

Utjecaj veličine nanočestice srebra na toksičnost kod morskih makroalgi

Krasulja, Lara

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:137:120334>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-22**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Fakultet prirodnih znanosti u Puli

Sveučilišni preddiplomski studij znanost o moru

LARA KRASULJA

**ISPITIVANJE UTJECAJA VELIČINE NANOČESTICA SREBRA NA TOKSIČNOST
KOD MORSKIH MAKROALGI**

Završni rad

Pula, rujan 2022.

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

LARA KRASULJA

**ISPITIVANJE UTJECAJA VELIČINE NANOČESTICA SREBRA NA TOKSIČNOST
KOD MORSKIH MAKROALGI**

Završni rad

JMBAG: 0303091127

Status: redovna studentica

Predmet: Nanotehnologija u istraživanju mora

Mentor: prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

Komentor: Ivana Čarapar mag.oecol.

Pula, rujan 2022.



IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI (završni rad)

Ja, dolje potpisana Lara Krasulja, kandidatkinja za prvostupnika (baccalaureus) 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: Lara Krasulja

U Puli, rujan 2022. godine



IZJAVA

o korištenju autorskog djela

Ja, Lara Krasulja dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava korištenja, da moj završni rad pod nazivom " Ispitivanje utjecaja veličine nanočestica srebra na toksičnost kod morskih makroalgi" 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, rujan 2022.

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. Paolo Paliaga

Fakultet prirodnih znanosti, Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Član: izv. prof. dr. sc. Andrej Jaklin

Centar za istraživanje mora, Institut Ruđer Bošković, Rovinj

Mentor: prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

Centar za istraživanje mora, Institut Ruđer Bošković, Rovinj

Datum i mjesto obrane završnog rada: 26. 9. 2022., Rovinj

Rad je rezultat samostalnog istraživačkog rada.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Danielu Marku Lyonsu na pomoći, uloženom vremenu i strpljenju tijekom praktične izvedbe i prilikom pisanja završnog rada.

Zahvaljujem se komentorici mag. oecol. Ivani Čarapar na podijeljenom znanju i pomoći pri pisanju završnog rada.

Zahvaljujem se Centru za istraživanje mora u Rovinju za mogućnost izrade završnog rada u Laboratoriju za morsku nanotehnologiju i biotehnologiju.

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, Sveučilište 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”.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Nanočestice i nanotehnologija	1
1.1.1. Podjela i sinteza nanočestica	1
1.1.2. Ispuštanje i ponašanje nanočestica u morskom okolišu	3
1.2. Nanočestice srebra (AgNPs)	4
1.2.1. Primjena AgNPs	4
1.2.2. Ponašanje AgNPs u morskom okolišu	4
1.2.3. Mehanizmi unosa AgNPs i utjecaj na morske organizme	5
1.3. Morske makroalge	6
1.3.1. Crvene alge (<i>Rhodophyta</i>)	7
1.3.2. <i>Laurencia obtusa</i> (Hudson) J.V.Lamouroux, 1813	8
1.4. Biomarkeri oksidacijskog stresa u morskim makroalgama	9
2. Cilj istraživanja	10
3. Materijali i metode	11
3.1. Kemikalije	11
3.2. Karakterizacija AgNPs UV-Vis spektroskopijom	11
3.3. Tretiranje crvene morske makroalge <i>Laurencia obtusa</i> s AgNPs i AgNO ₃	11
3.4. Biokemijske analize	13
3.4.1. Određivanje količine produkata lipidne peroksidacije (TBARS)	13
3.4.2. Određivanje sadržaja vodikovog peroksida (H ₂ O ₂)	15
3.5. Statistička obrada podataka	16
4. Rezultati	16
4. 1. Karakterizacija AgNPs	16
4.2. Biokemijske analize	18
4.2.1. Određivanje količine produkata lipidne peroksidacije (TBARS)	18
4.2.2. Određivanje sadržaja vodikovog peroksida (H ₂ O ₂)	19
5. Rasprava	21
6. Zaključak	26
7. Literatura	27
8. Izvori slika	31

1. Uvod

Velika proizvodnja i uporaba proizvoda s nanočesticama dovode do ispuštanja velike količine istih u morski okoliš što može izazvati zabrinutost zbog negativnog utjecaja nanočestica na morske organizme (Abbas i sur., 2020). Organizmi se od davnina susreću s prirodnim nanočesticama i na njih su evolucijski prilagođeni. No, za razliku od prirodnih nanočestica, umjetno stvorene nanočestice mogu predstavljati problem za različite vrste organizama. Razlog tome je da su umjetno stvorene nanočestice puno reaktivnije od prirodnih i ispuštaju se u puno većoj koncentraciji (Baker i sur., 2013). Iz navedenog razloga danas se sve češće istražuje utjecaj umjetno stvorenih nanočestica na morske organizme (Abbas i sur., 2020).

1.1. Nanočestice i nanotehnologija

Nanočestice (engl. *nanoparticles*, NPs) su čestice veličine 1-100 nanometara (nm). Mogu biti prirodnog i antropogenog podrijetla, a u okolišu se prirodno nalaze u obliku pepela, pustinjske prašine i metalnih oksida. Svojstva nanočestica izrazito se razlikuju od svojstva koje posjeduju makroskopski materijali iste tvari, a to je posljedica veće površine naspram volumena. Na površini nanočestica nalazi se mnogo atoma koji imaju mogućnost stupati u kemijske reakcije s drugim tvarima što čini nanočestice vrlo reaktivnim. Upravo zbog ovih razloga čovjek je počeo istraživati, proizvoditi i koristiti nanočestice (Ealia i Saravanakumar, 2017).

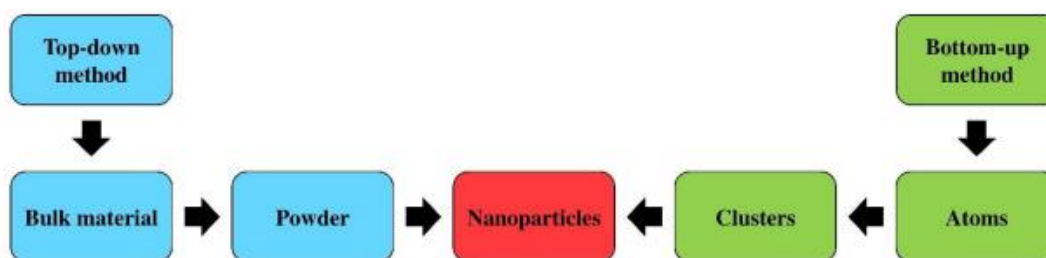
Nanotehnologija je znanost koja se bavi istraživanjem i proizvodnjom materijala na nanometarskoj skali (Hulla i sur., 2015). Primijećeno je da umjetno stvorene nanočestice i nanomaterijali posjeduju posebna mehanička, katalitička i optička svojstva (Klaine i sur., 2008). Stoga su umjetno stvorene nanočestice našle primjenu u mnogim industrijama poput elektroničke, farmaceutske, kozmetičke, biomedicinske i energetske. Nanotehnologija ima veliki potencijal u poboljšanju kvalitete zraka, vode i tla, ali može imati i veliki utjecaj na okoliš i organizme (Biswas i Wu, 2005).

1.1.1. Podjela i sinteza nanočestica

Nanočestice su podijeljene u različite skupine ovisno o njihovoj veličini, morfologiji i kemijskim svojstvima (Khan i sur., 2017). Mogu se podijeliti na organske, anorganske i

nanočestice na bazi ugljika. U skupinu organskih nanočestica spadaju: micelle, feritin, dendrimeri i liposomi. Organske nanočestice su biorazgradive te se zbog svojih karakteristika najčešće koriste u biomedicini. Anorganske nanočestice dijele se na: nanočestice na bazi metala i nanočestice na bazi metalnih oksida. Treća skupina su nanočestice na bazi ugljika, a u njih spadaju: fulereni, grafeni, ugljične nanocijevi, ugljična nanovlakna i čađa (Ealias i Saravanakumar, 2017). Osim ove podjele, ISO standard je definirao podjelu na jednodimenzionalne i dvodimenzionalne nano objekte.

Nanočestice se sintetiziraju metodama koje su kategorizirane kao: „odozgo prema dolje“ (Top-Down) i „odozdo prema gore“ (Bottom-up) (Slika 1.) (Khan i sur., 2017).



Slika 1. Sinteza nanočestica (Ealias i Saravanakumar, 2017).

„Top-down“ metoda ili destruktivna metoda je redukcija većeg materijala na čestice nanometarskog razmjera, a to se postiže uz pomoć mehaničkog mljevenja, nanolitografije, laserske ablacije, raspršivanja i toplinske razgradnje. Među ovim metodama mehaničko mljevenje je najraširenije te se koristi za proizvodnju različitih nanočestica. U „top-down“ metode spada i nanolitografija, proces izrezivanja oblika ili strukture na materijalu koji je osjetljiv na svjetlost. Metoda laserske ablacije je sinteza nanočestica iz otopina te predstavlja jednu od pouzdanijih „top-down“ metoda za proizvodnju nanočestica različitih metala. Proces kojim se taloži tanki sloj nanočestica nakon čega slijedi žarenje je metoda raspršivanja. Posljednja „top-down“ metoda je toplinska razgradnja u kojoj se razbijaju kemijske veze pomoću endotermne kemijske razgradnje, a konačni produkt su nanočestice (Ealias i Saravanakumar, 2017).

„Bottom-up“ ili konstruktivna metoda je stvaranje nanočestica od atoma do nanočestica. U takve metode spadaju: sol-gel, kemijsko taloženje pare, piroliza i biosinteza. Sol-gel je

najkorištenija metoda u „bottom-up“ pristupu. Kemijsko taloženje pare je metoda u kojoj se tanki sloj plinovitih reaktanata taloži na podlogu, a piroliza je metoda kojom se nanočestice dobivaju spaljivanjem prekursora (tekućine ili pare). Biosinteza je pristup koji sintetizira biorazgradive nanočestice, a koristi bakterije, biljne ekstrakte i gljivice. Biosintetizirane nanočestice su jedinstvene nanočestice koje pronalaze svoj put u biomedicinskim primjenama. Posljednjih godina znanstvenici pokušavaju pronaći nove metode sinteze nanočestica koje će biti ekonomično i ekološki prihvatljivije (Ealias i Saravanakumar, 2017).

1.1.2. Ispuštanje i ponašanje nanočestica u morskom okolišu

Nanočestice u morski okoliš dospijevaju iz otpadnih voda, zračnim donosom ili riječnim donosom (Baker i sur., 2013). Tri glavna izvora iz kojih se nanočestice ispuštaju u morski okoliš su proizvodi za osobnu njegu (kreme za sunčanje i kozmetika), otpadne vode i premazi protiv obraštaja koji se koriste na morskim plovilima (Matranga i Corsi, 2012). Nakon ispuštanja u morski okoliš, nanočestice mogu biti podvrgnute različitim procesima transformacije poput agregacije, aglomeracije, otapanja, sedimentacije, adsorpcije, oksidacije i redukcije. Takvim procesima se posljedično mijenja mobilnost, biodostupnost i toksičnost nanočestica. Ponašanje i procesi transformacije nanočestica određeni su fizikalno-kemijskim svojstvima nanočestica i uvjetima u morskom okolišu. Fizikalno-kemijske karakteristike koje određuju ponašanje nanočestica su veličina, površinski naboj i površinski premaz („capping agents“). Uvjeti u morskom okolišu koji utječu na transformaciju nanočestica su pH, ionska jakost, temperatura, organska tvar i organizmi (Abbas i sur., 2020). Morski organizmi poput ježinaca, školjkaša, rakova i riba mogu unositi i nakupljati nanočestice u svom organizmu što posljedično dovodi do smrti tih organizama. Uz navedeno, postoji mogućnost biomagnifikacije odnosno povećanje koncentracije nanočestica s jedne trofičke razine na drugu, no to još nije u potpunosti istraženo (Matranaga i Corsi, 2012).

1.2. Nanočestice srebra (AgNPs)

1.2.1. Primjena AgNPs

Jednu od najvećih primjena u različitim industrijama imaju nanočestice srebra (engl. *silver nanoparticles*, AgNPs). AgNPs imaju izuzetno dobra svojstva poput dobre toplinske i električne vodljivosti, male veličine i antibakterijskog djelovanja. Toplinska i električna vodljivost čini AgNPs vrlo dobrom opcijom u elektronici: u izradi tranzistorskih elektroda, uređaja za pohranu podataka (USB) i baterija. Zbog velike površinske energije AgNPs su u mogućnosti katalizirati brojne reakcije stoga se koriste u različitim kemijskim industrijama. Dokazano je kako AgNPs mogu inhibirati rast gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija te imaju dobra antivirusna i fungicidna svojstva. Upravo zbog navedenih karakteristika nalaze se u mnogim proizvodima poput materijala za pakiranje hrane, u sredstvima za pročišćavanje vode, u čarapama i donjem rublju, u deterdžentima za rublje, u losionima, sapunima, medicinskim oblozima i drugim sličnim proizvodima. Široka primjena AgNPs u svakodnevnom životu, njihova proizvodnja, erozija, pranje i odlaganje proizvoda koji sadrže AgNPs dovode do ispuštanja istih u morski okoliš, a najčešće se ispuštaju putem otpadnih voda (Juan-Yu i sur., 2013).

1.2.2. Ponašanje AgNPs u morskom okolišu

Ponašanje AgNPs u morskom okolišu određeno je fizikalno-kemijskim svojstvima i uvjetima u morskom okolišu. Svojstva AgNPs koja mogu utjecati na ponašanje su oblik, veličina i površinski premaz. Uvjeti u okolišu koji mogu utjecati na ponašanje AgNPs su ionska jakost, prisutnost organske tvari, pH i prisutnost drugih zagađivala. Ionska jakost se smatra važnim čimbenikom u ponašanju AgNPs. Naime, ustanovljeno je da ionska jakost utječe na agregaciju, odnosno povećanjem ionske jakosti dolazi do povećanja agregacije AgNPs, a povećana agregacija dovodi do sedimentacije. Ponašanje AgNPs također ovisi o prisutnosti sredstva za stabilizaciju nanočestica. Dokazano je da AgNPs koji su bile premazane sredstvima za stabilizaciju nisu oksidirale te su ostale stabilne. pH je još jedan faktor koji može utjecati na ponašanje AgNPs jer pri višim pH vrijednostima dolazi do otapanja AgNPs i ispuštanja Ag⁺ iona (Trotella i sur., 2020). Općenito, AgNPs su svrstane u visoko topive nanočestice (Abbas i sur., 2020). Nadalje, Ag⁺ ioni mogu biti vrlo toksični za različite skupine organizama te imaju veliku mogućnost biokoncentracije

kontakta sa sedimentom u kojima se najčešće nalaze agregirane AgNPs (Tortella i sur., 2020).

Prijašnjim istraživanjima je dokazano da AgNPs i Ag⁺ ioni u morskim organizmima mogu stvarati reaktivne izomere kisika (ROS), oštetiti staničnu membranu, oksidirati i denaturirati proteine, uzrokovati disfunkciju mitohondrija, oštetiti DNA i inhibirati staničnu proliferaciju (Tortella i sur., 2020). ROS su prirodni proizvodi staničnog metabolizma i najčešće se mogu ukloniti uz pomoć različitih enzima. No, povećana količina ROS-a se ne može biti uklonjena antioksidativnim mehanizmima i može rezultirati oksidativnim stresom. Slobodni radikali koji nastaju oksidativnim stresom mogu „napadati“ stanične membrane, reagirati s lipidima, proteinima te tako poremetiti normalni stanični transportni sustav. U mnogim studijama je dokazano da se AgNPs mogu vezati na staničnu membranu, odnosno na lipidni dvosloj, a to može dovesti do poremećaja u propusnosti membrane i do ispuštanja iona te konačno do stanične smrti. Vezanjem u lipidni dvosloj dolazi do stvaranja nepravilnog oblika u vanjskoj membrani (Yu i sur., 2013). Potencijalni toksični učinci AgNPs također ovise o vremenu izlaganja (Tortella i sur., 2020). Većina trenutno dostupnih ekotoksikoloških podataka o AgNPs ograničeni su na slatkovodne organizme, a vrlo je malo radova dostupno o toksičnosti AgNPs na morskim organizmima (Matranga i Corsi, 2012). Najčešći modelni organizmi za istraživanje toksičnosti AgNPs su beskralješnjaci poput ježinaca, rakova i školjkaša. Ovi organizmi se odabiru zbog svojih povoljnih karakteristika kao što su kratki životni ciklus i jednostavnost uzgoja u laboratoriju. Rezultati dobiveni na modelnim organizmima vrlo su važni jer omogućuju ekstrapolaciju učinaka AgNPs na veće organizme poput sisavaca (Tortella i sur., 2020). No, potrebno je provoditi istraživanja i na drugim organizmima poput makroalgi zbog njihove važne uloge u morskom ekosustavu (Turner i sur., 2011).

1.3. Morske makroalge

Morske makroalge su skupina višestaničnih algi koje nastanjuju litoralno područje do dubine na kojoj ima dovoljno svjetlosti za odvijanje fotosinteze. Podijeljene su u tri skupine: smeđe alge (*Phaeophyceae*), zelene alge (*Chlorophyta*) i crvene alge (*Rhodophyta*). Procijenjeno je da se u morskom okolišu nalazi oko 1.800 različitih smeđih

algi, 6.200 crvenih algi i 1.800 zelenih algi (Mouritsen, 2013). Jednostavniji predstavnici makroalgi imaju jednostavno i nediferencirano tijelo koje nazivamo talus. Građa razvijenijih predstavnika makroalgi sastoji se od dijelova koji fizički nalikuju na korijen, stabljiku i list, ali ne dolazi do diferencijacije u njihovoj anatomskej građi. Stoga se označavaju kao rizoid, kauloid i filoid. Rizoidi su tvorbe slične korijenu, kauloidi tvorbe slične stabljici, a filoidi tvorbe slične listu. Makroalge su autotrofni organizmi koji sadrže klorofil, no osim klorofila postoji čitav niz drugih pigmenata poput: fukoksantina, fikoeritrina, fikocijanina i ostalih. Prisutnost pojedinih pigmenata ovisi o skupini makroalgi. Morske makroalge mogu se razmnožavati na različite načine poput vegetativnog, nespolnog i spolnog razmnožavanja. Vegetativno razmnožavanje je razmnožavanje pomoću vegetativnih dijelova, a javlja se kod najjednostavnijih oblika makroalgi. Nespolni način razmnožavanja odvija se uz pomoć nespolnih rasplodnih stanica ili spora. Stvaranju spora može prethoditi spolno razmnožavanje. Kod makroalgi često dolazi do izmjenjivanja dvije generacije, spolne i nespolne (Pavletić, 1971). Morske makroalge su primarni proizvođači i važan su dio hranidbenog lanca te pružaju stanište i skrovište mnogim vrstama beskralješnjaka i kralješnjaka (Sathianeson i sur. 2017). Njihov brzi odgovor na zagađivala čini ih odličnim pokazateljem stanja morskog ekosustava (Domingo i sur. 2019). Zbog svoje sposobnosti apsorbiranja i iskorištavanja hranjivih tvari kontroliraju eutrofikaciju i time mogu poboljšati kvalitetu i stabilnost morskih ekosustava (Liu i sur., 2018).

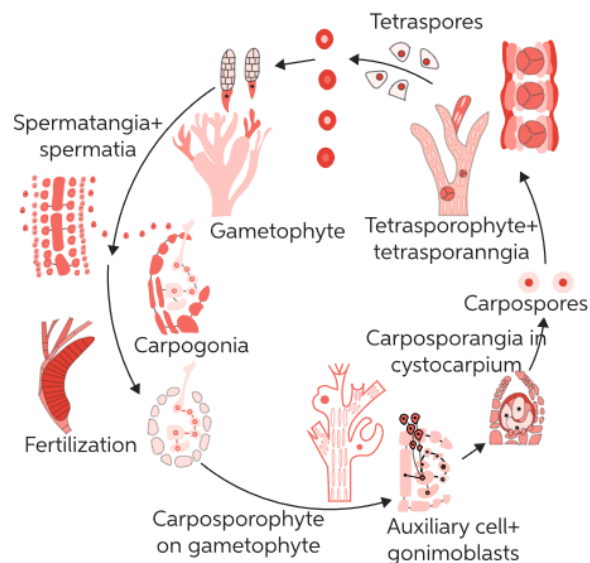
1.3.1. Crvene alge (*Rhodophyta*)

Većina pripadnika crvenih algi nalazi se u moru gdje su rasprostranjene od mediolitorala do kraja neritičke zone. Crvene alge mogu biti litofitske i epifitske. Oblici talusa crvenih algi mogu biti vlaknasti, cilindrični, plosnati, nitasti, razgranati i nerazgranati. Glavne komponente stanične stijenke su celuloza koja čini unutarnji sloj i pektin koji čini vanjski sloj. Uz ove komponente nalaze se još polisulfatni esteri, miofibrili i sluzavi matriks (Mayanglambam i Sahoo, 2015). Alge iz roda *Corallines* u svojoj staničnoj stijenci biomineraliziraju kalcijev karbonat te sudjeluju u stvaranju organogenih vapnenačkih stijena. Kloroplasti crvenih algi sadrže klorofil *a* i *d*, β -karoten, fikoeritrin i fikocijanin. Fikoeritrin je zaslužan za karakterističnu crvenu ili plavu boju algi. To je boja dušičnog karaktera koja je topiva u vodi, a fluorescira crveno-narančasto. Crvene alge posjeduju i

specifični rodamilon odnosno floridejski škrob koji se nalazi izvan plastida, a služi kao rezerva hranjivih tvari (Pavletić, 1971). Zbog svoje sposobnosti korištenja valnih duljina svjetlosti koje prodiru dublje u more, crvene alge najčešće obitavaju u zasjenjenim ili dubljim staništima (Dodds i Whiles, 2020). Razmnožavaju se na specifičan način. Rasplodne stanice (spore i gamete) uvijek su nepokretne, a većinom prevladava oogamija. U takvom razmnožavanju nepokretne gametangije ženke su posebno građene te se nazivaju karpogon. Nepokretne muške spolne stanice koje se nazivaju spermacije proizvode se pojedinačno u muškim spolnim organima, anteridijima. Nakon oplodnje iz karpogona nastaju sporogene niti koje proizvode nespolne spore. Daljnji razvoj algi i životni ciklus je različit kod različitih skupina crvenih algi (Pavletić, 1971). U mnogim tropskim i suptropskim međuplinnim zajednicama crvene alge su primarna komponenta flore. Kao primarni proizvođači one su izvor kisika, hrana su za razne heterotrofne vrste organizama te su supstrat za mnoge epifitske vrste biljaka i životinja. Također kao što je već spomenuto služe kao utočište i gnjezdilište mnogim vrstama morskih organizama. Neke vrste crvenih algi mogu izdržati velike abiotičke stresove kao što su ograničenje nutrijenata, intenzivno izlaganje svjetlu, osmotski tlak i isušivanje. Crvene alge široko se primjenjuju od strane čovjeka u različitim industrijama. Koristi se najmanje 125 vrsta crvenih algi diljem svijeta. Dvije najvažnije primjene su hrana i proizvodnja hidrokoloida odnosno agara (Grugel i Lopez-Bautista, 2007).

1.3.2. *Laurencia obtusa* (Hudson) J.V.Lamouroux, 1813

Crvena alga *Laurencia obtusa* spada u porodicu *Rhodomelaceae* (Guiry i Guiry, 2022). Talus *L. obtusa* je cilindričnog oblika crveno-ljubičaste do narančaste boje (Furnari i sur., 2001). Može narasti 10-15 cm u visinu i 1-1.5 cm u širinu (Taskin i Sukatar, 2013). Kod crvenih algi iz roda *Laurencia* vidljiv je diplohaplontski rasplodni ciklus. U takvom rasplodnom ciklusu gametofit nosi anteridije i karpogon. Nakon oplodnje jajne stanice izrastu u sporogene niti, karposporangije koje su diploidne što znači da ne dolazi do redukcijske diobe. Karposporangije stvaraju diploidne karpospore. Iz diploidnih karpospora nastaju jedinke koje su diploidne i nemaju seksualne organe već tetrasporangije koje uz redukcijsku diobu proizvode tetraspore. Iz tetraspora nastaju nove jedinke koje imaju spolne organe. Prema tome razlikujemo tri generacije: haploidni gametofit, diploidni karposporofit i diploidni tetrasporofit (Slika 3.) (Pavletić, 1971).



Slika 3. Diplohaplontski razvojni ciklus crvenih algi (preuzeto s <https://www.chegg.com/learn/biology/introduction-to-biology/red-algae>).

L. obtusa je epifitska alga (rijetko epilitska) koja obitava od donjeg mediolitorala do gornjeg infralitorala. Smatra se kozmopolitskom vrstom te je široko rasprostranjena u Sredozemnom moru (Furnari i sur., 2001). Postoji relativno veliki broj istraživanja o tvarima koje se nalaze u *L. obtusa*. Neke tvari djeluju kao antibiotici, a neke inhibiraju diobu stanica i razvoj morskih organizama, posebno ježinaca. Smatra se da sadrži tvari koje mogu biti toksične za kukce, stoga se istražuje za primjenu u pesticidima (Eniav, 2022).

1.4. Biomarkeri oksidacijskog stresa u morskim makroalgama

Većina današnjih istraživanja toksičnosti AgNPs na primarne proizvođače uglavnom je usmjerena na slatkovodne vrste i fitoplankton te ima vrlo malo podataka o utjecaju AgNPs na morske makroalge. Morske makroalge važni su primarni proizvođači koji izravno utječu na daljnje razine trofičkog lanca i posljedično na konačno stanje morskog ekosustava (Diaz-Pulido i McCook, 2008; Sfriso i sur., 2019). Smatra se da AgNPs mogu

inhibirati fotosintezu u morskim makroalgama i posljedično smanjiti njihovu biomasu (Gambardella i sur., 2015). Kao što je već ranije spomenuto, AgNPs u morskim organizmima mogu izazvati oksidacijski stres, pa tako i u morskim makroalgama. AgNPs i ispušteni Ag^+ ioni u organizmima stvaraju slobodne radikale, najčešće ROS-ove koji dovode do oksidacijskog stresa. U procesu oksidacije masnih kiselina kojeg nazivamo lipidna peroksidacija dolazi do stvaranja spoja malondialdehid (MDA). MDA se često koristi kao biomarker oksidacijskog stresa zbog jednostavnosti njegovog određivanja. U postupku određivanja lipidne peroksidacije dodatkom tiobarbiturne kiseline (TBA) i zagrijavanja uzorka dolazi do reakcije između TBA i MDA. Koncentracija MDA koja je nastala mjeri se UV-Vis spektroskopijom te se tako dobivaju podaci o lipidnoj peroksidaciji i štetnosti toksikanata na istraživani organizam (Olivares i sur., 2016). Još jedan vrlo važan biomarker oksidacijskog stresa je vodikov peroksid (H_2O_2). Vodikov peroksid proizvodi se u biljkama i algama tijekom normalnih fizioloških procesa i kao odgovor na stresne situacije. Određivanje H_2O_2 važno je u brojnim istraživanjima te su zbog njegove važnosti razvijene različite metode njegovog određivanja. Najčešće se koristi metoda koja se temelji na oksidaciji kalijevim jodidom (KI). Kada se H_2O_2 doda u KI dolazi do stvaranja žutog spoja. Upravo se ta reakcija koristi u određivanju H_2O_2 u tkivima biljaka i algi kao biomarker oksidacijskog stresa. Količina proizvedenog H_2O_2 mjeri se uz pomoć UV-Vis spektroskopije i kalibracijske krivulje (Junglee i sur., 2014). Još jedan biomarker koji se koristi u istraživanju učinaka toksikanata na biljke i alge je inhibicija učinkovitosti fotosustava II odnosno mjerenje fluorescencije klorofila *a*. Mjerenje fluorescencije klorofila *a* radi se uz pomoć Hansatecha prijenosnog mjerača fluorescencije klorofila *a*. Rezultati dobiveni u ovoj metodi ukazuju na djelovanje toksikanata na klorofil *a* i primarnu produkciju biljaka i algi (Turner i sur., 2011).

2. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je ispitivanje utjecaja različitih veličina AgNPs (20 i 60 nm) na toksičnost kod morskih makroalgi na modelnom organizmu *Laurencia obtusa* pomoću biomarkera lipidne peroksidacije (TBARS) i sadržaja vodikovog peroksida.

3. Materijali i metode

3.1. Kemikalije

Za istraživanje toksičnosti AgNPs na morskim makroalgama korištene su sljedeće kemikalije: štok otopina srebrovog nitrata (AgNO_3), suspenzija AgNPs veličine 20 i 60 nm dobavljača SigmaAldrich-a, ultračista voda dobivena pomoću sustava za purifikaciju, filtrirana morska voda dobivena filtriranjem morske vode kroz filter papir veličine 0,2 μm , tekući dušik, otopine 0,1% i 20% trikloroctene kiseline (TCA), otopina 0,5% tiobarbiturne kiseline (TBA), otopina 10 mM kalij-fosfatnog pufera (K_3PO_4) pH 7,00, otopina 1 M kalijeva jodida (KI) i vodikov peroksid (H_2O_2).

3.2. Karakterizacija AgNPs UV-Vis spektroskopijom

UV-Vis spektroskopijom snimljeni su spektri uzoraka AgNPs veličina 20 i 60 nm u ultračistoj vodi. Temeljne otopine AgNPs veličina 20 i 60 nm dodane su u zasebne plastične tubice u koje je dodana ultračista voda te su tubice stavljene na vorteks 10 sekundi. Svaka otopina prebačena je u zasebnu kivetu od kvarcnog stakla s optičkom duljinom stranice od 10 milimetara. Uzorci UV-vidljivih podataka prikupljeni su na spektrofotometru Shimadzu UV-1800 dvostrukog snopa zraka. Uzroci su mjereni otprilike svake 2 minute unutar sat vremena, te je dobiveno 39 točaka. Prikupljeni podaci obrađeni su s UV Probe 2.3.1. softverom.

3.3. Tretiranje crvene morske makroalge *Laurencia obtusa* s AgNPs i AgNO_3

Morske makroalge prikupljene su u mjesecu srpnju na području grada Pule, sjeverni Jadran. Nakon prikupljanja jedinke su stavljene u prijenosni hladnjak te su prenesene u protočne vanjske akvarije Centra za istraživanje mora u Rovinju. Alge su isti dan determinirane, a iz determiniranih skupina odabrana je vrsta *Laurencia obtusa* (slika 4.).



Slika 4. Morska crvena makroalga *Laurencia obtusa*.

Za tretiranje makroalge toksikantima bilo je potrebno 10 boca od 100 mL. U svih 10 boca stavljen je po jedan talus alge i dodano je 100 mL filtrirane morske vode. Morska voda je filtrirana uz pomoć sustava za filtriranje gdje je veličina filter papira bila 0,2 μm . Nakon toga u boce su dodani sljedeći toksikanti- AgNPs: Ag20, Ag60 i AgNO₃ koji služi za usporedbu toksičnosti. Toksikanti su dodani u koncentracijama od 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ i 100 $\mu\text{g/mL}$ tako da se su se temeljne otopine razrijedile u filtriranoj morskoj vodi. U prvu bocu nije dodan toksikant te je ta boca označena s 0 i služila je kao kontrola. U preostalih devet boca dodani su toksikanti u već spomenutim koncentracijama. Boce su označene na sljedeći način: Ag20-1, Ag20-10, Ag20-100; Ag60-1, Ag60-10, Ag60-100; Ag-1, Ag-10 i Ag-100. Zatim su u boce postavljene cijevi za aeraciju kako bi osigurale dovoljan protok zraka. Tako pripremljene boce s makroalgama ostavljene su 24 sata, 16 sati svjetlo i 8 sati mrak na temperaturi od +/-22°C.

Nakon 24 sata talusi su izvađeni iz boca te su stavljeni na predmetna stakalca nakon čega se uzelo tkivo za biokemijske analize. Tkivo je stavljeno u tekući dušik te se premjestilo u mikrotubice volumena 2 mL koje su prethodno označene na isti način kao i boce (slika 5.). Mikrotubice su zatim stavljene na -80°C.



Slika 5. Mikrotubice s tretiranom crvenom morskom makroalgom *L. obtusa*.

3.4. Biokemijske analize

3.4.1. Određivanje količine produkata lipidne peroksidacije (TBARS)

Analiza količine produkata lipidne peroksidacije određena je prema metodi Verma i Dubey (2003). Kao što je već spomenuto MDA koji nastaje tijekom lipidne peroksidacije važan je biomarker oksidacijskog stresa koji pomaže u određivanju toksičnosti istraživanog toksikanta na organizme (Olivares i sur.,2016). Uzorci tkiva makroalgi *L. obtusa* koji su prethodno tretirani toksikantima i zaleđeni na -80°C homogenizirani su tekućim dušikom u tarioniku s tučkom. Prah algi koji je dobiven homogenizacijom stavljen je u tubice, tako da je u svaku tubicu stavljeno 0,2 g praha. Nakon toga prah je ekstrahiran uz dodatak 1 mL 0,1% otopine trikloroctene kiseline (TCA). Otopina TCA prethodno je napravljena otapanjem 0,1 g TCA u 100 mL destilirane vode. Uzorci su stavljeni u centrifugu na 5 minuta na 6.000 g pri temperaturi od 4°C . Nakon toga iz tubica je odvojeno 0,5 mL supernatanta u tubice sa čepom na navoj. U iste tubice je zatim dodano 1 mL TBA u TCA (otopina 0,5% tiobarbiturne kiseline u 20% otopini trikloroctene kiseline). Slijepa proba je

sadržavala 1,5 mL TBA u TCA bez homogeniziranog tkiva, a ona služi kako bi dokazali da dodatkom TBA u TCA bez homogeniziranog tkiva odnosno MDA nema reakcije. Nakon dodavanja TBA u TCA reakcijske smjese su se pomiješale na vorteksu 10 sekundi. Zatim su tako pripremljeni uzorci stavljeni u vodenu kupelj na 30 minuta i 95°C (slika 6.). U takvim uvjetima dolazi do reakcije raspada lipidnih peroksida i nastaju produkti od kojih su većinom malondialdehidi (MDA) koji reagiraju s TBA. Nakon 30 minuta reakcija je zaustavljena stavljanjem uzoraka na led. Potom su se uzorci centrifugirali na 15 minuta na 18.000 g i temperaturi od 4°C. Dobiveni supernatanti pepitirani su u plastičnu kivetu i zatim je UV-Vis spektroskopijom mjerena apsorbancija pri valnim duljinama od 532 nm i 600 nm. Također napravljena su još dva replikata kako bi se smanjila pogreška u rezultatima. Dobiveni rezultati lipidne peroksidacije izraženi su kao MDA u nmol/g svježe tvari prema jednadžbi:

$$\text{sadržaj MDA} = (A_{532} - A_{600}) / (m * \epsilon * l) \text{ [nmol/g svježe tvari]}$$

Navedeni simboli prikazuju sljedeće:

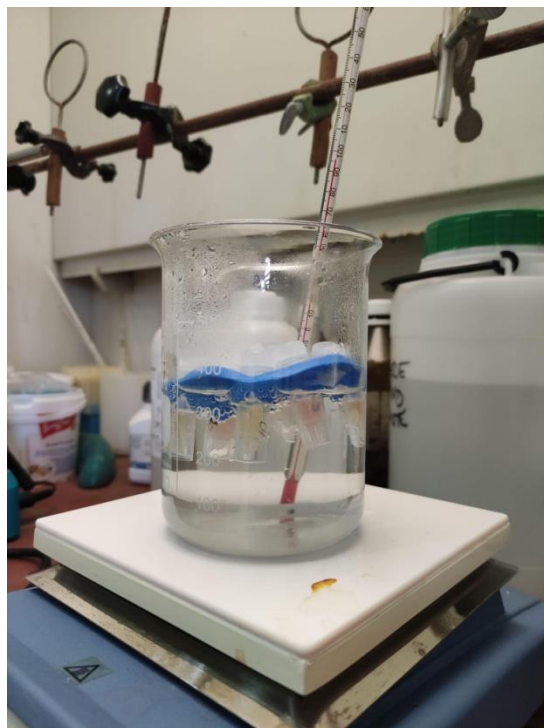
A₅₃₂- apsorbancija izmjerena na 532 nm,

A₆₀₀- apsorbancija izmjerena na 600 nm,

m- masa tkiva algi

ϵ - molarni apsorpcijski koeficijent

l- duljina puta



Slika 6. Vodena kupelj s uzorcima.

3.4.2. Određivanje sadržaja vodikovog peroksida (H_2O_2)

Sadržaj H_2O_2 u tretiranim tkivima morske markoalge *L. obtusa* određene su metodom prema Alexieva i sur. (2001). Vodikov peroksid je također važan biomarker oksidacijskog stresa te se najčešće koristi metoda oksidacije s kalijevim jodidom (Junglee i sur., 2014). Uzorci tkiva makroalgi homogenizirani su istom metodom kao u prethodnom eksperimentu. Nakon homogenizacije, u svaku tubicu od 2 mL dodano je otprilike 0,2 g homogeniziranog praha makroalgi. Zatim je prah ekstrahiran dodatkom 2 mL 0,1% otopine TCA. Tubice su ponovno označene na isti način kao i u prethodnim eksperimentima. Ekstrakti su zatim centrifugirani 10 minuta na 20.000 g i 0°C. Nakon centrifugiranja dobiveni supernatanti su prebačeni u čiste tubice. Za mjerenje uzoraka, u tubici od 2 mL promiješano je 0,5 mL supernatanta s 0,5 mL 10 mM otopine kalij-fosfatnog pufera (pH 7,00) i 1 mL 1 M otopine kalijeva jodida (KI). Zatim je sadržaj tubica pomiješan na vorteksu 10 sekundi te je prebačen u plastične kivete. Uzorci su zatim mjereni na UV-Vis spektrofotometru pri valnoj duljini od 390 nm. U slijepu probu dodano je samo 0,1%

otopine TCA bez homogeniziranog tkiva. Sadržaj H_2O_2 izračunat je pomoću baždarene krivulje pripremljene s H_2O_2 poznatih koncentracija. Rezultati su izraženi kao nmol/g svježe mase.

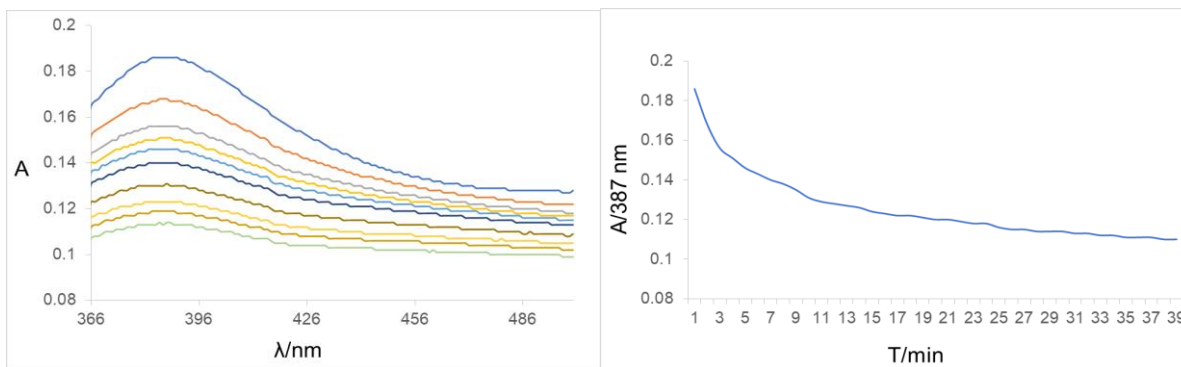
3.5. Statistička obrada podataka

Rezultati lipidne peroksidacije i sadržaja H_2O_2 prikazani su kao prosječna vrijednost \pm standardna greška te su testirani ANOVA testom u programu OriginPro 2016. Prije ANOVA testa bilo je potrebno ispitati podatke na normalnost distribucije (Shapiro-Wilkovim testom) i homogenost varijance (Leveneovim testom). Podaci koji su zadovoljili ove uvjete testirani su parametarskim ANOVA testom, a nakon toga je uslijedio Tukeyev test za razliku unutar skupina. Podaci koji nisu zadovoljili prethodne uvjete, testirani su neparametrijskim pristupom, odnosno analizom varijance između grupa Kruskal-Wallisovim testom i Mann-Whitney U-testom. Razina značajne razlike između skupina makroalgi koje su tretirane u odnosu na kontrolne uzorke odabrana je kao $p < 0,05$ u oba eksperimenta.

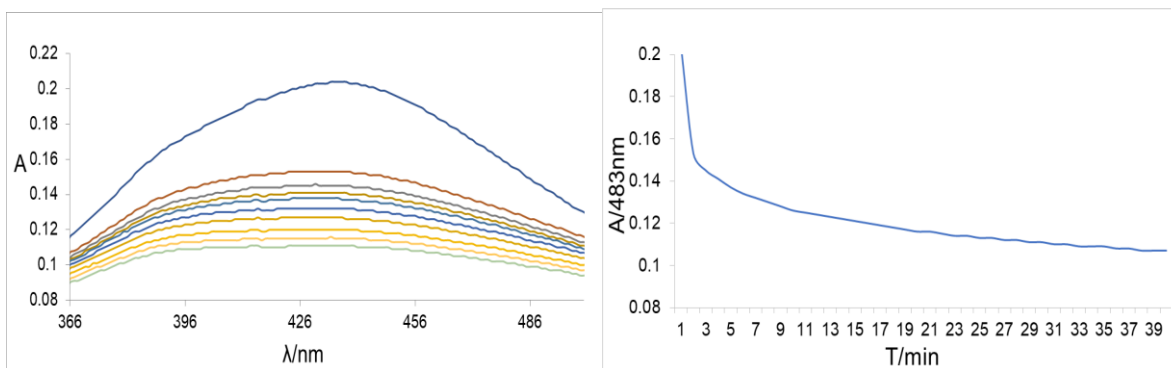
4. Rezultati

4. 1. Karakterizacija AgNPs

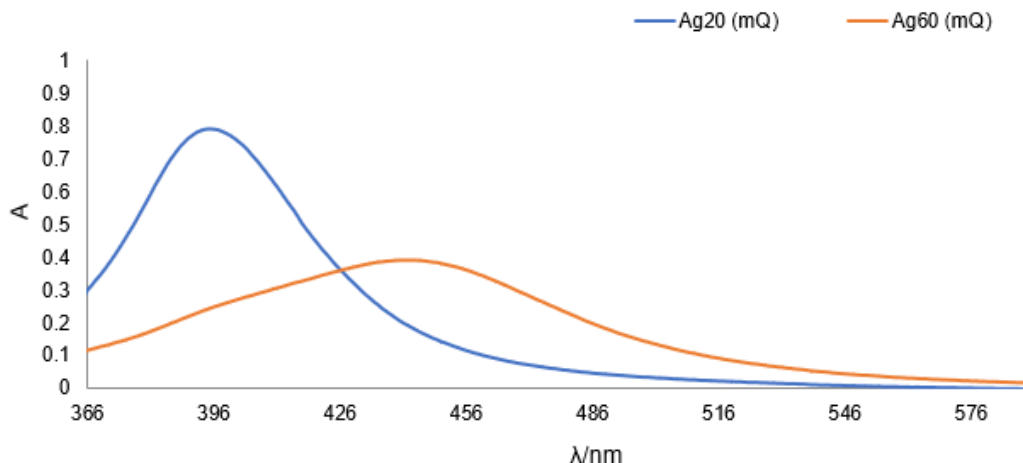
UV-Vis spektroskopijom dobiveni su spektri uzoraka Ag20 i Ag60 u ultračistoj vodi. Uzorak Ag20 pokazuje apsorpcijski pik s maksimumom na 387 nm (slika 7.), a uzorak Ag60 pokazuje apsorpcijski pik s maksimumom na 438 nm (slika 8.) Dobiveni rezultati odgovaraju površinskoj plazma rezonanciji. Uočeno je da se s vremenom smanjuje intenzitet maksimuma apsorpcijskog pika te se on pomiče na niže valne duljine. Općenito maksimalni pik AgNPs nalazi se između 390-460 nm, a maksimalni pik ovisi o veličini nanočestica (Burić, 2018). Veće nanočestice imaju povećanje maksimalnog apsorpcijskog pika što je jasno vidljivo na slici 9.



Slika 7. Maksimum apsorpcijskog pika na 387 nm (desno) i promjena apsorpcijskog spektra Ag20 u ultračistoj vodi s vremenom od 1 sata (lijevo).



Slika 8. Maksimum apsorpcijskog pika na 438 nm (lijevo) promjena apsorpcijskog spektra Ag60 u ultračistoj vodi s vremenom od 1 sata (desno).

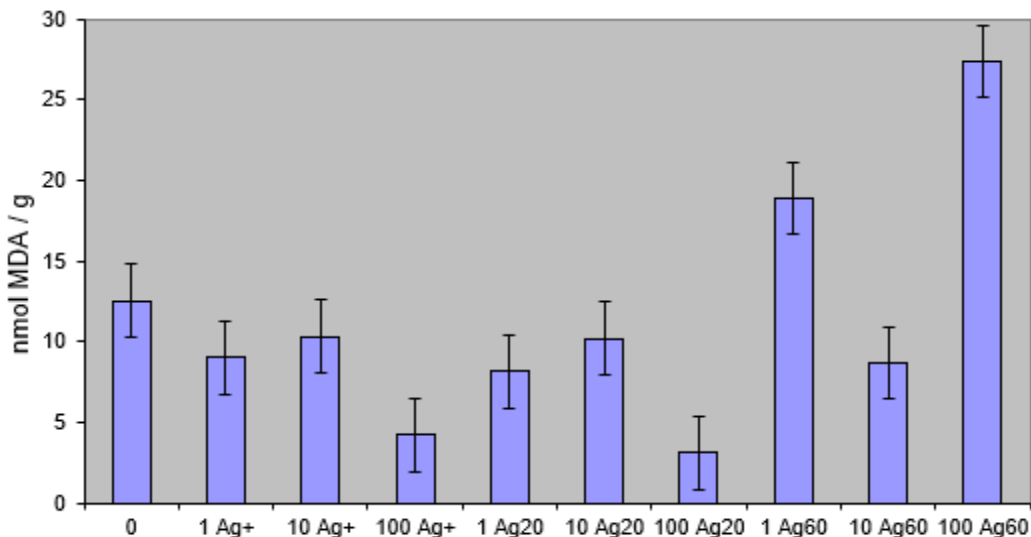


Slika 9. Apsorpcijski spektri AgNPs veličina 20 i 60 nm u ultračistoj vodi.

4.2. Biokemijske analize

4.2.1. Određivanje količine produkata lipidne peroksidacije (TBARS)

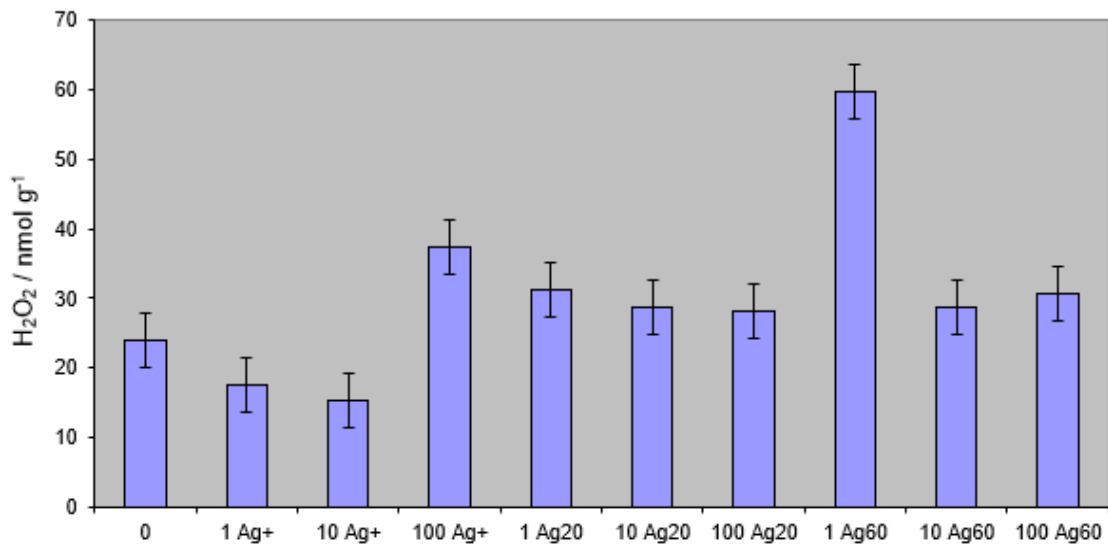
Lipidna peroksidacija u morskoj makroalgi *L. Obtusa* koja je podvrgnuta tretmanu s AgNPs (Ag20 i Ag60) i AgNO₃ procijenjena je određivanjem količine MDA. Prosječne vrijednosti MDA ± standardna odstupanja u tretiranoj makroalgi prikazane su na slici 10. Vidljivo je da se najveća proizvodnja MDA pojavila pri Ag60 u koncentraciji od 100 µg/mL te je iznosila 27,35 nmol/g. Ag20 nisu značajno uzrokovale stvaranje MDA s obzirom na kontrolu, Ag20 pri koncentraciji od 10 µg/mL su uzrokovale stvaranje MDA od 10,18 nmol/g. AgNO₃ odnosno Ag⁺ ioni najtoksičniji su bili pri koncentraciji od 10 µg/mL, a stvaranje MDA pri toj koncentraciji iznosilo je 10.30 nmol/g što nije značajno s obzirom na kontrolu. Ovakvi rezultati ukazuju da su na crvenim morskim makroalgama veće nanočestice toksičnije od manjih. Također vidljivo je da su Ag60 toksičnije od Ag⁺ iona. Tretirane makroalge nisu pokazale statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu na razini p<0,05.



Slika 10. Prosječne vrijednosti količine MDA ± standardne pogreške u tretiranoj morskoj makroalgi *L. obtusa* (brojevi ispred Ag označavaju koncentracije od 1, 10 i 100 µg/mL).

4.2.2. Određivanje sadržaja vodikovog peroksida (H₂O₂)

Prosječne vrijednosti sadržaja vodikovog peroksida ± standardna odstupanja u morskoj makroalgi *L. obtusa* koja je izložena tretmanima s AgNPs (Ag20, Ag60) i AgNO₃ prikazana je na slici 11. Najveći sadržaj H₂O₂ zabilježen je u algama koje su tretirane s Ag60 u koncentraciji od 1 µg/mL gdje je količina H₂O₂ iznosila 59,67 nmol/g. Ag20 su najveću proizvodnju H₂O₂ uzrokovale pri istoj koncentraciji kao i Ag60, ali značajno manje nego Ag60 odnosno 28,07 nmol/g. Sadržaj vodikovog peroksida u algama koje su bile tretirane s AgNO₃ bio je najveći pri koncentraciji od 100 µg/mL te je iznosio 37,41 nmol/g. Ostale koncentracije AgNO₃ nisu izazvale značajnu proizvodnju H₂O₂ u usporedbi s kontrolom. U ovim rezultatima također se može uočiti kako su veće AgNPs toksičnije od manjih i kako su Ag60 toksičnije od Ag⁺ iona. Tretirane makroalge nisu pokazale statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu na razini p<0,05.



Slika 11. Prosječne vrijednosti sadržaja H₂O₂ ± standardne pogreške u tretiranoj morskoj makroalgi *L. obtusa* (brojevi ispred Ag označavaju koncentracije od 1, 10 i 100 µg/mL).

5. Rasprava

AgNPs su velika prijetnja različitim organizmima u morskom okolišu. U ovom istraživanju provedeni su eksperimenti toksičnosti AgNPs veličina 20 i 60 nm na crvenoj morskoj makroalgi *Laurencia obtusa*. Rezultati toksičnosti ovisili su o primijenjenoj koncentraciji i veličini nanočestica. U testu lipidne peroksidacije dobiveni rezultati pokazali su da Ag20 nisu uzrokovale značajno stvaranje MDA s obzirom na kontrolu. Veće AgNPs od 60 nm pri koncentraciji od 100 µg/mL stvorile su značajnu lipidnu peroksidaciju u količinama od 27,35 nmol MDA/g. U testu sadržaja vodikovog peroksida također su veću toksičnost pokazale veće AgNPs. No, u ovom eksperimentu Ag20 su također pokazale značajniju toksičnost pri koncentraciji od 1 µg/mL te je stvaranje H₂O₂ iznosilo 31,15 nmol/g. Ag60 također su bile najtoksičnije pri 1 µg/mL te su izazvale stvaranje H₂O₂ u količini od 59,67 nmol/g. Ag60 su pokazale značajno veću toksičnost od Ag⁺ iona u oba eksperimenta. Može se uočiti razlika utjecaja različitih koncentracija AgNPs na morsku makroalgu između ova dva eksperimenta. No, vrlo je teško odrediti zašto su različite koncentracije uzrokovale različite utjecaje te je potrebno provesti još sličnih istraživanja. Za bolje shvaćanje dobivenih rezultata i toksičnosti AgNPs na morske makroalge potrebno je usporediti provedeni rad s ostalim sličnim istraživanjima. Sfriso i sur. (2019) istraživali su učinke AgNPs premazane citratom na zelenoj algi *Ulva ridiga*. Za usporedbu toksičnosti AgNPs koristili su AgNO₃. Toksičnost AgNPs ispitivana je pomoću biomarkera lipidne peroksidacije, primarne proizvodnje i ultrastrukturnom staničnom alteracijom. Alge vrste *U. ridiga* izložene su AgNPs u koncentracijama 0,01-120 µg/mL za test lipidne peroksidacije i 0,1-20 µg/mL za test primarne produkcije unutar 24 sata. Prvi toksični učinci AgNPs pojavili su se pri koncentraciji od 0,1 µg/mL, a najveće stvaranje MDA pojavilo se pri koncentracijama od 30 µg/mL te je iznosilo 300 mmol/g. Na višim koncentracijama uslijedio je pad stvaranja MDA. AgNO₃ nije značajno utjecao na stvaranje MDA s obzirom na kontrolu, ali je zato smanjio primarnu proizvodnju za 68%. Dokazano je da se dodavanjem prirodnih organskih i anorganskih liganda drastično smanjila akutna toksičnost AgNPs. Ovo istraživanje ukazalo je na izrazitu toksičnost AgNPs na morskim makroalgama. No, prikazano je kako toksičnost u morskom okolišu može biti smanjena u visokim koncentracijama prirodnih organskih i anorganskih liganda (Sfriso i sur., 2019). Vidljivo je da su u istraživanju Sfriso i sur. (2019) dobivene količine

MDA puno veće nego u provedenom istraživanju s crvenom morskom makroalgom *L. obtusa*. Mogući razlog takvih razlika u rezultatima mogu se pripisati različitosti istraživanih organizama, moguće je da su zelene morske makroalge osjetljivije od crvenih morskih makroalgi. Zanimljivo je kako oba istraživanja ukazuju da su AgNPs u morskim makroalgama toksičnije od Ag⁺ iona što se tiče testa lipidne peroksidacije. U istraživanju Turner i sur. (2011) morska makroalga *Ulva lactuca* je bila izložena AgNPs i AgNO₃ u koncentracijama od 0-100 µg/L u filtriranoj morskoj vodi unutar 48 sati. Toksičnost AgNPs promatrana je kao inhibicija učinkovitosti fotosustava II mjerenjem fluorescencije klorofila *a*. AgNO₃ bio je toksičan pri koncentraciji od 2,5 µg/L dok su AgNPs bile toksičnije tek pri višim koncentracijama od 15 µg/L. Takva toksičnost AgNPs na algama pripisuje se vezanju AgNPs na površinu algi odnosno na polisaharide. Ovo istraživanje dokazuje da su AgNPs neizravno toksični, odnosno njihova toksičnost je produkt otapanja i stvaranja Ag⁺ iona koji zatim djeluju na morske makroalge (Turner i sur., 2011). Toksičnost AgNPs iz spomenutog istraživanja djeluje na fotosustav II u nižim koncentracijama, isto kao što AgNPs djeluju na stvaranje vodikovog peroksida u provedenom istraživanju s *L. obtusa*.

Nadalje, zbog nedostatka literature o utjecaju AgNPs na morske makroalge uspoređen je utjecaj drugih vrsta nanočestica i toksikanata na morske makroalge. U istraživanju Liu i sur. (2018) procijenjen je toksični učinak nanočestica titanijevog dioksida (NPTiO₂) na rast i antioksidativno djelovanje kod crvene morske makroalge *Gracilaria lemaneiformis*. Morske makroalge bile su izložene koncentracijama NPTiO₂ od 0,5, 10, 20 i 40 mg/L unutar 15 dana. Mjerena je brzina rasta algi, koncentracija topljivih proteina, aktivnost nitrat reduktaze, superoksidni anion i antioksidativno djelovanje ekstrakta crvene morske makroalge. Inhibicija rasta bila je vidljiva pri koncentracijama od 20 mg/L i 40 mg/L unutar 15 dana. Koncentracija topljivih proteina povećala se tijekom prva tri dana izloženosti, ali se nakon toga postupno smanjivala zbog visokih koncentracija NPTiO₂. NPTiO₂ izazvale su oksidacijska oštećenja. Superoksidni anioni su se akumulirali, a aktivnosti nitrat reduktaze je padala linearno s porastom nanočestica TiO₂. Nadalje dokazano je da antioksidativni ekstrakti *G. lemaneiformis* mogu ukloniti 2,2 difenil - 1 pikrilhidrazil (DPPH) i hidroksilne radikale, no sposobnost uklanjanja se smanjila s porastom koncentracije NPTiO₂. Vidljivo je kako su NPTiO₂ vrlo toksične u višim koncentracijama unutar 15 dana, iako alga ima razvijene antioksidativne ekstrakte (Liu i sur., 2018). Također postoji

moćnost da je u istraživanju s *L. obtusa* oksidacijsko oštećenje smanjeno antioksidativnim ekstraktima, no to je potrebno dalje istražiti. Istraživanje Kumar i sur. (2010) prikazalo je utjecaj kadmija na toksičnost kod zelene makroalge *Ulva lactuca*. Talusi su bili izloženi kadmijevom kloridu (CdCl_2) unutar 4 dana u koncentracijama 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 i 0,7 mM. Određivana je inhibicija rasta, lipidna peroksidacija, sadržaj H_2O_2 , ukupni sadržaj proteina i aktivnosti antioksidativnih mehanizama. Alge koje su bile izložene koncentraciji od 0,4 mM CdCl_2 tijekom 4 dana imale su povećanje sadržaja MDA i H_2O_2 koji su zajedno djelovali na smanjenje rasta algi i smanjenje fotosinteze za 30%. Aktivnosti antioksidativnih mehanizama kao što su superoksid dismutaza (SOD), glutation reduktaza (GR) i glutation peroksidaza (GPX) povišeni su za dvostruko do trostruko više od kontrole, a aktivnost katalaze (CAT) je smanjena (Kumar i sur., 2010). U ovom istraživanju vidljivo je znatno djelovanje antioksidativnih mehanizama te je potrebno provesti još sličnih istraživanja. Nadalje, istraživanje Han i sur. (2008) procjenjivalo je toksičnost i toleranciju bakra (Cu) u dvije vrste zelenih morskih makroalgi *Ulvapertusai Ulvaarmoricana*. Alge su izložene CuCl_2 u koncentraciji od 25-250 $\mu\text{g/L}$ u periodu od 24 sata, a ispitan je učinak na rast algi, pigmentaciju, fluorescenciju klorofila i antoksidativni kapacitet. Toksični učinci Cu bili su manji kod vrste *U. armoricana*. Pri nižim koncentracijama Cu (25- 50 $\mu\text{g/L}$) izloženost algi *U. Armoricana* nije utjecala na rast talusa. Rast talusa *U. pretusa* bio je značajno smanjen pri istim koncentracijama. Porast koncentracije klorofila je primijećen kod *U. armoricana* do koncentracije od 100 $\mu\text{g/L}$, no u algi *U. pertusa* došlo je smanjenja koncentracije klorofila. Također, Cu kod alge *U. armoricana* nije utjecao na učinkovitost fotosustava II i minimalnu fluorescenciju. Za razliku od nje, *U. pertusa* pokazala je značajno smanjenje tih parametara. Povišene koncentracije Cu izazvale su snažnu aktivaciju antioksidativne aktivnosti u *U. armoricana*, a druga vrsta alge imala je smanjeni antioksidativni obrambeni sustav. Ovo istraživanje je važno zbog uspoređivanja odgovora i otpornosti dviju vrsta algi koje zajedno obitavaju u istom obalnom području na povremena opterećenja teškim metalima.

S obzirom na vrlo mali broj istraživanja utjecaja AgNPs na morske makroalge, provedeno istraživanje se može usporedit s drugim vrstama morskih organizama poput fitoplanktona. U istraživanju Gambardella i sur. (2015) procijenjeni su potencijalni učinci AgNPs na

inhibiciju rasta fitoplanktona vrsta *Dunaliella tertiolecta* i *Skeletonema costatum*. Obje vrste fitoplanktona uzgojene su u umjetnoj morskoj vodi te su tretirane suspenzijom AgNPs unutar 72 sata. Nakon toga inhibicija rasta broja fitoplanktona procijenjena je brojanjem stanica uz pomoć hemocitometra. Inhibicija rasta kod vrste *D. tertiolecta* uočena je već pri najnižoj koncentraciji od 0,9 mg/L, dok se kod vrste *S. costatum* inhibicija postupno povećavala povećanjem koncentracije AgNPs (Gambardella i sur., 2015). Vidljivo je da se inhibicija morskih fitoplanktona javlja pri puno višim koncentracijama od onih koje su korištene u istraživanju s *L. obtusa*. Također fitoplankton u istraživanju Gambardella i sur. (2015) bio je izložen 48 sati duže nego u istraživanju s crvenom makroalgom što znatno utječe na rezultate istraživanja. Sendra i sur. (2017) istraživali su utjecaj različitih veličina AgNPs na dvije vrste fitoplanktona, slatkovodnom *Chlamydomonas reinhardtii* i morskom *Phaeodactylum tricornutum*. Veličine AgNPs bile su AgNP1 (<2 nm), AgNP2 (<15 nm) i AgNP3 (30-50 nm), a fitoplankton je bio izložen koncentracijama od 10, 40, 75, 150 i 300 µg/L. Toksičnost je procijenjena uz pomoć eksperimenta inhibicije rasta algi, smanjenja klorofila *a* i oštećenja stanične membrane U istraživanju je zaključeno da AgNPs utječu na morski fitoplankton, dok u ispušteni Ag⁺ ioni djeluju na slatkovodni fitoplankton . Ovo istraživanje pokazuje ponašanje i utjecaj AgNPs u različitim vodenim okolišima i interakciju s fitoplanktonom (Sendra i sur., 2017). Fitoplankton je jednostavniji i osjetljiviji organizam što čini razliku u utjecaju AgNPs na fitoplankton i makroalge. Mnoge makroalge imaju razvijen antioksidativni obrambeni sustav i antioksidativne ekstrakte koji sprečavaju oksidacijski stres i djelovanje toksikanata (Liu i sur., 2018).

Istraživanja učinka AgNPs na crvenoj morskoj makroalgi mogu se usporediti i s učinkom AgNPs na više vodene i kopnene biljke. Jiang i sur. (2014) izvijestili su o toksičnosti različitih veličina AgNPs na veliku vodenu leću *Spirodela Polyrhiza*. U istraživanju su koristili AgNPs veličine 6 nm (0,5- 10 mg/L), 20 nm (10 mg/L) i >1 µm (10 mg/L) te su organizam izlagali tijekom 72 sata. Nakon tretmana mjerili su sadržaj ROS-a, SOD-a, CAT, postoperativnog delirija (POD), MDA i sadržaj proteina. Sve veličine AgNPs osim najveće povećali su aktivnost SOD-a. Aktivnost CAT i sadržaj MDA bili su postignuti samo za 5 mg/L pri AgNPs veličine 6 nm. Pri Ag6 i Ag20 došlo je do povećanja aktivnosti POD-a. Sadržaj proteina bio je povišen za 1-5 mg/L pri izloženosti na Ag6 i Ag20. Vidljivo je da

je stvaranje MDA u vodenoj leći nastalo pri višim koncentracijama isto kao u istraživanju s crvenom algom. No treba u obzir uzeti vrijeme izloženosti koje je bilo znatno duže nego u istraživanju s *L. obtusa* (Jiang i sur., 2014). U istraživanju Vannini i sur. (2013) dokazano je da je u pšenice rast korijenja smanjen pri 1 mg/L AgNPs. Klijanje sjemena i rast sadnica stabla *Boswellia ovalifoliolata* znatno su povećani dodatkom AgNPs (Savithramma i sur., 2012). Stoga je vidljivo da AgNPs na različite vrste organizama imaju različiti utjecaj.

Ponašanje i sudbina AgNPs u morskoj vodi rezultat je složenih interakcija između fizikalno-kemijskih svojstva nanočestica i uvjetima morskog okoliša. Primijećeno je da se AgNPs vežu za prirodne organske i anorganske ligande te je moguće da se tako smanjuje njihova toksičnost (Sfriso i sur., 2019). Na površini morskih makroalgi AgNPs se vežu za polisaharide što posljedično smanjuje toksičnost za makroalge. No, postoji rizik da će se algama koje imaju AgNPs na svojoj površini hraniti različiti herbivori. Smatra se da bi takav ishod rezultirao biomagnifikacijom AgNPs i posljedično doveo do smrtnosti organizama na višim trofičkim razinama. Same AgNPs ne pokazuju učinak na fotolitička svojstva algi, već to čine Ag⁺ ioni koji nastaju otapanjem AgNPs. Prema svemu navedenom, može se zaključiti kako su učinci AgNPs na alge funkcija brzine otapanja AgNPs, toksičnost iona koji nastaju i vrijeme izlaganja (Turner i sur., 2011).

6. Zaključak

Usljed sve veće proizvodnje i korištenja nanočestica srebra dolazi do ispuštanja istih u morski okoliš. Dosadašnja istraživanja na morskim beskralješnjacima i fitoplanktonu dokazala su mogućnost negativnog učinka AgNPs na iste. No, vrlo je malo istraživanja utjecaja AgNPs na morskim makroalgama. Morske makroalge bitna su komponenta morskog okoliša te utječu na daljnje stanje morskog ekosustava i na više razine hranidbenog lanca. U ovom radu izneseni su rezultati istraživanja kako različite veličine nanočestica srebra (20 i 60 nm) pri različitim koncentracijama utječu na crvenu morskou makroalgu *Laurencia obtusa*. Procjena toksičnosti AgNPs izvršena je uz pomoć biomarkera lipidne peroksidacije i sadržaja vodikovog peroksida. Oba biomarkera ukazuju na oksidacijski stres što je najčešći učinak AgNPs u različitim morskim organizmima. Rezultati testa lipidne peroksidacije upućuju na toksično djelovanje nanočestica srebra veličine 60 nm. Nanočestice srebra veličine 20 nm ne djeluju značajno na lipidnu peroksidaciju u crvenim morskim makroalgama. Rezultati sadržaja vodikovog peroksida također su pokazali najveće toksično djelovanje nanočestica veličine 60 nm, a manje nanočestice su pokazale značajniju toksičnost samo pri najnižoj koncentraciji. U oba eksperimenta AgNPs su pokazale veću toksičnost od Ag⁺ iona. Također, vidljivo je da su veće AgNPs uzrokovale veću toksičnost, što nije slučaj u istraživanjima na drugim morskim organizmima. Bitno je napomenuti da su ovo rezultati utjecaja unutar 24 sata te su mogući puno veći utjecaji unutar dužeg vremenskog razdoblja. Vrlo je malo podataka o utjecaju nanočestica na morske makroalge te su potrebna daljnja istraživanja koja će pobliže objasniti utjecaj nanočestica, ali i mehanizme antioksidativne obrane u morskim makroalgama.

7. Literatura

Abbas Q., Yousaf B., Amina, Ali M. U., Munir M. A. M., El-Naggar A., Rinklebe J., Nushad M. (2020) Transformation pathways and fate of engineered nanoparticles (EPNs) in distinct interactive environmental compartments: A review. *Environment International* 138: 105646.

Alexieva V., Sergiev I., Mapelli S., Karanov E. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment* 24, 1337-1344.

Baker T. J., Tyler C. R., Galloway T. S. (2013) Impact Of metal and oxide nanoparticles on marine organisms. *Environmental Pollution* 1-15.

Biwas P. i Wu C. Y. (2005) Nanoparticles and the Environment. *Journal of the Air & Waste Management Association* 55:6, 706-746.

Burić P. (2018) Utjecaj srebrnih nanočestica na morske beskralješnjake: biološki učinci na modelima dagnje i ježinaca. Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 159 pp.

Diaz-Pulido G. i McCook L. (2008) Macroalgae (Seaweeds). In Chin A. (editor) *The state of the Great Barrier Reef*. Great Barrier Reef Marine Park Authority, Townsville, pp: 1-44.

Dodds W.K. i Whiles M.R. (2020) Microbes and Plants. In Dodds W.K. i Whiles M.R. (Editors). *Freshwater ecology (Third Edition)*. Chapter 9, pp- 211-249.

Domingo G., Bracale M. i Vannini C. (2019) Phytotoxicity of Silver Nanoparticles to Aquatic Plants, Algae and Microorganisms. *Nanomaterials in Plants, Algae and Microorganisms*, 143-168.

Ealias A. M. Saravanakumar M.P. (2017) A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP: Conference Series: Materials Science and Engineering* 263: 032019.

Eniav R. (2022) *Laurencia obtusa*. Blue Ecosystems (Preuzeto s [https://www.blue-ecosystems.com/rachelSeaWeed/English/Laurencia-obtusa-\(Hudson\)-Lamouroux-](https://www.blue-ecosystems.com/rachelSeaWeed/English/Laurencia-obtusa-(Hudson)-Lamouroux-), pristupljeno 4.9.2022.).

Fabrega J., Luoma S. N., Tyler C. R., Galloway T. S., Olovo J. R. (2011) Silver nanoparticles: Behavior And Effects The Aquatic Environment. *Environment International* 37: 517-531.

Furnari G., Cormaci M., Serio D. (2001) The Laurencia complex (Rhodophyta, Rhodomelaceae) in Mediterranean Sea: An Overview. *Cryptogamie Algologie* 22 (4): 331-373.

Gambardella C., Costa E., Piazza V., Fabbrocini A., Magi E., Fimali M., Garaventa F. (2015) Effect Of Silver Nanoparticles on marine organisms belonging to different trophic levels. *Marine Environmental Research* 111: 41-49.

Guiry M.D. i Guiry G.M. (2022) *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway (taxonomic information republished from *AlgaeBase* with permission of M.D. Guiry). *Laurencia obtusa* (Hudson) J.V.Lamouroux, 1813. Accessed Through: World Register of Marine Species at: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=144827> on 2022-08-04.

Grugel C.F.G i Lopez-Bautista J. (2007) Red algae. *Encyclopedia of LifeSciences*.

Han T., Kang S-H., Park J-S., Lee H-K., Brown M.T. (2008) Psychological responses of *Ulva pertusa* and *U. armoricana* to copper exposure. *Aquatic Toxicology* 86: 176–184.

Hulla J. E., Shau S. C., Hayes A. W. (2015) Nanotechnology: History and future. *Human and Experimental Toxicology* 34(12): 1318- 1321..

Jiang H., Qiu X., Li G., Li W., Yin L. (2014) Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in aquatic plant *Spirodela polyrhiza*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33(6): 138- 1405.

Juan- Yu S. J., Yin Y. G., Liu J. F. (2012) Silver nanoparticles in the environment. *Environmental Science: Processes and Impacts* 15: 78-92.

Junglee S., Urban L., Sallanon H., Lopez-Luri F. (2014) Optimized Assay for Hydrogen Peroxide Determination In Plant Tissue Using Potassium Iodide. *American Journal of Analytical Chemistry* 5, 730-736.

Khan I., Saeed K., Khan I. (2017) Nanoparticles: properties, applications, and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry* 12: 908-931.

Klaine J.S., Alvarez J.J.P., Batley E.G., Fernandes F.T., Handy D.R., Lyon Y.D., Mahendra S., McLaughlin J.M., Lead R.J. (2008) Nanomaterials In The Environment: behavior, fate, bioavailability and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1825-1851.

Kumar M., Kumari P., Gupta P., Anisha P.A., Reddy C.R.K., Jha B. (2010) Differential Responses to cadmium induced oxidative stress in marine macroalgae *Ulva Lactuca* (Ulvales, Chlorophyta). *Biometals* 23, 315- 325.

Liu J., Yin P., Zhao L. (2018) Adverse Effect Of Nano- TiO₂ on the marine macroalgae *Gracilaria Lemaneiformis* (Gracilariales, Rhodophyta): growth and antioxidant activity. *RSC Advances*, 8(51), 29172- 29178.

Matranga V. i Corsi I. (2012) Toxic Effects Of Engineered Nanoparticles In the marine environment: Model organisms and molecular approaches 76: 32-40.

Mayanglambam A. i Sahoo D. (2015) Red Algae. In Sahoo D. i Seckbach (editors) *TheAlgae World, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology. Part I.*, pp. 177- 205.

Mouritsen Ole G. (2013) The Science Of Seaweeds: marine macroalgae benefit people culturally, industrially, nutritionally, and ecologically. *American scientist* 101:458.

Olivares H.G., Lagos M.N., Gutierrez C.J., Kittelsen R.C., Valenzuela G.L., Hidalgo Lillo M.E. (2016) Assess Oxidative stress biomarkers and metal bioaccumulation in macroalgae from costal areas with mining activities in Chile. *Environmental Monit Assess* 1:88:25.

Pavletić Z. (1971) Filogenija Talofita. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno matematički fakultet u Zagrebu. VI. Odjel Phaephyta, pp. 88-103.

Sathianeson S., Baakdah M., Al-Sofyani A.A. (2017) An introduction to the ecological significance of seaweeds on coastal ecosystems. In Nabti E. (editor) *Biotechnological Applications of Seaweeds*. Chapter I. pp: 1-14.

Savithramma N., Ankanna., Bhumi G. (2012) Effect of nanoparticels on seed germination and seedling growth of *Boswellia ovalifoliolata*, an endemic endangered medicinal treetaxon. *Nano. Vis* 2, 61- 68.

Sendra M., Yeste M.P., Gatica J.M., Moreno- Garrido I., Blasco J. (2017) Direct and Indirect Effects Of Silver nanoparticels on freshwater and marine microalgae (*Chlamydomonas reinhardtii* and *Phaeodactylum Tricornutum*), *Chemosphere* 0.3.123.

Sfriso A.A., Mistri M., Munari C., Moro I., Washa M., Sfriso A., Juhmani A.S. (2019) Hazardous effects of silver nanoparticels for primary producers in transitional water systems: The case of *Ulva ridiga* C. Agardh. *Environment International* 131.

Sukhanova A., Bozrova S., Sokolov P., Berestovoy M., Karaulov A., Nabiev I. (2018) Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physicaland Chemical Properties. *Nanoscale Research Letters* 13:44 2-21.

Taskin E., Sukatar A. (2013) The Red Alga Genera *Laurencia*, *Osmundea* and *Palisada* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 13: 713-723.

Tortella G. R., Rubilar O., Duran N., Diez M. C., Martinez M., Parada J., Seabra A. B. (2020) Silver nanoparticles: Toxicity In model organisms as an overview of its hazard for human health and environment. *Journal of Hazardous Materials* 390: 121974.

Turner A., Brice D., Brown M.T. (2011) Interactions Of Silver nanoparticels with The marine macroalga, *Ulva lactuca*. *Ecotoxicology* 21:148- 154.

Vannini C., Domingo G., Onelli E., De Mattia F., Bruni I., Marsoni M., Barcale M. (2013) Phytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticels exposure on germinating wheat seedlings. *Journal of Plant Physiology* 171, 1142- 1148.

Verma S. i Dubey R.S. (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and altersthe activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164: 645-655.

8. Izvori slika

Slika 1. Sinteza nanočestica. Preuzeto iz Ealias A. M., Saravanakumar M.P. (2017) A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP: Conference Series: Materials Science and Engineering* 263: 032019.

Slika 2. Ispuštanje AgNP i ponašanje u morskom okolišu. Preuzeto iz Tortella G. R., Rubilar O., Duran N., Diez M. C., Martinez M., Parada J., Seabra A. B. (2020) Silver nanoparticles: Toxicity in model organisms as an overview of its hazard for human health and environment. *Journal of Hazardous Materials* 390: 121974.

Slika 3. Diplohaplontski Razvojni ciklus crvenih algi. Preuzeto [shhttps://www.chegg.com/learn/biology/introduction-to-biology/red-algae](https://www.chegg.com/learn/biology/introduction-to-biology/red-algae) (pristupljeno 26.8.2022.).

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Završni rad

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

Ispitivanje utjecaja veličine nanočestica srebra na toksičnost kod morskih makroalgi

Lara Krasulja

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

Sažetak:

Velika proizvodnja i uporaba nanočestica srebra (AgNPs) može dovesti do ispuštanja istih u morski okoliš što posljedično može dovesti do smrtnosti različitih vrsta morskih organizama. Dosadašnja istraživanja dokazala su toksičnost AgNPs na morskim beskralješnjacima i fitoplanktonu, no nedostaju istraživanja učinka AgNPs na morskim makroalgama. Morske makroalge vrlo su važan dio morskog ekosustava. One obogaćuju morski okoliš kisikom, važna su hrana herbivornim vrstama organizama te pružaju stanište i skrovište različitim vrstama kralješnjaka i beskralješnjaka. Cilj ovog rada bio je ispitati kako različite veličine nanočestica srebra utječu na toksičnost kod crvene morske makroalge *Laurencia obtusa*. Toksičnost AgNPs istraživana je pomoću biomarkera lipidne peroksidacije i sadržaja vodikovog peroksida koji ukazuju na oksidacijski stres. Talusi morske makroalge *L. obtusa* bili su izloženi AgNPs veličina 20 i 60 nm u koncentracijama od 1, 10 i 100 µg/mL tijekom 24 sata. Rezultati testa lipidne peroksidacije pokazali su najveću toksičnost Ag60 u koncentraciji od 100 µg/mL, a Ag20 nisu značajno utjecale na lipidnu peroksidaciju u *L. obtusa*. Rezultati sadržaja vodikovog peroksida također su ukazali na veću toksičnost Ag60, ali pri najnižoj ispitanjoj koncentraciji. U oba testa AgNPs pokazale su veću toksičnost od Ag⁺ iona. Vidljivo je da u istraživanju s crvenim makroalgama veće AgNPs imaju veći toksični utjecaj. Potrebno je provesti daljnja istraživanja kako bi s većom sigurnošću bio određen utjecaj AgNPs na morske makroalge.

Ključne riječi: nanočestice srebra, *Laurencia obtusa*, makroalga, vodikov peroksid, lipidna peroksidacija

Mentor: prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

Ocjenjivači: doc. dr. sc. Paolo Paliaga

izv. prof. dr. sc. Andrej Jaklin

prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

Datum obrane: 26. 9. 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Juraj Dobrila University of Pula

Bachelor thesis

University Undergraduate Study Programme - Marine Sciences

Investigating Silver nanoparticle size as a driver of toxicity in marine macroalgae

Lara Krasulja

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

Abstract:

Large-scale production and use of silver nanoparticles (AgNPs) may lead to their release into the marine environment, which can consequently lead to the death of various marine organisms. Previous research has proven the toxicity of AgNPs to marine invertebrates and phytoplankton, but there are scarcely any data available on their effect on marine macroalgae. Marine macroalgae are a very important part of the marine ecosystem as they enrich the marine environment with oxygen, are important food for herbivorous species of organisms and provide a habitat and hiding place for different species of vertebrates and invertebrates. The aim of this work was to examine how different particle sizes modulates the toxicity of silver nanoparticles to the red marine macroalgae *Laurencia obtusa*. The toxicity of AgNPs was investigated using lipid peroxidation and hydrogen peroxide content as indicators of negative stress. The thalli of *L. obtusa* were exposed to AgNPs, of sizes of 20 and 60 nm, in concentrations of 1, 10 and 100 µg/mL for a period of 24 hours. The results of the lipid peroxidation test showed the highest toxicity from Ag60 at a concentration of 100 µg/mL, while Ag20 did not significantly affect toxicity towards *L. obtusa*. Hydrogen peroxide content also indicated greater toxicity of Ag60, but at the lowest tested concentration. In both tests, AgNPs typically showed greater lipid peroxidation and hydrogen peroxide generation than Ag⁺ ions. Furthermore, larger AgNPs were found to have a greater impact on toxicity. Ultimately, it is necessary to carry out further research to determine with greater certainty the impact of AgNPs on marine macroalgae using a wider range of endpoints.

Keywords: silver nanoparticles, *Laurencia obtusa*, macroalga, hydrogen peroxide, lipid peroxidation

Supervisor: prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

Reviewers: doc. dr. sc. Paolo Paliaga

izv. prof. dr. sc. Andrej Jaklin

prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

Thesis defence: 26. 9. 2022.