Utjecaj srebrnih nanočestica na morske beskralježnjake: biološki učinci na modelima dagnje i ježinaca

Burić, Petra

Doctoral thesis / Disertacija

2018

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:217:200655

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Geološki odsjek

Petra Burić

UTJECAJ SREBRNIH NANOČESTICA NA MORSKE BESKRALJEŽNJAKE: BIOLOŠKI UČINCI NA MODELIMA DAGNJE I JEŽINACA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Geology

Petra Burić

IMPACT OF SILVER NANOPARTICLES ON MARINE INVERTEBRATES: BIOLOGICAL EFFECTS ON MUSSEL AND SEA URCHIN MODELS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Geološki odsjek

Petra Burić

UTJECAJ SREBRNIH NANOČESTICA NA MORSKE BESKRALJEŽNJAKE: BIOLOŠKI UČINCI NA MODELIMA DAGNJE I JEŽINACA

DOKTORSKI RAD

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

Zagreb, 2018.

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Geology

Petra Burić

IMPACT OF SILVER NANOPARTICLES ON MARINE INVERTEBRATES: BIOLOGICAL EFFECTS ON MUSSEL AND SEA URCHIN MODELS

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Assoc. Prof. Daniel Mark Lyons, PhD

Zagreb, 2018.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Laboratoriju za morsku nanotehnologiju i biotehnologiju Centra za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković, Rovinj, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Daniela Marka Lyonsa, u sklopu Interdisciplinarnog doktorskog studija iz Oceanologije pri Geološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc. Danielu Marku Lyonsu na iskazanu povjerenju, razumijevanju, savjetima te vremenu posvećenu momu znanstvenom radu. Uvijek ću mu biti zahvalna na prigodi koju mi je pružio te na potpori zbog koje sam činila sve sigurnije korake u znanstvenim i istraživačkim vodama. Zahvaljujem mu i kao voditelju Laboratorija za morsku nanotehnologiju i biotehnologiju na mogućnosti izrade disertacije na Institutu „Ruđer Bošković“ u Centru za istraživanje mora.

Zahvaljujem članovima povjerenstva, prof. dr. sc. Višnji Besendorfer, izv. prof. dr. sc. Biljani Balen i izv. prof. dr. sc. Maji Dutour Sikirić na korisnim uputama, brzini pri ispravljanju i poboljšanju ovog rukopisa.

Veliko hvala dr. sc. Loreni Perić na pokazivanju načina određivanja enzima i proteina te pomoći u laboratoriju u radu sa školjkašima. Ujedno joj zahvaljujem i na čitanju ove disertacije i svim korisnim komentarima za njezino poboljšanje.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Dijani Pavičić-Hamer na pomoći tijekom laboratorijskoga rada i na stručnim savjetima tijekom pisanja disertacije.

Zahvaljujem prijateljici i kolegici doc. dr. sc. Ines Kovačić na pomoći u obavljanju opsežna laboratorijskog posla.

Hvala prijateljici Katji Peruško na dostupnosti i raspravi oko ispravna hrvatskog prijevoda engleskih termina.

Zahvaljujem svojim obiteljima Burić, Rosanda i Lorencin koje su uvijek bile ovdje kada je bilo potrebno, uskakale u bilo koje doba ne pitajući zašto, preuzimale na sebe one svakidašnje sitnice koje ne bih stizala, olakšale mi sve ove godine istraživanja i pisanja, hrabrile me i na koje sam se uvijek mogla osloniti bez razmišljanja.

Za kraj zahvala onima bez kojih ovo ne bi bilo isto, mom Nenu i sinu Damianu.
Hvala vam na bezgraničnu strpljenju, odvlačenju pozornosti, razumijevanju svakoga onog trenutka u kojem sam teška srca morala reći „ne“ i nastaviti raditi iako bih se rado družila s vama.
Hvala vam na sreći i ljubavi koju mi pružate i kojom me okružujete. Zbog vas je osjećaj stavljanja točke na posljednju rečenicu u ovome radu još ljepši i posebniji.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Geološki odsjek

Doktorski rad

UTJECAJ SREBRNIH NANOČESTICA NA MORSKE BESKRALJEŽNJAKE: BIOLOŠKI UČINCI NA MODELIMA DAGNJE I JEŽINACA

Petra Burić

Laboratorij za morsku nanotehnologiju i biotehnologiju, Centar za istraživanje mora, Institut Ruđer Bošković, G. Paliage 5, Rovinj

Uz sve veću primjenu nanočestica u širokoj lepezi industrijskih i potrošačkih proizvoda povećana je mogućnost da će takve nanočestice dospjeti u vodeni okoliš, zadržati stabilnost kroz slatke vode te u konačnici dospjeti do morskog sustava. Osim toga, velika naselja u priobalnim područjima povećavaju vjerojatnost dospijeća nanočestica u estuarijske i morske vode zbog izravnog odljeva otpadnih voda. Posebice je za okoliš od velike važnosti odrediti ponašanje, sudbinu i utjecaj srebrnih nanočestica (AgNP) na biotu. Naime, srebro posjeduje antimikrobna svojstva te je u „nano“ obliku pronašlo primjenu u mnogim potrošačkim proizvodima. U tom kontekstu, cilj ove doktorske studije jest karakterizirati AgNP u morskoj vodi te ispitati njihov utjecaj na morske beskralježnjake: embrije ježinaca *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* i *Sphaerechinus granularis*. Pri tom je poseban naglasak stavljen na nisku, po okoliš relevantnu, koncentraciju AgNP različitih veličina. Nadalje, piretroidni insekticidi, koji se danas široko primijenjuju u različitim područjima poljoprivrede, rasadnicima, pri kontroli vrtnih štetočina u kućanstvu (posebice pri uklanjanju komaraca), također imaju potencijal za ulazak u otpadne i priobalne vode. Potencijalna interakcija između AgNP i tih insekticida može značajno povisiti toksičnost potonjeg. Stoga, ovaj doktorski rad također uključuje istraživanje biološkog učinka AgNP u kombinaciji s piretroidnim insekticidima, cipermetrinom i deltametrinom, na modelu školjkaša *Mytilus galloprovincialis* određivanjem aktivnosti enzima acetilkolinesteraze i glutation *S*-transferaze u škrgama te koncentracije metalotioneina u probavnoj žlijezdi dagnje.

(159 stranice, 47 slika, 5 tablica, 249 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: srebrne nanočestice, *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus*, *Sphaerechinus granularis*, *Mytilus galloprovincialis*, embrionalni razvoj ježinca, glutation *S*-transferaza, acetilkolinesteraza, metalotioneini, cipermetrin, deltametrin, citogenotoksičnost, oksidacijski stres.

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

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Višnja Besendorfer

izv. prof. dr. sc. Biljana Balen

izv. prof. dr. sc. Maja Dutour Sikirić

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Geology

Doctoral thesis

IMPACT OF SILVER NANOPARTICLES ON MARINE INVERTEBRATES: BIOLOGICAL EFFECT ON MUSSEL AND SEA URCHIN MODELS

Petra Burić

Laboratory for Marine Nannotechnology and Biotechnology, Center for Marine Research, Ruđer Bošković Institute, G. Paliaga 5, Rovinj

With the ever growing use of nanoparticles in a broad range of industrial and consumer applications there is an increasing likelihood that such nanoparticles will enter the aquatic environment and be transported through freshwater systems, eventually reaching marine waters. In addition, large population centres in near-coastal areas increases the probability of nanoparticles rapidly reaching estuarine and marine waters due to direct outflow of wastewater streams. Due to silver's known antimicrobial properties and widespread use of silver nanoparticles (AgNP) in consumer products, the latter's environmental fate and impact is therefore of particular concern. In this context, the aim of this doctoral study is to characterize AgNP in sea water and investigate the species-specific effects of low, environmentally-relevant, concentrations and different sizes of AgNP on marine invertebrate: sea urchin embryos of the species *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* and *Sphaerechinus granularis*. Further, pyrethroid insecticides, which are widely used today in a diverse range of applications from agriculture, to nurseries, urban structural and landscaping sites, residential homes' garden pest control and mosquito abatement, also have the potential to enter wastewater streams and coastal waters. The potenital interaction between AgNP and these insecticides may significantly increase the toxicity of the latter. Thus, this doctoral work also includes investigation of the effect of AgNP in combination with two commonly used pyrethroid insecticides, cypermetrin and deltametrin, in bivalve *Mytilus galloprovincialis* as a model by determination of the activity of two enzymes in mussel gills: acetylcholinesterase and glutathione *S*-transferase, and the concentration of metallothioneins in the digestive gland.

(159 pages, 47 figures, 5 tables, 249 references, original in Croatian)

Keywords: silver nanoparticles, *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus*, *Sphaerechinus granularis*, *Mytilus galloprovincialis*, urchin embryonal development, glutathione *S*-transferase, acetylcholinesterase, metallothioneins, cypermetrin, deltametrin, cytogenotoxicity, oxidative stress.

Supervisor: Assoc. Prof. Daniel Mark Lyons, PhD
Reviewers: Prof. Višnja Besendorfer, PhD
Assoc. Prof. Biljana Balen, PhD
Assoc. Prof. Maja Dutour Sikirić, PhD

SADRŽAJ

1. Uvod 1

1.1. Nanočestice 1
1.2. Piretroidni insekticidi 8
1.3. Ježinci kao modelni organizmi: *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* i *Sphaerechinus granularis* 10

1.4. Dagnja *Mytilus galloprovincialis* kao modelni organizam 15

2. Ciljevi i hipoteze istraživanja 17

3. Literaturni pregled 18

3.1. Stabilizacija nanočestica u suspenziji 18

3.2. Ponašanje i sudbina nanočestica u vodenom okolišu 20

3.3. Metode za karakterizaciju nanočestica u okolišnim matricama 23

3.4. Unos nanočestica u vodene organizme 28

3.4.1. Ježinac kao modelni organizam u ispitivanju utjecaja nanočestica 36

3.4.2. Dagnja kao modelni organizmi u ispitivanju utjecaja nanočestica 39

3.5. Utjecaj piretroidnih insekticida na vodene organizme 43

4. Materijali i metode 45

4.1. Kemikalije 45

4.2. Sinteza srebrnih nanočestica 46

4.3. Određivanje karakteristika srebrnih nanočestica 47

4.3.1. UV-Vis apsorpcijska spektroskopija 47

4.3.2. Određivanje veličine nanočestica dinamičkim raspršenjem svijetlosti 47

4.3.3. Određivanje koncentracije iona srebra spektrometrijom masa s induktivno spregnutom plazmom 48

4.3.4. Određivanje morfologije srebrnih nanočestica transmisijskom elektronskom mikroskopijom 48

4.4. Određivanje utjecaja srebrnih nanočestica na embrionalni razvoj ježinca 49

4.4.1. Sakupljanje ježinaca 49

4.4.2. Izdvajanje gameta ježinca injektiranjem 0.5 M kalijeva klorida i njihova oplodnja 49

4.4.3. Izdvajanje gonada ježinaca mehaničkim putem 51

4.4.4. Određivanje uspješnosti dosezanja stadija larvi ježinaca *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* i *Sphaerechinus granularis* nakon tretiranja zigota sa 60 nm AgNP u različitim stadijima embrionalnog razvoja 52

4.4.5. Određivanje uspješnosti dosezanja stadija larvi ježinaca *Arbacia lixula* i *Paracentrotus lividus* nakon tretiranja zigota s 10, 20, 40, 60 i 100 nm AgNP 53

4.4.6. Određivanje uspješnosti oplodnje jajnih stanica ježinaca *Arbacia lixula* i *Paracentrotus lividus* spermijima prethodno tretiranim sa AgNP te kvaliteta potomstva 54

4.4.7. Određivanje citogenoksičnosti na moruli ježinca *Arbacia lixula* 55

4.5. Određivanje kombiniranog učinka srebrnih nanočestica i piretroidnih insekticida (cipermetrina i deltametrina) na dagnju *Mytilus galloprovincialis* 57

4.5.1. Određivanje sposobnosti dagnji za preživljavanje na zraku nakon tretmana sa srebrnim nanočesticama 57

4.5.2. Određivanje stabilnosti lizosomalne membrane hemocita dagnje nakon tretmana sa srebrnim nanočesticama 57

4.5.3. Izlaganje dagnji srebrnim nanočesticama, cipermetrinu, deltametrinu i njihovim kombinacijama u uvjetima *in vivo* 59

4.5.3.1. Određivanje aktivnosti enzima acetilkolinesteraze u škrgama dagnji nakon tretmana sa srebrnim nanočesticama, cipermetrinom, deltametrinom i njihovim kombinacijama ……....60

4.5.3.2. Određivanje aktivnosti enzima glutation *S*-transferaze u škrgama dagnje nakon tretmana sa srebrnim nanočesticama, cipermetrinom, deltametrinom i kombinacijama 61

4.5.3.3. Određivanje koncentracije metalotioneina u probavnoj žlijezdi dagnje nakon tretmana sa srebrnim nanočesticama, cipermetrinom, deltametrinom i njihovim kombinacijama ...62

4.6. Statistička obrada podataka 63

5. Rezultati 65

5.1. Fizikalno-kemijska karakterizacija srebrnih nanočestica 65

5.1.1. Praćenje nastajanja nanočestica primjenom UV-Vis apsorpcijske spektroskopije 65

5.1.2. Određivanje veličine nanočestica dinamičkim raspršenjem svijetlosti 68

5.1.3. Određivanje specijacije srebra spektroskopijom masas induktivno spregnutom plazmom 71

5.1.4. Određivanje morfologije srebrnih nanočestica transmisijskom elektronskom mikroskopijom 72

5.2. Utjecaj srebrnih nanočestica na embrionalni razvoj ježinaca 73

5.2.1. Embrionalni razvoj ježinaca *Arbacia lixula*, *Paracentrotus. lividus* i *Sphaerechinus granularis* nakon tretmana sa 60 nm-AgNP u različitom razvojnom stadiju 73

5.2.2. Embrionalni razvoj ježinaca *Arbacia lixula* i *Paracentrotus lividus* nakon tretmana zigote sa srebrnim nanočesticama različitih veličina 81

5.2.3. Uspješnost oplodnje ježinaca *Arbacia lixula* i *Paracentrotus lividus* te embrionalni razvoj nakon tretmana sperme sa srebrnim nanočesticama različitih veličina.....87

5.2.4. Citogenetički učinak srebrnih nanočestica na stadij morule ježinca *Arbacia lixula*.....94

5.3. Rezultati ispitivanja kombiniranog učinka srebrnih nanočestica i insekticida na dagnji *Mytilus galloprovincialis* 103

5.3.1. Preživljavanje dagnji na zraku nakon tretmana sa srebrnim nanočesticama 103

5.3.2. Sposobnost zadržavanja neutralnog crvenila u lizosomima hemocita dagnje nakon tretmana sa srebrnim nanočesticama 105

5.3.3. Aktivnost enzima acetilkolinesteraze u škrgama dagnje nakon tretmana sa srebrnim nanočesticama i insekticidima 106

5.3.4. Aktivnost enzima glutation *S*-transferaze u škrgama dagnje nakon tretmana sa srebrnim nanočesticama i insekticidima 108

5.3.5. Koncentracija metalotioneina u probavnoj žlijezdi dagnje nakon tretmana sa srebrnim nanočesticama i insekticidima 109

6. Rasprava 112

6.1. Ponašanje srebrnih nanočestica u obalnim vodama.....112

6.2. Utjecaj srebrnih nanočestica na embrionalni razvoj ježinaca.....115

6.3. Utjecaj srebrnih nanočestica u kombinaciji s insekticidima na enzimski sustav i metalotioneine u dagnji.....127

7. Zaključci 137

8. Literatura 139

1. UVOD

1. Uvod

1.1. Nanočestice

Materijal zrnate ili slojevite strukture, sastavljen od gradivnih čestica (zrna, kristala ili slojeva) dimenzija od 1 do 100 nm, naziva se nanostrukturiranim materijalom (Farré i sur., 2011). Prema preporuci Europske komisije iz 2011. godine **nanomaterijali** (NM) se definiraju kao prirodni ili industrijski proizvedeni materijali koje sadrže čestice u nevezanom stanju, u obliku aglomerata ili agregata, a barem 50% takvih čestica ima najmanjejednu vanjsku dimenziju manju od 100 nm (EC, 2011). Ovisno o broju dimenzija u rasponu od 1 – 100 nm, NM se mogu podijeliti na „pseudo-1D, pseudo-2D i pseudo-3D NM". „Pseudo-1D NM" sadrži jednu dimenziju raspona između 1 i 100 nm, a pri tom je duljina čestice važna dok je promjer relativno nebitan (npr. nanocjevčice). „Pseudo-2D NM" jesu nanopločice koje sadrže dvije dimenzije u rasponu od 1 – 100 nm, a pri tom je bitna njihova duljina i širina, ali ne i debljina. Te u konačnici „pseudo-3D NM" su čestice koje imaju sve tri dimenzije u rasponu od 1 – 100 nm, poput primjerice nanočestica i kvantnih točaka (Njugunja i sur., 2014). Nadalje, NM se mogu podijeliti i prema kemijskom sastavu od kojeg su građeni i to na organske (polimerni NM), ugljikove (ugljikove nanocjevčice, grafen, fulereni) i anorganske (metali, metalni oksidi) i kompozitne (građene od jezgre i ljuske, npr. CdSe@ZnS ili Ag@Au) NM (Farré i sur., 2011).

Nanočestice se uglavnom klasificiraju na temelju veličine, morfologije, sastava, homogenosti te aglomeracije, a obzirom na kemijska i elektrokemijska svojstva mogu postojati kao dispergirani aerosolovi, suspenzije/koloidi te u obliku aglomerata (Buzea i sur., 2007). Svojstva nanočestica uvelike se razlikuju od svojstava drugih malih molekula. Naime, nakupina nanočestica češće se smatra kompleksnom smjesom negoli „malom molekulom" (Christian, 2008). O veličini nanočestice ovise njezina fizikalna svojstva (točka taljenja, električna vodljivost) i reaktivnost (primjerice katalitička aktivnost, kapacitet adsorpcije). Svojstva koja posjeduju nanočestice nekog materijala znatno se razlikuju od svojstava koja posjeduje makroskopski materijal iste tvari.

Od samih početaka života na zemlji čestice nano veličine prisutne su u okolišu i organizmima koji u njemu obitavaju. Primjerice, biogeni magnetit prirodno je prisutan nano materijal koji se može pronaći u mnogim vrstama, od bakterija i protozoa, pa sve do životinja (Banfield i Zhang, 2001). Nadalje, biološki model nano materijala može se pronaći i u

feritinu. Naime, feritin je protein veličine 12 nm koji sadrži željezo, a unutar zaštitne proteinske ljuske sadrži fosfate željezova oksida veličine od 5 do 7 nm (Domínguez-Vera i Colacio, 2003). Erupcijom vulkana i šumskim požarima nastaju materijali nano veličine, uključujući fulerene (Farré i sur., 2011). Prirodno prisutne nanočestice ne predstavljaju prijetnju organizmima na zemlji budući se oni s njima susreću od davnina. Ono što može predstavljati opasnost po žive organizme, samim time i čovjeka, jesu tzv. **umjetno proizvedene nanočestice (engl. *engineered nanoparticles,* ENP)** koje su osmišljene i dizajnirane s posebnom namjerom i željom bilo za jačom reaktivnošću (kataliza) i interakcijom s prirodnim membranama (biomedicina ili kozmetika) ili za većom mogućnošću prolaska ciljanih bioloških molekula. Upravo zbog svoje namjene, nanočestice ukoliko se nađu u okolišu u mogućnosti su ispoljiti učinak suprotan njihovoj prvotnoj namjeni. Razlika između prirodnih i umjetno proizvedenih, antropogenih nanočestica je polidisperznost i kemijska složenost prirodnih čestica u usporedbi s često monodispreznim i točno kemijski definiranim umjetno proizvedenim nanočesticama. Međutim, bez obzira na njihove međusobne razlike, za obje vrste nanočestica primjenjiva su ista toksikološka načela (Oberdörster i sur., 2005).

Svojstvo koje nanočestice čini posebno zanimljivima, a moguće i opasnima jest veliki omjer površine nanočestice naspram njezina volumena. Površina nanočestice određuje njezino ponašanje u okolišu, odnosno interakciju nanočestice s tvarima koje se nađu u neposrednoj blizini. Već je prethodno spomenuto kako se svojstva nanočestice uvelike razlikuju od materijala većih dimenzija (engl. *bulk material*) od kojeg su dobivene. Naime, na površini nanočestice nalazi se puno više atoma koji mogu stupati u kemijske interakcije s tvarima s kojima dođu u doticaj, u usporedbi s krupim materijalom od kojega su nanočestice dobivene. Upravo taj veliki omjer površine nanočestica naspram njihovog volumena čini ih vrlo pogodnim katalizatorima. Materijali pripremljeni u nano obliku mogu imati puno veću aktivnost u katalitičkim procesima od makro-materijala iste tvari. Tako primjerice materijal koji ima slabu katalitičku aktivnost, poput zlata, može postati vrlo dobar katalizator redoks reakcija ako se koristi u nano obliku (Daniel i Astruc, 2004).

Iako bi se zbog male veličine i Brownovog gibanja moglo zaključiti da nanočestice ostaju dobro raspršene u suspenziji, one se zapravo, zbog velike površinske reaktivnosti, nakupljaju ukoliko se nađu u neposrednoj blizini. Da bi se spriječilo agregiranje nanočestica, njihova površina se kemijski modificira spojevima koji povećavaju elektrostatsko odbijanje

(npr. citrat) ili sterički (poput primjerice razgranatog polietilenimina, tzv. BPEI ili albumina iz goveđeg seruma) ometaju agregiranje čestica. Često se nanočesticama dodaju razne kemijske i biološke funkcionalne skupine zbog bolje disperzije u željenome mediju te radi postizanja i održavanja željene koncentracije (kako ne bi dolazilo do nakupljanja nanočestica) ili zbog njihove učinkovitije primjene u medicinske svrhe (kako bi nanočestice s vezanom skupinom lakše pronašle ciljano mjesto djelovanja, primjerice tumorsku stanicu). Površina nanočestice može biti funkcionalizirana raznim metalnim ionima, molekulama amina, fosfina, karboksilata i tiola, surfaktantima (poput natrij dodecil sulfata – SDS, cetil trimetilamonijeva bromida – CTAB), polimerima (npr. polivinilpirolidonom – PVP, polietileniminom – PEI, polietilen oksid – polipropilen oksid blok kopolimerima – PEO-PPO) ili biološkim molekulama poput albumina iz goveđeg seruma (Levard i sur., 2012; Levak i sur., 2017). Nanočestica je građena iz dva ili tri sloja: površinski dio (na koji su često vezane razne skupine), materijal ljuske (koji se također može dodati ciljano) i materijal jezgre nanočestice. Kada se govori o nanočesticama najčešće se misli na svojstva koja posjeduje osnovna jezgra čestice. Međutim u okolišu gdje nanočestice dolaze u kontakt sa živim organizmima situacija je nešto drugačija. Sudbina, ponašanje i toksičnost nanočestice u okolišu ne ovise samo o značajkama njezine jezgre. Vrlo je malo vjerojatno da će jezgra nanočestice, koja posjeduje površinsku modifikaciju ili omotač nastao adsorbiranjem iz okoliša, igrati ključnu ulogu u njezinome ponašanju u okolišu. Tijekom toksikoloških ispitivanja uvijek se mora uzeti u obzir nanočestica u cjelini, sa svim tvarima koje su na nju dodane, jer možda upravo te funkcionalne skupine olakšavaju transport nanočestice u stanicu, a samim time i povećavaju njezinu toksičnost (Grillo i sur., 2015). Moguća je i obrnuta situacija, tj. da nanočestice s pojedinim grupama imaju otežan ili pak nikakav pristup stanici, čime je smanjena njihova toksičnost. Međutim, govoriti o povećanoj toksičnosti nanočestica zbog njihove dostupnosti, odnosno mogućnosti ulaska u stanicu, nije uvijek ispravno - primjerice u medicinske svrhe upravo je i cilj omogućiti dostupnost nanočestice pojedinim stanicama radi ciljanog djelovanja (Bashir, 2004).

Kao što je već prethodno spomenuto, čestice nano-dimenzija prisutne su svuda oko nas, a izloženost njihovom djelovanju znatno je porasla tijekom posljednjih nekoliko godina zbog povećanog broja antropogenih izvora nanočestica (ENP). Osnovni razlog tome je činjenica da nanočestice posjeduju **nova svojstva** potencijalno primjenjiva u industriji. **Umjetno proizvedene nanočestice** u posljednjih nekoliko godina pronašle su primjenu u mnogim

industrijskim granama poput elektronike, biomedicine, agrikulture, tekstilne, kemijske, farmaceutske i prehrambene industrije, zatim sanaciju voda i tla (Som i sur., 2011). Najveća prijetnja za okoliš, samim time i organizmima koji u njemu žive, jesu ENP koje se danas već uvelike primjenjuju u industriji, poput: nanočestica titanijeva dioksida (TiO_2 NP), srebra (AgNP), silicijeva dioksida (SiO_2 NP), cerijeva dioksida (CeO_2 NP) te nanočestice željeza/željezova oksida (Fe/Fe_2O_3 NP) (Pisino i sur., 2015). Internetski portal Projekata o novim nanotehnologijama (*The Project of Emerging Nanotechnology*) objavio je listu potrošačkih proizvoda koji sadrže nanomaterijal (*Consumer Products Inventory*) koja je 2013. godini sadržavala 1814 proizvoda iz čak 622 tvrtke u 32 zemlje. U kategoriju Zdravlje i Fitnes svrstana je većina proizvoda (točnije 762, ili 42%). Srebro je najčešće korišteni nanomaterijal s trenutnim udjelom od 24% tržišta (Vance i sur., 2015). Tako se primjerice nanokompozitni materijali sastavljeni od srebra i silicija, danas često primjenjuju u medicinske svrhe za suzbijanje mikrobnog djelovanja (Sondi i Salopek-Sondi, 2004). Za srebrne nanočestice, odnosno srebro kao metal, poznato je već dugi niz godina da posjeduje vrlo jaka antimikrobna svojstva (Egger i sur., 2009). U posljednjih nekoliko godina razvijen je veliki broj nanomaterijala s jezgrom silicija koji se primjenjuje u polju biologije i biomedicine, u svrhu detekcije i fluorescentne dijagnostike (Zhao i sur., 2013). Osim toga, kvantne točke (engl. *quantum dots*, QD) CdSe/ZnS su sićušne čestice koje emitiraju svjetlost na nanometarskoj skali i kao takve pronašle su primjenu u biomedicini, odnosno tzv. „nanodijagnostici“ kao fluorescentne probe (Smith i sur., 2008). Za zlatne nanočestice (AuNP) istražuje se moguća primjena u biomedicini kao fluorescentnih proba za detekciju ili kemoterapijsko uništenje tumorskih stanica (Wu i sur., 2010). U zadnja tri desetljeća ulaganja u industriju proizvodnje i primjenu nanočestica sve su veća (tzv. nano-industrija ili nanotehnologija), međutim dostupni podaci o trenutnoj proizvodnji i primjeni nanočestica rijetki su i često proturječni. Procjena proizvodnje ENP za 2004. godinu bila je 200 tona, a predviđeno je da će ta količina porasti na 58 000 tona u periodu od 2011. do 2020. godine (Matranga i Corsi, 2012).

Povećanom upotrebom ENP raste i zabrinutost šire javnosti kako bi one mogle dospjeti u okoliš u količini dostatnoj za izazivanje negativnog učinka na organizme (Dwivedi i sur., 2015). Umjetno proizveden nanomaterijal može dospjeti u okoliš iz više razloga. Za vrijeme upotrebe ili prestankom upotrebe proizvoda koji sadrži ENP, one mogu biti ispuštene posredno u okoliš, na primjer, kroz sustav otpadnih voda kućanstava ili industrijskim izljevima, atmosferskim donosom, razgradnjom materijala koji sadrži nanočestice pod

utjecajem vremenskih uvjeta, otjecanjem kišnice te uslijed sanacije tla i odlagališta otpada (Kahru i Dubourguier, 2010; Matranga i Corsi, 2012) (Slika 1). U okolišu, nanočestice se mogu stabilizirati s prirodno prisutnom organskom tvari, transformirati i prijeći u stabilniji (manje reaktivni) oblik ili ostati reaktivne (otpuštati ione sa svoje površine) prije prijenosa na veće udaljenosti. Posljedično, intenzivno istraživanje ponašanja i distribucije ENP u okolišu usmjereno je na slatkovodne sustave (jezera, rijeke i podzemne vode) zbog očekivanja da će ENP ostati dispergirane u slatkovodnim sustavima, te će predstavljati veliku prijetnju živom svijetu u tim dijelovima okoliša. Zbog velikog omjera površine prema masi, nanočestice često bivaju adsorbirane na sediment i čestice tla te time postaju imobilizirane (Cleveland i sur., 2012). Trošenjem sedimenta može doći do ponovne resuspenzije nanočestica i njihovog transporta. Prilikom transporta nanočestice mogu biti unešene u organizme te može doći do njihove biomagnifikacije (Bouldin i sur., 2008; Holbrook i sur., 2008). Stabilnost nanočestica u slatkim vodama proizlazi iz stabilizacije ENP prirodnom organskom tvari (engl. *natural organic matter*, NOM), poput humične i fulvične kiseline, izvanstaničnom polimernom tvari porijeklom iz algi te zbog niske ionske jakosti medija (Chen i sur., 2011; Grillo i sur., 2015). Nadalje, u slučaju prijenosa nanočestica iz slatkovodnog sustava do estuarija ili eventualno obalnih morskih voda, dolazi do njihova razrjeđenja zbog čega se značajno smanjuje rizik od toksičnog učinka. Raspodjela ENP u ušćima rijeka i priobalnim vodama još uvijek nije u potpunosti jasna. Djelomičan razlog tome mogu biti jaki gradijenti temperature, slanosti, gustoće, pH, sadržaja otopljenog kisika, neprozirnosti te prisutnosti kompleksih smjesa prirodne organske tvari (npr. humične i fulvične kiseline te alginata i polisaharida) u vodenom stupcu preko prijelazne zone od slatke i boćate vode do mora. Budući da mnogi estuarijski sustavi sadrže muljevita tla i močvare bogate raznolikim životom, koji su često pod posebnom zaštitom, postaje jasna važnost razumijevanja ponašanja i sudbine nanočestica kao novih potencijalnih onečiščivala u tim područjima.

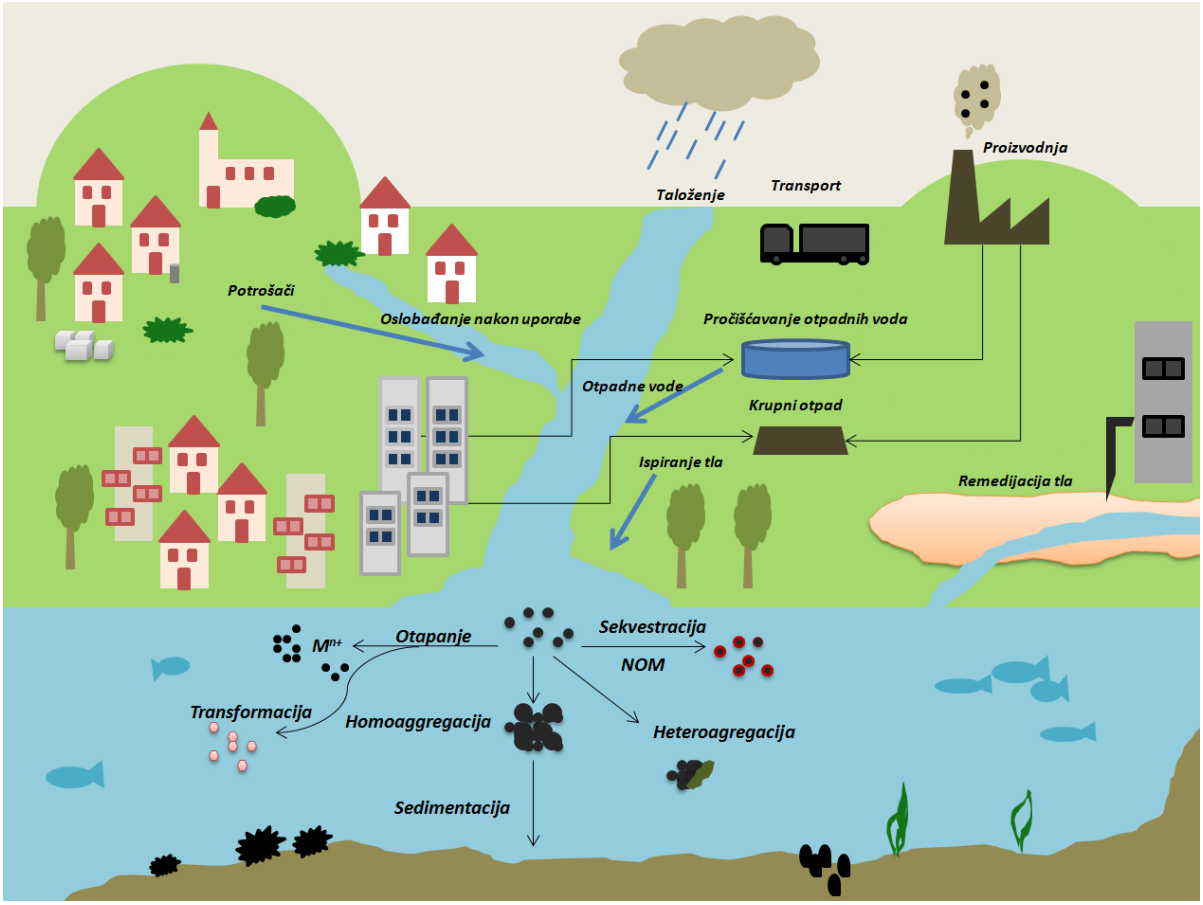
U brojim istraživanjima komercijalno važni morski organizmi, poput školjkaša, ježinaca, rakova i riba, pokazali su sposobnost unosa i nakupljanja ENP na razne načine: filtriranjem vode, disanjem, skladištenjem hrane ili prijenosom kroz hranidbeni lanac između plijena i predatora. Umjetno proizvedene nanočestice uzrokovale su niz nepovoljnih učinaka u vodenim organizmima, uključujući poremećaje funkcije stanične membrane (koja utječe na prijenos hranjivih tvari u stanicama), stvaranjem reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS), narušavanje integriteta molekule DNA te razgradnju proteina

(Matranga i Corsi, 2012) (Tablica 1). Bioakumulacija ENP i njihov trofički prijenos kroz hranidbeni lanac u moru i bočatoj vodi predstavljaju još jednu razinu prijetnje. Brojna istraživanja su pokazala da se ENP mogu uspješno prenijeti iz nižih jednostavnijih u više složenije organizme te time ukazale na potencijalnu opasnost čak i za čovjeka (Holbrook i sur., 2008; He i sur., 2012; Yoo-iam i sur., 2014).

Danas je već poznato da AgNP uzrokuju stvaranje ROS-ova i snižavanje koncentracije glutationa (GSH) u ljudskim stanicama jetre (Piao i sur., 2011). U istraživanjima je dokazano da se u ljudskoj jetri nakupljaju i AuNP, koje uzrokuju oštećenja DNA stanica jetre (Fraga i sur., 2013). Nanočestice titanijeva oksida pokazale su citotoksično, genotoksično i hemolitičko djelovanje na ljudske limfocite i eritrocite (Ghosh i sur., 2013). Posebno u obzir valja uzeti one nanočestice koje prilikom proizvodnje mogu dospjeti u zrak te biti inhalirane u dišni sustav te se u konačnici nakupljati u plućima radnika u pogonu proizvodnje samih nanočestica (Kendall i Holgate, 2012).

Srebro se već dugi niz godina primjenjuje u industriji materijala, no tek u posljednjih nekoliko godina pronašlo je primjenu u nano-obliku **srebrnih nanočestica (AgNP)** prvenstveno zbog svojih antimikrobnih svojstava. Naime, AgNP su danas najčešće korišten nanomaterijal na tržištu potrošačkih nano-proizvoda, od kozmetike i prehrambenih aditiva do sustava za pročišćavanje otpadnih voda, te elektronskih i medicinskih aparata s proizvodnjom od 500 tona na godinu (Wijnhoven i sur., 2009). Na temelju $L(E)C_{50}$ vrijednosti ENP na okolišno važne organizme, AgNP su klasificirane kao iznimno toksične ($L(E)C_{50} < 0.1$ mg l^{-1}) i općenito su pokazale najveći toksični učinak na vodene organizme (Kahru i sur., 2010; Bondarenko i sur., 2013). Srebrne nanočestice mogu ostati relativno stabilne prolaskom kroz slatkovodni sustav rijeka i jezera jer bivaju modificirane s otopljenom organskom tvari (engl. *dissolved organic matter*, DOM) prisutnom u vodi te mogu dospjeti do estuarijskog i morskog okoliša gdje s vremenom nastupa proces sedimentacije. S druge strane, moguć je i direktni unos srebrnih nanočestica u obalne vode koji uključuje kanalizacijske ispuste, obalne septičke jame te ispuste raznih industrija iz priobalnih urbanih sredina. U tim dijelovima okoliša sudbina i ponašanje AgNP još uvijek nisu poznati. Stoga je od iznimne važnosti utvrditi način djelovanja AgNP na žive organizme koji tu prirodno obitavaju. Odnosno, potrebno je odrediti njihov ekotoksikološki potencijal (Chinnapongse i sur., 2011). Budući je morska voda visoke ionske jakosti, AgNP, zbog svojih fizikalno-kemijskih osobina, najčešće aglomeriraju, agregiraju i bivaju uhvaćene u organskoj tvari te se talože na dno mora. To osnovno

ponašanje AgNP u estuarijima i priobalnoj vodi može biti promijenjeno interakcijom s DOM-om (npr. alginatom, huminskom ili fulvinskom kiselinom), ali i s produktima industrijske proizvodnje, poput primjerice citratnih iona ili proteina (Angel i sur., 2013; Dobias i Bernier-Latmani, 2013; António i sur., 2015).



Slika 1. Pojednostavljeni prikaz izvora i emisije nanomaterijala u okoliš. Umjetno proizvedene nanočestice bivaju otpuštene u okoliš tijekom svog životnog ciklusa, što uključuje: otpuštanje iz industrijskih postrojenja za vrijeme proizvodnje, otpuštanje iz proizvoda koji se više ne koriste, otpuštanje tijekom/ili nakon tretmana pročišćavanja otpadnih voda. Skraćenica NOM odnosi se na prirodnu organsku tvar (engl. *natural organic matter*, NOM).

Upravo tvari koje čine omotač AgNP kontroliraju proces aglomeracije te imaju ključnu ulogu u kinetici oksidativnog otapanja, tj. otpuštanja srebrnih iona s površine nanočestica. Osim toga na otpuštanje iona s površine nanočestica utječe i povišena temperatura okoliša, dok povišena pH vrijednost te prisutnost humične/fulvične kiseline smanjuju brzinu njihovog oksidativnog otapanja (Liu i Hurt, 2010; Hadioui i sur., 2013). Nadalje, biodostupnost, unos i

nakupljanje ENP u organizmu od iznimne su važnosti u definiranju njihovog toksikološkog potencijala trofičkim prijenosom kroz hranidbeni lanac (Ward i Kach, 2009; Behra i sur., 2013; Croteau i sur., 2014).Većina istraživanja učinka AgNP na vodene organizme provedena je na slatkovodnim sustavima i vrstama. S druge strane, vrlo malo radova dostupno je o utjecaju i eventualnoj toksičnosti AgNP na morske vrste, posebice beskralježnjake (Bianchini i sur., 2007; Ringwood i sur., 2010; Gomes i sur., 2014).

1.2. Piretroidni insekticidi

Dosadašnje toksikološke studije na dagnji *Mytilus galloprovincialis* već su ukazale na negativan učinak AgNP na razini organizma i na staničnoj i molekularnoj razini (Gomes i sur., 2013; Gomes i sur., 2014; Munari i sur., 2014). Štetan učinak AgNP na dagnjama u većini istraživanja ukazao je na prisutnost oksidacijskog stresa u organizmu te povišene ili snižene aktivnosti antioksidacijskih enzima (poput superoksid dizmutaze, katalaze, glutation S-transferaze, peroksidaza i sl.) (Canesi i sur., 2011). Stoga je u ovome doktoratu u obzir uzeto još jedno zagađivalo prilikom ispitivanja kombiniranog učinka piretroidnih insekticida i AgNP na dagnji. Naime, piretroidni insekticidi se danas uvelike primjenjuju u poljoprivredi, za tretiranje travnatih površina na komercijalnim i stambenim područjima s krajnjim ciljem suzbijanja širokog raspona štetnih insekata (naročito komaraca). Osim toga široku su primjenu pronašli i u akvakulturi, posebice u uzgoju lososa za suzbijanje zaraza ribljih parazita (npr. *Lepeophtherius salmonis* i *Caligus elongatus*) (Ernst i sur., 2001; Carne i sur., 2011). Sintetički piretroidi su porodica kiralnih pesticida s velikim brojem stereoizomera. Primjena sintetičkih piretroida u porastu je u Sjedinjenim Američkim Državama zbog toga što se koriste kao zamjena za druge štetne insekticide, poput organofosfata, organoklorida i karbamata jer su dokazano manje toksični za ptice i sisavce, iako su nažalost svi toksični za vodene organizme, uključujući ribe (DeLorenzo i sur., 2014; Guardiola i sur., 2014). Još jedna velika prednost piretroidnih insekticida u usporedbi s ostalima je njihova velika brzina biorazgradnje u vodenom stupcu (Ayad i sur., 2011). Piretroidni insekticidi mogu dospijeti u vodeni okoliš taloženjem komercijalnih proizvoda-raspršivača iz zraka te kroz sustav za otjecanje i pročišćavanja otpadnih voda ili pak ciljanim direktnim unosom (USEPA, 2005). **Cipermetrin,** punog kemijskog naziva α-cijano-3-fenoksibenzil 1-*cis*,*trans*-3-(2,2-diklorovinil)-2,2 dimetilkloropropan karboksilat, jedan je od vrlo često primjenjivanih

sintetičkih insekticida, skraćeno ga se označuje i s „CYP“, a primjenjuje se na raznim poljoprivrednim kulturama za suzbijanje raznih štetnika, poput komaraca, grozdovih moljaca, lisnih ušiju i kruškinih buha (Ayad i sur., 2011). Nadalje, cipermetrin se kao licencirani piretoid pod nazivom Excis® može pronaći na škotskom tržištu gdje se primjenjuje za suzbijanje tzv. morskih uši (engl. *sea lice*) na uzgajanim lososima pri čemu dolazi do izlaganja i neciljnih organizama, posebno dagnji u blizini uzgojnih instalacija i kaveza. Cipermetrin djeluje na način da interferira s Na-K pumpom (enzim Na^+, K^+ ATPaza), koja regulira prijenos iona natrija i kalija kroz ionske kanale membrane živčanih i mišićnih stanica i na taj način ometa normalno provođenje živčanog impulsa i mišićne kontrakcije. Naime, uslijed djelovanja cipermetrina na Na-K pumpu, ionski kanali ostaju otvoreni do nekoliko sekundi nakon prijenosa živčanog impulsa, što je vrlo veliki period u usporedbi s normalnim periodom od svega nekoliko milisekundi. Posljedica ovakvih dugotrajnih i repetitivnih podražaja jest smrt organizma (Ayad i sur., 2011). Poput ostalih piretroida, cipermetrin ima vrlo kratko vrijeme zadržavanja u vodenom stupcu (općenito manje od dva dana) te se brzo adsorbira na otopljenu čestičnu tvar ili na sediment, što u velikoj mjeri umanjuje njegovu biodostupnost organizmima koji žive u vodenom stupcu (Ayad i sur., 2011). Međutim, potencijalna opasnost javlja se za bentičke vrste poput dagnji i ježinaca koji mogu biti izloženi direktnim kontaktom ili unosom kontaminirane čestične tvari i čestica sedimenta tijekom filtriranja morske vode (Ayad i sur., 2011). Nadalje, nekoliko je studija već dokazalo kako su vodeni beskralježnjaci i ribe iznimno osjetljivi na cipermetrin i ostale piretroide insekticide općenito (Svodoba i sur., 2003; Aydin i sur., 2005; Ayad i sur., 2011). **Deltametrin** nastaje esterifikacijom 2,2-dimetil-3-(2,2-dibromovinil) ciklopropankarboksilne kiseline (nazvane još i krizantemična kiselina) s α-cijano-3-fenoksibenzilnim alkoholom. Dakle, deltametrin je sintetički analog ostalih piretroida, dobiven prirodnom ekstrakcijom iz dalmatinskog buhača *Tanacetum cinerariifolium* te modificiran na način da posjeduje bolju stabilnost u okolišu (Guardiola i sur., 2014). Ta je tvar neurotoksin koja djeluje na jednak način kao i piretroid cipermetrin, tj. interferira s Na-K pumpom u perifernom živčanom sustavu organizma, ciljano u člankonožaca poput raznih ribljih parazita. Izlaganje deltametrinu uzrokuje opetovano okidanje živčanih impulsa te povišeni i dugotrajan akcijski potencijal koji može preopteretiti mišiće, što u konačnici rezultira paralizom i smrću organizma (Crane i sur., 2011). Iako, se prvotno smatralo da je manje toksičan od ostalih piretroida, mnogobrojna istraživanja ukazuju na njegovu toksičnost u laboratorijskim

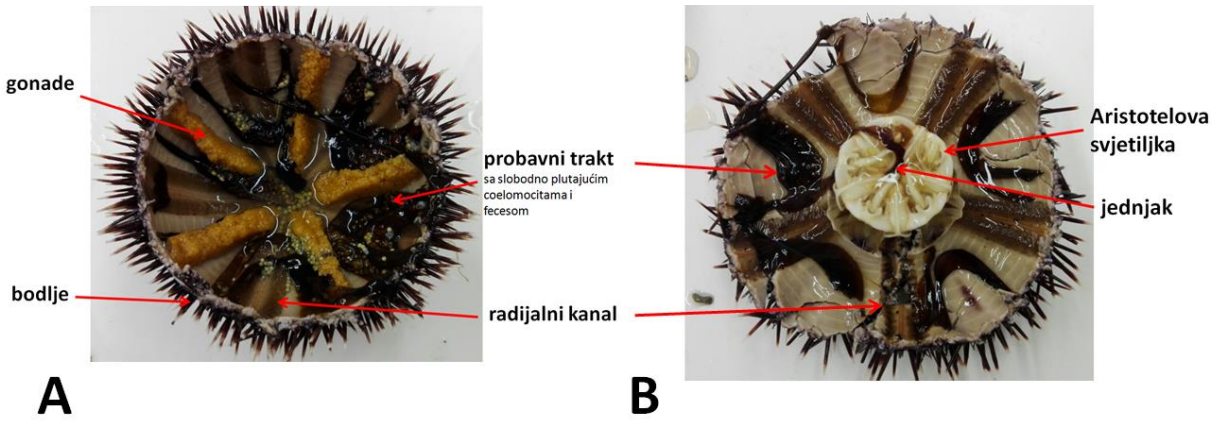
uvjetima te na neciljanim organizmima u okolišu (Bhuya i sur., 1992; Husain i sur., 1994; Kontrezecky i sur., 1997; Tu i sur., 2012; Guardiola i sur., 2014; Gharred i sur., 2015).

U konačnici, budući da AgNP i pesticidi mogu biti istovremeno prisutni u okolišu, postavlja se pitanje njihova međudjelovanja i mogućeg kombiniranog toksičnog učinka na neciljne organizme, poput ježinaca i dagnji što do danas nije proučavano.

1.3. Ježinci kao modelni organizmi: *Arbacia lixula, Paracentrotus lividus i Sphaerechinus granularis*

Ježinci su rasprostranjeni organizmi koji se često koriste u istraživanjima razvojne biologije te kao bioindikatorska vrsta (Ozretić i sur., 1998; Tomšić i sur., 2010; Anselmo i sur., 2012; Camballeira i sur., 2012).

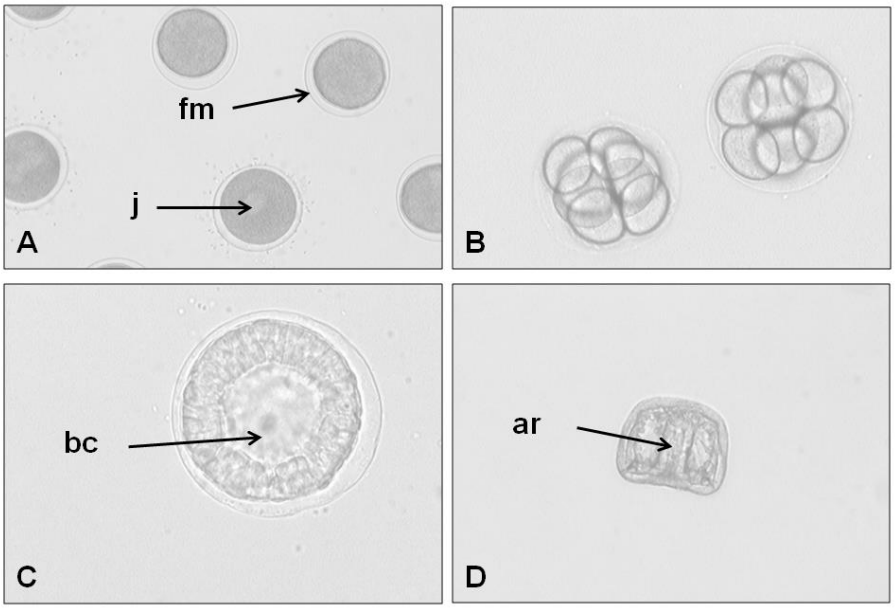
Ježinci spadaju u koljeno Echinodermata – bodljikaši i razred *Echinoidea* - ježinci. Osnovna karakteristika ježinaca jest radijalna, petokraka simetrija tijela (Slika 2). Tijelo im je građeno od usnog, donjeg dijela i gornjeg, leđnog dijela na kojemu se nalaze spolni otvori, a u većine vrsta i crijevni otvor (tzv. oralna i aboralna strana ježinca). U sredini usne ploče nalaze se usta s pet dobro vidljivih zubaca u obliku dlijeta, koji čine dio složenog aparata za žvakanje, tzv. Aristotelova svjetiljka. Oko ustiju nalazi se mekši dio ježinca, tzv. peristomialna membrana, te mnogo usnih nožica (tzv. pedicelarija) i manjih bodlji pomoću kojih se ježinac kreće. Živčani sustav u ježinca je djelomice zakržljao i očuvan je samo njegov površinski, ambulakralni dio. Iako su neke od ambulakralnih nožica preobražene u ticala, ježinci nemaju posebne osjetilne organe. U unutrašnjosti čahure nalazi se velika tjelesna šupljina na mnogim mjestima obložena trepetljikavim epidermom. Tekućina kojom je šupljina ispunjena slična je morskoj vodi, a u njoj se nalaze slobodno plivajuće stanice coelomociti (fagocitni leukociti), koje slobodno prolaze kroz različite organe. Coelomocite u ježinaca služe za izlučivanje te nakupljanje pigmentnih zrnaca. Ježinci su razdvojena spola. Njihovi spolni organi nalaze se slobodni u tjelesnoj šupljini, dok spolne stanice izlaze izravno u vodu u kojoj se zatim odvija oplodnja. Larve ježinaca slobodno plivaju u moru oko mjesec dana (ovisno o vrsti), nakon čega slijedi njihov prihvat za podlugu te u konačnici metamorfoza u odrasli, sesilni organizam (Turk, 2011).



Slika 2. Presijek ježinca *S. granularis:* A. Prikaz organa u šupljini čahure. B. Prikaz Aristotelove svjetiljke i okolnih organa.

Slijedi sažeto objašnjenje embriologije ježinaca kako bi se nadalje moglo raspravljati o različitim razvojnim stadijima te njihovim specifičnostima. Nekoliko razvojnih stadija vrste *P. lividus* prikazano je na Slici 3. Naime, stvaranje fertilizacijske membrane nastupa u prvim minutama nakon oplodnje (Slika 3A). Fertilizacijska membrana jednostavno je uočljiva u nekih vrsta poput primjerice *Paracentrotus lividus* i *Sphaerechinus granularis* dok je ista manje uočljiva u vrsti *Arbacia lixula* (Cornwal, 1980). Nakon oplodnje i pojave fertilizacijske membrane nastupa proces nazvan fuzija jezgre (engl. *nuclear fusion*), koji nastupa između 30 i 45 min nakon oplodnje u većine ježinaca. Nadalje, tijekom brze i opetovane mitotičke diobe stanica jednostanična zigota postaje višestanični embrij. Prva dioba, koja daje dvije stanice po zigoti nastupa, ovisno o vrsti, između 60 i 90 min nakon spajanja gameta. Ravnina cijepajuće brazde je meridionalna ili longitudinalna te prolazi od jednog do drugog životinjskog pola. Životinjski polovi jesu mjesta gdje se unutar zigote nalaze polarna tijela. Zatim iduća dioba stanica daje stadij od 4 stanice po zigoti te je isto tako meridionalna, ali nastupa od desnog kuta prve diobe. Treća dioba je ekvatorijalna ili horizontalna, te dolazi do rezanja okomito preko polarne osi i rezultira zigotom koja sadrži 8 stanica (Slika 3B). Budući je veličina svih stanica unutar zigote tijekom prvih triju dioba jednaka, dioba se do ovog trenutka naziva jednakom diobom. U trenutku kada se zigota sastoji od 8 stanica nastaje malena šupljina između stanica blastomera. Kako se dioba stanica nastavlja ta se rupa širi kako bi u konačnici tvorila **blastocel**. Tekućina unutar blastocela većinom je morska voda. Nadalje, četvrta stanična dioba stvara embrij od 16 stanica te se ovaj stadij ujedno naziva i početak **morule**, koja traje sve do trenutka pojavljivanja šupljine unutar embrija (cca 6 h nakon oplodnje). Do

ovoga trenutka diobu pojedinačnih stanica moguće je donekle pratiti pod mikroskopom. Petom diobom nastaje embrij s 32 stanice, zatim šestom diobom embrij sa 64 stanice. Kako se dioba nastavlja nastaju sve manje i manje stanice, a slojevi stanica više se ne mogu razabrati pod mikroskopom. Stadij **blastule** karakterizira prisutnost velikog, tekućeg blastocela te smanjenja stopa stanične diobe (Slika 3C). Ponekad je teško odrediti trenutak kada se embrij nalazi u stadiju blastule, odnosno da je šupljina u sredini blastocel. Međutim, taj se trenutak najčešće definira onda kada je šupljina u sredini veća od najveće stanice embrija (Cornway, 1980). Otprilike 6 h nakon oplodnje većina ježinaca ulazi u rani stadij blastule. Stanice (blastomere) su u ovoj fazi organizirane u jednom sloju uokolo blastocela. Blastomere razvijaju cilije na svojoj vanjskoj površini te će se kao rezultat njihovog pulsiranja embrij okretati unutar fertilizacijske ovojnice. Deset do dvanaest sati nakon oplodnje blastula, koja se u ovome trenutku sastoji od oko 600 stanica, izliježe se iz fertilizacijske membrane (Briggs i Wessel, 2006). Već vrlo rane studije pokazale su kako blastula otpušta tzv. „enzime izlijeganja“ (engl. *hatching enzymes*) koji oslabljuju i otapaju membranu dovoljno kako bi se blastula probila u okolni medij (Ishida i sur., 1936; Kopac i sur., 1941). Tijekom kasne blastule na vegetativnom polu dolazi do zadebljanja i nastanka vegetalne ploče (engl. *vegetal plate*) te početka gastrulacije koja nastupa između 20 i 24 h od oplodnje kod većine ježinaca (Cornway, 1980). Za vrijeme **gastrulacije** dolazi do intenzivne preraspodijele stanica i prekrivanja blastocela stanicama od dna (vegetativnog pola) prema sredini blastocela, koji se s vremenom gubi. Takva preraspodjela stanica nastupa radi promijene oblika stanica. Kako se invaginacija vegetativnog pola nastavlja, dolazi do stvaranja tzv. slijepe cijevi (engl. *blind-ended tube*) i stvaranja arhenterona (Slika 3D). Kao rezultat ovih „morfogenetičkih pokreta“ (engl. *morphogenetic movements*), stanice embrija moguće je podijeliti u tri gastrulacijska sloja: ektoderm, mezoderm i endoderm. Gastrula se sastoji od oko 1000 stanica. Iza faze gastrule nastupa konačan **stadij prizme** koji karakterizira potpuna promjena oblika embrija te početak diferencijacije struktura larve. Pri kraju gastrulacije, vršak arhenterona spaja se s ektodermom, koji se zatim blago uvlači kako bi se stvorio *stomodaeum*. Na jednom kraju *stomodaeuma* stvaraju se usta larve, a na suprotnome polu otvor probavnog trakta. Tijekom ovog razvojnog stadija embrij poprima oblik piramide (Briggs i Wessel, 2006).



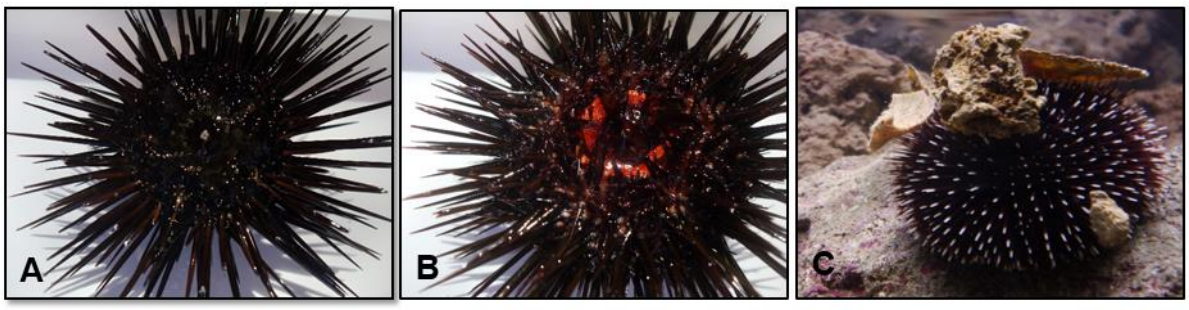
Slika 3. Razvojni stadiji embrija ježinca *P. lividus*: A) 30 min (zigota s jasno formiranom fertilizacijskom membranom), B) 90 min (embrij sa 4 (lijevo) i 8 (desno) stanica), C) 6 h (blastula) i D) 24 h (gastrula) nakon oplodnje. Slike A, B i D 100× povećanje, slika C 200× povećanje. Skraćenice: ar – arhenteron, bc – blastocel, fm – fertilizacijska membrana, j – jezgra (osobna arhiva, prema Cornway, 1980).

U Jadranskom moru živi oko 20 vrsta ježinaca, a svega tri vrste lako su dostupne za sakupljanje u većem broju na području Sjevernog Jadrana, to su: *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* i *Sphaerechinus granularis* (Slika 4).

Ježinac *A. lixula* (Linné 1758) naziva se i crnim ježincem, zbog izrazito dugih crnih bodlji koje dosežu duljinu promjera čahure (Slika 4A). Ovaj je ježinac vrlo sličan ježincu kamenjaru *(P. lividus*), međutim na leđnoj strani nema pedicelarije, stoga se rjeđe prekriva sitnim kamenčićima te česticama šljunka. Ne buši rupe za razliku od vrste *P. lividus* već čvrsto prijanja za podlogu. Veličine je do 8 cm i živi na dubini od samo nekoliko metara. Općenito je rjeđi od ježinca *P. lividus* i prevladava na hridinastom dnu u čistome moru (Turk, 2011). Gonadosomatski indeks (postotak mase gonada naspram ukupne tjelesne mase organizma) u ove vrste najviši je od svibnja do srpnja, a najniži tijekom listopada i studenog (Wangensteen i sur., 2013), stoga su istraživanja utjecaja AgNP na embrionalni razvoj izvedena u kasno proljeće ili tijekom ljeta. Gonade crnog ježinca bojom se uvelike razlikuju od njemu vrlo slične vrste *P. lividus*. Naime, gonade ježinca *A. lixula* su tamnocrvene (bordo) boje, dok su one ježinca *P. lividus* narančaste boje.

Ježinac *P. lividus* (Lamarck 1816) još se naziva i ljubičasti ježinac, ježinac kamenjar ili hridinski ježinac, a ujedno je jedina zaštićena vrsta ježinaca u Hrvatskoj (Slika 4B). Bodlje ovog ježinca rijetke su i krhke te otprilike jednake duljine kao i promjer čahure. Čahura je ljubičaste ili zelene boje, dok su bodlje tamnoljubičaste, rjeđe crno-smeđe ili crno-zelene. Ježinac kamenjar doseže veličinu do 8 cm. Ovaj se ježinac često prekriva ostacima puževa, kamenčićima ili raznim antropogenim otpadcima. Ježinac kamenjar nastanjuje kamenitu podlogu i stijene obrasle algama te svojim jakim zubnim aparatom buši kamen (Turk, 2011). Vrijeme mriještenja ovog ježinca ne događa se uvijek u isto vrijeme tijekom godine (uvelike ovisi o temperaturi mora i ostalim uvjetima), ali najčešće se događa između ožujka i rujna (proljeće, ljeto i rana jesen) (González-Irusta i sur., 2009; Tenuzzo i sur., 2012). Na sjevernom je Jadranu mnogo češći stanovnik od ježinca *A. lixula,* a staništa koja ove dvije srodne skupine ježinaca (*A. lixula* i *P. lividus*) zajedno nastanjuju vrlo su rijetka.

Ježinac *S. granularis* (Lamarck 1816) još se naziva i pjegavi ježinac zbog toga što njegove jake, kratke, ljubičaste bodlje završavaju malenim, bijelim poljem (Slika 4C). Čahura pjegavog ježinca je tamnoljubičaste boje, a može narasti do 12 cm. *S. granularis* živi na koraligenskom tvrdom ili pješčanom dnu među livadama morskih trava na dubinama između 5 i 120 m (Turk, 2011). U ovog ježinca gonade se pune i prazne kroz cijelu godinu uz reproduktivnu aktivnost koja kulminira između listopada i svibnja (Guillou i Lumingas, 1998; Nahon i sur., 2009). Dok se prethodno spomenute dvije vrste ježinaca *A. lixula* i *P. lividus* mogu sakupiti s obale, posebice za vrijeme oseke, za sakupljanje *S. granularis* vrste potreban je ronioc, budući ježinac nastanjuje dubine mora ispod 20 m.



Slika 4. Tri vrste ježinaca korištene kao modelni organizmi: A) oralna strana ježinca *A. lixula*, B) oralna strana ježinca *P. lividus* i C) pogled sa strane ježinca *S. granularis*.

Ježinci predstavljaju važnu komponentu obalnog ekosustava zbog čega pojačan unos zagađivala može imati šire posljedice za njegovo funkcioniranje. Hrane se algama i uginulim organizmima koje nanose morske struje, pretežno su biljojedi, ali postoje i grabežljive vrste. Prirodni neprijatelji su im ribe, zvjezdače i rakovi te morski nametnici poput praživotinja, oblića, veslonožaca, vitičara i dr. Gonade ženskih jedinki ježinaca poseban su gastronomski specijalitet u mediteranskim zemljama poput Italije, Francuske i Španjolske (Turk, 2011; Wangensteen i sur., 2013).

Od nedavno se ježinac počeo primjenjivati kao modelni organizam za istraživanje utjecaja nanočestica (Falugi i sur., 2011; Šiller i sur., 2013). Naime, embriji i larve ježinaca, zbog svoje male veličine, iznimno su osjetljivi, posebno kod koncentracija koje su uobičajene za akutnu izloženost. Budući da se prihvaćaju na čvrstu podlogu u plitkim obalnim vodama, larve mnogih morskih vrsta predstavljaju razvojni stadij za koji je rizik od točkastih izvora ENP najveći, upravo zbog mogućeg učinka na rast i stabilnost populacije. Ježinci su vrlo zahvalna vrsta za toksikološka istraživanja, posebice u rutinskim laboratorijskim testovima embrionalnog razvoja, poznatijima pod nazivom SUEDT (engl. *sea urchin embryonal development test*). Nedavno je ustanovljeno kako embriji ježinaca mogu biti odličan model i za ispitivanje embrionalne toksičnosti raznih vrsta nanočestica koje posjeduju jezgru metalnih oksida (Fairbairn i sur., 2011; Falugi i sur., 2011; Manzo i sur., 2013, Šiller i sur., 2013). Vrlo često se testovi SUEDT primjenjuju za ekotoksikološka istraživanja učinka srebrnih nanočestica, međutim do sada nisu uzete u obzir sljedeće činjenice:

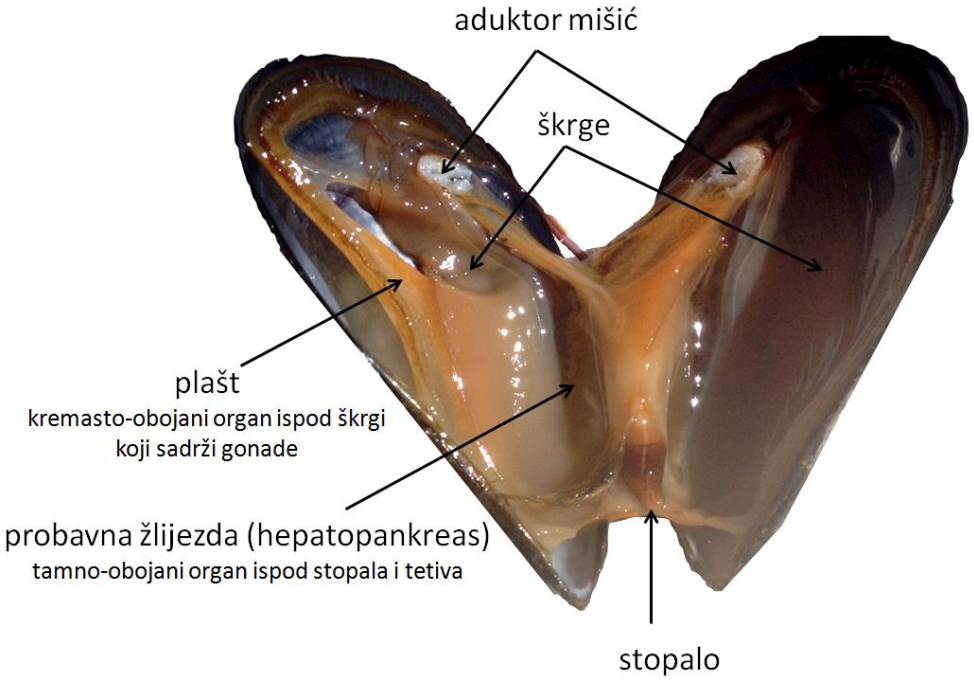
a) doziranje AgNP u različitim razvojnim stadijima razvoja morskog ježinca, kako bi se utvrdilo jesu li ježinci u određeno vrijeme nakon oplodnje osjetljiviji;
b) osjetljivost između različitih vrsta ježinaca te
c) utjecaj različitih veličina AgNP na njegov embrionalni razvoj.

1.4. Dagnja *Mytilus galloprovincialis* kao modelni organizam

Osim ježinaca, za ispitivanje utjecaja nanočestica na morske organizme često se kao modelni organizam koriste i **školjkaši**. Naime, školjkaši obitavaju u slatkovodnim i morskim ekosustavima, gdje se uvelike primjenjuju u programima dugoročnog ili periodičnog praćenja i procjene kvalitete vodenog okoliša/ekoustava (tzv. biomonitoring). Školjkaši se hrane filtriranjem morske vode, stoga imaju visoko razvijen sustav staničnog unosa nano- i mikro

čestica procesima endocitoze i fagocitoze (Canesi i sur., 2012). Do danas je već objavljeno mnogo toksikoloških studija koje su se bavile utjecajem raznih nanočestica na školjkaše, posebice na dagnjama *Mytilus spp.* (*M. galloprovincialis* ili *M. edulis*) i to na različitim razinama biološke organizacije. (Canesi i sur., 2010a; Canesi i sur., 2010b; Canesi i sur., 2011; Lopes Rocha i sur., 2015).

Za potrebe ove doktorske disertacije kao predstavnik razreda Bivalvia - školjkaša odabrana je dagnja *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) (Slika 5). Dagnja je vrlo raširen školjkaš tamnoplave boje ljuštura, a može narasti do 7 cm. Za podlogu i međusobno unutar populacije dagnje se pričvršćuju bisusnim nitima. Zanimljivo je kako ovi organizmi u čistome moru rastu prilično polako, dok u moru s puno hranjivih tvari (npr. luke) rastu brzo (Turk, 2011). Upravo je to jedan od razloga zbog čega su odabrane dagnje kao modelni organizam u ovoj disertaciji, jer najčešće nastanjuju luke mnogobrojnih gradova uz obalu gdje se nalaze i brojni industrijski ispusti. Svaka dagnja može profiltrirati dnevno oko 400 litara morske vode, samim time u svojem tkivu može nakupiti razna okolišna zagađivala (Turk, 2011).



Slika 5. Unutarnji organi mediteranske dagnje *Mytilus galloprovincialis*.

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

2.1. Ciljevi i hipoteze istraživanja

U ovoj doktorskoj disertaciji postavljena su tri osnovna **cilja**:

a) okarakterizirati sustav različitih veličina AgNP u morskoj vodi,
b) ispitati utjecaj AgNP na embrionalni razvoj ježinaca te
c) ispitati sustav međudjelovanja AgNP i dva insekticida (cipermetrina i deltametrina) na enzimski sustav u dagnji (acetilkolinesteraza i glutation *S*-transferaza) i na koncentraciju proteina metalotioneina.

Postavljene hipoteze istraživanja jesu:

(i) AgNP u doticaju s morskom vodom stvaraju nakupine, a kinetika otpuštanja iona mijenja se s vremenom;

(ii) AgNP su toksične za dagnju i embrij ježinaca, a njihova toksičnost ovisna je o primijenjenoj koncentraciji;

(iii) AgNP su toksičnije od primijenjenih iona srebra iste koncentracije;

(iv) AgNP manjih dimenzija toksičnije su od onih većih promjera;

(v) AgNP uzrokuju različiti odgovor ovisno o trenutku kada je organizam prvi puta došao u doticaj s njima,

(vi) različite vrste organizama (koje pripadaju istome razredu) daju isti odgovor na toksičnost AgNP te

(vii) AgNP mogu poslužiti kao prijenosnici raznih zagađivala (insekticida) te uzrokovati povećani toksični učinak na morske organizme.

3. LITERATURNI PREGLED

3. Literaturni pregled

3.1. Stabilnost nanočestica u suspenziji

Za uspješnu primjenu nanočestica te za bolje razumijevanje njihovog ponašanja i sudbine u okolišu potrebno je razumijeti ponašanje i stabilizaciju nanočestica u suspenziji te njihovu interakciju s molekulama vode i prirodno prisutnom organskom tvari (NOM). Nanočestice u suspenzijama podliježu procesima aglomeracije, agregacije (homogene i heterogene), sedimentacije, otapanja i kemijskih transformacija (Markus i sur., 2015). Otapanje nanočestica, tj. otpuštanje iona s površine čestica, vrlo je važan proces koji se zbiva u suspenziji nanočestica. Na proces otapanja utječu fizikalno-kemijska svojstva nanočestica (njihov elementarni sastav, veličina, oblik, struktura, površinska modifikacija, masena koncentracija, kristaličnost i drugo) te priroda medija (ionska jakost, pH i drugo). Među tim faktorima najvažnijim se smatra veličina nanočestica jer smanjenje veličine čestica može dovesti do povećanja njihove topivosti. Topivost nanočestica uvelike utječe na njihovu stabilnost u suspenziji, ali i na njihovu toksičnost prema bioti. Površina nanočestica određuje njihovu reaktivnost i sorpciju, dok naboj površine utječe na stabilnost čestica i međudjelovanja s drugim površinama, odnosno česticama (Ngoc, 2014).

Kada se govori o nanočesticama i njihovom ponašanju u suspenziji potrebno je razlikovati dva pojma: aglomeraciju i agregaciju. Prema IUPAC-ovoj definiciji u aglomeratima se dispergirane čestice drže slabim fizikalnim međudjelovanjima, što može dovesti do fazne separacije pri kojoj nastaje talog čestica veličina većih od koloidnih čestica (> 1 μm), a cijeli proces je reverzibilan. Suprotno tome, u agregatima su čestice povezane jakim silama i proces je ireverzibilan (McNaught i Wilkinson, 2007). Agregacija nanočestica je proces koji povećava njihovu veličinu i potencijalno smanjuje apsorpciju. Nadalje, agregacija može biti homogena ili heterogena. Homoagregacija podrazumijeva agregiranje čestica iste vrste, dok se heteroagregacija odvija između čestica različitih vrsta, veličine i svojstava. Do heteroagregacije nanočestica može doći s organskim, anorganskim i biološkim koloidima te s virusima i bakterijama. U suspenzijama, većina nanočestica je sklona agregiranju, a proces agregacije je važan jer može dovesti do njihovog taloženja (Huynh i sur., 2012). Na agregaciju nanočestica, odnosno njihovu stabilnost u suspenziji utječu brojni čimbenici poput površinskog naboja nanočestica, prisustva NOM-a, ionske jakosti medija, pH

te sastav elektrolita (Kim i sur., 2012). Tako se primjerice stabilizacija srebrnih nanočestica može postići kontroliranjem bilo elektrostatskih (npr. dodavanjem citratnog omotača) ili steričkih odbojnih sila (npr. modificiranjem površine s raznim hidrofobnim proteinima) (Levak i sur., 2017). Brojna su istraživanja potvrdila da se NOM može adsorbirati na površinu nanočestica i time smanjiti stupanj agregacije pomoću elektrosteričke stabilizacije (kombinacije elektrostatskog odbijanja i steričke hidratacije) (Chen i sur., 2011; Grillo i sur., 2015; Louie i sur., 2015). Liu i sur. (2012) su primjenom dinamičkog raspršenja svjetlosti proučavali utjecaj okolišnih parametara, poput pH, koncentracije natrijevog klorida i NOM-a na proces agregacije funkcionaliziranih nanočestica zlata (FAuNP). Usporedbom utjecaja veličine čestica, sastava njihove jezgre te citrata kao omotača na kinetiku procesa agregacije FAuNP, došli su do zaključka kako fizikalno-kemijska svojstva omotača nanočestica najviše utječu na proces njihove agregacije.

Stabilnost nanočestica u suspenziji, odnosno stupanj njihove agregacije, rezultat su elektrostatskih odbijanja te steričkih i van der Waals-ovih sila koje se javljaju između čestica. Stabilnost suspenzije nanočestica i njihova sklonost agregiranju može se opisati pomoću Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek teorije (DLVO teorije). DLVO teorija koloidne stabilnosti opisuje ukupnu energiju međudjelovanja između čestica koje se približavaju jedna drugoj. Prema DLVO teoriji, stabilnost nanočestica suspendiranih u vodenom mediju može se procijeniti kao suma van der Waals-ovih sila i međudjelovanja električnog dvosloja. Nadalje, agregacija je usporena ako elektrostatske odbojne sile dominiraju nad van der Waals-ovim privlačnim silama (Christian i sur., 2008). Kod suspenzija velikih koncentracija treba uzeti u obzir i udaljenost između čestica. Čestice agregiraju kada je koncentracija čestica visoka i udaljenost između njih je nekoliko nanometara, jer na njih djeluju van der Waals-ove sile. Sudaranje čestica tijekom agregacije može biti rezultat Brown-ove difuzije, gibanja fluida i diferencijalnog taloženja. Brown-ova difuzija predstavlja glavni mehanizam agregacije nanočestica s neznatnim doprinosom gibanja fluida i diferencijalnog taloženja (Petosa i sur., 2010).

3.2. Ponašanje i sudbina nanočestica u vodenom okolišu

Umjetno proizveden nanomaterijal može dospjeti u okoliš na više načina kako je prethodno spomenuto u Uvodnome dijelu (iz proizvodnih otpadnih voda, izlijevanjem tijekom prijevoza i rukovanja nanomaterijalom, ciljanim ispuštanje u okoliš u svrhu sanacije tla). Jednom kad se nađu u okolišu nanočestice mogu biti unesene u pojedine organizme koji žive u vodi, tlu ili zraku, u njima ispoljiti svoj učinak (pozitivan ili negativan) te biti prenesene u više karike hranidbenog lanca. Veliki broj istraživanja posvećen je ponašanju nanočestica u slatkoj vodi (Bouldin i sur., 2008; Holbrook i sur., 2008; Lewinski i sur. 2011). Nedavno je utvrđeno da opterećenje TiO_2 NP, porijeklom iz proizvoda za zaštitu kože od djelovanja sunčevog zračenja, na samo jednoj plaži može iznositi i više od 4 kg po danu (Sánchez-Quiles i Tovar-Sánchez, 2014). U okviru navedene studije, zabilježene su i značajne kemijske promjene u vodama obalnog pojasa te ustanovljen toksični učinak TiO_2 NP na živi svijet u moru.

Toksičnost raznovrsnih nanočestica ispitana je na velikom broj slatkovodnih organizama i predmet je brojnih istraživanja učinaka unosa velikih količina nanomaterijala u rijeke ili jezera (Gottschalk i Nowack, 2011; Piccapietra i sur., 2012; Zhao i sur., 2013). S druge strane, puno je manje podataka o toksičnom učinku nanočestica na organizme koji naseljavaju estuarije i obalna mora, područja gdje se fizikalno-kemijska svojstva nanočestica bitno mijenjaju (uglavnom zbog većeg saliniteta) (Canesi i sur., 2011; Baker i sur., 2014; Mouneyrac i sur., 2014). Razlozi tome su višestruki. Nanočestice posjeduju veliku specifičnu površinsku reaktivnost, te se smatra da će se one, ubrzo nakon unosa u okoliš, transformirati i prevesti u stabilniji (manje reaktivni) oblik prije prijenosa na veće udaljenosti. Nadalje, u slučaju prijenosa nanočestica iz slatkovodnog sustava do estuarija ili eventualno obalnih morskih voda, došlo bi do smanjenja njihove konecntracije zbog čega bi se značajno smanjio rizik toksičnog učinka. Osim toga, nanočestice vrlo često stupaju u interakciju s prirodno prisutnom organskom tvari (engl. *natural organic mater,* NOM). Van Hoecke i sur. (2011) svojom su studijom pokazali da medij u kojem se ispituju karakteristike CeO_2 NP uvelike utječe na konačni rezultat, odnosno biodostupnost i toksičnost nanočestica. U svojim su istraživanjima došli do zaključka kako bi medij za ispitivanje utjecaja nanočestica općenito trebao sadržavati NOM, dok bi medij bez prisustva NOM-a trebalo promatrati kao najgori mogući scenarij (engl. *worst case scenario*). Naime, NOM se adsorbira na površinu s CeO_2

NP, zbog čega najvjerojatnije dolazi do smanjenja njihove toksičnosti jer su manje dostupne organizmima za unos. Aglomeracijski procesi, uz rastuću ionsku jakost, onemogućavaju raspršenje nanočestica koje time postaju zarobljene i inaktivirane unutar većih čestica, čija je toksičnost za organizme opet smanjena. Međutim, u nedavnim istraživanjima dokazano je kako nanočestice (u pojedinačnom obliku ili u nakupinama) ipak mogu ostati dulje vrijeme stabilne te se održati u bočatim vodama i u morskoj vodi (Kammer i sur., 2012; Levak i sur., 2017). Dakle, ENP se mogu prenijeti na velike udaljenosti, te ukoliko ne dođe do njihove promjene redoks procesima, postupno dospjeti do estuarija gdje, zbog povećanog saliniteta, dolazi do aglomeracije i taloženja. Svojom su opsežnom studijom Cleveland i sur. 2012. godine pokazali da dolazi do ispiranja AgNP s potrošačkih proizvoda, poput primjerice raznih antibakterijskih sredstava koja se primjenjuju za suzbijanje rasta bakterije *Escherichie coli*. Posljedično AgNP ostaju neko vrijeme u vodenom stupcu u moru te se s vremenom adsorbiraju na sediment i čestice pijeska, a dolazi i do njihove biokoncentracije iz vodenog stupca u organizmima poput juvenilnih stadija školjkaša (*Mercenaria mercenaria*), morskih trava (*Spartina alterniflora*) kozica (*Palaemonetes pugio*) i puževa (*Ilyanassa obsoleta*) koji žive na morskome dnu u mulju.

Dakle, sve je više dokaza kako se pojedine nanočestice, ili njihove manje nakupine, mogu održati danima u mediju s visokom koncentracijom soli kao što su estuariji i morska voda, vjerojatno stabilizacijom s humusnom tvari, polisaharidima ili zbog adsorpcije na organski detritus (António i sur., 2015; Louie i sur., 2015). Budući da više od polovice svjetskog stanovništva živi u priobalnom području, sve je vjerojatnije da će značajne količine ENP dospjeti do obalne morske vode prije nego li procesi otapanja, aglomeracije i agregacije mogu značajno smanjiti njihovu koncentraciju. Štoviše, u posljednje vrijeme dokazane su značajno visoke koncentracije ENP u obalnoj vodi, poput prethodno spomenutih nanočestica titanijeva dioksida, samo zbog upotrebe kreme za zaštitu od sunca (Sánchez-Quiles i Tovar-Sánchez, 2014). Kádár i sur. (2014) pokazali su da nanočestice porijeklom iz oblaka prašine dospijevaju u morsku vodu, u takvom okruženju agregiraju, a izvanstanične tvari porijeklom iz mikroalgi (engl. *microalgal exopolymeric substances*, EPS) ih stabiliziraju (Chen i sur., 2011). El Badawy i sur. (2010) su otkrili kako upravo o vrsti omotača koji je dodan na površinu AgNP ovisi njihovo ponašanje u okolišu. Naime, oni su otkrili kako AgNP omotane polivinilpirolidonom (PVP-om) nisu reagirale na promjenu koncentracije kalcija u okolišu ili pH, dok je stabilnost AgNP omotanih citratom ovisila o pH i koncentraciji kalcija. Slično

tome istraživanju, nanočestice zlata omotane s merkaptoundekanoičnom kiselinom pokazale su jači negativni površinski naboj u usporedbi s nanočesticama bez omotača (Dougherty i sur., 2008). Spomenuta istraživanja govore u prilog činjenici kako upravo omotač nanočestica može biti odgovoran za međudjelovanje između nanočestica i organizma, odnosno o njemu uvelike ovisi hoće li nanočestice biti unesene u organizam.

Međudjelovanje nanočestica s toksičnim organskim spojevima može povećati ili smanjiti njihov toksični učinak. Kao što je već prethodno spomenuto, nanočestice nemaju isključivo negativan učinak, u nekim slučajevima posebna svojstva nanočestica mogu povoljno djelovati na okoliš. Tako se primjerice na nanočestice mogu vezati razna okolišna zagađivala te ih se na taj način može odstraniti iz okoliša. U trojnom sustavu organizam-zagađivalo-nanočestica (npr. nanočestice, pesticidi i organizam) postoje dva osnovna načina međudjelovanja. Jedan od načina je adsorpcija ili apsorpcija zagađivala na površinu ili unutar nanočestice, čime je smanjena koncentracija slobodnog zagađivala, a samim time i njegova biodostupnost. Ukoliko dolazi do unosa kompleksa nanočestica-zagađivalo u stanicu, toksični učinak može biti posljedica djelovanja samo nanočestica, samo zagađivala ili pak njihovog zajedničkog djelovanja. Može se dogoditi i da nema nikakvog učinka zbog toga što zagađivalo nije biodostupno, a nanočestica sama po sebi nije toksična (Nowack i Bucheli, 2007). Tako primjerice crni ugljik (engl. *carbon black*), koji sačinjava oko 9% ukupne organske tvari u sedimentu, može smanjiti njen unos u organizam. Smanjena biodostupnost velikog broja organskih zagađivala u sedimentu i beskralježnjacima bentosa u prisutnosti crnog ugljika zabilježena je u mnogim studijama (Koelmans i sur., 2006; Smith i sur., 2007; Moore i sur., 2009; Canesi i sur., 2010b, Magesky i Pelletier, 2015; Mesarič i sur., 2015).

Još jedna prepreka koja se javlja u studijama ispitivanja utjecaja nanočestica na vodene organizme jest činjenica da trenutno nije poznato kako razlikovati ENP od prirodno prisutnih nanočestica. Osnovna logika i pretpostavke koje su se do sada primjenjivale u toksikološkim studijama mogu se primijeniti i na nanočestice, međutim postoje razlike između nanočestica i ostalih zagađivala, poput primjerice raznih pesticida (Hany i sur., 2008). Osnovna razlika između nanočestica i primjerice pesticida je u veličini: nanočestice su vrlo male čestice (veličine 1 - 100 nm), dok su pesticidi molekule (veličine ~0.5 - 2 nm) (Street i sur., 2008). Nadalje, nanočestice su najčešće građene od raznih metala (srebra, titanija, nikla, zlata, željeza i sl.) dok su najčešće korišteni pesticidi u agrokulturi organofosforni spojevi (npr.

diklorovos, klorpirifos, malation, triklorofon) i piretroidni insekticidi (cipermetrin i deltametrin). S toksikološkog aspekta pesticidi, kao organski spojevi (ksenobiotici), jednom uneseni u organizam prolaze kroz procese biotransformacije i detoksifikacije, a posjeduju i neurotoksični učinak (uzrokuju inhibiciju acetilkolinesteraze, AChE) dok za nanočestice još uvijek nije poznato što se s njima zbiva jednom kad se unesu u biotu. Nanočestice, zbog svoje veličine, mogu imati biofizički razarajući učinak na membrane stanica gdje stanični receptori mogu drugačije prepoznati površinu nanočestica zbog njihovog naboja ili njihove površinske kemije (tj. proteinskog omotača) ili pak u stanice mogu ući endocitozom i gdje se zatim oslobađaju ioni s njihove površine. Osim toga, nanočestice mogu pokazati mehanizam toksičnosti „Trojanskog konja“ gdje nanočestice djeluju kao nosači za druge toksične tvari. Naime, toksični učinak raznih nanočestica počeo se ispitivati tek unatrag nekoliko godina, a odgovor ovisi o vrsti čestica čija se toksičnost ispituje.

3.3. Metode za karakterizaciju nanočestica u okolišnim matricama

Kako bi se odredilo i predvidjelo ponašanje nanočestica u okolišu ključno je dobro fizikalno-kemijski i biološki okarakterizirati nanočestice. Karakterizacija nanočestica uvelike pomaže i industriji da bi se u konačnici „nano“- proizvod ispravno skladištio te spriječilo eventualno dospijevanje neželjene količine nanočestica u okoliš. Međutim, upravo zbog njihove veličine, karakterizacija nije jednostavan zadatak, a interpretacija dobivenih rezultata veliki je izazov brojnim istraživačima (Peterson i sur., 2014).

Do danas postoji relativno malo istraživanja o fizikalno-kemijskom ponašanju nanočestica u morskoj vodi, a podaci o njihovoj stabilnosti su dvojbeni (brza aglomeracija naspram značajne postojanosti nanočestica) (Chekli i sur., 2015). Nadalje, nanočestice se često oblažu ionima poput citrata ili polietilen glikola, a malo se pozornosti posvećuje mogućnosti da biomolekule prisutne u okolišu (npr. EPS, humična i fulvična kiselina) zamijene te ione s površine nanočestice. Otpadne vode ili drugi okoliš bogat proteinima, kao što su postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda, gdje proteini čine do 50% organske tvari, mogu dovesti do stvaranja biološkog omotača oko ENP i time im dati značajnu dugoročnu stabilnost (Eddy i sur., 2003).

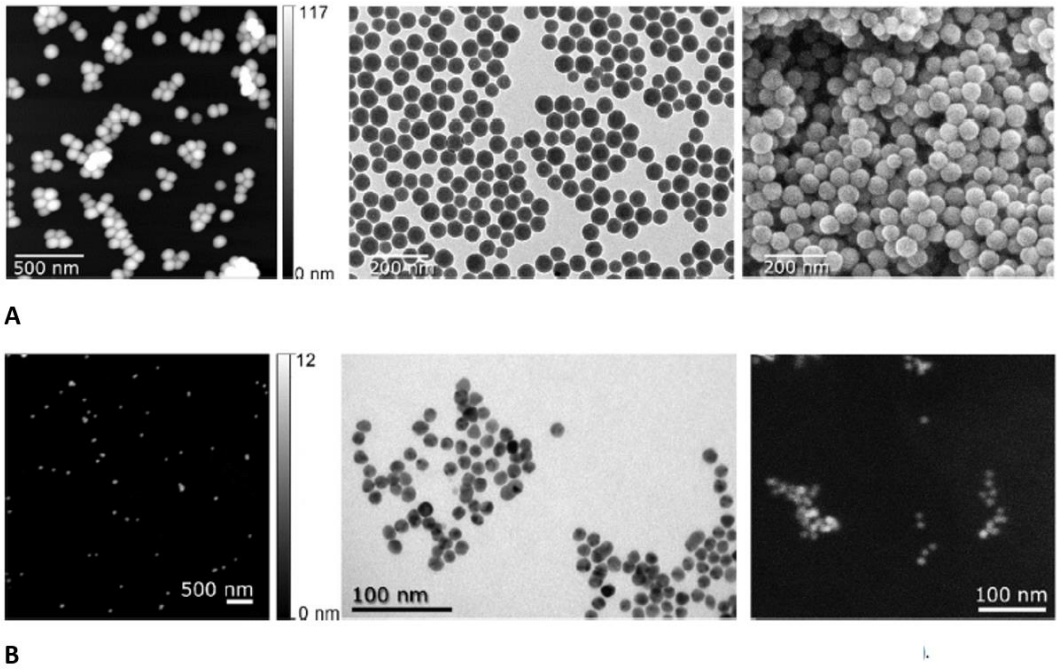
Postoje mnoge metode i instrumenti koji se koriste za karakterizaciju nanočestica, određivanje njihovog sastava, strukture, oblika, raspodjele veličine, morfologije i čistoće u mediju od interesa (Farré i sur., 2011). Primjena samo jedne tehnike za karakterizaciju nanočestica nije dovoljna jer svaka metoda mjeri određeni parametar. Tek nakon sakupljanja i podrobne analize podataka dobivenih raznim tehnikama može se dobiti cjelokupna slika te svojstva i osobine ispitivanog nanomaterijala postaju jasnije (Hogue i sur., 2012). Neke od najčešće korištenih metoda za karakterizaciju nanočestica i njihovih suspenzija te njihove prednosti i nedostaci bit će spomenuti u nastavku.

Određivanje kemijskog sastava i specijacija metala u različitim medijima može se ispitati **spektrometrijom masa visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom (engl. *Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry,* ICP-MS)**. ICP-MS je tehnika razvijena da bi se utvrdila koncentracija pojedinih elemenata u različitim vrstama uzoraka, poput vode, hrane, okoliša, itd. Ta tehnika primjenjuje induktivno spregnutu plazmu kao ionizacijski izvor, a za detekciju se koristi spektrometrija masa. Danas se ICP-MS-om uspješno mogu detektirati pojedinačne čestice (engl. *Single Particle Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry,* SP-ICP-MS) te se u tom slučaju može odrediti i njihova koncentracija, veličina i elementarni sastav. Ta metoda ima odličnu osjetljivost, vrlo nizak pozadinski šum i omogućuje određivanje koncentracija u dijelovima trilijuna (ppt). Osim toga, SP-ICP-MS-om se može pratiti otapanje nanočestica i njihova aglomeraciju (Stevenson, 2012; Cornelis i Hassellöv, 2014). Uz pomoć infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy,* FTIR) može se odrediti organski omotač nanočestica te nanočestice građene od organskih spojeva. Nadalje, rentgenskom difrakcijom X zrakama (XRD) može se potvrditi kristalografska struktura nanočestica što pomaže prilikom određivanja njihovog elemtarnog sastava.

U „**nano-svijet**“ može se „proviriti“ transmisijskom ili pretražnom elektronskom mikroskopijom te mikroskopijom atomskih sila. Te tri tehnike oslikavanja pronašle su primjenu u svim područjima znanosti, poput kemije, biologije, fizike, astronomije, medicinske dijagnostike, a odnedavno se koriste i u nanotehnologiji (Ma i Lin, 2013). **Transmisijska elektronska mikroskopija (engl. *Transmission Electron Microscopy,* TEM)** predstavlja jednu od ključnih metoda za ispitivanje površine nanomaterijala i to na temelju razlike u sposobnosti snopa elektrona da prođe kroz čvrsti uzorak te se dobiva slika visoke rezolucije u koja seže do približno 0,2 nm. Kako bi se dobila visoka kvaliteta slike pripremljeni presijek

uzoraka mora biti vrlo tanak. Iznimno visoka rezolucija mikrografije dobivene TEM-om, čak do atomske rezolucije, predstavlja njegovu osnovnu prednost. **Pretražna elektronska mikroskopija (engl. *Scanning Electron Microscopy,* SEM)** još je jedna od vizualnih tehnika za ispitivanje veličine i morfologije nanočestica. Za razliku od TEM-a, SEM zahtijeva sakupljanje snopa elektrona raspršenih od uzorka za stvaranje slike površine. U rezoluciji se SEM ne razlikuje mnogo od TEM-a te njegova rezolucija seže do ~2 nm. Oslikavanje nanočestica uz pomoć SEM tehnike vrlo je osjetljivo, precizno i selektivno. Međutim, postoje ograničenja tih dviju mikroskopskih tehnika. Naime, TEM i SEM zahtijevaju nanošenje uzoraka na određenu površinu i sušenje prije same karakterizacije (u uvjetima visokog vakuuma), a sama analiza rezultata može ovisiti o osobi koja interpretira rezultate. Nadalje, otapalo može biti odgovorno za agregaciju nanočestica pa vrijednost veličine dobivene pomoću takvih metoda ne omogućava određivanje njegovog utjecaja (Kato i sur., 2012).

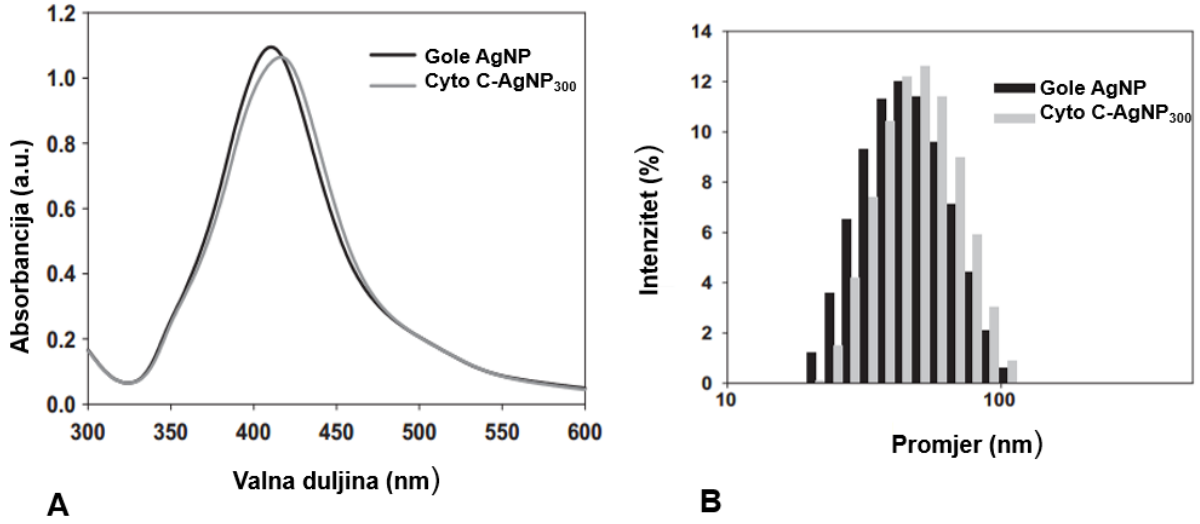
Slična prethodnim dvjema tehnikama jest **mikroskopija atomskih sila (engl. *Atomic Force Microscopy,* AFM)**. AFM se može primijeniti za proučavanje kompleksnih bioloških sustava, ali i samih nanočestica. Ta se metoda mikroskopiranja temelji na postavljanju skenirajuće sonde povrh uzorka te se uzorak skenira na način da se mjeri međumolekulska sila koja djeluje između atoma mjerne sonde i atoma ispitivanog uzorka. Takvo kretanje vrha sonde zatim se pretvara u topografsku kartu površine. AFM je tehnika koja omogućuje oslikavanje površinske strukture s visokom rezolucijom čime se dobiva prikaz rasporeda pojedinih atoma u uzorku, a moguće je vidjeti i strukturu pojedinih molekula. AFM omogućuje vizualizaciju uzorka u tri dimenzije (kao i SEM) te posjeduje vertikalnu rezoluciju manju od 0.1 nm, a X-Y lateralnu rezoluciju oko 1 nm. Osnovna prednost AFM je da se ne treba provoditi u ekstremnim uvjetima (npr. ultra vakuum i niske temperature), već se oslikavanje može vršiti i u tekućinama i pri različitim temperaturama. Upravo iz tog razloga idealna je metoda za proučavanje bioloških makromolekula te interakcije nanočestica s organizmima. Nedostatak svih tehnika mikroskopiranja nanočestica jest činjenica što je rezultat slika određenog (malog) dijela nakupine nanočestica, a ne informacija o svim prisutnim česticama u uzorku. Međutim, kako bi se premostila ta slabost mikroskopije, trenutno se razvija mikroskopija visoke propusnosti (engl. *High-throughput microscopy*) (Ljosa i sur., 2013). Na Slici 7 prikazan je uzorak nanočestica silicija i zlata snimljen svim trima prethodno opisanim metodama mikroskopiranja: AFM, TEM i SEM (Eaton i sur., 2017).



Slika 7. Usporedba triju mikroskopskih tehnika: AFM, SEM i TEM: (A) uzorak SiNP uz pomoć AFM-a(lijevo), TEM-a (sredina i SEM-a(desno) i (B) uzorak AuNP uz pomoć AFM-a (lijevo), TEM-a (sredina) i SEM-a (desno) (Eaton i sur., 2017).

Veličina nanočestica u suspenziji najčešće se određuje **dinamičkim raspršenjem svjetlosti** (**engl. *Dynamic Light Scattering,* DLS)**. DLS metoda temelji se na mjerenju brzine nasumičnog gibanja čestica u suspenziji, na temelju kojeg se određuje raspodjela veličine čestica i aglomerata/agregata. Ta se metoda temelji na raspršenju laserske svjetlosti zbog Brownovog gibanja vrlo malih čestica. DLS tehnikom mogu se odrediti veličine nanočestica u rasponu od ~0.3 nm do 10 μm. Međutim, valja imati na umu da promjeri nanočestica nisu pravi promjeri već hidrodinamički promjeri nanočestice, što znači da čestica nije „gola“ već oko sebe ima hidratacijski tj. solvatacijski sloj (Hassan i sur., 2015). DLS je neinvazivna metoda, mjerenja traju kratko, mogu se analizirati velika područja koncentracije uzoraka, a reproducibilnost mjerenja je veća nego kod drugih metoda. No DLS-om se ne može odrediti sastav čestica određene veličine i njegova primjena za analizu uzoraka koji sadrže različite veličine čestica je ograničena (Lin i sur., 2012). Velika prednost DLS je što se u većini modernih instrumenata povezuje s elektroforetskim raspršenjem svjetlosti, što omogućuje određivanje zeta potencijala čestica (električnog potencijal površine čestica koji se giba zajedno s nabijenom česticom). Slika 6. prikazuje analizu golih i citokromom C omotanih

AgNP primjenom dviju metoda: UV/Vis spektroskopije te metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (Kim i sur., 2015). UV/Vis spekar (Slika 6A) prikazuje na mali pomak citokromom C omotanih AgNP u desno, prema višim valnim duljinama, omotač djeluje na ukupnu oscilaciju površinskih elektrona zbog čega se SPR javlja pri nižoj energiji. DLS tehnika pokazuje povećanje veličine AgNP nakon dodatka citokroma C što se očituje u pomaku distribucije maksimuma intenziteta (%) ka česticama s većim promjerom (Slika 6B). Ta dva podatka zajedno ukazuju na činjenicu da citokromom C omotane AgNP jesu većih dimenzija.



Slika 6. UV/Vis spektar (A) i raspodjela veličine (B) čistih AgNP i citokomom C omotanih AgNP dobiveni za molarni odnos [Cyto C]/[AgNP] = 300 (Kim i sur., 2015).

Za istraživanje optičkih svojstava nanočestica i njihove veličine primijenjuje se **apsorpcijska spektroskopija vidljivog zračenja (engl. *Ultra Violet-Visible spectroscopy*, UV/Vis)**. UV/Vis spektroskopija primjenjuje se za praćenje promjena u površinskoj plazma rezonanciji (*eng. surface plasmon resonance*, SPR) metalnih nanočestica (npr. srebra ili zlata) dok se fluorescentna spektroskopija koristi za detekciju fluorescentnih nemetalnih nanočestica (npr. nanočestica poluvodiča popud CdSe/ZnS ili nanočestica na koje su specifično dodani fluorofori, npr. DAPI- SiNP). UV-Vis spektroskopijom može se pratiti taloženje nanočestica i proces agregacije s vremenom (Sondi i sur., 2003), ali i interakcija između raznih nanočestica i NOM-a (Woulandri i sur., 2015; Levak i sur., 2017). Osim UV-Vis spektroskopije za karakterizaciju nanočestica može se koristiti i infracrvena spektroskopija (određuje se sastav nanočestica i koncentracija pojedinih vrsta kemijskih veza na temelju vibracija i istezanja

specifičnih kemijskih veza), Ramanova spektroskopija (određivanje prirode kemijskih veza u materijalu), nuklearna magnetska rezonancija, elektronska i masena spektroskopija (određivanje mase i sastava nanočestica).

Tehnika razdvajanja čestica protočnim poljem (engl. *Field Flow Fractination,* FFF) veoma je učinkovita metoda za razdvajanje i frakcioniranje raznih nano- i makro-čestica (kompleksnih polimera, biomakromolekula, nanočestica). Uz pomoć FFF-a razdvajanje može biti od 1 nm do nekoliko mikrona (Bott i Tadjiki, 2013). Jedna od osnovnih prednosti sustava FFF je ta što se na njega mogu dodati razni drugi detektori (poput prethodno spomenutih UV/Vis i DLS instrumenata) koji daju informacije o razdvojenim frakcijama koje posljedično mogu biti povezane s veličinom tvari u pojedinoj frakciji. Analizom asimetričnog razdvajanja čestica protočnim poljem (engl. *Asymmetrical Flow Field Flow Fractination,* AsFFFF) Kim i sur. (2015) pokazali su da promjer AgNP naraste za oko 4 nm kada se na nanočestice veže citokrom C. Kombinacijom više tehnika (AsFFFF, DLS, UV/Vis i mikroskopijskih tehnika) moguće je vrlo detaljno razraditi i predvidjeti proces aglomeracije kako AgNP, tako i ostalih nanočestica u morskoj vodi.

3.4. Unos nanočestica u vodene organizme

Nanočestice mogu prijeći staničnu membranu raznih vrsta stanica i na taj način postati internalizirane (Feswick i sur., 2013). Glavni parametri koji određuju hoće li nanočestice biti internalizirane jesu: nakupljanje i sedimentacija na površini stanice ili difuzija prema stanici (Novak i sur., 2013). U specijaliziranim stanicama unos nanočestica odvija se procesima endocitoze ili fagocitoze (Piccapietra i sur., 2012). Jednom kada se nanočestice nađu unutar stanice, pohranjuju se na razna mjesta (primjerice unutar vezikula, mitohondrija, lizosoma) te su u mogućnosti izazvati toksičan učinak (Hull i sur., 2011; García-Negrete i sur., 2013). Nanočestice mogu biti toksične zbog svoje veličine, zatim zbog velike reaktivne površine te zbog sposobnosti stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxigen species,* ROS) (Canesi i sur., 2010; Tedesco i sur., 2010; Gomes i sur., 2011; McCarthy i sur., 2013). Nakon izlaganja brojnih organizma (fitoplanktona, školjkaša, ježinaca, rakova, riba) nanočesticama, na staničnoj razini primijećeni su: oksidacijski stres, antioksidacijska aktivnost i citotoksičnost (Gomes i sur., 2011; Balbi i sur., 2014; Pisino i sur., 2015; Walters i sur., 2016). Naime, razna istraživanja do danas ukazuju na činjenicu kako utjecaj nanočestica na

morske organizme varira ovisno o sastavu nanočestice (metalni oksid, metal) te taksonomiji organizma na kojemu se izvodi ispitivanje (Miller i sur., 2010).

Tablica 1. Literaturni pregled podataka o toksičnom učinku raznih industrijski važnih nanočestica na morske organizme.

Red	Vrsta	Vrsta NP[a]	Veličina (nm)	c (μg l^{-1})	Izloženost (h)	Posljedice	Literatura
Plankton	*Chlorella vulgaris*	ZnO	40 - 48	50 - 300 x10^3	24, 72	↓preživljenje, ↓LDH, ↓GSH, ↑SOD, ↑LPO	Suman i sur. 2015
	Zajednica planktona	Ag	10	5	24	značajna razlika djelovanja $AgNO_3$ u usporedbi s kontrolom, nikakav učinak AgNP	Boenigk i sur. 2014
	Dunaliella tetriolecta *Phaeodactylum tricornutum* *Rhino-monas reticulata*	CdSe/ZnS	17 ± 3	0.5 - 4 nM	3 dana	↓brzina rasta	Zhou i sur. 2015
	Isochrysis galbana *Phaeodactylum tricornutum* *Tetraselmis suecica*	PVP/PEI Ag Ag	5 47	0.00001 - 100 x 10^3 1 - 10 x 10^3	72	PVP/PEI AgNP + stanice algi → heteroagregati, PVP/PEI AgNP uzrokovale su različitu osjetljivost u stanica algi (*T. suecica* > *I. galbana* > *P.tricornutum*). PVP/PEI bio je toksičan za alge	Schiavo i sur. 2016
	Dunaliella tetriolecta *Skeletonema costatum*	Ag	1-10	0.1 - 100 x 10^3	72	↓ brzina rasta	Gambardella i sur. 2015
Cnidaria	*Aurelia aurita*	Ag	1-10	0.1 - 100 x 10^3	24, 48	učinak na larvi meduza bio je ovisan o primijenjenoj dozi, a došlo je i do smanjene frekvencije pulsacija i kretnji larvi	Gambardella i sur. 2015

	Exaiptasia pallida	CuO	<100	10 – 100	21 dan	↑CAT, ↑GPx, ↑GR, ↓CA	Siddiqui i sur. 2015
Crustacea	*Acartia tonsa*	CdSe/ZnS	17 ± 3	0.15 - 2.5 nM	48 (akutno), 4 dana (kronično)	↑smrtnost larvi nakon 48 h (EC_{50} = 0.7 nM), kronična izloženost 4 dana: nikakav utjecaj na proizvodnju jaja (osim kod doze od 2.5 nM), nije došlo do smanjenja izlijeganja iz jaja, ↑*HSP 70* genska ekspresija	Zhou i sur. 2015
	Amphibalanus amphitrite *Artemia salina*	Ag	1-10	0.1 - 100 x 10^3	24, 48	↑smrtnost ↓sposobnost plivanja	Gambardella i sur. 2015
	Artemia franciscana	n-PS	1.4	5 - 100 x 10^3	48	nije došlo do smrtnosti, n-PS nakupljale su se unutar crijeva i na površini senzorskih antena (engl. *sensorial antennules)* i privjesaka (engl. *appendages*), ometajući pokretljivost larvi	Bergami i sur. 2015
	Tigriopus japonicus	MWCNT	promjer = 6 - 13; duljina = 10000	6.25 - 100 x 10^3	96	↓ROS, ↓CAT, ↓GST, nikakva promjena GSH i GR, te aktivacija ERK	Lee i sur. 2016
Echinodermata	*Paracentrotus lividus*	Ag Co TiO_2	1 - 10 28 10 - 30	0.1 – 1000	izloženost sperme: 1	NP su sudjelovale u bio-mineralizacijskim procesima larvi, nije uočen nikakav utjecaj izložene sperme na oplodnju gameta	Gambardella i sur. 2014

		NCB GO	20 500 - 5000	0.1 – 1000	izloženost sperme: 1	↓uspješnost oplodnje za NCB, nikakav utjecaj na oplodnju za GO, ↓AChE i PChE za NCB i GO	Mesarič i sur. 2015
	Strongylocentrotus droebachiensis	Ag SWCNT	15 ± 5 2r = 2.2 duljina = 1400	20 – 500 2 - 50 x 10^3	96	stanice blastule bile su vakuolizirani i bez oblika nakon izlaganja AgNP, ali ne i smjesi AgNP i SWCNT	Magesky i sur. 2015
Mollusca	*Brachidontes pharaonis*	Ag	5	2, 20, 40	8 dana	↑brzina disanja, brzina otkucaja srca i apsorpcijska sposobnost	Saggese i sur. 2016
	Corbicula fluminea	TiO_2	20.5	0.1 - 1 x 10^3	10 dana	ko-izloženost (TiO_2 NP i Cd): ↓koncentracija slobodnog Cd; ↑CAT; ↑oksidacijski stres; ↑oštećenje tkiva (DG), nikakav utjecaj na SOD, GST i nakupljanje Cd	Vale i sur. 2014
	Crassostrea gigas	ZnO	31.7	50 - 50 x 10^3	96	LC_{50} = 37.2 mg l^{-1}; ↓GR aktivnost (G, DG), ↓PSH (G); ↑LPO (G); oštećenje mitohondrija (G, DG), nikakav učinak na imunološki sustav i GSH, GSSG, CAT, TrxR	Trevisan i sur. 2014
	Crassostrea virginica	TiO_2	86 ± 32 28 ± 4	1 x 10^3	izloženost: 2, 6 pročišćavanje: 0 - 120	unos NP, pročišćavanje nakon 12 h, nije došlo do bioakumulacije	Doyle i sur. 2015

Mytilus coruscus	TiO_2	20 - 30	2.5 - 10 x 10^3	14 dana	TiO_2 NP: ↑smrtnost hemocita, ↑ROS: niski pH + TiO_2 NP ↓THC, ↓Pha, ↓ Est, ↓sadržaj lizosoma	Huang i sur. 2016
Perna viridis	TiO_2	20	2.5, 10 x 10^3	9 dana	ko-izloženost: NP +hipoksija; ↑nanotoksičnost, sinergistični učinak	Wang i sur. 2014
Mytilus galloprovincialis	Ag	42	10 x 10^3	15 dana	AgNP i Ag^+ nakupljali su se u DG i G; ↑SOD, ↑CAT, ↑GPx, ↑MT u G > u DG, ↑LPO u G > u DG	Gomes i sur. 2014a
	CuO	31	10	15 dana	↑oksidacijski stres; proteomska analiza pokazala je promjenu količine/aktivnosti klasičnih (*HSP*, aktin, GST, ATP sinteza) i novih BM (kaspaze 3/7–1, catL, Zn-prst)	Gomes i sur. 2014b
	CNT	1.22 - 1.96	1 - 3 x 10^3	4 tjedna	↓brzina pročišćavanja; nikakva promjena u rastu, izlučivanje u F i Pf	Hanna i sur. 2014
	TiO_2	27	100	96	ko-izloženost (NP + TCDD): ↑TCDD nakupljanje, sinergistični i antagonistini učinak na stanice i tkivo	Canesi i sur. 2015
	ZnO	20	0.1 - 2 x 10^3	izloženost: 84 dana pročišćavanje: 14 dana	Promjene u energetskim potrebama: ↓mogućnost hranjenja, ↑potrebe za održavanjem, ↓vrijeme gametogeneze	Muller i sur. 2014

Mytilus edulis	Ag_2S CdS	13 ± 7 4 ± 1	0.01 - 10 x 103	4	genotoksični učinak pri visokim ispitivanim koncentracijama	Munari i sur. 2014
	TiO_2	86.0 ± 32.0 28.0 ± 4.0	1 x 10^3	izloženost: 2,6 pročišćavanje: 0 - 120	unos NP, pročišćavanje nakon 12 h, nije došlo do bioakumulacije	Doyle i sur. 2015
Scapharca subcrenata	TiO_2	10	500	izloženost: 35 dana pročišćavanje: 30 dana	ko-izloženost (NP + Phe): NP djelovale su poput nosača i time olakšale bioakumulaciju Phe, nije došlo do nakupljanja NP u tkivu M i G	Tian i sur. 2014

a AgNP (srebrne nanočestice), CNT (ugljikove nanocjevčice), GO (grafenov oksid), MWCNT (višeslojne ugljikove nanocjevčice), NCB (čađa nano veličine), NP (nanočestice), n-PS (nano-polistiren), PVP/PEI (poli-N-vinil-2-pirolidone/poliethilenimin), SWCNT (jednodijelne ugljikove nanocjevčice).

b ↑(povećanje), ↓(smanjenje) AChE (acetilkolinesteraza), ATP (adenozin trifosfat), BM (biomarkeri), CA (karboksilna anhidraza), CAT (katalaza), DG (probavna žlijezda), EC_{50}(srednja efektivna koncentracija), ERK (izvanstranična signalna kinaza), Est (esteraza), G (škrge), GPx (glutation peroksidaza), GR (glutation reduktaza), GSH (glutation), GSSG (glutation disulfid), GST (glutation *S*-transferaza), *HSP* (proteini toplinskog šoka), LC_{50} (srednja smrtonosna koncentracija), LDH (laktat dehidrogenaza), LPO (lipidna peroksidacija), M (mišić), MT (metalotioneini), O (cijelo tijelo), PChE (propionilkolinesteraza), Pha (fagocitoza), Phe (fenantren), PSH (protein tiol), ROS (reaktivne kisikove vrste), SOD (superoksid dismutaza), TCDD (2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin), THC (ukupan broj hemocita), TrxR (tioredoksin reduktaza).

Ekotoksikološka istraživanja upućuju na činjenicu da su nanočestice toksične za jednostanične i višestanične vodene organizme, poput bakterija, protozoa, školjkaša i riba (Moore, 2006; Cupaioli i sur., 2014). U istraživanju kojeg su proveli Thill i suradnici (2006.) otkrivene su CeO_2 NP na površini stanične stijenke **bakterije *E. coli***, međutim mikroskopske metode nisu bile dovoljno osjetljive da se ustanovi je li došlo do unosa nanočestica u stanice. Stanice bakterija bivaju oštećene u prisutnosti AgNP, što u krajnosti može dovesti do njihove smrti (Sondi i Salopek-Sondi, 2004). Provedena su mnoga istraživanja u kojima je ispitivana toksičnost nanočestica na **slatkovodnom planktonskom račiću (*Daphnia magna)***. U većini slučajeva određivala se toksičnost ili razina biomarkera stresa. Nakon 48-satnog izlaganja vodenbuhe koloidnoj suspenziji fulerena (C_{60}) bez premaza (engl. *uncoated, water-soluble, colloidal fullerenes*), prema standardnom U.S. EPA protokolu, srednja letalna doza (engl. *median lethal concentration*, LC_{50}) iznosila je 800 μg l^{-1} (Oberdörster, 2004b). Vrsta *D. magna* uspješno je internalizirala kvantne točke, a stupanj nakupljanja, internalizacije i depuracije ovisio je o funkcionalnim grupama prisutnim na samoj površini QD. Feswick i sur. (2013) zabilježili su preferencijalno nakupljanje i zadržavanje nanočestica s -COOH grupom u probavnom traktu vodenbuhe naspram onih koje sadrže $-NH_2$ ili PEG skupinu. Nanočestice CuO pronađene su u stanicama srednjeg dijela crijeva vrste *D. magna* (Heinlaan i sur., 2011) i u hranidbenim vakuolama protozoe *Tetrahymena termophila* (Mortimer i sur., 2010). Vodeni ekosustav je pod stalnom prijetnjom antropogenih izvora zagađivala, na što dodatni negativan utjecaj može imati i globalno zatopljenje. Kako bi ispitali takvu hipotezu Walters i sur. (2016) istražili su posljedice izloženosti riječnog **raka** *Potamonautes perlatus* AgNP i povišenju temperature. Povišena temperatura potaknula je oksidacijski stres koji se očitovao u povećanoj aktivnosti enzima superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation *S*-transferaze (GST), posebice na tretmanu sa 100 μg ml^{-1}AgNP.

Ribe se nalaze na samome vrhu hranidbenog lanca u moru, a nanočestice najčešće unose hranom i/ili vodom, ali i preko škrga. Ugljikove nanocijevčice pokazale su toksični učinak na ribama i to na respiratorni sustav kalifornijske pastrve (Smith i sur., 2007). Nanočestice lateksa preuzela su jajašca ribe *Oryzias latipes*, dok su odrasle ribe nakupljale nanočestice u škrgama i crijevu, a čestice su detektirane i u mozgu, testisima, jetri i krvi (Kashiwada, 2006). Nakon izlaganja pastrvskog grgeča (*Micropterus salmoides*) 0.5 μg ml^{-1} koncentraciji C_{60} tijekom 48 sati nije uočeno ugibanje, ali zamijećena je peroksidacija lipida u mozgu i povećano iskorištavanje glutationa u škrgama (Oberdörster, 2004a). U istome

istraživanju, ekspresija mRNA, koja kodira za proteine povezane s imunosnim odgovorom i popravkom tkiva, bila je povišena, dok je ekspresija mRNA nekoliko proteina povezanih s kontrolom homeostaze organizma bila snižena. Zahvaljujući biokemijskim promjenama na molekularnoj razini u riba, trenutno se ispituju baktericidna svojstva fulerena kao potencijalno novog antimikrobnog sredstva (Nowack i Bucheli, 2007). Fent i sur. (2010) nisu primijetili fluorescentne nanočestice silicija (veličine ~60 i ~200 nm) ili njihove aglomerate u embriju zebrice. Međutim, u tom se slučaju nije mogao isključiti unos vrlo niske koncentracije nanočestica, koju nije bilo moguće detektirati konfokalnim mikroskopom. Fluorescentne nanočestice silicija nakupljale su se na površini jajnih stanica ribe. Ispitivane nanočestice i njihovi agregati bili su preveliki za prolazak kroz pore kanala placente. Različiti putovi unosa mogu uzrokovati razne načine djelovanja u organizmu, uključujući kemijske i mehaničke načine, te ovisno o toksikološkoj kinetici i dinamici ENP može doći do njihove biomagnifikacije (Bielmayer-Fraser i sur., 2014).

U **trofičkom hranidbenom lancu**, primarni proizvođači izloženi su ENP direktno iz vode te će biokoncentracija nanočestica ovisiti o njihovom načinu ulaska u organizam, i/ili ulasku njihovih razgradih produkata (npr. iona, kompleksa) (Tangaa i sur., 2016). Upravo zbog toga toksičnost će uvelike ovisiti o obliku materijala koji ulazi u organizam, ali i o drugim fizičkim utjecajima koji indirektno mogu potaknuti stres, poput direktnog vezanja materijala na pojedine komponente unutar stanice ili sl. (Wang i sur., 2016). Sukladno tome, komponente koje će biti biodostupne putem fitoplanktona mogu biti različite i ovisiti o samom obliku metala te o raspodijeli ENP unutar organela ili njihovom zaostajanju na staničnoj stjenci fitoplanktona (Pletikapić i sur., 2012; Bielmyer-Fraser i sur., 2014). Primarni potrošači bit će izloženi putem vode i hrane, počevši od najniže trofičke razine, a bioakumulacija će ovisiti o potencijalnoj ugradnji ENP u hranu i njihovoj prisutnosti u vodenom stupcu. Alge proizvode mucilagene tvari koje mogu djelovati na ENP potičući njihovu agregaciju te u konačnici doprinijeti njihovom olakšanom unosu u organizam. Tijekom istraživanja u kojem je kopepodni račić *Acartia tonsa* hranjen dijatomejama obogaćenim ZnO NP, pokazano je da je protok ENP između dvije trofičke razine doveo do ometanja rasta i razvoja cijele populacije i dinamike fitoplanktona (Riberio i sur., 2015). Ispitivan je i trofički prijenos C_{60} fulerena od zelene alge *Scenedesmus obliquus* do račića vodenbuhe *D. magna*. Otkriveno je da je zastupljenost C_{60} najveća u frakciji stanične stijenke vrste *S. obliquus*, nakon čega slijede stanični organeli te stanična membrana (Chen i sur., 2016). Obzirom na priobalne vode, vrste koje ne plivaju kroz vodeni stupac, poput iverka i

rano izleglog kopepodnog račića, mogu biti izloženije toksičnim učincima ENP prisutnima u sedimentu (Wang i sur., 2016). Holbrook i sur. (2008) nisu uočili biokoncentraciju QD u jednostavnom hranidbenom lancu: bakterija (*E. coli*) – cilijat (*Tetrahymena pyriformis*) – rotifera (kolnjak, *Brachinous calyciflorus*). He i sur. (2012) prikazali su pojavu znatnog međudjelovanja između AgNP i ihtiotoksične morske alge *Chattonella marina* te otkrili ključnu ulogu otopljenog Ag(I) oblika na toksičnost AgNP. Nadalje, ustanovili su da AgNP i *C. marina* imaju sinergistički toksični učinak na stanice škrga riba. Time su posebnu pažnju uputili na činjenicu da se i biološke interakcije moraju uzeti u obzir prilikom ispitivanja učinka nanomaterijala u morskome okolišu. C_{60} NP mogu prianjati na površinu slatkovodne mikroalge *Pseudokirchneriella subcapitata* te se na taj način unijeti u organizam koji se hrani filtriranjem vode, što u konačnici može dovesti do biokoncentracije i bioakumulacije nanočestica (Baun i sur., 2008). Modelni hranidbeni lanac od četiri organizama (*Chlorella* sp., *Moina macrocopa*, *Barbonymus gonionotus* i *Chironomus* sp.) osmislili su Yoo-iam i sur. (2014) kako bi pratili toksičnost, bioakumulaciju i biomagnifikaciju AgNP. U ovome istraživanju korišteni su Ag^+ kao pozitivna kontrola. Najviši bioakumulacijski čimbenik (engl. *bioaccumulation factor*, BAF) Ag^+ zamijećen je u algi *Chlorella* sp. (101.84 l g^{-1}), dok je najniži BAF AgNP dokazan u ribi *B. gonionotus* (1.89 l g^{-1}). Prijenos AgNP kroz hranidbeni lanac utvrđen je samo od *Chlorella sp.* do račića *M. macrocopa*. Jarvis i sur. (2013) pokazali su da dolazi do trofičkog prijenosa metalnih nanočestica (ZnO NP) od morskog fitoplanktona dijatomeje *T. weissflogii* do kopepodnog račića *A. tonsa*. Zhu i sur. (2010) pokazali su da dolazi do prijenosa TiO_2 NP od račića *D. magna* do zebrice *D. rerio* u pojednostavljenom slatkovodnom hranidbenom lancu, ali nije zabilježena biomagnifikacija nanočestica (biomagnifikacijski čimbenik, BMF = 0.024 i 0.009 < 1). U konačnici potrebno je naglasiti kako konzumiranjem hrane iz mora, posebice riba, rakova i školjaka, nanočestice mogu dospjeti i do čovjeka.

3.4.1. Ježinac kao modelni organizam u ispitivanju utjecaja nanočestica

Potraga za alternativnim modelnim organizmima pokazala se prijeko potrebnom u pogledu razumijevanja utjecaja raznih ENP na morski ekosustav (Matranga i Corsi, 2012). Naime, u ispitivanju utjecaja nanočestica na morske organizme u posljednjih nekoliko godina uvelike se primjenjuje test **SUEDT**. Oplodnja predstavlja esencijalni proces kojim započinje

život većine organizama, otuda i sličnost ježinca i čovjeka. Iako se sam mehanizam oplodnje uvelike razlikuje između vrsta, suština je uvijek ista: jedna muška i ženska gameta moraju se spojiti kako bi genetički materijal roditelja prenijele u genetički jedinstveno potomstvo (Briggs i Wessel, 2006). Upravo iz tog razloga SUEDT vrlo je značajan i interesantan test. Naime, ovim se testom pokazalo da već vrlo niske koncentracije nanočestica, osobito srebra, mogu usporiti embrionalni razvoj ježinca i uzrokovati različite ozbiljne deformacije embrija (Šiller i sur., 2013; Magesky i sur., 2016). Gambardella i sur. (2014) otkrili su da dolazi do trofičkog prijenosa nanočestica metalnih oksida hraneći larvu ježinca *P. lividus* morskom algom prethodno opterećenom nanočesticama. Rezultati ovog istraživanja ukazali su na degradaciju kostura, promijenjen rast rudimenta (osnovice kosturne formacije u larve) te u konačnici smanjeno preživljene larvi. Izlaganje embrija ježinca *P. lividus* 2 h nakon oplodnje (embrija sa četiri stanice) srebrnim nanočesticama stabiliziranim citratom dovelo je do zastoja u razvoju larve, tjelesne asimetrije, promjena u ponašanju (kretanju, plivanju) te kraćih ili nepravilnih ruku larvi (Šiller i sur., 2013). Osim toga, u navedenom je istraživanju ustanovljeno kako su AgNP toksičnije od ekvivalentne doze iona Ag^+. Ispitivanjem učinka AgNP na spermije ježinca *P. lividus* u tzv. testu „spermiotoksičnosti" (engl. *spermiotoxicity testing*) potvrđen je negativan učinak AgNP na embrionalni razvoj i biomineralizaciju kostura larvi (Gambardella i sur., 2013, 2015). Levak i sur. (2016) pokazali su, uz pomoć testa SUEDT na vrsti *P. lividus*, da AgNP, stabilizirane albuminom iz goveđeg seruma, pokazuju nižu toksičnost naspram golih AgNP. Falugi i sur. (2011) ispitali su potencijalnu toksičnost **nanočestica stanij dioksida** (SnO_2 NP), **cerij dioksida** (CeO_2 NP) i **željezova oksida** (Fe_3O_4 NP) na ježincu *P. lividus*. Nakon petodnevne izloženosti nanočesticama, iste su bile pronađene unutar coelomocita (stanica imunosnog sustava u ježinca). Osim toga, aktivnost kolinesteraze bila je znatno povišena, a razina proteina toplinskog stresa (engl. *heat shock proteins*) snižena, što je bilo u skladu sa zamijećenim morfološkim promjenama endoplazmatskog retikuluma i lizosoma. Nanočestice dvaju metalnih oksida, **TiO_2 NP** i **CeO_2 NP** do koncentracije od 10 mg l^{-1}, nisu pokazale toksičnost za embrionalni razvoj bijelog ježinca *Lytechinus pictus*. Suprotno njima, **ZnO NP**, u istome su ispitivanju, pokazale izraženi toksični učinak na razvoj embrija (EC_{50} = 99.5 g l^{-1}). Toksični odgovor zamijećen za ZnO NP nije se znatno razlikovao od učinka iona Zn^{2+}, što potvrđuje činjenicu da toksičnost ZnO NP može biti uzrokovana otpuštanjem iona Zn^{2+} s njihove površine (Fairbairn i sur., 2011). Wu i sur. (2015) ispitali su mogućnost da ENP djeluju poput inhibitora ATP-vezujućeg kasetnog transportera (engl. *ATP-binding cassette,* ABC) u embriju ježinca *L. pictus*.

Rezultati su pokazali da **CuO NP** i **ZnO NP**, već pri vrlo niskim ispitivanim koncentracijama (0.5 µg ml^{-1}) uzrokuju značajno povišenje i nakupljanje fluorescentne boje kalceina-AM (CAM-indikatora ABC transportne aktivnosti) u različitim razvojnim stadijima embrija ježinca. Mesarič i sur. (2015) ispitali su utjecaj **nanočestica crnog ugljika** (engl. *carbon black*, CB) i **grafenova oksida (GO)** na spermi ježinca *P. lividus*. Ustanovili su da CB NP imaju veći toksični učinak na uspješnost oplodnje tretiranom spermom, dok izloženost GO NP nije utjecala na oplodnju (do 1 mg ml^{-1}). Međutim embrij i larve, čiji su spermiji bili izloženi ovim dvjema vrstama nanočestica, pokazali su inhibiciju aktivnosti dvaju enzima: acetilkolinesteraze i propionilkolinesteraze. Vrlo neobičan biomineralizacijski proces otkrili su Manno i sur. (2013) tijekom ispitivanja utjecaja CB NP na larvi ježinca *P. lividus*. Naime, nakon tretmana s povišenom koncentracijom nanočestica, larve su aktivirale obrambeni mehanizam zaštite od izvanstaničnih tvari i počele ugrađivati CB NP u svoju mikrostrukturu, vrlo slično načinu na koji kamenice ugrađuju aragonit u svoju ljušturu. **Nanočestice nikla** (Ni NP) nisu pokazale nikakav učinak na embrionalni razvoj ježinca *P. lividus* kroz 48 h. Međutim, koncentracija Ni NP od 3 mg ml^{-1} uzrokovala je smanjenje veličine larve koje je zamijećeno i na tretmanima s ionima nikla u koncentraciji od 1.2 mg ml^{-1} (Kanold i sur., 2016). Anselmo i sur. (2012) pokazali su da je embrionalni razvoj ježinca *Psammechinus miliaris* kroz 48 h znatno osjetljiviji na toksični vinblastin, supstrat modelne efluks pumpe, u prisutnosti anti-mikrobne tvari triklosana ili **nanočestica P85 (**engl. *Pluronic P85 triblock copolymer***)**. Prilikom ispitivanja utjecaja **polistirenskih nanočestica** (PS NP) na embrionalni razvoj ježinca *P. lividus* došlo se do zaključka kako razlike u površinskome naboju i agregaciji koja nastupa u moru uvelike utječu na embrionalnu toksičnost (engl. *embryotoxicity*) (Della Torre i sur., 2014). Nadalje, kako je prethodno spomenuto u Uvodnome dijelu, u moru često dolazi do stabilizacije raznih nanočestica s prirodno prisutnom organskom tvari (engl. *natural organic matter*, NOM), koja usporava proces aglomeracije i taloženja istih ili pak prisutnost omotača, kojim su nanočestice stabilizirane, onemogućuje njihovu potpunu agregaciju, a moguće posljedično i smanjuje biodostupnost organizmu (Antonio i sur., 2015). Naime, Levak i sur. (2016) pokazali su kako su AgNP omotane biološkim omotačem, albuminom iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA), manje embriotoksične u ježinca *P. lividus*.

Osim testa SUEDT, često se u ispitivanju utjecaja nanočestica koriste i stanice imunosnog sustava ježinca, tzv. koelomocite (engl. *coelomocytes*). Naime, imunosni sustav ježinaca vrlo je sličan humanom po diferencijaciji stanica imunosnog sustava (eritrocita,

limfocita i leukocita u čovjeka). Pisino i sur. (2015) preporučuju upravo ovu vrstu stanica, kao novi snažni alat za određivanje utjecaja nanočestica, odnosno njihove toksičnosti.

3.4.2. Dagnja kao modelni organizmi u ispitivanju utjecaja nanočestica

Organizmi koji se hrane filtriranjem morske vode, poput raznih školjkaša, predstavljaju jedinstvenu ciljanu skupinu za ispitivanje učinka nanočestica. Naime, školjkaši mogu filtrirati do devet litara morske vode u jednom satu. Brojna istraživanja ukazuju na činjenicu da dagnje posjeduju mogućnost unosa i nakupljanja raznih nanočestica u svome tkivu (najčešće škrgama ili probavnoj žlijezdi, tzv. hepatopankreasu) (Chinnapongse i sur., 2011; Gomes i sur., 2011; Canesi i sur., 2012). Dagnja je organizam koji se u zadnjih nekoliko godina vrlo često primjenjuje u ispitivanju učinka nanočestica na morskim organizmima (Canesi i sur., 2012).

Izloženost školjkaša zagađivalu može se istraživati na razini cijelog organizma u tzv. **„stres na stres" testu (engl. *Stress On Stress test,* SOS**). SOS test je test gdje se školjkaši prvotno kroz nekoliko dana izlože zagađivalu te se nakon toga ostavljaju na zraku kroz određeno vremensko razdoblje, tijekom kojeg se bilježi broj uginulih jedinki. Preživljavanje školjkaša na zraku ovisi o prethodnoj izloženosti zagađivalu i posljedično njihovoj kondiciji. SOS test često se primjenjuje kao preliminarni eksperiment za određivanje subletalne koncentracije ispitivane tvari (Viarengo i sur., 1995). Test se također primjenjuje u istraživanjima biološkog učinka zagađivala i kvalitete morskog okoliša. Tako su primjerice, Petrović i sur. (2004) otkrili veću sposobnost preživljavanja na zraku dagnji iz područja uzgajališta u Limskom kanalu u usporedbi s dagnjama iz Pulske luke tijekom ožujka i studenog.

Test zadržavanja neutralnog crvenila (engl. *Neutral Red Retention Time Assay,* NRRT) još je jedan test koji se primjenjuje u ispitivanju toksičnog utjecaja raznih zagađivala na stabilnost lizosomalnih membrana u stanicama imunosnog sustava (hemocitama) dagnje, ali i drugih morskih organizama. Budući da nanočestice s vremenom otpuštaju ione sa svoje površine, valja voditi računa i o interakciji metalnih iona od kojih su one sačinjene s drugim tvarima koje dospijevaju u okoliš. Naime, nanočestice ne ulaze vrlo jednostavno u organizam, međutim uz pomoć molekula "nosača" njihov transport i unos u organizam može postati olakšan. Testom NRRT, Canesi i sur. (2010) otkrili su kako komercijalne ugljikove nanocjevčice (koncentracije 1, 5 i 10 μg ml^{-1}) ne uzrokuju značajnu destabilizaciju

lizosomalne membrane hemocita u dagnje. Unos ovih nanočestica u hemocite ovisio je o primijenjenoj koncentraciji te je bio povezan s naglim porastom otpuštanja izvanstaničnih lizozima, proizvodnjom izvanstaničnih oksidacijskih radikala i otpuštanjem dušikova dioksida. Jedinke vrste *M. edulis* pokazale su značajno smanjenje stabilnosti lizosomalnih membrana 12 h nakon tretmana s nanočesticama staklene vune (Koehler i sur., 2008).

Osim testova SOS i NRRT, vrlo često se pri ispitivanju utjecaja zagađivala na školjkaše upotrebljavaju testovi koji ispituju **aktivnost raznih enzima** odgovornih za održavanje homeostaze organizma. **Acetilkolinesteraza** (AChE) je enzim koji se nalazi u sinaptičkim pukotinama središnjeg živčanog sustava. Njegova uloga je hidroliza acetilkolina na acetil i kolin. Acetilkolin je neurotransmiter koji sudjeluje u prijenosu živčanog signala između neurona. Najveća aktivnosti AChE u dagnji utvrđena je u tkivu škrga (Perić i sur., 2013). **Glutation *S*-transferaza** (GST) predstavlja skupinu detoksifikacijskih i biotransformacijskih izoenzima faze II koji kataliziraju reakciju konjugacije glutationa (GSH) s različitim ksenobioticima i nus-produkatima staničnog metabolizma, na taj način štiteći stanice od njihova štetnog djelovanja. Osim toga, djeluju i kao glutation peroksidaze neovisne o selenu, koje reduciraju štetne perokside i tako štite organizam od oksidacijskog stresa (Manduzio i sur., 2004). **Metalotioneini** (MT) su citosolni proteini niske molekulske mase, koji imaju ključnu ulogu u održavanju homeostaze esencijalnih metala i detoksifikaciji toksičnih metala. Indukcija sinteze metalotioneina i porast njihove količine predstavljaju biomarker izloženosti u školjkaša (Adami i sur., 2002).

Gomes i sur. (2011) izložili su dagnju *M. galloprovincialis* **CuO NP** i ionima Cu (10 µg l^{-1}) kroz petnaest dana te pratili biomarkere oksidacijskog stresa (aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GPx)), lipidnu peroksidaciju te koncentraciju MT zajedno s nakupljanjem bakra u probavnoj žlijezdi dagnje. Bakar se nakupljao linearno s povećanjem vremena izloženosti dagnji CuO NP, dok su dagnje uspješno eliminirale Cu^{2+} nakon petnaestog dana izlaganja. Oba oblika bakra uzrokovala su oksidacijski stres i povišenu lipidnu peroksidaciju. Nanočestice CuO uzrokovale su smanjenu aktivnost SOD u probavnoj žlijezdi u usporedbi s Cu^{2+}, dok se aktivnost CAT javila tek nakon sedmog dana izloženosti nano i ionskom obliku bakra. Indukcija MT primijećena je u dagnjama izloženima CuO NP, te je bila direktno povezana s nakupljanjem bakra, dok je kod Cu^{2+} indukcija MT potaknuta tek nakon petnaestog dana izloženosti. Ovi rezultati jasno ukazuju na činjenicu da je probavna žlijezda u dagnji organ koji najviše nakuplja CuO NP te

je time dobar izbor za ispitivanje učinka oksidacijskog stresa istih. Suprotno tome, Gomes i sur. (2014) primijetili su kako nakon izlaganja AgNP i ionima Ag^+ u škrgama dagnje *M. galloprovincialis* dolazi do indukcije sinteze MT, dok je tek neznatna količina srebra bila povezana s nakupljanje MT u probavnoj žlijezdi. Nadalje, Wong i sur. (2010) nisu primijetili povišenu ekspresiju MT i SOD nakon tretmana vrste *O. latipes* s ZnO NP u usporedbi s kontrolom dok je izloženost ionima cinka uzrokovala značajno povišenje sinteze SOD i MT. Unos nanočestica u dagnju može biti olakšan uz pomoć raznih morskih nakupina (agregata). Naime, Kach i Ward (2008) ispitali su unos nanočestica u dvije vrste školjkaša (dagnju *M. edulis* i kamenicu *Crassostrea virginica*) te otkrili da je sposobnost zaostajanja individualnih čestica < 1 μm unutar organizama (točnije u probavnoj žlijezdi) manja od 15%. Međutim, tijekom godine dana ta sposobnost naraste iznad 70%, zbog olakšanog unosa agregata nanočestica većih od 100 μm. Toksični učinak **AgNP** najčešće se pripisuje ionima koji se s vremenom otpuštaju s površine nanočestica. Ipak, sve je više dokaza kako se otpušteni ioni srebra vežu na tkivo škrga dok se AgNP vezuju na tkivo probavne žlijezde pri čemu oba oblika izazivaju oksidacijski stres (McCarthy i sur., 2013). Munari i sur. (2014) potvrdili su genotoksični potencijal Ag_2S i CdS NP na dagnji *M. edulis*. Nakon izlaganja dagnje *M. edulis* **AuNP** veličine 5 nm kroz 24 h došlo je do umjerenog oksidacijskog stresa dovoljnog da se oksidiraju tiolne skupine glutationa i drugih proteina, ali bez uzrokovanja lipidne peroksidacije ili indukcije aktivnosti tioredoksin reduktaze (Tedesco i sur., 2010). Azijski slatkovodni školjkaš *Corbicula fluminea* unio je u svoj organizam AuNP omotane albuminom goveđeg seruma. Nanočestice su se zadržale u probavnom traktu ili bile izlučene iz organizma putem fecesa. Ovi rezultati upućuju na činjenicu da biotransformacija i biodepozicija imaju vrlo bitnu ulogu u sudbini i prijenosu perzistentnih nanočestica u vodenom okolišu (Hull i sur., 2011). García-Negrete i sur. (2013) su primijetili nakupljanje AuNP u probavnoj žlijezdi ili u škrgama morskog školjkaša *Ruditapes philippinarum*. Nakon 28. dana izloženosti ovog organizma AuNP, uz pomoć rendgenske mikroanalize (engl. *X-ray microanalysis*), pronađena su elektronima bogata područja koja odgovaraju AuNP i to u stanicama heterolizosoma probavne žlijezde. Nadalje, Kadar i sur. (2010) primijenili su niz testova *in vitro* na škrgama dagnje kako bi ispitali učinak **nano-Fe** naspram soli $FeCl_3$. Njihovi rezultati ukazuju na sljedeće: 1) unutar 12 h topivi $FeCl_3$ (95%) i nano-Fe (90%) bili su uklonjeni iz vodenog stupca, 2) otopljeno- i nano-Fe slijede različiti put unosa u epitel škrga dagnje, 3) nano-Fe i otopljeno-Fe uzrokovali su smanjenu stabilnost lizosomalnih membrana u hemocitama dagnje, 4) lipidna peroksidacija u škrgama bila je povišena za oba oblika Fe, dok je aktivnost

AChE ostala nepromijenjena. U ovom slučaju uočena je tek vrlo mala razlika učinka nanočestica u usporedbi s ionima. Međutim, to može biti zbog kratkog vremena izlaganja te činjenice da se eksperiment odvijao *in vitro* (na škrgama), a ne *in vivo*. Barmo i sur. (2013) izložili su dagnju *M. galloprovincialis* **TiO_2 NP** (koncentracije od 1-100 µg l^{-1}) kroz 96 h. Rezultati su pokazali da TiO_2 NP mogu znatno utjecati na funkcionalnost probavne žlijezde i stanice imunosnog sustava dagnje i to u koncentracijama koje su potencijalno relevantne za okoliš. Niske koncentracije TiO_2 NP izazvale su oksidativni stres u probavnoj žlijezdi školjkaša, koji je utvrđen na razini transkripcije gena, dok su **SiO_2 NP**, za koje se pretpostavljalo da nisu toksične, uzrokovale povišenje aktivnosti enzima CAT u probavnoj žlijezdi dagnje i to u koncentracijama relevantnim za okoliš (Wegner i sur., 2012; Zuykov i sur., 2011). Canesi i sur. (2010) izložili su *in vivo* dagnju *M. galloprovincialis* raznim nanočesticama (NCB, C_{60} fuleren, TiO_2 NP i SiO_2 NP, koncentracije 0.05 - 5 mg l^{-1}) kroz 24 h, nakon čega su praćeni razni biomarkeri u hemocitama, probavnoj žlijezdi i škrgama. Rezultati su pokazali kako suspenzije svih nanočestica uzrokuju znatnu destabilizaciju lizosomalnih membrana u hemocitama i probavnoj žlijezdi (NCB >> C_{60} > TiO_2 NP > SiO_2 NP), nakupljanje lipofuscina i neutralnih lipida u lizosomima te povišenu aktivnost antioksidativnih enzima CAT (SiO_2 NP > NCB ~TiO_2 NP > C_{60}) i GST (NCB i TiO_2 NP). Nadalje, eksperimentalna studija provedena je na dagnji *M. galloprovincialis* kako bi se ispitao zajednički učinak TiO_2 NP i kadmija na stanicama hemolimfe i probavne žlijezde. Mnogim testovima toksičnosti (poput poremećaja embrionalnog razvoja) i biomarkerima stresa (poput određivanja koncnetracije MT i stabilnosti lizosomalnih membrana) ustanovljeno je da ko-ekspozicija TiO_2 NP i ionima Cd^{2+} ne uzrokuje povećani štetni učinak u dagnji (Balbi i sur., 2014).

Prilikom ispitivanja nanočestica u prirodnom okolišu u obzir valja uzeti abiotičke čimbenike. Između ostaloga ne smije se zaboraviti na pH morske vode te način na koji zakiseljavanje morske vode može promijeniti sudbinu nanočestica. Kadar i sur. (2010) ispitali su jedan takav scenarij. Naime, pratili su **embrionalni razvoj** dagnje *M. galloprovincialis* izložene nanočesticama Fe_2O_3 i otopljenom obliku Fe_2O_3 u kiselom mediju pH 3 (u morskoj vodi) i otkrili sljedeće: 1) morska voda obogaćena s CO_2 znatno je usporila embrionalni razvoj dagnje, 2) pri prirodnim pH uvjetima, nije uočena nikakva promjena u razvoju embrija bez obzira jesu li bili izloženi nano- ili otopljenom obliku Fe, 3) pri prirodnom pH morske vode (pH = 8) nano-Fe čestice agregiraju u veće polidisperzne i porozne čestice, za koje nije uočen nikakav biološki učinak, 4) pri pH 6 i 7 veće nakupine nanočestica smanjuju negativan

učinak povećane koncentracije CO_2 u okolišu što dovodi do većeg broja normalno razvijenih D-oblikovanih larvi te 5) toksični učinak Fe kod promijenjenog pH ovisio je o primijenjenoj koncentraciji. Osim ovog istraživanja, Kadar i sur. (2011) ispitali su i utjecaj stabiliziranog oblika (omotanog organskim poliakriličnim stabilizatorom) i nestabilnog oblika nulto-valentnog željeza na razvoj embrija dagnje 2 h nakon izlaganja spermija nanočesticama prije oplodnje (spermiotoksičnost). Oba oblika nanočestica uzrokovala su značajni zastoj u embrionalnom razvoju, koji se očitovao u 30% smrtnosti spermija s posljedičnom 20% manjom uspješnosti oplodnje i pomakom u razvoju (npr. 50% larvi zaostalo je u stadiju trohofore). Najviša ispitivana koncentracija od 10 mg l^{-1} uzrokovala je znatno oštećenje DNA u spermijima.

3.5. Utjecaj piretroidnih insekticida na vodene organizme

Ispitivanjem utjecaja **piretroidnih insekticida** na vodenim organizmima došlo se do zaključka kako već vrlo niske koncentracije ovih insekticida imaju negativne učinke na razne ispitivane organizme, posebice ribe. Naime, Alonso i sur. (2012) po prvi su puta pokazali bioakumulaciju piretroida u morskim sisavcima, suprotno činjenici kako se ovi insekticidi u organizmu sisavaca pretvaraju u netoksične metabolite procesom hidrolize. Ova grupa istraživača pronašla je čak 12 vrsta piretroida u tkivu jetre izoliranom iz dupina La Plata (*Pontoporia blainvillei*). Šokantna je činjenica kako su ribe iznimno osjetljive na prisutnost piretroida u okolišu. Naime, one ne posjeduju enzim koji hidrolizira piretroide, te su zbog ove osobitosti ekstremno osjetljive na njihovo neurotoksično djelovanje. DeLorenzo i sur. (2014) otkrili su kako su koncentracije od svega nekoliko nanograma po litri pojedinih piretroida (točnije α-cihalotrin i permetrin) akutno toksične za estuarijskog raka *Americamysis bahia* te uzrokuju povećanu smrtnost larvi. Gowland i sur. (2002) pokazali su da visoke koncentracije cipermetrina uzrokuju zatvaranje dagnje *M. edulis*, ali ne utječu na uspješnost preživljavanja na zraku. Piretroidni pesticid **cipermetrin** inhibirao je aktivnost AChE, povisio aktivnost SOD i CAT, te znatno smanjio aktivnost GST u slatkovodnoj dagnji *Unio gibbus* (Khazri i sur., 2015). Suprotno ovim otkrićima, Geest i sur. (2014) pronašli su vrlo nizak rizik za toksičnost komercijalnog piretroidnog pripravka naziva Excis® (aktivna tvar: cipermetrin) za amfipodnog račića *Echinogammarus finmarchicus*. Naime, ovaj račić vrsta je koja obitava u obalnome području (točnije sedimentu) sjevernog Atlantika, a pripravak Excis® u tom se području primjenjuje u akvakulturi lososa za suzbijanje i kontrolu ektoparazitskih morskih

nametnika. Prethodno izlaganje bakru te kasnija izloženost deltametrinu potaknula je oksidacijski stres (povišena koncentracija glutationa te povišena lipidna peroksidacija) u slatkovodnoj ribi *Channa punctata* (Parvez i Raisuddin, 2006). Izlaganje sperme ježinca *P. lividus* **deltametrinu** i bakru zasebno, te u kombinaciji, uzrokovalo je značajnu promjenu u sposobnosti oplodnje spermatozoida. Osim toga, uočen je toksični odgovor, koji je ovisio o primijenjenoj koncentraciji, na rani razvojni stadij ježinca *P. lividus* (Gharred i sur., 2015). Tu i sur. (2012) pokazali su znatnu inhibiciju AChE u mišićnom tkivu škampa *Penaeus monodon* nakon izlaganja deltametrinu pri raznim temperaturama i salinitetima. Osim toga, značajna inhibicija aktivnosti enzima AChE zamijećena je nakon 48 h izloženosti vodenbuhe (*D. magna*) deltametrinu (Toumi i sur., 2015), dok su Lutnicka i sur. (2014) pokazali 13% inhibiciju rasta fitoplanktona *Chlorella vulgaris* 14 dana nakon izloženosti cipermetrinu i deltametrinu.

4. MATERIJALI I METODE

4. Materijali i metode

4.1. Kemikalije

Kemikalije srebrov nitrat, trinatrijev citrat dihidrat, kalijev klorid, kromov(III) sulfat, etanol (abs.), kloroform, bakrov(II) sulfat pentahidrat, tris-hidroksimetil aminometan (TRIS), 36.5% klorovodična kiselina te natrijev klorid kupljene su od proizvođača Kemika te su bile najviše analitičke čistoće (p.a.). Od proizvođača GRAM-MOL nabavljena je ledena octena kiselina (p.a.). Kemikalije acetiltiokolin jodid (ATC, čistoće ≥ 99.0%) i boja 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid (tzv. boja neutralno crvenilo; postotak boje ≥ 90%) kupljene su od proizvođača Fluka. Nadalje, paraformaldehid, dimetilsulfoksid (DMSO), saharoza, poli-L-lizin (0.1% otopina), 1-kloro-2, 4- dinitrobenzen (CDNB), 5,5-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina (DTNB, tzv. Ellmanov reagens), acetokarmin crveni prah, Bradfordov reagens, monobazni kalijev fosfat (anh.), natrijev dihidrogenfosfat monohidrat (Ph. Eur.), dinatrijev fosfat dodekahidrat, etilendiamintetrakloroctena kiselina (EDTA), L - glutation reducirani, albumin goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin,* BSA), fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF) i *β*-merkaptoetanol kupljeni su od proizvođača Sigma-Aldrich te su bili najviše analitičke čistoće (p.a.). Srebrne nanočestice veličine 10, 20, 40, 60 i 100 nm kupljene su također od proizvođača Sigma-Aldrich. Te su suspenzije nanočestica bile koncentracije 0.02 mg ml^{-1}. Leupeptin hemisulfat dopremljen je od proizvođača ROTH te je bio kemijske čistoće ≥ 96.5%. Kupovni pripravci dvaju insekticida bili su komercijalnog naziva „Aquacyp“ (aktivna tvar: cipermetrin, koncentracije 100 g cipermetrin l^{-1}, proizvođač Presso d.o.o.) i „Deltasect“ (aktivna tvar deltametrin, koncentracije 24 g deltametrina l^{-1}, proizvođač Euroazijski pesticidi d.o.o.).

Za pripremu ultračiste vode (18 MΩ) korišten je filtrirajući sustav „Millipore Advantage System“ (Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka), dok je filtrirana morska voda dobivena filtriranjem prirodne morske vode (Sjevernog Jadranskog mora: saliniteta 36.5-38.4, pH 8.1± 0.1) kroz Whatmanov-e filtere veličine pora od 0.2 μm (GE Helthcare Life Science, Little Chalfont, Engleska).

4.2. Sinteza srebrnih nanočestica

Srebrne nanočestice sintetizirane su u Laboratoriju za morsku nanotehnologiju i biotehnologiju (LMNB) Instituta Ruđer Bošković, Centra za istraživanje mora (Rovinj). AgNP pripremljene su redukcijom s trinatrijevim citratom dihidratom. Ukratko, 21.2 mg srebrova nitrata ($AgNO_3$) otopljeno je u 120 ml ultračiste vode te zagrijavano, uz miješanje, do vrenja. Nakon toga, dodano je 5 ml 1% otopine trinatrij citrata dihidrata i zagrijavano uz miješanje sve dok boja otopine nije poprimila svjetlo žutu boju, ukazujući na nastanak nanočestica (Slika 8). Tako pripremljena suspenzija AgNP konačne koncentracije 107.7 mg l^{-1}, odnosno 1 mM Ag korištena je u testu embrionalnog razvoja ježinaca (SUEDT) *A. lixula*, *P. lividus* i *S. granularis* s varijabilnim vremenom doziranja AgNP te pri ispitivanju kombiniranog učinka insekticida i nanočestica na dagnji *M. galloprovincialis*.



Slika 8. Žućkasta ishodna suspenzija srebrnih nanočestica sintetizirana u LMNB.

Srebrne nanočestice raznih veličina (10, 20, 40, 60 i 100 nm) korištene su u eksperimentima u kojima se ispitivao učinak AgNP na spermu i razvojni stadij zigote ježinaca *A. lixula* i *P. lividus*. Suspenzija 40 nm AgNP korištena je pri određivanju citogenetičkog učinka srebrnih nanočestica na moruli ježinca *A. lixula*.

Prije svakog doziranja, AgNP raspršene su 30 minutnim ultrazvučnim homogeniziranjem pri snazi 30W i amplitudi 35 kHz na sobnoj temperaturi (Sonorex Digitec, Bandelin).

Radi lakšeg praćenja, AgNP sintetizirane u našem laboratoriju, označene su kraticom AgNP (LMNB), dok su komercijalne nanočestce navedene bez oznake.

4.3. Određivanje karakteristika srebrnih nanočestica

4.3.1. UV-Vis apsorpcijska spektroskopija

UV-Vis apsorpcijskom spektroskopijom snimljeni su spektri AgNP (LMNB) te komercijalnih AgNP različitih veličina (10, 20, 40, 60 i 100 nm) u dva medija: ultračistoj vodi i filtriranoj morskoj vodi (mediju koji je korišten tijekom ispitivanja embrionalnog razvoja ježinaca). Alikvoti suspenzja AgNP dodani su 0.2 μm filtriranoj morskoj vodi i ultračistoj vodi te je konačna koncentracija iznosila 1 mg ml^{-1}. UV apsorpcijski spektri AgNP snimani su na Shimadzu UV-1800 spektrofotometru dvostrukog snopa zraka. Spektri su snimani u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm s rezolucijom od 1 nm. Mjerenja su provedena u kvarcnim kivetama optičke duljine puta od 10 mm. Za obradu podataka korišten je program UVProbe 2.3.1 (Shimadzu, Kyoto, Japan) te programski paket Origin 9.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

4.3.2. Određivanje veličine nanočestica dinamičkim raspršenjem svijetlosti

Veličina srebrnih nanočestica (komercijalnih i sintetiziranih u LMNB) u supenziji morske vode i ultračistoj vodi, koncentracije 1 mg l^{-1}, određivana je uz pomoć dinamičkog raspršenja svjetlosti, korištenjem uređaja Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) opremljenim zelenim laserom (532 nm). Za mjerenje su korištene polistirol/polistriren kivete od duljine puta od 10 mm, a intenzitet raspršene svjetlosti mjeren je pod kutem od 173º. Svaki je uzorak mjeren najmanje deset puta. Hidrodinamički promjer (d_h) AgNP ili njihovih aglomerata dobiven je očitanjem maksimalne vrijednosti pika raspodjele veličina čestica po broju (engl. *number size distribution function*). Podaci su obrađeni korištenjem programskog paketa Zetasizer 6.32 (Malvern Instruments, UK).

4.3.3. Određivanje koncentracije iona srebra spektrometrijom masa s induktivno spregnutom plazmom

Kako bi se odredio stupanj otpuštanja iona Ag^+ s površine AgNP, alikvoti početnih suspenzija AgNP (koncentracija kupovnih AgNP: 0.02 mg ml^{-1} te sintetiziranih u LMNB koncentracije 100 mg ml^{-1}) razrijeđeni su u filtriranoj morskoj vodi (do konačne koncentracije 2 mg l^{-1}) te ostavljeni tijekom 48 h na sobnoj temperaturi. U odabranim vremenima (6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 i 48 h) suspenzije su filtrirane centrifugiranjem na filtrima 3 kDa MWCO (Merck Millipore), a ukupna količina srebra (u obliku srebrnih iona) u filtratu određena je spektrometrom visoke rezolucije s induktivno spregnutom plazmom (Agilent ICP-MS 7700x193, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) opremljenim s uzorkovanjem od platine i kvarcnim raspršivačem (engl. *nebuliser*). Argon je korišten kao nosač, a helij kao plin spajanja (plin za sudare, engl. *collision gas*). Kao interni standard dodan je rodij u 1% dušičnoj kiselini. Praćeni su signali masa izotopa ^{107}Ag i ^{109}Ag te ^{103}Rh, dok je za kvantifikaciju korišten izotop ^{107}Ag. Ukupno je pripremljeno 6 otopina standarda srebra, u 2% dušičnoj kiselini, raspona koncentracije od 0.2-50 μg l^{-1}. Kao kontrolni uzorak korištena je filtrirana morska voda. Kalibracijske krivulje određene su dva puta za vrijeme mjerenja, te je ukupno analizirano 5 kontrolnih uzoraka. Uzorci Ag^+ u morskoj vodi razrijeđeni su 5 puta u 1% dušičnoj kiselini prije mjerenja.

4.3.4. Određivanje morfologije srebrnih nanočestica transmisijskom elektronskom mikroskopijom

Mikrografije AgNP snimljene su na transmisijskom elektronskom mikroskopu (FEI-Philips EO-Morgagni, 100kV). Kapljica suspenzije nanočestica u ultračistoj vodi smještena je na ugljikov sloj na bakrenoj mrežici za snimanje (engl. *carbon coated copper grid*), koja je zatim ostavljena da se osuši na zraku.

4.4. Određivanje utjecaja srebrnih nanočestica na embrionalni razvoj ježinca

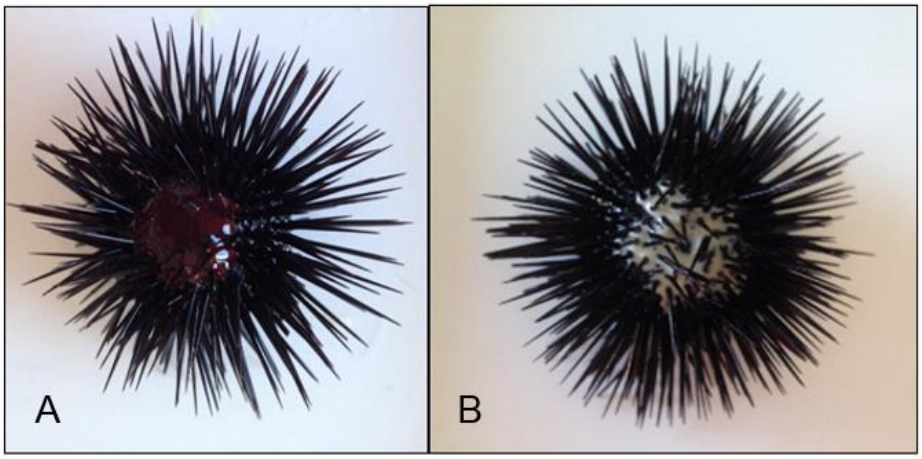
4.4.1. Sakupljanje ježinaca

Ježinci *A. lixula* i *P. lividus* za potrebe eksperimenata sakupljeni su u Puli, Republika Hrvatska, na području Valkana na dubini do 5 m (GPS koordinate: 44°51′20″N, 13°49′33″E). Ježinci su sakupljeni uz pomoć mrežice u kontejner s morskom vodom te kroz sat vremena prebačeni u Rovinj, u vanjski akvarij sa stalnim protokom morske vode. Eksperimenti s ovim vrstama ježinaca obavljali su se u vremenskom razdoblju od travnja do listopada 2013.-2016. godine. Ježinac *S. granularis*, budući da naseljava dubine veće od 20 m, sakupili su ronioci Centra za istraživanje mora, Instituta Ruđer Bošković u obalnom području okolice Rovinja, Republika Hrvatska (GPS koordinate: 45°04′47″N, 13°38′24″E). Eksperimenti s vrstom *S. granularis* rađeni su tijekom listopada i studenog 2013. i 2016. godine. Sakupljeni ježinci korišteni su unutar pet dana od trenutka uzimanja iz njihovog prirodnog staništa. Naime, za potrebe izdvajanja gonada ježinca, aklimatizacija odrasle jedinke nije potrebna.

Ovisno o eksperimentu i potrebnoj količini i čistoći gameta, iste su izdvojene injektiranjem 0.5 M kalijeva klorida (KCl) ili nakon seciranja ježinca što je opisano u sljedećim poglavljima.

4.4.2. Izdvajanje gameta ježinca injektiranjem 0.5 M kalijeva klorida i njihova oplodnja

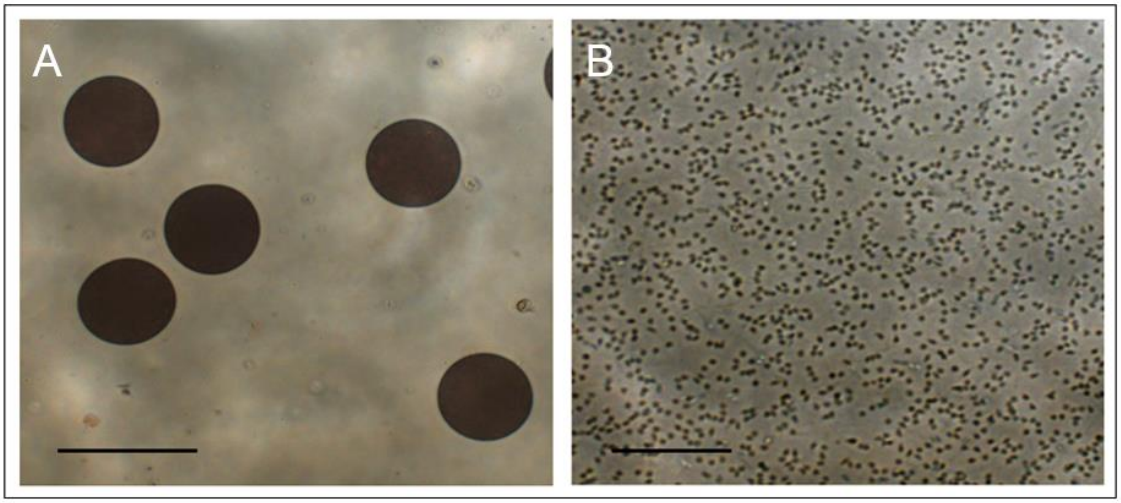
Za izdvajanje gameta ježinaca za potrebe ***testa embrionalnog razvoja ježinca*** *(*engl. *sea urchin embryo development test,* SUEDT*)* uslijed izlaganja različitih razvojnih stadija embrija triju ježinaca, te tretmana zigote 2 h nakon oplodnje dvaju ježinaca (*A. lixula* i *P. lividus*) primijenjena je metoda injektiranja 0.5 M KCl kroz peristomialnu membranu ježinca (Quiniou i sur., 1999). Ukratko, jedinka je prvotno dobro protresena kako bi se vidjelo počinje li s ispuštanjem gameta i bez injektiranja KCl-a. Ukoliko nije došlo do ispuštanja gameta samo trešnjom ježinca, injektirano je na nekoliko mjesta uokolo peristomialne membrane do 1 ml 0.5 M KCl-a, ježinac je ponovno protresen kako bi se otopina KCl-a ravnomjerno rasporedila unutar svih pet gonada te se na aboralnoj strani pratilo otpuštanje gameta. Spol ježinaca moguće je odrediti tek nakon što se gamete počnu ispuštati: gusta bijela suspenzija ukazuje na mušku jedinku u sve tri vrste, dok tamnocrvene (bordo) jajne stanice posjeduje vrsta *A. lixula* (Slika 9), narančaste gamete imaju ženke vrste *P. lividus* te žute jajne stanice vrsta *S. granularis* (Slika 11).



Slika 9. Jedinke ježinca *A. lixula* koje s aboralne strane luče gamete: (A) ženka luči suspenziju tamnocrvenih (bordo) jajnih stanica i (B) mužjak luči gustu suspenziju sperme.

Nadalje, u eksperimentima je korištena suspenzija gameta triju jedinki svakog spola kao početna suspenzija gameta za oplodnju. Jajne stanice sakupljale su se na način da se ježinac okrene aboralnom stranom prema dolje iznad čaše konusnog oblika te su se jajne stanice sakupljale na njezinom dnu u filtriranoj morskoj vodi. Nakon taloženja na dnu čaše, jajne stanice su sakupljene Pasteur pipetom te prebačene u plastičnu konusnu epruvetu od 15 ml gdje su dodatno istaložene. U konačnici, talog jajnih stanica triju ženki spojen je u jednu početku suspenziju za oplodnju. Sperma je sakupljena s Pasteur pipetom na suho, zbog toga što se ista u doticaju s morskom vodom aktivira, te čuvana na ledu do trenutka korištenja, odnosno početka oplodnje. Zrelost gameta provjerena je pod mikroskopom: pravilne okrugle jajne stanice te mobilna sperma smatrane su zrelim gametama (Slika 10).

Za oplodnju u Petrijevim zdjelicama korišteno je 50 µl koncentrirane suspenzije jajnih stanica u 20 ml filtrirane morske vode (~1000 stanica ml^{-1}), te 10 µl prethodno razrijeđene suspenzije sperme (1:8 u filtriranoj morskoj vodi). Nakon dodavanja sperme, Petrijevke su lagano promiješane kako bi se potaknula oplodnja te su ostavljene na sobnoj temperaturi 30 min (1 h za *S. granularis*).

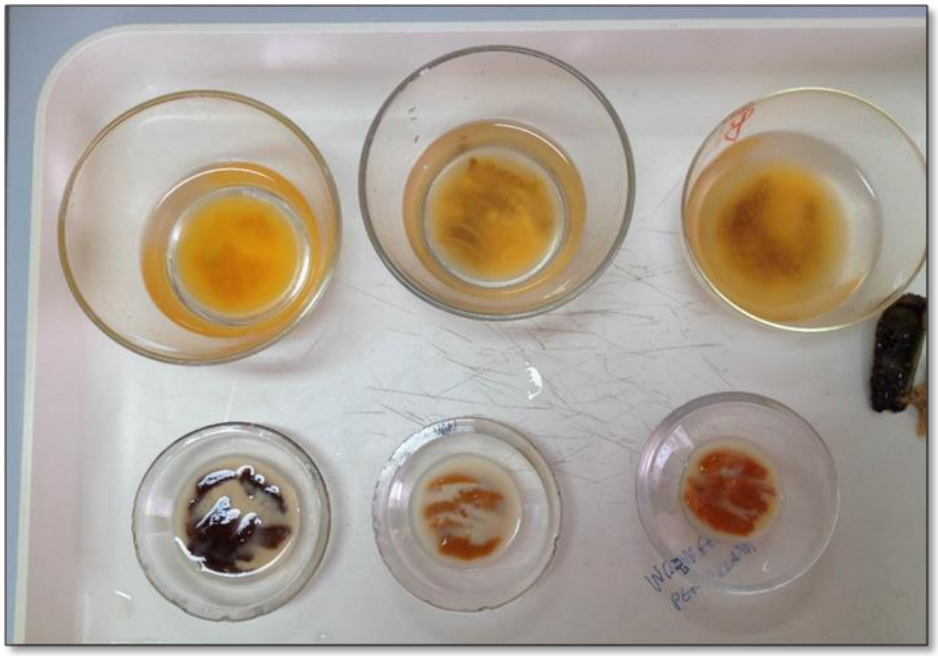


Slika 10. Gamete ježinca *A. lixula*: (A) jajne stanice (mjerilo 100 µm) i (B) spermiji (mjerilo 50 µm).

4.4.3. Izdvajanje gonada ježinaca mehaničkim putem

Za potrebe eksperimenta tretmana sperme nanočesticama te pripremu embrija za citogenetičku analizu ježinci su žrtvovani te su im izolirane gamete prema protokolu Pagano i sur. (1986 i 2002). Ukratko, ježinci su škarama otvoreni nekoliko centimetara uokolo usnog otvora. Slijedilo je utvrđivanje spola. Ukoliko su gonade ispuštale bijelu gustu suspenziju, žlicom su prebačene na suhi maleni tanjurić, dok su ženske gonade držane u maloj količini filtrirane morske vode (Slika 11). Prije korištenja suspenzija jajnih stanica, odnosno sperme profiltrirana je kroz fitoplanktonsku mrežicu veličine pora od 100 µm.

U svim SUEDT eksperimentima embriji ježinaca *A. lixula* i *P. lividus* nakon oplodnje čuvani su 48 h na temperaturi od 20 °C, dok su embriji ježinca *S. granularis* čuvani kroz 72 h na temperaturi od 18 °C. Osim toga, kulture su prekrivene crnom folijom kako ne bi bilo dodatnog negativnog utjecaja UV zračenja, uz povremeno protresanje zdjelica kao simulacije prirodnih valova.



Slika 11. Gonade ježinca *S. granularis* prije filtriranja kroz fitoplanktonsku mrežicu. Gornji red: gonade ženki - suspenzija jajnih stanica je žućkaste boje. Donji red: na suho izolirane muške gonade i bijela sperma oko njih. Muške gonade prve s lijeva nisu uzete za oplodnju budući su tamno smeđe do crne boje, što upućuje na starost jedinke i nekrotično tkivo.

4.4.4. Određivanje uspješnosti dosezanja stadija larvi ježinaca *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* i *Sphaerechinus granularis* nakon tretiranja zigota sa 60 nm-AgNP u različitim stadijima embrionalnog razvoja

Za potrebe ovog ispitivanja gonade ježinaca izdvojene su injektiranjem 0.5 M KCl-a te je oplodnja izvršena kako je to opisano u metodi poglavlja 4.4.2. Zigote triju vrsta ježinaca (*A. lixula*, *P. lividus* i *S. granularis*) izložene 60 nm-AgNP sintetiziranim u LMNB u rasponu koncentracije od 1-100 μg l^{-1} u različitim razvojnim stadijima nakon oplodnje. Vrijeme kada se embrij prvi puta susreo s AgNP odnosno kada su nanočestice dodane u uzorak bilo je: 30 min, 90 min, 6 h i 24 h nakon oplodnje za embrije vrsta *A. lixula* i *P. lividus*, odnosno 1, 6, 24 i 48 h za vrstu *S. granularis* zbog prirodno sporijeg razvoja embrija ove vrste. Specifična vremena doziranja AgNP odabrana su kako bi se tretirali različiti razvojni stadiji zigote ježinca: 30 min nakon oplodnje (1 h za vrstu *S. granularis*) – kako bi došlo do oplodnje i sintetizirala se fertilizacijska membrana, 90 min nakon oplodnje (6 h za vrstu *S. granularis*) – zigota se intenzivno dijeli i nalazi se u stadiju od 4-8 stanica, 6 h nakon oplodnje (24 h za vrstu *S. granularis*) – stadij blastule te 24 h nakon oplodnje (48 h za vrstu *S. granularis*) – stadij gastrule (Slika 7). Kao pozitivna kontrola korištena je otopina $AgNO_3$ u istome

koncentracijskom rasponu kao i AgNP, dodana 30 min nakon oplodnje (1 h za *S. granularis*) te netretirani kontrolni uzorci kao negativna kontrola.

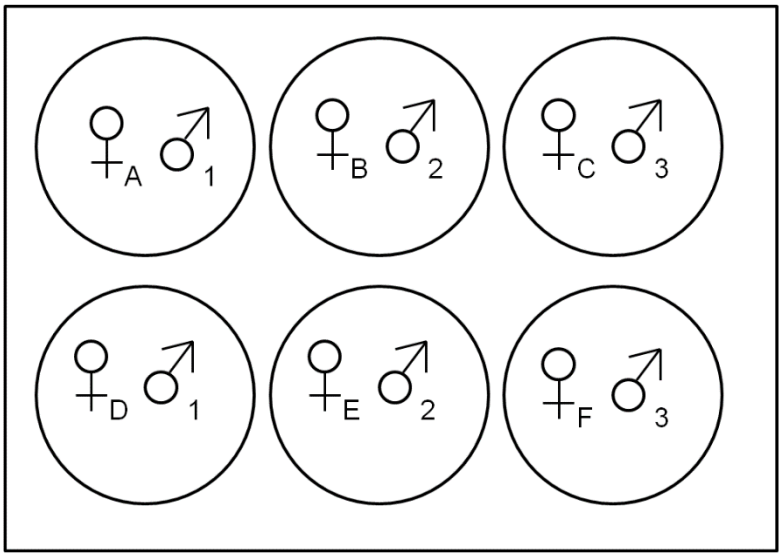
Nakon 48 h (72 h za *S. granularis*) kontrolne larve dosegnule su pluteus fazu s četiri potpuno razvijena ekstremiteta: dva dulja tzv. nožice i dva kraća tzv. ručice larve, te u potpunosti razvijenim probavnim traktom (Slika 21). Larve su zatim fiksirane u 0.1% paraformaldehidu (ishodna otopina: 40% u fosfatnom puferu, pH 7.0) i pohranjene na +4 °C kroz najviše 5 dana tijekom kojih je napravljeno brojanje. Primijećeno je da ukoliko se larve čuvaju u paraformaldehidu dulje od 5 dana, dolazi do promjene u samome izgledu larvi koje nisu posljedica učinka AgNP. Analizirane su tri biološke replike od kojih je svaka sadržavala po 100 larvi. Uspješnost dosezanja faze pluteusa praćena je pod lupom s povećanjem od 45× te je brojano prvih 100 larvi koje su razvrstane u jednu od sljedećih kategorija: normalno razvijena, zaostala larva i nerazvijeni embrij (Slika 21). Mikroskop Nikon Microphot-SA uz CCD Nikon-Hitachi kameru (100× povećanje) korišten je za fotografiranje uzoraka.

4.4.5. Određivanje uspješnosti dosezanja stadija larvi ježinaca *Arbacia lixula* i *Paracentrotus lividus* nakon tretiranja zigota s 10, 20, 40, 60 i 100 nm AgNP

Gamete dvaju ježinaca *A. lixula* i *P. lividus* izdvojene su injektiranjem 0.5 M KCl otopine te je oplodnja izvršena kako je prethodno objašnjeno u poglavlju 4.4.2. Ispitivanje embriotoksičnosti AgNP izvedeno je u Petrijevim zdjelicama od 20 ml. Dva sata nakon oplodnje, u fazi intenzivne diobe (4-8 stanica po zigoti), embriji su izloženi AgNP veličine 10, 20, 40, 60 i 100 nm različitih koncentracija, kao i $AgNO_3$. Konačne koncentracije AgNP i $AgNO_3$ iznosile su 0, 1, 10, 50, 100, 500 i 1000 μg l^{-1}. Nakon 48 h larve su fiksirane u 0.1% paraformaldehidu (ishodna otopina: 40% u fosfatnom puferu, pH 7.0), pohranjene na +4 °C te su kroz narednih 5 dana analizirane 4 biološke replike. U svakoj od njih pregledano je prvih 100 jedinki na način kako je to prethodno opisano u poglavlju 4.4.2. Mikroskop Carl Zeiss Axiovert200 uz AxioCam MRc5 kameru (100× povećanje) korišten je za fotografiranje uzoraka.

4.4.6. Određivanje uspješnosti oplodnje jajnih stanica ježinaca *Arbacia lixula* i *Paracentrotus lividus* spermijima prethodno tretiranim sa AgNP te kvaliteta potomstva

U svrhu tretmana sperme ježinca s raznim veličinama AgNP potrebna je veća količina čisto izolirane i profiltrirane sperme, stoga su za potrebe ovog eksperimenta ježincima gonade izdvojene kako je to opisano u poglavlju 4.4.3. U ovome eksperimentu gamete različitih jedinki nisu miješane u jednu suspenziju već su jajašca ukupno šest ženki i spermiji tri mužjaka nanošeni odvojeno u zasebne jažice plastične mikrotitarske ploče kako je prikazano na Slici 12. Na taj način, jajašca dviju ženki zasebno su oplođena spermijima samo jednog mužjaka u zasebnim jažicama.



Slika 12. Shema oplodnje jajnih stanica spermom predtretiranom s AgNP ili $AgNO_3$ u ploči od 6 jažica. Slova A, B, C, D, E i F označavaju žensku jedinku, dok brojke 1, 2 i 3 označavaju mušku jedinku ježinca.

Za tretman sperme ježinaca vrste *A. lixula* i *P. lividus* korištene su AgNP veličine od 10, 20, 40, 60 i 100 nm u rasponu koncentracija od 0 – 1000 μg l^{-1}. Suho izolirana sperma triju jedinki svake vrste profiltrirana je kroz fitoplanktonsku mrežicu te razrijeđena 10 puta u filtriranoj morskoj vodi. Tretman sperme odvijao se u plastičnim čašicama od 40 ml u koje je prethodno dodana određena koncentracija AgNP ili $AgNO_3$ kao pozitivne kontrole, odnosno ultračiste vode kada se radilo o kontrolnom, netretiranom uzorku. Nakon dodavanja ispitivane tvari, dodano je 10 ml filtrirane morske vode te u konačnici 100 μl razrijeđene suspenzije sperme. Suspenzija sperme s ispitivanom tvari ostavljena je na sobnoj temperaturi kroz 1 h. Za to vrijeme pripremljene su ploče sa 6 jažica u koje je redom dodano: 9 ml

filtrirane morske vode, 1 ml razrijeđene suspenzije jajnih stanica (konačna koncentracija jajnih stanica u jažici ~1000 stanica ml^{-1}) te u konačnici u svaku jažicu dodano je 100 µl sperme prethodno tretirane sa AgNP, odnosno $AgNO_3$ ili netretiranog uzorka sperme. U svrhu ispravnog brojanja uspješnosti oplodnje jajnih stanica brojanje je rađeno 2 h nakon oplodnje. Naime, fertilizacijska membrana stvara se oko oplođene jajne stanice nekoliko minuta nakon dodavanja sperme u medij s jajnim stanicama. Međutim, ona je vrlo teško uočljiva kod nekih vrsta ježinaca jer se nalazi vrlo blizu same površine jajne stanice. To se odnosi za vrstu *A. lixula*, dok je kod vrste *P. lividus* ona vrlo jasno uočljiva netom nakon oplodnje budući je dosta odvojena od same površine jajnih stanica (Conway i sur., 1980). Zbog ove pojave uspješnost oplodnje nakon tretmana s različitim veličinama AgNP te Ag^+ brojana je 2 h nakon oplodnje kada je ista vrlo lako uočljiva i kod vrste *A. lixula* jer je do tada već došlo barem do prve diobe te se embriji nalazi u stadiju od 2 – 4 stanice po zigoti, što se puno lakše može uočiti u usporedbi s netom oplođenom jajnom stanicom. Uspješno oplođenom jajnom stanicom smatran je embrij koji je bio u diobi ili je imao vidljivu sintetiziranu fertilizacijsku membranu. U protivnom, jajnu stanicu se smatralo neuspješno oplođenom. Nakon dva dana (48 h nakon oplodnje) larve su fiksirane s kromovim(III) sulfatom te je inverznim mikroskopom (Carl Zeiss) promatrana uspješnost dosezanja pluteus faze na prvih 100 larvi u svakoj od 6 jažica tj. bioloških replika.

4.4.7. Određivanje citogenotoksičnosti srebrnih nanočestica na moruli ježinca *Arbacia lixula*

Citogenetička analiza ježinca *A. lixula* nakon izloženosti 40 nm AgNP napravljena je prema protokolu Oral i sur. (2010). Ukratko, izolacija gameta učinjena je kako je to prethodno opisano u poglavlju 4.4.3. U svrhu ovog istraživanja korištena su tri mužjaka i 6 ženki, a oplodnja je izvršena u 500 ml filtrirane morske vode u staklenim čašama. Za postupak oplodnje u čaše je prvotno dodana filtrirana morska voda, zatim nekoliko ml profiltriranih jajnih stanica, tako da u konačnici koncentracija jajnih stanica iznosi ~1000 st. ml^{-1}. U konačnici ova će se suspenzija razrijediti još 10 puta (3 ml oplođenih jajnih stanica u 30 ml filtrirane morske vode) te će koncentracija embrija u eksperimentalnom tretmanu iznositi ~100 st. ml^{-1}. Suho izolirana sperma razrijeđena je s filtriranom morskom vodom (10 µl suho izolirane sperme razrijeđeno je s 2.5 ml filtrirane morske vode) te je za oplodnju u volumen od 500 ml dodan 1 ml razrijeđene suspenzije sperme (konačno razrjeđenje sperme bilo je 125

000 puta). Jajne stanice ostavljene su 30-45 min kako bi došlo do oplodnje, nakon čega je 3 ml suspenzije zigota prebačeno u manje plastične 40 ml čašice u koje su prethodno dodane komercijalne AgNP različitih veličina u rasponu koncentracije od 1 – 1000 μg l^{-1}, odnosno $AgNO_3$ ili 1000 μg l^{-1} ultračiste vode za kontrolni, netretirani uzorak i 27 ml filtrirane morske vode. Embriji su ostavljeni u kontaktu sa AgNP do trenutka dosezanja faze morule (~5 h nakon oplodnje). Nakon toga, staklenom vakuum sisaljkom usisano je 20 ml suspenzije iznad embrija koji su se istaložili na dno čašice. Ostatak od oko 10 ml suspenzije embrija prebačen je u plastičnu konusnu epruvetu od 15 ml te dodatno ostavljen na sobnoj temperaturi 10-ak min kako bi se embriji istaložili u 1 ml. Nakon toga, na isti je način usisano 9 ml filtrirane morske vode, vrlo pažljivo kako se ne bi usisali embriji s dna. Uzorci su fiksirani dodavanjem 9 ml otopine Carnoy (etanol, kloroform i ledena octena kiselina u volumnom omjeru 6:3:1), nakon čega su epruvete okrenute 3 puta kako bi embriji došli u kontakt s otopinom te su ostavljeni na sobnoj temperaturi 15-ak minuta, nakon čega je ponovo isisano 9 ml otopine Carnoy (ostavljajući na dnu plastične konusne epruvete 1 ml koncentriranih embrija) i dodano 9 ml čistog etanola. Uzorci su nadalje čuvani na sobnoj temperaturi u etanolu.

Za bojanje embrija, odnosno kromosoma u mitozi korištena je svježe pripremljena 1% otopina acetokarmina, koja je pripremljena otapanjem 0.2 g acetokarmina u 11 ml destilirane vode i 9 ml ledene octene kiseline, nakon čega je otopina ohlađena preko noći na +4 °C te naredni dan profiltrirana preko običnog filter papira kako bi se odstranili veći kristali boje. Bojanje embrija učinjeno je na način da je na predmetnicu prethodno nanesena kapljica (~50 μl) uzorka suspenzije embrija, ostavljena 1 min na sobnoj temperaturi da ispari ostatak etanola, te dodana kapljica 1% acetokarmina. Odmah nakon dodavanja boje, na preparat je položeno pokrovno stakalce te je odložen na tamno mjesto (ili prekriven aluminijskom folijom) kako ne bi dolazilo do degradacije boje. Nakon 5 – 10 min bojanja uzorak je promatran pod imerzijskim objektivom svjetlosnog mikroskopa Nikon Microphot-SA i fotografiran s CCD kamerom Nikon-Hitachi (povećanje od 1000 puta). Mjerene krajnje točke bile su kvantitativne i morfološke abnormalnosti. Kvantitativni parametri uključivali su: a) prosječan broj mitoza po embriju, b) postotak interfaznih embrija (embrija bez mitozne aktivnosti) i c) omjer metafaznih i anafaznih kromosoma (M/A). Morfološke promjene (abnormalnosti) zabilježene su kao: a) anafazni mostovi, b) zaostali kromosomi, c) acentrični fragmenti, d) raspršeni kromosomi, e) višestruka diobena vretena, f) ukupan broj mitotičkih promjena po embriju i g) postotak embrija s više od jednom aberacijom tijekom mitoze. Analizirana su 33 embrija, u tri biološka replikanta uzorka po tretmanu (koncentraciji).

4.5. Određivanje kombiniranog učinka srebrnih nanočestica i piretroidnih insekticida (cipermetrina i deltametrina) na dagnju *Mytilus galloprovincialis*

Dagnje *M. galloprovincialis* dopremljene su iz uzgajališta u Limskom kanalu (GPS koordinate: 45°07′49.45″N, 13° 44′13.06″E) barem 5 dana prije početka eksperimenta te ostavljene u vanjskom bazenu s protočnom morskom vodom radi aklimatizacije. Kako bi dagnje bile slične starosti pri odabiru jedinki nastojalo se uzimati dagnje približno jednake veličine (~4 cm). U svrhu istraživanja kombiniranog učinka AgNP i insekticida (cipermetrina i deltametrina) na dagnje prethodno su određene subletalne koncentracije 60 nm-AgNP LMNB te je procijenjen njihov biološki učinak u uvjetima *in vivo* testom stres na stres i u uvjetima *in vitro* testom stabilnosti lizosomalnih membrana hemocita.

4.5.1. Određivanje sposobnosti dagnji za preživljavanje na zraku nakon tretmana sa srebrnim nanočesticama

Za određivanje sposobnosti dagnji za preživljavanje na zraku nakon izlaganja (stres na stres test, Viarengo i sur., 1995) postavljeno je pet bazena s 37.5 l morske vode u koje su dodane različite koncentracije 60 nm-AgNP (sintetiziranih u LMNB): 1, 10, 50 i 100 μg l^{-1} te kontrolni bazen. U svaki je bazen zatim dodano 50 dagnji (0.75 l morske vode/dagnji). Postavljen je sustav za prozračivanje te su dagnje izlagane kroz 24 h. Nakon 24 h dagnje su izvađene iz bazena, prebačene na vlažni filter papir, kojim su bile i prekrivene te ostavljene na zraku, u klimatiziranoj prostoriji na temperaturi morske vode. Svaki je dan kontroliran broj preživjelih (potpuno zatvorenih ljuštura), odnosno uginulih dagnji, za koje je vanjskim pritiskom ljuštura utvrđeno da se ne zatvaraju u potpunosti. U konačnici računalo se srednje smrtonosno vrijeme za 50% ispitivanih jedinki (engl. *mean lethal time for 50% of sampled animals*, LT_{50}) s donjom i gornjom granicom povjerljivosti podataka (engl. *Lower and Upper Confidence Interval*, LCI, UCI).

4.5.2. Određivanje stabilnosti lizosomalne membrane hemocita dagnje nakon tretmana sa srebrnim nanočesticama

Stabilnost lizosomalnih membrana hemocita dagnje određena je u uvjetima *in vitro* testom sposobnosti zadržavanja boje neutralnog crvenila nakon izlaganja ispitivanoj tvari (60 nm AgNP sintetiziranih u LMNB) prema protokolu Moore i sur. (2009). Ishodna 0.2 postotna

otopina neutralnog crvenila pripremljena je otapanjem u dimetilsulfoksidu (DMSO). U svrhu bojanja hemocita svaki dan je pripremljena svježa 0.0006% radna otopina boje razrjeđivanjem matične otopine u filtriranoj morskoj vodi. Hemolimfa dagnje izdvojena je uz pomoć 25 mjerne hipodermične medicinske igle postavljene na 1 ml špricu u koju je prvotno uzet volumen filtrirane morske vode od 0.1 ml. Iz mišića aduktora dagnje izvađen je jednaki volumen hemolimfe. Uzorak hemolimfe zatim je prebačen u Eppendorf tubicu od 1.5 ml. Eppendorf tubica je nekoliko puta lagano okrenuta kako bi se sadržaj jednolično rasporedio te je 50 µl ove suspenzije hemocita stavljeno u sredinu predmetnog stakalca prethodno premazanog poli-L-lizinom kako bi se stanice učinkovitije vezale na njihovu površinu. Naime, kapljica od 2 µl poli-L-lizina, prethodno razrijeđenog s destiliranom vodom (1:10, V/V), stavljena je u sredinu predmetnice te je uz pomoć pokrovnog stakalca raširena po predmetnici. Predmetnica je zatim ostavljena 15-ak minuta u vlažnu komoru kako bi se stanice povezale na stakalce. Nakon 15 min stakalce s uzorkom hemolimfe je prebačeno u Petrijevu zdjelicu u kojoj se nalazilo 30 ml 50 i 100 µg l^{-1} 60 nm-AgNP resuspendiranih u filtriranoj morskoj vodi. Kao pozitivna kontrola korištena je otopina $CuSO_4$ koncentracije od 0.25 i 2.5 µg l^{-1} te je analiziran i kontrolni netretirani uzorak. Nakon inkubacije s nanočesticama u trajanju od 1 h predmetnice su izvađene iz Petrijevih zdjelica te su stanice bojane radnom otopinom neutralnog crvenila. Radna otopina neutralnog crvenila (40 µl) dodana je nekoliko cm dalje od same sredine predmetnice gdje su se nalazile stanice, zatim je predmetnica lagano nakošena kako bi cijeli volumen boje postepeno skliznuo na stanice. Predmetnice su zatim inkubirane 15 min u vlažnoj komorici u mraku. Nakon toga višak boje je ispran filtriranom morskom vodom, te je na preparat stavljena pokrovnica, nakon čega je slijedilo mikroskopiranje uzoraka na mikroskopu Nikon Microphot-SA i fotografiranje CCD kamerom Nikon-Hitachi.

Budući je neutralno crvenilo vrlo fotosenzibilna boja, čitanje valja napraviti što brže te po završetku uzorak dalje spremiti u vlažnu komoru u mraku. Stanice hemocita fokusiraju se prvotno pod povećanjem od 100x, nakon čega se otpuštanje boje iz lizosoma prati na povećanju od 400x u sljedećim vremenskim razmacima: nakon 15, 30, 60, 90 120, 150 i 180 min, pri čemu se bilježi broj hemocita koje su potpuno ispustile boju u citosol. Uspješnost zadržavanja boje unutar lizosoma analizirana je u prvih 100 stanica, u tri replikanta uzorka. Dakle, za svaki je tretman ukupno pregledano 300 stanica hemocita. Krajnji rezultat mjerenja jest vrijeme kada 50% hemocita ispusti boju iz lizosoma.

4.5.3. Izlaganje dagnji srebrnim nanočesticama, cipermetrinu, deltametrinu i njihovim kombinacijama u uvjetima *in vivo*

Dagnje srednje veličine od ~4 cm (30 jedinki) raspoređene su u 15 bazena s 20 l prirodne morske vode (0.75 l morske vode/dagnji). Za izlaganje su korišteni pripravci insekticida komercijalnog naziva „Deltasect“ (masene koncentracije 24 g l^{-1}) i „Aquacyp“ (masene koncentracije 100 g l^{-1}). Iz izvornih otopina napravljene su matične otopine komercijalnih pripravaka u destiliranoj vodi koje su sadržavale 0.01 i 1 g l^{-1} deltametrina, i 0.2 i 20 g l^{-1} cipermetrina. Koncentracije matičnih suspenzija AgNP u destiliranoj vodi iznosile su 100 mg l^{-1} izvorno sintetizirane suspenzije 60 nm-AgNP. U svaki od bazena dodano je po 11 ml odgovarajuće radne suspenzije priređene iz različitih kombinacija matičnih suspenzija AgNP (10 ml) i pesticida (1 ml). U kontrolni bazen s netretiranim školjkama, dodano je 11 ml destilirane vode (s kojom su pripremljena razrjeđenja ispitivanih tvari). Radna suspenzija za izlaganje samo AgNP sadržavala je 1 ml vode umjesto nanočestica, dok je ona za izlaganje samo pesticidima, sadržavala 10 ml vode. Eksperimentalni način doziranja i konačne koncentracije prikazane su u Tablici 2. Svaki je dan morska voda u potpunosti izmijenjena te je doziranje ponovljeno. Izlaganje je trajalo 4 dana, nakon čega su dagnje secirane te su im izolirane škrge i probavna žlijezda. Tkivo je odmah spremljeno u zasebne Eppendorf tubice od 1.5 ml te zaleđeno u tekućem dušiku. Svi uzorci, do daljnje uporabe, pohranjeni su na -80 °C.

Tablica 2. Nazivi bazena te konačne koncentracije AgNP, cipermetrina i deltametrina u pojedinom bazenu. Skraćenice: A – AgNP, C – cipermetrin i D – deltametrin.

Skraćeni naziv bazena	c (AgNP) [μg l^{-1}]	c (insekticida) [μg l^{-1}]
A1	50	/
A2	5	/
C1	/	1000
C2	/	10
D1	/	50
D2	/	0.05
A1C1	50	1000
A1C2	50	10
A2C1	5	1000
A2C2	5	10
A1D1	50	50
A1D2	50	0.05
A2D1	5	50
A2D2	5	0.05
K	/	/

4.5.3.1 Određivanje aktivnosti enzima acetilkolinesteraze u škrgama dagnji nakon tretmana sa srebrnim nanočesticama, cipermetrinom, deltametrinom i njihovim kombinacijama

Aktivnost enzima acetilkolinesteraze (AChE) u škrgama dagnji određivana je prema Ellman-ovoj metodi (1961). Za potrebe određivanja aktivnosti AChE korišteno je 15 prethodno smrznutih škrga dagnji. Tkivo škrga prvo je mehanički homogenizirano (Teflon Potter homogenizator) i to na način da je izvagan ~1 g smrznutih škrga te dodan tri puta veći volumen hladnog (+4 ºC) homogenizacijskog pufera (0.1 M tris-hidroksimetil aminometan, TRIS-HCl, pH 8.0) u omjeru 1:3 (w/V). Homogenat škrga zatim je centrifugiran u tubici od

1.5 ml na 10 000 g, +4 °C kroz 30 min. Supernatant je izuzet, prebačen u novu 1.5 ml tubicu te pohranjen na -80 °C do daljnje uporabe.

Aktivnost AChE je mjerena u mikrotitarskim pločama s 96 jažica. Enzimska reakcija započinje dodavanjem 50 µl supstrata 6 mM acetiltiokolina (ATC) istovremeno u sve jažice mikrotitarske ploče gdje je prethodno već dodano redom: 50 µl homogenata škrga i 200 µl 0.5 mM otopine Ellman-ovog reagensa 5,5-ditiobis-2-nitrobenzojeve kiseline (DTNB). U jednu od jažica, umjesto homogenata dodano je 50 µl pufera. Apsorbancija ovog uzorka predstavlja pozadinsku vrijednost (tzv. slijepa proba). Za svaku jedinku nanesene su po tri replike uzorka homogenata, pri čemu je u jednu od njih umjesto supstrata dodan pufer, kako bi se odredila nespecifična enzimska aktivnost u svakom uzorku. Tijekom enzimske reakcije, dolazi do hidrolize supstrata ATC, pri čemu se oslobađa tiokolin, koji s reagensom DTNB stvara kromofor 5-tio-2-nitrobenzoatni anion (TNB), čija se apsorbancija mjeri na 405 nm i proporcionalna je s njegovom količinom, tj. s aktivnošću enzima AChE.

Za mjerenje apsorbancije korišten je čitač mikrotitarskih ploča (Labsystems, Multiscan Ascent®) opremljen programskim paketom „Ascent Version 2.4.2“. Uređaj je bio podešen za očitavanje svakih 30 sekundi, tijekom 4 minute.

Aktivnost enzima AChE određena je prema formuli:

$$\mathbf{A_{AChE} = (\Delta A/\ min) \times V_{(reakcijske\ smjese)} \times 1000/ (\varepsilon \times d \times V_{(uzorka)}) [U\ l^{-1}]}$$

gdje $\mathbf{A_{AChE}}$ predstavlja aktivnost enzima AChE, $\mathbf{\Delta A}$ promjenu apsorbancije u minuti, $V_{(reakcijske\ smjese)}$ = 350 µl; $V_{(uzorka)}$ = 50 µl; ε = 13.3 cm^2 μmol^{-1}; d = 1 cm.

Dobivena enzimska aktivnost izražena je u molima prerađenog supstrata u jedinici vremena (U = µmol min^{-1}). Naknadno se dobivena vrijednost dijeli s koncentracijom proteina u uzorku (koncentracija proteina određena je prema Bradfordu, 1976) te se u konačnici izražava kao specifična aktivnost AChE u nmol min^{-1} mg $prot.^{-1}$.

4.5.3.2 Određivanje aktivnosti enzima glutation *S*-transferaze u škrgama dagnje nakon tretmana sa srebrnim nanočesticama, cipermetrinom, deltametrinom i kombinacijama

Za potrebe određivanja aktivnosti glutation *S*-transferaze (GST) prethodno smrznute škrge dagnji mehanički su homogenizirane (Teflon Potter homogenizator) u hladnom 0.1 M kalij-fosfatnom puferu koji je sadržavao 2 mM EDTA (pH 7.4) u omjeru 1:2 (w/V).

Homogenizirano je 15 uzoraka škrga iz 15 različitih jedinki. Uzorci su zatim centrifugirani na 10 000 g, +4 °C kroz 30 min. Supernatant je spremljen u Eppendorf tubice od 1,5 ml, zaleđen u tekućem dušiku te pohranjen na -80 °C do daljnje uporabe.

Aktivnost GST određena je prema protokolu Owensa i Belchera (1965). U tu je svrhu pripremljen poseban pufer GST (0.1 M kalij-fosfatni pufer, pH 6.5), 1 mM supstrat 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) i 1 mM glutation (GSH). U mikrotitarske jažice dodano je prvo 5 µl ispitivanog uzorka te 295 µl svježe pripremljenog pufera GST. Kontrolne jažice nisu sadržavale uzorak, već 5 µl pufera GST. Porast apsorbancije uslijed stvaranja konjugata *S*-2,4-dinitrofenilglutationa mjeren je na valnoj duljini od 340 nm uz 1.5 min predinkubacije te tijekom ukupno 5 minuta svakih 30 sekundi. Za mjerenje apsorbancije korišten je čitač mikrotitarskih ploča (Labsystems, Multiscan Ascent®) opremljen programskim paketom „Ascent Version 2.4.2".

Aktivnost enzima GST određena je prema formuli:

$$\mathbf{A_{GST} = (\Delta A/\ min) \times V_{(reakcijske\ smjese)} \times 1000/ (\varepsilon \times d \times V_{(uzorka)}) [U\ l^{-1}]}$$

gdje A_{GST} predstavlja aktivnost enzima GST, ΔA promjenu apsorbancije u minuti,

$V_{(reakcijske\ smjese)}$ = 300 µl; $V_{(uzorka)}$ = 5 µl; ε = 9.6 cm^2 μmol^{-1}; d = 1 cm.

Dobivena enzimska aktivnost izražena je u molima prerađenog supstrata u jedinici vremena (U = µmol min^{-1}). Naknadno se dobivena vrijednost dijeli s koncentracijom proteina u uzorku koje je bila određena je prema Bradfordu (Bradford, 1976) te se u konačnici dobivena vrijednost izražava kao specifična aktivnost GST u nmol min^{-1} mg $prot.^{-1}$.

4.5.3.3. Određivanje koncentracije metalotioneina u probavnoj žlijezdi dagnje nakon tretmana sa srebrnim nanočesticama, cipermetrinom, deltametrinom i njihovim kombinacijama

U 8 kompozitnih uzoraka probavne žlijezde (od tri dagnje) (ukupno 0.75 – 1.20 g) dodan je hladni (+4 °C) pufer za homogeniziranje u omjeru 1:3 (w/V). Pufer za homogeniziranje (0.5 M saharoze, 20 mM TRIS, pH 8.6), sadržavao je leupeptin (3 µl ml^{-1}), fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF; 1.5 µl ml^{-1}) te β-merkaptoetanol (0.05 µl ml^{-1}). Uzorci probavne žlijezde mehanički su homogenizirani (Teflon Potter homogenizator) i zatim centrifugirani u staklenim epruvetama (Biofuge stratos Corex), na 15 000 g, + 4 °C kroz 1 h.

Nakon toga u čistu epruvetu sakupljen je 1 ml supernatanta u koji je dodano 1.05 ml etanola (ohlađenog na -20 °C) i 20 µl kloroforma. Uzorci su kratko vorteksirani te centrifugirani na 6 000 g, +4 °C, 10 min. Izuzet je zatim sav supernatant i prebačen u čistu plastičnu epruvetu u koju je zatim dodano 40 µl 36.5% klorovodične kiseline i 5 ml etanola (ohlađenog na -20 °C). Proteini su taloženi preko noći na -20 °C te naredni dan oboreni centrifugiranjem na 6 000 g, +4 °C kroz 10 min. Supernatant je zatim odliven, a talog ispran u hladnoj (-20 °C) otopini etanola, kloroforma i pufera za homogeniziranje (87:1:12, V/V/V). Metalotionein je zatim bilo potrebno denaturirati i odstraniti katione metala koji su na njih vezani, tj. osloboditi SH skupine. Stoga je u talog dodano 150 µl 0.25 M natrijeva klorida i 150 µl otopine 1 M HCl-a koja je sadržavala 4 mM EDTA te je talog raspršen na ledu 5 sekundi ultrazvučnim homogeniziranjem snage 100W (HD 4100, Bandelin, Njemačka).

Za određivanje metalotionenina korištena je kalibracijska krivulja glutationa (GSH). Serijska razrjeđenja GSH priređena su iz matične otopine GSH (1 mg ml^{-1} u 0.25 M natrijevom kloridu) i iznosila su 0, 7.2, 14.4, 21.6, 28.8, 36.0, 43.2 i 57.8 nmol ml^{-1}. Nakon pripreme, u svako od razrjeđenja GSH dodano je po 150 µl otopine 1M HCl s 4 mM EDTA.

Otopina DTNB-a (0.43 mM) priređena je u 0.2 M natrij-fosfatnom puferu (pH 8.0) koji je sadržavao i 2 M NaCl za stabilizaciju DTNB-a kako bi se održao maksimum apsorbancije koji je postignut nakon svega nekoliko sekundi. U svaki je uzorak i sva razrjeđenja GSH zatim otpipetirano 4.2 ml otopine DTNB-a. Uzorci probavnih žlijezdi su kratko vorteksirani te centrifugirani na 6 000 g, +15 °C kroz 10 min. Iza toga je 340 µl uzorka i standarda GSH otpipetirano u mikrotitarsku ploču te je odmah potom mjerena apsorbancija na 405 nm. Za mjerenje apsorbancije korišten je čitač mikrotitarskih ploča (Labsystems, Multiscan Ascent®) opremljen programskim paketom „Ascent Version 2.4.2“.

4.6. Statistička obrada podataka

U ovome su radu podaci najčešće prikazivani kao stupčasti dijagrami srednjih vrijednosti i pripadajućih standardnih devijacija, osim rezultata SOS testa kada su prikazani kao krivulja preživljavanja u funkciji vremena izlaganja.

Za statističku obradu podataka najčešće je korištena metoda analize varijanci (engl. *analysis of variance – ANOVA*). Normalna raspodjela podataka provjerena je Shapiro-Wilk-ovim testom, a homogenost varijanci Levene-ovim testom, kako bi se potvrdilo da su

zadovoljene pretpostavke za korištenje parametarskog testa. Ukoliko je utvrđena statistički značajna razlika srednje vrijednosti određenog parametra između eksperimentalnih skupina, uslijedio je Bonferroni *post hoc* test. Ovim je testom utvrđeno koje se eksperimentalne skupine razlikuju međusobno i u odnosu na kontrolnu skupinu. Za razinu značajnosti odabrane su slijedeće vrijednosti: $p < 0.05$, $p < 0.01$ i $p < 0.001$. Ukoliko je utvrđeno da podaci nisu normalno distribuirani, ili varijance nisu homogene, korišten je ne-parametarski Kruskal-Wallis test kako bi se provjerilo postoji li značajna razlika između grupa. U tom slučaju, slijedio je Mann Whitney neparametarski test, kako bi se utvrdilo koje se eksperimentalne skupine razlikuju međusobno i od kontrole. Za statističku obradu podataka korišten je program OriginLab software OriginPro v8.0

5. REZULTATI

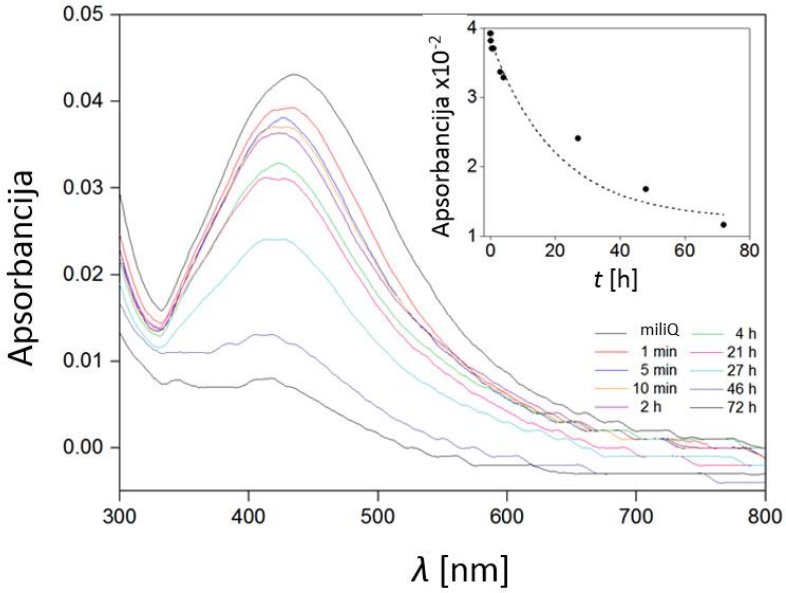
5. Rezultati

5.1. Fizikalno-kemijska karakterizacija srebrnih nanočestica

5.1.1. Praćenje nastajanja nanočestica primjenom UV-Vis apsorpcijske spektroskopije

UV-Vis apsorpcijski spektri uzoraka suspenzija AgNP (LMNB) u ultračistoj vodi (Slika 13) pokazuju apsorpcijski pik jakog intenziteta s maksimumom na 435 nm, što odgovara površinskoj plazma rezonanciji (engl. *surface plasmon resonance*, SPR) AgNP od približno 60 nm (Gicheva i Yordanov, 2013). Kako bi se ispitalo ponašanje AgNP (LMNB) u morskoj vodi, alikvot izvorne suspenzije nanočestica dodan je u filtriranu morsku vodu te su apsorpcijski spektri snimani u vremenskom periodu od 72 h. Primijećeno je da se s vremenom smanjuje intenzitet maksimuma apsorpcijskog pika te se on pomiće na niže valne duljine. Takvo ponašanje može se objasniti oksidacijskim otapanjem (Adamczyk i sur., 2016) nanočestica u morskoj vodi nakon čega se u mediju nalaze čestice manjih dimenzija koje daju apsorpcijski pik na nižim valnim duljinama (Slika 13 i Tablica 3).

Najveće smanjenje intenziteta maksimuma apsorpcijskog pika javlja se netom nakon dodavanja AgNP u morsku vodu, kao rezultat aglomeracije AgNP u prisutnosti elektrolita morske vode (Slika 13). Međutim, konstantna prisutnost SPR čak i nakon nekoliko dana je posljedica stabilizacije AgNP s prirodno prisutnom organskom tvari u moru (NOM) koja djelomično stabilizira nanočestice i time usporava aglomeraciju i/ili otapanje (Levak i sur., 2017).



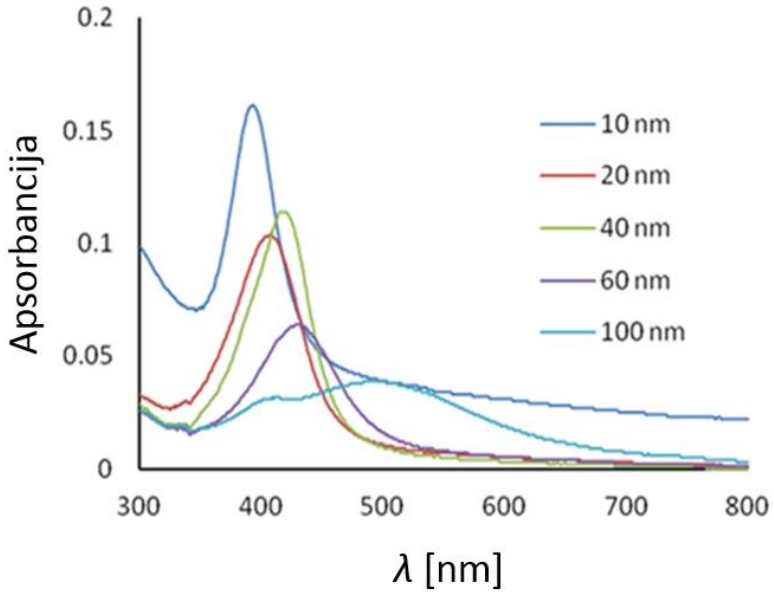
Slika 13. Promjena apsorpcijskog spektra AgNP veličine 60 nm (LMNB) u filtriranoj morskoj vodi s vremenom (MiliQ – ultračista voda)

Eksponencijalni pad maksimuma apsorpcijskog pika, odnosno smanjenje površinske plazma rezonancije s vremenom, modelirano je eksponencijalno padajućom funkcijom oblika $y = Ae^{-x/t} + y_0$, dok je R^2 vrijednost iznosila 0.98. Konstanta opadanja (engl. *decay constant*) za krivulju t iznosila je 20.344 ± 6.306 h^{-1} (0.848 ± 0.263 dan^{-1}).

Osim 60 nm-AgNP (LMNB), ispitano je ponašanje komercijalnih AgNP različitih veličina (10, 20, 40, 60 i 100 nm) u ultračistoj vodi i filtriranoj morskoj vodi kroz 48 h. Naime, srebrne nanočestice, ovisno o veličini, maksimalni pik daju na valnoj duljini između 390 – 460 nm. Dobiveni maksimumi apsorpcijskih pikova u ultračistoj vodi, prema veličini ispitivanih AgNP, navedeni su u Tablici 3. Na Slici 14. jasno se vidi pomak maksimuma apsorpcijskog pika s povećanjem veličine nanočestica prema višim valnim duljinama.

Tablica 3. Valne duljine (λ) maksimuma apsorpcijskog pika različitih veličina AgNP u ultračistoj vodi (c = 1 mg l^{-1}).

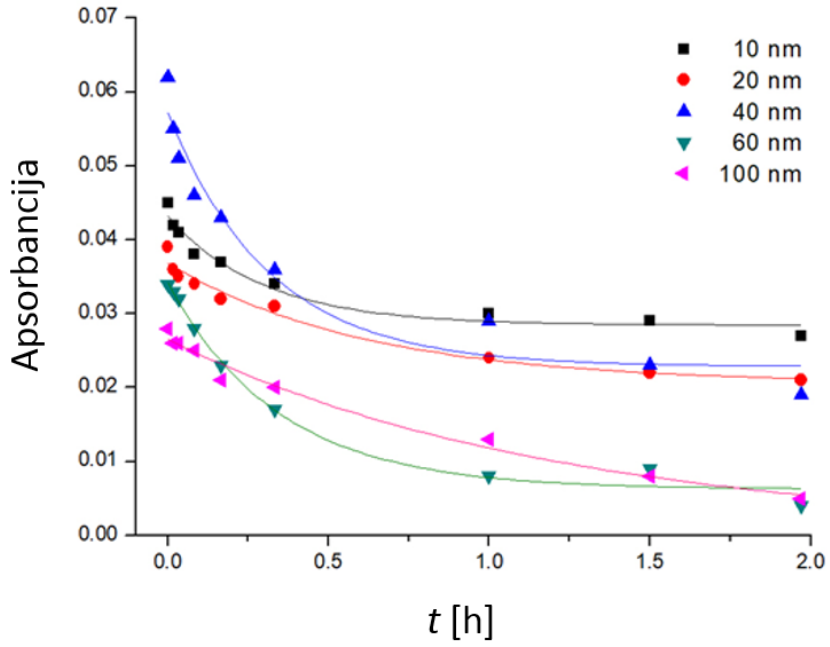
Veličina AgNP [nm]	λ maksimuma apsorpcijskog pika [nm]
10	393
20	406
40	415
60	430
100	495



Slika 14. Apsorpcijski spektri AgNP različitih veličina u ultračistoj vodi (c = 1 mg l^{-1}).

Na Slici 15. prikazano je opadanje maksimuma apsorpcijskog pika AgNP različitih veličina tijekom prva dva sata od trenutka dodavanja AgNP u filtriranu morsku vodu. Naime, s vremenom se apsorpcijski pik kod svih ispitivanih AgNP pomiče na niže valne duljine. Najveće opadanje intenziteta pika i u tom je slučaju uočeno tijekom prvih sat vremena nakon dodatka AgNP u filtriranu morsku vodu nakon čega se jačina pika kroz narednih 48 h održala konstantnom (stoga nije prikazana na grafu). Takvo ponašanje je posljedica nagle aglomeracije nanočestica u trenutku kada se nađu u mediju visoke koncentracije soli. No, budući da SPR ne nestaje u potpunosti vrlo vjerojatno dolazi do vezanja prirodne organske tvari na površinu AgNP što ih čini stabilnijima te usporava proces aglomeracije. Osim toga, iz

grafa (Slika 15.) se jasno vidi kako AgNP manje veličine (10 i 20 nm) dulje ostaju u nano-obliku.



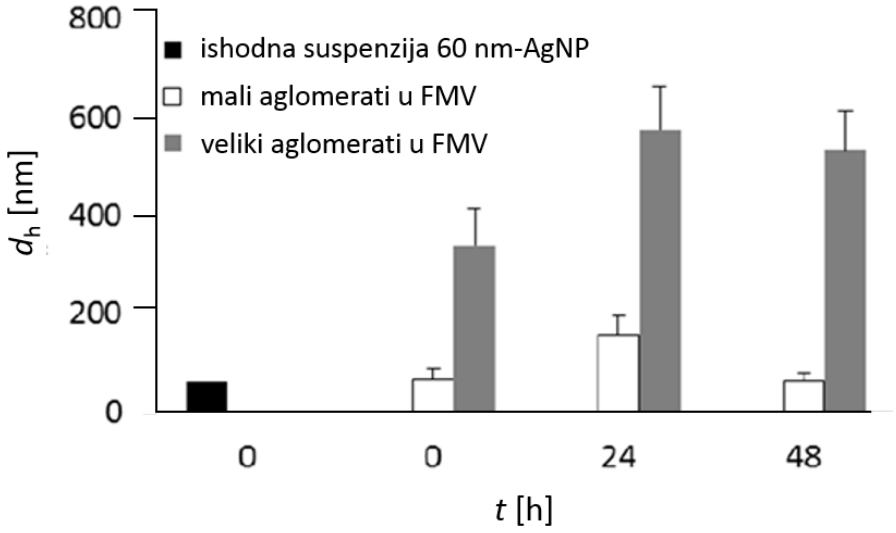
Slika 15. Promjena intenziteta maksimuma površinske plazma rezonancije apsorpcijskog pika AgNP veličina 10, 20, 40, 60 i 100 nm u filtriranoj morskoj vodi s vremenom (c = 1 mg l^{-1}).

Smanjenje intenziteta površinske plazma rezonancije s vremenom modelirano je eksponencijalno padajućom funkcijom oblika $y = Ae^{-x/t} + y_0$, dok se R^2 vrijednost kretala u rasponu od 0.94 do 0.99. Konstante opadanja za prikazane krivulje kretale su se od 0.3 ± 0.07 do 0.35 ± 0.05 dan^{-1} za AgNP veličine do 60 nm, te su porasle na 1.22 ± 0.41 dan^{-1} za 100 nm-AgNP. Što je manja konstanta opadanja to je brži proces aglomeracije. Stoga se iz konstante opadanja može zaključiti kako je proces aglomeracije kod AgNP veličine od 10 - 60 nm znatno brži u usporebi s onima veličine 100 nm. Nadalje, viša vrijednost konstante opadanja AgNP (LMNB) (0.84 ± 0.263 dan^{-1}) u usporedbi s kupovnim AgNP veličine 60 nm (0.35± 0.05 dan^{-1}) govori u prilog većoj distrubuciji veličine čestica u suspenziji sintetiziranoj u LMNB. Namie, određena količina većih čestica u suspenziji AgNP (LMNB) usporava otapanje čestica.

5.1.2. Određivanje veličine nanočestica dinamičkim raspršenjem svijetlosti

Hidrodinamički promjer AgNP pripremljenih u ultračistoj vodi te filtriranoj morskoj vodi određen je metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS-om). Za AgNP pripremljene u LMNB u ultračistoj vodi, izmjerena je veličina od 59.7 ± 3.06 nm. Međutim, indeks polidisperznosti (engl. *polydispersivity index* , PdI) iznosio je 0.42 ± 0.2 što upućuje na široki raspon veličina čestica. Takvi rezultati ukazuju na činjenicu kako sinteza nanočestica redukcijom s natrijevim citratom nije dala 'monodisperzne' nanočestice uskog raspona veličine.

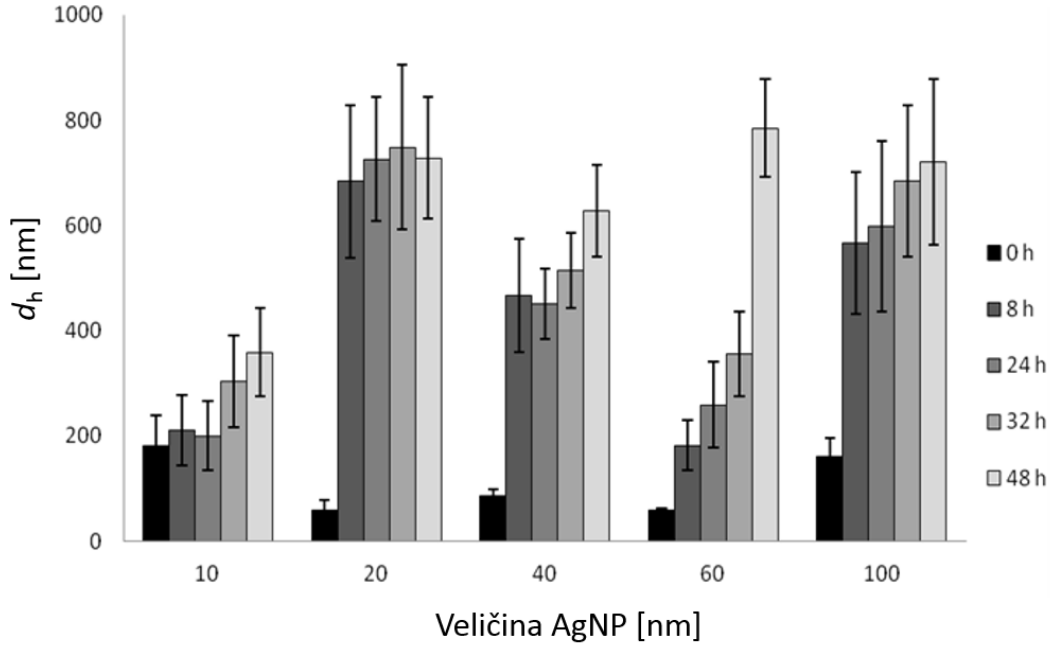
Stabilnost 60 nm-AgNP (LMNB) u filtriranoj morskoj vodi praćena je kroz 48 h. U trenutku doticaja s filtriranom morskom vodom AgNP stvorile su bimodalnu raspodjelu veličine čestica s dominantnom populacijom veličine 286.0 nm (77.7%). Nakon 24 h u suspenziji je i dalje prisutna bimodalna raspodjela veličine čestica s nešto većim hidrodinamičkim promjerom od 490.0 nm (85%). Hidrodinamički promjer čestica nije se znatno promijenio u naredna 24 h (kroz ukupno 48 h) te je dominantna populacija čestica imala h_d 432.4 nm (93%) (Slika 16).



Slika 16. Promjena hidrodinamičkih promjera (d_h) i njihove standardne devijacije ishodnih suspenzija 60 nm-AgNP (c = 1 mg l^{-1}) u ultračistoj vodi (crni stupac), manjih (bijeli stupci) i većih (sivi stupci) aglomerata u filtriranoj morskoj vodi (FMV) s vremenom. Temperatura mjerenja 25 °C.

Promjene hidrodinamičkog promjera AgNP različtih veličina kroz 48 h prikazane su na Slici 17. U suspenziji AgNP veličine 10 nm već pri samom doticaju s morskom vodom (nulto vrijeme mjerenja – 0 h) bila je prisutna jedna populacija čestica, d_h 180.3 nm. Nakon 8 h

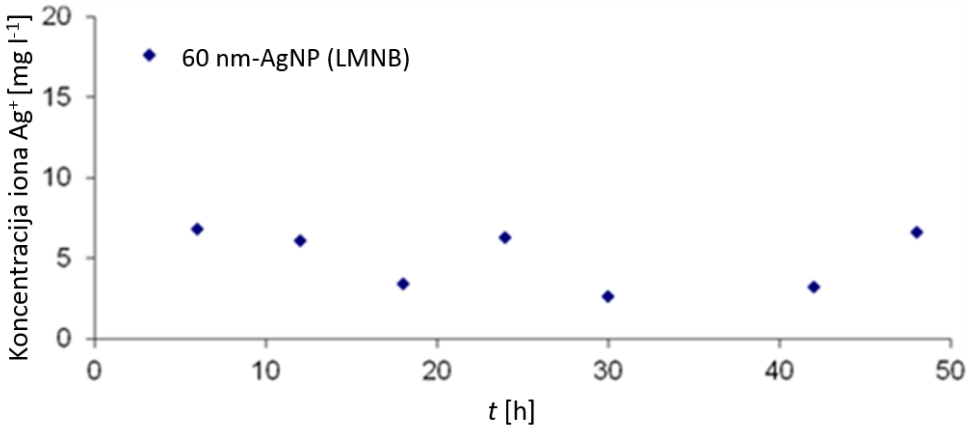
njihova se veličina udvostručila te se u suspenziji mjerio hidrodinamički promjer čestica od 210.5 nm. Veličina nanočestica zatim je ostala približno konstantna kroz naredna 24 h (do 32 h), nakon čega su izmjerene čestice imale d_h od 303.4 nm. Hidrodinamički radijus neznatno je rasao te pri vremenu mjerenja do 48 h nakon dodatka u filtriranu morsku vodu iznosio 358.6 nm. Dakle, 10 nm-AgNP, kroz 48 h, dale su monomodalnu rapodjelu veličine čestica po volumenu u filtriranoj morskoj vodi, iako je d_h čestica rasao s vremenom. AgNP veličine 20 nm u doticaju s morskom vodom stvorile su bimodalnu rapodjelu čestica s dominantnom populacijom (67.8%) čestica d_h od 250.8 nm, te nešto manjih čestica hidrodinamičkog promjera od 58.2 nm (32.2%). Međutim, već nakon 8 h u suspenziji su prevladavale nakupine čestica d_h od 683.3 nm (98.6%), i vrijednosti d_h se nisu mijenjale s vremenom (do 48 h), što ukazuje na relativnu stabilnost aglomerata 20 nm-AgNP u filtriranoj morskoj vodi. Srebrne nanočestice od 40 nm, poput 20 nm-AgNP, stvorile su bimodalnu distribuciju čestica u trenutku doticaja s filtriranom morskom vodom: dominantna populacija čestica (77.2%) imala je d_h od 24.6 nm, te nešto veća polulacija čestica od 87.2 nm (22.8%). Između 8 i 48 h hidrodinamički promjer čestica u suspenziji kretao se između 200.9 i 634.1 nm. Srebrne nanočestice od 60 nm imale su najpravilniji, postepeni rast aglomerata u morskoj vodi. U trenutku doticaja s morskom vodom one su zadržale svoju veličinu (d_h od 59.1 nm). Nakon prvih 8 h u suspenziji su dominirali aglomerati (89.9%) d_h od 181.4 nm uz 10.1% populacije čestica hidrodinamičkog promjera od 5531.3 nm. Proces aglomeracije se nastavio te je nakon 24 h vrijednost d_h čestica iznosio 259.3 nm. Čestice su dalje postepeno rasle kroz narednih 8 h te dostigle hidrodinamički promjer od 332.9 nm. Kroz narednih 16 h dolazi do naglog porasta veličine čestica u suspenziji, te je nakon 48 h vrijednost d_h čestica iznosio 760.2 nm (97.6%). Hidrodinamički promjer AgNP veličine 100 nm u trenutku doticaja s morskom vodom iznosio je 160.8 nm. Nadalje, u prvih 8 h došlo je do aglomeracije čestica d_h vrijednost bila je 677.4 nm. Između 24 i 32 h izmjerena je vrijednost d_h čestica od 134.6 do 872.3 nm. Nakon 48 h javila se bimodalna distribucija čestica u kojoj je dominantna populacija (61.8%) imala vrijednost d_h od 450.1 nm, a manje čestice u suspenziji dale su vrijednost d_h od 60.5 nm (38.2%).



Slika 17. Hidrodinamički promjeri (d_h) i standardna devijacija svježe pripremljenih AgNP različitih veličina (c = 1 mg l^{-1}) u filtriranoj morskoj vodi kroz vrijeme (distribucija veličine nanočestica prema izmjerenom volumenu).

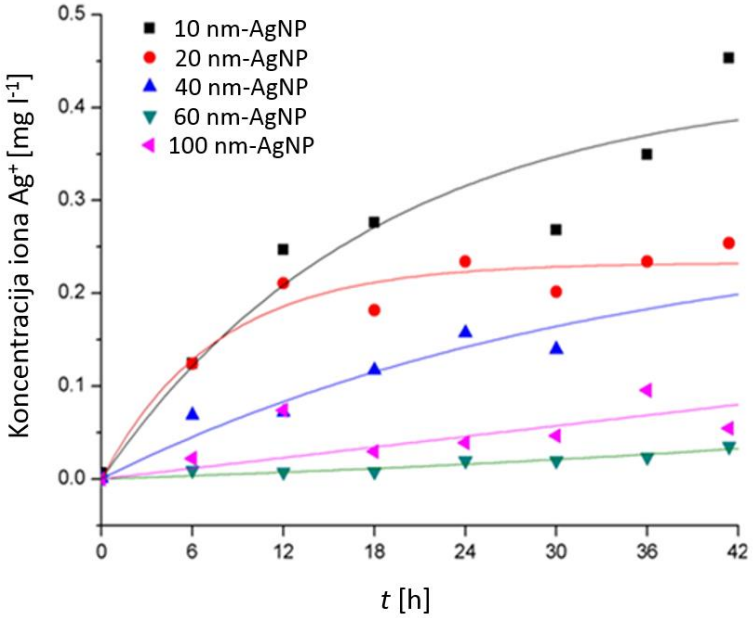
5.1.3. Određivanje specijacije srebra spektrometrijom masa s induktivno spregnutom plazmom

Spektrometrijom masa s induktivno spregnutom plazmom ispitana je koncentracija ionskog srebra u filtriranoj morskoj vodi, odnosno otpuštanje iona Ag^+ s površine AgNP kroz vrijeme trajanja eksperimenta. Veličine pora filtera bile su dovoljno male kako bi zadržale nanočestice, a dopustile prolaz srebrnih iona i njihovih soli. Na Slici 18. prikazana je promjena koncentracije srebrnih iona s vremenom (kroz 48 h) za 60 nm-AgNP (LMNB) u filtriranoj morskoj vodi. Iz grafa je vidljivo kako masena frakcija iona Ag^+ u usporedbi s početnom koncentracijom AgNP ostaje relativno konstantna kroz dva dana uz vrijednosti u rasponu od 2.7 – 6.8% prema ICP-MS analizi. Ovi rezultati upućuju na činjenicu da je većina srebra prisutna u tretiranim uzorcima u obliku nanočestica te da nije došlo do značajnijeg otapanja tijekom eksperimenata.



Slika 18. Masena koncentracija iona Ag^+ u filtriranoj morskoj vodi u odnosu na početnu masu 60-nm AgNP (LMNB).

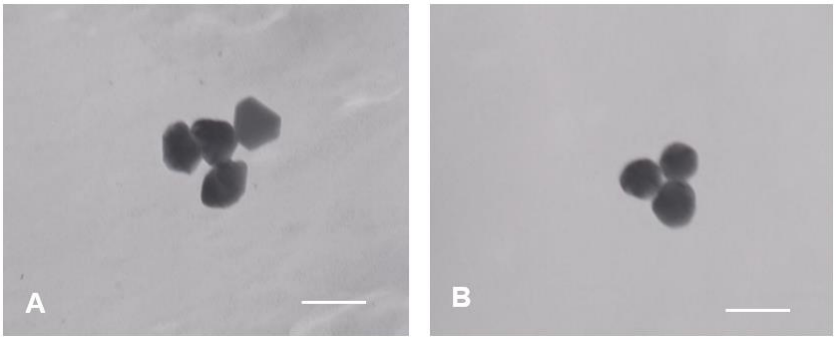
Na Slici 19. prikazane su promjene koncentracija iona Ag^+ u filtriranoj morskoj vodi za različite veličine komercijalnih AgNP s vremenom. Iz rezultata se jasno vidi kako najmanje 10 nm-AgNP otpuštaju najveću koncentraciju iona Ag^+ sa svoje površine, nakon čega slijede 20 nm-AgNP, te postepeno 40 nm-, 60 nm- i 100 nm-AgNP.



Slika 19. Promjene masene koncentracije iona Ag^+ u filtriranoj morskoj vodi u odnosu na početnu masu različitih veličina AgNP s vremenom. Početna koncenrtacija AgNP iznosila je 1 mg l^{-1}.

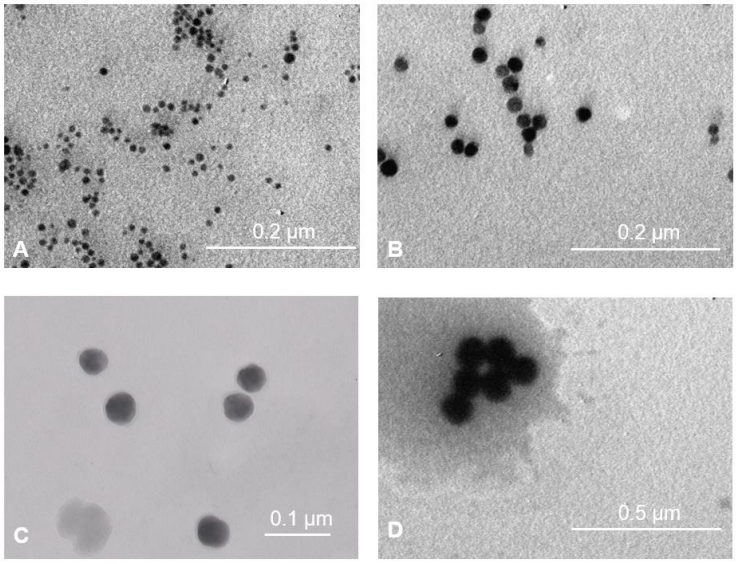
5.1.4. Određivanje morfologije srebrnih nanočestica transmisijskom elektronskom mikroskopijom

Transmisijskom elektronskom mikroskopijom određena je morfologija AgNP. Na Slici 20. prikazana je usporedba morfologije komercijalnih 60 nm-AgNP s onima sintetiziranim u LMNB istog promjera. Srebrne nanočestice sintetizirane u LMNB bile su nešto oštrijih rubova dok su one komercijalne bile više sferičnog oblika.



Slika 20. Morfologija srebrnih nanočestica približno jednake veličine od 60 nm: (A) sintetizirane u LMNB i (B) komercijalne u filtriranoj morskoj vodi (mjerilo 0.1 μm).

Na Slici 21. prikazane su morfologije komercijalnih AgNP ostalih veličina od 10, 20, 40 i 100 nm AgNP prema deklaraciji proizvoda od Sigma-Aldrich.



Slika 21. Morfologija komercijalnih AgNP analiziranih transmisijskim elektronskim mikroskopom. Veličine AgNP: (A) 10 nm, (B) 20 nm, (C) 40 nm i (D) 100 nm u filtriranoj morskoj vodi.

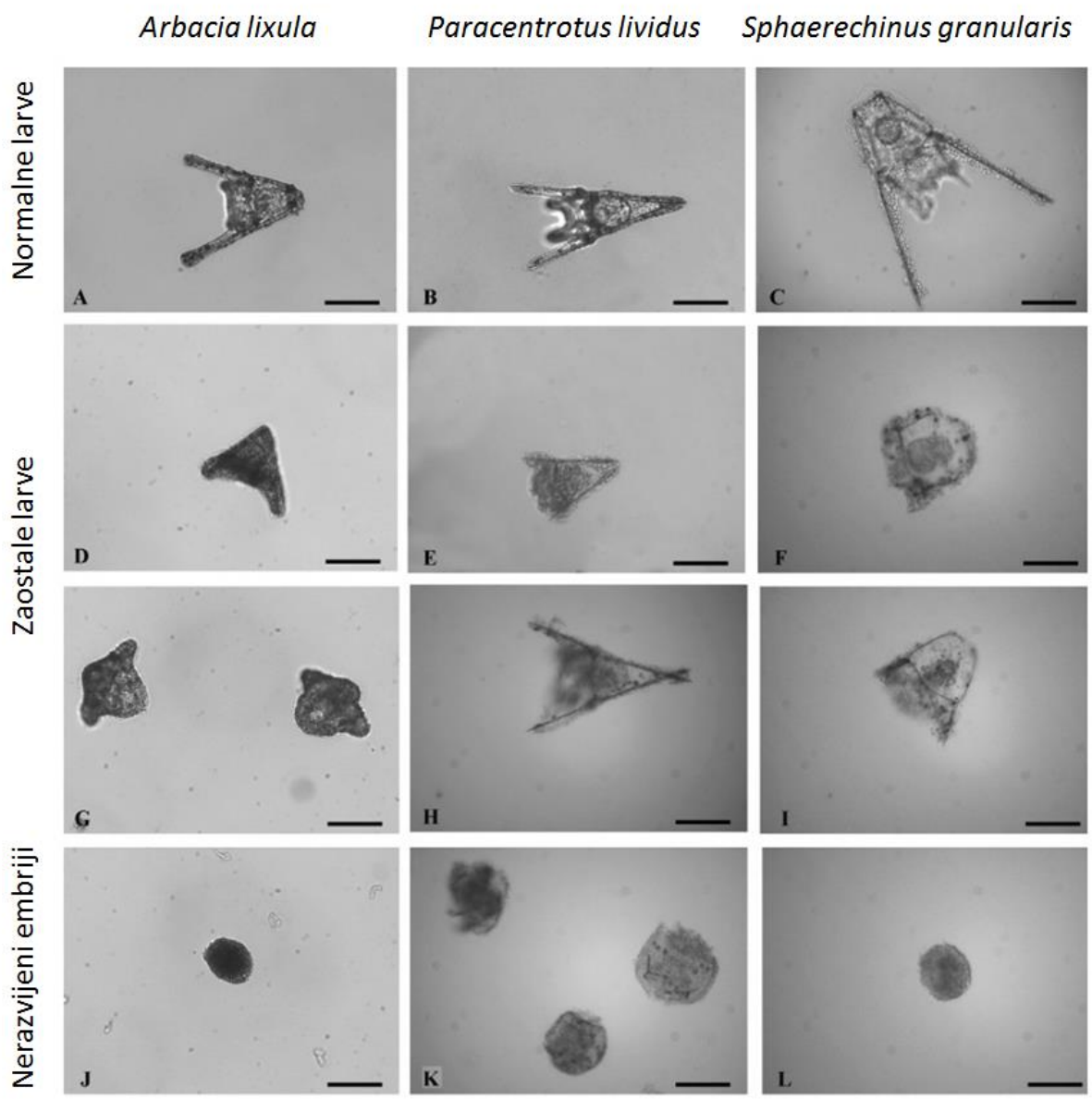
5.2. Utjecaj srebrnih nanočestica na embrionalni razvoj ježinaca

5.2.1. Embrionalni razvoj ježinaca *Arbacia lixula, Paracentrotus lividus* i *Sphaerechinus granularis* nakon tretmana sa 60 nm-AgNP u različitom razvojnom stadiju

Kao pozitivna kontrola kod ispitivanja utjecaja 60 nm-AgNP (LMNB) na embrionalni razvoj ježinaca, oplođene jajne stanice - zigote triju vrsta ježinaca izložene su ionima Ag^+ (u otopini $AgNO_3$) u rasponu koncentracija od 1 – 100 μg l^{-1} 30 min nakon oplodnje. Nakon 48 h, odnosno 72 h zamijećena su tri različita razvojna stadija:

a) normalno razvijena larva u pluteus fazi s 2 potpuno razvijene „nožice“ i „ručice“ te formiranim probavnim traktom,
b) zaostala larva, izgledom dva puta manja od normalne larve te
c) nerazvijeni embrij, zaostao u jednom od ranijih razvojnih stadija (morule, blastule ili gastrule) (Slika 22).

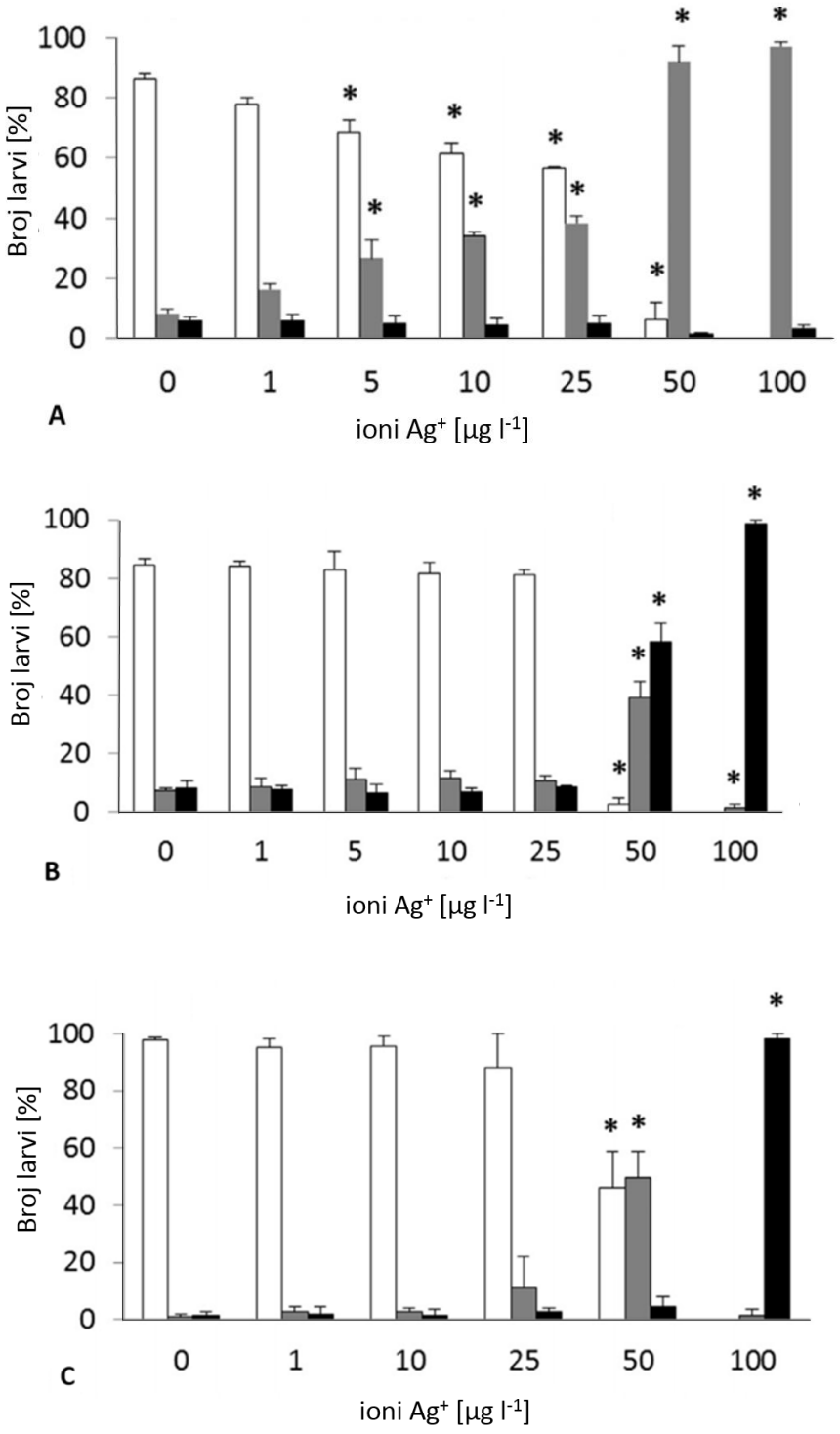
Kod ježinca *P. lividus* u srednju grupaciju (zaostalih larvi) ubrojene su i sve larve koje su pokazale malformacije u formiranju kostura poput: prekriženih, odvojenih ili savijenih vrhova kostura, spojenih „ruku“ te kostura koji nije u potpunosti formiran ili uopće ne postoji (Slika 22E, H) (prema kriteriju navedenom u radu Carballeira i sur., 2012a). Kod ježinca *A. lixula* u srednju grupaciju, osim spojenih vrhova, smještene su i larve koje su bile presavijenih vrhova, ukazujući na neispravno formiranje, odnosno jačinu kostura larvi.



Slika 22. Normalne (A-C), zaostale (D-I) larve i nerazvijeni (J-L) embriji ježinaca: *A. lixula* i *P. lividus* 48 h ili *S. granularis* 72 h nakon izlaganja zigote 60 nm-AgNP (LMNB) (mjerilo = 100 μm).

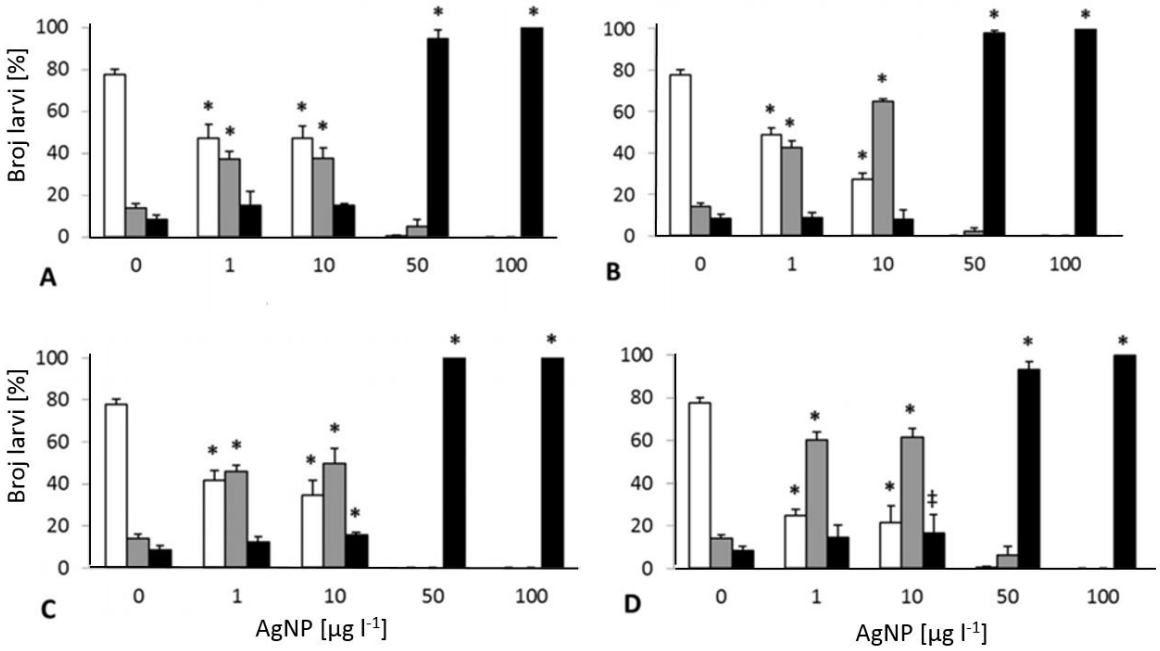
Uspješnost dosezanja pluteus faze larvi uslijed tretmana embrija s jednakom koncentracijom 60 nm-AgNP (LMNB) ili ionima Ag^+ 48 h nakon oplodnje za vrste *A. lixula* i *P. lividus*, odnosno 72 h za vrstu *S. granularis* bila je različita između tri odabrane vrste (Slika 23. – 26). Naime, embrij ježinca *P. lividus* tretiran s 1 – 25 μg l^{-1} iona Ag^+ 30 min nakon oplodnje nije pokazao nikakvu promjenu u usporedbi s kontrolnim uzorkom. Međutim, više koncentracije (50 i 100 μg l^{-1}) uzrokovale su značajnu promjenu ($p < 0.001$) u broju zaostalih larvi i nerazvijenih embrija nakon 48 h izloženosti ionima Ag^+ (Slika 23B).

Izloženost koncentraciji od 50 μg l^{-1} iona Ag^+ dovela je do drastičnog smanjenja postotka normalnih larvi na svega 2.5% te istovremenog porasta zaostalih larvi na 39.3%, odnosno nerazvijenih embrija na 58.3%. S druge strane, izlaganje koncentraciji od 100 μg l^{-1} iona Ag^+ dovelo je do potpunog zastoja u razvoju larvi (98.8% nerazvijenih embrija). Slični rezultati dobiveni su i prilikom tretiranja embrija ježinca *S. granularis* s ionima Ag^+. U tim ispitivanjima, statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolom ($p < 0.001$) uočena je isto tako pri koncentraciji od 50 μg l^{-1} iona Ag^+ kada je broj normalno razvijenih larvi i zaostalih larvi bio približno jednak (46.0% normalnih i 49.5% zaostalih larvi). Statistički značajna razlika uočena je i u odnosu na uzorke s nižim koncentracijama iona Ag^+ (Slika 23C). Kao najosjetljiviji između embrija triju vrsta ježinaca na izloženost iona Ag^+ 30 min nakon oplodnje pokazali su se embriji ježinca *A. lixula.* Naime, u ovom ježincu statistički značajna razlika ($p < 0.001$) u omjeru zaostalih i normalnih larvi u usporedbi s kontrolnim uzorkom uočena je već kod vrlo niske koncentracije iona Ag^+ (5 – 25 μg l^{-1}). Najviše ispitane koncentracije iona Ag^+ dovele su do znatnog pada u broju normalnih larvi do 6.5% (50 μg l^{-1}) te istovremenog porasta broja zaostalih larvi 92.0% (50 μg l^{-1}), odnosno 97.0% (100 μg l^{-1}) nakon 48 h izloženosti (Slika 23A). Iako u ovome slučaju najviša ispitivana koncentracija iona Ag^+ nije dovela do potpune blokade u razvoju larvi i znatnog povišenja postotka nerazvijenih embrija, odnosno embrija u ranim stadijima razvoja, usporedbom triju vrsta ježinaca ustanovljeno je da je vrsta *A. lixula* najosjetljivija na izloženost ionima Ag^+ te da osjetljivost opada u smjeru: *A. lixula* > *P. lividus* > *S. granularis.*



Slika 23. Postotak normalnih (bijeli stupci), zaostalih (sivi stupci) larvi te nerazvijenih embrija (crni stupci) ježinaca: (A) *A. lixula*, (B) *P. lividus* (48 h nakon oplodnje) i (C) *S. granularis* (72 h nakon oplodnje) i dodavanja iona Ag^+ 30 min nakon oplodnje. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu $*p < 0.001$.

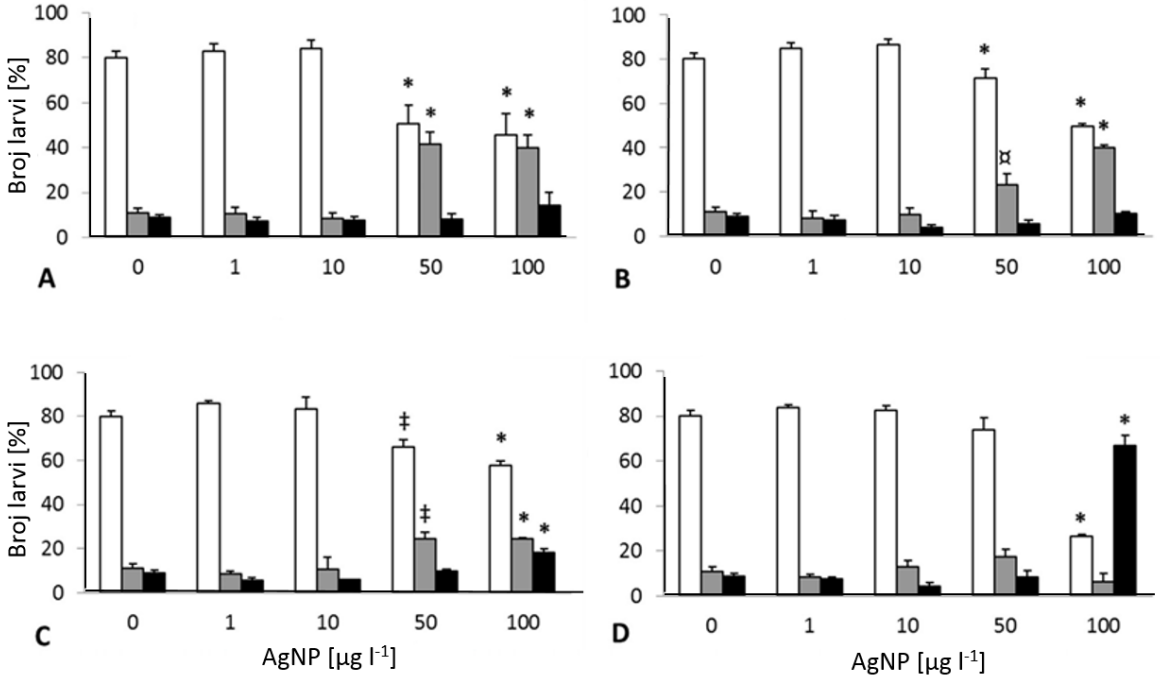
Uspješnost dosezanja stadija pluteusa nakon tretmana zigota ježinca ***A. lixula*** sa 60 nm-AgNP (LMNB) u različitim stadijima razvoja embrija prikazana je na Slici 24. Tretman 30 min nakon oplodnje rezultirao je promjenom u razvoju normalnih larvi za sve ispitivane koncentracije (od 1 do 100 μg l^{-1}) u usporedbi s kontrolnim uzorkom. Naime, čak je i najniža ispitivana koncentracija od 1 μg l^{-1} AgNP uzrokovala statistički značajan pad ($p < 0.001$) broja normalno razvijenih larvi i to za 1.6 puta u odnosu na kontrolu (od 77.7% u kontrolnom uzorku na 47.7%), te istovremeni tri puta veći postotak zaostalih larvi (s 14.0% na 37.3%) (Slika 24A). Nadalje, nakon izlaganja embrija koncentraciji od 1 i 10 μg l^{-1} AgNP 6 i 24 h nakon oplodnje došlo je do znatnih promjena u omjeru normalnih i zaostalih larvi i to tako što je broj zaostalih larvi premašio postotak normalno razvijenih pluteusa ježinaca (Slika 24C, D). Izlaganje embrija ježinca *A. lixula* 10 μg l^{-1} AgNP 90 min i 6 h nakon oplodnje ukazalo je na vrlo slične rezultate dobivene nakon izlaganja embrija 30 min nakon oplodnje s nešto većim brojem zaostalih larvi u populaciji od 64.7%, odnosno 49.7% (Slika 24B, C). Tretman s 1 i 10 μg l^{-1} AgNP 24 h nakon oplodnje doveo je do smanjenja broja normalnih larvi na 25.0%, odnosno 21.7%, uz statistički značajan ($p < 0.001$) porast populacije zaostalih larvi na 60.3%, odnosno 61.7%. Više koncentracije od 50 i 100 μg l^{-1} AgNP dovele su do gotovo potpunog zastoja embrionalnog razvoja neovisno o trenutku dodavanja nanočestica. Budući se u uzorku sa AgNP nalazi 10 puta niža koncentracije iona Ag^{+} (kako je prethodno dokazano ICP-MS analizom) moguće je usporediti tretman dodavanja AgNP 30 min nakon oplodnje s 10 puta nižom koncentracijom iona Ag^{+} dodanom u isto vrijeme. Zaključno, srebrne nanočestice koncentracije 100, 50 i 10 μg l^{-1} pokazale su veći negativan učinak na embrionalni razvoj ježinca *A. lixula* u usporedbi s 1, 5 i 10 μg l^{-1} iona Ag^{+}.



Slika 24. Postotak normalnih (bijeli stupci), zaostalih (sivi stupci) larvi te nerazvijenih embrija (crni stupci) ježinca *A. lixula* tretiranih različitim koncentracijama 60 nm-AgNP (LMNB): (A) 30 min, (B) 90 min, (C) 6 h i (D) 24 h nakon oplodnje. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu: ‡p < 0.01,*p < 0.001.

Uspješnost dosezanja stadija pluteusa nakon tretmana embrija ježinca ***P. lividus*** sa 60 nm-AgNP (LMNB) prikazana je na Slici 25. Najniže koncentracije AgNP od 1 i 10 µg l^{-1} nisu pokazale negativan utjecaj AgNP u usporedbi s kontrolom. Naime, postotak normalno razvijenih larvi bio je viši od 80% neovisno o trenutku dodavanja AgNP. Negativan učinak AgNP zamijećen je prvi puta na koncentraciji od 50 µg l^{-1} kada je došlo do znatnog smanjenja broja normalno razvijenih larvi, odnosno porasta postotka zaostalih larvi nakon tretmana embrija 30 min, 90 min i 6 h nakon oplodnje (Slika 25A, B, C). Najniži postotak normalno razvijenih larvi (50.7%), ujedno i najviši postotak zaostalih larvi (41.3%) uočen je nakon dodavanja AgNP 30 min nakon oplodnje. Izlaganje embrija istoj koncentraciji AgNP u kasnijim razvojnim stadijima dovelo je do povišenja uspješnosti dosezanja pluteus stadija larvi nakon 48 h (90 min: 71. 0%, 6 h: 66.0% i 24 h: 74.0%). Embriji izloženi 100 µg l^{-1} AgNP 30 min, 90 min i 6 h nakon oplodnje pokazali su statistički značajan porast (p < 0.001) postotka zaostalih larvi u usporedbi s kontrolom (Slika 25A, B, C). Najizraženiji učinak javio se nakon dodavanja 100 µg l^{-1} AgNP 24 h nakon oplodnje, nakon razvoja kasne gastrule i već plutajućeg embrija, kada je došlo do znatnog porasta nerazvijenih embrija i to s 18.0% (6 h) na 67.0% (24 h) (Slika 25C, D). I u ovome je slučaju moguće izvršiti usporedbu tretmana

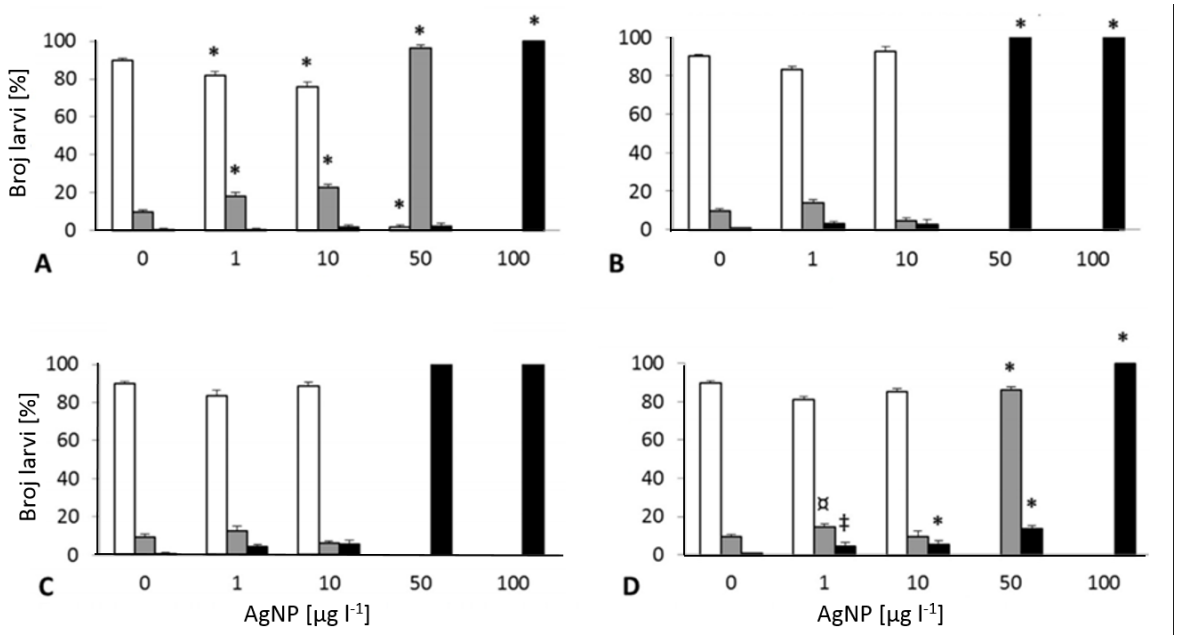
dodavanja AgNP 30 min nakon oplodnje s 10 puta nižom koncentracijom iona Ag^+. Rezultati ukazuju na sličan odgovor kao i u vrsti *A. lixula*. Naime, više ispitivane koncentracije AgNP (50 i 100 μg l^{-1}) pokazale su jači negativan učinak na uspješnost dosezanja pluteus stadija larvi u usporedbi s 5 i 10 μg l^{-1} iona Ag^+. Koncentracije od 10 μg l^{-1} AgNP i 1 μg l^{-1} iona Ag^+ dale su jednaki odgovor, te je isti odgovarao kontrolnom uzorku.



Slika 25. Postotak normalnih (bijeli stupci), zaostalih (sivi stupci) larvi te nerazvijenih embrija (crni stupci) ježinca *P. lividus* tretiranih različitim koncentracijama 60 nm-AgNP: (A) 30 min, (B) 90 min, (C) 6 h i (D) 24 h nakon oplodnje. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu: $^{¤}p < 0.05$, $^{‡}p < 0.01$ i $^{*}p < 0.001$.

U konačnici, izlaganje zigote ježinca ***S. granularis*** 60 nm-AgNP (LMNB) u rasponu koncentracija od 1 do 100 μg l^{-1}, rezultirao je uspješnošću dostizanja pluteus stadija larvi koja je ovisila o primijenjenoj koncentraciji nanočestica (Slika 26). Vremena tretiranja, odnosno dodavanja AgNP, promijenjena su kako bi razvojni stadiji odgovarali onima kod prethodnih dviju vrsta ježinca budući se embrij ovog ježinca razvija nešto sporije. Odabrana vremena dodavanja AgNP u okolinu embrija u ovome su slučaju bila: 1, 6, 24 i 48 h nakon oplodnje te su larve fiksirane u paraformaldehidu nakon 72 h. Slično kao i pri tretmanu od 30 min nakon oplodnje u ježinca *A. lixula*, izlaganje embrija ježinca *S. granularis* AgNP 1 h nakon oplodnje rezultiralo je statistički značajnom razlikom ($p < 0.001$) postotka normalno razvijenih larvi u usporedbi s kontrolom (Slika 26A). Naime, broj normalno razvijenih larvi pao je s 90.0% u

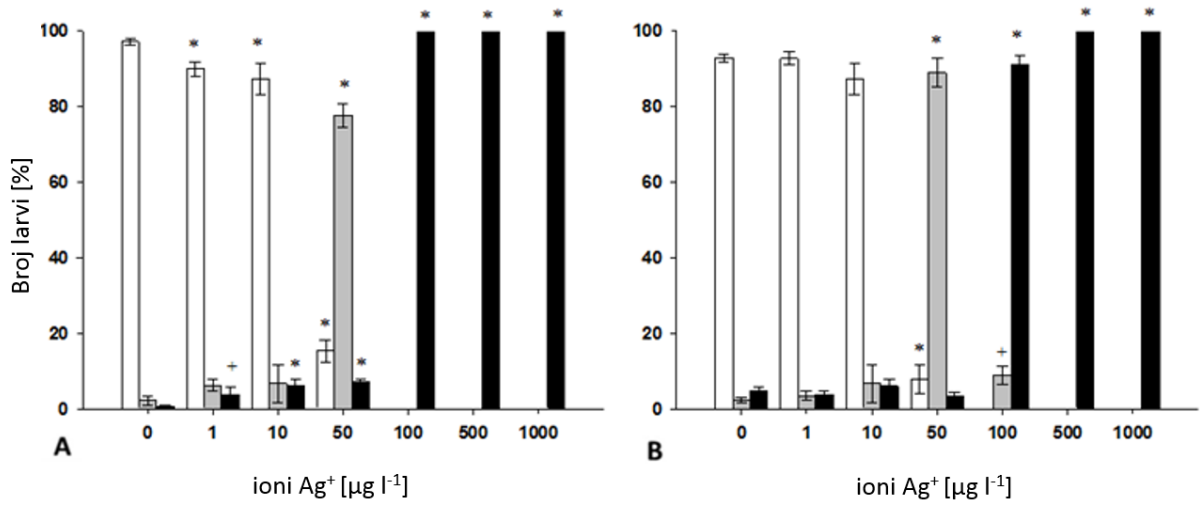
kontrolnom uzorku na 81.7%, 75.8% i 1.5% u uzorcima izloženim 1, 10 i 50 μg l^{-1} AgNP. S druge strane, postotak zaostalih larvi porastao je s 9.5% na 96.5% u istom koncentracijskom rasponu. Nakon izlaganja embrija koncentraciji od 100 μg l^{-1} AgNP 1 h nakon oplodnje došlo je do potpunog zastoja u embrionalnom razvoju ježinca. Tretman morule (6 h nakon oplodnje) i blastule (24 h nakon oplodnje) s 1 i 10 μg l^{-1} AgNP nije doveo do znatne razlike u razvoju normalnih larvi u usporedbi s kontrolom ($p > 0.05$). Suprotno tome, izlaganje embrija 50 i 100 μg l^{-1} AgNP 6 i 24 h nakon oplodnje izazvalo je kompletni zastoj razvoja, odnosno 100% nerazvijenih embrija u analiziranim uzorcima (Slika 26B, C). Koncentracija od 50 μg l^{-1} AgNP u trenutku dodavanja embrijima 1 h (stadij zigote) i 48 h (stadij gastrule) nakon oplodnje dovela je do razvoja isključivo zaostalih larvi, dok je koncentracija od 100 μg l^{-1} AgNP uzrokovala potpuni zastoj u razvoju larvi (Slika 26A, D). U konačnici, usporedbom tretmana od 30 min nakon oplodnje sa 100 i 10 μg l^{-1} AgNP te 10 puta nižom koncentracijom iona Ag^{+} (10 i 1 μg l^{-1}) primijećen je jači negativan učinak AgNP.



Slika 26. Postotak normalnih (bijeli stupci), zaostalih (sivi stupci) larvi te nerazvijenih embrija (crni stupci) ježinaca *S. granularis* tretiranih različitim koncentracijama 60 nm-AgNP (LMNB): (A) 1 h, (B) 6 h, (C) 24 h i (D) 48 h nakon oplodnje. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu: $^{¤}p < 0.05$, $^{‡}p < 0.01$ i $^{*}p < 0.001$.

5.2.2 Embrionalni razvoj ježinaca *Arbacia lixula* i *Paracentrotus lividus* nakon tretmana zigote sa srebrnim nanočesticama različitih veličina

Uspješnost dostizanja faze pluteusa nakon tretmana zigota ježinaca *A. lixula* i *P. lividus* s ionima Ag^+ 2 h nakon oplodnje prikazani su na Slici 27. Iako i u ovom slučaju embriji ježinca *A. lixula* već pri najnižim ispitivanim koncentracijama od 1 – 10 μg l^{-1} iona Ag^+ ukazuju na značajno smanjenje broja normalno razvijenih larvi u usporedbi s kontrolom (s 97% u kontrolnom uzorku na 87% u tretmanu s 10 μg l^{-1}), niske koncentracije iona Ag^+ ne uzrokuju nikakve anomalije niti zastoj u razvoju embrija ježinca *P. lividus*. Nadalje, do značajnog porasta postotka zaostalih larvi dolazi pri tretmanu s 50 μg l^{-1} iona Ag^+ gdje u ježincu *A. lixula* taj broj doseže 78%, a u vrste *P. lividus* 89%. Koncentracija od 100 μg l^{-1} iona Ag^+ uzrokovala je nastanak svega 9% zaostalih larvi i 91% nerazvijenih embrija u ježinca *P. lividus*. Ista koncentracija u ježinca *A. lixula* uzrokovala je kompletan zastoj u embrionalnom razvoju. Najviše ispitivane koncentracije iona Ag^+ (500 i 1000 μg l^{-1}) u oba ježinca pokazale su značajnu toksičnost, odnosno broj nerazvijenih embrija iznosio je 100%.



Slika 27. Postotak normalnih (bijeli stupci), zaostalih (sivi stupci) larvi te nerazvijenih embrija (crni stupci) ježinaca (A) *A. lixula* i (B) *P. lividus* 48 h nakon tretmana s ionima Ag^+ 2 h nakon oplodnje. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu: $^+p < 0.05$ i $^*p < 0.001$.

Na Slici 28. prikazana je uspješnost dostizanja faze pluteusa uslijed tretmana embrija ježinaca ***A. lixula*** **i** ***P. lividus*** sa AgNP različitih veličina. Naime, iz prikazanih rezultata se može zaključiti kako manje veličine nanočestica od 10 i 20 nm uzrokuju jači negativan učinak na embrionalni razvoj ježinaca obje vrste u usporedbi s veličinama nanočestica od 40 nm i

većim. Srebrne nanočestice veličine 10 nm nisu uzrokovale zastoj embrionalnog razvoja ježinaca pri niskim ispitivanim koncentracijama (1 – 10 μg l^{-1}) u obje vrste ježinaca (Slika 28A, B). Negativan utjecaj 10 nm-AgNP javlja se pri koncentraciji od 50 μg l^{-1}, gdje u vrsti *P. lividus* broj normalno razvijenih larvi opada s 94% (kontrolni uzorak) na 80%, a u ježinca *A. lixula* s 97% na svega 32%. U oba slučaja dolazi do porasta postotka zaostalih larvi, koji u vrsti *A. lixula* doseže čak 66%. Uslijed tretmana koncentracijom od 100 μg l^{-1} 10 nm-AgNP zabilježen je jednak odgovor među vrstama, pri čemu je došlo do porasta postotka zaostalih larvi, koji je iznosio 96% za vrstu *A. lixula* i 93% za vrstu *P. lividus*. Postotak nerazvijenih embrija u obje vrste ježinaca ne mijenja se značajno u usporedbi s kontrolom sve do najviših ispitivanih koncentracija (500 i 1000 μg l^{-1}), kada su u obje vrste izbrojani samo nerazvijeni embriji.

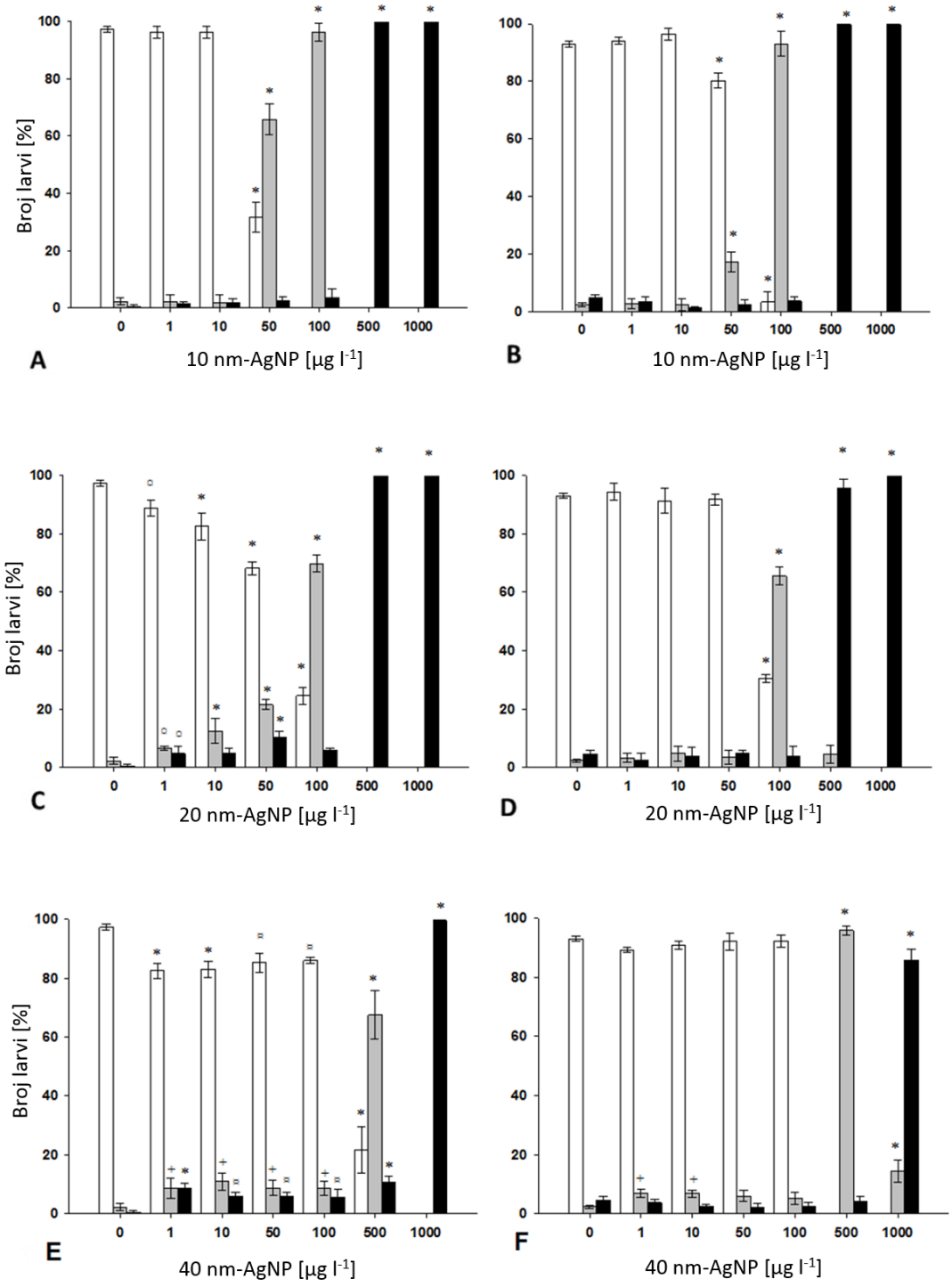
Srebrne nanočestice veličine 20 nm imale su sličan učinak onima od 10 nm (Slika 28C, D). I u ovome slučaju ježinac *A. lixula* pokazao se osjetljivijim. Naime, već najniže ispitivane koncentracije 20 nm AgNP (1 – 50 μg l^{-1}) uzrokuju statistički značajan pad ($p < 0.001$) postotka normalno razvijenih larvi i to s 97% (kontrola) na 68% pri koncentraciji od 50 μg l^{-1}. Iste koncentracije primijenjene u tretmanu embrija ježinca *P. lividus* ne uzrokuju negativan učinak na uspješnost dosezanja pluteus faze. Koncentracija od 100 μg l^{-1} 20 nm-AgNP ima vrlo sličan učinak u obje ispitivane vrste s postotkom normalnih larvi od 25% (*A. lixula*) i 31% (*P. lividus*). Pri najvišim ispitivanim koncentracijama od 500 i 1000 μg l^{-1}, 20 nm-AgNP uzrokovale su kompletan zastoj u embrionalnom razvoju, jednako kao i 10 nm AgNP. Svega 5% zaostalih larvi bilo je prisutno u uzorcima embrija ježinca *P. lividus* tretiranih s 500 μg l^{-1} 20 nm-AgNP, što ponovo potvrđuje otpornost ove vrste ježinca na učinak AgNP na njegov embrionalni razvoj.

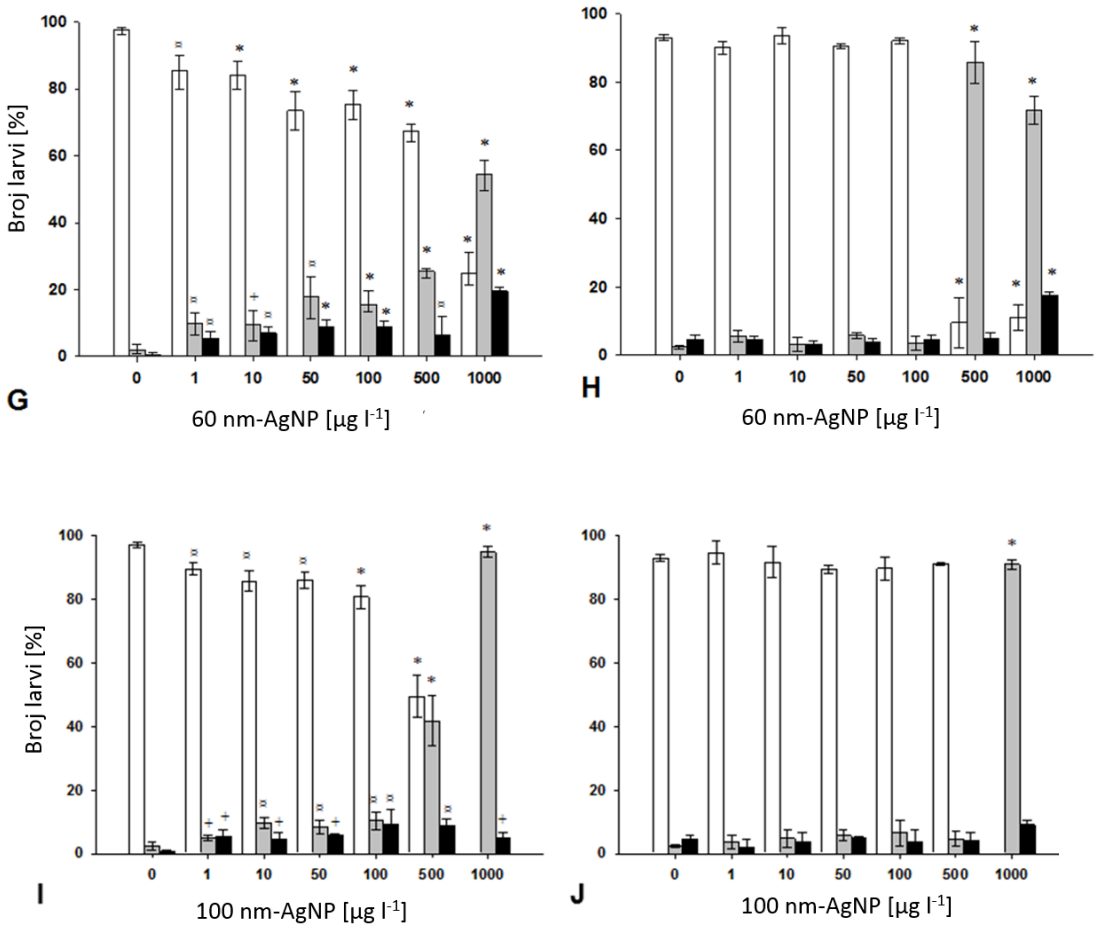
Srebrne nanočestice veličine 40 nm pokazale su znatno slabije izražen negativan učinak na embrionalni razvoj obiju vrsta ježinaca u usporedbi s 10 nm- i 20 nm-AgNP (Slika 28E, F). Naime, 40 nm-AgNP uzrokovale su statistički značajan porast broja zaostalih larvi u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$) u obje vrste tek pri koncentraciji od 500 μg l^{-1}, pri čemu je postotak iznosio 68% za vrstu *A. lixula*, odnosno 96% za vrstu *P. lividus*. Međutim, već niže ispitivane koncentracije 40 nm-AgNP (1 – 100 μg l^{-1}) uzrokovale su statistički značajno ($p < 0.01$) smanjenje (~10%) normalno razvijenih larvi u populaciji vrste *A. lixula* u usporedbi s kontrolom. Isti trend nije zamijećen u tretmanu 40 nm-AgNP na embrije ježinca *P. lividus*. U

obje vrste ježinaca najviša ispitivana koncentracija od 1000 μg l^{-1} 40 nm AgNP uzrokovala je gotovo potpuni zastoj embrionalnog razvoja.

Srebrne nanočestice od 60 i 100 nm nisu uzrokovale kompletan zastoj u embrionalnome razvoju ispitivanih vrsta ježinaca ni pri najvišim ispitivanim koncentracijama. Naime pri koncentraciji od 1000 μg l^{-1} 60 nm-AgNP postotak zaostalih larvi je u ježinca *A. lixula* iznosio 54%, a u ježinca *P. lividus* 72%, što ukazuje na njihovu manju toksičnost u usporedbi s AgNP ostalih veličina, kod kojih ipak dolazi do kompletnog zastoja u razvoju larvi barem pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji. U vrsti *A. lixula* postotak normalno razvijenih larvi postepeno je opadao s porastom koncentracije 60 nm-AgNP (tzv. engl. „*dose response*“ odgovor). Sukladno tome, raste brojnost zaostalih larvi i to s 5% u kontrolnom uzorku na 54% pri 1000 μg l^{-1} 60 nm-AgNP. I u ovome su se slučaju embriji ježinca *P. lividus* pokazali manje osjetljivim na niže ispitivane koncentracije od 1 – 100 μg l^{-1} 60 nm-AgNP. Naime, negativan utjecaj u ježincu *P. lividus* zamijećeni je tek pri koncentraciji od 500 μg l^{-1} 60 nm-AgNP, kada dolazi do naglog statistički značajnog ($p < 0.001$) porasta postotka zaostalih larvi u usporedbi s kontrolom (s 3 na 86%). Pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji od 1000 μg l^{-1} 60 nm-AgNP brojnost zaostalih larvi u ježinca *P. lividus* opada zbog povećanja broja nerazvijenih embrija i to s 5 na 17% (Slika 28G, H).

Srebrne nanočestice veličine 100 nm uzrokuju blago (ali ne i statistički značajno, $p > 0.05$) smanjenje postotka normalno razvijenih larvi u ježinca *A. lixula* u usporedbi s kontrolom pri koncentraciji od 1 – 100 μg l^{-1}. Iste koncentracije nisu imale negativan učinak na embrionalni razvoj ježinca *P. lividus*. Koncentracija od 500 μg l^{-1} 100 nm-AgNP u ježinca *A. lixula* izaziva nagli porast broja zaostalih larvi (s 5% u kontrolnom uzorku na 42%), dok ista koncentracija ne uzrokuje nikakve promjene u postotku normalnih larvi u embrionalnome razvoju ježinca *P. lividus* u usporedbi s kontrolom. Dakle, i u ovome se slučaju embriji ježinca *P. lividus* pokazao otporniji u usporedbi s embrijima ježinca *A. lixula* na tretman sa 100 nm-AgNP. Pri tretmanu najvišom koncentracijom od 1000 μg l^{-1} 100 nm-AgNP zabilježen je jednak odgovor obiju vrsta ježinaca te pritom i slična brojnost zaostalih larvi, koja je iznosila 95% *(A. lixula*) i 91% (*P. lividus*) (Slika 28I, J).

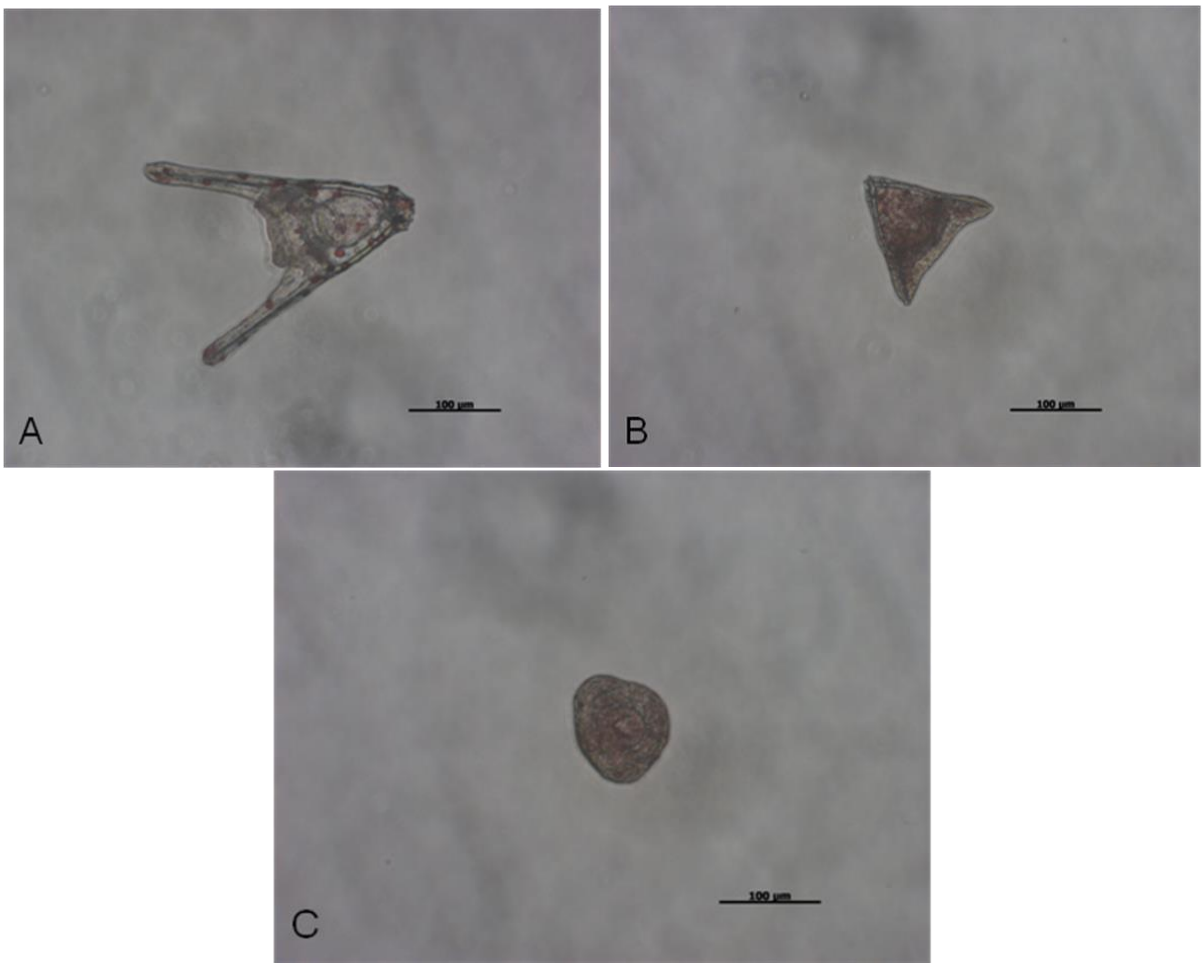

Broj larvi [%]
A
10 nm-AgNP [µg l-1]
B
10 nm-AgNP [µg l-1]
C
20 nm-AgNP [µg l-1]
D
20 nm-AgNP [µg l-1]
E
40 nm-AgNP [µg l-1]
F
40 nm-AgNP [µg l-1]



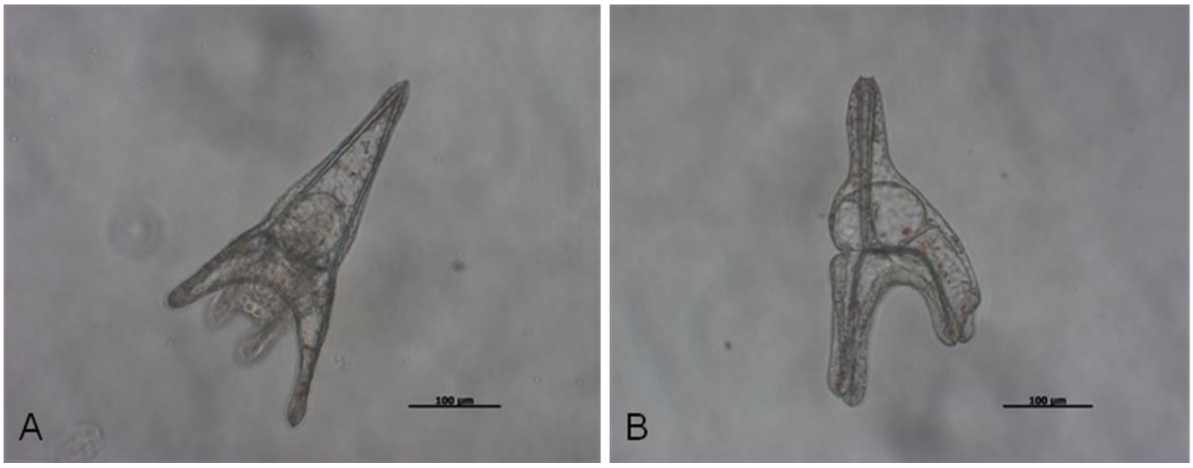
Slika 28. Postotak normalnih (bijeli stupci), zaostalih (sivi stupci) larvi te nerazvijenih embrija (crni stupci) ježinaca *A. lixula* (svi lijevi stupčasti grafovi: A, C, E, G, I) i *P. lividus* (svi desni stupčasti grafovi: B, D, F, H, J) izloženih AgNP različitih veličina, 10 nm (A i B), 20 nm (C, D), 40 nm (E, F), 60 nm (G, H) i 100 nm (I, J), 2 h nakon oplodnje. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu: $^{+}p < 0.05$, $^{¤}p < 0.01$ i $^{*}p < 0.001$.

Usporedbom rezultata tretmana ježinaca *A. lixula* i *P. lividus* 2 h nakon oplodnje sa AgNP i 10 puta nižom koncentracijom iona Ag^{+} dolazi se do zaključka kako manje veličine AgNP od 10 i 20 nm jesu toksičnije u usporedbi s 10 puta nižom kocnentracijom iona Ag^{+} za obje ispitivane vrste. Nadalje, 40 nm-AgNP pokazale su jednaki odgovor u rasponu koncentracija AgNP od 10 – 1000 µg l^{-1} u usporedbi s rasponom koncentracije iona Ag^{+} od 1 – 100 µg l^{-1}. Srebrne nanočestice većih dimenzija (60 i 100 nm) ukazale su na niži negativan učinak u usporedbi s 10 puta nižom koncentracijom iona Ag^{+}. Zaostale larve i nerazvijeni embriji ježinca *A. lixula* bili su pretežito crvene boje, što nije bio slučaj s netretiranim larvama u kojima su pak primijećene strogo definirane okrugle crvene stanice mezodrma (Slika 29). U ježincu *P. lividus* crvene stanice nešto su slabije uočene, iako jesu bile prisutne. Naime, na

tretmanima sa AgNP primijenjenim u višim koncentracijama (500 – 1000 µg l^{-1}) zamijećeno je bubrenje larvi, vjerojatno kao posljedica ulaska morske vode u gastrointestinalni trakt (Slika 30).



Slika 29. Na slici su prikazane: (A) netretirana normalno razvijena larva jasno uočljivim crvenim stanicama, (B) zaostala „crvena“ larva nakon tretmana sa 100 µg l^{-1} 10 nm-AgNP te (C) nerazvijeni embrij crvene boje nakon tretmana s 500 µg l^{-1} 20 nm-AgNP ježinca *A. lixula* nakon 48 h.



Slika 30. Na slici su prikazane: (A) netretirana normalno razvijena larva i (B) zaostala i otečena larva nakon tretmana sa 50 µg l^{-1} 60 nm-AgNP ježinca *P. lividus* nakon 48 h i slabije uočljivim crvenim stanicama

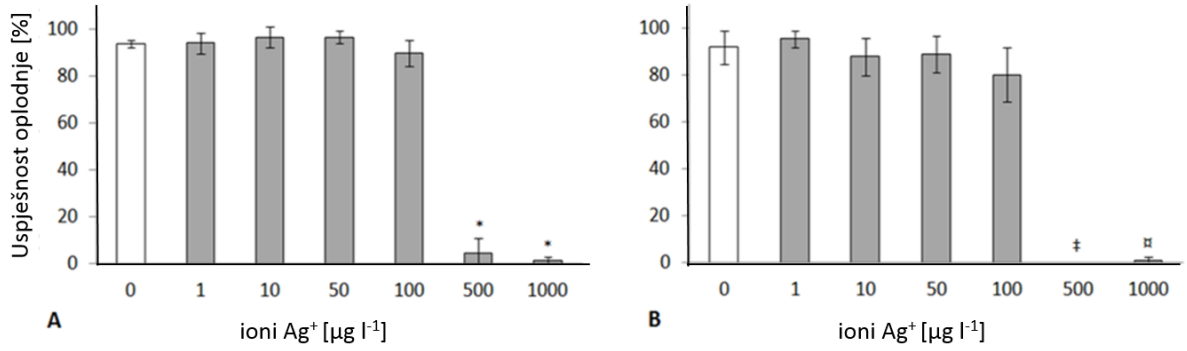
5.2.3. Uspješnost oplodnje ježinaca *Arbacia lixula* i *Paracentrotus lividus* te embrionalni razvoj nakon tretmana sperme sa srebrnim nanočesticama različitih veličina

Za potrebe ovog eksperimenta korišteno je 6 ženki i 3 mužjaka posebno za svaku od dviju vrsta ježinaca *A. lixula* i *P. lividus* kako bi u konačnici u svakoj od 6 jažica imali različitu ženku koju je oplodio jedan od triju mužjaka. Jajašca dviju ženki oplođena spermom istog mužjaka, služila su kao kontrola kvalitete sperme. Naime, ukoliko netretiranom spermom jednoga od triju mužjaka nije došlo do oplodnje jajnih stanica dviju različitih ženki te replike ne bi se dalje uzimale u obzir. Međutim, do toga nije došlo, te su svi spermiji uspješno oplodili jajne stanice u kontrolnom uzorku.

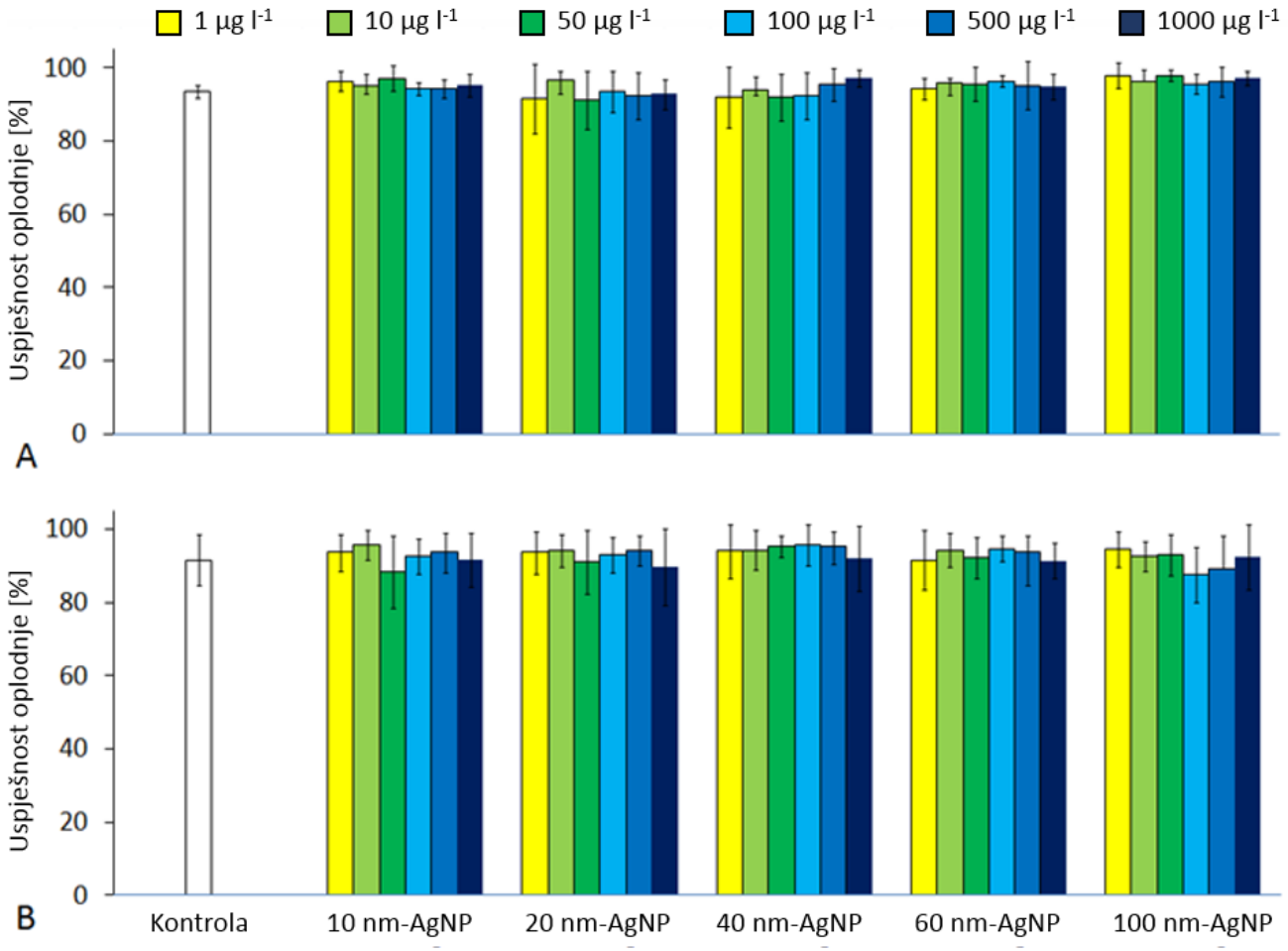
Na Slikama 31. i 32. prikazana je uspješnost oplodnje jajnih stanica ježinaca *A. lixula* i *P. lividus* nakon jednosatnog tretmana sperme sa srebrnim ionima (Slika 31), odnosno s različitim veličinama AgNP (Slika 32). Iz rezultata dobivenih nakon tretmana sperme ježinca *A. lixula* s različitim veličinama AgNP može se zaključiti kako AgNP nemaju nikakav utjecaj na uspješnost oplodnje ove vrste budući se uspješnost oplodnje u svim ispitivanim uzorcima, neovisno o primijenjenoj koncentraciji i veličini AgNP, nije značajno razlikovala od netretiranog uzorka ($p > 0.05$). Naime, u kontrolnom uzorku uspješnost oplodnje iznosila je 93.6 ± 1.7% te ista nije opadala ispod 91.2% niti kod jednog tretmana sa svim ispitanim koncentracijama različitih veličina AgNP. Suprotno tome, ioni Ag^{+} uzrokovali su smanjenje

uspješnosti oplodnje pri najvišim koncentracijama od 500 i 1000 µg l^{-1} s 93.6 ± 1.7% u kontrolnom uzorku na čak 4.4 ± 6.7%, odnosno 1.2 ± 1.7% (Slika 31A).

Nadalje, učinak iona Ag^+ i AgNP različitih veličina na spermije ježinca *P. lividus* sličan je onome zabilježenim u vrsti *A. lixula*. Naime, AgNP nisu imale značajan negativan učinak na uspješnost oplodnje nakon tretmana sperme ježinca (Slika 32B), dok su najviše koncentracije iona Ag^+ uzrokovale kompletan zastoj oplodnje (Slika 31B).



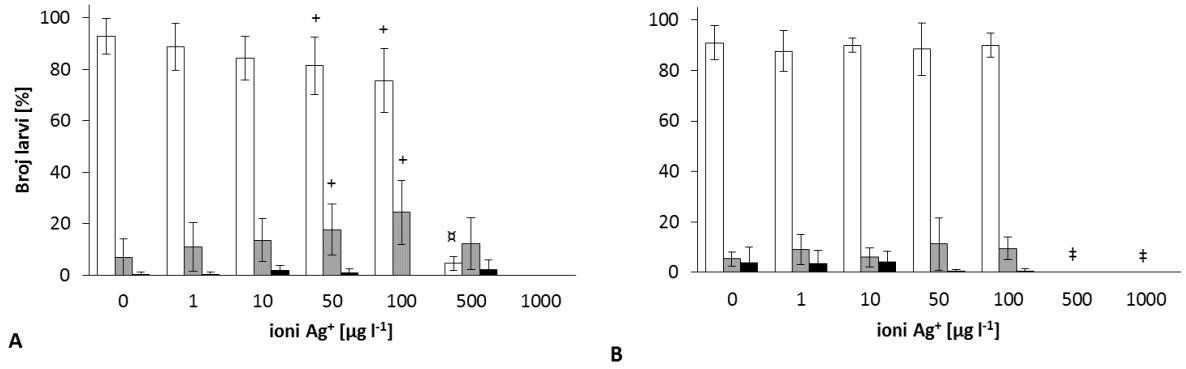
Slika 31. Uspješnost oplodnje jajnih stanica ježinaca *A. lixula* (A) i *P. lividus* (B) nakon tretmana sperme s ionima Ag^+. Statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolom: $^{¤}p < 0.01$, $^{*}p < 0.001$, ‡ za koncentraciju od 500 µg l^{-1} iona Ag^+ nije zabilježena niti jedna uspješno oplođena jajna stanica.



Slika 32. Uspješnost oplodnje ježinaca *A. lixula* (A) i *P. lividus* (B) nakon tretmana sperme sa AgNP različitih veličina (10, 20, 40, 60 i 100 nm).

Usporedbom učinka AgNP na uspješnost oplodnje ježinaca *A. lixula* i *P. lividus* s 10 puta nižom kocnentracijom iona Ag^+ uočeno je da nema negativnog učinka na uspješnost oplodnje jajnih stanica spermom prethodno izloženom AgNP različitih veličina ili iona Ag^+.

Kvaliteta potomstva, odnosno uspješnost dosezanja faze pluteusa nakon oplodnje ježinaca *A. lixula* i *P. lividus* spermom prethodno tretiranom s ionima Ag^+, prikazana je na Slici 33. Tretman od 1 h sperme obiju vrsta ježinaca s 1 i 10 μg l^{-1} iona Ag^+ nije uzrokovao nikakav štetan učinak na kvalitetu potomstva u usporedbi s netretiranim uzorkom. Razlika među vrstama primjećuje se u narednim dvijema koncentracijama od 50 i 100 μg l^{-1} iona Ag^+. Naime, nakon tretmana sperme ovim koncentracijama došlo je do smanjenja kvalitete potomstva ježinca *A. lixula* koje se očitovalo u statistički značajnom ($p < 0.05$) porastu broja zaostalih larvi od 7% (u kontroli) na 18% odnosno 25% u uzorcima tretiranima s 50 i 100 μg l^{-1} iona Ag^+. Suprotno tome, tretman sperme ježinca *P. lividus* s istim koncentracijama iona Ag^+ nije dao značajnu razliku u kvaliteti potomstva u usporedbi s kontrolom ($p > 0.05$). Najviše ispitane koncentracije iona Ag^+ (500 i 1000 μg l^{-1}) već su prethodno izazvale gotovo 100% neuspjelu oplodnju u obje vrste ježinaca zbog nemogućnosti spermija tretiranih sa srebrnim ionima da oplode jajne stanice ježinca.



Slika 33. Kvaliteta potomstva ježinca *A. lixula* (A) *i P. lividus* (B) čija je sperma prije oplodnje tretirana 1 h s ionima Ag^+. Bijeli stupci predstavljaju normalno razvijene larve, sivi stupci zaostale larve te crni stupci nerazvijene embrije. Statistička značajna razlika u usporedbi s kontrolom: $^{+}p < 0.05$ i $^{¤}p < 0.01$. ‡ neoplođene jajne stanice.

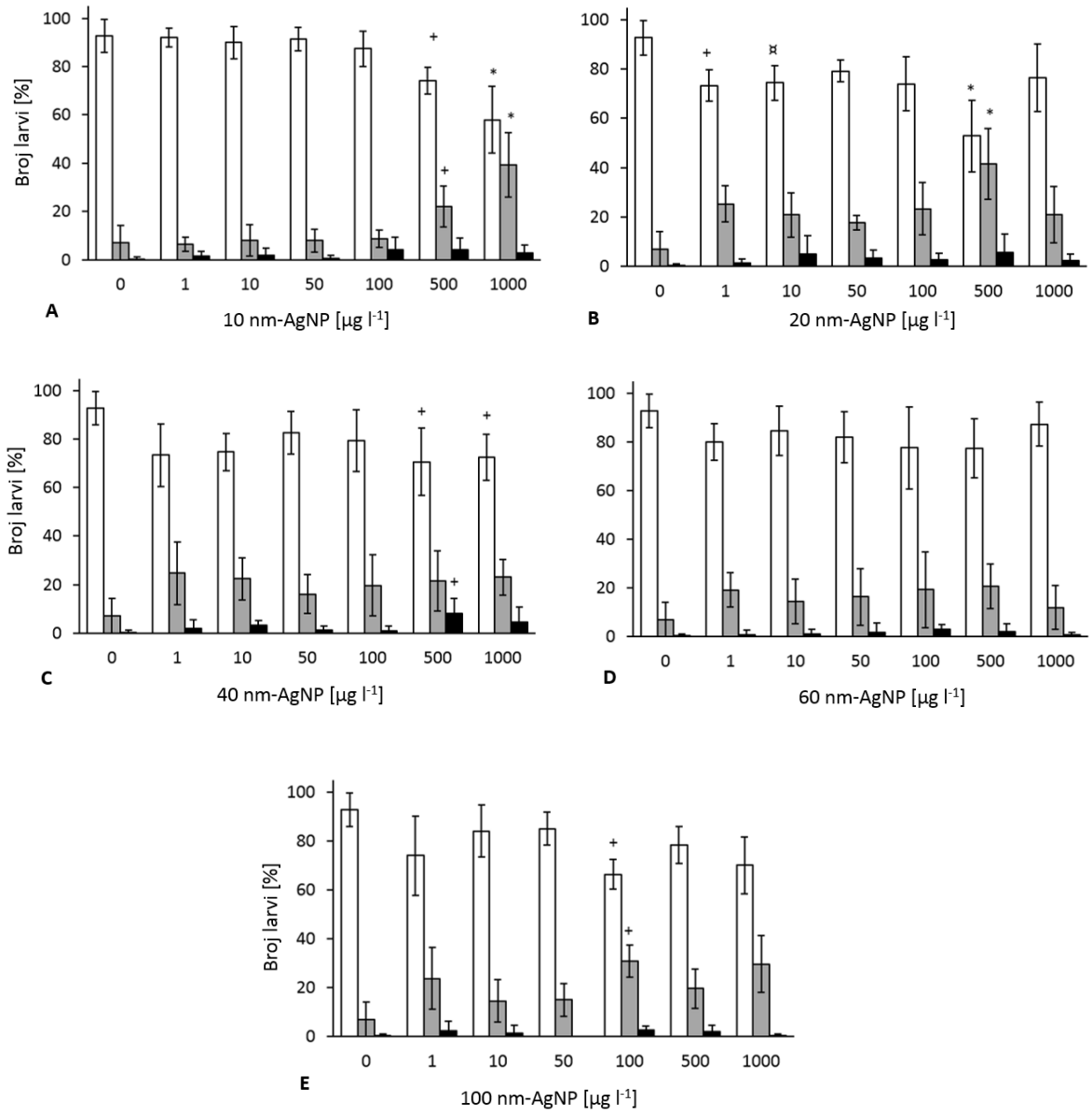
Tretman sperme ježinca *A. lixula* s koncentracijama od 1 do 100 μg l^{-1} 10 nm-AgNP rezultirao je jednakom uspješnošću dosezanja stadija larvi kao i kontrolni uzorak (Slika 34A). Tretman sperme s 500 i 1000 μg l^{-1} 10 nm-AgNP uzrokovao je smanjenje postotka normalno razvijenih larvi na 74% odnosno 58%, te istovremeni porast broja zaostalih larvi na 22%,

odnosno 39%. Brojnost nerazvijenih embrija nije se znatno promijenila u usporedbi s kontrolom u svim ispitanim koncentracijama te se kretala od 0.3 do 4%.

Prilikom ispitivanja kvalitete potomstva sperme prethodno izložene 20 nm-AgNP za sve koncentracije, pa i one najniže, zabilježena je statistički značajna razlika ($p < 0.05$) u usporedbi s kontrolom (Slika 34B). Naime, već pri koncentraciji od 1 μg l^{-1} postotak normalno razvijenih larvi pao je s 93% (u kontroli) na 73%, dok je postotak zaostalih larvi porastao sa 7% (kontrola) na 25%. Brojnost normalno razvijenih larvi zatim se zadržala na jednakoj razini pri višim koncentracijama od 10 – 100 μg l^{-1}. Koncentracija od 500 μg l^{-1} 20 nm-AgNP uzrokovala je daljnje smanjenje kvalitete potomstva, koje se ogledalo u porastu postotka zaostalih larvi na 42%, što je bilo i statistički značajno veće nego u kontrolnom uzorku ($p < 0.001$). Također je uočen i pad postotka normalno razvijenih larvi na razinu ispod 60%. Uslijed tretmana s najvišom ispitanom koncentracijom od 1000 μg l^{-1} AgNP, kao što je to bio slučaj i s koncentracijom od 100 μg l^{-1} AgNP, postotak normalno razvijenih larvi ponovno je bio iznad 70%. Postotak nerazvijenih embrija u ovome slučaju nije se znatno promijenio u usporedbi s kontrolom.

Srebrne nanočestice veličine 40 nm pokazale su vrlo sličan utjecaj na kvalitetu potomstva kao i one od 20 nm (Slika 34C). Naime, postotak normalno razvijenih larvi već pri najnižoj ispitanoj koncentraciji od 1 μg l^{-1} opao je s 92% u kontrolnom uzorku na 73% te se zadržao konstantnim kroz sve ispitane koncentracije. Slična situacija zbila se i nakon tretmana sperme sa 60 i 100 nm-AgNP. 60 nm-AgNP uzrokovale su smanjenje kvalitete potomstva tj. pad postotka normalnih larvi s 92% na najnižu razinu od 78% pri koncentracijama od 100 i 500 μg l^{-1} (Slika 34D). I u ovome je slučaju nakon tretmana s najvišom koncentracijom od 1000 μg l^{-1} zabilježen nešto viši postotak normalnih larvi od 87%. Na svim koncentracijama porastao je broj zaostalih larvi, dok je postotak nerazvijenih embrija ostao nepromijenjen u usporedbi s kontrolom. **100 nm-AgNP** uzrokovale su smanjenje postotka normalnih larvi na 74% već pri koncentraciji od 1 μg l^{-1} (Slika 34E). Taj je postotak porastao za 10% pri narednim koncentracijama od 10 i 50 μg l^{-1}, te je iznosio 85%. Koncentracija od 100 μg l^{-1} 100 nm-AgNP ukazala je na statistčki značajno ($p < 0.05$) povećanje broja zaostalih larvi u populaciji i to na čak 31%. Pri višim koncentracijama od 500 i 1000 μg l^{-1} broj zaostalih larvi zadržao se iznad 20%. Pri ispitivanju učinka predtretmana sperme na razvoj i kvalitetu potomstva, za niti jednu koncentraciju različitih veličina AgNP nije došlo do promjene u

broju nerazvijenih embrija u usporedbi s kontrolom (već se samo mijenjao omjer normalnih i zaostalih).

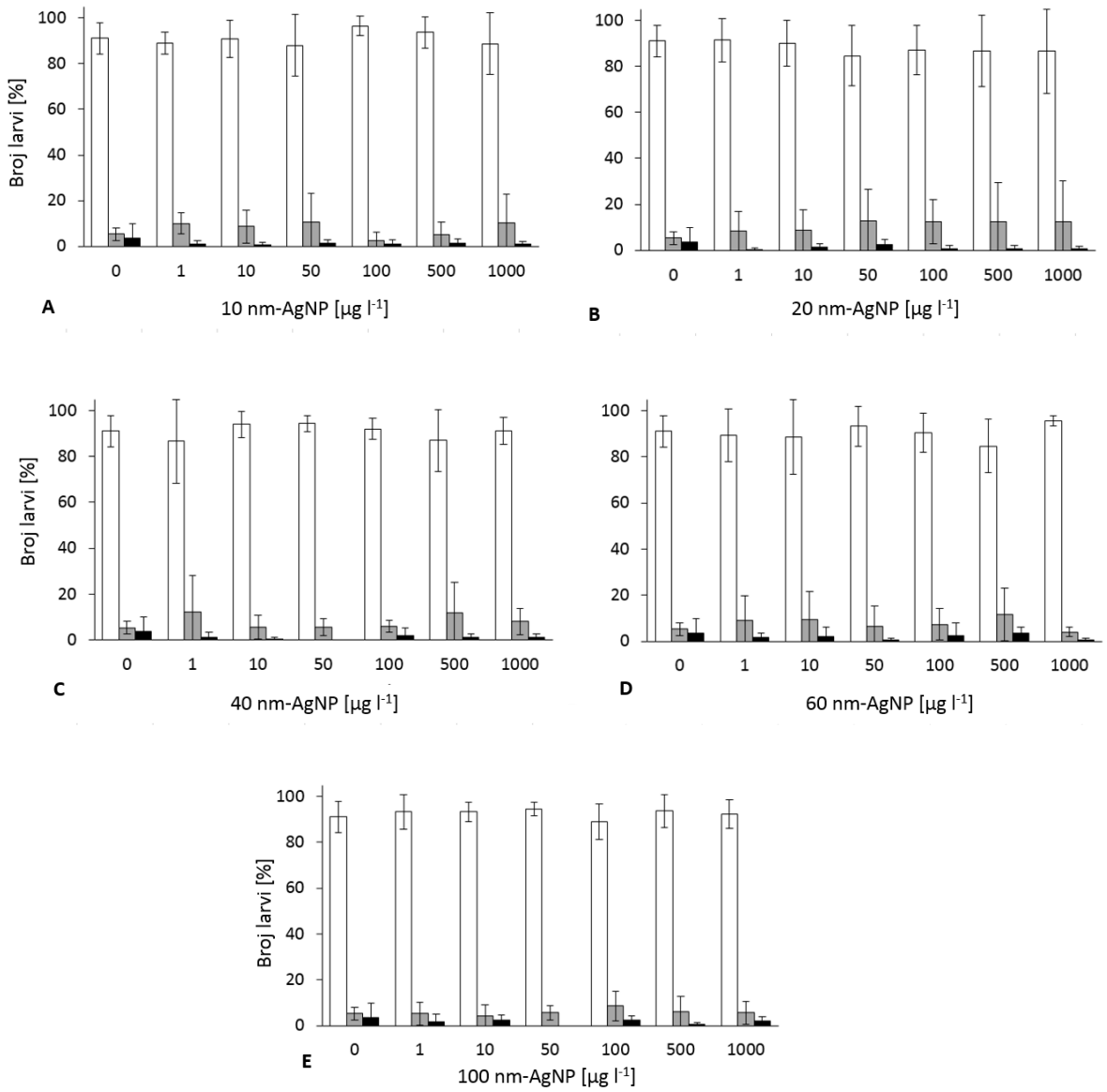


Slika 34. Kvaliteta potomstva ježinca *A. lixula* čija je sperma prije oplodnje tretirana 1 h sa AgNP različitih veličina: A) 10 nm , B) 20 nm, C) 40 nm, D) 60 nm i E) 100 nm. Bijeli stupci predstavljaju normalne larve, sivi stupci zaostale larve te crni stupci nerazvijene embrije. Statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolom: $^{+}p < 0.05$, $^{¤}p < 0.01$ i $^{*}p < 0.001$.

Usporedbom rezultata kvalitete potomstva sperme ježinca *A. lixula* tretirane s različitim veličinama AgNP te 10 puta nižom koncentracijom iona Ag^{+} dolazi se do zaključka kako veličina AgNP nije odigrala značajnu ulogu. Naime, 1000 µg l^{-1} 10 i 60 nm-AgNP pokazalo je

manji negativan učinak u usporedbi sa 100 μg l^{-1} iona Ag^{+}. Suprotno tome, AgNP veličine od 20, 40 i 100 nm pri svim ispitivanim koncentracijama u rasponu od 10 – 1000 μg l^{-1} pokazale su odgovor jednak onome nakon tretmana s ionima Ag^{+} u koncentracijskom rasponu od 1 – 100 μg l^{-1}.

Za razliku od utjecaja AgNP na spermu ježinca *A. lixula*, predtretman sperme ježinca *P. lividus* sa AgNP nije imao negativan učinak na uspješnost dosezanja pluteus faze larvi. Naime, nakon oplodnje jajnih stanica spermom predtretiranom AgNP raznim veličinama potomstvo je uspješno razvijeno do stadija larvi te su sve ispitane koncentracije i veličine AgNP dale visok postotak normalno razvijenih larvi, jednak onome u kontrolnom uzorku, a isti se kretao od 85 do 95% (Slika 35). Osim toga, utjecaj raspona koncentracije AgNP (neovisno o veličini) od 10 – 1000 μg l^{-1} nije ukazao na veći negativan učinak u usporedbi s 10 puta nižim koncentracijskim rasponom iona Ag^{+} (1 – 100 μg l^{-1}).

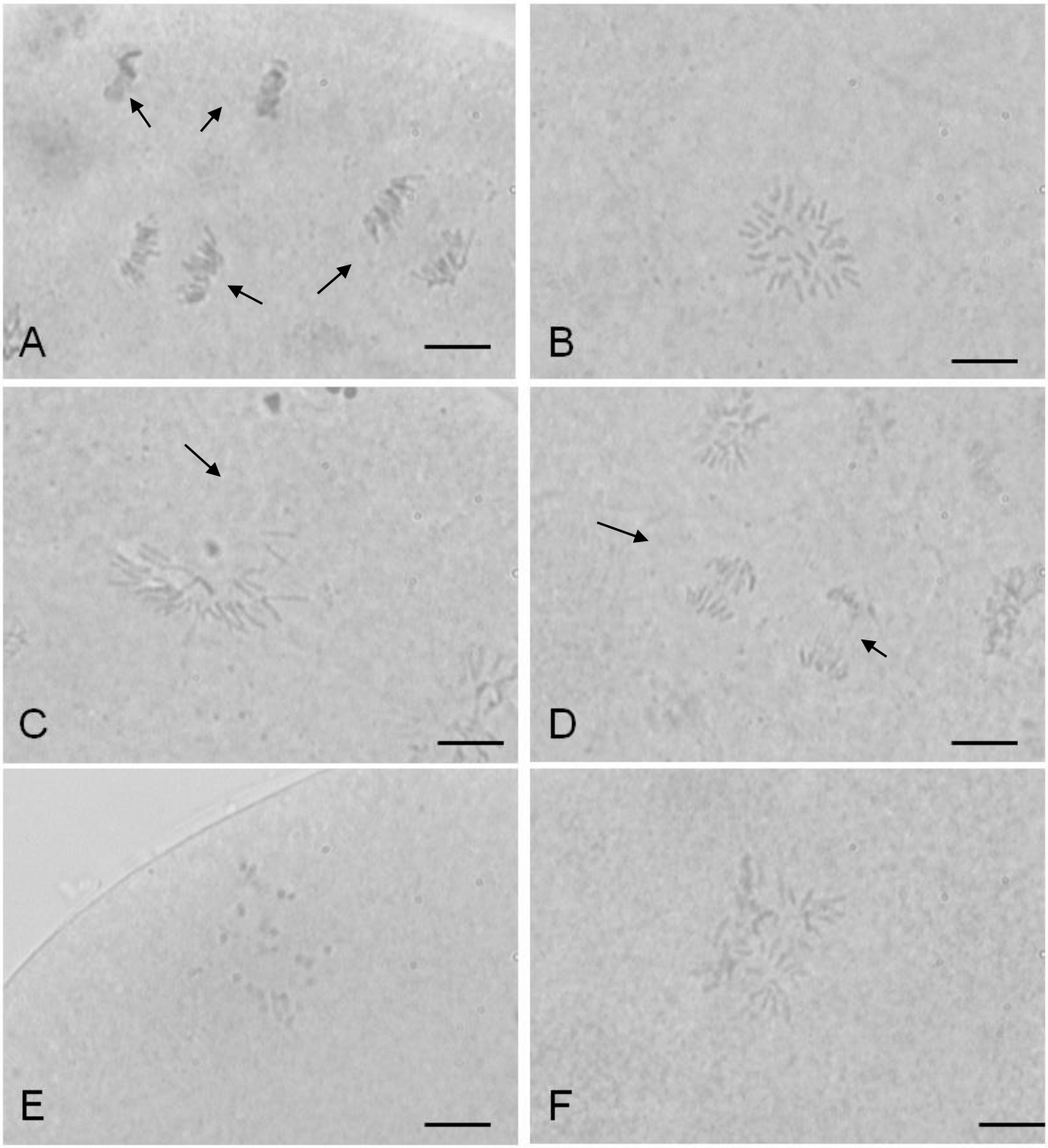


Slika 35. Kvaliteta potomstva ježinca *P. lividus* čija je sperma prethodno bila tretirana 1 h sa AgNP različitih veličina: A) 10 nm, B) 20 nm, C) 40 nm, D) 60 nm i E) 100 nm. Bijeli stupci predstavljaju normalne larve, sivi stupci zaostale larve te crni stupci nerazvijene embrije.

5.2.4. Citogenetički učinak srebrnih nanočestica na stadij morule ježinca *Arbacia lixula*

Citogenetički učinak AgNP procijenjen je na temelju kvantitativne i morfološke promjene (abnormalnosti). Kvantitativni parametri uključivali su: a) prosječan broj mitoza po embriju, b) postotak interfaznih embrija (embrija bez mitozne aktivnosti) i c) omjer metafaze i anafaze (M/A). Morfološke promjene su: a) anafazni mostovi, b) zaostali kromosomi, c) acentrični fragmenti, d) raspršeni kromosomi, e) višestruka vretena, f) ukupan broj mitotičkih promjena po embriju i g) postotak embrija s više od jedne aberacije. Na Slici 36A prikazana je

normalna stanična dioba (mitoza) te kromosomske aberacije do kojih može doći za vrijeme mitoze (Slika 36B – F).

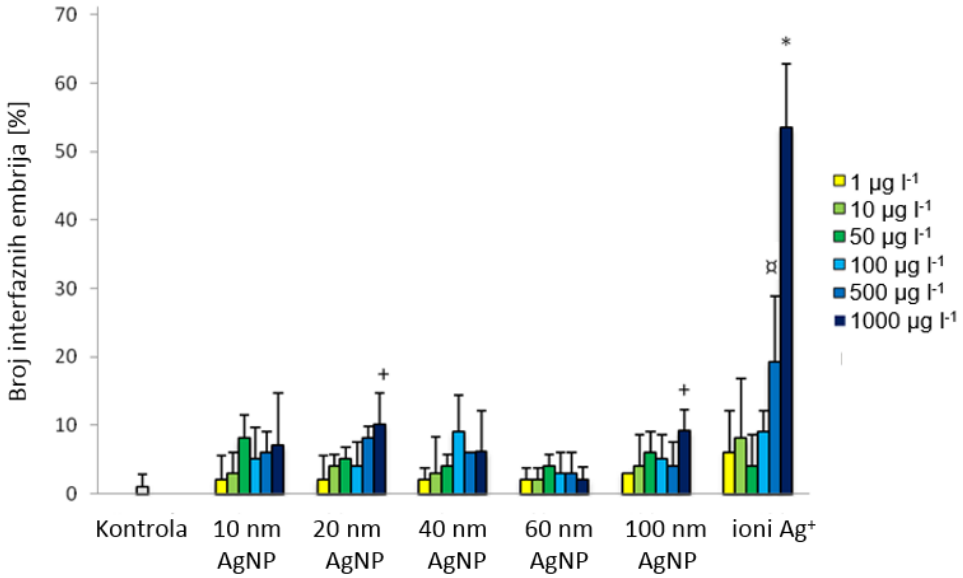


Slika 36. (A) Normalne faze diobe stanica tijekom mitoze (dvije stanice u anafazi - A i dvije u metafazi - M). Kromosomske aberacije u mitozi: (B) raspršeni kromosomi, (C) acentrični fragmenti, (D) zaostali kromosomi (sredina lijevo) i anafazni mostovi (sredina desno), (E) fragmentirani kromosomi te (F) četverostruko diobeno vreteno (mjerilo 20 µm).

Utjecaj srebrnih nanočestica ispitan je i na stadiju morule ježinca *A. lixula*. Kao negativna i pozitivna kontrola na narednih nekoliko slika (od 37. do 41.) dodani su: s lijeva

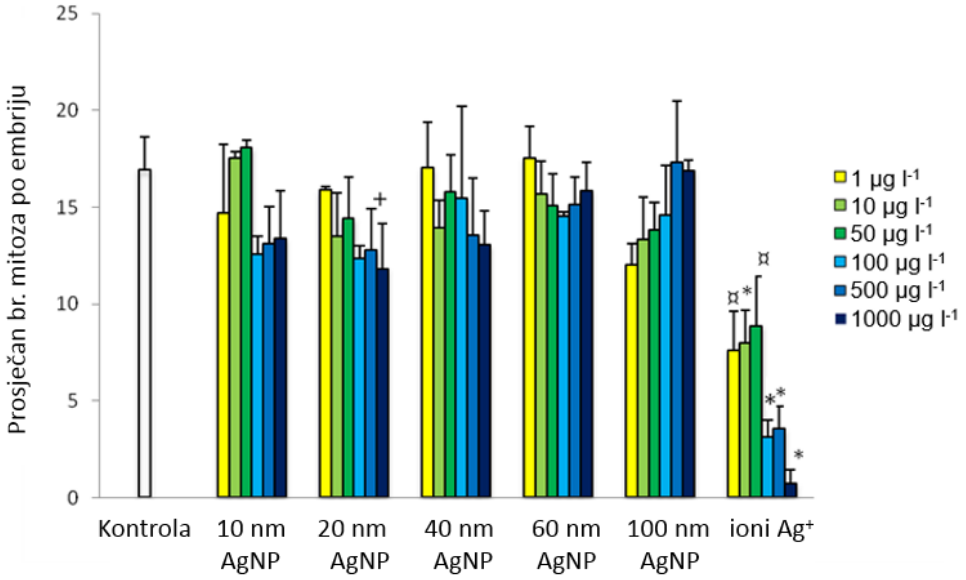
bijeli stupac koji je odgovarao netretiranom uzorku te krajnje s desna stupci raspona koncentracije iona Ag^+ od 1 – 1000 μg l^{-1}.

Na Slici 37. prikazan je mitotoksični učinak AgNP odnosno iona Ag^+. Postotak interfaznih embrija u kontrolnom uzorku iznosio je 1.0 ± 1.7%. Za sve koncentracije AgNP različitih veličina postotak interfaznih embrija bio je manji ili jednak 10%. Naime, izlaganje 1 i 10 μg l^{-1} 10 nm-AgNP dovelo je do nastanka svega 2.0% odnosno 3.0% interfaznih embrija (%IE). Taj je postotak neznatno porastao pri višim koncentracijama te je iznosio 7.1% pri najvišoj koncentraciji (1000 μg l^{-1}). Iz rezultata na Slici 38. vidi se kako postotak interfaznih embrija raste s primjenom viših koncentracija 10 nm-AgNP, međutim zbog izražene interindividualne varijabilnosti u vrijednostima IE nije zabilježena značajna razlika u usporedbi s kontrolnim uzorkom. Postotak IE nakon tretmana srebrnim nanočesticama veličine od 20, 40 i 100 nm bio je vrlo sličan prethodnome uz iznimku od 1000 μg l^{-1} 20 nm- i 100 nm-AgNP, kada se postotak interfaznih embrija statistički značajno razlikovao od kontrolnog uzorka te iznosio 10.1 ± 4.0%, odnosno 9.2 ± 3.0% (u oba slučaja $p < 0.05$). To je ujedno bio i najviši zabilježeni postotak interfaznih embrija za sve koncentracije AgNP različitih veličina. Suprotno tome, tretman sa 60 nm-AgNP rezultirao je najnižim brojem embrija u interfazi, koji se kretao između 2.0 i 4.0%. Otopina srebrnih iona izazvala je značajno viši postotak interfaznih embrija u usporedbi s kontrolom pri koncentracijama od 500 μg l^{-1}, kada je on iznosio 19.2 ± 9.7% ($p < 0.01$), dok je najveći postotak embrija u interfazi primijećen nakon tretmana s 1000 μg l^{-1} Ag^+ iona, kada je iznosio čak 53.5 ± 9.2% ($p < 0.001$) (Slika 37).



Slika 37. Mitotoksični učinak na embrije ježinca *A. lixula* nakon tretmana sa AgNP različitih veličina te s ionima Ag^+ prikazan kao postotak interfaznih embrija (%IE). Statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolom: $^{+}p < 0.05$, $^{¤}p < 0.01$ i $^{*}p < 0.001$.

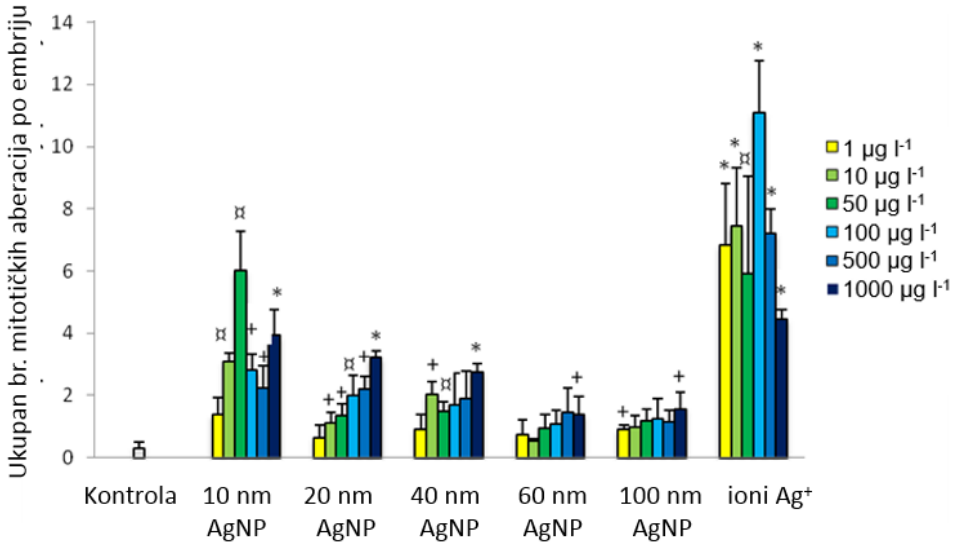
Prosječan broj mitotičkih dioba po embriju (engl. *mean number of mitosis per embryo*, MPE) prikazan je na Slici 38. Naime, u netretiranom uzorku vrijednost MPE iznosila je 16.9 ± 2.0 mitoza po embriju. Ista se nije značajno razlikovala od kontrolnog uzorka u svim ispitivanim veličinama i rasponu koncentracija AgNP te se kretala između 13.0 i 18.1 mitoza po embriju. Izuzetak je i u ovome slučaju (kao i u prethodnome s %IE) bio tretman embrija ježinca *A. lixula* s 1000 µg l^{-1} 20 nm-AgNP, kada je zamijećena statistički značajna razlika u usporedbi s netretiranim uzorkom te je MPE vrijednost iznosila 11.8 ± 2.3 ($p < 0.05$). Prisutnost iona **Ag^+** u okruženju embrija ježinca uzrokovala je značajno smanjenje MPE vrijednosti u usporedbi s kontrolom. Naime, nakon tretmana s nižim koncentracijama iona Ag^+ (1 i 10 µg l^{-1}) MPE vrijednost kretala se između 7.6 i 8.9. Taj se iznos smanjio pri povećanju koncentracije iona te je iznosio svega 3.1, odnosno 3.5 za koncentracije od 100 i 500 µg l^{-1} Ag^+. Najviša koncentracija od 1000 µg l^{-1} Ag^+ dovela je do gotovo potpunog zastoja u diobi stanica embrija ježinca *A. lixula*, te je MPE vrijednost iznosila 0.7 i bila statistički značajno niža od kontrole ($p < 0.001$).



Slika 38. Prosječan broj mitoza po embriju (MPE) ježinca *A. lixula* nakon tretmana sa AgNP različitih veličinaa te s ionima Ag^+. Statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolom: $^+p < 0.05$, $^¤p < 0.01$ i $^*p < 0.001$.

Na Slici 39. prikazan je ukupan broj mitotičkih aberacija po embriju (engl. *total mitotic aberrations per embryo*, MAE) nakon tretmana embrija ježinca *A. lixula* sa AgNP i ionima Ag^+. Naime, u netretiranome uzorku vrijednost MAE iznosila je 0.3 ± 0.1. Najniža koncentracija AgNP (1 µg l^{-1}) nije izazvala značajnije promjene vrijednosti MAE za veličine AgNP od 10, 20, 40 i 60 nm. Suprotno tome, nakon tretmana sa 1 µg l^{-1} 100 nm-AgNP zabilježena je značajna razlika u vrijednosti MAE u usporedbi s kontrolom te je ista iznosila 1.6 ± 0.5 ($p < 0.05$). Nadalje, nakon tretmana s 10 µg l^{-1} 10 nm-AgNP došlo je do porasta vrijednosti MAE na 3.1 ± 0.3 te je ista bila statistički značajno različita od kontrole ($p < 0.01$). Taj se iznos udvostručio pri izlaganju idućoj koncentraciji od 50 µg l^{-1} 10 nm-AgNP te je iznosio 6.0 mitotičkih aberacija po embriju. Vrijednosti MAE na višim koncentracijama bile su gotovo jednake vrijednostima nakon izlaganja 10 µg l^{-1} 10 nm-AgNP te su se kretale u rasponu od 2.8 (za 100 µg l^{-1}) do 3.9 (za 1000 µg l^{-1}). Iz rezultata na Slici 40. vidljivo je kako su AgNP veličina od 20, 40, 60 i 100 nm uzrokovale blago povišenje ukupnog broja mitotičkih aberacija po embriju prilikom povišenja koncentracije. Naime, raspon vrijednosti MAE za 20 nm-AgNP kretao se od 0.6 za najnižu (od 1 µg l^{-1}) do 3.2 za najvišu koncentraciju (od 1000 µg l^{-1}). Sličan raspon vrijednosti MAE zabilježen je i pri izlaganju 40 nm-AgNP te je iznosio od 0.9 do 2.7 (koncentracije od 1 – 1000 µg l^{-1}). Nešto niži raspon MAE vrijednosti

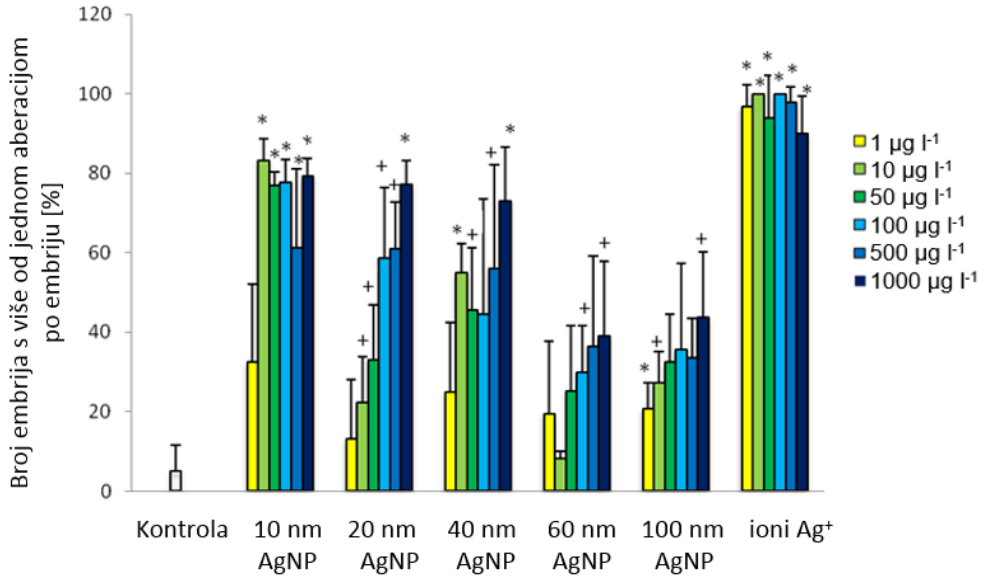
pojavio se nakon tretmana sa 60 nm- i 100 nm-AgNP, kada se isti kretao od 0.7 – 1.4, odnosno od 0.9 – 1.6. Naime, koncentracije od 1 – 500 µg l^{-1} 60 nm-AgNP nisu uzrokovale povišenje aberacija po embriju u usporedbi s kontrolom. Samo je najviša ispitana koncentracija 60 nm-AgNP uzrokovala statistički značajan porast MAE u usporedbi s kontrolom te je isti iznosio 1.4 ± 0.6 aberacija po embriju ($p < 0.05$). Suprotno tome, već vrlo niske koncentracije Ag^+ iona uzrokovale su također statistički značajan porast ukupnog broja mitotičkih aberacija po embriju i to s 0.3 u kontrolnom uzorku na 6.8, odnosno 7.5 pri koncentracijama od 1 i 10 µg l^{-1} Ag^+ ($p < 0.05$). Koncentracija Ag^+ iona od 100 µg l^{-1} udvostručila je vrijednost MAE s 6.0 (pri koncentraciji od 50 µg l^{-1} Ag^+) na 11.1. Pri koncentraciji od 500 µg l^{-1} Ag^+ vrijednost MAE bila je nešto niža, slična onoj pri nižim koncentracijama iona srebra, te je iznosila 7.2 dok je na najvišoj koncentraciji Ag^+ vrijednost MAE iznosila 4.5.



Slika 39. Ukupan broj mitotičkih aberacija po embriju ježinca *A. lixula* nakon tretmana sa AgNP različitih veličina te s ionima Ag^+. Statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolom: $^+p < 0.05$, $^¤p < 0.01$ i $^*p < 0.001$.

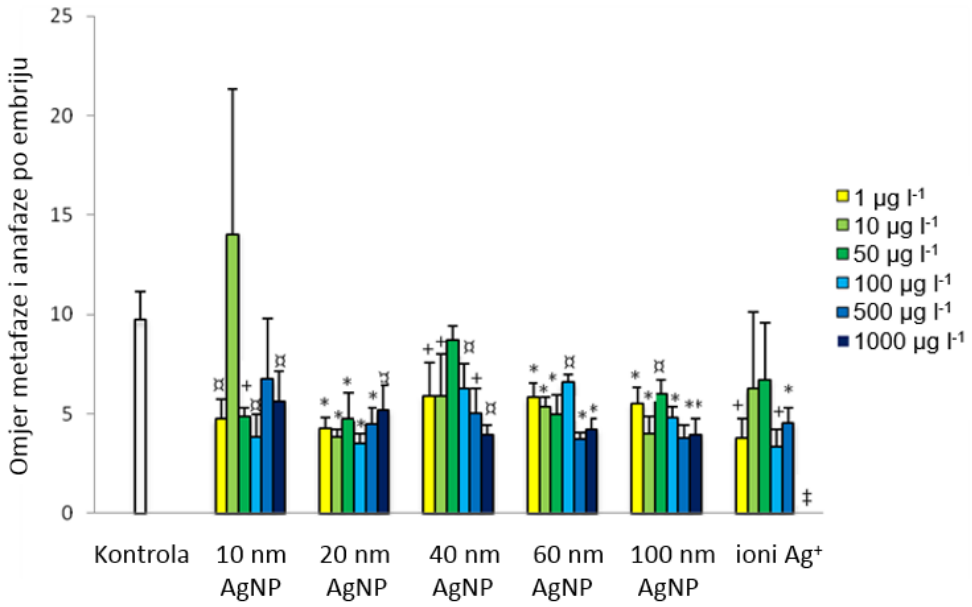
Na Slici 40. prikazan je postotak embrija s više od jednom aberacijom po embriju (%E > 1Ab) te je isti za netretirani uzorak iznosio 5.2 ± 6.5%. Gotovo svi uzorci analizirani u rasponu koncentracija srebrnih iona od 1 - 1000 µg l^{-1} ukazali su na prisutnost embrija s više od jedne aberacije po embriju (96.7 – 100.0%). Suprotno tome, koncentracija od 1 µg l^{-1} AgNP (neovisno o veličini) nije uzrokovala porast %E > 1Ab u usporedbi s kontrolom.

Međutim, na tretmanima s 10 – 1000 µg l^{-1} 10 nm-AgNP bilježi se statistički značajno veći %E > 1Ab u usporedbi s kontrolom ($p < 0.001$) te se isti kretao između 61.2 – 83.2%. Za AgNP veličine 20 nm pri koncentracijama od 10 i 50 µg l^{-1} %E > 1Ab bio je nešto niži i iznosio 22.2 ± 11.5, odnosno 33.1 ± 13.7%. Tretman sa 100 i 500 µg l^{-1} 20 nm-AgNP rezultirao je približno jednakim %E > 1Ab (58.7 – 60.8%), dok je na koncentraciji od 1000 µg l^{-1} isti iznosio 77.1 ± 6.0%. Srebrne nanočestice veličine 40 nm već pri vrlo niskoj koncentraciji od 10 µg l^{-1} uzrokovale su pojavu više od 50% E > 1Ab (55.0 ± 7.3%). Taj je postotak rastao te dosegao vrijednost od 72.9 ± 13.6% za koncentraciju od 1000 µg l^{-1} 40 nm-AgNP. Pri ispitivanju utjecaja AgNP veličine 60 i 100 nm postotak embrija s većim brojem aberacija bio je niži u usporedbi s kontrolom. Naime, nakon tretmana sa 60 nm-AgNP %E > 1Ab bio je statistički značajno veći ($p < 0.05$) u usporedbi s kontrolom tek na koncentracijama od 100 i 1000 µg l^{-1}. Suprotno tome, i pri nižim ispitivanim koncentracijama od 1 i 10 µg l^{-1} 100 nm-AgNP dolazi do značajnog porasta %E > 1Ab, kada je on iznosio 20.8 ± 6.5, odnosno 27.4 ± 7.6%. Međutim, tretmani sa 100 nm-AgNP u rasponu koncentracija od 50 – 500 µg l^{-1} nije rezultirao statistički značajnom razlikom u usporedbi s kontrolnim zbog izražene interindividualne varijabilnosti (vrijednosti za 50 µg l^{-1}: 32.4 ± 12.1; za 100 µg l^{-1} 35.7 ± 21.5; za 500 µg l^{-1} 33.6 ± 9.9). Tretman s 1000 µg l^{-1} 100 nm-AgNP doveo je do statistički značajnog povećanja %E > 1Ab s 5.2% u kontrolnom uzorku na 43.6 ± 16.6 % ($p < 0.05$).



Slika 40. Postotak embrija ježinca *A. lixula* s više od jedne aberacije (%E > 1Ab) nakon tretmana sa AgNP i ionima Ag^+. Statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolom: $^+p < 0.05$ i $^*p < 0.001$.

Rezultati omjera metafaze i anafaze (M/A) u stanicama embrija (Slika 41) u usporedbi s netretiranim uzorkom ukazuje na zastoj mitoze u metafazi te toksičnost ispitivane tvari na diobeno vreteno. Omjer M/A u kontrolnom je uzorku iznosio 9.7 ± 1.4, a nije bio značajno viši niti u jednom tretmanu s različitim koncentracijama AgNP različitih veličina niti u tretmanima sa Ag^+. Izuzetak je jedino bio tretman s 10 µg l^{-1} 10 nm-AgNP kada je omjer M/A iznosio 14.0, međutim standardna devijacija od srednje vrijednosti za tri replike bila je vrlo velika (14.0 ± 7.3). Za vrijeme analiziranja uzoraka koji su bili tetirani s 1000 µg l^{-1} Ag^+ nije zamijećena niti jedna anafaza, stoga omjer M/A nije bilo moguće odrediti.



Slika 41. Omjer metafaze i anafaze (M/A) po embriju ježinca *A. lixula* nakon tretmana sa AgNP i ionima Ag^+. Statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolom prikazana je s $^{+}p < 0.05$, $^{¤}p < 0.01$ i $^{*}p < 0.001$. ‡ za koncentraciju od 1000 µg l^{-1} iona Ag^+ omjer M/A nije bilo moguće izračunati jer nije primijećena niti jedna anafaza prilikom analize uzoraka.

Citogenetičkom analizom učinka AgNP u usporedbi s 10 puta nižom koncentracijom iona Ag^+ na stadiju morule ježinca *A. lixula* može se zaključiti kako su jači negativan učinak pokazali ioni Ag^+ u usporedbi s čak 10 puta višom koncentracijom AgNP, neovisno o veličini. U Tablici 4. prikazan je broj zamijećenih anomalija tijekom diobe embrija ježinca *A. lixula*. U netretiranim uzorcima u ukupno 300 embrija (3 tretmana od po 100 embrija svaki) zamijećen je vrlo niski broj svih praćenih anomalija koji se kretao između 0.02 – 0.08. Dobiveni rezultati ukazuju na činjenicu kako ioni Ag^+ uzrokuju stvaranje raspršenih kromosoma, acentričnih i višestrukih fragmenata. Naime, srednji broj raspršenih kromosoma po embriju (engl. *scattered*

chromosomes, SC) za tretman sa Ag^+ porastao je čak 57 puta u usporedbi s kontrolom. Osim toga došlo je i do znatnog porasta srednjeg broja acentričnih fragmenata po embriju (engl. *acentric fragments*, AF) s 0.05 ± 0.02 u kontrolnom uzorku na 2.06 ± 1.08 u tretmanu sa Ag^+. U konačnici bilježi se statistički značajan porast broja višestrukih fragmenata (engl. *multiple fragmentations*, MF) u usporedbi s kontrolom nakon tretmana s Ag^+ ($p < 0.01$). Srebrne nanočestice veličine 10, 20 i 40 nm uzrokovale su stvaranje znatno većeg broja raspršenih kromosoma, acentričnih fragmenata te anafaznih mostova po embriju u usporedbi s netretiranim uzorkom, te je među njima utvrđena i statistički značajna razlika ($p < 0.05$). S druge strane, nakon tretmana sa AgNP veličine 60 i 100 nm utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0.05$) samo u broju anafaznih mostova u usporedbi s netretiranim uzorkom. Osim toga, na tretmanimau s ionima Ag^+ i AgNP nije bilo značajne razlike u broju zaostalih kromosoma i višestrukih vretena u usporedbi s netretiranim uzorkom, stoga ti rezultati nisu prikazani.

Tablica 4. Srednja vrijednost mitotičkih promjena po embriju nakon tretmana embrija ježinca *A. lixula* sa AgNP različitih veličina (10, 20, 40, 60 i 100 nm), ionima Ag^+ te kontrolni (netretirani) uzorak. Statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolom: $^{\S}p < 0.05$, $^{*}p < 0.05$

Tretman	c [µg l^{-1}]	Br. replika	SC	AF	AB	MF
Kontrola	0	3	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.02 ± 0.03	0.07 ± 0.07
Ioni Ag^+	1	3	3.44 ± 1.47	2.84 ± 0.51	0.07 ± 0.10	0.19 ± 0.11
	10	3	4.12 ± 1.21	2.67 ± 1.02	0.15 ± 0.14	0.09 ± 0.08
	50	3	2.95 ± 1.42	2.00 ± 1.26	0.34 ± 0.12	0.25 ± 0.29
	100	3	3.65 ± 0.90	2.81 ± 0.86	0.47 ± 0.19	3.92 ± 0.26
	500	3	2.10 ± 0.45	1.48 ± 0.30	0.13 ± 0.02	2.90 ± 0.09
	1000	3	1.00 ± 0.51	0.57 ± 0.15	0.06 ± 0.10	2.20 ± 0.34
	Ukupno	**18**	**2.87 ± 1.41§**	**2.06 ± 1.08§**	**0.20 ± 0.19**	**1.60 ± 1.55***
10 nm AgNP	1	3	0.70 ± 0.29	0.28 ± 0.23	0.16 ± 0.07	0.07 ± 0.02
	10	3	2.15 ± 0.44	0.73 ± 0.15	0.10 ± 0.07	0.01 ± 0.02
	50	3	2.65 ± 0.56	2.84 ± 0.91	0.23 ± 0.04	0.13 ± 0.15
	100	3	1.30 ± 0.25	0.71 ± 0.30	0.55 ± 0.09	0.10 ± 0.12
	500	3	0.76 ± 0.27	0.89 ± 0.33	0.28 ± 0.05	0.10 ± 0.14
	1000	3	1.16 ± 0.33	1.70 ± 0.27	0.69 ± 0.17	0.06 ± 0.10
	Ukupno	**18**	**1.45 ± 0.80§**	**1.19 ± 0.95§**	**0.34 ± 0.23§**	**0.08 ± 0.19**
20 nm AgNP	1	3	0.11 ± 0.14	0.21 ± 0.12	0.19 ± 0.04	0.04 ± 0.07
	10	3	0.32 ± 0.06	0.42 ± 0.20	0.27 ± 0.10	0.01 ± 0.02
	50	3	0.32 ± 0.20	0.58 ± 0.20	0.36 ± 0.15	0.04 ± 0.07
	100	3	0.63 ± 0.34	0.87 ± 0.28	0.30 ± 0.15	0.01 ± 0.02

	500	3	0.30 ± 0.19	1.22 ± 0.27	0.42 ± 0.14	0.03 ± 0.03
	1000	3	0.61 ± 0.12	1.59 ± 0.20	0.73 ± 0.12	0.07 ± 0.03
	Ukupno	**18**	**0.38 ± 0.25§**	**0.81 ± 0.52§**	**0.38 ± 0.21§**	**0.03 ± 0.04**
40 nm AgNP	1	3	0.39 ± 0.35	0.19 ± 0.08	0.24 ± 0.20	0.02 ± 0.02
	10	3	1.05 ± 0.23	0.58 ± 0.18	0.24 ± 0.06	0.05 ± 0.02
	50	3	0.51 ± 0.06	0.56 ± 0.23	0.28 ± 0.03	0.04 ± 0.05
	100	3	0.50 ± 0.22	0.74 ± 0.59	0.29 ± 0.09	0.03 ± 0.03
	500	3	0.76 ± 0.53	0.84 ± 0.20	0.23 ± 0.12	0.04 ± 0.05
	1000	3	1.10 ± 0.24	0.98 ± 0.12	0.33 ± 0.03	0.08 ± 0.08
	Ukupno	**18**	**0.71 ± 0.38§**	**0.65 ± 0.35§**	**0.27 ± 0.10§**	**0.05 ± 0.04**
60 nm AgNP	1	3	0.36 ± 0.30	0.14 ± 0.12	0.14 ± 0.04	0.01 ± 0.02
	10	3	0.31 ± 0.04	0.08 ± 0.05	0.10 ± 0.02	0.01 ± 0.02
	50	3	0.51 ± 0.32	0.18 ± 0.05	0.12 ± 0.07	0.02 ± 0.04
	100	3	0.51 ± 0.33	0.20 ± 0.17	0.24 ± 0.05	0.01 ± 0.02
	500	3	0.65 ± 0.40	0.32 ± 0.24	0.27 ± 0.05	0.01 ± 0.02
	1000	3	0.64 ± 0.10	0.23 ± 0.27	0.27 ± 0.15	0.02 ± 0.03
	Ukupno	**18**	**0.50 ± 0.27**	**0.19 ± 0.16**	**0.19 ± 0.10§**	**0.01 ± 0.02**
100 nm AgNP	1	3	0.39 ± 0.07	0.21 ± 0.04	0.09 ± 0.06	0.06 ± 0.03
	10	3	0.35 ± 0.17	0.17 ± 0.06	0.19 ± 0.09	0.01 ± 0.02
	50	3	0.43 ± 0.22	0.18 ± 0.05	0.21 ± 0.17	0.03 ± 0.03
	100	3	0.44 ± 0.17	0.25 ± 0.20	0.19 ± 0.08	0.01 ± 0.02
	500	3	0.35 ± 0.11	0.25 ± 0.09	0.26 ± 0.13	0.06 ± 0.06
	1000	3	0.57 ± 0.36	0.26 ± 0.18	0.28 ± 0.13	0.02 ± 0.02
	Ukupno	**18**	**0.42 ± 0.19**	**0.22 ± 0.11**	**0.20 ± 0.12§**	**0.03 ± 0.04**

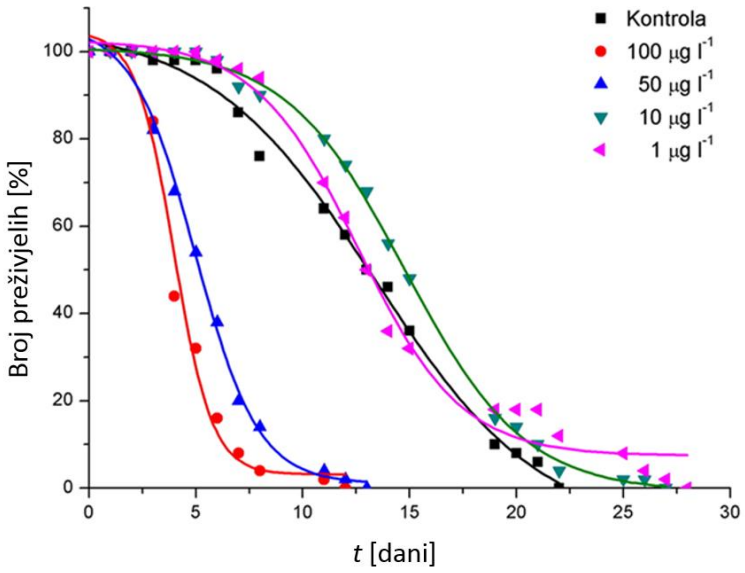
SC = raspršeni kromosomi (engl. *scattered chromosomes*); LC = zaostali kromosomi (engl. *lagging chromosomes*); AF = acentrični fragmenti (engl. *acentric fragments*); AB = anafazni mostovi (engl. *anaphase bridges*); MS = višestruka vretena (engl. *multipolar spindles*); MF = višestruki fragmenti (engl. *multiple fragments*).

5.3. Rezultati ispitivanja kombiniranog učinka srebrnih nanočestica i insekticida na dagnji *Mytilus galloprovincialis*

5.3.1. Preživljavanje dagnji na zraku nakon tretmana sa srebrnim nanočesticama

Preživljavanje dagnji *M. galloprovincialis* na zraku (SOS test) pratilo se kroz 30 dana nakon izlaganja 60 nm AgNP kroz 24 h kako bi se u konačnici moglo izračunati vrijeme kada se bilježi da je 50% jedinki mrtvo (engl. *lethal time for 50% of sampled animals*, LT_{50}) (Slika 42). Vrijednosti LT_{50} prikazane su u Tablici 5. s donjom i gornjom granicom povjerljivosti podataka (engl. *Lower and Upper Confidence Interval*, LCI, UCI). Naime, u netretiranom uzorku, vrijednost LT_{50} iznosila je 13.37 dana s LCI vrijednosti od 12.48, te UCI od 14.25 dana. Ta se vrijednost nije značajno mijenjala na nižim koncentracijama 60 nm-AgNP te je na

koncentraciji od 1 µg l^{-1} iznosila 12.59 dana (12.06 – 13.12 dana), odnosno 14.78 dana (14.52 – 15.04 dana) za tretman s 10 µg l^{-1}. Suprotno tome, više koncentracije od 50 i 100 µg l^{-1} 60 nm-AgNP uzrokovale su znatno smanjenje LT_{50} vrijednost te je ista iznosila 4.97 dana (4.62 – 5.33 dana), odnosno 3.98 dana (3.57 – 4.39 dana). Na Slici 42. prikazane su krivulje preživljenja dagnje nakon tretmana sa 60 nm-AgNP koncentracije od 1 – 100 µg l^{-1}.



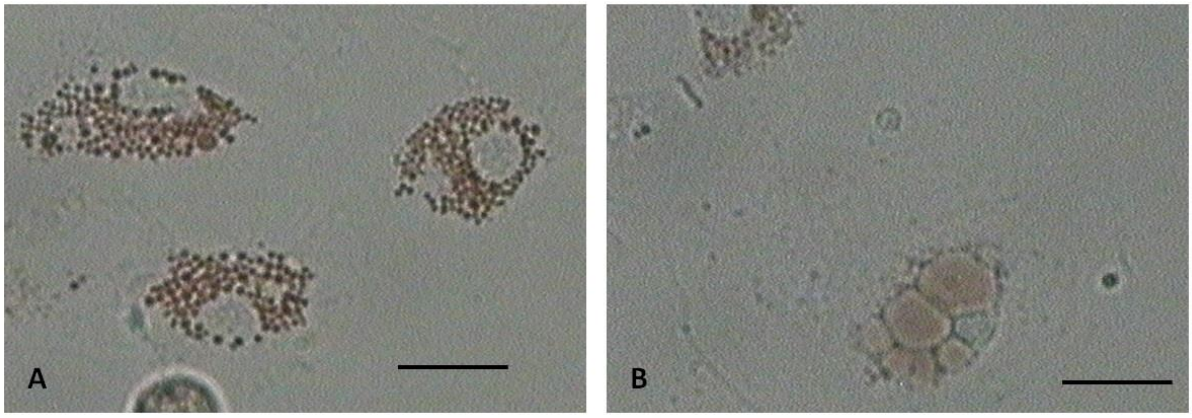
Slika 42. Stres na stres odgovor dagnje na izloženost AgNP izražen kao postotak jedinki preživjelih na zraku u ovisnosti o vremenu izlaganja.

Tablica 5.Vrijednosti LT_{50} za dagnje izložene različitim koncentracijama 60 nm-AgNP, te donje i gornje granice povjerljivosti podataka (engl. *Lower Confidence Interval*, LCI i *Upper Confidence Interval*, UCI).

c [µg l^{-1}]	LT_{50}	LCI	UCI
0	13.37	12.48	14.25
1	12.59	12.06	13.12
10	14.78	14.52	15.04
50	4.97	4.62	5.33
100	3.98	3.57	4.39

5.3.2. Sposobnost zadržavanja neutralnog crvenila u lizosomima hemocita dagnje nakon tretmana sa srebrnim nanočesticama

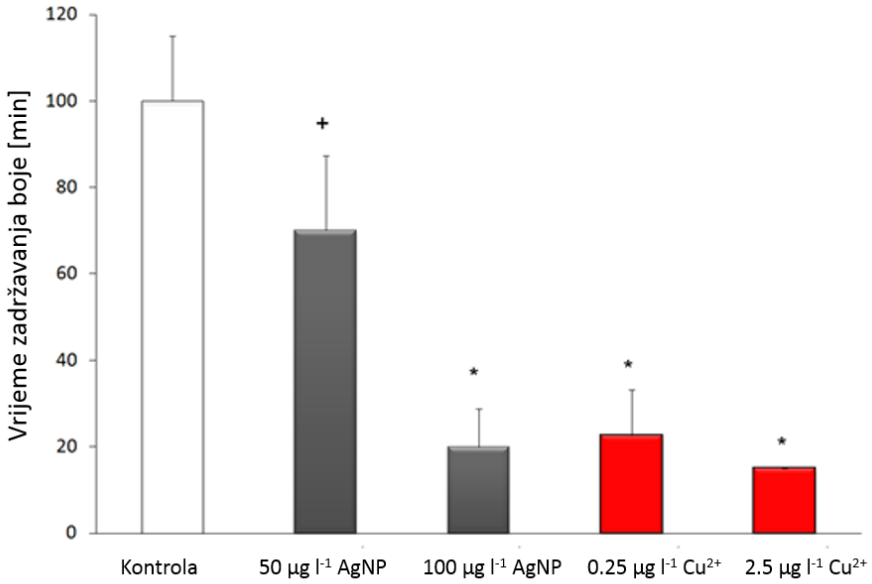
Na Slici 43. prikazane su stanice hemocita dagnje koje: (A) uspješno zadržavaju boju neutralnog crvenila unutar lizosoma i (B) stanica hemocita čiji lizosomi nisu uspjeli zadržati neutralno crvenilo unutar lizosoma. Otopina bakrenih iona poznati je uzročnik destabilizacije membrane hemocita, stoga je u ovome slučaju uzeta kao primjer pozitivne kontrole uz netretirani kontrolni uzorak.



Slika 43. Stanice optjecajne tekućine dagnje (hemocite) koje pokazuju (A) zadržavanje boje neutralnog crvenila u lizosomima kontrolnog uzorka te (B) stanice pod stresom, tretirane sa 100 µg l^{-1} AgNP-60 nm (mjerilo = 10 µm).

Zdrave jedinke trebale bi zadržavati boju neutralnog crvenila unutar lizosoma hemocita ≥ 120 min. Jedinke koje su pod stresom, ali mogu nadoknaditi nastalu štetu zadržavaju boju manje od 120 min, ali više od 50 min, dok u konačnici ozbiljno oštećene jedinke te one s vjerojatno trajnim, patološkim oštećenjem boju zadržavaju manje od 50 min. Nadalje, u testu zadržavanja boje neutralnog crvenila ispitane su dvije koncentracije 60 nm-AgNP (50 i 100 µg l^{-1}) i dvije koncentracije otopine bakrenih iona (0.25 i 2.5 µg l^{-1}), za koje je dobro poznato da uzrokuju otpuštanje boje iz lizosoma hemocita u školjkašima (Molnar i Fong, 2012). Lizosomi hemocita dagnje u kontrolnom uzorku uspjeli su zadržati boju kroz 100 ± 15 min. S druge strane, otopina bakrenog sulfata potaknula je otpuštanje boje neutralnog crvenila već nakon prvih 22 min (0.25 µg l^{-1} $CuSO_4$), odnosno 15 min (2.5 µg l^{-1} $CuSO_4$). Tretiranje suspenzijom 50 µg l^{-1} 60 nm-AgNP dovelo je do smanjenja integriteta lizosomalnih membrana te je vrijeme zadržavanja boje palo sa 100 ± 15 na 70 ± 17 min. Koncentracija od

100 µg l^{-1} 60 nm-AgNP potaknula je otpuštanje boje neutralnog crvenila iz lizosoma hemocita nakon 20 ± 9 min (Slika 44).



Slika 44. Vrijeme zadržavanja boje neutralnog crvenila unutar lizosoma hemocita dagnje nakon tretmana s 50 i 100 µg l^{-1} 60 nm-AgNP (LMNB) te s 0.25 i 2.5 µg l^{-1} Cu^{2+} ($CuSO_4$). Statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolom: $^{+}p < 0.05$ i $^{*}p < 0.001$.

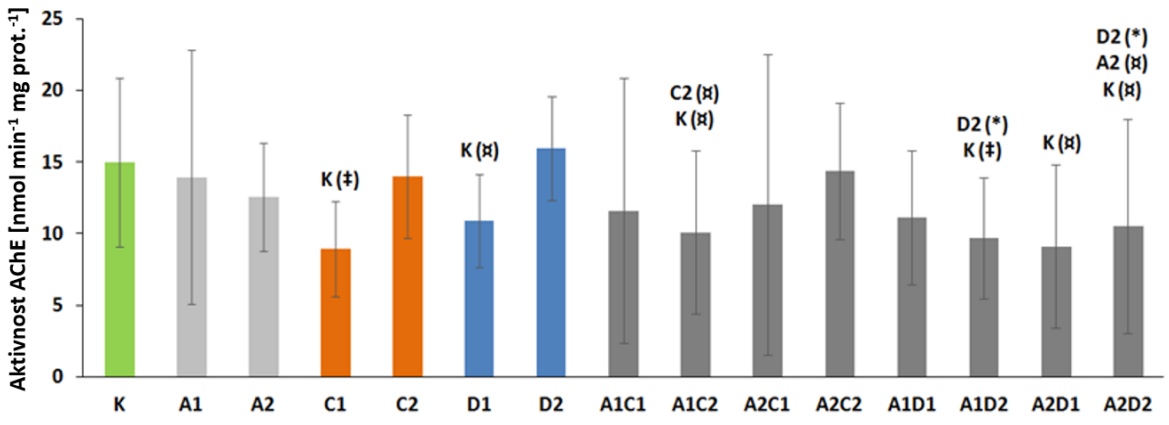
5.3.3. Aktivnost enzima acetilkolinesteraze u škrgama dagnje nakon tretmana sa srebrnim nanočesticama i insekticidima

Za vrijeme trajanja eksperimenta već je drugi dan zamijećeno zamućenje vode u bazenima tretmana samo s 50 µg l^{-1} 60 nm-AgNP te kombinacijom 50 µg l^{-1} 60 nm-AgNP i ispitivanih insekticida cipermetrina i deltametrina. Ovim promatranjem može se zaključiti kako su dagnje u navedenim bazenima bile pod jačim stresom te su u okolnu morsku vodu izlučile svoje gamete i sadržaj probavnog trakta (feces), što je u konačnici dovelo do zamućenja vode. Tijekom pet dana izlaganja dagnji AgNP i pesticidima nije utvrđena niti jedna mrtva jedinka, međutim uočeno je kako je velik broj dagnji u bazenima s 50 µg l^{-1} AgNP bio dosta otvoren, odnosno oslabljela im je mogućnost zatvaranja ljušture (slabija sposobnost mišića aduktora).

Aktivnosti enzima acetilkolinesteraze (AChE) u škrgama dagnji nakon izlaganja prikazana je na Slici 45. U netretiranom uzorku aktivnost enzima AChE u škrgama iznosila je 15.0 ± 5.9 nmol min^{-1} mg $prot.^{-1}$. U škrgama dagnji tretiranim sa 60 nm-AgNP je bila niža u

usporedbi s kontrolom, iako ne statistički značajno, i iznosila 11.8 ± 3.4 nmol min^{-1} mg prot.$^{-1}$ za koncentraciju od 50 μg l^{-1}, odnosno 12.6 ± 3.9 nmol min^{-1} mg prot.$^{-1}$ za koncentraciju od 5 μg l^{-1} AgNP. Viša koncentracija pesticida cipermetrina od 100 μg l^{-1} značajno je smanjila aktivnost AChE s 15.0 ± 5.9 u kontrolnom uzorku na 8.9 ± 3.3 nmol min^{-1} mg prot.$^{-1}$ ($p < 0.01$), dok niža koncentracija cipermetrina od 1 μg l^{-1} nije izazvala promjenu u aktivnosti AChE. Odgovor dagnji na izlaganje deltametrinu bio je sličan onome nakon izlaganja cipermetrinu. Naime, viša koncentracija deltametrina od 50 μg l^{-1} izazvala je značajnu inhibiciju enzima AChE u usporedbi s kontrolom te je ista iznosila 10.9 ± 3.3 nmol min^{-1} mg prot.$^{-1}$ ($p < 0.05$), dok je pri koncentraciji od 0.5 μg l^{-1} bila jednaka kontrolnom uzorku.

Nadalje, u dagnjama izloženim višoj koncentraciji AgNP (50 μg l^{-1}) i cipermetrina (100 μg l^{-1}) nije uočena značajna razlika u usporedbi s kontrolom, međutim standardna devijacija od srednje vrijednosti za replike u ovome je slučaju bila dosta velika te je aktivnost AChE iznosila 11.6 ± 9.2 nmol min^{-1} mg prot.$^{-1}$. Suprotno tome, dagnje tretirane s 50 μg l^{-1} AgNP i nižom koncentracijom cipermetrina (1 μg l^{-1}) pokazale su statistički značajnu inhibiciju aktivnosti AChE u usporedbi s kontrolom te je ista iznosila 10.1 ± 5.7 nmol min^{-1} mg prot.$^{-1}$ ($p < 0.05$). Isti rezultat bio je znatno različit i od tretmana dagnji samo s 1 μg l^{-1} cipermetrina, što nije uzorkovalo inhibiciju AChE. Kombinacijom 5 μg l^{-1} nm AgNP s 1 i 100 μg l^{-1} cipermetrina nije došlo do promjene u aktivnosti AChE u usporedbi s kontrolom, odnosno u usporedbi sa zasebno tretiranim toksikantima. Deltametrin u ispitivanoj koncentraciji od 50 μg l^{-1} u kombinaciji s 50 μg l^{-1} AgNP nije izazvao značajnu inhibiciju AChE. Međutim, niža koncentracija deltametrina od 0.5 μg l^{-1} u kombinaciji s višom koncentracijom AgNP pokazala je značajnu inhibiciju aktivnosti AChE (9.7 ± 4.2 nmol min^{-1} mg prot.$^{-}$1) u usporedbi s kontrolom ($p < 0.01$) i u usporedbi s tretmanom od 0.5 μg l^{-1} deltametrina. Izlaganje nižoj koncentraciji AgNP od 5 μg l^{-1} u kombinaciji s 50 μg l^{-1} deltametrina rezultiralo je značajnom inhibicijom aktivnosti AChE u usporedbi s kontrolom te je ista iznosila 9.1 ± 5.7 nmol min^{-1} mg prot.$^{-1}$ ($p < 0.05$). Jedini tretman nakon kojeg je došlo do značajne inhibicije aktivnosti AChE (10.5 ± 7.5 nmol min^{-1} mg prot.$^{-1}$) u usporedbi s kontrolom ($p < 0.05$) te s tretmanom samo sa AgNP ili deltametrinom bio je tretman s 5 μg l^{-1} AgNP i 0.5 μg l^{-1} deltametrina ($p < 0.001$) (Slika 45).



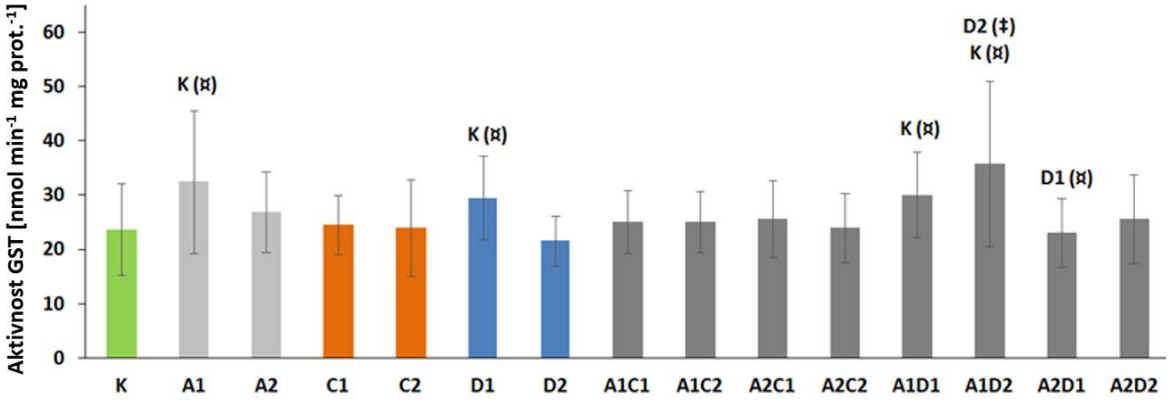
Slika 45. Aktivnost enzima acetilkolinesteraze (AChE) u škrgama dagnje nakon tretmana sa 60 nm-AgNP (LMNB) (svijetlo sivi stupci, koncentracije: A1 = 50 μg l^{-1} i A2 = 5 μg l^{-1}), cipermetrinom (narančasti stupci, C1 = 100 μg l^{-1} i C2 = 1 μg l^{-1}), deltametrinom (plavi stupci, D1 = 50 μg l^{-1} i D2 = 0,5 μg l^{-1}) te kombinacijama istih (tamno sivi stupci,) te netretirani kontrolni uzorak (zeleni stupac, K). Statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolom, zasebnim tretmanima i kombinacijom nanočestica i pesticida: ¤$p < 0.05$, ‡$p < 0.01$ i *$p < 0.001$.

5.3.4. Aktivnost enzima glutation *S*-transferaze u škrgama dagnje nakon tretmana sa srebrnim nanočesticama i insekticidima

Aktivnost enzima glutation *S*-transferaze (GST) u kontrolnom uzorku škrga dagnji iznosila je 23.7 ± 8.4 nmol min^{-1} mg $prot.^{-1}$. Ista je statistički značajno porasla u usporedbi s kontrolom nakon tretmana s 50 μg l^{-1} 60 nm AgNP te je iznosila 32.5 ± 13.2 nmol min^{-1} mg $prot.^{-1}$ ($p < 0.05$), dok je niža koncentracija od 5 μg l^{-1} AgNP uzrokovala je tek neznatno povišenje aktivnosti GST (26.9 ± 7.4 nmol min^{-1} mg $prot.^{-1}$). Tretmani s 1 i 100 μg l^{-1} cipermetrina nisu izazvali promjenu u aktivnosti GST u usporedbi s kontrolom, dok je značajno povećanje aktivnosti na 29.5 ± 7.7 nmol min^{-1} mg $prot.^{-1}$ ($p < 0.05$) zabilježeno nakon izlaganja 50 μg l^{-1} deltametrinu. Suprotno tome, pri nižoj koncentraciji deltametrina od 0.5 μg l^{-1} nije došlo do promjene aktivnosti u usporedbi s kontrolom.

Iz rezultata prikazanih na Slici 46. jasno je vidljivo kako je aktivnost GST u svim kombinacijama AgNP i cipermetrina približno jednaka aktivnosti izmjerenoj u dagnjama izloženim samo cipermetrinu, neovisno o primijenjenoj koncentraciji pesticida i nanočestica. Ista se ne razlikuje značajno u usporedbi s netretiranom populacijom dagnji, niti s dagnjama tretiranima sa pesticidima i nanočesticama zasebno. Nakon izlaganja kombinacijama viših koncentracija AgNP i deltametrina od 50 μg l^{-1} zabilježena je statsitički značajno povećanje

aktivnosti GST u usporedbi s kontrolnom dagnji te je ista iznosila 30.1 ± 8.0 nmol min^{-1} mg $prot.^{-1}$ ($p < 0.05$). Osim toga, tretman s 50 µg l^{-1} AgNP i 0.5 µg l^{-1} deltametrina uzrokovale su znatno povećanje aktivnosti GST u usporebi s kontrolom te u usporedbi s tretmanom sa samim deltametrinom iste koncentracije. Naime, u ovome tretmanu aktivnost GST iznosila je 35.7 ± 15.3 nmol min^{-1} mg $prot.^{-1}$ te je ujedno predstavljala i najvišu zabilježenu aktivnost GST u ovome eksperimentu. Nadalje, aktivnost GST bila je značajno niža nakon kombiniranog tretmana s 5 µg l^{-1} AgNP i 50 µg l^{-1} deltametrina u usporedbi s tretmanom samo s 50 µg l^{-1} deltametrina. Aktivnosti GST u ovome je slučaju iznosila 23.0 ± 6.3 nmol min^{-1} mg $prot.^{-1}$ te se statistički značajno razlikovala ($p < 0.05$) od tretmana s 50 µg l^{-1} deltametrina kada je aktivnost GST iznosila 29.5 ± 7.7 nmol min^{-1} mg $prot.^{-1}$. Kombinacija nižih koncentracija AgNP i deltametrina nije rezultirala promjenom u aktivnosti GST u usporedbi s kontrolom i zasebno ispitivanim toksikantima (Slika 46).



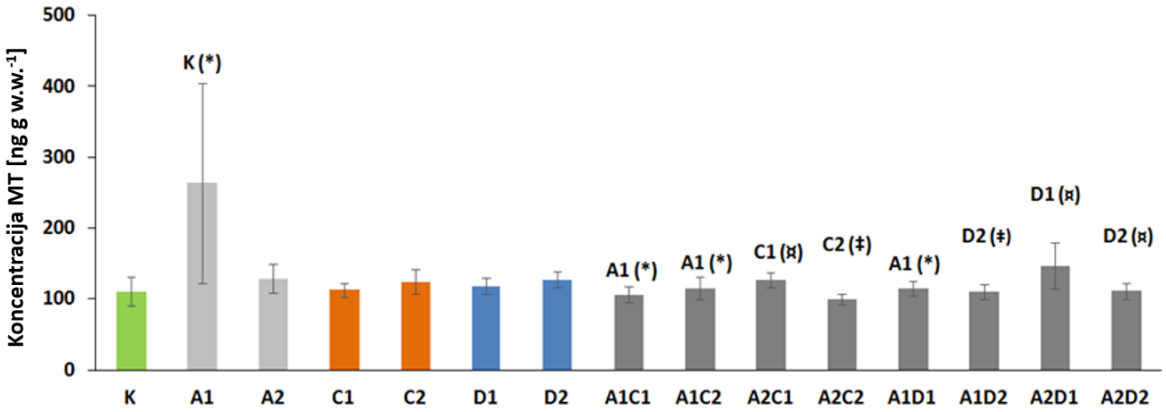
Slika 46. Aktivnost enzima glutation *S*-transferazse (GST) u škrgama dagnje nakon tretmana sa 60 nm-AgNP (LMNB) (svijetlo sivi stupci, koncentracije: A1 = 50 µg l^{-1} i A2 = 5 µg l^{-1}), cipermetrinom (narančasti stupci, C1 = 100 µg l^{-1} i C2 = 1 µg l^{-1}), deltametrinom (plavi stupci, D1 = 50 µg l^{-1} i D2 = 0,5 µg l^{-1}) te kombinacijama istih (tamno sivi stupci,) te netretirani kontrolni uzorak (zeleni stupac, K). Statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolom, zasebnim tretmanima i kombinacijom nanočestica i pesticida: ¤$p < 0.05$, ‡$p < 0.01$ i *$p < 0.001$.

5.3.5. Koncentracija metalotioneina u probavnoj žlijezdi dagnje nakon tretmana sa srebrnim nanočesticama i insekticidima

Koncentracija proteina metalotioneina (MT) u probavnoj žlijezdi kontrolnih dagnji iznosila je 110.8 ± 20.0 ng g $w.w.^{-1}$, a značajno se povećala na 263.3 ± 140.8 ng g $w.w.^{-1}$ ($p < 0.001$) nakon izlaganja dagnji 50 µg l^{-1} 60 nm-AgNP . Niža koncentracija AgNP (5 µg l^{-1}) nije rezultirala u promjeni u usporedbi s kontrolom. Koncentracija MT u probavnoj žlijezdi dagnji

izloženih pesticidima nije se razlikovala od netretiranih dagnji. Naime, nakon tretmana sa 100 μg l^{-1} cipermetrina koncentracija MT iznosila je 112.5 ± 10.5 ng g w.w.$^{-1}$, dok je ista za 1 μg l^{-1} cipermetrina iznosila 124.4 ± 17.2 ng g w.w.$^{-1}$. Jednako je bilo i s deltametrinom, gdje je tretman s koncentracijom od 50 μg l^{-1} rezultirao vrijednošću sličnoj kontrolnom uzorku (118.4 ± 11.4 ng g w.w^{-1}), dok je nakon tretmana s nižom koncentracijom od 0.5 μg l^{-1} koncentracija MT iznosila 127.3 ± 11.4 ng g w.w.$^{-1}$ (Slika 47).

Do vrlo zanimljivog učinka došlo je prilikom izlaganja dagnji kombinaciji 50 μg l^{-1} AgNP s cipermetrinom. Naime, obje koncentracije cipermetrina (1 i 100 μg l^{-1}) u kombinaciji s 50 μg l^{-1} AgNP umanjile su negativan učinak AgNP na način da je došlo do značajnog sniženja koncentracije MT s 263.3 ± 140.8 ng g w.w.$^{-1}$ iz kontrole na 106.3 ± 10.9 u uzorku tretiranom samo s 50 μg l^{-1} AgNP, odnosno na 115.2 ± 16.2 ng g w.w.$^{-1}$ u uzorcima tretiranim s kombinacijama, a isti se nije razlikovao od netretiranog uzorka. Tretman srebrnim nanočesticama koncentracije 5 μg l^{-1} u kombinaciji s 1 i 100 μg l^{-1} cipermetrina bio je značajno različit u usporedbi sa zasebnim tretmanima cipermetrina. Naime, kombinacija 5 μg l^{-1} AgNP i 100 μg l^{-1} cipermetrina pokazala je znatno povećanje koncentracije MT u usporedbi s tretmanom sa samim cipermetrinom i to s 112.5 ± 10.5 na 127.1 ± 10.8 ng g w.w.$^{-1}$ ($p < 0.05$). Suprotno tome, kombinacija 5 μg l^{-1} AgNP s 1 μg l^{-1} cipermetrinom značajno je snizila koncentraciju MT na 99.7 ± 7.6 ng g w.w.$^{-1}$ u usporedbi s tretmanom populacije dagnji samo s 1 μg l^{-1} cipermetrinom kada je ista iznosila 124.4 ± 17.2 ng g w.w.$^{-1}$ ($p < 0.01$). Nadalje, u kombinaciji AgNP s deltametrinom (koncentracije 50 μg l^{-1}) koncentracija, vrijednost je bila statistički značajno niža u usporedbi s tretmanom sa samim nanočesticama jednake koncentracije te je iznosila 115.4 ± 10.5 ng g w.w.$^{-1}$ ($p < 0.001$). Koncentracija MT bila je znatno niža i nakon tretmana s 50 μg l^{-1} AgNP i 0.5 μg l^{-1} deltametrina u usporedbi stretmanom sa samim deltametrinom iste koncentrace ($p < 0.01$). Suprotno tome, izlaganje kombinaciji od 5 μg l^{-1} AgNP i 50 μg l^{-1} deltametrina dovelo je do značajnog porasta koncentracije MT u usporedbi s tretmanom samo s 50 μg l^{-1} deltametrina ($p < 0.05$) Naime, u slučajnu navedene kombinacije koncentracija metalotioneina iznosila je 146.7 ± 32.5 ng g w.w.$^{-1}$ dok je ista za tretman samo s 50 μg l^{-1} deltametrina iznosila 118.4 ± 11.4 ng g w.w.$^{-1}$. Znatno niža koncentracija MT u usporedbi sa zasebnim tretmanom 0.5 μg l^{-1} deltametrina zamijećena je i pri kombiniranom tretmanu s 5 μg l^{-1} AgNP i 0.5 μg l^{-1} deltametrina. Kombinirani utjecaj svih AgNP s dva pesticida nije rezultirao značajnom razlikom u koncentraciji MT u usporedbi s kontrolom (Slika 47).



Slika 47. Koncentracija proteina metalotioneina (MT) u probavnoj žlijezdi dagnje *M. galloprovincialis* nakon tretmana sa 60 nm-AgNP (LMNB) (svijetlo sivi stupci, koncentracije: A1 = 50 µg l^{-1} i A2 = 5 µg l^{-1}), cipermetrinom (narančasti stupci, C1 = 100 µg l^{-1} i C2 = 1 µg l^{-1}), deltametrinom (plavi stupci, D1 = 50 µg l^{-1} i D2 = 0,5 µg l^{-1}) te kombinacijama istih (tamno sivi stupci,) te netretirani kontrolni uzorak (zeleni stupac, K). Statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolom, zasebnim tretmanima i kombinacijom nanočestica i pesticida: ¤$p < 0.05$, ‡$p < 0.01$ i *$p < 0.001$.

6. RASPRAVA

6. Rasprava

Kao posljedica sve intenzivnije primjene u industrijskim proizvodima, ENP u velikim se količinama danas ispuštaju u okoliš slučajno (primjerice, ispiranjem krema za sunčanje s potrošača) ili namjerno (u svrhu remedijacije tla) te postepeno dopiru do vodenog ekosustava (rijeka, jezera i obalnih morskih voda). Na taj način ENP predstavljaju potencijalno ozbiljan rizik za okolišne niše slatkovodnog, ali i morskog sustava. Upravo iz tog razloga, istraživanje potencijalno toksičnog učinka ENP na organizme u okolišu obalnih voda, dobiva na važnosti u proteklih nekoliko godina (Matranga i Corsi, 2012; Baker i sur., 2014; Corsi i sur., 2014). Osnovni izazov nanotehnologije leži u određivanju mogućih transformacija, interakcija i ponašanja ENP u vodenom okolišu visoke koncentracije elektrolita te posljedičnom objašnjenju specifičnih modela ponašanja ENP prema organizmima koji ga nastanjuju (Schultz i sur., 2014). Također, trenutno postoji vrlo malo tehnika i instrumenata koji mogu razlikovati ENP od prirodno prisutnog nanomaterijala u okolišu. Naime, veliki izazov analitičarima danas predstavlja razvoj metoda koje mogu identificirati i zatim kvantificirati pojedinu vrstu nanočestica te ju izdvojiti iz vrlo kompleksnog medija u kojem se nalazi (rijeka, more, sedimenti ili u organizmu). Iako vodeni medij predstavlja jednu vrlo kompleksnu smjesu tvari, gdje su prisutne nanočestice u vrlo niskim koncentracijama, mogao bi biti dobar izbor za proučavanje ponašanja nanočestica u okolišu. Naime, istraživanje ponašanja nanočestica u vodenom okolišu, te voda kao matriks, vrlo su pogodan odabir prilikom izučavanja prvotnih studija i razvoja tehnika detekcije i ponašanja nanočestica u okolišu budući je upravo vodeni medij manje kompleksan u usporedbi s ostalima, poput tla, sedimenta ili biote (Howard, 2009).

6.1. Ponašanje srebrnih nanočestica u obalnim vodama

Veoma mala veličina u kombinaciji s vrlo velikom specifičnom površinom daje nanočesticama jedinstvena svojstva. Osim omjera površine i veličine nanočestica, veoma je bitan i njihov kemijski sastav. Naime, upravo kemijsko-fizikalna svojstva nanočestice određuju njezino ponašanje i sudbinu u okolišu. O veličini, ponašanju i reaktivnosti nanomaterijala s drugim tvarima iz okoliša ovisi hoće li on biti toksičan za ispitivani organizam. Osim toga, u usporedbi s mnogim drugim nanomaterijalima, AgNP jesu topive u morskoj vodi, pri čemu dolazi do oksidacijskog otapanja površine nanočestica najčešće

stvaranjem sulfida srebra te se tako s površine nanočestica otpušta sloj po sloj iona Ag^+ ili manjih oblika nanočestica kroz određeno vrijeme (Zhu i sur., 2012). Prije ispitivanja učinka nanočestica na odabranome organizmu, iste se moraju okarakterizirati u mediju od interesa (npr. slatkoj ili morskoj vodi, umjetno proizvedenoj ili filtriranoj morskoj vodi, tlu, sedimentu ili sl.) (Mukherjee i sur., 2012). Stoga je u ovoj disertaciji karakteriziran sustav različitih veličina AgNP u filtriranoj morskoj vodi i to uz pomoć UV/Vis spektroskopije, dinamičkog raspršenja svjetlosti, spektroskopije masa s induktivno spregnutom plazmom te fotografiranjem primjenom transmisijske elektronske mikroskopije.

Usporedbom rezultata više tehnika za karakterizaciju AgNP, dolazi se do zaključka kako AgNP, neovisno o svojoj veličini, u doticaju s vodom visokog saliniteta, kao što je to morska voda, vrlo brzo aglomeriraju i agregiraju. Naime, **UV-Vis apsorpcijskom spektroskopijom** ustanovljeno je smanjenje maksimuma SPR apsorpcijskog pika s vremenom, što ukazuje na proces aglomeracije AgNP u morskoj vodi. Najveći pad intenziteta maksimuma apsorpcijskog pika javlja se unutar prva 4 h od trenutka dodavanja AgNP u filtriranu morsku vodu. Međutim, određeni dio čestica ipak ostaje u nano-obliku kroz cijelo vrijeme izvođenja eksperimenta. Valne duljine maksimuma apsorpcijskog pika, snimljene za različite veličine AgNP, odgovarale su rezultatima dobivenima od strane Paramelle i sur. (2014). Mock i sur. (2002) opisali su kako sferične AgNP imaju maksimum apsorpcijskoga pika između 400 i 500 nm (ovisno o veličini), dok one trokutastog oblika pomiču apsorpcijski pik u desno k većim valnim duljinama (između 600 − 750 nm). Isto je primijećeno i prilikom usporedbe 60 nm-AgNP sintetiziranih u LMNB, koje su se tijekom analize TEM-om pokazale kao čestice dobro definirane kristalne strukture i oštrih rubova, a njihov je maksimum apsorpcijskog pika bio na valnoj duljini od 435 nm, dok su kupovne 60 nm-AgNP bile više sferičnog oblika prema TEM-u i pokazale pomak maksimuma apsorpcijskog pika na niže valne duljina (~430 nm). Do velikog pomaka apsorpcijskog maksimuma na valne duljine veće od 600 nm nije došlo budući uglovi svih „trokutastih“ 60 nm-AgNP (LMNB) nisu bili izrazito oštri, stoga pomak nije bio jače izražen (Slika 20). Prema maksimumima apsorpcijskog pika suspenzija AgNP različitih veličina proizlazi da su iste sferičnog su oblika te se njihovi maksimumi pika nalaze između 393 i 495 nm.

Rezultati analize tehnikom **dinamičkog raspršenja svjetlosti** (DLS) svih ispitanih suspenzija AgNP slažu se s onima dobivenima UV-Vis spektroskopijom te ukazuju na činjenicu kako AgNP stvaraju veće i manje agregate kada se nađu okružene raznim solima

prisutnima u morskoj vodi. Posljedično, iz navedenog se može zaključiti kako su u okolišu ispitivanog organizma (ježinca ili dagnje) prisutne čestice većih i manjih (nano) dimenzija. Naime, Mukherjee i sur. (2012) upravo su uz pomoć DLS tehnike i zeta potencijala mogli objasniti sekundarnu toksičnost AgNP nakon njihove interakcije s hranjivim tvarima iz medija. Osim toga, DLS tehnikom ustanovljeno je kako manje nakupine nanočestica ostaju prisutne u filtriranoj morskoj vodi za vrijeme cijelog izvođenja eksperimenta. Naime, DLS tehnikom otkriveno je kako 60 nm-AgNP (LMNB) metodom redukcije s natrijevim citratom nisu dale monodisperznu suspenziju čestica jednakih veličina. Indeks polidisperznosti ove suspenzije iznosio je 0.42 ± 0.2, što ukazuje na prisutnost čestica različitih veličina. U filtriranoj morskoj vodi primijećene su dvije nakupine čestica i to veličine od 70 − 150 nm te veći aglomerati veličine između 350 − 550 nm. Buffet i sur (2013) primijetili su uz pomoć DLS-a isto tako brzu aglomeraciju AgNP veličine 20 i 40 nm do čak 400 nm u trenutku doticaja s medijem visokog saliniteta. Aglomeracija nanočestica u vodenom stupcu može biti važan čimbenik u njihovoj interakciji s organizmima, pri čemu je moguće kako će veće nakupine organizam lakše preuzeti nego pojedinačne nanočestice, kao što je to bio slučaj kod AgNP koje su se nakupljale u škrgama dagnji (Ward i Kach, 2009). Nadalje, Bruneau i sur. (2016) su u svojem istraživanju pokazali kako AgNP iz otpadnih voda jesu biodostupne bez obzira na stvorene agregate te posljedično izazivaju razne upalne procese u riba.

Analizom pomoću **ICP-MS** otkriveno je kako AgNP otpuštaju vrlo mali postotak iona sa svoje površine budući je isti iznosio svega 2.7 − 6.8% za 60 nm-AgNP (LMNB). Stoga se može zanemariti doprinos iona Ag^+ u suspenziji AgNP prilikom ispitivanja njihovog moguće toksičnog učinka na organizme. ICP-MS analizom suspenzija AgNP različitih veličina u filtriranoj morskoj vodi primijećeno je kako manje čestice (10 i 20 nm) brže otpuštaju ione Ag^+ sa svoje površine u usporedbi s onima većih dimenzija (40 i 60 nm), što je bilo za očekivati budući se veći postotak atoma nalazi na njihovoj površini te se stoga nanočestice mogu brže oksidativno otapati u mediju s visokom koncentracijom soli poput morske vode. Nadalje, AgNP veličine 100 nm najsporije otpuštaju srebrne ione sa svoje površine. Potrebno je spomenuti kako je usporedbnom 60 nm-AgNP (LMNB) s kupovnom suspenzijom AgNP iste veličine izmjeren sličan postotak otpuštanja iona Ag^+ s površine nanočestica s vremenom.

Uz pomoć transmisijske elektronske mikroskopije utvrđeno je kako su AgNP (LMNB) bile dobro definiranih oštrijih rubova dok su one kupovne iste veličine bile više sferičnog oblika. Kada se usporedi njihov utjecaj na embrionalni razvoj ježinaca dolazi se do zaključka

da su 60 nm-AgNP (LMNB) pokazale veću toksičnost, odnosno imale su jači negativan utjecaj na embrionalni razvoj ježinaca u usporedbi s kupovnim 60 nm-AgNP, što je vjerojatno posljedica oštrih rubova koji su uočeni na AgNP (LMNB). George i sur. (2012) ispitali su upravo utjecaj različitih oblika AgNP na staničnoj liniji RT-W1 kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) te ustanovili kako su „nanopločice“ (engl. *nanoplates*) najtoksičniji oblik AgNP u usporedbi s ostala dva ispitana nano-oblika: sfere i cjevčica. Takav učinak nije se mogao objasniti mehanizmom otpuštanja iona Ag^+ te njihovom biodostupnošću ispitivanim stanicama, već je ustanovljeno kako je potreban izravni kontakt srebrnih „nanopločica“ sa staničnom membranom stanica linije RT-W1, nakon čega dolazi do narušavanja njezine primarne strukture. Transmisijskom elektronskom mikroskopijom utvrđeno je da srebrne „nanopločice“ na svojoj površini posjeduju veliki broj kristalnih anomalija (pogrešaka u strukturi slaganja te točkastih anomalija, engl. *stacking faults and point defects*). Dakle, osim veličine AgNP, i oblik je od velike važnosti jer i o njemu može ovisiti toksičnost u ispitivanom organizmu.

6.2. Utjecaj srebrnih nanočestica na embrionalni razvoj ježinaca

Istraživanja koja se bave proučavanjem embrionalnog razvoja ježinaca pogodna su za ispitivanje učinka nanočestica zbog toga što u usporedbi s odraslim jedinkama zahtjevaju manji volumen eksperimenta (ispitivanog medija), samim time i manji volumen ispitivane tvari, relativno su jednostavna za izvođenje, a rezultati ukazuju na mogući negativan učinak na odrasle organizme (Ringwood i sur., 2010). Ježinac *P. lividus* najčešća je vrsta koja se koristi kao modelni organizam prilikom ispitivanja utjecaja raznih okolišnih zagađivala u brzom i jednostavnom testu embrionalnog razvoja ježinaca (test SUEDT). Naime, ova vrsta ježinca je vrlo rasprostranjena u Sredozemlju, nastanjuje obalno područje te se jedinke mogu lako sakupiti, a rani embrionalni razvojni stadiji jasno su uočljivi pod mikroskopom (Pinna i sur., 2006; Kanold i sur., 2016; Magesky i sur., 2016). Osim toga, odrasle jedinke otpuštaju gamete u okoliš, stoga njihove gamete, embriji i larve postaju meta raznih okolišnih zagađivala pa tako i nanočestica (Šiller i sur., 2013; Gambardella i sur., 2015; Mesarič i sur., 2015). Druga vrsta, koja isto tako obitava u obalnom području i česti je stanovnik Sredozemnoga mora, jest crni, hridinasti ježinac *A. lixula*. Međutim, ova vrsta živi u izrazito čistome moru te već minimalno zagađenje morske vode, posebice nanočesticama, uzrokuje

njezino nestajanje (Maisano i sur., 2015; Cappello i sur., 2017). Treća vrsta, koja je korištena za ispitivanje utjecaja AgNP u ovoj doktorskoj disertaciji, jest ježinac *S. granularis* koji nastanjuje dubine ispod 20 m te je za njegovo uzorkovanje potreban ronioc. Gonade ovih triju spomenutih vrsta ježinaca već se dugi niz godina primjenjuju u gastronomiji gdje se njihove pretežito ženske gonade koriste kao vrhunski specijaliteti (Wangensteen i sur., 2013). Neovisno o prethodno spomenutim činjenicama o pribavljanju ježinaca te njihovog nasumičnog odabira, što u današnjim istraživanjima najčešće jest slučaj, potrebno je pronaći onu vrstu koja je najosjetljivija za pojedinu ispitivanu tvar, u ovome slučaju AgNP, te ispitivanja izvoditi upravo na toj vrsti, kako bi ostale vrste bile zaštićene. Naime, rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na činjenicu kako su **neke vrste ježinaca osjetljivije** na djelovanje srebrnih nanočestica te da pri tome značajnu ulogu ima stupanj razvoja embrija u trenutku doticaja s njima. Naime, crni ježinac *A. lixula* pokazao se najosjetljivijom vrstom tijekom ispitivanja učinka AgNP na njegov embrionalni razvoj. Nakon njega, uslijedila je vrsta *S. granularis* te *P. lividus*, kao najmanje osjetljiva vrsta ježinca. Stoga bi bilo poželjno u budućim istraživanjima toksičnosti nanočestica u okolišu umjesto vrste *P. lividus* koristiti vrstu *A. lixula*. Moguće je da je vrsta *A. lixula* osjetljivija na puno veći broj okolišnih zagađivala u usporedbi s *P. lividus*. Naime, *A. lixula* je ježinac koji posjeduje puno tvrđi i kompleksniji kostur u usporedbi s vrstom *P. lividus*. Moguće je da je upravo potreba za sintezom jačeg kostura u procesu biomineralizacije larvi razlog veće osjetljivosti ježinca *A. lixula* naspram vrste *P. lividus*. Naime, Martino i sur. (2017) veću osjetljivost na gadolinij (Gd) vrste *A. lixula* naspram vrsti *P. lividus* pripisali su upravo procesima stvaranja kompleksnijeg i tvrđeg kostura u vrsti *A. lixula*. Oni su u svojem istraživanju objasnili kako bi osjetljivost na Gd mogla odražavati razlike u koncentraciji kalcita pohranjenog u kosturu ježinca koji proizvodi kompleksniji kostur (npr. *A. lixula*) u usporedbi s ježincima koji stvaraju jednostavniji kostur s nižom koncentracijom kalcita (poput vrste *P. lividus*). Dakle, moguće je da su ježinci koji proizvode više kalcita jače pogođene nekim zagađivalom (Gd, AgNP) koje ometa unos iona Ca^{2+} u organizam. Suprotno tim rezultatima, Carballeira i sur. (2012b) otkrili su približno jednaku osjetljivost ježinaca *A. lixula* i *P.lividus* na seriju ispitivanih antibiotika (amoksicilin, ampicilin, oksitetraciklin, streptomicin) i dezinficijensa (natrijev hipoklorit i formaldehid). Razlika u osjetljivost među vrstama na različita okolišna zagađivala iziskuje vrlo pažljiv odabir određene vrste za tvar čija se toksičnost želi ispitati.

Usporedno ispitivanje **učinka AgNP na tri vrste ježinaca** do danas nije istraženo. Upravo iz tog razloga u ovome su radu embriji ježinaca izloženi AgNP, i to u niskoj, po okoliš relevantnoj koncentraciji. Naime, već je prethodno dokazano kako su coelomocitne stanice ježinaca, (fagociti limfociti sa zaštitnom ulogom u bodljikaša), vrlo osjetljive na fiziološke perturbacije u unutrašnjoj sredini, stoga se očekivao brzi stanični odgovor nakon izlaganja metalnim nanočesticama (Falugi i sur., 2012). Štoviše, fagocitne stanice bodljikaša vrlo su učinkovite u identifikaciji i hvatanju stranih stanica i njihovih ostataka koji slobodno plutaju unutar coelomocitne tekućine (šupljine) i to čak pri temepraturi blizu 0 °C, kao što su dokazali Borges i sur. (2002) na antarktičkom ježincu *Sterechinus neumayeri*. Stoga je bilo za pretpostaviti da će neprekidni stanični odgovor usmjeren na AgNP u ježinaca *A. lixula, P. lividus* i *S. granularis,* ugroziti imunološki sustav larvi te posljedično narušiti homeostazu organizma. U ovome je radu odgovor ježinaca ovisio je o primijenjenoj koncentraciji AgNP. Naime, više primijenjene koncentracije uzrokovale su kompletan zastoj u embrionalnome razvoju ježinaca. Sličan odgovor na izloženost AgNP otkrili su Mano i sur. (2013) dokazavši, na embrionalnome razvoju ježinca *P. lividus*, vrlo jaki negativan učinak AgNP koji se očitovao u nemogućnosti izloženih embrija da dosegnu stadij potpuno razvijene larve nakon 48 h. Zigote ježinca *A. lixula* izložene koncentraciji 60 nm-AgNP od 50 μg l^{-1} i višoj, neovisno o trenutku u kojem su bile izložene, pokazale su značajan zastoj u embrionalnome razvoja. Naime, prvi učinci koji se javljuju prije bilo kakvog letalnog učinka jesu subletalni učinci (često reverzibilni), nakon čega slijedi tzv. "točka bez povratka“ (engl. „*point-of-no-return*"), stanična smrt i konačno autolitičke promjene i razgradnja (nekroza) (Kromer i sur., 2009). Kao što je već poznato, srebro stupa u interakciju s fosfolipidnim dvoslojem što može poremetiti transmembranski elektrokemijski gradijent iona Na^+ i K^+, što pak u konačnici dovodi do kolapsa potencijala stanične membrane i mogućnosti gubljenja njezinog integriteta (Lapresta-Fernández i sur., 2012). Ovo može biti objašnjenje velikog postotka nerazvijenih embrija čija je unutrašnjost bila nabubrena, a uočljivi su bili i povećani svijetli vezikuli unutar citoplazme. Subletalne učinke (letargiju, otekline i nepokretljivost) primijetili su i Magesky i sur. (2016) na juvenilim larvama i postlarvama ježinca *Strongylocentrotus droebachiensis,* nakon izloženosti AgNP obloženim poli-alilaminom (PAAm-AgNP). Upotrebom TEM-a primijećene su nakupine PAAm-AgNP u coelomocitnim sinusima (engl. *coelomic sinuses,* dijelu imunološkog sustava ježinca), dok su metamorfne larve već imale nanočestice rasprostranjene u različitim tkivima unutar blastocela. Nadalje, u larvama *S. droebachiensis* zamijećena je pojava dviju vrsta stanica kao posljedica izloženosti PAAm-AgNP koje ukazuju

na upalni mehanizam induciran srebrom. To su bile okrugle crvene stanice i natečene zelene stanice. Okrugle crvene stanice zamijećene su uokolo nakupine nanočestica, a sudjeluju u liječenju rana u odraslih ježinaca (Tajima i sur., 2007). Upravo su takve strukture uočene i nakon tretmana embrija ježinaca u ovome radu. Naime, embriji i larve vrste *A. lixula* bili su crvene boje, vrlo vjerojatno zbog povećanja brojnosti crvenih stanica, dok su u netretiranim larvama crvene stanice bile ravnomjerno raspoređene i puno rijeđe. U vrsti *P. lividus* crvene stanice su također zamijećene u tretiranim i netratiranim larvama, međutim njihova zastupljenost bila je puno niža nego li u vrste *A. lixula*, stoga nije zamijećeno povećanje u usporedbi s netretiranim larvama. Međutim, u larvama vrste *P. lividus* nakon tretmana sa AgNP primijećeno je bubrenje larvi. Otečena područja, okružena sjajnom membranom, koja sadrže crvene granule i stanice koje titraju (engl. *vibratile-like cells*) opisali su Gilles i Pearse, 1985. godine u odraslim jedinkama ježinca *S. purpuratus* te im pripisali zaštitnu ulogu u očuvanju homeostaze organizma. Nadalje, može se pretpostaviti kako će se isti stanični obrambeni mehanizmi kao odgovor na AgNP koji se javljaju u ranim razvojnim stadijima larvi pojaviti i u odraslim jedinkama ježinaca. Naime, Magesky i sur. (2016) primijetili su pojavu crvenih stanicama u pre-juvenilnom stadiju razvoja larvi (do 3 mjeseca od razvoja larvi) kao odgovor na AgNP, dok su u post-larvalnim stadijima iste jedva uočene kao odgovor na AgNP. Međutim, kako se razvoj nastavlja okrugle, crvene stanice počinju se ponovno pojavljivati u post-metamorfnim stadijima razvoja ježinca.

Nadalje, u ovome je radu ispitan utjecaj **vremena kada su embriji ježinaca prvi puta došli u doticaj s nanočesticama**. Odnosno, koji je trenutak embrionalnoh razvoja ježinaca najosjetljiviji na AgNP. Ježinci su stoga bili izloženi AgNP u različitim razvojnim stadijima. Odabrana vremena doziranja nanočestica prethodno su utvrđena za svaku vrstu ježinca u preliminarnom eksperimentu u kojemu su bez tretmana sa zagađivalom ustanovljeni kritični stadiji razvoja (opisani u poglavlju 4.4.4. Materijala i Metoda). Najizraženiji negativan učinak na embrionalni razvoj vrste *A. lixula* javio se nakon tretmana sa AgNP 24 h nakon oplodnje, u fazi kasne gastrule kada je zapaženo svega 22% normalno razvijenih larvi. Naime, u svim ostalim vremenima dodavanja AgNP zamijećeno je duplo više normalno razvijenih larvi nakon 48 h. Prema tome, može se zaključiti kako je stadij gastrule najosjetljiviji trenutak u razvoju ježinca *A. lixula* u okolišu u kojem su prisutne AgNP. Naime, upravo u stadiju gastrule intenzivno se razvija gastrointestinalni sustav, koji bi mogao predstavljati glavni kanal ulaska nanočestica u organizam. S druge strane, rezultati su bili drugačiji u ježinaca *P.*

lividus i *S. granularis*, gdje se pokazalo kako je najosjetljiviji trenutak dodavanja AgNP bio 30 min nakon oplodnje. Nadalje, usporedbom rezultata tretiranja sa AgNP 30 min nakon oplodnje spomenutih dviju vrsta ježinaca dolazi se do zaključka kako je vrsta *P. lividus* manje osjetljiva na AgNP u usporedbi s vrstom *S. granularis*, što govori u prilog selektivne propusnosti i jače **zaštitne uloge fertilizacijske membrane** jedne vrste u odnosu na drugu (Hamdoun i sur., 2004). Zaštitna uloga fertilizacijske mebrane primijećena je u još jednome istraživanju u ovome radu. Naime, tretman embrija ježinaca s ionima Ag^+ 30 min i 2 h nakon oplodnje dao je različite rezultate. U oba ispitivana vremena tretiranja embrija već najniže koncentracije iona izazvale su porast broja zaostalih larvi, međutim tretman s ionima dodanima 30 min nakon oplodnje nije uzrokovalo potpuni zastoj embrionalnog razvoja ježinca u usporedbi s tretmanom od 2 h nakon oplodnje, kada dolazi do potpune blokade embrionalnog razvoja. Naime, u ovome slučaju broj zaostalih larvi u tretmanu s ionima Ag^+ od 2 h nakon oplodnje bio je dva puta veći u usporedbi s tretmanom od 30 min nakon oplodnje. Spomenuti rezultati ne mogu se objasniti samo zaštitnom ulogom fertilizacijske membrane budući je ona prisutna sve do ~12 sati nakon oplodnje, tj. do stadija kasne blastule. Već je prethodno spomenuto (u Uvodnome dijelu, poglavlje 1.3.) kako je vrijeme od 2 h nakon oplodnje naročito osjetljivo u embrionalnom razvoju ježinaca zbog intenzivne diobe te prve diferencijacije stanica. Osim toga, 2 h nakon oplodnje embrij ježinca nalazi se u stadiju od nekoliko stanica po embriju (od 4 − 16 stanica po embriju), za koje je moguće pretpostaviti da mogu inducirati programiranu staničnu smrt – apoptozu. Upravo su to primijetili Vega i Epel (2004) prateći embrionalni razvoj ježinca vrste *S. purpuratus*, nakon izlaganja embrija raznim kemikalijama (emetinu, inhibitoru sinteze proteini i etopozidu, inhibitoru topoizomeraze II). Da je razvojni stadij važan za toksični učinak AgNP utvrđeno je i u nekim drugim organizmima. Tako su Tyne i sur. (2015) došli do zaključka kako stupanj toksičnosti 8 nm-AgNP u obliću *Caenorhabditis elegans* ovisi o razvojnom stadiju embrija koji je prvotno izložen nanočesticama. Naime, razvoj oblića bio je najmanje osjetljiv ukoliko su AgNP dodane 7 − 9 dana nakon izlijeganja larvi. Rezultati istraživanja Nørgaard Sørensen i Baun (2015) pokazali su da je ishod testiranja toksičnosti AgNP na slatkovodnoj zelenoj algi *Pseudokirchneriella subcapitata* bio pod utjecajem ne samo vremena trajanja eksperimenta, već i trenutka kada su AgNP dodane u ispitivani medij. Znanstvenici su zatim predložili kako se upravo vrijeme kada organizam dođe u doticaj sa zagađivalom mora uzeti u obzir prilikom razvijanja protokola za testiranje ekotoksičnosti raznih nanočestica.

Do danas još uvijek nije utvrđeno može li se **toksičnost AgNP pripisati otpuštanju iona Ag^+** s njihove površine ili je mehanizam njihove toksičnosti u potpunosti različit od djelovanja srebrnih iona. Naime, u rezultatima testa SUEDT u ovome radu pokazano je da je ionski oblik srebra djelomično odgovoran za toksičnost AgNP na embrionalnom razvoju ježinaca. Međutim, nije jasno koliki učinak se može pripisati djelovanju nano-oblika srebra, a koji pripada učinku iona Ag^+. Naime, ICP-MS analizom ustanovljeno da s vremenom (kroz 48 h) dolazi do tek neznatnog povećanja postotka iona Ag^+ u suspenziji AgNP (Slika 19). Do istog su zaključka došli i Borges i sur. 2002. godine pri ispitivanju učinka AgNP na ježincu *S. neumayeri*. Naime, znanstvenici su u spomenutom sitraživanju zaključili da se svega 10% ukupne mase AgNP u konačnici (isto tako nakon 48 h) nalazi u ionskom obliku. Što znači da pri jednakoj količini (koncentraciji) ionskog srebra ili srebrnih nanočestica, uzorak koji sadrži nanočestice, sadrži barem 10 puta manje iona nego uzorak koji se sastoji samo od iona. Međutim, neovisno o značajno nižoj koncentraciji iona u suspenziji nanočestica u suporedbi s otopinom srebrnih iona, postavlja se pitanje je li i u kojoj mjeri toksični učinak na embrionalni razvoj ježinaca posljedica djelovanja nanočestica i/ili iona koji se otpuštaju s vremenom s njihove površine. U mnogobrojnim je istraživanjima do danas ustanovljeno kako AgNP posjeduju mogućnost unosa u razne vodene organizme (posebice ribe: *Perca fluviatilis, D. rerio, O. mykiss, O. latipes*) te u stanicama dolazi do otpuštanja iona Ag^+ nakon čega dolazi do pro-oksidativnih i pro-upalnih procesa (Lapresta-Fernández i sur., 2012). Uz to, poznato je kako se akutna toksičnost iona Ag^+ za morske beskralježnjake ogleda u inhibiciji Na^+, K^+ -ATPaze u epitelnim stanicama škrga te oštećenjima u regulaciji vode i iona na staničnoj razini (Bianchini i sur., 2005). Iz navedenih primjera može se zaključiti da bi ioni srebra mogli u značajnoj mjeri doprinjeti toksičnom učinku samih nanočestica. No, u ovom radu pokazalo se da su AgNP toksičnije na embrije ježinca u usporedbi s jednakom količinom iona Ag^+. Do sličnih su rezultata došli i Šiller i sur. (2013) kada su usporedili toksičnost iona Ag^+ i AgNP te ustanovili da jači negativan učinak na embrionalni razvoj ježinca imaju AgNP. Ringwood i sur. (2010) isto tako zamijetili su štetan učinak AgNP na embrionalnom razvoju kamenice *Crasosstrea virginica*, iako toksičnost nisu pripisali isključivo AgNP već i ionima Ag^+. Ivask i sur. (2014) veću toksičnost 10 nm-AgNP u usporedbi s ionima Ag^+ na stanicama bakterije *E. coli* pripisali su većoj biodostupnosti i lakšoj internalizaciji nanočestica u usporedbi s ionima srebra. Nadalje, AgNP obložene glukozom pokazale su isto tako višu embriotoksičnost na ježincu *P. lividus* u usporedbi s ionima Ag^+ (Mano i sur., 2013). Naime, znanstvenici su u ovom istraživanju utvrdili kako su AgNP obložene glukozom najprikladnije

pri ispitivanju toksičnog učinka istih na vodenim organizmima budući da su citratom-obložene AgNP nestabilne i pri višoj koncentraciji soli u okolnome mediju dolazi do njihovg otapanja i otpuštanja iona Ag^+. Dakle, potrebno je voditi računa u kojoj mjeri omotač, dodan na površinu nanočestic,a djeluje na organizam budući da on prvi stupa u kontakt s jedinkom. Suprotno prethodno spomenutim istraživanjima, Magesky i Pelletier (2015) dokazali su veći toksični učinak iona Ag^+ naspram PAAm-AgNP na ranom razvojnom stadiju ježinca *S. droebachiensis* i to pripisali odumiranju stanica (nekrozi) do koje dolazi uslijed izloženosti ionima, ali ne i nanočesticama.

Nanotehnologija se temelji na svojstvima čestica koja ovise o njihovoj veličini u rasponu od 1 do 100 nm. Međutim, odnos između **veličine čestica i bioloških učinaka** još uvijek nije u potpunosti jasan. U nekoliko je istraživanja do danas već uočeno kako veličina nanočestica predstavlja još jedan čimbenik koji može značajno utjecati na njihov biološki učinak. Prilikom ispitivanja učinka AgNP različitih veličina na embrionalni razvoj ježinaca odabrane su dvije vrste ježinca *A. lixula* i *P. lividus*, budući se u prethodnim eksperimentima ovog rada vrsta *A. lixula* pokazala najosjetljivijom dok je ježinac *P. lividus* bio najmanje osjetljiv na učinak AgNP. Nadalje, odabrano je vrijeme tretmana s nanočesticama od 2 h nakon oplodnje kada je, kako je već prethodno ustanovljeno, embrij ježinca vrlo osjetljiv i nalazi se u intenzivnoj diobi od 4 − 8 stanica po embriju. Nakon tretiranja zigote ježinca sa AgNP različitih veličina utvrđeno je da su čestice manjeg promjera (10 i 20 nm) toksičnije od onih većih dimenzija (40, 60 i 100 nm). Naime, broj embrija s kompletnim zastojem u razvoju bio je obrnuto proporcionalan promjeru čestica. Do sličnog zaključka došli su Fujiwara i sur. (2008) i Passagne i sur. (2012). Naime, oni su otkrili kako je učinak SiO_2-NP na bioti (algi *Chlorella kessleri* i ljudskoj staničnoj liniji bubrega) ovisan o veličini nanočestica. Pritom su se nanočestice veličine od 5 do 26 nm pokazale toksičnijima u usporedbi s onima većeg promjera (78 i 100 nm SiO_2 NP). Naime, nanočestice većih dimenzija inducirale su povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima (CAT, GST) zbog čega je moguće da su rezultirale manjom toksičnošću (Passagne i sur., 2012). U istraživanjima ovog rada AgNP veličine 60 i 100 nm nisu izazvale kompletan zastoj u embrionalnome razvoju niti pri najvišim ispitivanim koncentracijama, možda upravo zbog povećanja aktivnosti antioksidacijskih enzima kako su ustanovili Passagne i sur. (2012). Osim toga, veće AgNP sporije otpuštaju ione sa svoje površine u usporedbi s onima manjih dimenzija, što može imati važnu ulogu pri određivanju ukupne toksičnosti na ispitivani organizam (Van Aerle i sur., 2013). Nadalje, AgNP

aglomeriraju u trenutku kada se nađu u mediju visoke ionske jakosti, pri čemu AgNP od 60 i 100 nm stvaraju puno veće nakupine od onih manjih dimenzija, budući su same većeg promjera; stoga je moguće da je unos u embrij ježinca otežan ili u potpunosti onemogućen. Još jedan razlog slabije toksičnosti AgNP većih dimenzija može biti činjenica da ih embriji mogu odstraniti iz organizma mehanizmom olakšanog transporta većih agregata iz stanica, poput primjerice proteina transportera za izbacivanje stranih tvari iz stanice (engl. *multi xenobiotic resistance proteins,* proteini-MXR ili transporteri ABC). Naime, već je prethodno ustanovljeno kako bi jedan od potencijalnih načina djelovanja nanočestica na organizme moglo biti njihovo vezanje na proteine stanične membrane koji su odgovoreni za izbacivanje ksenobiotika iz stanica (Pinsino i sur., 2015). Ovakvi rezultati u skladu su i s rezultatima Choi i sur. (2015) koji su otkrili kako se AgNP manjih promjera (50 nm) dulje vrijeme zadržavaju u tijelu endemičke jezerske mušice *Glyptotendipes tokunagai*, dok su čestice većih dimenzija (100 i 150 nm) bile unesene i izbačene iz organizma relativno brzo. Slično tome, Jimeno-Romero i sur. (2017b) dokazali su mikroanalizom X-zrakama kako se AuNP veličine 5 nm nakupljaju u endolizosomima probavne žlijezde dagnje *M. galloprovicialis* u većoj količini u usporedbi s 40 nm-AuNP. Ovisnost učinka citratom obloženih AgNP o primjenjenoj veličini (10, 20, 40, 60 i 80 nm) primijetili su i Ivask i sur. (2014) i to na različitim organizmima/stanicama koje se često koriste u toksikološkim ispitivanjima (bakteriji, kvascu i algi te stanicama rakova *in vitro*). U spomenutom je istraživanju otkriveno kako su 10 nm-AgNP lakše stupale u kontakt sa stanicama bakterije *E. coli*, što je rezultiralo višom unutarstaničnom bioraspoloživosti srebra u usporedbi s česticama većih dimenzija. Farkat i sur. (2011) otkrili su kako se manje AgNP (10 – 40 nm) omotane PVP-om lakše prenose između pojedinih staničnih slojeva škrga kalifornijske pastrve *O. mykiss* u usporedbi s nešto većim AgNP (~100 nm). Nadalje, u istraživanjima Jimeno-Romera i sur. (2017a) te Bouallegui i sur. (2017) na hemocitama dagnje *M. galloprovincialis* potvrđen je toksičniji učinak AgNP manjih veličina, kao i u testu SUEDT ovoga rada. Usporedbom rezultata ovoga rada s rezultatima studije Šillera i sur. (2013) može se potvrditi reproducibilnost testa SUEDT na vrsti *P. lividus*. Naime, u spomenutom istraživanju ustanovljeno je da citratom obložene AgNP veličine 5 – 35 nm uzrokuju zaostatak u razvoju, asimetriju u tijelu, kraće „ruke“ te promjene u kretanju larvi pri koncentraciji od ~300 μg l^{-1} AgNP. Ti su rezultati vrlo slični onima dobivenima nakon izlaganja zigota istog ježinca 2 h nakon oplodnje koncentraciji od 500 μg l^{-1} komercijalnim citratom obloženim AgNP veličine 10, 20 i 40 nm. Nadalje, koncentracija od 50 μg l^{-1} 10, 20 i 40 nm-AgNP nije uzrokovala nikakvu promjenu u

embrionalnome razvoju ježinca što je u skladu s rezultatima Šillera i sur. (2013) za 30 µg l^{-1} 5 – 35 nm-AgNP.

Jednom kada dospiju u morski okoliš AgNP mogu stupiti u interakciju, ne samo sa zigotom, već i s gametama koje ježinci ispuštaju u vodeni okoliš. Upravo iz tog razloga ispitan je **učinak AgNP na spermu** ježinca, pri čemu je istražena uspješnost oplodnje sperme tretirane s različitim veličinama AgNP te kvaliteta potomstva. Rezultati ovih istraživanja pokazali su kako AgNP, neovisno o veličini, ne djeluju negativno na uspješnost oplodnje jajnih stanica spermom tretiranom 1 h sa AgNP u ježincima *A. lixula* i *P. lividus*. Isti rezultat dobili su Gambardella i sur. (2015a) nakon izlaganja sperme ježinca *P. lividus* 1 – 10 nm-AgNP. Nadalje, Mano i sur. (2013) primijetili su da dodavanje AgNP u medij s gametama istog ježinca ne ometa uspješnost oplodnje, međutim posljedično ipak dolazi do perturbacija prilikom nastajanja fertilizacijske membrane i asimetrične diobe embrija, a u manjoj mjeri i do izostanka diobe. Suprotno ovim rezultatima, ugljikove nanočestice (nanočestice grafenova oksida i crnog ugljika), zbog fizičke interakcije između ugljikovog nanomaterijala i sperme, znatno su smanjile uspješnost oplodnje tretirane sperme u ježinca *P. lividus* (Mesarič i sur., 2015). Nadalje, u istraživanjima ove disertacije utvrđeno je da **tretman sperme** ježinaca s ionima Ag^{+} uzrokuje 100% neuspjelu oplodnju, što ukazuje na veću toksičnost jednake koncentracije srebrnih iona naspram AgNP. To se moglo pretpostaviti budući je u suspenziji AgNP prisutna 10 puta manja koncentracija iona Ag^{+} u usporedbi s koncentracijom iona Ag^{+} u otopini $AgNO_3$. Ukoliko su srebrni ioni odgovorni za toksičnost AgNP, kao što to jest moguće u ovome slučaju, nije iznenađujući rezultat da koncentracija od 500 i 1000 µg l^{-1} AgNP ne pokazuje toksičnost, dok je toksičnost značajna pri istoj koncentraciji otopine srebrnih iona. Suprotno tome, pri nižim koncentracijama iona Ag^{+} od 1 i 10 µg l^{-1} uočena je uspješna oplodnja kod obje vrste ježinacai uspješno dosezanje pluteus faze nakon 48 h.

Sljedeći parametar koji se koristio kako bi se ispitao učinak AgNP bila je **kvaliteta potomstva nakon tretiranja sperme ježinca**. Nakon tretmana sperme ježinca *A. lixula* s 10 nm-AgNP nije došlo do promjene u kvaliteti razvijenih larvi, dok je to ipak bio slučaj sa svim ostalim ispitivanim veličinama čestica. Moguće je da niže koncentracije 10 nm-AgNP (od 1 – 100 µg l^{-1}) nisu bile prenesene putem sperme u jajnu stanicu ili pak jajna stanica, odnosno zigota, posjeduje mehanizam obrane od istih (primjerice egzocitozom, ili prijenosom uz pomoć proteina transportera). Nadalje, prilikom ispitivanja učinka viših koncentracija 10 nm-AgNP (500 i 1000 µg l^{-1}) moguće je da je došlo do njihove aglomeracije te su se u okolini

sperme nalazile čestice većih promjera koje su djelovale na sličan način kao i one većih dimenzija (od 20 – 100 nm). Moguće je da su takve čestice bile uspješno prenesene u jajnu stanicu putem sperme te ispoljile svoj negativan učinak na daljnji embrionalni razvoj. Rezultati dobiveni na najvišim koncentracijama, neovisno o veličini AgNP, bili su vrlo slični. Moguće je da se nanočestice vežu na ili ulaze u spermije i ne ometaju njihov ulaz u jajne stanice (kao što je utvrđeno u prethodnom testu, ne utječu na uspješnost oplodnje), ali kasnije se nalaze unutar zigote te ometaju daljnji razvoj embrija i smanjuju uspješnost dosezanja stadija larvi nakon 48 h. Dakle, AgNP neovisno o veličini, pokazale su se umjereno toksičnma na spermu ježinca *A. lixula* i to na način da ne utječu na uspješnost oplodnje, ali posljedično dolazi do zastoja u razvoju larvi. Ova je pretpostavka u skladu s opažanjima Yoisungnern i sur. (2017), koji su primijetili internalizaciju 40 nm-AgNP unutar spermatozoida miša nakon čega je uslijedila smanjena sposobnost oplodnje te niži postotak normalno razvijenih embrija. Suprotno ovim rezultatima, nakon oplodnje jajnih stanica ježinca *P. lividus* sa spermijama tretiranim sa AgNP, kvaliteta razvijenih larvi bila je jednaka netretiranom uzorku. Dakle, tretman spermija ježinca *P. lividus* sa AgNP nije utjecao na uspješnost oplodnje, niti posljedično na kvalitetu razvoja larvi. To je još jedan primjer razlike između dviju odabranih vrsta ježinaca gdje se vrsta *A. lixula* potvrdila osjetljivijom na utjecaj AgNP. Ipak, suprotno rezultatima ovog rada, gdje AgNP nisu štetno djelovale na razvoj larvi ježinca *P. lividus*, Gambardella i sur. (2015a) otkrili su kako AgNP veličine 1 – 10 nm štetno djeluju na razvoj larvi ježinca *P. lividus*, nakon izlaganja muških gameta u koncentracijskom rasponu AgNP od 0.1 – 1000 μg l^{-1}. Međutim, u spomenutom istraživanju embriji su fiksirani u paraformaldehidu nakon 24 i 72 h te je rađena imunohistokemijska analiza (Western blot) larvi, dakle nije rađen test SUEDT u cijelosti sa završnim stadijem brojanja larvi nakon 48 h. Osim toga, larve su inkubirane na 18 °C, kroz 72 h, dok su u ovome radu embriji ježinaca *P. lividus* inkubirani kroz 48 h na 20 °C. Moguće je da je kod spomenutog istraživanja i niža temperatura doprinijela slabijem razvoju larvi. Naime, tijekom brojnih preliminarnih eksperimenata, provedenih u ovoj doktorskoj disertaciji, primijećeno je da je temperatura od 20 °C najpogodnija za embrionalni razvoj ježinaca *A. lixula* i *P. lividus*. U nekoliko eksperimenata kada je došlo do slučajnog pada temperature za svega nekoliko stupnjeva isti je morao biti ponovljen jer kontrolni uzorci nisu bili uspješni, odnosno netretirani embriji nisu dosegli stadij larvinakon 48 h. Nadalje, tretman sperme ježinaca sa AgNP nije uzrokovao promjenu u postotku nerazvijenih embrija. Iz navedenog se može zaključiti kako tretman sperme ježinaca sa AgNP ne blokira razvoj embrija, već je moguće da ga samo usporava te se

nakon 48 h javlja određeni postotak zaostalih larvi (a ne i nerazvijeni embriji). Te zaostale larve mogle bi se možda i razviti do stadija normalnih larvi ukoliko bi se produljio vrijeme odvijanja eksperimenta. Naime, u tom slučaju moglo bi se pratiti dolazi li do otklanjanja štetnog učinka AgNP na larve kroz vrijeme dulje od 48 h. Također, moguće je i da embriji posjeduju određeni mehanizam izbacivanja AgNP postepeno s vremenom, nešto poput prethodno spomenutih proteina MXR.

U ovome radu ustanovljeno štetno djelovanje AgNP na embrionalni razvoj triju vrsta ježinaca i pri tom je vrsta *A. lixula* pokazala najveću osjetljivost. Upravo iz spomenutih razloga, za istraživanje **citogenetičkog učinka** AgNP odabran je ježinac *A. lixula*. Potrebno je istaknuti kako je literatura na ovu temu dosta oskudna, posebice za vodene organizme. Nekoliko studija pokazalo je citotoksičnost i genotoksičnost AgNP (AshaRani i sur., 2009; Foldbjerg i sur., 2011; Asare i sur., 2012; Patlolla i sur., 2012; Li i sur., 2014), ali zaključci o njihovoj sposobnosti izazivanja oksidacijskog stresa često su proturječni i vrlo rijetko se odnose na kromosomske aberacije (Singh i sur., 2009). U ovome radu broj aberacija u stadiju morule embrija ježinca bio je manji od 1 u netretiranom uzorku, što se slaže s literaturom te ujedno ukazuje na kvalitetu eksperimenta s obzirom da kontrola ne bi smjela sadržavati aberacije tijekom mitotičke diobe (Oral i sur., 2010). Rezultati citogenetičke analize pokazuju kako AgNP ne uzrokuju značajan postotak **interfaznih embrija**, odnosno ne blokiraju diobu stanice. Najniži postotak interfaznih embrija uočen je na tretmanu s 40 nm-AgNP i ove su se nanočestice pokazale najmanje toksičnima na moruli ježinca. Klastogena i mutagena aktivnost AgNP nije dokazana niti u drugim organizama, npr. u odraslim miševima (Li i sur., 2014). U još jednom primjeru u ovome radu, u citogenetičkoj studiji učinka AgNP na embriju ježinca, potvrđena je veća toksičnost manjih nanočestica. Nadalje, prosječan **broj mitotičkih dioba** po embriju nije se značajno razlikovao od kontrole za sve veličine i raspone koncentracija AgNP. Rezultati ove disertacije pokazali su da je tretman s 10 nm-AgNP izazvao najveći porast **postotka embrija s više od jednom aberacijom po embriju** te su rezultati bili dosta slični onima dobivenima s ionima Ag^+, iako je koncentracija srebrnih iona u suspenziji AgNP bila puno niža nego li u uzorku u koji je dodana otopina $AgNO_3$. Porastom veličine ispitivanih AgNP smanjivao se postotak embrija s većim brojem aberacija. Stoga je moguće pretpostaviti da veličina AgNP utječe na razvoj embrija. Ovaj učinak mogao bi se objasniti većom koncentracijom 10 nm-AgNP u jednakom volumenu primijenjenih nanočestica te većim brojem čestica manje veličine koje su u mogućnosti otpustiti veću količinu iona Ag^+ u okoliš,

ali i unutar embrija. Dakle, i u ovome je slučaju potvrđena veća toksičnost i jači negativan učinak AgNP manjih veličina (10 nm) na moruli ježinca *A. lixula*. Huk i sur. (2014) dokazali su na humanim epitelnim stanicama karcinoma pluća jaku citotoksičnost i genotoksičnost AgNP veličine 50 nm, koje su uzrokovale oštećenja DNA direktnim kontaktom s kromatinom ili pak indirektno stvaranjem ROS-ova što je zamijećeno oksidacijom molekule DNA. Nadalje, Asharani i sur. (2009) zamijetili su citotoksičnost i genotoksičnost AgNP (veličine 6 – 20 nm) obloženih škrobom na humanoj staničnoj liniji fibroblastičnih stanica pluća i humanih glioblastoma stanica. Znanstvenici su to pripisali zaustavljanju u fazi G2 staničnog ciklusa mitoze vjerojatno zbog popravka molekule DNA nakon tretmana sa AgNP. Transmisijskom elektronskom mikroskopijom otkrivena je prisutnost AgNP unutar mitohondrija i jezgre, što direktno upućuje na njihovo ciljano djelovanje i toksičnost na mitohondrije i oštećenja mitohondrijske molekule DNA. Predložen je mogući mehanizam toksičnosti koji uključuje poremećaj u mitohondrijskom respiracijskom lancu uzrokovan od strane AgNP koji nadalje dovodi do stvaranja ROS-ova, prekida sinteze ATP-a, što pak u konačnici može dovesti do oštećenja molekule DNA. Osim toga, pretpostavlja se da je oštećenje molekule DNA povećano taloženjem i interakcijom AgNP s DNA, što dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa u G2 fazi mitoze, kako je već prethodno spomenuto.

Suprotno rezultatu dobivenom s različitim veličinama AgNP, ioni Ag^+ izazvali su smanjenje broja mitoza po embriju proporcionalno povišenju koncentracije. **Srebrni ioni** pokazali su znatno veći broj aberacija po embriju u usporedbi sa AgNP. Miura i Shinohara (2009) otkrili su također nižu citotoksičnost 5 i 10 nm-AgNP u staničnoj liniji HeLa u usporedbi s ionima Ag^+ (IC_{50} AgNP = 80 μg l^{-1} *vs* IC_{50} Ag^+ = 12 μg l^{-1}). Nadalje, **omjer metafaze i anafaze** u stanicama embrija ježinca tretiranim sa AgNP i ionima Ag^+ bio je niži nego u kontrolnom uzorku. Stoga se može zaključiti kako AgNP i ioni Ag^+ ne uzrokuju veći postotak metafaze u usporedbi s kontrolom, odnosno ne uzrokuju zastoj embrija u stadiju metafaze te nemaju izraženu toksičnost za diobeno vreteno. Dobiveni rezultati ukazuju na činjenicu kako ioni Ag^+ uzrokuju stvaranje raspršenih kromosoma, acentričnih i višestrukih fragmenata, dok AgNP uzrokuju stvaranje raspršenih kromosoma, acentričnih fragmenata i anafaznih mostova u stanicama embrija ježinca *A. lixula*. U još jednome primjeru potvrđen je različiti učinak AgNP i iona Ag^+ na embrionalnome razvoju ježinca. Stvaranje anafaznih mostova, ali i zaostalih kromosoma, nakon tretmana sa AgNP primijetili su i Daphedar i Taranath (2017) u meristemskim stanicama korijena biljke *Drimia indica*. Rezultati

istraživanja Chae i sur. (2009) na ribici *O. latipes* (engl. *Japanese medaka*) potvrdili su kako AgNP i ioni Ag^+ imaju različiti mehanizam djelovanja. Naime, u spomenutom istraživanju AgNP su uzrokovale citotoksičnost, oštećenje molekule DNA, pokazale su se kancerogenima za jetru ribe, uzrokovale su oksidacijski stres te aktivaciju gena odgovornih za detoksikaciju metala i regulaciju metabolizma. Nasuprot tome, ionsko srebro dovelo je do indukcije upalnog odgovora cijelog organizma te indukcije procesa detoksikacije metala u jetri izložene ribe, ali je rezultiralo nižim općim stresom u usporedbi sa AgNP. Suprotno ovim istraživanjima, Massarsky i sur. (2013) otkrili su sličnu citotoksičnost AgNP i iona Ag^+ te povišeni oksidacijski stres u kalifornijske pastrve. Međutim, razlikovalo se ciljano mjesto djelovanja ovih dviju oblika srebra. Naime, AgNP su uzrokovale morfološke promjene bez vidljive bioakumulacije u stanicama škrga, dok su ioni Ag^+ povećali oštećenja molekule DNA i pojačali oksidacijski stres (povećana lipidna peroksidacija i smanjena aktivnost SOD). Naime, dosadašnja istraživanja utjecaja srebra pripisivala su toksičnost isključivo njegovom ionskom obliku, međutim sve je više prihvaćeno kako oba oblika (ioni i nanočestice) mogu uzrokovati toksičnost u velikom broju organizama, iako su razlike u specifičnim mehanizmima djelovanja još uvijek nejasne. U literaturi već postoji niz istraživanja koja ukazuju na činjenicu da su srebrne nanočestice toksičnije od ionskog srebra, što je vrlo vjerojatno povezano s njihovom nano-veličinom, a u skladu je s ovdje prikazanim rezultatima.

6.3. Utjecaj srebrnih nanočestica u kombinaciji s insekticidima na enzimski sustav i proteine metalotioneine u dagnji

Nanočestice mogu biti privučene negativnim nabojem kojeg posjeduju vezivna mjesta na škrgama školjkaša nakon čega može doći do njihovog unosa u stanice (npr. pasivnom difuzijom, olakšanim transportom uz pomoć proteina nosača ili pak procesom endocitoze) (Zhang i sur., 2017). Test zadržavanja boje neutralnog crvenila (test NRRT) u hemocitama dagnji te preživljavanje dagnji na zraku (test SOS) već se dugi niz godina primijenjuju prilikom ispitivanja toksičnosti nanočestica kao pokazatelji općeg stresa organizma (Canesi i sur., 2008; Moore i sur., 2009; Tedesco i sur., 2010; Hu i sur., 2015; Katsumiti i sur., 2016). Test NRRT koristi prednost hemocita čije je osnovna uloga upravo fagocitoza (unos stranih čestica), odnosno imunološka zaštita organizma. Brojni radovi ukazuju na činjenicu kako razne nanočestice ulaze u stanice hemocita dagnje najverojatnije procesima fagocitoze ili

makro-endocitoze (Moore i sur., 2009; Katsumiti i su., 2014; Hu i sur., 2015). U ovome je radu dokazano da 60 nm-AgNP uzrokuju kraće vrijeme zadržavanja boje neutralnog crvenila u hemocitama dagnji i smanjuju njihovu sposobnost preživljavanja na zraku. Narušavanje stabilnosti lizosomalnih membrana hemocita relativno visokim koncentracijama od 100 μg l^{-1} AgNP (dviju veličina: <50 nm i <100 nm) zabilježeno je i u nedavnom istraživanju Bouallegui i sur., 2017). U spomenutom istraživanju jači negativan učinak na stanice imunološkog sustava dagnji pokazale su AgNP manje od 50 nm u usporedbi s većim česticama (<100 nm). Jimeno-Romero i sur. (2017a) ispitali su učinak različitih veličina AgNP (20, 40 i 100 nm) na dagnju *M. galloprovincialis*. U spomenutom istraživanju nakon trodnevnog izlaganja dagnji AgNP nisu dovele do smanjenja vremena preživljavanja na zraku (LT_{50}) kao obilježja općeg stresa niti pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji od 750 μg l^{-1}, dok je u istraživanjima provedenima za ovu disertaciju LT_{50} bio značajno smanjen već pri koncentraciji od 100 μg l^{-1} AgNP. Međutim, u datom istraživanju (ove disertacije) dagnje su bile izložene samo 1 dan te je moguće da su kroz to vrijeme uspjele nakupiti, ali ne i izbaciti iz organizma veću koncentraciju AgNP. Osim toga, moguće je da je razlika u zamijećenim rezultatima i posljedica različitog omotača koji je dodan na površinu AgNP. Jimeno-Romero i sur. (2017a) koristili su maltozom-stabilizirane AgNP, dok su AgNP korištene u ovome radu bile obložene citratom. Naime, Katsumiti i sur. (2016) već su prethodno dokazali veću toksičnost jednake koncentracije citratom-stabiliziranih AuNP u usporedbi s golim AuNP na hemocitama dagnje *M. galloprovincialis*.

Preliminarnim istraživanjima korištenjem testova SOS i NRRT utvrđeno je da 60 nm-AgNP u koncentraciji od 1 i 10 μg l^{-1}, ne uzrokuju stres u dagnji. Stoga je niža odabrana koncentracija za kombinirani tretman dagnji s nanočesticama i insekticidima bila 5 μg l^{-1}. S druge strane, koncentracije od 50 i 100 μg l^{-1} AgNP dovele su do smanjenja vremena preživljavanja dagnji na zraku te destabilizacije membrana lizosoma hemocita, što znači da AgNP u navedenim koncentracijama izazivaju opći stres u ovim školjkašima. Stoga je za višu koncentraciju odabrano 50 μg l^{-1} AgNP kako bi se moglo uočiti smanjenje negativnog učinka AgNP (ukoliko do njega dođe) nakon dodatka insekticida. Nadalje, za ispitivanje kombiniranog učinka AgNP s piretroidnim insekticidima odabrani su **cipermetrin i deltametrin** koji predstavljaju djelatnu tvar raznih komercijalnih pripravaka učestalo korištenih za suzbijanje insekata (posebice komaraca i moljaca), ali i ribljih parazita (pri uzgoju lososa u akvakulturi). Upravo iz tog razloga važno je ispitati njihov učinak na vodenim organizmima. Naime, potrebno je istaknuti kako su istraživanja provedena u cilju ispitivanja

učinka cipermetrina i deltametrina na vodenim organizmima vrlo oskudna. Naime, cipermetrin je na hrvatskome tržištu dostupan pod tržišnim nazivom „Aquacyp“, koji sadrži 100 g cipermetrina po litri. Za primjenu se koristi radna otopina priređena razrjeđivanjem 100 ml komercijalnog pripravka u 10 l vode (100x razrjeđenje) te je djelatna tvar cipermetrin u takvoj otopini prisutna u koncentraciji od 1 g l^{-1}. „Deltasect“ je tržišni naziv pesticida koji kao djelatnu tvar sadrži deltametrin te se radna otopina isto tako razrijeđuje 100 puta kod primjene i to 50 ml komercijalnog pripravka u 5 l vode te je djelatna tvar deltametrin u takvoj otopini prisutana u koncentraciji 0.24 g l^{-1}. Do danas postoji svega nekoliko znanstvenih istraživanja koja su se bavila proučavanjem učinka piretroidnih insekticida cipermetrina i deltametrina na školjkašima. Koncentracije cipermetrina odabrane za ovo istraživanje slijedile su iz objavljenih rezultata ranijih istraživanja i iznosile 1 i 100 µg l^{-1}. Naime, rezultati ispitivanja utjecaja cipermetrina na dagnji *M. galloprovincialis* pokazali su kako je najniža koncentracija koja uzrokuje smanjenje vremena otvorenosti dagnji 100 µg l^{-1} cipermetrina, dok je produljeno vrijeme zatvorenosti ljuštura dagnje uočeno i pri tretmanu s 400 i 800 µg l^{-1} cipermetrina (Ayad i sur., 2011). Nadalje, Gowland i sur. (2002) otkrili kako dagnje *M. edulis* zatvaraju svoje ljušture nakon jednosatne izloženosti cipermetrinu koncentracije od 1000 µg l^{-1}. Znanstvenici su iz navedenog zaključili kako koncentracije koje se ciljano ispuštaju u okolinu kaveza s ribama s ciljem suzbijanja rasta mikroorganizama (konačne koncentracije cipermetrina od 5 µg l^{-1}) ne bi trebale imati negativnih posljedica na dagnje. U jednome istraživanju cipermetrin je pronađen u dagnjama *Mytilus californianus* koje naseljavaju obalu južne Kalifornije u koncentraciji od 1.19 do 6.15 ng/g mokre težine dagnje dok se njegova kocnentracija u sedimentu kretala između 0.04 i 1.95 ng/g suhe težine sedimeta (Hernández-Guzmán i sur., 2017). Visoku toksičnost (LC_{50} = 5 µg cipermetrina/ kg suhog sedimenta) primijetili su Mayor i sur. (2008) u istraživanjima na bentičkom račiću *Corophium volutator*. Odabrane koncentracije deltametrina isto tako slijedile su iz objavljenih istraživanja i iznosile 0.5 i 50 µg l^{-1}. Kontreczky i sur. (1995) godine ispitali su učinak deltametrina na slatkovodnom školjkašu bezupki *Anodonta cygnea* i utvrdili da koncentracija od 1 i 5 µg l^{-1} deltametrina nakon izlaganja 30 min uzrokuje povećanje vremena otvorenosti ljuštura školjke, dok koncentracija od 10 do 50 µg l^{-1} dovodi do znatnog smanjenja istog. U dugotrajnijem, sedmodnevnom eksperimentu zabilježena je pak inhibicija filtracijske aktivnosti školjke isto tako pri koncentracijama od 10 - 50 µg l^{-1}, dok koncentracija od 1 µg l^{-1} deltametrina nije pokazala negativan učinak. Nadalje, povišenje koncentracije deltametrina u rasponu od 25 do 1600 µg l^{-1} dovelo je do porasta oksidativnog stresa (povišenje peroksidacije lipida, smanjenja

aktivnosti GST i katalaze, CAT) u probavnoj žlijezdi slatkovodnog školjkaša *U. elongatulus eucirrus* (Köprücü i sur., 2008). Medutim, deltametrin u vrlo niskoj koncentraciji od 0.1 µg l^{-1} negativno je utjecao na imunološki sustav te uzrokovao smanjenje hepato-somatskog indeksa u ribe komarče (*Sparus aurata* L.) (Guardiola i sur., 2014). U konačnici, nakon opsežnog pregleda literature, za ispitivanja kombiniranog učinka AgNP i piretroida odabrane koncentracije cipermetrina bile su 1 i 100 µg l^{-1} te nešto niže za deltametrin (0.5 i 50 µg l^{-1}). U oba slučaja niža koncentracija insekticida predstavljala je onu za koju ni u kojem prethodnom istraživanju nije bio dokazan toksini učinak, dok je viša koncentracija u većini slučaja imala određeni negativan učinak na ispitivani organizam. Važno je istaknuti kako su odabrane koncentracije dvaju ispitivanih insekticida daleko niže od njihovih radnih otopina koje se primjenjuju u poljoprivredi. Dakle, koncentracije koje su korištene tijekom istraživanja jesu relevantne po okoliš i velika je mogućnost da se iste u njemu pronađu.

Biološki učinak piretroidnih insekticida zasebno te u kombinaciji sa 60 nm-AgNP određen je praćenjem aktivnosti dvaju enzima u škrgama dagnji (AChE i GST) te određivanjem koncentracije proteina metalotioneina (MT) u probavnoj žlijezdi dagnje. Zamućenje vode zamijećeno je u bazenima u kojima su dagnje bile tretirane s 50 µg l^{-1} AgNP (zasebno ili u kombinaciji s pesticidima). Do zamućenja je došlo uslijed ispuštanja gameta do kojeg dolazi zbog stresa nakon izloženosti nanočesticama, međutim **aktivnost AChE** u škrgama dagnji izloženima samo srebrnim nanočesticama nije bila promijenjena. Izostanak inhibicije AChE primijetili su i Hidouri i sur. (2017) nakon kroničnog izlaganja školjkaša *Ruditapes decussatus* AgNP u trajanju od 30 dana. Naime, moguće je da organizam jednom kad osjeti prisutnost zagađivala, u ovome slučaju AgNP, aktivira druge obrambene mehanizme oksidacijskog stresa (enzime CAT, GST i glutation reduktazu) kako bi zaštitio dublje i važnije sustave (enzime), a AChE je jedan od njih. Suprotno tome, Zhang i sur. (2017) primijetili su značajnu inhibiciju AChE i to za 54.2% nakon četverodnevne izloženosti školjkaša *Ruditapes philippinarum* 10 µg l^{-1} AgNP. Međutim, u spomenutom je istraživanju veličina AgNP bila ~9.2 nm, dok su AgNP korištene u ispitivanju učinka na dagnji u ovome radu bile veličine ~60 nm. Naime, u testovima SUEDT koji su provedeni u ovoj disertaciji ustanovljeno je kako veličina nanočestica može utjecati na njihov konačni učinak te pritom manje čestice ispoljavaju jači negativan učinak na ispitivani organizam. Do smanjenja aktivnosti eritrocitne AChE došlo je i nakon izlaganja odrasle zebrice 25 – 100 nm-AgNP (koncentracije 16.76 mg l^{-1}) (Katuli i sur., 2014), a inhibicija AChE ovisila je o primijenjenoj koncentraciji 1 – 20 nm-AgNP (10 – 100 mg l^{-1}) na razvojnom stadiju gastrule zebrice

(Myrzakhanova i sur., 2013). Suprotno ovim sitraživanjima Ulm i sur. (2015) primijetili su jaču aktivnost AChE nakon izlaganja račića *D. magne* AgNP koncentracije 0.05 mg l^{-1}. Pojačanu aktivnost AChE znanstvenici, objašnjavaju na dva načina: 1) srebro se, u nano ili ionskom obliku, veže na aktivno mjesto enzima što u konačnici dovodi do njegove jače aktivnosti ili 2) sinteza enzima *de novo* slijedi kao odgovor na prvotnu inhibiciju uzrokovanu prisutstvom nanočestica.

Nadalje, piretroidi u vodenom okruženju moduliraju koncentraciju acetilkolina (neuroprijenosnika), a budući da enzim AChE izvodi hidrolizu neurotransmitera acetilkolina u sinaptičkoj pukotini centralnog i perifernog živčanog sustava, određivanje njegove aktivnosti predstavlja pokazatelj štetnog djelovanja ovih pesticida (Sturm i sur., 2007; Khazri i sur., 2016). Upravo iz tog razloga bilo je važno ispitati aktivnost enzima AChE uslijed tretmana dagnje s cipermetrinom i deltametrinom, odnosno njihovim kombinacijama sa AgNP. Viša koncentracija obaju insekticida (100 µg l^{-1} cipermetrina i 50 µg l^{-1} deltametrina) nakon četverodnevne izloženosti dagnji izazvala je značajnu inhibiciju AChE u škrgama dagnji. Acetilkolinesteraza bila je isto tako inhibirana nakon četverodnevnog izlaganja slatkovodnog školjkaša *U. gibbus* cipermetrinu koncetracije od 100 i 150 µg l^{-1} (Khazri i sur., 2016). U istome je istraživanju uočena pojava oksidacijskog stresa u školjkaša: smanjenje razine reduciranog oblika glutationa, povećanje koncentracije produkata peroksidacije lipida (malondialdehida) te povećanje aktivnosti antioksidacijskih enzima (SOD i CAT). Znatno smanjenje aktivnosti AChE primijećeno je i nakon tretmana s 20.1 – 161.3 ng l^{-1} deltametrina u vodenbuhi *D. magna* (Toumi i sur., 2015), a do vrlo jake inhibicije AChE došlo je i nakon izlaganja tigraste kozice *Penaeus monodon* 0.1 µg l^{-1} deltametrinu (Tu i sur., 2012). Khazri i sur. (2016) pretpostavljaju kako do inhibicije AChE uslijed izloženosti cipermetrinu dolazi zbog stvaranja hidrofobnih veza cipermetrina s aromatskim aminokiselinama na površini enzima AChE. Suprotno tome, Sellami i sur. (2014) nisu primijetili inhibiciju aktivnosti AChE nakon petodnevne izloženosti mediteranskog školjkaša *R. decussatus* permetrinu, isto tako piretroidnom insekticidu, u koncentraciji od 16.66 – 55.61 µg l^{-1}. Međutim, izloženost školjkaša koncentraciji permetrina od 16.66 µg l^{-1} dovela je do smanjenja aktivnosti AChE za 8% nakon 10 dana, odnosno za 61% nakon 25 dana izloženosti. Naime, permetrin je sintetski insekticid treće generacije, poput cipermetrina i deltametrina, a smatra se uz cipermetrin, najčešće korištenim piretroidnim insekticidom (Ayad i sur., 2010; Sellami i sur., 2014). Zaključno, značajno smanjenje aktivnosti AChE nakon 48 sati izloženosti vodenbuhi (Toumi i sur., 2015), četverodnevne izloženosti dagnji *M. galloprovincialis* (rezultati ove disertacije) i

školjkaša *U. gibbus* (Khazri i su., 2016) deltametrinu i cipermetrinu, ukazuje na činjenicu kako bi se inhibicija AChE mogla primjeniti kao biomarker izloženosti pri ispitivanju učinka piretroidnih insekticida na vodenim organizmima. Ovi rezultati također govore u prilog tvrdnjama da se AChE može smatrati nespecifičnim biomarkerom, budući je inhibicija aktivnosti ovog enzima utvrđena i nakon izlaganja metalima i određenim organskim spojevima (Kopecka-Pilarczyk, 2010; Dondero i sur., 2011; Chalkiadaki i sur., 2014; Perić i sur., 2017). U konačnici izlaganje dagnji kombinaciji obaju ineskticida (cipermetrina i deltametrina) sa AgNP dovelo je do inhibicije AChE koja je bila značajno izražena čak i pri nižim koncentracijama nanočestica i/ili piretroida. Ovakav rezultat ukazuje na višu toksičnost smjese dvaju ispitivanih zagađivala. Naime, cipermetrin posjeduje dva iona klora u svojoj kemijskoj strukturi, stoga je moguće da dolazi do bržeg procesa oksidativnog otapanja AgNP, te posljedično više koncentracije iona Ag^{+} u otopini, za koje je već ustanovljena visoka toksičnost na vodene organizme.

Kombinirani učinak piretroidnih insekticida i AgNP ispitana je i određivanjem **aktivnosti enzima GST** u škrgama dagnje. Aktivnost enzima GST bila je znatno povišena nakon četverodnevne izloženosti dagnji s 50 µg l^{-1} AgNP, vrlo vjerojatno kao posljedica stvaranja slobodnih radikala. Sličan odgovor dobili su Zhang i sur. (2017) na školjkašu *R. philippinarum* isto tako nakon 4 dana izloženosti AgNP. Naime u spomenutom istraživanju 10 µg l^{-1} AgNP izazvalo je 5 puta veću aktivnost GST u usporedbi s kontrolom, dok je u istraživanjima ovog rada tretman s 50 µg l^{-1} AgNP rezultirao aktivnošću 1.5 puta većom nego u kontrolnom tretmanu. Nadalje, izlaganje slatkovodnog školjkaša *Sphaerium corneum* koncentraciji AgNP od 5 – 50 µg l^{-1} kroz 24 h dovelo je do neznatnog povišenja aktivnosti GST i to za 1.03 puta u usporedbi s kontrolom (Völker i sur., 2014), dok je ista koncentracija AgNP u dagnjama povisila aktivnost GST za vrlo sličnih 1.13 puta u usporedbi s netretiranim uzorkom (rezultati ove disertacije). Aktivnost GST bila je povišena i u školjkašu *Scrobicularia plana* nakon izloženosti koncentraciji od 10 µg l^{-1} 40 nm-AgNP (Buffet i sur., 2014). Naime, već je poznato kako srebrni ioni, koji se otpuštaju s površine nanočestice, uzrokuju disfunkciju mitohondrija, proizvodnju ROS-ova, otpuštanje pro-apoptotskih proteina iz mitohondrija, što u konačnici može dovesti do oštećenja molekule DNA i kromosomskih aberacija (Hossain i Huq, 2002; AshaRani i sur., 2008; 2009). Proizvodnja ROS-ova izaziva i povišenu aktivnost antioksidacijskih enzima, poput GST, CAT i SOD s ciljem održavanja homeostaze organizma. Aktivacija antioksidacijskih enzima vrlo vjerojatno jest posljedica stvaranja slobodnih radikala nakon izloženosti AgNP (Sellami i sur., 2014). Suprotno ovim

rezultatima, AgNP su u nekim organizmima inhibirale aktivnost GST. Tako su primjerice u probavnoj žlijezdi slatkovodnog puža *Lymnaea luteola* AgNP izazvale znatno smanjenje koncentracije glutationa te inhibiciju enzima GST i glutation peroksidaze (Ali i sur., 2014), a sličan učinak bio je zamijećen i nakon tretmana kalifornijske pastrve (Massarsky i sur., 2013) i dvije slatkovodne ribe (*Oreochromis niloticus* i *Tilapia zillii*) (Afifi i sur., 2016). Kao što je već prethodno spomenuto tijekom rasprave ove disertacije, rezultati trenutnih istraživanja ukazuju na činjenicu kako se toksičnost AgNP ne može pripisati isključivo djelovanju iona Ag^{+}. Naime, upalno stanje cijelog organizma te degradacija raznih proteina stresa ukazuju na posljedicu djelovanja čestica nano-strukture, odnosno veličine iako se pritom doprinos ionskog Ag ne može u potpunosti isključiti.

Učinak insekticida cipermetrina znatno se razlikovao od onoga zamijećenog nakon tretmana sa AgNP u škrgama dagnje. Naime, aktivnost enzima GST u škrgama dagnje nije bila znatno promijenjena nakon tretmana s cipermetrinom, dok je viša koncentracija deltametrina (50 µg l^{-1}) izazvala značajno povećanje aktivnosti. Zanimljivo, Tucca i sur. (2014) otkrili su indukciju aktivnosti GST nakon dvodnevnog izlaganja kozice *Monocorophium insidiosum* cipermetrinu, ali ne i deltametrinu. Moguće je da je to posljedica dosta niže odabrane koncentracije deltametrina u spomenutom istraživanju u usporedbi s cipermetrinom čije su odabrane koncentracije bile nešto više, a osim toga radilo se i o drugoj vrsti organizma. Slično spomenutom istraživanju, a suprotno opažanjima ove disertacije, povećanje koncentracije cipermetrina od 5 – 160 µg l^{-1} dovelo je do oksidacijskog stresa u probavnim žlijezdama i škrgama školjkaša *Unio elongatulus eucirrus* (Köprücü i sur., 2010). Nadalje, zanimljivo je kako je kombinacija AgNP i deltametrina izazvala povišenje aktivnosti GST u usporedbi sa zasebnim tretmanima. S druge strane, izostanak značajne promjene aktivnosti enzima GST nakon izlaganja AgNP u kombinaciji s cipermetrinom, iako je učinak na aktivnost ovog enzima primjećen na tretmanu sa samim nanočesticama, ukazuje na određenu interakciju ovog insekticida sa AgNP. Moguće je da dolazi do vezanja cipermetrina sa AgNP (zbog interakcije klora i iona Ag^{+} na površini AgNP) te posljedično smanjenja njihove biodostupnosti za unos od strane organizma. Deltametrin je s druge strane izazvao povećanje aktivnosti enzima GST zasebno i u kombinaciji s AgNP, što jasno ukazuje na detoksifikacijski antioksidacijski odgovor organizma kao posljedicu generiranja ROS-ova. Sličan odgovor dobili su i Sellami i sur. (2014) nakon izlaganja školjkaša *R. decussatus* piretroidnom insekticidu permetrinu nakon čega je došlo do stvaranja ROS-ova i posljedično povišene aktivnosti enzima CAT. Suprotno rezultatima ove disertacije, gdje kombinacija

deltametrina sa AgNP uzrokuje povišenu aktivnost GST, niža aktivnost GST primijećena je nakon djelovanja kombinacije 0.75 µg l^{-1}deltametrina i 10 µg l^{-1} bakra u slatkovodnoj ribi *Channa punctata* (Parvez i Raisuddin, 2006). U konačnici, ispitan je kombinirani učinak piretroidnih insekticida i AgNP u probavnoj žlijezdi dagnje na način da je određena **koncentracija proteina MT**. Povišena koncentracija proteina MT zamijećena je u probavnoj žijezdi dagnji izloženih AgNP (50 µg l^{-1}). Opće je poznato, već podrobno istraženo i potvrđeno kako AgNP nisu stabilne u morskom okruženju te dolazi do otpuštanja iona Ag^+ s vremenom. Naime, srebrni ioni imaju veliki afiniteta za sulfhidrilne skupine aminokiseline cisteina čiji je udio u molekuli MT vrlo visok (Geffard i sur., 2004). No, do povećanja indukcije MT nakon 15 dana izlaganja 10 µg l^{-1} AgNP došlo je samo u škrgama dagnje *M. galloprovincialis*, ali ne i u probavnoj žlijezdi (Gomes i sur., 2014). Kada se uzmu u obzir i rezultati ove doktorske disertacije, moglo bi se reći da pri nižim koncentracijama AgNP indukcija proteina MT u probavnoj žlijezdi ne mora nužno biti jako izražena, u skladu s pretpostavkom da se ioni Ag^+ ne vežu za MT već se akumuliraju u lizosomima stanica ovog tkiva u obliku kompleksa sa sulfidima (Geffard i sur, 2004). Ipak, deset puta viša koncentracija ima značajno izražen induktivni učinak, budući je koncentracija proteina MT u tom slučaju bila višestruko povišena. To upućuje na činjenicu kako prethodno opisana eliminacija iona Ag^+ vezivanjem u kompleks sa sulfidima i razgradnja u lizosomima nisu dovoljno učinkoviti prilikom detoksifikacije ovih iona u slučaju kada se uslijed otpuštanja s površine nanočestica javljaju u povišenim koncentracijama. Tada je moguće da se dio iona ipak veže na MT, pa slijedom toga dolazi i do potrebe indukcije njihove sinteze. Druga je mogućnost da povećanje koncentracije nanočestica i/ili iona dovodi do pojačane produkcije slobodnih radikala, uslijed čega je izraženija i potreba za pojačanom sintezom MT za koje je prethodno utvrđeno da sudjeluju u antioksidativnom odgovoru (Buico i sur., 2008; Banni i sur., 2011). U prilog ovoj pretpostavci govore primjeri gdje je zbog stvaranja oksidacijskih radikala od strane AgNP došlo ne samo do porasta koncentracije MT, već i do povišenja aktivnosti antioksidacijskih enzima (CAT, SOD, glutation peroksidaze, GST) te koncentracije glutationa i malondialdehida u ljudskim stanicama jetre *in vitro* (Kim i sur., 2009), u odrasloj zebrici (Choi i sur., 2010) te u kalifornijskoj pastrvi (Gagné i sur., 2012). Nadalje, do povišene razine molekule mRNA proteina MT došlo je i nakon izlaganja embrija i odraslih jedinki kamenice *Crassostrea virginica* AgNP (Ringwood i sur., 2010). Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na najviši negativan učinak AgNP zabilježen upravo pri povišenoj koncentraciji MT u probavnoj žlijezdi dagnje *M. galloprovincialis* nakon izlaganja

50 μg l^{-1} 60 nm-AgNP. Sinteza MT bila je isto tako povišena u probavnoj žlijezdi slatkovodnog školjkaša raznolike trokutnjače (*Dreissena polymorpha*) nakon izlaganja 500 μg l^{-1} PVP-om obloženih AgNP (Zimmermann i sur., 2016). U slatkovodnom školjkašu *E. complananta* ustanovljeno je da se 20 nm-AgNP nakupljaju u svim tkivima, dok je koncentracija 80 nm-AgNP bila najviša upravo u probavnoj žlijezdi (Gagné i sur., 2016). Naime, nakupljanje srebra u probavnoj žlijezdi dagnje *M. galloprovincialis*, kao preferencijalnog tkiva za nakupljanje srebra, primijetili su i Jimeno-Romero i sur. (2017a) nakon jednodnevnog izlaganja AgNP, iako u spomenutom istraživanju nije došlo do povišene transkripcije gena odgovornih za sintezu MT.

Suprotno rezultatima dobivenim nakon tretmana dagnji *M. galloprovincialis* sa AgNP, piretroidni insekticidi cipermetrin i deltametrin nisu izazvali promjenu koncentracije MT. Nadalje, rezultati kombiniranog učinka AgNP s oba insekticida rezultirali su značajno nižom koncentracijom MT. Naime, iako su AgNP izazvale vrlo uočljivu indukciju MT u probavnoj žlijezdi, rezultati kombiniranog izlaganja ukazuju da vjerojatno dolazi do međudjelovanja između cipermetrina/deltametrina i AgNP. Nije isključeno da se u ovom slučaju radi zapravo o pojačanom stresu kod izlaganja smjesama, kada vjerojatno dolazi do pojačane sinteze MT, no paralelno i do ubrzane eliminacije kompleksa MT i srebrnih iona/nanočestica. Primjerice, Serafim i Bebbiano (2009) utvrdili su indukciju MT u škrgama školjkaša kućice *R. decussatus* nakon izlaganja relativno niskim koncentracijama metala, no pretpostavili su da se kod viših koncentracija intenzivira i proces degradacije MT u lizosomima, zbog čega se, paradoksalno, tada uočava i uspostava padajućeg trenda koncentracije MT. Ovdje je ponovno potrebno naglasiti da je za detoksifikaciju iona Ag^+ u probavnoj žlijezdi školjkaša važno stvaranje sulfidnih kompleksa iona Ag^+ i njihova akumulacija u lizosomima stanica ovog tkiva (Geffard i sur., 2004), dok MT nemaju toliki značaj (Gomes i sur., 2014). Može se pretpostaviti da zbog interakcije AgNP i molekula piretroida, otpuštanje iona Ag^+ nije izraženo u tolikoj mjeri da bi u ovom tkivu bila potrebna i dodatna sinteza MT kao što je uočeno nakon izlaganja samo AgNP u relativno visokoj koncentraciji. No, u posljednje vrijeme u literaturi se sve više ističu razmišljanja koja su u osnovi suprotna gore opisanoj pretpostavci. Naime, govori se o pojavi tzv. efekta prelijevanja (engl. „*spillover effect*“) kada se pretpostavlja da kod izlaganja visokim koncentracijama dolazi do snižavanja vezivnog kapaciteta MT, koje pak dovodi do smanjene sposobnosti odstranjivanja i eliminacije metala (Le i sur., 2016). U svakom slučaju, kombinacija nanočestica s piretroidnim pesticidima, u velikoj mjeri utječe na detoksifikacijske procese u probavnoj žlijezdi dagnje.

Zaključno, svojstva koja AgNP (odnosno nanočestice općenito) čine privlačnima s jedne strane, mogu imati vrlo negativan učinak s druge strane. Stoga procjena sigurnosti nanočestica mora biti od primarne važnosti zbog njihove svestrane primjene u industriji i posljedične izloženosti ljudi, direktno ili indirektno (putem okoliša). Asghari i sur. 2012. godine predložili su klasifikaciju AgNP prema Globalnom Ujedinjenom sustavu klasifikacije i označavanja kemikalija (engl. *Globally Harmonized System of classification and labeling of chemicals*) kao „kategorija akutna 1" (engl. „*category acute* 1") za larve *Daphnie*, čime su htjeli ukazati na činjenicu kako je potrebno vrlo pažljivo pratiti otpuštanje nano-srebra u okolišu. Nedostatak toksikoloških podataka o umjetno proizvedenim nanočesticama onemogućuje prikladnu procjenu rizika po okoliš i organizme koji u njemu žive. Ipak, načelo predostrožnosti ne bi trebalo zaustaviti istraživanja vezana uz nanotehnologiju i nanočestice. Potrebno je pronaći ravnotežu između novih nanočestica (nanomaterijali) koje se ispuštaju u okoliš i načina ispitivanja njihovog djelovanja te moguće toksičnosti. Kako bi to bilo moguće, potrebno je produbiti osnovna znanja o djelovanju nanočestica gdje bi jedan od ciljeva bio i razvoj tzv. ekotoksikoloških profila različitih nanočestica. Dakle, nakon sinteze novih nanočestica trebala bi se izvršiti procjena njihovog rizika i prema rezultatima istraživanja postaviti opravdane procedure upravljanja rizikom. Činjenica je da rezultati prethodnih istraživanja tek bivaju prepoznati i stvaraju temelj iz kojeg će se dalje graditi nano-znanost. Kroz ova rana istraživanja uspostavljeni su temeljni principi, međutim nano-svijet još je uvijek jedno sivo područje o kojemu ne možemo reći da puno znamo. Nadalje, porastom dokaza kako široki raspon nano-materijala (pa tako i nano-proizvoda) može imati značajne negativne učinke na živote raznih organizma, jasno je da se istraživanja na ovom području moraju ojačati i proširiti. Posebice je potrebno proširiti i definirati načine toksičnog djelovanja samih nanomaterijala te njihove kombinacija s drugim potencijalno štetnim, antropogenim tvarima. Potaknuta naglim porastom i razvojem te u konačnici primjenom novih nanomaterijala u različitim poljima, od poljoprivrede do biomedicine, takva potreba nikad nije bila veća. Istraživanja prikazana u ovoj doktorskoj disertaciji, prema našem saznanju prvi puta koriste ježince *A. lixula* i *S. granularis* u ispitivanju učinka srebrnih nanočestice te je po prvi puta ispitana kombinacija AgNP s piretroidnim insekticidima na dagnji *M. galloprovincialis*.

7. ZAKLJUČCI

7. Zaključci

- Srebrne nanočestice, neovisno o svojoj veličini, u doticaju s vodom visokog saliniteta, kao što je to morska voda, vrlo brzo aglomeriraju i agregiraju, a kinetika aglomeracije brža za manje nanočestice.
- Oblik i veličina AgNP određuje njihov učinak na embrionalni razvoj ježinaca i to tako što sferične AgNP pokazuju manju toksičnost u usporedbi s onima koje sadrže više površinskih anomalija (oštrih rubova i udubljenja), a nanočestice manjih dimenzija (10 i 20 nm) toksičnije su u usporedbi s onima većih dimenzija (40, 60 i 100 nm).
- AgNP toksičnije su za ježince nego li ista koncentracija srebrnih iona, što ukazuje na učinak veličine nanočestica.
- Učinak AgNP ovisi o fazi embrionalnog razvoja u kojoj se ježinac nalazi za vrijeme prvog doticaja s nanočesticama, a najosjetljiviji trenutak razvoja ježinca jest stadij gastrule i netom oplođene jajne stanice.
- AgNP ne djeluju negativno na uspješnost oplodnje kod ježinaca *A. lixula* i *P. lividus*, međutim uzrokuju smanjenje kvalitete potomstva u ježinca *A. lixula*. Općenito (na temelju različitih istraživanja ove disertacije) može se zaključiti kako je ježinac *A. lixula* najosjetljivijim prilikom ispitivanja učinka AgNP dok je najmanje osjetljiva vrsta na AgNP ježinac *P. lividus*.
- Ioni Ag^+ izazvaju veći postotak interfaznih embrija te niži broj mitotičkih dioba po embriju za vrijeme mitoze ježinca dok AgNP ne pokazuju negativan učinak, neovisno o primijenjenoj veličini ili koncentraciji.
- Ioni Ag^+ i AgNP dovode do stvaranja raspršenih kromosoma, acentričnih i višestrukih fragmenata, dok AgNP dodatno uzrokuju stvaranje anafaznih mostova. Broj mitotičkih aberacija po embriju obrnuto je proporcionalan veličini nanočestica (tj. AgNP veličine 10, 20 i 40 nm toksičnije su od 60 i 100 nm-AgNP).
- Dagnje izložene 60 nm-AgNP pokazuju smanjenu sposobnost preživljavanja na zraku, manju stabilnost lizosomalnih membrana hemocita, povišenje aktivnosti GST i povećanu sintezu proteina MT.
- U kombinaciji s cipermetrinom učinak AgNP izraženiji je nego u slučaju pojedinačnog izlaganja kada dolazi do povišenja aktivnosti GST i indukcije MT.

- Deltametrin uzrokuje značajno povećanje aktivnost GST pri višoj ispitivanoj koncentraciji zasebno i u kombinaciji sa AgNP.

Istraživanja, čiji su rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji, ukazuju na činjenicu kako AgNP jesu toksične prema odabranim morskim organizmima (ježincima i dagnjama). Međutim, njihova toksičnost nije isključivo posljedica djelovanja srebrnih iona, kao što se to donedavno smatralo (prema objavljenoj literaturi). Naime, postoji značajan učinak veličine nanočestica koji se mora uzeti u obzir prilikom ispitivanja utjecaja AgNP na bioti. Nadalje, druge potencijalno štetne tvari antropogenog porijekla koje mogu biti prisutne u okolišu uz AgNP mogu dovesti do povećanog toksičnog učinka istih na organizam. Zaključno, umjetno proizvedene nanočestice predstavljaju jedinstvenu novu prijetnju bioti, jer mogu utjecati ne samo na različite stanične putove u usporedbi s njihovim odgovarajućim ionima, već mogu i biomehanički komunicirati sa staničnim membranama zbog svoje konačne veličine i velikih reaktivnih površina. U konačnici, ovaj rad pruža temelj za buduća istraživanja AgNP u modelu morskih organizama usmjerenih prema otkrivanju točnih načina djelovanja tih novih materijala na staničnoj i pod-staničnoj razini.

8. LITERATURA

8. LITERATURA

https://sestar.irb.hr/instrumenti_show.php?ID=50 pristupljeno 19. listopada 2016.

Adamczyk, Z., Oćwieja, M., Mrowiec, H., Walas, S., Lupa, D. Oxidative dissolution of silver nanoparticles: A new theoretical approach. *J. Colloid Interf. Sci*. **2016**, 469, 355-364.

Adami, G., Barbieri, P., Fabiani, M., Piselli, S., Predonzani, S., Reisenhofer, E. Levels ofcadmium and zinc in hepatopancreas of reared *Mytilus galloprovincialis* from the Gulf of Trieste (Italy). *Chemosphere*, **2002**, 48, 671-677.

Afifi, M., Saddick, S., Zinada, O.A.A. Toxicity of silver nanoparticles on the brain of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. *Saudi J. Biol. Sci*. **2016**, 23, 754-760.

Ali, D., Yadav, P.G., Kumar, S., Ali, H., Alarifi, S., Harrath, A.H. Sensitivity of freshwater pulmonate snail *Lymnaea luteola* to silver nanoparticles. *Chemosphere*, **2014**, 104, 134-140.

Alonso, M.B., Feo, M.L., Corcellas, C., Vidal, L.G., Bertozzi, C.P., Marigo, J., Secchi, E.R., Bassoi, M., Azevedo, A.F., Dorneles, P.R., Torres, J.P.M., Lailson-Broto, J., Malm, O., Eljarrat, E., Barceló, D. Pyrethroids: A new threat to marine mammals? *Environ. Internat.* **2012**, 47, 99-106.

Anselmo, H.M.R., Van den Berg, J.H.J., Rietjens, I.M.C.M., Murk, A.T.J. Inhibition of cellular efflux pumps involved in multi xenobiotic resistance (MXR) in echinoid larvae as a possible mode of action for increased ecotoxicological risk of mixtures. *Ecotoxicol*. **2012**, 21, 2276-2287.

António, D.C., Cascio, C., Jakšić, Ž., Jurašin, D., Lyons, D.M., Nogueira, A.J.A., Rossi, F., Calzolai, L. Assessing silver nanoparticles behaviour in artificial seawater by mean of AF4 and spICP-MS. *Mar. Environ. Res*. **2015**, 111, 1-8.

Asare, N., Instanes, C., Sandberg, W.J., Refsnes, M., Schwarze, P., Kruszewski, M., Brunborg G. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology*, **2012**, 291, 65-72.

AshaRani, P.V.,Wu, Y.L., Gong, Z.Y., Valiyaveettil, S. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*, **2008**, 19, 255102–2255107.

AshaRani, P.V., Low Kah Mun, G., Hande, M.P., Valiyaveettil, S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*. **2009**, 3, 279-290.

Asghari, S., Johari, S.A., Lee, J.H., Kim, S., Jeon, Y.B., Choi, H.J., Moon, M.C., Yu, I.J. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*. *J. Nanobiotech*. **2012**, 25, 10-14.

Ayad, M.A., Fdil, M.A., Mouabad, A. Effects of cypermethrin (pyrethroid insecticide) on the valve activity behaviour, byssal thread formation, and survival in air of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2011**, 60, 462-470.

Aydın, R., Köprücü, K., Dörücü, M., Köprücü, S.S., Pala, M. Acute toxicity of synthetic pyrethroid cypermethrin on the common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos and larvae. *Aquacult. Int*. **2005**, 13, 451-458.

Baker, T.J., Tyler, C.R., Galloway, T.S. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environ. Pollut.* **2014**, 186, 257-271.

Balbi, T., Smerilli, A., Fabbri, R., Ciacci, C., Montagna, M., Grasselli, E., Brunelli, A., Pojana, G., Marcomini, A., Gallo, G., Canesi, L. Co-exposure to N-TiO_2 and Cd^{2+} results in interactive effects on biomarker responses but not in increased toxicity in the marine bivalve *M. galloprovincialis*. *Sci. Total Environ*. **2014**, 493, 355-364.

Banfield, J.F., Zhang, H. Nanoparticles in the environment. *Rev. Mineral. Geochem*. **2001**, 44, 1-6.

Banni, M., Jebali, J., Guerbej, H., Dondero, F., Boussetta, H., Viarengo, A. Mixture toxicity assessment of nickel and chlorpyrifos in the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. **2011**, 60, 124-131.

Barmo, C., Ciacci, C., Canonico, B., Fabbri, R., Cortese, K., Balbi, T., Marcomini, A., Pojana, G., Gallo, G., Canesi, L. *In vivo* effects of n-TiO_2 on digestive gland and immune function of the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* **2013**, 133, 9-18.

Bashir, R. BioMEMS: state-of-the-art in detection, opportunities and prospects. *Adv. Drug Del. Rev.* **2004**, 56, 1565-1586.

Bianchini, A., Playle, R.C., Wood, C.M., Walsh, P.J. Mechanism of acute silver toxicity in marine invertebrates. *Aquat. Toxicol*. **2005**, 72, 67-82.

Bielmyer-Fraser, G.K., Fraser, M., Rault, P., Fortier, M., Brousseau, P., Fournier, M., Surette, C., Vaillancourt, C. Immune response of blue mussels (*Mytilus edulis*) in spawning period following exposure to metals. *J. Xenobiot*. **2014**, 4895, 65-67.

Bielmyer-Fraser, G.K., Jarvis, T.A., Lenihan, H.S., Miller, R.J. Cellular partitioning of nanoparticulate versus dissolved metals in marine phytoplankton. *Environ. Sci. Technol*. **2014**, 48, 13443-13450.

Boenigk, J., Beisser, D., Zimmermann, S., Bock, C., Jakobi, J., Grabner, D., Groβmann, L., Rahmann, S., Barcikowski, S., Sures, B. Effect of silver nitrate and silver nanoparticles on a planktonic community: General trends after short-term exposure. *PLoS One*, **2014**, 9, doi: doi: 10.1371/journal.pone.0095340.

Borges, J. C., Porto-Neto, L., Mangiaterra, M., Jensch-Junior, B., da Silva, J. Phagocytosis *in vitro* and *in vivo* in the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* at 0°C. *Polar Biol.* **2002**, 25, 891-897.

Bott, J., Tadjiki, S. Field-Flow Fractionation supporting consumer safety evaluation of silver nanoparticle applications in food packaging olymers. *Am. Lab*. **2013**, 45, 9-12.

Bouallegui, Y., Ben Younes, R., Turki, F., Mezni, A., Oueslati, R. Effect of exposure time, particle size and uptake pathways in immune cell lysosomal cytotoxicity of mussels exposed to silver nanoparticles. *Drug. Chem. Toxicol.* **2017**, 6, 1-6.

Bouldin, J.L., Ingle, T.M., Senggupta, A., Alexander, R., Hannigan, R.E., Buchanan, R.A. Aqueous toxicity and food chain transfer of quantum DOTs in freshwater algae and *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.* **2008**, **27**, 1958-1963.

Bradford, M.M. Analytical Biochemistry. **1976**, 72, 248-254.

Briggs, E., Wessel, G.M. In the beginning…animal fertilization and sea urchin development. *Dev. Biol.* **2006**, 300, 15-26.

Bruneau , A., Turcotte, P., Pilote, M., Gagné, F., Gagnon, C. Fate of silver nanoparticles in wastewater and immunotoxic effects on rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* **2016**, 174, 70-81.

Buffet, P.E., Pan, J.F., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Gaudin, P., Faverney, R., Guibbolini, M., Gilliland, D., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C. Biochemical and behavioural responses of the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* to silver nanoparticles in seawater and microalgal food. *Ecotox. Environ. Safety.* **2013**, 89, 117-124.

Buffet, P.M., Zalouk-Vergnoux, A., Châtel, A., Berthet, B., Métais, I., Perrein-Ettajani, H., Poirier, L., Luna-Acosta, A., Thomas-Guyon, H., Risso-de Faverney, C., Guibbolini, M.,

Gilliland, D., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C. A marine mesocosm study on the environmental fate of silvernanoparticles and toxicity effects on two endobenthic species: The ragworm *Hediste diversicolor* and the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*. *Sci. Total Environ*. **2014**, 470, 1151-1159.

Buico, A., Cassino, C., Dondero, F., Vergani, L., Osella, D. Radical scavenging abilities of fish MT-A and mussel MT-10 metallothionein isoforms: An ESR study. *J. Inorg. Biochem*. **2008**, 102, 921-927.

Burić, P., Pfannkuchen, M., Jakšić, Ž., Stipić, F., Lyons, D.M. Uptake and impact of engineered nanoparticles on embryonal development and stress response in selected marine organisms. *Arch. Ind. Hygiene Toxicol.* **2012**, 63, 21.

Burić, P., Jakšić, Ž., Štajner, L., Dutour Sikirić, M., Jurašin, D., Cascio, C., Calzolai, L., Lyons, D.M. Effect of silver nanoparticles on Mediterranean sea urchin embryonal development is species specific and depends on moment of first exposure. *Mar. Environ. Res.* **2015**, 111, 50-59.

Burić, P., Levak, M., Pavičić-Hamer, D., Lyons, D.M. Sensitivity to different sizes of silver nanoparticles in the early life stages of two Mediterranean sea urchins *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758) and *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Arch. Ind. Hygiene Toxicol.* **2016**, 67, 32.

Buzea, C., Pacheco, I.I., Robbie, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, **2007**, 2, 17-71.Canesi, L., Ciacci, C., Betti, M., Fabbri, R., Canonico, B., Fantinati, A., Marcomini, A., Pojana, G. Immunotoxicity of carbon black nanoparticles to blue mussel hemocytes. *Environ. Int.* **2008**, 34, 1114-1119.

Canesi, L., Ciacci, C., Vallotto, D., Gallo, G., Marcomini, A., Pojana, G. *In vitro* effects of suspensions of selected nanoparticles (C_{60} fullerene, TiO_2, SiO_2) on *Mytilus* hemocytes. *Aquat. Toxicol.* **2010a**, 96, 151-158.

Canesi, L., Fabbri, R., Gallo, G., Vallotto, D., Marcomini, A., Pojana, G. Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C_{60} fullerene, Nano-TiO_2, Nano-SiO_2). *Aquat. Toxicol.* **2010b**, 100, 168-177.

Canesi, L., Ciacci, C., Fabbri, R., Marcomini, A., Pojana, G., Gallo, G. Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Mar. Environ. Res.* **2011**, 76, 16-21.

Cappello, T., Vitale, V., Oliva, S., Villari, V., Mauceri, A., Fasulo, S., Maisano, M. Alteration of neurotransmission and skeletogenesis in sea urchin *Arbacia lixula* embryos exposed to copper oxide nanoparticles. *Comp. Biochem. Phys. C.* **2017**, 199, 20-27.

Carballeira, C., Ramos-Gómez, J., Martín-Díaz, L., DelValls, T.A. Identification of specific malformations of sea urchin larvae for toxicity assessment: Application to marine pisciculture effluents. *Mar. Environ. Res.* **2012a**, 77, 12-22.

Carballeira, C., De Orte, M.R., Viana, I.G., Delvalls, T.A., Carballeira A. Assessing the toxicity of chemical compounds associated with land-based marine fish farms: the sea urchin embryo bioassay with *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2012b**, 63, 249-261.

Carne, M., Gross, M., Maycock, D., Grant, A., Fossum, B.H. Environmental quality standards for a deltamethrin sea louse treatment in marine finfish aquaculture based on survival time analyses and species sensitivity distributions. *Aquac. Res*. **2011**, 42, 68-72.

Chae, Y.J., Pham, C.H., Lee, J., Bae, E., Yi, J., Gu, M.B. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* **2009**, 94, 320-327.

Chalkiadaki, O., Dassenakis, M., Paraskevopoulou, V., Lydakis-Simantiris, N. Experimental study of cadmium bioaccumulation in three Mediterranean marine bivalve species: correlation with selected biomarkers. *Pure Appl. Chem*. **2014**, 86, 1189-1204.

Chekli, L., Zhao, Y.X., Tijing, L.D., Phuntsho, S., Donner, E., Lombi, E., Gao, B. Y., Shon, H.K. Aggregation behavior of engineered nanoparticles in natural waters: characterising aggregate structure using on-line light scattering. *J. Hazard. Matter.* **2015**, 284, 190-200.

Chen, C.-S., Anaya, J.M., Zhang, S., Spuring, J., Chuang, C.-Y., Miao, A.-J., Chen, E. Y.-T., Schwehr, K.A., Jiang, Y., Quigg, A., Santschi, P.H., Chin, W.-C. Effects of engineered nanoparticles on the assembly of exopolymeric substances from phytoplankton. *PLoS One*, **2011**, doi: 10.1371/journal.pone.0021865.

Chen, Q., Hu, X., Yin, D. Wang, R. Effect of subcellular distribution on nC_{60} uptake and transfer efficiency from *Scenedesmus obliquus* to *Daphnia magna*. *Ecotox. Environ. Safe.* **2016**, 128, 213-221.

Chinnapongse, S.L., MacCuspie, R.I., Hackley, V.A. Persistence of singly-dispersed silver nanoparticles in natural freshwaters, synthetic seawater, and simulated estuarine waters. *Sci. Total Environ.* **2011**, 409, 2443-2450.

Choi, J.E., Kim, S., Ahn, J.H., Youn, P.Y., Kang, J.S., Park, K., Yi, J., Ryu, D.-Y. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the adult zebrafish. *Aquat. Toxicol*. **2010**, 100, 151-159.

Choi, S., Kim, S., Bae, Y.J., Park, J.W., Jung, J. Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to *Glyptotendipes tokunagai*. *Environ. Health Toxicol*. **2015**, 30, doi: 10.5620/eht.e2015003.

Christian, P., Von der Kammer, F., Baalousha, M., Hofmann, T. Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology*, **2008**, 17, 326-343.

Cleveland, D., Long, E.L., Pennington, P.L., Cooper, E., Fulton, M.H., Scott, G:I., Brewer, T., Davis, J., Petersen, E.J., Wood, L. Pilot estuarine mesocosm study on the environmental fate of silver nanomaterials leached from consumer products. *Sci. Total. Environ*. **2012**, 421, 267-272.

Cong, Y., Banta, G.T., Selck, H., Berhanu, D., Valsami-Jones, E., Forbes, V.E. Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated silver nanoparticles in the estuarine polychaete, *Nereis* (*Hediste*) *diversicolor*. *Aquat. Toxicol.* **2014**, 156,106-115.

Conway, M.C., Igelsrud, D., Conway, A.F. Sea urchin developmet, Chapter 4. **1980**.

Cornelis, G., Hassellöv, M. A signal deconvolution method to discriminate smaller nanoparticles in single particle ICP-MS. *J. Anal. Atom. Spectrom*. **2014**, 29, 134-144.

Cupaioli, F.A., Zucca, F.A., Boraschi, D., Zecca, L. Engineered nanoparticles. How brain friendly is this new guest? *Prog. Neurobiol.* **2014**, 120, 20-38.

Daniel, M.C., Astruc, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev*. **2004**, 104, 293-346.

Daphedar, A., Taranath, T.C. Biosynthesis of silver nanoparticles by leaf extract of *Albizia saman* (Jacq.) Merr. and their cytotoxic effect on mitotic chromosomes of *Drimia indica* (Roxb.) Jessop. Environ. *Sci. Pollut. Res. Int.* **2017**, doi: 10.1007/s11356-017-9899-z.

Das, P., Metcalfe, C.D., Xenopoulos, M.A. Interactive effects of silver nanoparticles and phosphorus on phytoplankton growth in natural waters. *Environ. Sci. Technol*. **2014**, 48, 4573-4580.

DeLorenzo, M.E., Key, P.B., Chung, K.W., Sapozhnikova, Y., Fulton, M.H. Comparativetoxicity of pyrethroid insecticides to two estuarine crustacean species, *Americamysis bahia* and *Palaemonetes pugio*. *Environ. Toxicol*. **2014**, 29, 1099-1106.

De Matteis, V., Malvindi, M.A., Galeone, A., Brunetti, V., De Luca, E., Kote, S., Kshirsagar, P., Sabella, S., Bardi, G., Pompa, P.P. Negligible particle-specific toxicity mechanism of silver nanoparticles: The role of Ag^{+} ion release in the cytosol. *Nanomed-Nanotechnol.* **2015**, 11, 731-739.

Della Torre, C., Bergami, E., Salvati, A., Faleri, C., Cirino, P., Dawson, K.A., Corsi, I. Accumulation and embryotoxicity of polystyrene nanoparticles at early life stages of development of sea urchin embryos *Paracentrotus lividus*. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, 48, 12302-12311.

Domínguez-Vera, J.M., Colacio, E. Nanoparticles of prussian blue ferritin: A new route for obtaining nanomaterials. *Inorg. Chem.* **2003**, 42, 6983−6985.

Dondero, F., Banni, M., Negri, A., Boatti, L., Dagnino, A., Viarengo, A. Interactions of a pesticide/heavy metal mixture in marine bivalves: a transcriptomic assessment. *BMC Genomics*, **2011**, 12, 195.

Dougherty, G.M., Rose, K.A., Tok, J.B.H., Pannu, S.S., Chuang, F.Y.S., Sha, M.Y., Chakarova, G., Penn, S.G. The zeta potential of surface-functionalized metallic nanorod particles in aqueous solution. *Electrophoresis*, **2008**, 29, 1131-1139.

Dwivedi, A.D., Dubey, S.P., Sillanpää, M., Kwon, Y.N., Lee, C., Varma, R.S. Fate of engineered nanoparticles: implications in the environment. *Coordin. Chem. Rev.* **2015**, 287, 64-78.

Eaton, P., Quaresmaa, P., Soares, C., Neves, C., Almeidaa, M.P., Pereiraa, E., West, P. A direct comparison of experimental methods to measure dimensions of synthetic nanoparticles. *Ultramicroscopy*. **2017**, 182, 179-190.

EC, European Comission. Recommendation on the Definition of Nanomaterials EU/696/**2011**.

Eddy, M., Wastewater Engineering Treatment and Reuse, 4th ed.; McGraw Hill: New York, **2003**.

Egger, S., Lehmann, R.P., Height, M.J., Loessner, M.J., Schuppler, M. Antimicrobial properties of a novel silver-silica nanocomposite material. *Appl. Environ. Microbiol*. **2009**, 75, 2973-2976.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. Jr., Feather-Stone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol*. **1961**, 7, 88-95.

El Badawy, A.M., Luxton, T.P., Silva, R.G., Scheckel, K.G., Suidan, M.T., Tolaymat, T.M. Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environ. Sci. Technol*. **2010**, 44, 1260-1266.

Ernst, W., Jackman, P., Doe, K., Page, F., Julien, G., Mackay, K., Sutherland, T. Dispersion and toxicity to non-target aquatic organisms of pesticides used to treat sea lice on salmon in net pen anclousers. *Mar. Pollut. Bullet.* **2001**, 42, 433-444.

Fairbairn, E.A., Kellerb, A.A., Mädlerc, L., Zhou, D., Pokhrel, S., Chirra, G.N. Metal oxide nanomaterials in seawater: Linking physicochemical characteristics with biological response in sea urchin development. *J. Hazardous Mat.* **2011**, 192, 1565-1571.

Falugi, C., Aluigi, M.G., Chiantore, M.C., Privitera, D., Ramoino, P., Gatti, M.A., Fabrizi, A., Pisino, A., Matranga, V. Toxicity of metal oxide nanoparticles in immune cells of sea urchin. *Mar. Environ. Res.* **2012**, 76, 114-121.

Farkasa, J., Christianc, P., Gallego-Urread, J.A., Roose, N., Hassellövd, M., Tollefsena, K.E., Thomasa, K.V. Uptake and effects of manufactured silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill cells. *Aquat. Toxicol.* **2011**, 101, 117-125.

Farré, M., Sanchís, J., Barceló, D. Analysis and assessment of the occurrence, the fate and the behavior of nanomaterials in the environment. *Trends Anal. Chem.* **2011**, 30, 517-527.

Fent., K., Weisbord, C.J., Wirth-Heller, A., Pieles, U. Assessment of uptake and toxicity of fluorescent silica nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *Aquat. Toxicol.* **2010**, 100, 218-228.

Feswick, A., Griffitt, R. J., Siebein, K., Barber, D.S. Uptake, retention and internalization of quantum dots in *Daphnia* is influenced by particle surface functionalization. *Aquat. Toxicol.* **2013**, 130-131, 210-218.

Foldbjerg, R., Dang, D.A., Autrup, H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Arch Toxicol.* **2011**, 85, 743-750.

Fraga, S., Faria, H., Soares, M.E., Duarte, J.A., Soares, L., Pereira, E., Costa-Pereira, C., Teixeira, P., de Lourdes Bastos, M., Carmo, H. Influence of the surface coating on the cytotoxicity, genotoxicity and uptake of gold nanoparticles in human HepG2 cells. *J. Appl. Toxicol.* **2013**, 33, 1111-1119.

Fujiwara, K., Suematsu, H., Kiyomiya, E., Aoki, M., Sato, M., Moritoki N. Size-dependent toxicity of silica nano-particles to *Chlorella kessleri*. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* **2008**, 43, 1167-1173.

Gagné, F., André, C., Skirrow, R., Gélinas, M., Auclair, J., van Aggelen, G., Turcotte, P., Gagnon, P. Toxicity of silver nanoparticles to rainbow trout: A toxicogenomic approach. *Chemosphere*, **2012**, 89, 615-622.

Gagné, F., Turcotte, P., Pilote, M., Auclair, J., André, C., Gagnon, C. Elemental profiles of freshwater mussels treated with silver nanoparticles: A metallomic approach. *Comp. Biochem. Phys. C.* **2016**, 188, 17-23.

Galletti, A., Seo, S., Hee Joo, S., Su, C., Blackwelder, P. Effects of titanium dioxide nanoparticles derived from consumer products on the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2016**, 23, 21113-21122.

Gambardella, C., Ferrando, S., Morgana, S., Gallus, L., Ramoino, P., Ravera, S., Bramini, M., Diaspro, A., Faimali, M., Falugi, C. Exposure of *Paracentrotus lividus* male gametes to engineered nanoparticles affects skeletal bio-mineralization processes and larval plasticity. *Aquat. Toxicol.* **2015a**, 158, 181-191.

Gambardella, C., Costa, E., Piazza, V., Fabbrocini, A., Magi, E., Faimali, M., Garaventa, F. Effect of silver nanoparticles on marine organisms belonging to different trophic levels. *Mar. Environ. Res.* **2015b**, 111, 41-49.

García-Negrete, C.A., Blasco, J., Volland, M., Rojas, T.C., Hample, M., Lapresta-Fernández, A., Jiménez de Haro, M.C., Soto, M., Fernández, A. Behaviour of Au-citrate nanoparticles in seawater and accumulation in bivalves at environmentally relevant concentrations. *Environ. Pollut.* **2013**, 174, 134-141.

Geest, J.L.V., Burridge, L.E., Kidd, K.A. Toxicity of two pyrethroid-based anti-sea lice pesticides, AlphaMax® and Excis®, to a marine amphipod in aqueous sediment exposures. *Aquaculture***, 2014**, 434, 233-240.

Geffard, A., Jeantet, A.Y., Amiard, J.C., Le Pennec, M., Ballan-Dufrançais, C., Amiard-Triquet, C. Comparative study of metal handling strategies in bivalves *Mytilus edulis* and *Crassostrea gigas*: a multidisciplinary approach. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **2004**, 84, 641-650.

George, S., Lin, S., Ji, Z., Thomas, C.R., Li, L., Mecklenburg, M., Meng, H., Wang, X., Zhang, H., Xia, T., Hohman, J.N., Lin, S., Zink, J.I., Weiss, P.S., Nel, A.E. Surface defects on plate-shaped silver nanoparticles contribute to its hazard potential in a fish cell line and zebrafish embryos. *ACS Nano*, **2012**, 6, 3745-3759.

Gharred, T., Ezzine, I.K., Naija, A., Bouali, R.R., Jebali, J. Assesment of toxicity interactions between deltamethrin and copper on the fertility and developmental events in the Mediterranean sea urchin, *Paracentrotus lividus*. *Environ. Monit. Assess*. **2015**, 4, 187-193.

Gicheva, G., Yordanov, G. Removal of citrate-coated silver nanoparticles from aquous dispersions by using activated carbon. *Colloid Surface A*, **2013**, 431, 51-59.

Gilles, K.W., Pearse, J.S. Disease in sea urchins *Strongylocentrotus purpuratus*: Experimental infection and bacterial virulence. *Dis. Aquat. Organ.* **1985**, 1, 105–14.

Godrijan, J., Marić, D., Tomažić, I., Precali, R., Pfannkuchen, M. Seasonal phytoplankton dynamics in the coastal waters of the north-eastern Adriatic Sea. *J. Sea Res.* **2013**, 77, 32-44.

Gomes, T., Pinheiro, J., Cancio, I., Pereira, C.G., Cardoso, C., Bebianno, M.J., Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, 45, 9356-9362.

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

Gomes, T., Pereira, C.G., Cardoso, C., Sousa, V.S., Teixeira, M.R., Pinheiro, J.P., Bebianno, M.J. Effects of silver nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* **2014**, 101, 208-214.

González-Irusta, J.M., Goñi de Cerio, F., Canteras, J.C. Reproductive cycle of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the Cantabrian Sea (northern Spain): environmental effects. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* **2010**, 190, 699-709.

Gottschalk, F., Nowack, B. The release of engineered nanomaterials to the environment. *J. Environ. Monit.* **2011**, 13, 1145-1155.

Gowland, B., Webster, L., Fryer, R., Davies, I., Moffat, C., Stagg, R. Uptake and effects of the cypermethrin-containing sea lice tretament Excis® i the mussel, *Mytilus edulis*. *Environ. Pollut*. **2002**, 120, 805-811.

Grillo, R., Rosa, A.H., Fraceto, L.F. Engineered nanoparticles and organic matter: a review of the state-of-the-art. *Chem.* **2015**, 119, 608-619.

Guardiola, F.A., Gónzalez-Páranga, P., Meseguer, J., Cuesta, A., Esteban, M.A. Modulatory effects of deltamethrin-exposure on the immune status, metabolism and oxidative stress in gilthead seabream. *Fish Shellfish Immun*. **2014**, 36, 120-129.

Guillou, M., Lumingas, L.J.L. The reproductive cycle of the blunt sea urchin. *Aquacult. Int.* **1998**, 6, 147-160.

Hassan, P.A., Rana, S., Verma, G. Making sense of Brownian motion: Colloid characterization by Dynamic Light Scattering. *Langmuir*, **2015**, 3-12.

Hamdoun, A.M., Cherr, G.N., Roepke, T.A., Epel, D. Activation of multidrug efflux transporter activity at fertilization in sea urchin embryos (*Strongylocentrotus purpuratus*). *Dev. Biol*. **2004**, 276, 452-462.

He, D., Dorantes-Aranda, J.J., Waite, T.D. Silver nanoparticle-algae interactions: oxidative dissolution, reactive oxygen species generation and synergistic toxic effects. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, 46, 8731-8738.

Heinlaan, M., Kahru, A., Kasemets, K., Arbeille, B., Prensier, G., Dubourguier, H.C. Changes in the *Daphnia magna* midgut upon ingestion of copper oxide nanoparticles: a transmission electron microscopy study. *Water Res.* **2011**, 45, 179-1790.

Hernández-Guzmán, F.A., Macías-Zamora, J.V., Ramírez-Álvarez, N., Alvarez-Aguilar, A., Quezada-Hernández, C., Fonseca, A.P. Treated wastewater effluent as a source of pyrethroids and fipronil at Todos Santos Bay, Mexico: Its impact on sediments and organisms. *Environ. Toxicol*. **2017**, 36, 3057-3064.

Hidouri, S., Ensibi, C., Landoulsi, A., Daly-Yahia, M.N. Effects of chronic exposure to silver nanoparticles on *Ruditapes decussatus* gills using biochemical markers. *Water Air Soil Pollut*. **2017**, 228, 79-88.

Hogue, M.E., Khosravi, K., Newman, K., Metcalfe, C. Detection and characterization of silver nanoparticles in aqueous matrices using asymmetric-flow field flow fractionation with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2012**, 1233, 109-115.

Holbrook, R.D., Murphy, K.E., Morrow, J.B., Cole, K.D. Trophic transfer of nanoparticles in a simplefied invertebrate food web. *Nat. Nanotechnol.* **2008**, 3, 352-355.

Hossain, Z., Huq, F. Studies on the interaction between Cd^{2+} ions and DNA. *J. Inorg. Biochem*. **2002**, 90, 85–96.

Howard, A.G., On the challenge of quantifying man-made nanoparticles in the aquatic environment. *J. Environ. Monit.* **2012**, 12, 135-142.

Hu, W., Culloty, S., Darmody, G., Lynch, S., Davenport, J., Ramirez-Garcia, S., Dawson, K., Lynch, I., Doyle, H., Sheehan, D. Neutral red retention time assay in determination of toxicity of nanoparticles. *Mar. Environ. Res.* **2015**, 111, 158-161.

Huk, A., Izak-Nau, E., Reidy, B., Boyles, M., Duschl, A., Lynch, I., Dušinska, M. Is the toxic potential of nanosilver dependent on its size? *Par. Fibre. Toxicol.* **2014**, 11, 65-81.

Hull, S.M., Chaurand, P., Rose, J., Auffan, M., Bottero, J.-Y., Jones, J.C., Schultz, I.R., Vikesland, P.J. Filter-feeding bivalves store and biodeposit colloidally stable gold nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, 45, 6592-6599.

Ivask, A., Kurvet, I., Kasemets, K., Blinova, I., Aruoja, V., Suppi, S., Vija, H., Käkinen, A., Titma, T., Heinlaan, M., Visnapuu, M., Koller, D., Kisand, V., Kahru, A. Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells *In vitro*. *PLoS One*, **2014**, 9, doi: 10.1371/journal.pone.0102108.

Jarvis, T.A., Miller, R.J., Lenihan, H.S., Bielmyer, G.K. Toxicity of ZnO nanoparticles to the copedop *Acartia tonsa*, exposed through a phytoplankton diet. *Environ. Toxicol. Chem.* **2013**, 32, 1-6.

Jimeno-Romero, A., Bilbao, E., Izagirre, U., Cajaraville, M.P., Marigómez, I., Soto, M. Digestive cell lysosomes as main targets for Ag accumulation and toxicity in marine mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to maltose-stabilised Ag nanoparticles of different sizes. *Nanotoxicology*, **2017a**, 11, 168-183.

Jimeno-Romero, A., Izagirre, U., Gilliland, D., Warley, A., Cajaraville, M.P., Marigómez, I., Soto, M. Lysosomal responses to different gold forms (nanoparticles, aqueous, bulk) in mussel digestive cells: a trade-off between the toxicity of the capping agent and form, size and exposure concentration. *Nanotoxicology*, **2017b**, 11, 658-670.

Kach, D.J., Ward, J.E. The role of marine aggregates in the ingestion of picoplankton-size particles by suspension-feeding molluscs. *Mar. Biol.* **2008**, 153, 797-805.

Kadar, E., Lowe, D.M., Solé, M., Fisher, A.S., Jha, A.N., Readman, J.W., Hutchinson, T.H. Uptake and biological responses to nano-Fe versus soluble $FeCl_3$ in excised mussel gills. *Anal Bioanal Chem.* **2010**, 396, 657-666.

Kadar, E., Simmance, F., Martin, O., Voulvoulis, N., Widdicombe, S., Mitov, S., Lead, J.R., Readman, J.W. The influence of engineered Fe_2O_3 nanoparticles and soluble $FeCl_3$ iron on the developmental toxicity caused by CO_2-induced seawater acidification. *Environ. Pollut.* **2010**, 158, 3490-3497.

Kadar, E., Tarran, G.A., Jha, A.N., Al-Subiai, S.N. Stabilization of engineered zero-valent nanoiron with Na-acrylic copolymer enhances spermiotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, 45, 3245-3251.

Kadar, E., Cunliffe, M., Fisher, A., Stolpe, B., Lead, J., Shi, Z. Chemical interaction of atmospheric mineral dust-derived nanoparticles with natural seawater — EPS and sunlight-mediated changes. *Sci. Total Environ.* **2014**, 265, 468-469.

Kammer, F., Legros, S., Larsen, E.H., Loeschner, K., Hofmann, T. Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by field-flow fractionation. *Trends Anal. Chem.* **2011**, 30, 425-436.

Kanold, J.M., Wang, J., Brummer, F., Šiller, L. Metallic nickel nanoparticles and their effect on the embryonic development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environ. Pollut.* **2016**, 212, 224-229.

Kashiwada, S. Distribution of nanoparticles in the see-through medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Health Persp.* **2006**, 114, 1697-1702.

Kato, H., Sinhg, S.C., Zeng, H.B., Guo, C., Cai, W. Size determination of nanoparticles by dynamic light scattering, nanomaterials. *Process. and Charact. with Lasers*. **2012**.

Katsumiti, A., Gilliland, D., Arostegui, I., Cajaraville, M.P. Cytotoxicity and cellular mechanisms involved in the toxicity of CdS quantum dots in hemocytes and gill cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol*. **2014**, 153, 39-52.

Katsumiti, A., Arostegui, I., Oron, M., Gilliland, D., Valsami-Jones, E., Cajaraville, M.P. Cytotoxicity of Au, ZnO and SiO_2 NPs using in vitro assays with mussel hemocytes and gill cells: Relevance of size, shape and additives. *Nanotoxicology*, **2016**, 10, 185-193.

Katuli, K.K., Massarsky, A., Hadadi, A., Pourmehran, Z. Silver nanoparticles inhibit the gill Na^+ /K^+ -ATPase and erythrocyte AChE activities and induce the stress response in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotox. Environ. Safe.* **2014**, 106, 173-180.

Kendall, M., Holgate, S. Health impact and toxicological effects of nanomaterials in the lung. *Respirology*, **2012**, 17, 743-758.

Khazri, A., Sellami, B., Dellali, M., Corcellas, C., Eljarrat, E., Barcelo, D., Beyrem, H., Mahmoudi, E. Diastereomeric and enantiomeric selective acuumulation of cypermethrin in freshwater mussel *Unio gibbus* and its effect on biochemical parameters. *Pest. Biochem. and Phys.* **2016**, 129, 83-88.

Kim, S., Choi, J.E., Choi, J., Chung, K.H., Park, K., Yi, J., Ryu, D.-Y. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol. in Vitro,* **2009**, 23, 1076-1084.

Kim, S.T., Yong, Y.J., Hwang, Y.S., Lee, S. Study on aggregation behavior of Cytochrome C–conjugated silver nanoparticles using asymmetrical flow field-flow fractionation. *Talanta,* **2015**, 132, 939-944.

Koehler, A., Marx, U., Broeg, K., Bahns, S., Bressling, J. Effects of nanoparticles in *Mytilus edullis* gills and hepatopancreas – A new threat to marine life? *Mar. Env. Res.* **2008**, 66, 12-21.

Koelmans, A.A., Jonker, M.T.O., Cornelissen, G., Bucheli, T.D., Van Noort, P.C.M., Gustafsson, Ö. Black carbon: the reverse of its dark side. *Chemosphere,* **2006**, 63, 365-377.

Kontreczky, C., Farkas, A., Nemcsók, J., Salánki, J. Short- and long-term effects of deltamethrin on filtering activity of freshwater mussel (*Anodonta cygnea*L.). *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **1997**, 38, 195-199.

Kopecka-Pilarczyk, J. *In vitro* effects of pesticides and metals on the activity of acetylcholinesterase (AChE) from different tissues of the blue mussel, *Mytilus trossulus* L. *J. Environ. Sci. Health Part B*, **2010**, 45, 46-52.

Koukouzika, N., Dimitriadis, V.K. Multiple biomarker comparison in *Mytilus galloprovincialis* from the Greece coast: "Lysosomal membrane stability, neutral red retention, micronucleus frequency and stress on stress". *Ecotoxicology*, **2005**, 14, 449-63.

Köprücü, S., Yonar, E., Seker, E. Effects of deltamethrin on antioxidant status and oxidative stress biomarkers in freshwater mussel, *Unio elongatulus eucirrus. B. Environ. Contam. Tox.* **2008**, 84, 253-257.

Köprücü, K., Yonar, S.M., Şeker, E. Effects of cypermethrin on antioxidant status, oxidative stress biomarkers, behavior, and mortality in the freshwater mussel *Unio elongatulus eucirrus*. *Fisheries Sci.* **2010**, 76, 1007-1013.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* **2009**, 16, 3-11.

Lapresta-Fernández, A., Fernández, A., Blasco, J. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. *TrAC Trends in Anal. Chem*. **2012**, 32, 40-59.

Le, T.T.Y., Zimmermann, S., Sures, B. How does the metallothionein induction in bivalves eet the criteria for biomarkers of metal exposure? *Environ. Pollut*. **2016**, 212, 257-268.

Levak, M., Burić, P., Pavičić-Hamer, D., Lyons, D.M. Impact of bio-corona on silver nanoparticles toxicity to the embryonal development of Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Arch. Ind. Hygiene Toxicol.* **2016**, 67, 32.

Levak, M., Burić, P., Dutour Sikirić, M., Domazet Jurašin, D., Mikac, N., Bačić, N., Drexel, R., Meier, F., Jakšić, Ž., Lyons, D.M. Effect of protein corona on silver nanoparticle stabilization and ion release kinetics in artificial seawater. *Environ. Sci Technol.* **2017**, 51, 1259-1266.

Levard, C., Hotze, E.M., Lowry, G.V. Brown, G.E. Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, 46, 6900-6914.

Lewinski, N.A., Zhu, H., Ouyang, C.R., Conner, G..P, Wagner, D.S., Colvin, V.L., Drezek, R.A. Trophic transfer of amphiphilic polymer coated CdSe/ZnS quantum dots to *Danio rerio*. *Nanoscale*, **2011**, 3, 3030-3083.

Li, Y., Bhalli, J.A., Ding, W., Yan, J., Pearce, M.G., Sadiq, R., Cunningham, C.K., Jones, M.Y., Monroe, W.A., Howard, P.C., Zhou, T., Chen, T. Cytotoxicity and genotoxicity assessment of silver nanoparticles in mouse. *Nanotoxicology*, **2014**, 8, 36-45.

Lin, P.C., Lin, S., Wang, P.C., Sridhar, R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials, *Bitechnol. Adv.* **2014**, 32. 711-726.

Liu, J., Legros, S., Ma, G., Veinot, J.G.C., Von der Kammer, F. Influence of surface functionalization and particle size on the aggregation kinetics of engineered nanoparticles. *Chem.* **2012**, 87, 918-924.

Lopes Rocha, T., Gomes, T., Serrao Sousa, V., Mestre, N.C., Bebianno, J. Ecotoxicological impact of enginerred nanomaterials in bivalve molluscs: an overview. *Mar. Environ. Res.* **2015**, 111, 74-88.

Louie, S.M., Spielman-Sun, E.R., Small, M.J., Tilton, R.D., Lowry, G.V. Correlation of the physicochemical properties of natural organic matter samples from different sources to their effects on gold nanoparticle aggregation in monovalent electrolyte. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, 49, 2188-2198.

Ljosa, V., Sokolnicki, K.L., Carpenter, A.E. Annotated high-throughput microscopy image sets for validation. *Nat. Methods.* **2013**, 9, 637-638.

Ma, S., Lin, D. The biophysicochemical interactions at the interfaces between nanoparticles and aquatic organisms: adsorption and internalization. *Environ. Sci.* **2013**, 15, 145-160.

Magesky, A., De Olivieira Riberio, C.A., Beaulieu, L., Pelletier, E. Silver nanoparticles and dissolved silver activate contrasting immune responses and stress-induced Hsp expression in sea urchin. *Environ. Toxicol. Chem.* **2016**, 36, 1872-1886.

Magesky, A., Pelletier, E. Toxicity of ionic silver and polymer-coated silver nanoparticles with interactions of functionalized carbon nanotubes on early development stages of sea urchin. *Aquat. Toxicol.* **2015**, 167, 106-123.

Maisano, M., Cappello, T., Catanese, E., Vitale, V., Natalotto, A., Giannetto, A., Barreca, D., Brunelli, E., Mauceri, A., Fasulo, S. Developmental abnormalities and neurotoxicological effects of CuO NPs on the black sea urchin *Arbacia lixula* by embryotoxicity assay. *Mar. Environ. Res.* **2015**, 111, 121-127.

Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F., Rocher, B. Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione *S*-transferase. *Aquat. Toxicol.* **2004**, 70, 83-93.

Manno, D., Serra, A., Buccolieri, A., Panzarini, E., Carata, E., Tenuzzo, B., Izzo, D., Vergallo, C., Rossi, M., Dini, L. Silver and carbon nanoparticles toxicity in sea urchin *Paracentrotus lividus* embryos. *BioNanoMaterials*, **2013**, 14, 229-236.

Markus, A.A., Parsons, J.R., Roex, E.W., Voogt, P., Laane, R.W. Modeling aggregation and sedimentation of nanoparticles in the aquatic environment. *Sci. Total Environ*. **2015**, 506, 323-329.

Martino, C., Bonaventura, R., Byrne, M., Roccheri, M., Matranga, V. Effects of exposure to gadolinium on the development of geographically and phylogenetically distant sea urchins species. *Mar. Environ. Res.* **2017**, 128, 98-106.

Massarsky, A., Abrahama, R., Nguyen, K.C., Rippstein, P., Tayabali, A.F., Trudeau, V.L., Moona, T.W. Nanosilver cytotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) 2 erythrocytes and hepatocytes. *Comp. Biochem. Phys. C.* **2013**, 159, 10-21.

Matranga, V., Corsi, I. Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: Model organisms and molecular approaches. *Mar. Environ. Res.* **2012**, 76, 32-40.

Mayor, D.J., Solan, M., Martinez, I., Murray, L., McMillan, H., Paton, G.I., Killham, K. Acute toxicity of some treatments commonly used by the salmonid aquaculture industry to *Corophium volutator* and *Hediste diversicolor*: Whole sediment bioassay test. *Aquaculture*, **2008**, 285, 102-108.

McCarthy, M.P., Carroll, D.L., Ringwood, A.H. Tissue specific responses of oysters, *Crassostrea virginica*, to silver nanoparticles. *Aquat. Toxicol.* **2013**, 138, 123-128.

McNaught, A. D., Wilkinson, A. IUPAC, Compendium of chemical technology, 2. Izdanje, ur., („the Gold Book"), On-line corrected version, Blackwell Scientific Publications, **2007**.

Mesarič, T., Sepčić, K., Drobne, D., Makoved, D., Faimali, M., Morgana, S., Falugi, C., Gambardella, C. Sperm exposure to carbon-based nanomaterials causes abnormalities in early development of purple sea urchin (*Paracentrotus lividus*). *Aquat. Toxicol.* **2015**, 163, 158-166.

Meyera, J.N., Lorda, C.A., Yanga, X.Y., Turnera, E.A., Badireddyb, A.R., Marinakosb, S.M., Chilkotib, A., Wiesnerb, M.R., Auffanb, M. Intracellular uptake and associated toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. *Aquat. Toxicol.* **2010**, 100, 140-150.

Miller, R.J., Lenihan, H.S., Muller, E., Tseng, N., Keller, A.A. Impacts of metal oxide nanoparticles on marine phytoplankton. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, 44, 7329-7334.

Miura, N., Shinohara, Y. Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **2009**, 390, 733-737.

Mock, J.J., Barbic, M., Smith, D.R., Schultz, D.A., Schultz, S. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *J. Chem. Phys.* **2002**, 116, 6755-6759.

Molnar, N., Fong, P.P. Toxic effect of copper, cadmium, and methoxychlor shown by neutral red retention assay in two species of fresh water molluscs. *Environ. Pollut. and Toxicol. J.* **2012**, 3, 65-71.

Moore, N.M., Readman, A.J., Readman, J.W., Lowe, D.M., Frickers, P.E., Beesley, A. Lysosomal cytotoxicity of carbon nanoparticles in cells of the molluscan immune system: An *in vitro* study. *Nanotoxicology*, **2009**, 3, 40-45.

Mortimer, M. Kasemets, K. Kahru, A. Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. *Toxicology*, **2010**, 269, 182-189.

Mouneyrac, C., Buffet, P.E., Poirier, L., Zalouk-Vergnoux, A., Guibbolini, M., Faverney, C.R., Gilliland, D., Berhanu, D., Dybowska, A., Châtel, A., Perrein-Ettajni, H., Pan, J.F., Thomas-Guyon, H., Reip, P., Valsami-Jones, E. Fate and effects of metal-based nanoparticles in two marine invertebrates, the bivalve mollusc *Scrobicularia plana* and the annelid polychaete *Hediste diversicolor*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2014**, 21, 7899-7912.

Mukherjee, S.G., O'Claonadh, N., Casey, A., Chambers, G. Comparative *in vitro* cytotoxicity study of silver nanoparticle on two mammalian cell lines. *Toxicol. In Vitro*, **2012**, 26, 238-251.

Munari, M., Sturve, J., Frenzilli, G., Sanders, M.B., Christian, P., Nigro, M., Lyons, B.P. Genotoxic effects of Ag_2S and CdS nanoparticles in blue mussel (*Mytilus edulis*) haemocytes. *Chem. Ecol.* **2014**, 30, 719-725.

Myrzakhanova, M., Gambardella, C., Falugi, C., Gatti, A.M., Tagliafierro, G., Ramoino, P., Bianchini, P., Diaspro, A. Effects of nanosilver exposure on cholinesterase activities, CD41, and CDF/LIF-like expression in ZebraFish (*Danio rerio*) larvae. *BioMed Res. Int.* **2013**, doi 10.1155/2013/205183.

Nahon, S., Castro Porras, V.A., Pruski, A.M., Charles, F. Sensitivity to UV radioation in early life stages of the Mediterranean sea urchin *Sphaerechinus granularis* (Lamarck). *Sci. Total. Environ.* **2009**, 407, 1892-1900.

Ngoc, T.T.T. The life of nanoparticles in contact with biological media and entities, doktorska disertacija, Universitat Autònoma de Barcelona, **2014**.

Novak, S., Drobne, D., Golobič, M., Zupanc, J., Romih, T., Gianoncelli, A., Kiskinova, M., Kaulich, B., Pelicon, P., Vavpetič, P., Jeromel, L., Ogrinc, N., Makovec, D. Cellular internalization of dissolved cobalt ions from ingested $CoFe_2O_4$ nanoparticles: *in vivo* experimental evidence. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, 47, 5400-5408.

Nowack, B., Bucheli, T.D. Occurence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ. Pollut.* **2007**, 150, 5-22.

Nørgaard Sørensen, S., Baun, A. Controlling silver nanoparticle exposure in algal toxicity testing – A matter of timing. *Nanotoxicology*, **2015**, 9, 201-209.

Njugunja, J., Ansari, F., Sacshe, S., Zhu, H., Rodriguez, V.M. Nanomaterials, nanofillers and nanocomposites: types and properties. *Health Environ. Safety of Nanomat.* **2014**, 1, 3-27.

Oberdörster, E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C_{60}) induce oxidative stress in brain of juvenile largemouth bass. *Environ. Health. Perspect.* **2004a**, 112, 1058-1062.

Oberdörster, E. 2004b. Toxicity of nC_{60} fullerenes to two aquatic species: *Daphnia* and largemouth bass [Abstract]. In: 227th American Chemical Society National Meeting, 27 March–1 April 2004, Anaheim, CA. Washington, DC:American Chemical Society, IEC 21.

Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health. Persp.* **2005**, 113, 823-840.

Oral, R., Bustamante, P., Warnau, M., D'Ambra, A., Guida, M., Pagano, G. Cytogenetic and developmental toxicity of cerium and lanthanum to sea urchin embryos. *Chem.* **2010**, 81, 194-198.

Oral, R., Pagano, G., Giuda, M., Palumbo, A., Siciliano, A., Gravina, M., Lyons, D.M., Burić, P., Levak, M., Thomas, P.J., Giarra, A., Trifuoggi, M. Comparative toxicity of seven rare eart elements in sea urchin early life stages. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, 25, 20803-20810.

Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F., Popovic, R. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2012**, 78, 80-85.

Owens, C.W., Belcher, R.V. A colorimetric micro-method for the determination of glutathione. *Biochem. J.* **1965**, 94, 705-711.

Pagano, G., Cipollaro, M., Corsale, G., Esposito, A., Ragucci, E., Giordano, G.G., Trieff, N.M. The sea urchin: bioassay for the assessment of damage from environmental contaminants. *In: Cairns, J., Jr. (Ed.), Community Toxicity*, **1986**.

Pagano, G., De Biase, A., Doronin, Y.K., Iaccarino, M., Meriç, S., Petruzzelli, D., Tünay, O., Warnau, M., Trieff, N.M. Bauxite manufacturing residues from Gardanne (France) and Portovesme (Italy) exert different patterns of pollution and toxicity to sea urchin embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* **2002**, 21, 1272-1278.

Paramelle, D., Sadovoy, A., Gorelik, S., Free, P., HobleyJ., Fernig, D.G. A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-Visible light spectra. *Analyst*, **2014**, 139, 4855-4861.

Parvez, S., Raisuddin, S. Copper modulates non-enzymatic antioxidants in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to deltamethrin. *Chemosphere*, **2006**, 62, 1324-1332.

Passagne, I., Morille, M., Rousset, M., Pujalté, I., L'azou, B. Implication of oxidative stress in size-dependent toxicity of silica nanoparticles in kidney cells. *Toxicology*, 2012, 229, 112-124.

Patlolla, A.K., Berry, A., May, L., Tchounwou, P.B. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Vicia faba:* A pilot study on the Environmental Monitoring of Nanoparticles. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* **2012**, 9, 1649-1662.

Perić, L., Ribarić, L., Nerlović, V. Cholinesterase activity in the tissues of bivalves Noah's ark shell (*Arca noae*) and warty venus (*Venus verrucosa*): Characterisation and *in vitro* sensitivity to organophosphorous pesticide trichlorfon. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol. Biol*. **2013**, 165, 243-249.

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

Petersen, J., Volz, J., Rauschenbeutel, A. Chiral nanophotonic waveguide interface based on spin-orbit interaction of light. *Science*, **2014**, 346, 67-71.

Petosa, A.R., Jaisi, D. P., Quevedo, I.R., Elimelech, M., Tufenkji, N. Aggregation and deposition of engineered nanomaterials in aquatic environments: role of hysicochemical interactions. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, 44, 6532-6549.

Petrović, S., Semenčić, L., Ozretić, B., Ozretić, M. Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of north Adriatic coastal waters (Croatia). *Mar. Pollut. Bull.* **2004**, 49, 713-720.

Piao, M.J., Kim, K.C., Choi, J.Y., Choi, J., Hyun, J.W. Silver nanoparticles down-regulate Nrf2-mediated 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 through inactivation of extracellular regulated kinase and protein kinase B in human Chang liver cells. *Toxicol. Lett.* **2011**, 207, 143-148.

Piccapietra, F., Allué, C.G., Sigg, L., Behra, R. Intracellular Silver accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* upon exposure to carbonate coated silver nanoparticles and silver nitrate. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, 46, 7390-7397.

Pinna, S., Ceccharelli, G., Sechi, N. Investigating on the occurrence of *Paracentrotus lividus* in rocky and *Posidonia oceanica* habitat. 16th Meeting of the Italian Society of Ecology, **2006**, 19-22.

Pinsino, A., Russo, R., Bonaventura, R., Brunelli, A., Marcomini, A., Matranga, V. Titanium dioxide nanoparticles stimulate sea urchin immune cell phagocytic activity involving TLR/p38 MAPK-mediated signalling pathway. *Sci. Rep.* **2015**, 5, 14492-14504.

Pletikapić, G., Žutić, V., Vinković Vrček, I., Svetličić, V. Atomic force microscopy characterization of silver nanoparticles interactions with marine diatom cells and extracellular polymeric substance. *J. Mol. Recognit.* **2012**, 25, 309-317.

Riberio, F., Gallego-Urrea, J.A., Goodhead, R.M., Van Gestel, C.A.M., Moger, J., Soares, A. M.V.M., Loureiro, S. Uptake and elimination kinetics of silver nanoparticles and silver nitrate by *Raphidocelis subcapitata*: The influence of silver behaviour in solution. *Nanotoxicology*, **2015**, 9, 686-695.

Ringwood., A.H., McCarthy, M., Bates, T.C., Carroll, D.L. The effects of silver nanoparticles on oyster embryos. *Mar. Environ. Res.* **2010**, 69, 49-51.

Sánchez-Quiles, D., Tovar-Sánchez, A. Sunscreens as a source of hydrogen peroxide production in coastal waters. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, 48, 9037-9042.

Sellami, B., Louati, H., Dellali, M., Aissa, P., Mahmoundi, E., Coelho, A.V., Sheehan, D. Effects of permethrin exposure on antioxidant enzymes and protein status in Mediterranean clams *Ruditapes decussatus*. *Environ. Sci. Pollut. Res*. **2013**, 21, 4461-4472.

Sellami, B., Khazri, A., Louati, H., Boufahja, F., Dellali, M., Sheehan, D., Aissa, P., Driss, M.R., Mahmoudi, E., Beyrem, H. Effects of permethrin on biomarkers in Mediterranean clams (*Ruditapes decussatus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. **2014**, 92, 574-578.

Serafim, A., Bebianno, M.J. Metallothionein role in the kinetic model of copper accumulation and elimination in the clam *Ruditapes decussatus*. *Environ. Res.* **2009**, 109, 390-399.

Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffeis, T.G.G., Wright, C.J., Doak, S.H. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, **2009**, 30, 3891-3914.

Smith, C.J., Shaw, B. J., Handy, R.D. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquat. Toxicol.* **2007**, 82, 94-109.

Sondi, I., Dan V.G., Matijević, E. Preparation of highly concentrated stable dispersions of uniform silver nanoparticles. *J. of Colloid Interface Sci.* **2003**, 260, 75-81.

Sondi, I., Salopek-Sondi, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for gram-negative bacteria. *J. of Colloid Interface Sci.* **2004**, 275, 177-182.

Stevenson, R.L. New technology for the characterization of nanometals. *Am. Lab.* **2012**, 15-19.

Street, A., Sustich, R., Duncan, J., Savage, N. Nanotechnology applications for clean water.

Solutions for improving water quality. *Micro and Nanotechnol.* **2008**, 1-704.

Svobodova, Z., Luskova, V., Drastichova, M.J., Svoboda, M., Labek, V. Effect of deltamethrin on haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta. Vet. Brno*, **2003**, 72, 79-85.

Šiller, L., Lemloh, M.L., Pitiicharoenphun, S., Mendis, B.G., Horrocks, B.R., Brümmer, F., Medaković, D. Silver nanoparticles toxicity in sea urchin *Paracentrotus lividus. Environ. Pollut.* **2013**, 178, 498-502.

Tajima, K., da Silva, J.R.M.C., Lawrence, J.M. Chapter 9 Disease in sea urchins. *Dev. Aquacult. Fish. Sci*. **2007**, 37, 167-182.

Tedesco, S., Doyleb, H., Blascoc, J.,Redmondb, G., Sheehana, D. Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol*. **2010**, 100, 178-186.

Tenuzzo, B.A., Zaccarelli, N., Dini, L. The reproductive cycle of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamark, 1816) (Echinodermata: Echinoidea) in the Ionian Sea. *Ital. J. Zool*. **2012**, 79, 200-211.

Thill, A., Zeyons, O., Spalla, O., Chauvat, F., Rose, J., Auffan, M., Flank, A.M. Cytotoxicity of CeO_2 nanoparticles for *Escherichia coli*. Physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism. *Environ. Sci. Technol*. **2006**, 40, 6151-6156.

Tomšić, S., Conides, A., Dupčić radić, I., Glamuzina, B. Growth, size slass frequendy and reproduction of purple sea urchin, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) in Bistrina Bay (Adriatic Sea, Croatia). *Acta Adriat.* **2010**, 51, 67-77.

Toumi, H., Boumaiza, M., Millet, M., Radetski, C.M., Felten, V., Férard, J.F. Is acetylcholinesterase a biomarker of susceptibility in *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) after deltamethrin exposure? *Chemosphere*, **2015**, 120, 351-356.

Tu, H.T., Silvestre, F., De Meulder, B., Thome, J.P., Phoung, N.T., Kestemont, P. Combined effects of deltamethrin, temperature and salinity on oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Chemosphere*, **2012**, 86, 83-91.

Tucca, F., Díaz-Jaramillo, M., Cruz, G., Silva, J., Bay-Schmith, E., Chiang, G., Barra, R. Toxic effects of antiparasitic pesticides used by the salmon industry in the marine amphipod *Monocorophium insidiosum*. *Arch. Environ. Toxicol.* **2014**, 67, 139-148.

Turk, T. Pod površinom Mediterana. Školska knjiga, Zagreb, **2011**.

Tyne, W., Little, S., Spurgeon, D.J., Svendsen, C. Hormesis depends upon the life-stage and duration of exposure: Exaple for a pesticide and a nanomaterial. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* **2015**, 120, 117-123.

Ulm, L., Krivohlavek, A., Jurašin, D., Ljubojević, M., Šinko, G., Crnković, T., Žuntar, I., Šikić, S., Vinković Vrček, I. Response of biochemical biomarkers in the aquatic crustacean *Daphnia magna* exposed to silver nanoparticles. *Environ. Sci. Pollut. Res*. **2015**, 22, 19990-19999.

USEPA. U.S. Environmental Protection Agency, Permethrin, EFED revised risk assessment for the reregistration eligibility decision on permethrin. Washington, DC. 2005, 93.

Van Aerle, R., Lange, A., Moorhouse, A., Paszkiewicz, K., Ball, K., Johnston, B.D., de-Bastos, E., Booth, T., Tyler, C.R., Santos, E.M. Molecular mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Environ. Sci. Technol*. **2013**, 47, 8005-8014.

Van Hoecke, K., De Schamphelaere, K.A.C., Van der Meeren, P., Smagghe, G., Janssen, C.R. Aggregation and ecotoxicity of CeO_2 nanoparticles in synthetic and natural waters with variable pH, organic matter concentration and ionic strength. Environ. Pollut. 2011, 159, 970-976.

Vance, M.E., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., Hochella Jr.M.F., Rejeski, D., Hull, M.S. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2015**, 6, 1769-1780.

Vega, R.L., Epel, D. Stress-induced apoptosis in sea urchin embryogenesis. *Mar. Environ. Res.* **2004**, 58, 799-802.

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Mancinelli, G., Accomando, R., Smaal, A.C., Orunesu, M. Stress on stress response: A simple monitoring tool in the assessment of a general stress syndrome in mussels. *Mar. Environ. Res.* **1995**, 39, 245-248.

Walters, C.R., Cheng, P., Pool, E., Somerset, V. Effect of temperature on oxidative stress parameters and enzyme activity in tissue of Cape River crab (*Potamanautes perlatus*) following exposure to silver nanoparticles (AgNP). *J. Toxicol. Environ. Health*. **2016**, 79, 61-70.

Wang, Y., Zhu, X., Lao, Y., Ly, X., Tao, Y., Huang, B., Wang, J., Zhou, J., Cai, Z. TiO_2 nanoparticles in the marine environment: Physical effects responsible for the toxicity on algae *Phaeodactylum tricornutum*. *Sci. Total Environ*. **2016**, 565, 818-826.

Wang, Z., Yin, L., Zhao, J., Xing, B. Trophic transfer and accumulation of TiO_2 nanoparticles from clamworm (*Perinereis aibuhitensis*) to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) along a marine benthic food chain. *Water Res.* **2016**, 95, 250-259.

Wangensteen, O.S., Turon, X., Casso, M., Palacin, C. The reproductive cycle of the sea urchin *Arbacia lixula* in the northwest Mediterranean: potential influence of temperature and photoperiod. *Mar. Biol.* **2013**, 160, 3157-3168.

Ward, J.E., Kach, D.J. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Mar. Environ. Res*. **2009**, 68,137-142.

Wong, S.W.Y., Leung, P.T.Y., Djuršić, A.B., Leung, K.M.Y. Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: influences of aggregate size and ion solubility. *Anal. Biol. Chem*. **2010**, 396, 609-618.

Woulandri, P., Nagahiro, T., Fukada, N., Kimura, Y., Niwano, M., Tamada, K. Characterization of citrates on gold and silver nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, 438, 244-248.

Wegner, A., Besseling, E., Foekema, E.M., Kamermans, P., Koelmans, A.A. Effects of nanopolystyrene on the feeding behavior of the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Environ. Toxicol. Chem.* **2012**, 31, 2490-2497.

Wu, B., Torres-Duarte, C., Cole, B.J., Cherr, G.N. Copper oxide and zinc oxide nanoparticles act as inhibitors of multidrug resistance transport in sea urchin embryos: Their role as chemosensitizers. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, 49, 5760-5770.

Yoo-iam, M., Chaichanaa, R., Satapanajarua, S., Toxicity, bioaccumulation and biomagnification of silver nanoparticles in green algae (*Chlorella sp*.), water flea (*Moina macrocopa*), blood worm (*Chironomus spp*.) and silver barb (*Barbonymus gonionotus*). *Chem. Spec. Bioavailab.* **2014**, 26, 257-265.

Yoisungnern, T., Choi, Y.-J., Han, J.W., Kang, M.-H., Das, J., Gurunathan, S., Kwon, D.-N., Cho, S.-G., Park, C., Chang, W.K., Chang, B.-S., Parnpai, R., Kim, J.-H. Internalization of silver nanoparticles into mouse spermatozoa results in poor fertilization and compromised embryo development. *Sci. Rep.* **2015**, 5, 1-13.

Zhang, T., Pan, J.-F., Hunt, D.E., Chen, M., Wang, B. Organic matter modifies biochemical but not most behavioral responses of the clam *Ruditapes philippinarum* to nanosilver exposure. *Mar. Environ. Res*. **2017**, doi 10.1016/j.marenvres.2017.10.016.

Zhu, X., Wang, J., Zhang, X., Chang, Y., Chen, Y. Trophic transfer of TiO_2 nanoparticles from daphia to zebrafish in a simplified freshwater food chain. *Chemosphere*, **2010**, 79, 928-933.

Zhu, M., Nie, G., Meng, H., Xia, T., Nel, A., Zhao, Y. Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport and fate. *Acc. Chem. Res*. **2012**. 46, 622-631.

Zimmermann, S., Ruchter, N., Loza, K., Epple, M., Sures, B. Nanoparticulate versus ionic silver: Behaviour in the tank water, bioaccumulation, elimination and subcellular distribution in the freshwater *Dreissena polymorpha*. *Environ. Pollut*. **2017**, 222, 251-260.

Zuykov, M., Pelletier, E., Demers, S. Colloidal complexed silver and silver nanoparticles in extrapallial fluid of *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.* **2011**, 71, 17-21

ŽIVOTOPIS

Petra Burić rođena je 5. studenog 1986. u Puli, Hrvatska. Osnovnu školu završila je u Puli. 2001. upisuje Opću gimnaziju u Puli, a 2005. godine upisuje preddiplomski studij Biotehnologije, na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu. 2008. godine završava preddiplomski studij te upisuje diplomski studij Molekularne biotehnologije na istom fakultetu. Magistrirala je u studenom 2010. godine te stekla naziv magistrice inženjerke molekularne biotehnologije. Magistarski rad, naziva „Određivanje učinka 17 *β*-etinilestradiola na RTG-2 staničnoj liniji riba“ pod vodstvom dr. sc. Višnje Gaurina Srček, redovite profesorice odrađen je u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, u Zagrebu. Od veljače 2011. do listopada 2011. zaposlena je u Plivi, kao Specijalist za registraciju proizvoda. Nakon preseljenja u Pulu, zaposlena je kao znanstveni novak (doktorand) na Institutu Ruđer Bošković, Centru za istraživanje mora u Rovinju, gdje je pod vodstvom mentora izv. prof. dr. sc. Daniela Marka Lyonsa izradila doktorsku disertaciju. Autor je jednog prvoautorskog znanstvenog rada, koautor na četiri znanstvena rada i jedanaest priopćenja s međunarodnih znanstvenih skupova. Stručno se usavršavala na brojnim međunarodnim i nacionalnim radionicama.

ORIGINALNI ZNANTSVENI RADOVI KOJE CITIRA CURRENT CONTENTS

1. **Burić, P.**; Jakšić, Ž.; Štajner, L.; Dutour Sikirić, M.; Jurašin, D.; Cascio, C.; Calzolai, L.; Lyons, D. M.. **Effect of silver nanoparticles on Mediterranean sea urchin embryonal development is species specific and depends on moment of first exposure.** *Marine Environmental Research*. 2015, 111, 50-59 (članak, znanstveni).

2. Oral, R.; Pagano G.; Guida, M.; Palumbo, A.; Siciliano, A.; Lyons, D. M.; **Burić, P**.; Levak, M.; Thomas, P.; Trifuoggi, M. **Comparative toxicity of seven rare earth elements in sea urchin early life stages.** *Environmental Science and Pollution Research*. 2017, 25, 20803-20810 (članak znanstveni).

3. Levak, M.; **Burić, P**.; Dutour Sikirić, M.; Domazet Jurašin, D.; Mikac, N.; Bačić, N.; Drexel, R.; Meier, F.; Jakšić, Ž.; Lyons, D.M **Effect of protein corona on silver nanoparticle stabilization and ion release kinetics in artificial seawater.** *Environmental science & technology*. 2017, **51,** 1259-1266 (članak, znanstveni).

mm

4. Stipić, F.; **Burić, P.**; Jakšić, Ž.; Pletikapić, G.; Dutour Sikirić, M.; Zgrablić, G.; Frkanec, L.; Lyons, D. M.. **Antibody-based donor-acceptor spatial reconfiguration in decorated lanthanide-doped nanoparticle colloids for the quantification of okadaic acid biotoxin**. Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces. 2015, 135, 481-489 (članak, znanstveni).

5. Stipić, F.; Pletikapić, G.; Jakšić, Ž.; Frkanec, Leo.; Zgrablić, G.; **Burić, P.**; Lyons, D. M.. **Application of functionalized lanthanide-based nanoparticles for the detection of okadaic acid-specific immunoglobulin G**. Journal of Physical Chemistry B,. 2015, 119, 1259-1264 (članak, znanstveni).

RADOVI U ZBORNICIMA SKUPOVA I ZBORNICMA SKUPOVA S MEĐUNARODNOM RECENZIJOM

1. **Burić, P.;** Levak, M.; Pavičić-Hamer, D.; Lyons, D. M. **Sensitivity to different sizes of silver nanoparticles in the early life stages of two Mediterranean sea urchins *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758) and *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)** // Abstracts of the 5th Croatian Congress of Toxicology (CROTOX 2016), Arhiv za higijenu rada i toksikologiju 2016;67(Suppl. 1):31-32 / Kopjar, N. (ur.). Zagreb, 2016. (predavanje, domaća recenzija, sažetak,znanstveni).

2. **Burić, P**.; Pfannkuchen, M.; Jakšić, Ž.; Stipić, F.; Lyons, D. M. **Uptake and Impact of engineered nanoparticles on embryonal development and stress response in selected marine organisms** // Abstracts of the 4th Croatian Congress of Toxicology (CROTOX 2012), Arhiv za higijenu rada i toksikologiju 63(Suppl. 2) / Želježić, D (ur.). Zagreb, 2012. 21-21 (predavanje,domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

3. Levak, M.; **Burić, P**.; Pavičić-Hamer, D.; Lyons, D. M**. Impact of bio-corona on silver nanoparticle toxicity to the embryonal development of Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus*** // Abstracts of the 5th Croatian Congress of Toxicology (CROTOX 2016), Arhiv za higijenu rada i toksikologiju 2016;67(Suppl. 1):31-32 / Kopjar, N. (ur.). Zagreb, 2016. (predavanje,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).

4. Lyons, D. M.; **Burić, P**.; Levak, M.; Pavičić-Hamer, D.; Manzo, S.; Schiavo, S.; Oliviero, M.; Khodaparast, Z.; Galante-Oliveira, S.; Barroso, C.; Loureiro, S.; Oliveira, M.; Barreto, A.; Trindade, T. **From wastewaters to estuaries and coastal waters – entry pathways and effects of engineered nanoparticles on brackish and marine organisms** // *Proceedings of the Final Conference of COST Action ES1205* / Duester, Lars (ur.). Aveiro, 2017. 28-30 (pozvano predavanje,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).

5. Lyons, D. M.; Levak, M.; **Burić, P**.; Domazet Jurašin, D.; Dutour Sikirić, M.; Mikac, N.; Meier, F.; Welz, R. **Effect of surface coating on nanoparticle stability and fate in high strength electrolytes – silver nanoparticles in marine waters** // *Book of Abstracts*. Nantes, 2016. 117-117 (predavanje,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).

6. Lyons, D. M.; **Burić, P.**; Pfannkuchen, M. A.; Godrijan, J.; Gilliland, D.; Jakšić, Ž. **Trophic transfer and biomagnification of nanoparticles on transition from freshwater to marine environment** // 7. International Nanotoxicology Congress - Nanotox 2014, Programme & Abstracts Book / Fadeel B., Kagan V. i Karakaya A.E. (ur.). Antalya, 2014. 199-200 (poster, međunarodna recenzija, sažetak).

7. Levak, M.; **Burić, P.**; Domazet Jurašin, D.; Dutour Sikirić, M.; Calzolai, L.; Lyons, D. M.**. Evaluation of AF4 for the fractionation of protein-coated silver nanoparticles in artificial seawater** //2016. *Book of Abstracts* (poster,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).

8. Jakšić, Ž.; **Burić, P.**; Štajner, L.; Lyons, D. M.. **The effect of industrially-relevant engineered nanoparticles on marine invertebrates** // 9th NanoBio-Europe Conference Abstract Booklet. Toulouse, Francuska, 2013. 94-95 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

9. Lyons, D. M.; Stipić, F., Pletikapić, G.; Jakšić, Ž., Frkanec, L.; **Burić, P**. **Application of functionalized lanthanide nanoparticles for the detection of algal biotoxins** //Programme Book – Third International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, 3-7 March, 2013, Sorrento, Italy.

10. Stipić, F.; Jakšić, Ž.; **Burić, P.**; Lyons, D. M.; Pletikapić, G.; Svetličić, V.; Frkanec, L. **Nanoparticle-based detection of the marine toxin okadaic acid** // 8th NanoBio-Europe Conference Technical program. Varese, Italija, 2012. 82-82 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

11. Stipić, F.; Pletikapić, G.; Svetličić, V.; Jakšić, Ž.; Frkanec, L.; **Burić, P.**; Lyons, D. M. **Luminescence resonance energy transfer as a new detection technique for marine biotoxines** // Abstracts of the 4th Croatian Congress of Toxicology (CROTOX 2012), Arhiv za higijenu rada i toksikologiju 63(Suppl. 2) / Želježić, D (ur.). Zagreb, 2012. 33-33 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

12. Stipić, F.; Pletikapić, G.; Svetličić, V.; Jakšić, Ž.; Frkanec, L.; **Burić, P.**; Lyons, D. M. **Nanoparticle-based detection of the marine toxin okadaic acid // Abstracts of the Marine Microbiology and Biotechnology**, 2012 Confrence.Cork, Irska, 2012. 52-52 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

13. Nižić, I.; Radoš, I.; **Burić, P.**; Cvjetko, M.; Vorkapić-Furač, J. **Priprava supstituiranih imidazolijevih i piridinijevih kvaternih soli, potencijalnih ionskih tekućina** // Zbornik radova XII. Ružičkini dani. (poster, domaća recenzija, sažetak,znanstveni).

STRUČNO USAVRŠAVANJE

1. Međunarodna radionica naslova: "Cryo Electron microscopy and 3D image processing", Lecce, Italija, 18. – 20. travnja 2016.
2. Međunarodna radionica naslova "Principles of Toxicology" održanom od strane Hrvatskog toksikološkog društva pod pokroviteljstvom Europskog toksikološkog društva, Zagreb, Hrvatska, 4. – 8. travnja 2016.
3. Međunarodna radionica naslova: "Advanced course on detection, quantification, and modeling strategies for environmental Engineered NanoMaterials", Belvaux, Luksemburg, 3. – 5. ožujka 2015.
4. Međunarodna radionica naslova: "Intelligent testing strategy for engineered nanomaterials", Venecija, Italija, 21. ožujka 2013.
5. Međunarodna radionica naslova: "Implications of Nanomaterials: A hands on course on Synthesis, Characterization, and Ecotoxicology, 5th Edition" Aveiro, Portugal, 6. – 10. svibnja 2012.
6. Međunarodna radionica naslova: "Understanding and manipulating enzymatic and proteomic processes in biomineralization – towards new biomimetic strategies, the creation of tailored nano-scale architectutes and environmental monitoring" Bukurešt, Rumunjska, 7. – 11.svibnja 2012.