

Uloga prirodne organske tvari u smanjenju embriotoksičnosti kroz oslobađanje iona s površine metala u morskoj vodi

Modrušan, Vanja

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Pula / Sveučilište Jurja Dobrile u Puli**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:137:518613>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula](#)



Sveučilište Jurja Dobrile u Puli
Fakultet prirodnih znanosti
Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

VANJA MODRUŠAN

**ULOGA PRIRODNE ORGANSKE TVARI U SMANJENJU
EMBRIOTOKSIČNOSTI KROZ OSLOBAĐANJE IONA S POVRŠINE
METALA U MORSKOJ VODI**

Završni rad

Pula, rujan, 2022.

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli
Fakultet prirodnih znanosti
Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

VANJA MODRUŠAN

**ULOGA PRIRODNE ORGANSKE TVARI U SMANJENJU
EMBRIOTOKSIČNOSTI KROZ OSLOBAĐANJE IONA S POVRŠINE
METALA U MORSKOJ VODI**

Završni rad

JMBAG: 0303091218, redovna studentica

Studijski smjer: Znanost o moru

Predmet: Nanotehnologija u istraživanju mora

Mentor: prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

Komentor: Ivana Čarapar mag. oecol.

Pula, rujan, 2022.



IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisana VANJA MODRUŠAN, kandidat za prvostupnicu ZNANOSTI O MORU ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mogega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na objavljenu literaturu kao što to pokazuju korištene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da niti jedan dio Završnog rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da nijedan dio rada nije iskorišten za koji drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

Studentica: Vanja Modrušan

U Puli, 23. rujna 2022. godine.



IZJAVA o korištenju autorskog djela

Ja, VANJA MODRUŠAN dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom „Uloga prirodne organske tvari u smanjenju embriotoksičnosti kroz oslobađanje iona s površine metala u morskoj vodi“ koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu s Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnoga pristupa znanstvenim informacijama.

Za korištenje autorskog djela na gore navedeni način ne potražujem naknadu.

U Puli, 23. rujna 2022. godine.

Potpis

Ovaj rad izrađen je u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju pod vodstvom prof. dr. sc. Daniela Marka Lyonsa. Predan je na ocjenu Sveučilišnom preddiplomskom studiju Znanost o moru Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli radi stjecanja zvanja prvostupnice (baccalaureus) Znanosti o moru.

Voditelj Sveučilišnog preddiplomskog studija Znanost o moru je za mentora završnog rada imenovao prof. dr. sc. Daniela Marka Lyonsa i za komentoricu Ivanu Čarapar mag. oecol.

Povjerenstvo za ocjenjivanje i obranu:

Predsjednik: doc. dr. sc. Petra Burić

Fakultet prirodnih znanosti, Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Član: doc. dr. sc. Ines Kovačić

Fakultet prirodnih znanosti, Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Mentor: prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

Centar za istraživanje mora, Institut Ruđer Bošković, Rovinj

Datum i mjesto obrane završnog rada: 23. rujna, 2022.; Sveučilište Jurja Dobrile u Puli.

Ovaj je završni rad izrađen u Laboratoriju za morsku nanotehnologiju i biotehnologiju Centra za istraživanje mora, Institut Ruđer Bošković, pod vodstvom prof. dr. sc. Daniela Marka Lyonsa, u sklopu Sveučilišnog preddiplomskog studija Znanosti o moru na Fakultetu prirodnih znanosti Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli. Rad je vezan uz projekt Hrvatske zaklade za znanost IP-2018-01-5351 pod naslovom “Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava i toksičnosti nanočestica srebra, bakra i plastike kao potencijalno štetnih novih materijala u obalnim vodama”.

ZAHVALA

Zahvaljujem svom mentoru i profesoru dr. sc. Danielu Marku Lyonsu na uloženom vremenu, trudu i strpljenju prilikom izrade ovog završnog rada. Ovim putem zahvaljujem i asistentici Ivani Čarapar na pomoći i savjetima. Također, od srca zahvaljujem svojim roditeljima, sestri i Damiru na potpori.

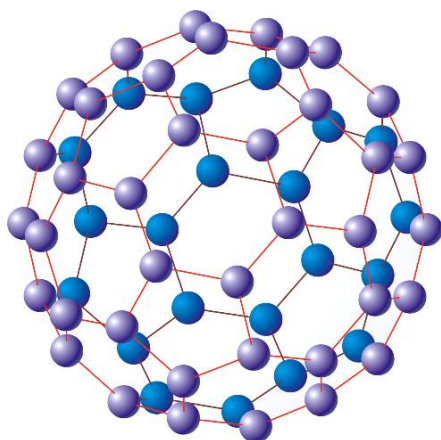
SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Nanočestice	1
1.1.1. Srebrne nanočestice	4
1.2. Prirodna organska tvar.....	5
1.2.1. Huminske tvari	6
1.2.2. Alginat.....	7
1.2.3. Goveđi serumski albumin	8
1.3. UV/VIS spektrofotometrija	9
1.4. Ježinci u toksikološkim istraživanjima.....	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	14
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Kemikalije.....	15
3.2. Karakterizacija čestica	15
3.3. Test embrionalnog razvoja ježinca.....	16
3.3.1 Sakupljanje ježinaca, izdvajanje gameta i oplodnja	16
3.3.2. Tretiranje embrija ježinaca	18
3.3.3. Uspješnost dosezanja larvi u stadiju pluteusa	18
3.4. Statistička obrada podataka	19
4. REZULTATI.....	20
4.1 Karakterizacija čestica.....	20
4.2 Brojanje larvi 72 h nakon oplodnje	24
5. RASPRAVA.....	29
6. ZAKLJUČAK	33
7. LITERATURA.....	34

1. UVOD

1.1. Nanočestice

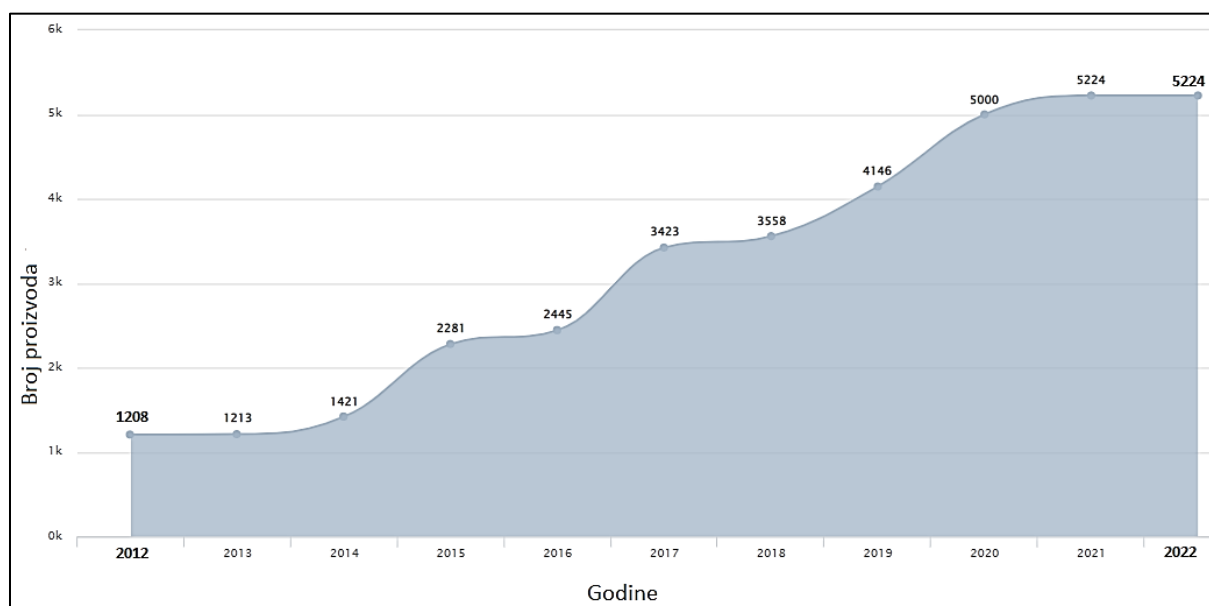
Nanočestice (engl. *nanoparticles*, NP) su 2008. godine prema ISO (International Organization for Standardization) definirane kao „čestice s barem jednom dimenzijom manjom od 100 nm“ (Biswas i Wu, 2005; Christian i sur., 2008; Klaine i sur., 2008). Prefiks „nano“ (grčki *nanos*, patuljak) podrazumijeva veličinu mjerenu u nanometrima, gdje 1 nm iznosi 10^{-9} metara (Zaračko, 2017). Za njihovo otkriće spominju se Robert F. Curl, Harold W. Kroto i Richard E. Smalley koji su 1985. otkrili „buckyballs“, prvi i najmanji fuleren (Slika 1), organsku tvar koja se sastoji od ugljikovih atoma poredanih u obliku pravilnih poliedara sa šupljinom u sredini. Spomenuta struktura fulerenu omogućuje veću električnu vodljivost i visoku čvrstoću za razliku od drugih alotropskih modifikacija ugljika (dijamanta i grafita) (Delgado i sur., 2013). Ideja o nanotehnologiji kao znanstvenoj disciplini započinje govorom Richarda Feynmana koji je na znanstvenom skupu 1959. godine dao ideju o manipulaciji materijala na razini atoma. Time je izazvao interes mnogih znanstvenika čija su istraživanja dovela do velikih otkrića „nano svijeta“. Danas je nanotehnologija jedna od brzo rastućih disciplina koja je našla široku primjenu u biomedicini, poljoprivredi, farmaceutskoj, kozmetičkoj i elektronskoj industriji (Hulla i sur., 2015). Bavi se proizvodnjom nanomaterijala (engl. *nanomaterial*, NM), „prirodnih ili industrijski proizvedenih materijala koji sadrže čestice u nevezanom stanju, u obliku aglomerata ili agregata, a barem 50% takvih čestica ima najmanje jednu vanjsku dimenziju manju od 100 nm“ (Europska komisija, 2011).



Slika 1. Fuleren (buckyballs) (Preuzeto s: <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=fuleren>).

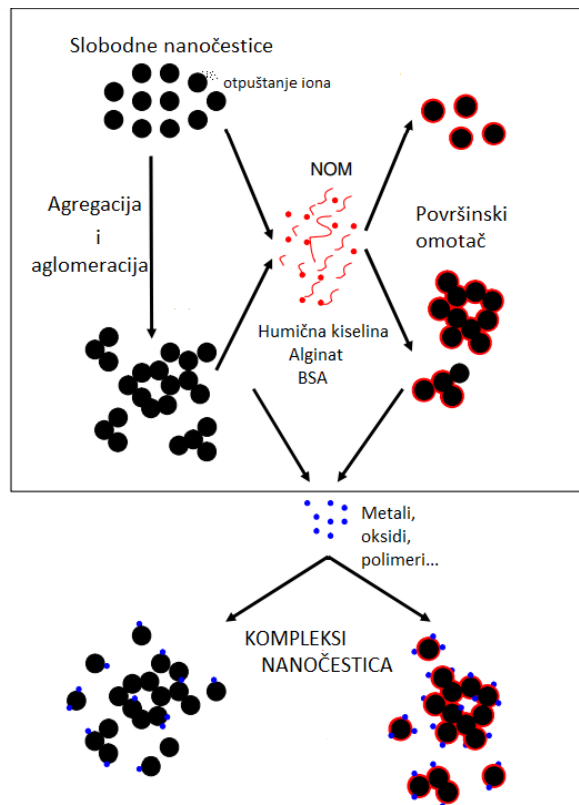
Smanjenjem čestica na nano skalu pridodaju im se nova svojstva. Glavno obilježje im je veliki omjer površine naspram volumena iz kojeg proizlaze preostala svojstva koja ih karakteriziraju: dobra katalitička sposobnost, visoka reaktivnost i sklonost aglomeraciji. Smanjenjem veličine čestica dolazi do povećanja broja atoma na njezinoj površini obzirom na unutrašnjost, zbog čega čestice lakše stupaju u interakciju s okolinom (Chaturvedi i sur., 2012). Osim što su manje čestice reaktivnije, poznato je kako se smanjenjem čestica povećava i njihova toksičnost zbog specifične površine koja otpušta više iona. Dodatna specifičnost nanočestica je kvantni efekt koji je rezultat ograničenih kretnji elektrona, zbog čega mijenjaju optička, električna i magnetna svojstva (Zaračko, 2017). Obzirom na podrijetlo nanočestice mogu biti prirodne ili umjetne. Biogeni magnetit, feritin (protein 12 nm) i čestice nastale erupcijom vulkana čine prirodne nanočestice koje ne predstavljaju prijetnju živim organizmima jer su s njima u kontaktu od davnina (Klaine i sur., 2008). Za razliku od njih, umjetno proizvedene nanočestice (engl. *engineered nanoparticles*, ENP) su dokazane da uzrokuju toksične učinke kod sisavaca i morskih beskralježnjaka. Razlog njihove toksičnosti je poseban dizajn koji im omogućuje veliku reaktivnost s drugim tvarima, interakciju s prirodnim membranama i prolazak kroz ciljana tkiva (Burić, 2018). Nanočestice s vremenom otpuštaju ione s površine, koji će pri doticaju sa živim organizmima uzrokovati oksidacijska oštećenja, proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta (eng. *Reactive oxygen species*, ROS) i posljedično dovesti do raznih poremećaja u ranim razvojnim fazama ili promjene u imunološkom odgovoru organizma. Koliko će nanočestice biti toksične za neki organizam ovisi o njihovoj veličini, kemijskom sastavu i obliku (Magesky i Pelletier, 2018). Ta svojstva se kontrolirano dobivaju manipulacijom temperature, pH vrijednostima, koncentracijom i modifikacijom površine prilikom proizvodnje. Postoje dva osnovna procesa sinteze nanočestica koja se odabiru ovisno o željenim svojstvima. „*Top down*“ metoda se zasniva na dobivanju nanočestica usitnjavanjem izvornog materijala, dok se „*Bottom up*“ metoda zasniva na slaganju atoma ili molekula na uređen način tvoreći složene strukture (Horikoshi i Serpone, 2013). Prema Nanodatabase 2022. godine proizvodnja nanočestica je u zadnjih deset godina eksponencijalno porasla za 332.45%, te se danas se na tržištu nalazi 5 224 nanomaterijala (Slika 2). Nanočestice se koriste u proizvodnji materijala kako bi im poboljšale svojstva poput čvrstoće, izdržljivosti, reaktivnosti, električne vodljivosti, otpornosti i slično. Nanočestice koje se danas često mogu pronaći na tržištu su

nanočestice titanija (TiNP), srebra (AgNP), silicija (SiNP), bakra (CuNP), cerijeve dioksida (CeO₂ NP) i željezova oksida (Fe/Fe₂O₃ NP) (Burić, 2018).



Slika 2. Broj nanoproizvoda na tržištu od 2012 do 2022 godine (Preuzeto s: <https://nanodb.dk/en/analysis/consumer-products/#chartHashsection>).

Zbog brzog razvoja nanotehnologije, kao istraživačke i inženjerske discipline, dolazi do sve veće emisije nanočestica u okoliš, što dovodi u pitanje sigurnost čovjeka i ostalih organizama (Delay i sur., 2011). Naime, nanočestice vrlo lako dopijevaju u okoliš nakon upotrebe ili prilikom proizvodnje, a najčešći putevi unosa su otpadnim vodama, ispiranjem tla ili atmosferskim donosom (Klaine i sur., 2008). Njihovo ponašanje u vodenim ekosustavima je vrlo kompleksno te ovisi o raznim fizikalno-kemijskim uvjetima poput pH, ionske jakosti, vrsti iona i njegovoj koncentraciji. Zbog slabe topivosti, zadržavaju se u vodenom stupcu, talože se na dno ili bivaju podvrgnute procesima kao što su agregacija, aglomeracija i otapanje (Slika 3). Aglomeracija je spajanje čestica slabim Van der Waalsovima silama, a agregacija je gusta nakupina čestica povezana jakim vodikovim vezama (Burić, 2018). Nanočestice stupaju u interakciju s raznim komponentama u vodi kao što su metali, oksidi, polimeri te organska tvar. Vezanjem takvih spojeva na površinu nanočestice mijenja se njezina stabilnost i biodostupnost živoj bioti (Christian i sur., 2008).



Slika 3. Ponašanje nanočestica u vodenom mediju (Prilagođeno prema Christian i sur., 2008).

1.1.1. Srebrne nanočestice

Srebrne nanočestice su danas široko korištene na tržištu, gdje se trenutno nalazi 563 proizvoda (10.77% NM koji se danas nalaze na tržištu sadrže AgNP) (Nanodatabase, 2022). Imaju široku primjenu zbog jedinstvenih svojstva kao što su visoka eklektična i termička vodljivost, visoka kemijska stabilnost, dobra katalitička i antimikrobiološka aktivnost. Najveću primjenu su našle u farmaceutskoj, medicinskoj, kozmetičkoj i mikroelektroničkoj industriji. Njihova upotreba je poznata još iz davnina, gdje su se koristile za održavanje čistoće vode i u medicinske svrhe. Upravo zbog široke primjene, neizbježno je da nanočestice srebra dospiju u okoliš, što je nepoželjno zbog toksičnog djelovanja na organizme i ljude (Delay i sur., 2011). Srebrne nanočestice u morskoj vodi, zbog velike ionske jakosti, stvaraju agregate i aglomerate te se s vremenom otapaju i otpuštaju ione s površine (Šiller i sur., 2013). Srebrne nanočestice su vrlo česte u toksikološkim istraživanjima, posebice kod ispitivanja utjecaja na vodene organizme. Morske vrste koje se istražuju su najčešće osjetljive skupine organizama kao što su mnogočetinaši, mekušci, rakovi i bodljikaši (García-Alonso i sur., 2011; Wang i sur., 2014; Burić i sur., 2015; Walters i sur., 2016; Bouallegui i sur., 2018; Magesky i Pelletier, 2018).

1.2. Prirodna organska tvar

Prirodna organska tvar (engl. *Natural organic matter*, NOM) je kompleksna smjesa organskih spojeva široko rasprostranjena u tlu, prirodnoj vodi i sedimentu. Nastala je raspadanjem materijala biljnog ili životinjskog porijekla te kao nusprodukt algi, biljaka i bakterija (Chen i sur., 2002). Čine ju spojevi s različitim fizikalno kemijskim svojstvima, kao što su polarnost, kiselost, naboj, molekulska masa i biorazgradivost (Parsons i sur., 2004). Koncentracija u okolišu varira od 0.1 do 10 mg C/L te uvelike ovisi o biogeokemijskim i klimatskim uvjetima (Baalousha i sur., 2018). NOM ima važnu ulogu u vodenim ekosustavima jer osigurava zalihu energije za vodene organizme, štiti ih od UV zračenja, te ima važnu ulogu u globalnom ciklusu ugljika. Stupa u interakciju s raznim antropogenim spojevima i time mijenja bioraspoloživost, pokretljivost te konačnu sudbinu onečišćivala i metala u okolišu. U slučaju viška organske tvari, dolazi do povećanja koncentracije hranjivih soli i proliferacije algi koje sa sobom donosi negativne posljedice (Minor i sur., 2014). NOM se u vodenim medijima može nalaziti u obliku čestica (engl. *particulate organic matter*, POM) veličine $> 1.0 \mu\text{m}$, koloida (engl. *colloidal organic matter*, COM) $1.0 - 0.22 \mu\text{m}$ i otopine (engl. *dissolved organic matter*, DOM) $< 0.22 \mu\text{m}$ (Schmit i Wells, 2002). Organska tvar je glavni spremnik ugljika zbog čega se može izraziti i u obliku ukupnog organskog ugljika (engl. *total organic carbon*, TOC) koji se dijeli na čestični (engl. *particulate organic carbon*, POC) i otopljeni organski ugljik (engl. *dissolved organic carbon*, DOC) (Kornegay i sur., 2000). Koncentracija čestične organske tvari ovisi o više čimbenika, no u većini vodenih ekosustava POC čini 10%, a DOC 90% od ukupnog organskog ugljika. Koncentracija DOC-a prvenstveno ovisi o vrsti površinske vode, godišnjem dobu te unosu POC-a rijekama ili cvjetanjem algi (Burić, 2021). Obzirom na podrijetlo, organsku tvar u morskim ekosustavima dijelimo na autohtonu i alohtonu. Autohtona organska tvar nastaje cvjetanjem algi i cijanobakterija, te ovisno o uvjetima može činiti 5 – 100% koncentracije DOC-a. Sastoji se od raznih spojeva kao što su: mono- i polisaharidi, aminokiseline, peptidi, proteini, lipidi, nukleinske, organske i masne kiseline (Henderson i sur., 2008.). Alohtona organska tvar ima podrijetlo iz kopnenih ekosustava, te u morski ekosustav ulazi atmosferom, ispiranjem tla, podzemnim vodama ili rijekama. Sastoji se od hidrofobnih komponentni kao što su humusne tvari (88%), biljni otpad (7%) i raspadnuti organski materijal (1.5%) (Aitkenhead-Peterson i sur., 2003; Dotson i Westerhoff, 2009). Većoj koncentraciji alohtone organske tvari doprinose i

antropogeni izvori kao što su sustavi obrade otpadnih voda, oborinski ispusti, ispiranje poljoprivrednih površina te industrijska ispuštanja. Takva antropogena organska tvar značajno doprinosi povećanju koncentracije dušika (Imai i sur., 2001.) Koncentracija NOM-a je često niža u izvorima podzemnih voda jer je tamo podvrgnuta adsorpciji i procesima mikrobne razgradnje. Najveće koncentracije su zamijećene ljeti i u jesen kada je temperatura viša, veća je biološka aktivnost i česte su oborine visokog intenziteta i kratkog trajanja (Kornegay i sur., 2000).

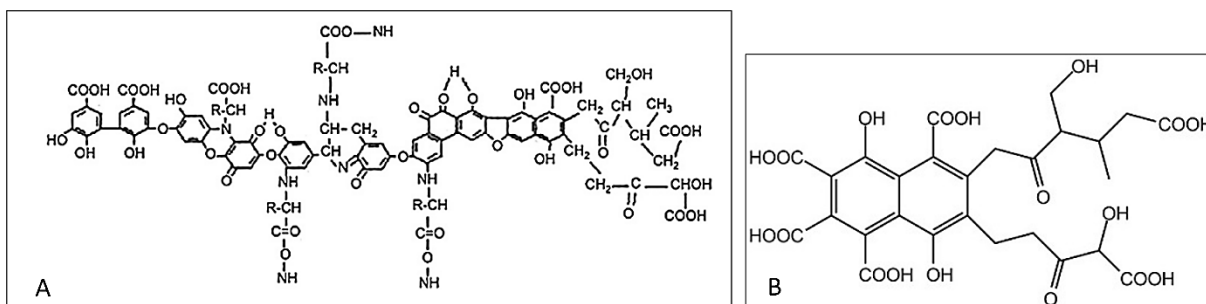
Glavne komponente NOM-a su huminske tvari, polisaharidi (alginat), proteini te drugi organski spojevi (Wang i sur., 2016).

1.2.1. Huminske tvari

Huminske tvari su prirodne komponente prisutne u gornjem sloju tla, bogate ugljikom i vodikom, nastale kao nusprodukt metabolizma organske tvari. Prema Parsons i sur. (2004) humusne tvari doprinose čak 50% DOC-a, te čine 65 – 75% organske tvari u tlu. Glavne komponente su joj humične i fulvične kiseline (Slika 4) koje izravno utječu na važna svojstva i dinamiku plodnosti tla (Pettit, 2004; Gluhić, 2017).

Humična kiselina je heterogena smjesa organskih spojeva, nastala raspadanjem biljnih i životinjskih ostataka u tlu, vodi i sedimentima (de Melo i sur., 2016). Topiva je u bazama, zbog čega se lako ekstrahira kalijevom ili natrijevom lužinom, a taloži se u kiselinama. Sastoji se od ugljika (50 – 60%), vodika (2.8 – 6%), kisika (31 – 40%) i dušika (2 – 6%), a prosječna molekulska masa iznosi do 5 kDa (Gluhić, 2017). Humična kiselina je amfipatska molekula zbog prisutnosti karboksilne i fenolne skupine, što joj omogućuje stvaranje veznih mjesta za određene anorganske spojeve poput teških metala i metalnih nanočestica (Pettit, 2004; Grillo i sur., 2015). Iz tog razloga, humične kiseline su ekološki vrlo važne zbog redukcije toksičnosti i akumulacije štetnih tvari u okolišu (Zaračko, 2017).

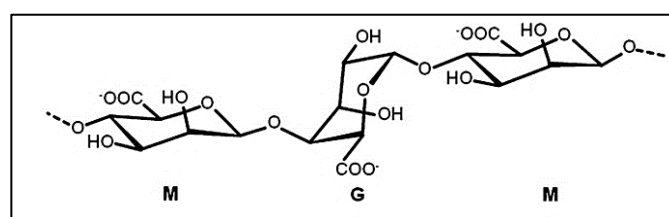
Fulvična kiselina je kompleks organskih spojeva, žute do crvenkaste boje, čije su soli topive u vodi, bazama i kiselinama (Chen i sur., 2002). U njezinom sastavu nalaze se polisaharidi i fosforni spojevi. Za razliku od humične, fulvične kiseline imaju manji udio ugljika, više kisika i 7 – 10% pepela. Imaju manju molekulsku masu (2 kDa), više hidrofilnih funkcionalnih grupa, te veću biološku aktivnost (Wang i sur., 2016). Fulvične kiseline mogu stvarati kompleksne spojeve, gdje su kompleksi s aluminijem (Al) i željezom (Fe) od posebnog značaja za tlo (Gluhić 2017).



Slika 4. Kemijska struktura humične (A) i fulvične (B) kiseline (Preuzeto s: https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB4855060_EN.htm).

1.2.2. Alginat

Alginat je sol alginske kiseline koja se dobiva ekstrahiranjem iz stanične stijenke smeđih algi razreda Phaeophyceae. Neke od vrsta koje se koriste su: *Laminaria hyperborea*, *L. digitata*, *L. japonica*, *Macrocystis pyrifera* i *Ascophyllum nodosum*. Osim iz smeđih algi, alginat se može dobiti i pomoću bakterijske biosinteze. Prednost bakterijske biosinteze je veća količina dobivenog alginata s definiranim željenim kemijskim strukturama i fizikalnim svojstvima. Za takvu proizvodnju koriste se bakterije roda *Azotobacter* i *Pseudomonas*, a trenutno se takav način proizvodnje alginata koristi u biomedicinske svrhe (Lee i Mooney, 2012). Zbog velike biokompatibilnosti, niske toksičnosti, relativno niske cijene, alginat je našao veliku primjenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji (Tønnesen i Karlsen, 2002). Uz to, zbog velike strukturalne sličnosti s ljudskim tkivom, alginat ima primjenu u zacjeljivanju rana, transplantaciji stanica, prijenosu malenih lijekova i proteina. Alginska kiselina je linearni polimer koji se sastoji od dva monomera, D-manuronske kiseline koja čini M blok i L-guluronske kiseline koja čini G blok (Slika 5) (Lee i Mooney, 2012). Omjer M i G blokova, duljina i molekulska težina su glavni čimbenici koji utječu na fizikalna svojstva alginata. Sama struktura spoja i dužina navedenih blokova je različita ovisno o izvoru alginata. Trenutno je poznato više od 200 različitih struktura alginata (Draget i sur., 1997).



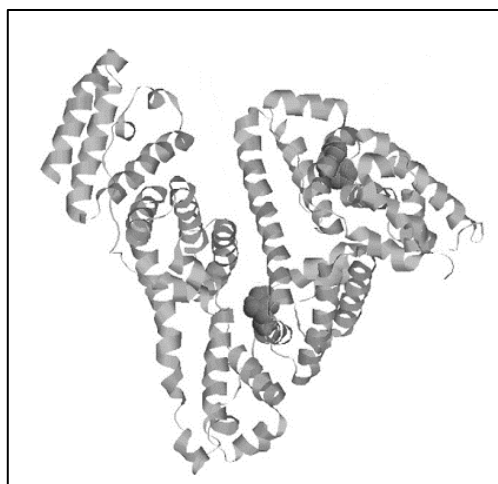
Slika 5. Struktura alginata (Lee i Mooney, 2012).

1.2.3. Goveđi serumski albumin

Serumski albumini su jedni od najzastupljenijih (52 – 62%) proteina ukupne vodotopive frakcije u krvnoj plazmi. Zbog svoje fiziološke uloge vrlo su bitne makromolekule koje služe za prijenos i distribuciju različitih egzogenih ili endogenih tvari u tijelu. Jedni od najvažnijih predstavnika serumskih albumina su humani serumski albumin (engl. *human serum albumin*, HSA) i goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA) (Jahanban-Esfahlan i sur., 2019).

HSA je najzastupljeniji protein u ljudskoj plazmi s koncentracijom od 35 – 50 g/L kod zdravih ljudi, te predstavlja oko 60% mase svih proteina u plazmi. Sintetizira se u hepatocitima kao jednonančani protein relativne molekulske mase od 66.5 kDa, a sastoji se od 585 aminokiselinskih ostataka te je strukturalno vrlo sličan BSA proteinu (Rimac, 2017).

BSA je globularni protein dobiven iz goveđih stanica. Zbog svoje dobre topivosti i velikog fiziološkog značaja te primjene u biomedicinske svrhe često je korišten protein u laboratorijskim istraživanjima. Jedna od glavnih funkcija ovog proteina je vezanje i transport masnih kiselina, steroida, lijekova i metala. Sadrži sulfhidrilnu skupinu koja veže ROS-ove čime sprječava oksidacijski stres u tijelu (Crnković, 2016). Struktura BSA prikazana na Slici 6, sadrži jedan polipeptidni lanac s 583 aminokiselina, strukturu podupiru 17 disulfidnih mostova aminokiseline cistein, a molekulska težina iznosi otprilike 66.8 kDa. Trodimenzionalni BSA je scolikog oblika, te sadrži tri strukturno slične domene oblika α uzvojnice (I, II i III) s dvije poddomene (A i B) koje pridodaju posebne značajke proteinu (Jahanban-Esfahlan i sur., 2019).



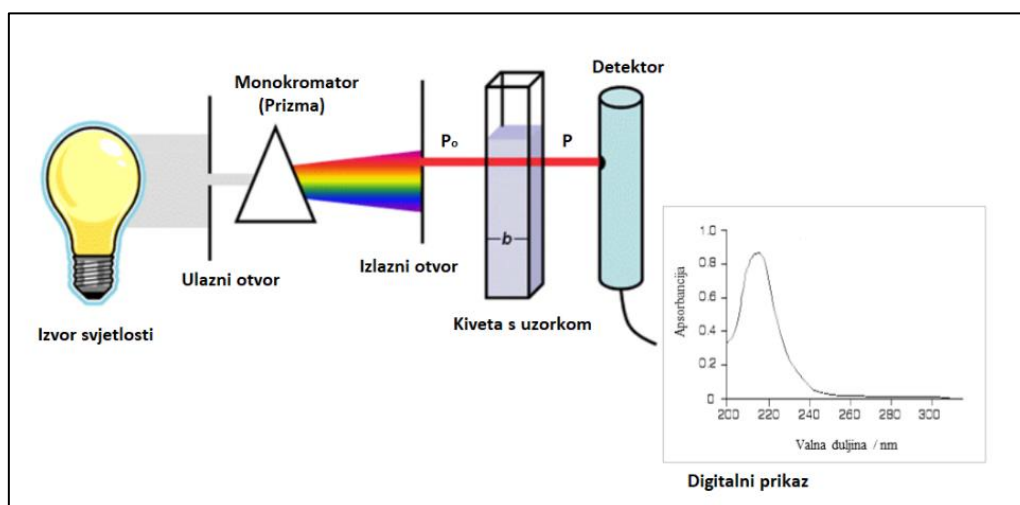
Slika 6. Struktura BSA proteina (prema modelu HSA) (Zhao i sur., 2011).

1.3. UV/VIS spektrofotometrija

Spektroskopija je grana fizike koja se bavi proučavanjem kvantitativnih i kvalitativnih svojstva tvari uz korištenje raspršenja elektromagnetskog zračenja, a ispitivane tvari mogu biti u tekućem ili krutom stanju. Za istraživanje optičkih svojstava nanočestica i prirodne organske tvari, u ovom radu korištena je spektrometrija u ultraljubičastom (200 – 400 nm) i vidljivom (400 – 800 nm) dijelu spektra. Primjenom UV/Vis spektroskopije mogu se pratiti procesi taloženja čestica i agregiranja s vremenom, ali i interakcija NP-a i NOM-a (Burić, 2018). UV/VIS spektrofotometar mjeri količinu elektromagnetskog zračenja koje prolaskom kroz prizmu (monokromator) odašilje valove s određenom valnom duljinom. Prolaskom kroz uzorak, dio zračenja se apsorbira, a preostalo zračenje dalje prolazi do detektora i izražava se kao apsorbanca (Slika 7). Koncentracija ispitivane tvari može se izračunati pomoću Beer-Lambertove jednadžbe:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Pri čemu oznaka ε označava apsorpcijski koeficijent, b duljinu puta svjetlosti koja je prošla kroz uzorak, a c koncentraciju tvari u uzorku (Burić, 2021). S povećanjem veličine čestica, apsorpcijski maksimum se pomiče prema višim valnim duljinama. AgNP imaju apsorpcijski maksimum u području valne duljine od 390 do 420 nm (ovisno o veličini nanočestica u suspenziji). Što se tiče obloženih nanočestica, do povećanja valne duljine apsorpcijskog pika dolazi zbog povećanja debljine sloja/omotača (Delay i sur., 2011).



Slika 7. Shematski prikaz spektrofotometra (Prilagođeno prema

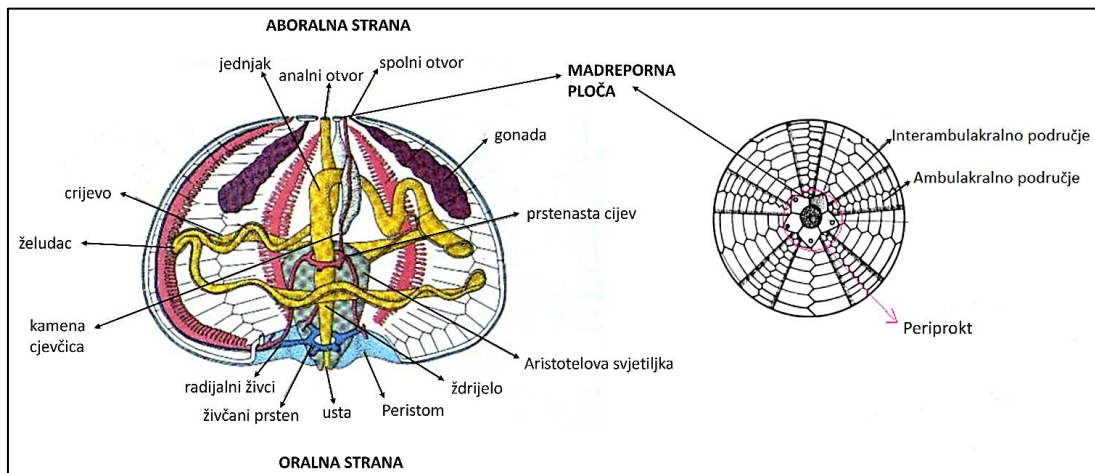
https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/Odredjivanje_struktura_organskih_spojeva_nastavni_tekst.pdf).

1.4. Ježinci u toksikološkim istraživanjima

Ježinci su skupina morskih beskralježnjaka koja naseljava isključivo morska staništa. Nalaze se na raznim tipovima morskog dna, u gotovo svim dubinama od zone mediolitorala pa sve do hadala. Spadaju u koljeno Echinodermata (bodljikaši) i razred Echinoidea (ježinci) koji obilježava tjelesna organizacija zasnovana na pentaradijalnoj simetriji. Bodljikaši, kao deuterostomične životinje imaju trodijelnu građu tijela, a obilježava ih kostur građen od vapnenih pločica i poseban ambulakralni sustav. Kod ježinaca razlikujemo dvije glavne skupine: ježince pravilnjake (Regularia) koji imaju kuglasto tijelo s pravilnom peterozrakastom simetrijom i nepravilnjake (Irregularia) s bilateralnom simetrijom diskoidnog oblika tijela (Habdija i sur. 2011).

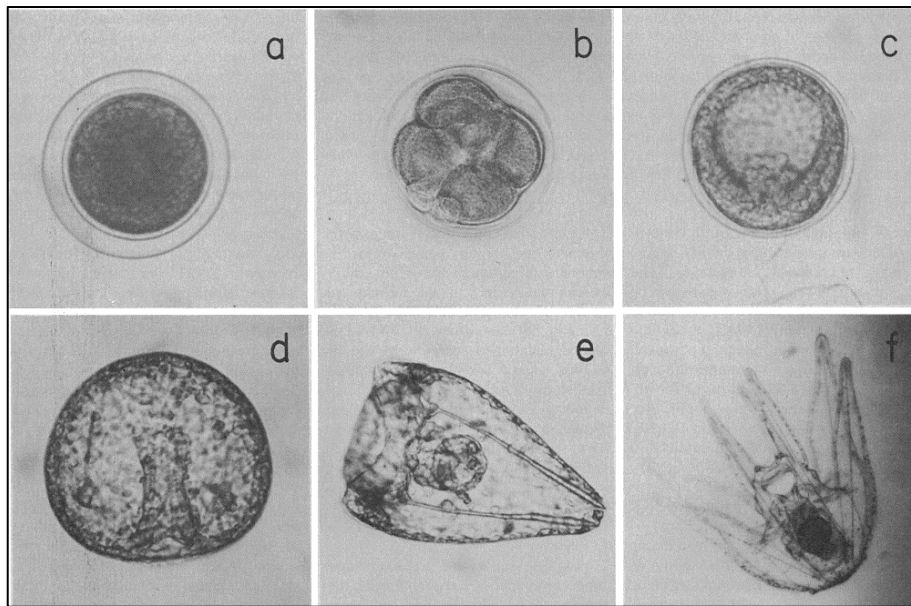
Na tijelu ježinca razlikujemo aboralnu stranu kojom je ježinac okrenut prema gore i oralnu stranu okrenutu prema dole (Slika 8). S oralne strane nalaze se usta s četiri zubića koja zajedno s mišićima čine žvakalo (Aristotelovu svjetiljku). Oko ustiju nalazi se peristom (peristomalna membrana) s pet pari usnih nožica koje služe za usmjeravanje hrane prema ustima. Tu se nalaze i pedicelarije koje služe za čišćenje bodlji i površine tijela. Funkciju škruga obavljaju busenaste strukture smještene na samom rubu peristomalne membrane u međuzračnom području. Po cijelom tijelu ježinaca nalaze se bodlje koje su dio endoskeleta, smještene unutar zglobove kvržice (kutis). Čahura je najvećim dijelom građena od kalcijeva i magnezijeva karbonata te ostalog organskog materijala, a čine ju međusobno povezane vapnenačke pločice (osikule). Na čahuri se razlikuju ambulakrano i interambulakralno područje. Ambulakralno područje ima rupice kroz koje prolaze ambulakralne nožice (podiji) koje služe za kretanje i opipavanje podloge. Na aboralnom polu ježinca nalazi se periprokt, područje sa spolnim i analnim otvorom. U unutrašnjosti čahure nalazi se tjelesna šupljina (celom) ispunjena tekućinom sličnoj morskoj vodi, u kojoj se nalaze slobodno plivajuće stanice (coelomociti). Ambulakralni (vodožilni) sustav je splet cjevčica ispunjenih tekućinom uglavnom morskom vodom, čija je funkcija izmjena plinova, ekskrecija, hranjenje i pokretanje ježinca. Sustav započinje na površini tijela mjehurićem ispod madreporne ploče, od kuda silazi kamena cjevčica povezana s prstenastom cijevi. Iz nje se nadovezuje pet cjevčica iz kojih izlaze naizmjenični ili parni ogranci koji se dijele prema funkcijama poput disanje, kretanje, primanje podražaja. Živčani sustav prati raspored ambulakralnog. Funkciju mozga obavlja živčani prsten na koji se nastavljaju radijalni živci. Probavilo započinje ustima, zatim

slijedi usna šupljina, ždrijelo, jednjak, nakon čega slijedi želudac i crijevo koje završava na aboralnoj strani analnim otvorom (Habdija i sur. 2011).



Slika 8. Unutarnja i vanjska građa ježinca (Prilagođeno prema Habdija i sur. 2011).

Ježinci su odvojenog spola, bez razlike u vanjskom izgledu. Sadrže pet gonada iz kojih se ispuštaju spermiji i jajne stanice u morsku okolinu gdje dolazi do oplodnje. Fertilizacijska membrana oko spolne stanice označava da je oplodnja bila uspješna, te je potrebno oko 2 minute da membrana očvrstne kako bi se spriječila polispermija. Nakon 60 min dolazi do prvog dijeljena stanice na dva jednaka dijela, čime nastaju dvije blastomere. Drugom diobom nastaju 4 stanice, trećom 8 stanica i četvrtom nastaje 16 stanica. Nakon otprilike 6 h dolazi do stvaranja 64-staničnog stadija zvanog morula (Slika 9). Sedmom diobom morula prelazi u blastulu, unutar koje se razvija šupljina blastocel. Nakon otprilike 12 h, dolazi do razgradnje fertilizacijske membrane te blastula prelazi u gastrulu (Briggs i Wessel, 2006). Invaginacijom blastoderma na vegetativnom polu stanice nastaje pracrijevo (arhenteron) i prausta (blastospor). Iz blastopora će se razviti anusni otvor, a na suprotnom dijelu usta. Takva struktura ježince čini deuterostomičnim životinjama kao i kralješnjake. Nakon što se formira crijevo, gastrula poprima oblik piramide i razvija se ličinka dipleurula, a potom pluteus. S vremenom se kod ličinke formiraju skeletne pločice zbog čega ona tone na morsko dno, te metamorfozom poprima obilježja odraslog ježinca i postaje spremna za sjedilački način života (Giudice, 1973).

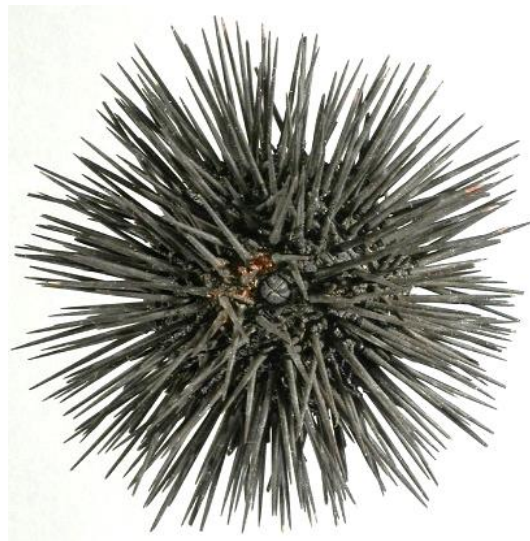


Slika 9. Embrionalni razvoj ježinca prikazan prema stadijima: a) oplođena jajna stanica, b) 16-stanični stadij - početak morule, c) blastula, d) gastrula, e) ličinka dipleurula i f) pluteus (Davidson i sur., 1982).

Ježinci se već dugi niz godina koriste kao bioindikatorska vrsta u toksikološkim istraživanjima zbog visoke osjetljivosti na razna zagađivala, te predstavljaju značajnu komponentu pridnenih zajednica morskog ekosustava (Manzo, 2004). Uz to, značajna su filogenetska skupina radi evolucijske veze između beskralježnjaka i kralježnjaka te zbog sličnog embrionalnog razvoja do stadija morule. Jedan od vrlo čestih testova koji se primjenjuje u ekotoksikološkim istraživanjima je „Test embrionalnog razvoja ježinca“ (engl. *Sea Urchin Embryo Development Test*, SUEDT). Primjenom ovog testa ispituje se akutna izloženost raznih zagađivala na embrionalnom razvoju. Učinak zagađivala vidljiv je na morfološkoj razini u kratkom vremenskom periodu od 48 do 72 h, ovisno o vrsti. Prednost ovog testa je jednostavnost njegove izvedbe, brzina, jeftin je i standardiziran.

U Jadranskom moru otkriveno je i opisano 21 vrsta ježinaca, a među najčešćima su *Paracentrotus lividus*, *Arbacia lixula* i *Sphaerechinus granularis*. Crni ježinac, *A. lixula* (Linnaeus, 1758) prikazan na Slici 10, spada u porodicu Arbaciidae i rod *Arbacia*. Termofilna je vrsta koja je proširila svoj areal u mediteransko područje nakon pleistocena. Prepoznatljiv je prema dugim bodljama koje su najčešće iste duljine kao čahura. Nalazi se na stjenovitim morskim dnima litorala gdje se čvrsto prijanja za podloge izložene velikim strujanjima (Wangensteen i Owen 2013). Hrani se struganjem vapnenačkih algi, zbog čega ima veliki ekološki značaj za oblikovanje

bentičkih zajednica, posebice algi i livada morskih cvjetnica (Bulleri i sur., 1999). Spolnu zrelost doseže kada je promjer jedinke u rasponu od 9 i 14 mm (Gianguzza i Bonaviri, 2013), a mrijesti se u periodu od svibnja do srpnja (Wangensteen i Owen 2013). Brzina rasta ovisi o fizikalnim uvjetima u moru, uznemirenosti populacije te o kvaliteti hrane. Prijetnju ovoj vrsti predstavlja izlov zbog gonada, koje su vrlo tražena kulinarska delicija u mnogim dijelovima Mediterana. Uz to klimatske promjene i zagađenja su jedan od faktora koji doprinose smanjenju brojnosti ove, ali i drugih vrsta ježinca u Jadranskom moru (Okićki, 2021).



Slika 10. *Arbacia lixula* (Preuzeto s: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=image&tid=124249&pic=144433>).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati ulogu prirodne organske tvari u smanjenju embriotoksičnosti nanočestica srebra u morskoj vodi. Eksperiment je proveden na ježincu vrste *Arbacia lixula* primjenom SUEDT-a. Ispitivana je sposobnost razvoja ježinaca tretiranih različitim koncentracijama prirodne organske tvari i konstantnom koncentracijom nanočestica srebra. Pratio se razvoj oplođenih jajnih stanica do morfološkog stadija larve. Također su se ispitali međudjelovanje nanočestica srebra i prirodne organske tvari pomoću UV/VIS spektrofotometra.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije

Kemikalije korištene u ovom završnom radu su: humična kiselina (Technical grade), alginat, BSA (minimum 98% electrophoresis) te suspenzija srebrnih nanočestica (veličine 40 nm i koncentracije 0.02 mg/mL) nabavljene od proizvođača Sigma-Aldrich. Od proizvođača Carl Roth nabavljen je kromov (III) kalijev sulfat dodekahidrat ($\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (čistoće $\geq 98\%$). Soli potrebne za izradu umjetne morske vode (engl. Artificial sea water, ASW) nabavljene su dijelom od proizvođača Sigma-Aldrich: natrijev klorid (NaCl) najviše analitičke čistoće (p.a), kalcijev klorid (CaCl_2), magnezijev sulfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (čistoće $> 99\%$) te dijelom od Kemike: kalijev klorid (KCl) (p.a.) i magnezijev klorid heksahidrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (p.a). Za pripremu ultračiste vode korišten je filtrirajući sustav „Millipore Advantage System“. Filtrirana morska voda dobivena je filtriranjem morske vode (saliniteta 38 i pH 8.1 ± 0.1) kroz Whatmanov-e filtere s veličinom pora od 0.2 μm (Cellulose Nitrate Membrane Filters).

3.2. Karakterizacija čestica

Karakterizacija nanočestica srebra i prirodne organske tvari rađena je u dva medija: u ultračistoj i umjetnoj morskoj vodi. Umjetna morska voda, saliniteta 108.7, pripravljena je otapanjem: 26.29 g NaCl, 0.74 g KCl, 0.99 g CaCl_2 , 6.09 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ i 3.94 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ u 350 mL ultračiste vode uz miješanje na magnetskoj miješalici. Ispitivani uzorci bili su različite koncentracije prirodne organske tvari: 1, 10 i 100 $\mu\text{g/mL}$ sa stalnom koncentracijom nanočestica srebra: 0.02 $\mu\text{g/mL}$.

Otopine prirodne organske tvari pripravljene su na sljedeći način: izvagano je 40 mg humične kiseline, te je dodano u 2 mL ultračiste vode, s konačnom koncentracijom od 20 mg/mL. Isto je napravljeno za otopinu alginata. Otopina BSA pripravljena je na sljedeći način: izvagano je 5 mg BSA i dodano u 2 mL ultračiste vode, s konačnom koncentracijom od 2.5 mg/mL. Od svake otopine je uzeto 0.2 mL i razrijeđeno u 0.8 mL ultračiste vode, te je dobivena konačna koncentracija (1, 10 i 100 $\mu\text{g/mL}$) s kojima su napravljeni uzorci za UV/VIS.

Uzorci s humičnom kiselinom i alginatom pripremljeni su na isti način. Uzorak od 500 μL sadrži: 200 μL ultračiste vode, 100 μL AgNP, 25 μL humične kiseline ili alginata i 175 μL umjetne morske vode ili ultračiste vode. Uzorci koji sadrže BSA sastoje se od: 25 μL ultračiste vode, 100 μL AgNP, 200 μL BSA i 175 μL umjetne morske vode ili ultračiste vode. Sveukupno je napravljeno osamnaest uzoraka; devet u umjetnoj morskoj vodi i devet u ultračistoj vodi. Morska voda je dodavana neposredno pred mjerenje, otprilike 3 min prije stavljanja u spektrofotometar kako bi se odgodila agregacija i aglomeracija čestica.

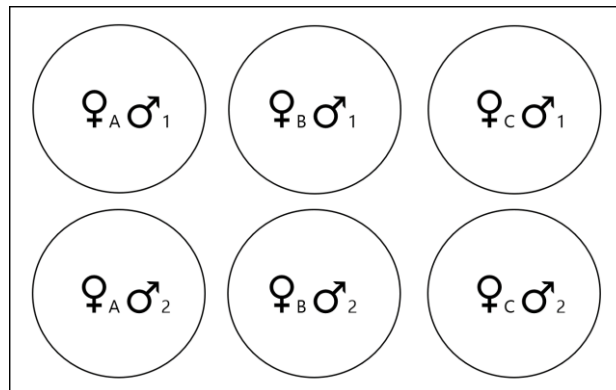
UV/Vis apsorpcijski spektri AgNP i NOM-a snimani su na Shimadzu UV-1800 spektrofotometru u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm s rezolucijom od 1 nm. Mjerenja su rađena 0, 24 i 48 h od pripreme uzoraka u kvarcnim kivetama, optičke duljine puta od 10 mm. Prilikom obrade podataka korišten je program UVProbe 2.3.1.

3.3. Test embrionalnog razvoja ježinca

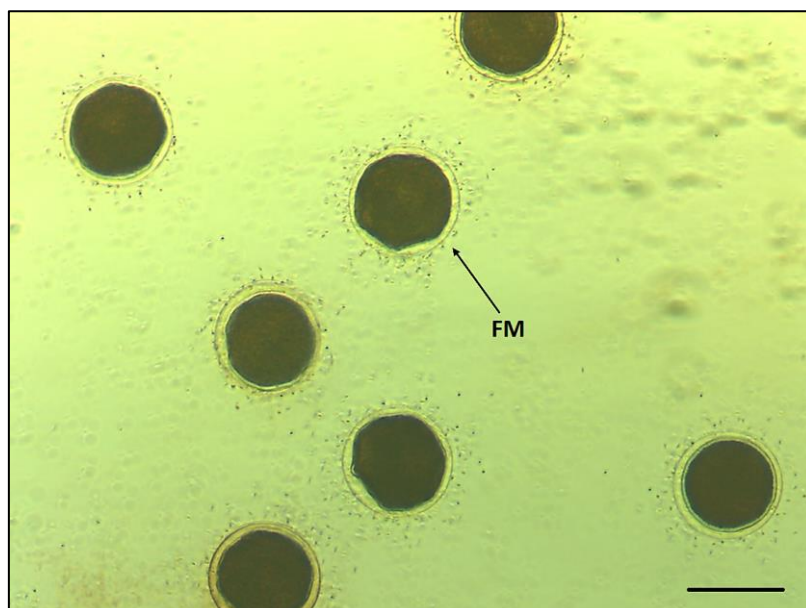
3.3.1 Sakupljanje ježinaca, izdvajanje gameta i oplodnja

Sakupljeno je petnaest ježinaca s obale Lungomare (Pula, RH), dana 31.5.2022, u 9:00 h ujutro. Ježinci su sakupljeni uz pomoć mrežice, te su stavljeni u prienosnu hladnjaču s morskom vodom i kroz sat vremena su dopremljeni u Centar za istraživanje mora, Institut Ruđera Boškovića. Ježinci su isti dan korišteni za eksperiment određivanja utjecaja nanočestica srebra u kombinaciji s prirodnom organskom tvari. U eksperimentu je korišteno pet ježinaca (tri ženske i dva mužjaka). Gamete potrebne za oplodnju dobivene su injektiranjem 1-2 mL 0.5 M otopine kalijeva klorida (3.73 g KCl otopljeno je u 100 mL destilirane vode) u peristomalnu membranu. Ježinac je zatim potresen kako bi se otopina KCl-a ravnomjerno raspodijelila po gonadama, te se čekalo ispuštanje gameta na aboralnoj strani ježinca. Spol ježinaca određen je prema razlici u boji gameta; muške gamete su se pokazale bijele boje a ženske tamno crvene. Sperma je sakupljena pomoću Pasteur pipete te je prebačena u Eppendorf tubice od 1.5 mL i stavljena u posudu s ledom kako bi joj se produžio životni vijek. Jajne stanice prikupljene su uranjanjem ježinca aboralnom stranom u čašu s filtriranom morskom vodom, što je omogućilo njihovo taloženje na dnu čaše. Nakon prikupljanja, jajne stanice su filtrirane kroz fitoplanktonsku mrežicu s veličinom pora od 100 μm radi uklanjanja nečistoća. Zatim se voda iznad jajnih stanica izlila i one su prebačene u čašu od 150 mL filtrirane

morske vode. Suspenzija jajnih stanica je razrijeđena do željene koncentracije od 1000 jajnih stanica na mL, te se u nju dodalo 25 μ L razrijeđene sperme (0.1 mL koncentrirane na suho izolirane sperme razrijeđeno u 0.9 mL filtrirane morske vode). Ispravnost i zrelost gameta je potvrđena pomoću inverznog mikroskopa. Oplodnja je izvršena kombinacijom sperme prikupljene od dva mužjaka i jajnih stanica prikupljenih od tri ženke. Križanje zigote ženki i mužjaka u jažicama je prikazano na Slici 11. Sperma je dodavana kružnim pokretima u suspenziju jajnih stanica kako bi se pravilno rasporedila. Čaše su puštene 30 minuta kako bi došlo do oplodnje, koja se potvrdila pod inverznim mikroskopom pojavom fertilizacijske membrane oko jajnih stanica (Slika 12).



Slika 11. Shema oplodnje ježinaca u jažicama. Slova A, B i C predstavljaju gamete ženske jedinke, dok brojke 1 i 2 označavaju gamete muških jedinki ježinca.



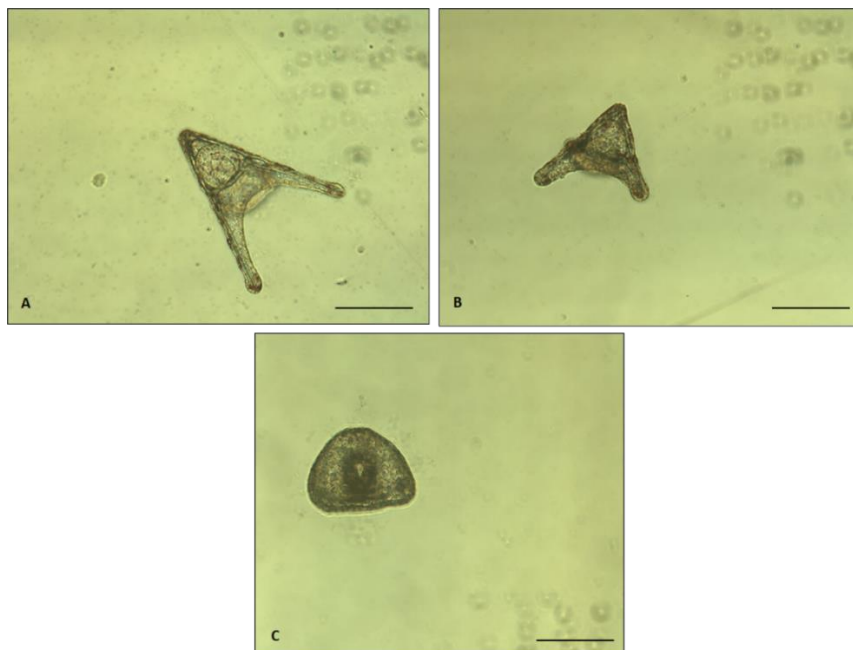
Slika 12. Oplodena jajna stanica ježinca *A. lixula* (FM – fertilizacijska membrana; mjerilo 50 μ m) (Osobna arhiva).

3.3.2. Tretiranje embrija ježinaca

Koncentracija AgNP-a korištena za tretman s prirodnom organskom tvari je u svim uzorcima bila konstantna 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dok su koncentracije NOM-a mijenjane. Ispitano je šest različitih koncentracija: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 i 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ za humičnu kiselinu, alginat i BSA. Eksperiment je podijeljen u dvije grupe; gdje je **Grupa (A)** tretirana samo s NOM-om, dok je **Grupa (B)** tretirana kombinacijom NOM-a i AgNP-a. Uz to postavljene su tri pozitivne kontrole; dvije koje su ispitale toksičnost AgNP-a u koncentracijama od 0.01 i 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ te kontrola bez tretmana. U jažice je dodano 9 mL filtrirane morske vode, 1 mL oplođenih jajnih stanica te tretman (oko 100 μL). Embriji su nakon tretmana čuvani na temperaturi od 20°C 48h, nakon čega su brojani pod inverznim mikroskopom.

3.3.3. Uspješnost dosezanja larvi u stadiju pluteusa

Uspješnost dosezanja stadija larvi brojana je nakon 72 h. Larve su fiksirane s 10⁻² M otopinom kromovog (III) sulfata (100 μL kromovog (III) sulfata je otopljeno u 10 mL destilirane vode). Nakon 10 min od dodavanja, larve su se istaložile. Brojano je do 100 larva po jažici, pri čemu se razlikovalo tri kategorije: normalno razvijena larva (N), zaostala larva (R) i nerazvijeni embrij (D) (Slika 13).



Slika 13. Normalno razvijena larva (A), zaostala larva (B) i nerazvijeni embrij (C) ježinca *A. lixula* 72 h nakon izlaganja zigote AgNP (mjerilo = 100 μm) (Osobna arhiva).

3.4. Statistička obrada podataka

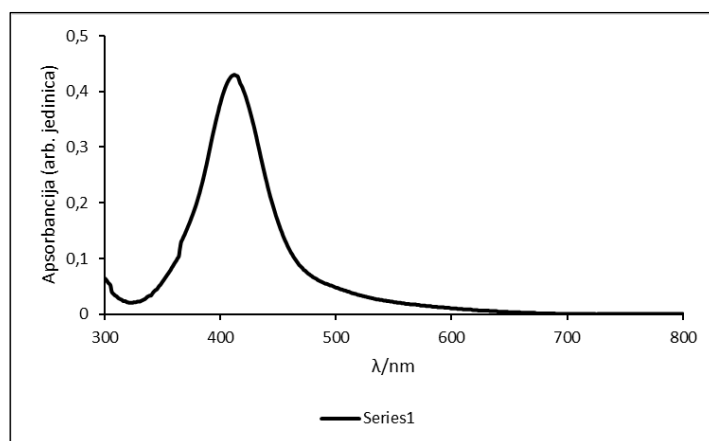
Podaci su prikazani kao stupičasti dijagrami srednjih vrijednosti i pripadajućih standardnih grešaka. Za statističku obradu podataka korišten je program OriginLab 2016. pomoću kojeg se izvela parametrijska metoda analize varijance (engl. *analysis of variance*, ANOVA) nakon čega slijedi *post hoc* Tukey test, odnosno neparametrijska analiza varijance među grupama primjenom Kruskal-Wallisov test i Mann Whitney U-test. Statistički značajna razlika između grupe normalno razvijenih larvi u odnosu na kontrolne uzorke izražena je kao * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$.

4. REZULTATI

4.1 Karakterizacija čestica

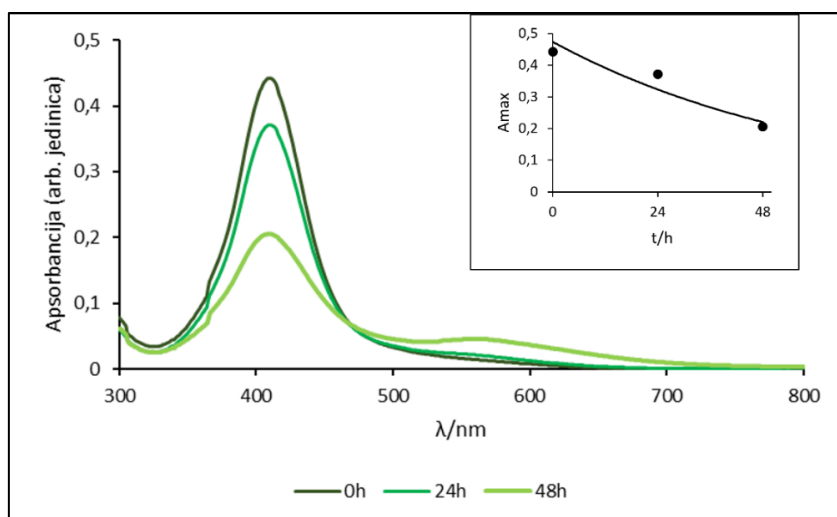
Pomoću UV/VIS spektrofotometra ispitali smo ponašanje nanočestica srebra (konc. 0.02 µg/mL) u kombinaciji s različitim koncentracijama (1, 10 i 100 µg/mL) prirodne organske tvari u dva različita medija; ultračistoj vodi (zeleni grafovi) i umjetnoj morskoj vodi (plavi grafovi). Apsorpcijski spektri su praćeni u vremenskom periodu od 48 h. U rezultatima su prikazani apsorpcijski spektri za najnižu koncentraciju prirodne organske tvari (1 µg/mL), dok se ostale koncentracije nalaze u Prilogu 1 – 12.

Na x-osi prikazane su valne duljine izražene u nanometrima, a na y-osi se nalazi apsorbanca ispitivanog uzorka s odgovarajućom mjernom jedinicom. Apsorpcijski pik nanočestica srebra najčešće iznosi između 390 do 420 nm te ovisi o njezinoj veličini. Naš uzorak AgNP-a u ultračistoj vodi pokazao je pik u rasponu od 412 do 415 nm (Slika 14) što odgovara površinskoj plazmonskoj rezonanci (engl. *surface plasmon resonance*, SPR) karakterističnoj za AgNP veličine od 40 nm (Delay i sur., 2011).



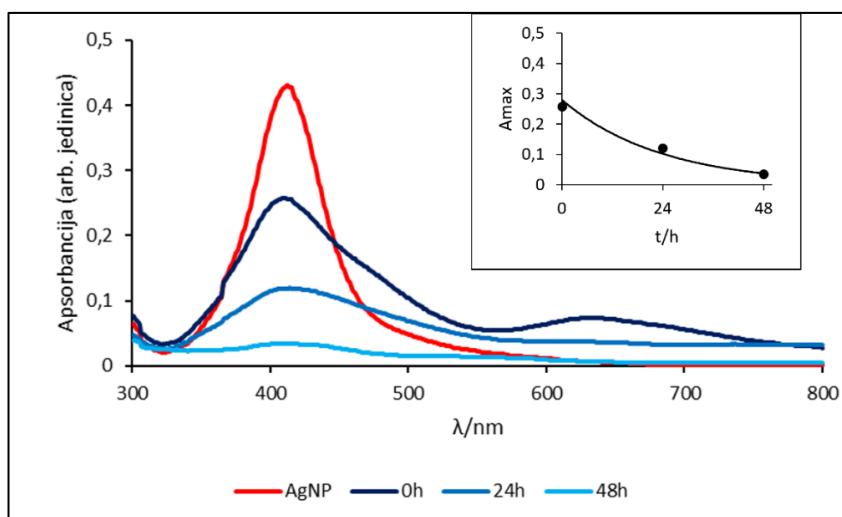
Slika 14. Apsorpcijski spektar AgNP veličine 40 nm mjeren u ultračistoj vodi.

Površinska plazmonska rezonanca **AgNP-a** s omotačem od **humične kiseline** mjerena u **ultračistoj vodi** (Slika 15), konstantno se nalazi između 409 – 411 nm, zbog čega možemo zaključiti da nije došlo do otapanja ni aglomeracije čestica. Eksponecijalni pad apsorpcijskog maksimuma, odnosno smanjenje površinske plazmonske rezonance s vremenom, dobiveno je eksponencijalnom padajućom funkcijom oblika $y=Ae^{-\lambda x}$, gdje simbol „ λ “ označava nagib krivulje. U ovom slučaju nagib krivulje iznosi svega 0.016, a R^2 vrijednost iznosi 0.89.



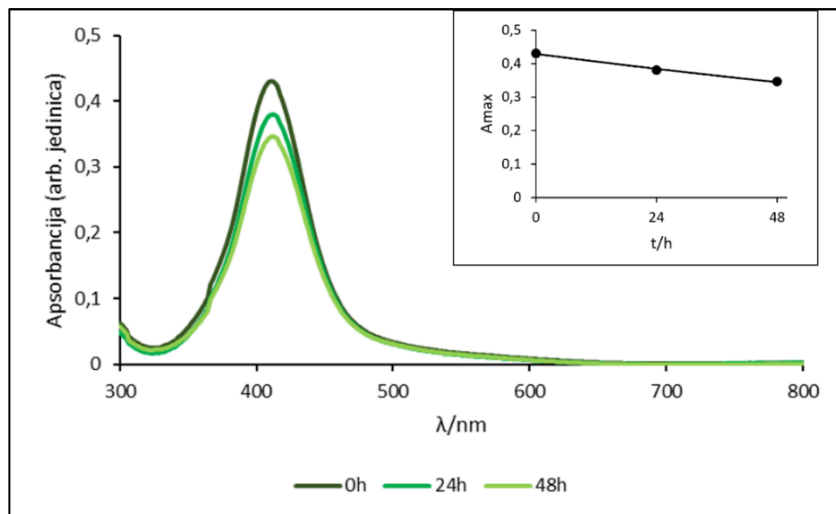
Slika 15. Promjena apsorpcijskog spektra i apsorpcijskog maksimuma humične kiseline (1 µg/mL) i AgNP-a (0.02 µg/mL) snimanog u ultračistoj vodi kroz 48 h.

Površinska plazmonska rezonanca **AgNP-a** s omotačem od **humične kiseline** mjerena u **umjetnoj morskoj vodi** (Slika 16) pokazuje pomak na više valne duljine; sa 411 nm na 421 nm što ukazuje na to da se u uzorku nakon 48 h nalaze veće čestice obzirom na početno vrijeme. Nagib krivulje iznosi 0.042, a R^2 vrijednost iznosi 0.98. Crvena krivulja prikazuje apsorpcijski spektar za AgNP. Dodatkom morske vode, apsorpcijski pik naglo pada radi aglomeracije kao posljedica prisutnosti elektrolita u vodi.



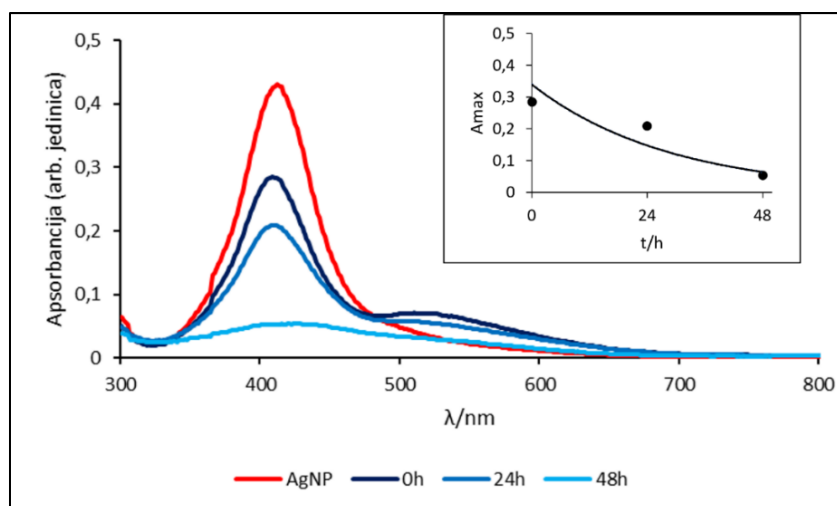
Slika 16. Promjena apsorpcijskog spektra i apsorpcijskog maksimuma humične kiseline (1 µg/mL) i AgNP-a (0.02 µg/mL) snimanog u ASW kroz 48 h.

Površinska plazmonska rezonanca **AgNP-a** s omotačem od **BSA** mjerena u **ultračistoj vodi** (Slika 19), konstantno se nalazi između 410 – 412 nm. R^2 vrijednost iznosi 0.99, a nagib krivulje iznosi 0.005, što ukazuje na visoku stabilnost AgNP-a BSA proteinima.



Slika 19. Promjena apsorpcijskog spektra i apsorpcijskog maksimuma BSA (1 µg/mL) i AgNP-a (0.02 µg/mL) snimanog u ultračistoj vodi kroz 48 h.

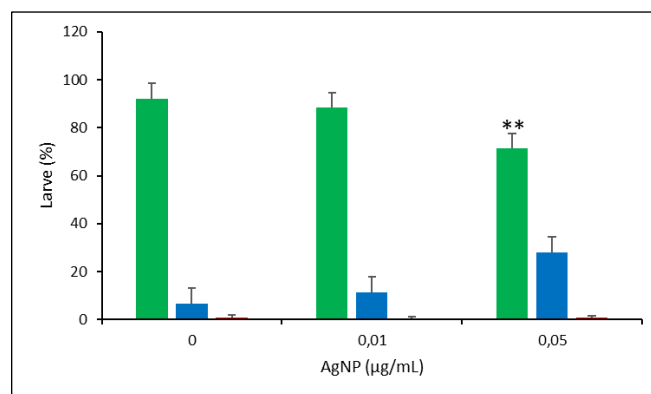
Površinska plazmonska rezonanca **AgNP-a** s omotačem od **BSA** mjerena u **umjetnoj morskoj vodi** (Slika 20) pokazuje blagi pomak na više valne duljine; sa 408 nm na 415 nm što ukazuje na to da se u uzorku, nakon 48 h nalaze nešto veće čestice obzirom na čestice u početnom vremenu. Nagib krivulje iznosi 0.035, a R^2 vrijednost 0.83.



Slika 20. Promjena apsorpcijskog spektra i apsorpcijskog maksimuma BSA (1 µg/mL) i AgNP-a (0.02 µg/mL) snimanog u ASW kroz 48 h.

4.2 Brojanje larvi 72 h nakon oplodnje

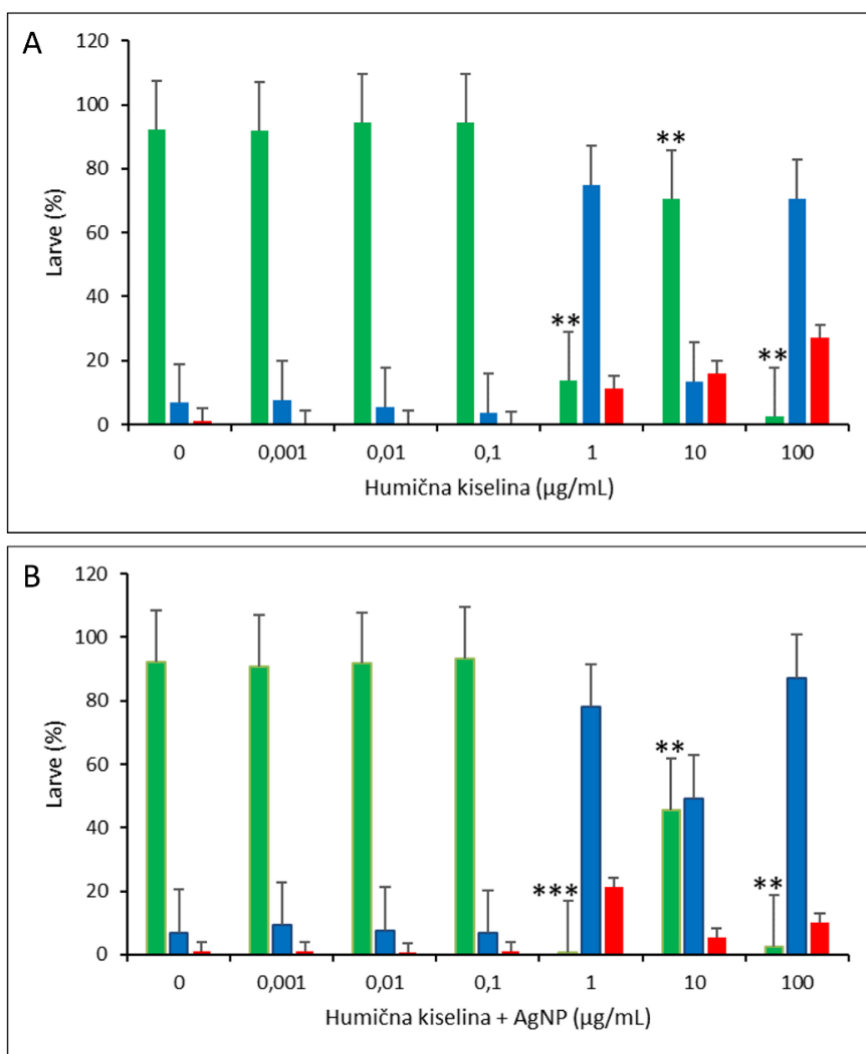
Postotak uspješno razvijenih larvi ježinca nakon tretiranja zigota **nanočesticama srebra** (konc. **0.01 i 0.05 µg/mL**) prikazan je na Slici 21. U usporedbi s kontrolom, gdje je ostvareno 92.2% normalno razvijenih i 6.8% zaostalih larvi, niska konc. srebrnih nanočestica (0.01 µg/mL) nije uzrokovala značajne razlike. Broj normalno razvijenih larvi je blago pao na 88.25%, dok je postotak zaostalih larvi porastao na 11.5%. Pri većoj konc. srebrnih nanočestica od 0.05 µg/mL, zamijećena je statistički značajna razlika ($p < 0.01$) u odnosu na kontrolu, gdje je broj normalno razvijenih larvi pao na 71.25%, a broj zaostalih larvi porastao na 28%. Postotak nerazvijenih embrija promjenom konc. nije porastao, već je zamijećen blagi pad s 1% na 0.25% pri koncentraciji od 0.01 µg/mL, odnosno 0.75% pri koncentraciji od 0.05 µg/mL AgNP-a.



Slika 21. Postotak normalnih (zeleni stupci), zaostalih (plavi stupci) larvi te nerazvijenih embrija (crveni stupci) ježinca *A. lixula* 72 h nakon oplodnje i dodavanja AgNP-a. Statistički značajna razlika normalno razvijenih larvi u odnosu na kontrolu $**p < 0.01$.

Prilikom tretiranja embrija niskim konc. NOM-a (0.001, 0.01 i 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) nije zamijećena značajna promjena u odnosu na kontrolni uzorak. Postotak normalno razvijenih larvi je kod svih uzorka veći od 90%, broj zaostalih larvi se nalazi u rasponu od 6 – 10% te broj nerazvijenih embrija je u prosjeku između 1 – 2%. Iz tog razloga, spomenute koncentracije će biti izuzete u daljnjim rezultatima, već će fokus biti na većim konc. (1, 10 i 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), gdje postoji značajnija razlika između ispitivanih skupinama. Rezultati su prikazani na Slikama 22 – 24.

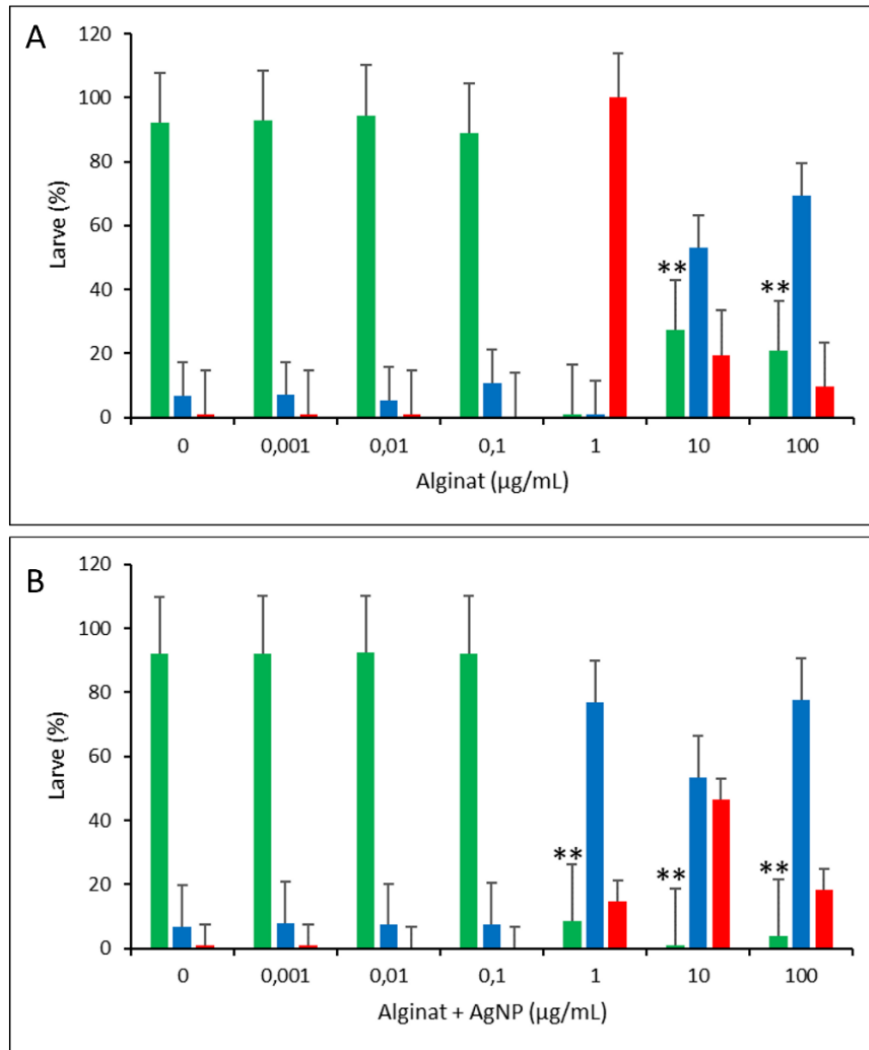
Na Slici 22. nalaze se grafovi koji prikazuju uspješnost embrionalnog razvoja ježinca tretiranog s **humičnom kiselinom** (HA) – Grupa A i kombinacijom HA i AgNP-a – Grupa B. Embriji ježinca (**Grupe A**) tretirani s konc. od 1, 10 i 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HA pokazuju statistički značajnu razliku ($p < 0.01$) u broju normalno razvijenih larvi obzirom na kontrolu. Kod konc. od 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ došlo je do naglog pada u broju normalno razvijenih larvi na 13.8%, dok je broj zaostalih larvi naglo narastao na 75%. Pri konc. od 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zamijećen je nagli porast normalno razvijenih larvi na 70.6% te smanjenje broja zaostalih larvi na 13%. Daljnjim rastom konc. na 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ broj normalno razvijenih larvi ponovno pada na 2%, te broj zaostalih larvi raste na 70.6%. Broj nerazvijenih embrija je s povećanjem koncentracije blago narastao na 27% pri konc. od 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Embriji ježinca (**Grupe B**) tretirani s HA i dodatkom AgNP-a konstantne konc. od 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pokazuju nešto drugačije rezultate u odnosu na Grup A. Kod konc. od 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zamijećena je statistički značajna razlika ($p < 0.001$), gdje je broj normalno razvijenih larvi pao na svega 0.8%, a broj zaostalih porastao na 78%. Broj nerazvijenih embrija je pri ovoj konc. najviši te iznosi 21.2%. Kao i kod Grupe A, prilikom tretiranja embrija konc. od 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zamijećena je statistički značajna razlika ($p < 0.01$), gdje je broj normalno razvijenih larvi narastao na 45.6%, broj zaostalih se smanjio na 49.2% te je broj nerazvijenih embrija pao na 5.2%. Daljnjim rastom konc. na 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ broj normalno razvijenih larvi ponovno pada na 2.6%, a broj zaostalih larvi naglo raste na 87.2%.



Slika 22. Postotak normalnih (zeleni stupci), zaostalih (plavi stupci) larvi te nerazvijenih embrija (crveni stupci) ježinca *A. lixula* 72 h nakon tretmana s humičnom kiselinom (A) i kombinacijom humične kiseline i AgNP-a (B). Statistički značajna razlika normalno razvijenih larvi u odnosu na kontrolu $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

Na Slici 23. nalaze se grafovi koji prikazuju uspješnost embrionalnog razvoja ježinca tretiranog s **alginskom kiselinom** (Alg) – Grupa A i kombinacijom Alg i AgNP-a – Grupa B. Embriji ježinca (**Grupe A**) tretirani s konc. 10 i 100 µg/mL Alg pokazuju statistički značajnu razliku ($p < 0.01$), te je zamijećen porast broja zaostalih larvi na 53 – 70% uz smanjenje normalno razvijenih na 21 – 27%. Kod konc. od 1 µg/mL došlo je do 100 %-te promjene u porastu nerazvijenih embrija. Embriji ježinca (**Grupe B**) tretirani s Alg i dodatkom AgNP-a konstantne konc. od 0.01 µg/mL, pokazuju statistički značajnu razliku obzirom na uzorak ($p < 0.01$). Kod konc. od 1 µg/mL zamijećen je nagli pad brojnosti normalno razvijenih larvi na 8.4%, te porast broja zaostalih na 77%. Najveće promjene u brojnosti uočene su pri konc. od 10 µg/mL, gdje broj

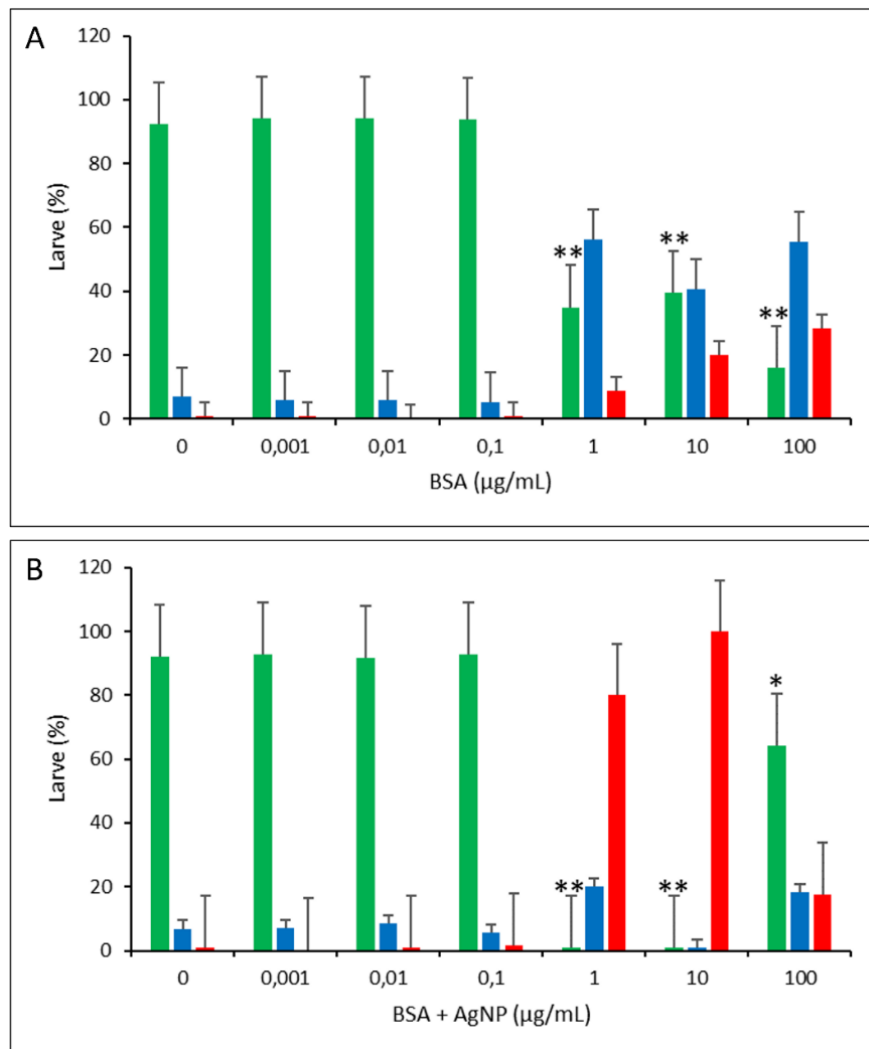
normalno razvijenih larvi pada na 0, broj zaostalih larvi raste na 53.4% te broj nerazvijenih embrija je maksimalan u ispitivanoj grupi i iznosi 46.6%. Konc. od 100 µg/mL prati slične rezultate kao kod konc. od 1 µg/mL s nešto većim brojem nerazvijenih embrija (18.4%) i nižim postotkom normalno razvijenih larvi (3.8%).



Slika 23. Postotak normalnih (zeleni stupci), zaostalih (plavi stupci) larvi te nerazvijenih embrija (crveni stupci) ježinca *A. lixula* 72 h nakon tretmana s alginatom (A) i kombinacijom alginata sa AgNP-om (B). Statistički značajna razlika normalno razvijenih larvi u odnosu na kontrolu $**p < 0.01$.

Na Slici 24. nalaze se grafovi koji prikazuju uspješnost embrionalnog razvoja ježinca tretiranog s **BSA** – Grupa A i kombinacijom BSA i AgNP-a – Grupa B. Embriji ježinca (**Grupe A**) tretirani s konc. od 1, 10 i 100 µg/mL BSA pokazuju statistički značajnu razliku ($p < 0.01$) u broju normalno razvijenih larvi obzirom na kontrolu. Broj normalno razvijenih larvi se pri konc. od 1 µg/mL smanjuje na 35%, dok se pri konc. od 10 µg/mL povećava na 39.4%, te ponovno naglo pada na svega 16% pri konc. od 100

µg/mL. Najveći postotak nerazvijenih embrija (28.4%) javlja se pri konc. od 100 µg/mL, dok se broj zaostalih larvi između tri konc. kreće u rasponu od 40.6 – 56.2%. Embriji ježinca (**Grupe B**) tretirani s BSA i AgNP-om pokazuju značajno drugačije rezultate u odnosu na Grupu A. Kod konc. od 1 µg/mL zamijećena je statistički značajna razlika ($p < 0.01$), s 20% zaostalih larvi i 80% nerazvijenih embrija. Porastom konc. na 10 µg/mL promjena statistički značajna ($p < 0.01$) sa 100%-tnim brojem nerazvijenih embrija. Pri najvišoj koncentraciji zamijećen je najveći broj normalno razvijenih larvi od 64.2%, te je statistički značajna razlika je nešto manja u odnosu na kontrolni uzorak ($p < 0.05$). Broj nerazvijenih embrija je svega 17.6% a broj zaostalih larvi 18.2%.



Slika 24. Postotak normalnih (zeleni stupci), zaostalih (plavi stupci) larvi te nerazvijenih embrija (crveni stupci) ježinca *A. lixula* 72 h nakon tretmana s BSA (A) i kombinacijom BSA sa AgNP-om (B). Statistički značajna razlika normalno razvijenih larvi u odnosu na kontrolu * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

5. RASPRAVA

U ovom radu ispitana je uloga NOM-a u embriotoksičnosti AgNP-a na ježincu vrste *Arbacia lixula*. Ispitivane tvari bile su humična kiselina, alginat i BSA u različitim koncentracijama, počevši od najmanjih (0.001, 0.01 i 0.1 $\mu\text{g/mL}$) radi njihove relevantnosti u okolišu, te veće koncentracije (1, 10 i 100 $\mu\text{g/mL}$) moguće u dijelovima intenzivnog nakupljanja NOM-a poput riječnih ušća i obalnih voda. Humična kiselina je odabrana kao predstavnik NOM-a u bočatoj i slatkoj vodi, BSA u tokovima otpadnih voda, dok je alginat izabran kao predstavnik NOM-a u morskoj vodi. Odabrane tvari NOM-a sveprisutne su u okolišu, te je vrlo vjerojatno kako će AgNP u nekom trenutku doći u interakciju s njim, prilikom čega dolazi do promjene u stabilnosti NP-a i bioraspoloživosti (Wang i sur., 2016; Čarapar i sur., 2022.). Iz tog razloga bilo je ključno ispitati ponašanje AgNP-a u trenutku kada stupi u interakciju s NOM-om u morskom i slatkovodnom sustavu.

Prema rezultatima vidimo kako prisustvo NOM-a različito utječe na ponašanje AgNP-a u morskom i slatkovodnom sustavu. Međutim, u oba slučaja dolazi do stvaranja površinskog omotača oko NP-a, čime se sprječava otapanje, to jest otpuštanje iona srebra. Prateći apsorpcijski spektar uzoraka kroz 48 h, vidljivo je kako se SPR čestica ne pomiče na niže valne duljine, što ukazuje na to da nije došlo do otapanja čestica. U uzorcima mjerenima u **ultračistoj vodi** nije došlo do pada apsorpcijskog pika što upućuje na izrazito dobru stabilizaciju AgNP-a. Uzevši u obzir nagib krivulje promjene apsorpcijskog spektra kroz 48 h, vidljiva je minimalna aglomeracija čestica, te se može zaključiti kako je alginat najviše stabilizirao AgNP, zatim BSA i potom humična kiselina. U uzorcima mjerenima u **umjetnoj morskoj vodi**, došlo je do pomaka SPR na više valne duljine, što prema Delay i sur. (2011) ukazuje na povećanje veličine čestica. Agregacija je najbrža dodatkom humične kiseline, zatim alginata i BSA. Agregacija AgNP-a obloženog s NOM-om se može objasniti mehanizmom „premoštavanja“, gdje vezanje dvovalentnih kationa iz morske vode pospješuje vezanje dvije susjedne, makromolekulama obavijene nanočestice. Uzastopnim premoštavanjem, nastaju veći agregati i onemogućuje se raspršenje iona te time NP postaju zarobljene i inaktivne. Kod viših koncentracija NOM-a prikazanih u Prilogu 6 i 10, zamijećene su dvije iznimke. Naime, kod koncentracije od 10 $\mu\text{g/mL}$ BSA i 100 $\mu\text{g/mL}$ alginata u umjetnoj morskoj vodi, uočena je potpuna stabilizacija AgNP-a. Nema pomaka apsorpcijskog pika kroz 48 h, što ukazuje na to

da NOM, u određenim koncentracijama, može stabilizirati AgNP u morskoj vodi. Do sličnog rezultata došla je Levak Zorinc, 2020. godine ispitujući stabilizaciju AgNP-a u morskoj vodi pomoću BSA proteina, gdje je ustanovljeno da su AgNP stabilizirane pri salinitetu između 5 i 38 kada su maseni omjeri BSA proteina prema NP-u od 133:1 do 3332:1. Iako NOM značajno utječe na raspodjelu veličine čestica, stabilnost i površinska svojstva AgNP-a u vodenoj fazi, na njezinu stabilizaciju utječu i drugi čimbenici poput saliniteta, ionske jakosti te određenih omjera NP/NOM-a (Furman i sur., 2013; Wang i sur., 2016.). Veća stabilizacija nanočestica u slatkovodnim vodama u odnosu na morsku je potvrđena i u istraživanju Kellera i sur. (2010) gdje je ispitana stabilnost NP-a CeO₂, TiO₂ i ZnO u raznim tipovima voda. Utvrđeno je kako je stabilizacija NP-a najveća u kišnici i otpadnim vodama radi vrlo niske ionske jakosti.

Uzevši u obzir smanjenje otpuštanja iona srebra uzrokovano stvaranjem površinskog omotača NOM-a, ispitana je toksičnost tog kompleksa na embrionalnom razvoju ježinca. Odabrani organizam za ovo istraživanje bio je ježinac vrste ***A. lixula***, koji se prema mnogim provedenim istraživanjima pokazao osjetljivijim u odnosu na druge Mediteranske vrste poput *Paracentrotus lividus* i *Sphaerechinus granularis* (Burić i sur., 2015). Jedan od mogućih razloga visoke osjetljivosti *A. lixula* naspram drugih vrsta je veća stopa biomineralizacije prilikom embrionalnog razvoja, prilikom kojeg se ometa unos iona Ca²⁺ u organizam u prisutnosti toksikanta (Martino i sur., 2017). Drugi mogući razlog je u tome što se ova vrsta nalazi u vrlo plitkim dijelovima obalnih ekosustava, gdje je temperatura veća. To čini metabolizam bržim, ali i osjetljivijim na zagađenje.

Ispitan je zaseban učinak **nanočestica srebra** veličine 40 nm. Dvije ispitane koncentracije ukazale su na različite rezultate. Niska koncentracija od 0.01 µg/mL nije uzrokovala značajnije promjene u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je koncentracija od 0.05 µg/mL uzrokovala smanjenje normalnog razvoja larvi na 71%, te povećanje broja nerazvijenih larvi na 28%. Međutim, broj nerazvijenih embrija se kod obje ispitivane koncentracije nije značajno promijenio, već je ostao ispod 1%. Prema tome, možemo zaključiti kako se AgNP u koncentraciji od 0.01 µg/mL nije pokazala toksičnom, dok je koncentracija od 0.05 µg/mL uzrokovala sporiji razvoj normalno razvijenih larvi. Primijećeni su slični rezultati kod usporedbe s istraživanjem

Šiller i sur. (2013), gdje se pokazalo da AgNP u koncentraciji od 0.03 µg/mL ne uzrokuju značajnije promjene na razvoj embrija ježinca *P. lividus*. Jedan od mogućih razloga je adaptivni odgovor biološkog sustava na umjerenu razinu okolišnog stresa, zbog kojeg organizam ima veću toleranciju na određene razine okolišnog stresa. Suprotno našim rezultatima Burić i sur. su 2015. godine zamijetili kako su zigote ježinca *A. lixula* izložene koncentracijama od 0.05 µg/mL AgNP pokazale 100%-tnu smrtnost embrija, slično kao i kod istraživanja Lončarić (2020).

Prema rezultatima može se uočiti kako vrlo niske koncentracije **NOM-a** nemaju značajnije, gotovo nikakve posljedice na embrionalni razvoj ježinca. To potvrđuje činjenica da je postotak normalno razvijenih larvi u ispitivanim grupama tretiranim s humičnom kiselinom, alginatom i BSA pri najnižim koncentracijama (0.001, 0.01 i 0.1 µg/mL) bio veći od 90%, broj zaostalih larvi do 10%, te broj nerazvijenih embrija se zadržao ispod 1%. Međutim, treba imati na umu da je samostalni učinak NOM-a i u kombinaciji sa AgNP, pri koncentracijama većim od 1 µg/ml, uzrokovao nagli pad u broju normalno razvijenih larvi na 1% za humičnu kiselinu, 8% za alginat i 0% za BSA. Zbog toga se može zaključiti kako se kod nižih koncentracija NOM-a javlja antagonistički efekt kod kojeg niske koncentracije smanjuju toksičnost AgNP-a, dok više koncentracije ometaju razvoj embrija. Uloga NOM-a u smanjenju toksičnosti NP-a je do sada dobro ispitana na bakterijskim vrsta. Dasari i Hwang (2019) pokazali su da prisustvo humične kiseline, uz sunčevu svjetlost, pojačava toksično djelovanje AgNP-a na ispitivanom uzorku bakterija iz prirodne vode. Do sličnog rezultata došli su i Mahendra i sur. (2008) pokazavši da humična kiselina, BSA i cistein pojačavaju toksičnost nanočestica CdSe i ZnS kod vrsta *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas aeruginosa*. Za razliku od tih rezultata Liu i sur. (2014) su pokazali su da prisustvo HA, BSA i alginat sa AgNP kod vrsta *B. subtilis* i *E. coli* nema značajnije razlike u toksičnosti, osim prilikom dodatka iona Ca²⁺ koji pojačava agregaciju i smanjuje elektrostatsko odbijanje NP-a. Na tri vrste mikroalgi: *Raphidocelis subcapitata*, *Anabaena sp* i *Chlorella sp* pokazano je da NOM smanjuje toksičnost ispitivanih čestica (Van Hoecke i sur., 2011; Tang i sur., 2015; Lin i sur., 2012) dok kod vrste *Microcystis aeruginosa* fulvična kiselina značajno povećava toksičnost NP-a (Wang i sur., 2011). Istraživanja provedena na kralježnjacima pokazuju da je humična kiselina kod vrste zebrica (*Danio rerio*) povećala toksičnost NP TiO₂ (Yang i

sur., 2013), dok je na embriju vrste *Oryzias latipes* smanjuje toksičnost AgNP-a (Kim i sur., 2013).

Različiti i često kontradiktorni rezultati vezani uz djelovanje NOM-a na toksičnost NP-a mogu biti uzrokovani drugačijim karakteristikama NP-a kao što su veličina, sastav, površinski naboj, omjer površine i volumena. Uz to NOM je vrlo raznolika skupina spojeva, koja promjenom koncentracije mijenja svoje ponašanje i ponašanje AgNP-a u vodenom sustavu. Nadalje, treba uzeti u obzir i različito dizajnirane eksperimente u istraživanjima te različiti odabir ispitivanog organizma.

6. ZAKLJUČAK

- NOM značajno utječe na raspodjelu veličine čestica, stabilnost i površinska svojstva AgNP-a u vodenoj fazi.
- Prisustvo NOM-a u ultračistoj vodi povećava stabilnost AgNP-a, dok se u umjetnoj morskoj vodi destabilizira stvaranjem agregata.
- Neovisno o mediju, NOM sprječava otpuštanje iona s površine metala u periodu od 48 h.
- NOM u niskim koncentracijama djeluje antagonistički na djelovanje AgNP-a.
- Povećanjem koncentracije NOM-a uočen je negativan utjecaj na embrionalni razvoj ježinca.

U ovom radu ispitano je ponašanje NOM-a u kombinaciji sa niskom koncentracijom AgNP-a, u ultračistoj vodi i umjetnoj morskoj vodi, te utjecaj na embrionalni razvoj ježinca. U obzir nisu uzeti različiti fizikalno kemijski uvjeti poput promjene saliniteta i pH koji bi znatno mogli promijeniti ponašanje i toksičnost čestica. Radi sve većeg ispuštanja nanočestica u okoliš potrebno je provesti daljnja istraživanja utjecaja NOM-a na stabilnost i promjenu svojstva NP-a. Mali broj studija pokazuje utjecaj NOM-a u smanjenju toksičnosti nanočestica na morskim vrstama, što bi u se u budućnosti trebalo više ispitati radi dokazano različitog ponašanja u morskoj vodi u usporedbi sa slatkom vodom.

7. LITERATURA

Aitkenhead-Peterson, J.A., McDowell, W.H., Neff, J.C. (2003). Sources, production and regulation of allochthonous dissolved organic matter inputs to surface waters. Chapter 2 in: *Aquatic ecosystems: Interactivity of dissolved organic matter*. Findlay, S.E.G. and Sinsabaugh, R.L. (eds.). Academic Press, San Diego, California. pp. 25–70.

Baalousha, M., Afshinnia, K., Guo, L. (2018). Natural organic matter composition determines the molecular nature of silver nanomaterial-NOM corona. *Environmental Science: Nano*, 5(4), 868-881.

Biswas, P., Wu, C. Y. (2005). Nanoparticles and the environment. *Journal of the air & waste management association*, 55(6), 708-746.

Bouallegui, Y., Younes, R. B., Oueslati, R., i Sheehan, D. (2018). Role of endocytotic uptake routes in impacting the ROS-related toxicity of silver nanoparticles to *Mytilus galloprovincialis*: A redox proteomic investigation. *Aquatic Toxicology*, 200, 21-27.

Briggs, E., Wessel, G. M. (2006). In the beginning... animal fertilization and sea urchin development. *Developmental biology*, 300(1), 15-26.

Bulleri, F., Benedetti-Cecchi, L., Cinelli, F. (1999). Grazing by the sea urchins *Arbacia lixula* L. and *Paracentrotus lividus* Lam. in the Northwest Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 241(1), 81-95.

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

Burić, P. (2018). *Utjecaj srebrnih nanočestica na morske beskralježnjake: biološki učinci na modelima dagnje i ježinaca* (Doctoral dissertation, University of Zagreb. Faculty of Science. Department of Geology).

Burić, B. (2021). *Prirodne organske tvari u površinskim vodama* (Doctoral dissertation, University of Zagreb. Faculty of Food Technology and Biotechnology. Department of Food Engineering. Laboratory for Water Technology).

Chaturvedi, S., Dave, P. N., Shah, N. K. (2012). Applications of nano-catalyst in new era. *Journal of Saudi Chemical Society*, 16(3), 307-325.

Chen, J., Gu, B., LeBoeuf, E. J., Pan, H., Dai, S. (2002). Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere*, 48(1), 59-68.

- Christian, P., Von der Kammer, F., Baalousha, M., Hofmann, T. (2008). Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology*, 17(5), 326-343.
- Čarapar, I., Jurković, L., Pavičić-Hamer, D., Hamer, B., Lyons, D. M. (2022). Simultaneous Influence of Gradients in Natural Organic Matter and Abiotic Parameters on the Behavior of Silver Nanoparticles in the Transition Zone from Freshwater to Saltwater Environments. *Nanomaterials*, 12(2), 296.
- Dasari, T. P., Hwang, H. M. (2010). The effect of humic acids on the cytotoxicity of silver nanoparticles to a natural aquatic bacterial assemblage. *Science of the Total Environment*, 408(23), 5817-5823.
- Davidson, E. H., Hough-Evans, B. R., Britten, R. J. (1982). Molecular biology of the sea urchin embryo. *Science*, 217(4554), 17-26.
- Delay, M., Dolt, T., Woellhaf, A., Sembritzki, R., Frimmel, F. H. (2011). Interactions and stability of silver nanoparticles in the aqueous phase: Influence of natural organic matter (NOM) and ionic strength. *Journal of Chromatography A*, 1218(27), 4206-4212.
- Delgado, J. L., Filippone, S., Giacalone, F., Herranz, M. Á., Illescas, B., Pérez, E. M., Martín, N. (2013). Buckyballs. *Polyarenes II*, 1-64.
- Dotson, A., Westerhoff, P. (2009). Occurrence and removal of amino acids during drinking water treatment. *J. Am. Water Works Assoc.*, 101(9): 101–115.
- Draget, K. I., Skjåk-Bræk, G., Smidsrød, O. (1997). Alginate based new materials. *International journal of biological macromolecules*, 21(1-2), 47-55.
- García-Alonso, J., Khan, F. R., Misra, S. K., Turmaine, M., Smith, B. D., Rainbow, P. S., ... i Valsami-Jones, E. (2011). Cellular internalization of silver nanoparticles in gut epithelia of the estuarine polychaete *Nereis diversicolor*. *Environmental science & technology*, 45(10), 4630-4636.
- Giudice, G. (2012). *Developmental biology of the sea urchin embryo*. Elsevier.
- Gluhić, D. (2017). Humusne tvari i primjena huminske kiseline u poljoprivredi. *Glasnik zaštite bilja*, 40(3), 64-72.
- Grillo, R., Rosa, A. H., Fraceto, L. F. (2015). Engineered nanoparticles and organic matter: a review of the state-of-the-art. *Chemosphere*, 119, 608-619.

Habdija I., Primc Habdija B., Radanović I., Špoljar M., Matoničkin Kepčija R., Vujčić Karlo S., Miliša M., Ostojić A., Sertić Perić M. (2021). Protista-protozoa i metazoainvertebrata. Strukture i funkcije. Alfa, Zagreb.

Henderson, R.K., Baker, A., Parsons, S.A., Jefferson, B. (2008). Characterisation of algogenic organic matter extracted from cyanobacteria, green algae and diatoms. *Water Res.*, 42(13): 3435-3445.

Horikoshi, S., Serpone, N. (2013) . Introduction to Nanoparticles, in *Microwaves in Nanoparticle Synthesis: Fundamentals and Applications* (Eds. S. Horikoshi and N. Serpone), Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany

Hulla, J. E., Sahu, S. C., Hayes, A. W. (2015). Nanotechnology: History and future. *Human & experimental toxicology*, 34(12), 1318-1321.

Imai, A., Fukushima, T., Matsushige, K. and Hwan Kim, Y. (2001). Fractionation and characterization of dissolved organic matter in a shallow eutrophic lake, its inflowing rivers, and other organic matter sources. *Water Res.*, 35(17): 4019–4028.

Jahanban-Esfahlan, A., Ostadrahimi, A., Jahanban-Esfahlan, R., Roufegarinejad, L., Tabibiazar, M., Amarowicz, R. (2019). Recent developments in the detection of bovine serum albumin. *International journal of biological macromolecules*, 138, 602-617.

Keller, A. A., Wang, H., Zhou, D., Lenihan, H. S., Cherr, G., Cardinale, B. J., Ji, Z. (2010). Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. *Environmental science & technology*, 44(6), 1962-1967.

Klaine, S. J., Alvarez, P. J., Batley, G. E., Fernandes, T. F., Handy, R. D., Lyon, D. Y., Lead, J. R. (2008). Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 27(9), 1825-1851.

Kim, J. Y., Kim, K. T., Lee, B. G., Lim, B. J., Kim, S. D. (2013). Developmental toxicity of Japanese medaka embryos by silver nanoparticles and released ions in the presence of humic acid. *Ecotoxicology and environmental safety*, 92, 57-63.

Kornegay, B. H., Kornegay, K. J., Torres, E. (2000). *Natural organic matter in drinking water: recommendations to water utilities*. American Water Works Association.

Lee, K. Y., Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, 37(1), 106-126.

Levak Zorinc, M. (2020). *Stabilizacija nanočestica srebra proteinima i površinski aktivnim tvarima u morskoj vodi* (Doctoral dissertation, University of Zagreb. Faculty of Science. Department of Geology).

Lin, V. J. C., Koenig, J. L. (1976). Raman studies of bovine serum albumin. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 15(1), 203-218.

Lin, D., Ji, J., Long, Z., Yang, K., Wu, F. (2012). The influence of dissolved and surface-bound humic acid on the toxicity of TiO₂ nanoparticles to *Chlorella* sp. *Water research*, 46(14), 4477-4487.

Liu, X., Jin, X., Cao, B., Tang, C. Y. (2014). Bactericidal activity of silver nanoparticles in environmentally relevant freshwater matrices: influences of organic matter and chelating agent. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 525-531.

Lončarić, N. (2020). *Utjecaj koizloženosti srebrnih nanočestica i indometacina na embrije ježinca *Arbacia lixula** (Doctoral dissertation, University of Pula. Department of Natural and Health Studies).

Magesky, A., Pelletier, É. (2018). Cytotoxicity and physiological effects of silver nanoparticles on marine invertebrates. *Cellular and molecular toxicology of nanoparticles*, 285-309.

Mahendra, S., Zhu, H., Colvin, V. L., Alvarez, P. J. (2008). Quantum dot weathering results in microbial toxicity. *Environmental science & technology*, 42(24), 9424-9430.

Manzo, S. (2004). Sea urchin embryotoxicity test: proposal for a simplified bioassay. *Ecotoxicology and environmental safety*, 57(2), 123-128.

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

de Melo, B. A. G., Motta, F. L., Santana, M. H. A. (2016). Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. *Materials Science and Engineering: C*, 62, 967-974.

Minor, E. C., Swenson, M. M., Mattson, B. M., Oyler, A. R. (2014). Structural characterization of dissolved organic matter: a review of current techniques for isolation and analysis. *Environmental science: processes & impacts*, 16(9), 2064-2079.

Nanodatabase (Internetska stranica, dostupno na: <https://nanodb.dk/en/>, pristupljeno 7 svibnja. 2022)

Okićki, L. (2021). *Ugroženost ježinaca u jadranskom moru* (Doctoral dissertation, University of Zagreb. Faculty of Science. Department of Biology).

Parsons, S. A., Jefferson, B., Goslan, E. H., Jarvis, P. R., Fearing, D. A. (2004). Natural organic matter—the relationship between character and treatability. *Water science and technology: water supply*, 4(5-6), 43-48.

Pettit, R. E. (2004). Organic matter, humus, humate, humic acid, fulvic acid and humin: their importance in soil fertility and plant health. *CTI Research*, 10, 1-7.

Rimac, H. (2017). *Interakcije flavonoida i odabranih ksenobiotika pri vezanju na humani serumski albumin* (Doctoral dissertation, University of Zagreb. Faculty of Pharmacy and Biochemistry. Department of medicinal chemistry).

Schmit, K. H., Wells, M. J. (2002). Preferential adsorption of fluorescing fulvic and humic acid components on activated carbon using flow field-flow fractionation analysis. *Journal of Environmental Monitoring*, 4(1), 75-84.

Šiller, L., Lemloh, M. L., Piticharoenphun, S., Mendis, B. G., Horrocks, B. R., Brümmer, F., Medaković, D. (2013). Silver nanoparticle toxicity in sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environmental pollution*, 178, 498-502.

Tang, Y., Li, S., Lu, Y., Li, Q., Yu, S. (2015). The influence of humic acid on the toxicity of nano-ZnO and Zn²⁺ to the *Anabaena* sp. *Environmental toxicology*, 30(8), 895-903.

Tønnesen, H. H., Karlsen, J. (2002). Alginate in drug delivery systems. *Drug development and industrial pharmacy*, 28(6), 621-630.

Van Hoecke, K., De Schamphelaere, K. A., Van der Meeren, P., Smagghe, G., Janssen, C. R. (2011). Aggregation and ecotoxicity of CeO₂ nanoparticles in synthetic and natural waters with variable pH, organic matter concentration and ionic strength. *Environmental Pollution*, 159(4), 970-976.

Walters, C. R., Cheng, P., Pool, E., i Somerset, V. (2016). Effect of temperature on oxidative stress parameters and enzyme activity in tissues of Cape River crab (*Potamonautes perlatus*) following exposure to silver nanoparticles (AgNP). *Journal of toxicology and environmental health, Part A*, 79(2), 61-70.

Wang, Z., Li, J., Zhao, J., Xing, B. (2011). Toxicity and internalization of CuO nanoparticles to prokaryotic alga *Microcystis aeruginosa* as affected by dissolved organic matter. *Environmental science & technology*, 45(14), 6032-6040.

Wang, H., Ho, K. T., Scheckel, K. G., Wu, F., Cantwell, M. G., Katz, D. R., ... i Burgess, R. M. (2014). Toxicity, bioaccumulation, and biotransformation of silver nanoparticles in marine organisms. *Environmental science & technology*, 48(23), 13711-13717.

Wang, Z., Zhang, L., Zhao, J., Xing, B. (2016). Environmental processes and toxicity of metallic nanoparticles in aquatic systems as affected by natural organic matter. *Environmental Science: Nano*, 3(2), 240-255.

Wangensteen F., Owen S. (2013). Biology and phylogeography of the black sea urchin *Arbacia lixula* (Echinoidea: Arbacioida). Universitat de Barcelona

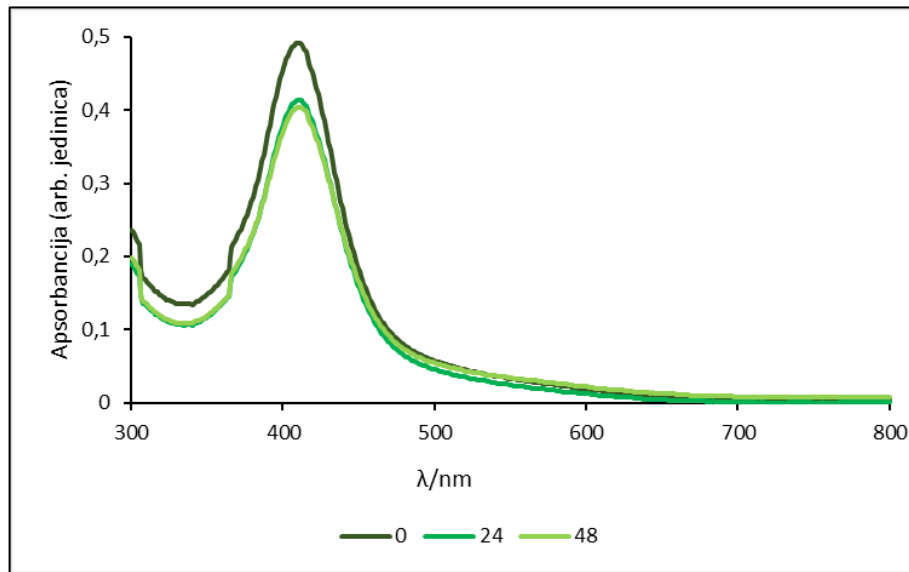
Yang, S. P., Bar-Ilan, O., Peterson, R. E., Heideman, W., Hamers, R. J., Pedersen, J. A. (2013). Influence of humic acid on titanium dioxide nanoparticle toxicity to developing zebrafish. *Environmental science & technology*, 47(9), 4718-4725.

Zaračko, M. (2017). *Sinteza i karakterizacija nanokompozita srebra i huminskih kiselina* (Doctoral dissertation, University of Zagreb. Faculty of Chemical Engineering and Technology).

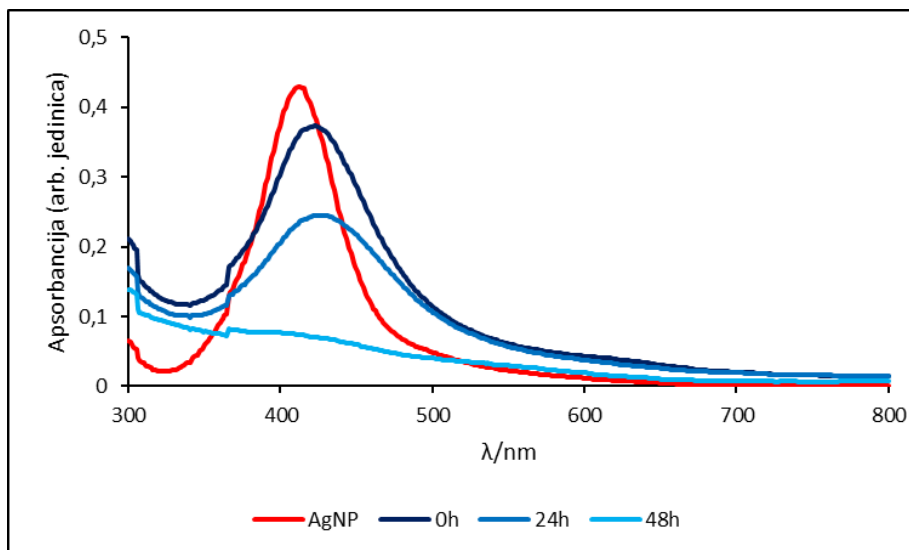
Zhao, X., Liu, R., Teng, Y., Liu, X. (2011). The interaction between Ag⁺ and bovine serum albumin: a spectroscopic investigation. *Science of the total environment*, 409(5), 892-897.

Žuljević, E. (2020). *Prostorna rasprostranjenost i ekološka obilježja hridinskog ježinca (*Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)) i crnog ježinca (*Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758)) istočne obale Jadranskog mora* (Doctoral dissertation, University of Zagreb. Faculty of Science. Department of Biology).

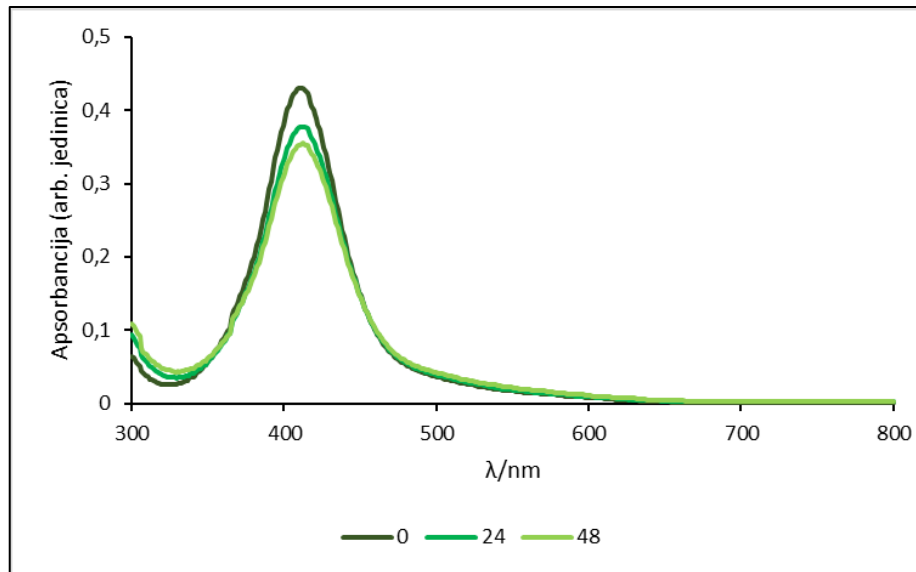
PRILOZI



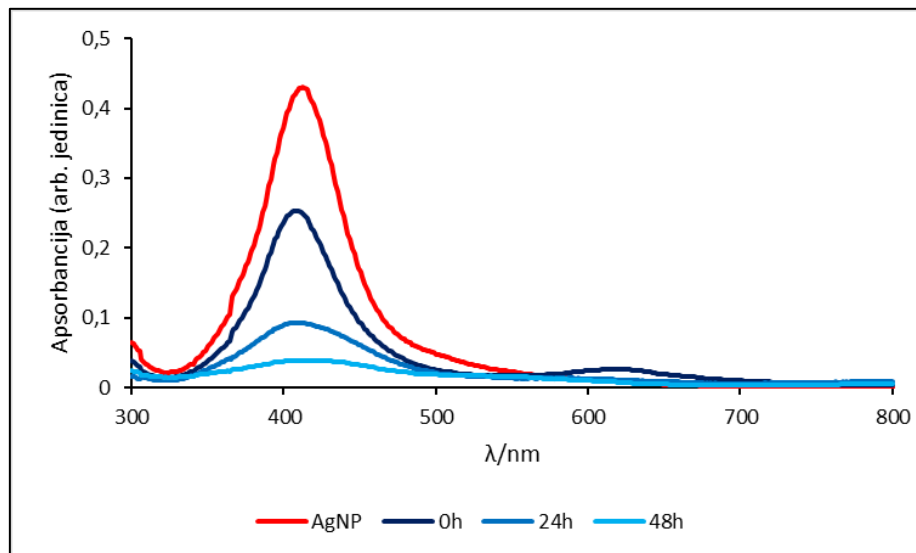
Prilog 1. Promjena apsorpcijskog spektra spektra **AgNP-a** ($0.02 \mu\text{g/mL}$) s omotačem od **humične kiseline** ($10 \mu\text{g/mL}$) snimanog u **ultračistoj vodi** kroz 48 h.



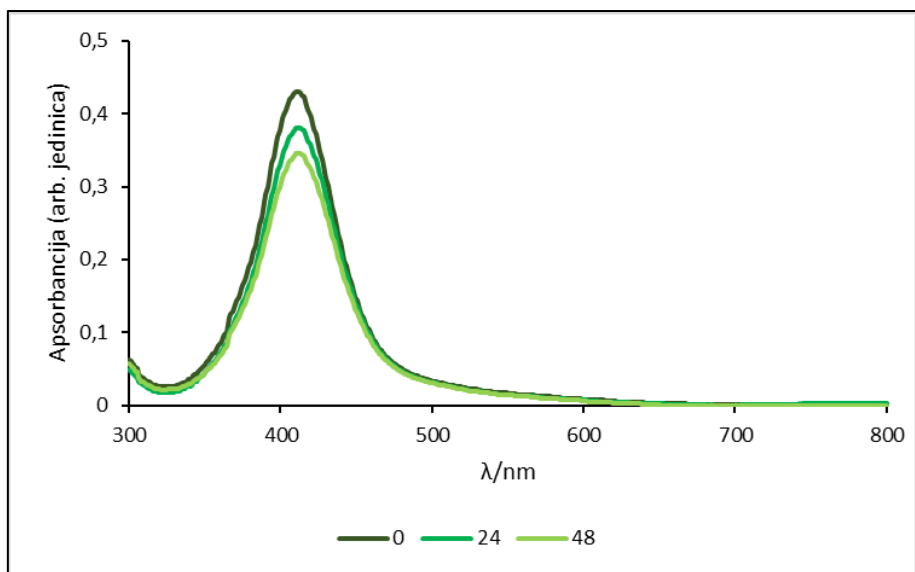
Prilog 2. Promjena apsorpcijskog spektra **AgNP-a** ($0.02 \mu\text{g/mL}$) s omotačem od **humične kiseline** ($10 \mu\text{g/mL}$) snimanog u **ASW** kroz 48 h.



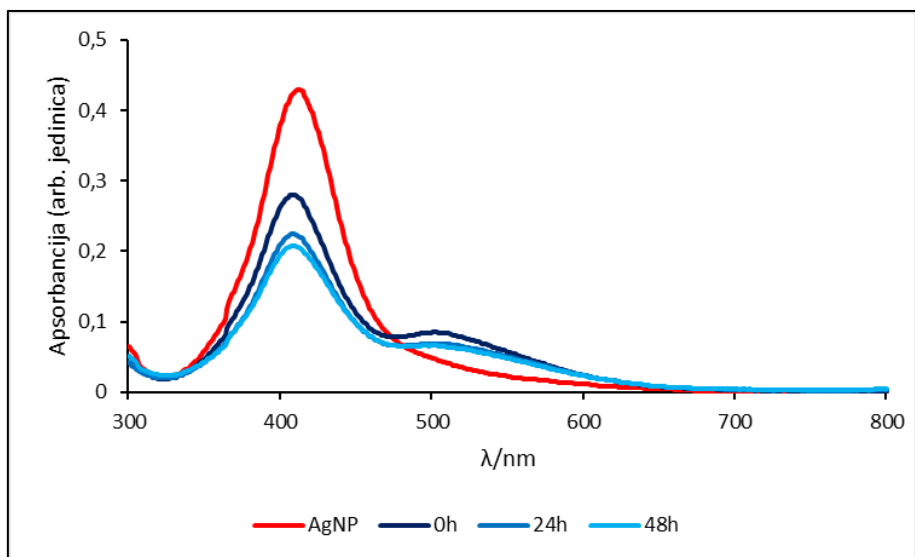
Prilog 3. Promjena apsorpcijskog spektra **AgNP-a** (0.02 µg/mL) s omotačem od **alginata** (10 µg/mL) snimanog u **ultračistoj vodi** kroz 48 h.



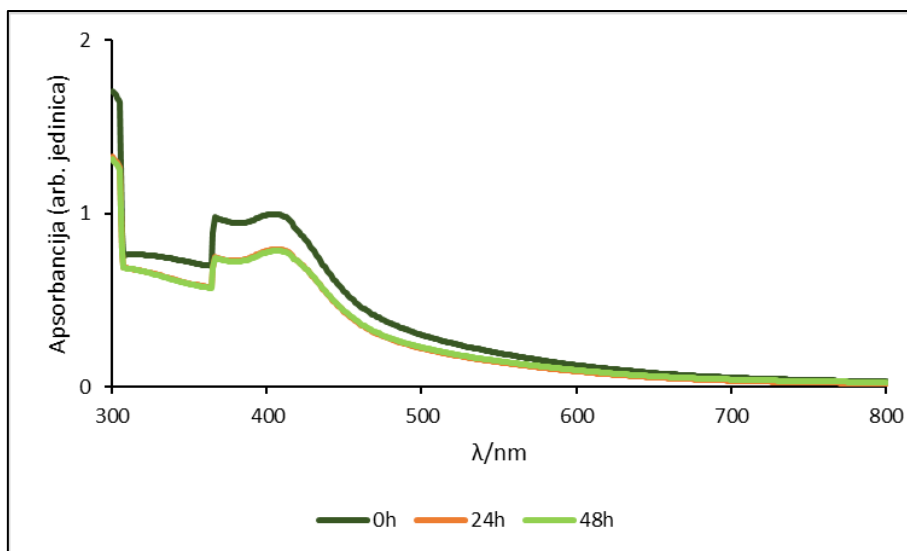
Prilog 4. Promjena apsorpcijskog spektra **AgNP-a** (0.02 µg/mL) s omotačem od **alginata** (10 µg/mL) snimanog u **ASW** kroz 48 h.



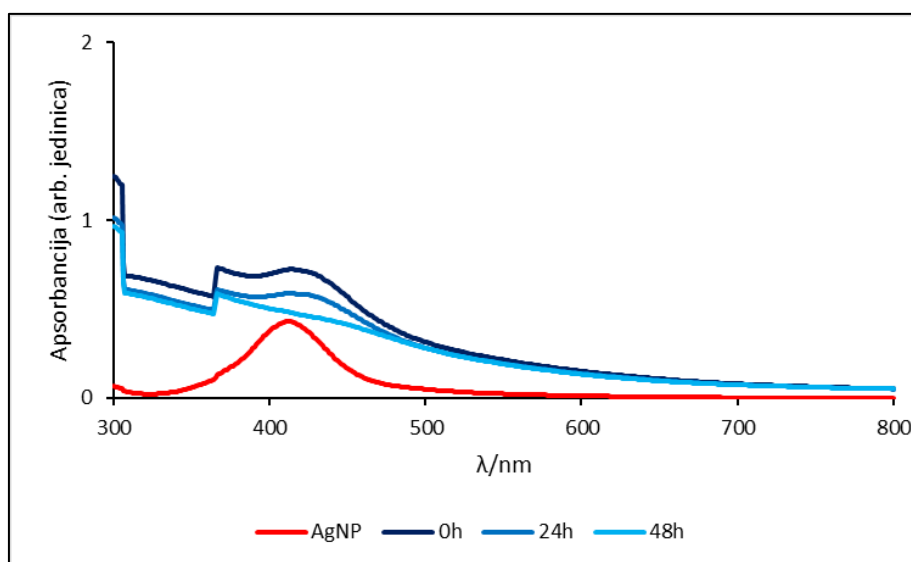
Prilog 5. Promjena apsorpcijskog spektra **AgNP-a** ($0.02 \mu\text{g/mL}$) s omotačem od **BSA** ($10 \mu\text{g/mL}$) snimanog u **ultračistoj vodi** kroz 48 h.



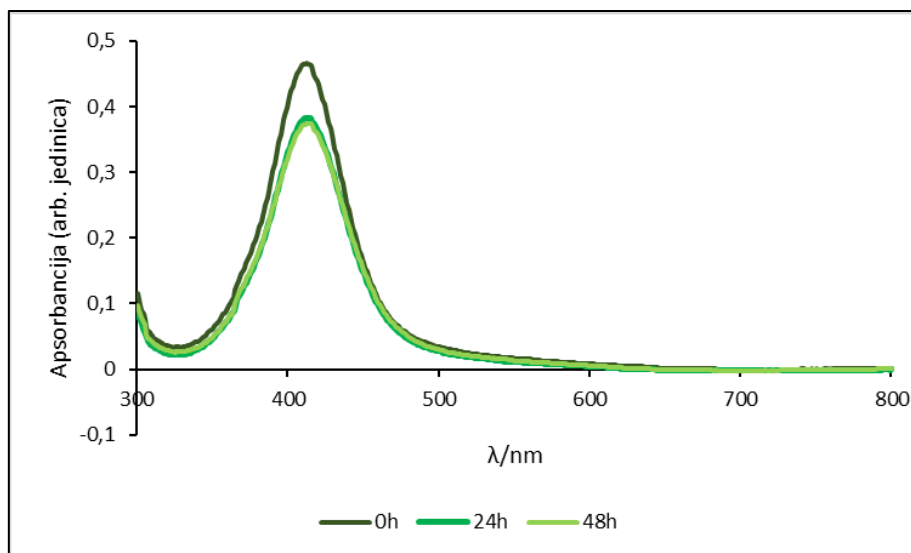
Prilog 6. Promjena apsorpcijskog spektra **AgNP-a** ($0.02 \mu\text{g/mL}$) s omotačem od **BSA** ($10 \mu\text{g/mL}$) snimanog u **ASW** kroz 48 h.



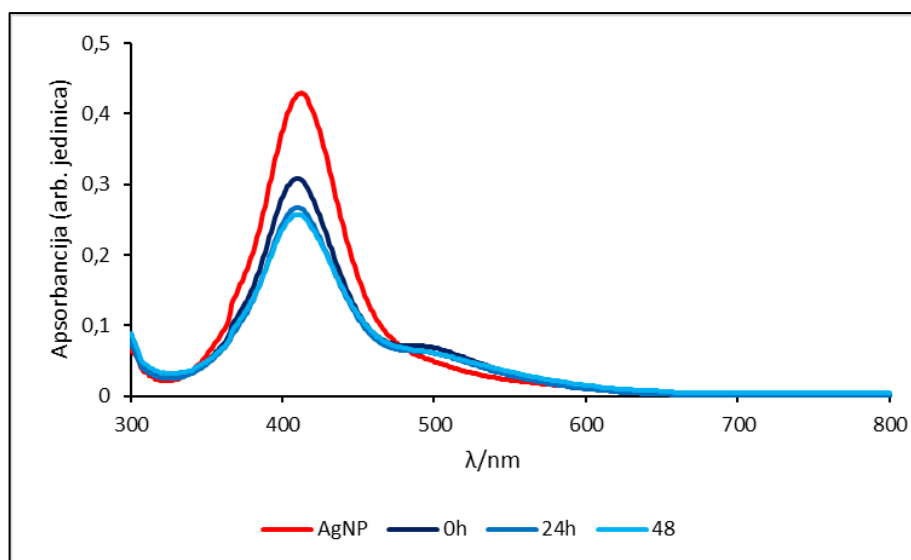
Prilog 7. Promjena apsorpcijskog spektra spektra **AgNP-a** ($0.02 \mu\text{g/mL}$) s omotačem od **humične kiseline** ($100 \mu\text{g/mL}$) snimanog u **ultračistoj vodi** kroz 48 h.



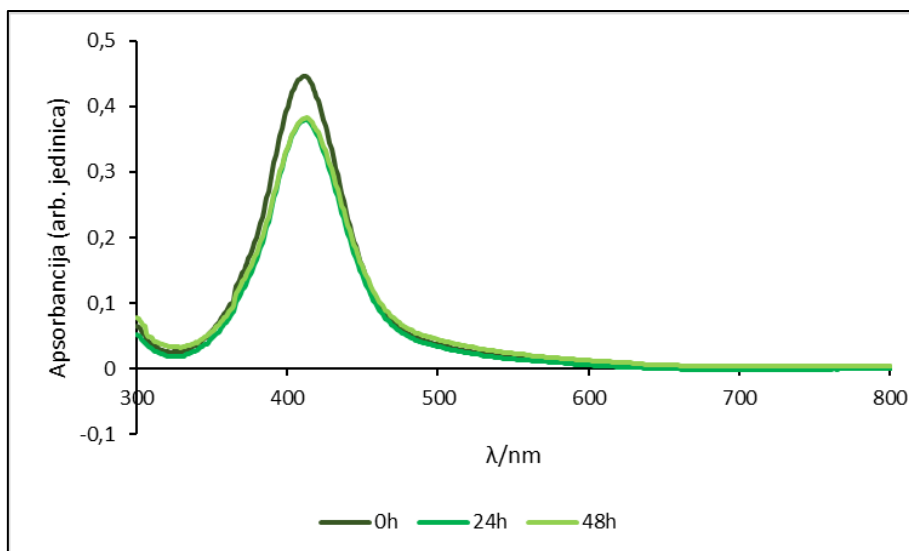
Prilog 8. Promjena apsorpcijskog spektra **AgNP-a** ($0.02 \mu\text{g/mL}$) s omotačem od **humične kiseline** ($100 \mu\text{g/mL}$) snimanog u **ASW** kroz 48 h.



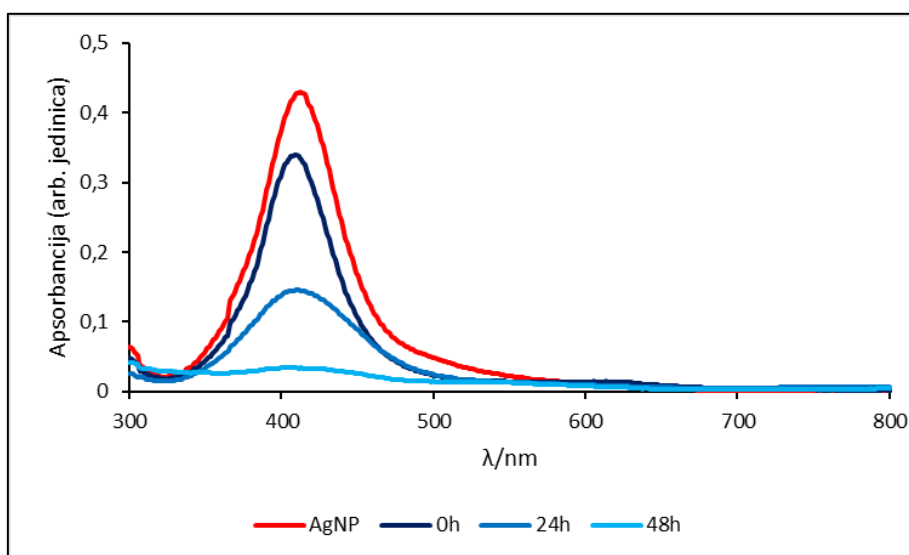
Prilog 9. Promjena apsorpcijskog spektra **AgNP-a** ($0.02 \mu\text{g/mL}$) s omotačem od **alginata** ($100 \mu\text{g/mL}$) snimanog u **ultračistoj vodi** kroz 48 h.



Prilog 10. Promjena apsorpcijskog spektra **AgNP-a** ($0.02 \mu\text{g/mL}$) s omotačem od **alginata** ($100 \mu\text{g/mL}$) snimanog u **ASW** kroz 48 h.



Prilog 11. Promjena apsorpcijskog spektra **AgNP-a** (0.02 µg/mL) s omotačem od **BSA** (100 µg/mL) snimanog u **ultračistoj vodi** kroz 48 h.



Prilog 12. Promjena apsorpcijskog spektra **AgNP-a** (0.02 µg/mL) s omotačem od **BSA** (100 µg/mL) snimanog u **ASW** kroz 48 h.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli
Fakultet prirodnih znanosti
Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

Završni rad

Uloga prirodne organske tvari u smanjenju embriotoksičnosti kroz oslobađanje iona s površine metala u morskoj vodi

VANJA MODRUŠAN

Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, G. Paliaga 5, 52210 Rovinj

SAŽETAK

Sve veća upotreba nanočestica (NP) dovodi do značajnijih ispuštanja u okoliš, što uzrokuje zabrinutost zbog potencijalnog štetnog djelovanja na biotu. Prirodna organska tvar (NOM) može značajno utjecati na svojstva NP-a u smislu koloidne stabilnosti zbog stvaranja površinskog omotača i smanjenja otpuštanja iona. U morskoj vodi, NOM na različite načine može pospješiti stabilizaciju ili stvaranje velikih nakupina, što posljedično smanjuje bioraspodivnost NP-a za biotu. U ovom radu je pokazano da humična kiselina, alginat i goveđi serumski albumin, kao predstavnici NOM-a, u ekološki relevantnim koncentracijama (0.001-0.1 µg/mL) pokazuju antagonističke učinke na toksičnost nanočestica srebra (40 nm). Smanjena toksičnost nanočestica u prisutnosti niskih koncentracija NOM-a pripisuje se sposobnosti NOM-a da destabilizira koloid, što dovodi do agregacije čestica, koje posljedično imaju manju ukupnu površinu a time i smanjeno otpuštanje iona u morsku vodu. Osim toga, NOM može dodatno smanjiti toksičnost nanočestica srebra kod embrijima vezanjem iona srebra iz vode.

Ključne riječi: prirodna organska tvar, nanočestice srebra, *Arbacia lixula*, UV/VIS spektrofotometrija, eksperiment embrionalnog razvoja ježinca

Mentor: prof. dr.sc. Daniel Mark Lyons

Ocjenjivači: doc. dr. sc. Petra Burić
doc. dr. sc. Ines Kovačić
prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

BASIC DOCUMENTATION CARD

Juraj Dobrila University of Pula
University Undergraduate Study Programme – Marine Sciences

Bachelor thesis

The role of natural organic matter in mitigating embryotoxicity through modulation of ion release from metal surfaces in seawater

VANJA MODRUŠAN

Ruđer Bošković Institute, Center for Marine Research, G. Paliaga 5, 52210 Rovinj

ABSTRACT

Growing use of nanoparticles (NP) is an increasing cause for concern due to the probability that they will enter the environment, potentially leading to harmful impacts on biota. Natural organic matter (NOM) can significantly effect the properties of NP in terms of its colloidal stability as it may act as a surface coating on the NP, reducing the release of ions. In addition, NOM in seawater may variously promote either colloidal stabilisation, or the formation of large aggregates which reduces the bioavailability of NP to biota. Herein we report that humic acid, alginate and bovine serum albumin, as proxies for NOM, at environmentally relevant concentrations (0.001 - 0.1 µg/mL) show antagonistic impacts on silver nanoparticle (40nm) toxicity. The reduced toxicity of these nanoparticles in the presence of low NOM concentrations is ascribed to the ability of NOM to destabilise the colloid, leading to aggregation of particles, which consequently present a smaller total surface area and hence reduced release of silver ions into the seawater. In addition, NOM may also have some ability to sequester silver ions from the water and thus further reduce silver nanoparticle toxicity in embryos.

Key words: natural organic matter, silver nanoparticles, *Arbacia lixula*, UV/VIS spectrophotometry, sea urchin embryo development test

Supervisor: Prof. Daniel Mark Lyons

Reviewers: Asst. Prof. Petra Burić

Asst. Prof. Ines Kovačić

Prof. Daniel Mark Lyons