

Određivanje bioakumulacije polistirenske nanoplastike u dagnji *Mytilus galloprovincialis* i njihov učinak na enzimske i neenzimske mehanizme antioksidativnog stresa

Nedeljković, Lara

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:137:288487>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-19**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Fakultet prirodnih znanosti

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

LARA NEDELJKOVIĆ

Određivanje bioakumulacije polistirenske nanoplastike u dagnji *Mytilus galloprovincialis* i njihov učinak na enzimske i neenzimske mehanizme antioksidativnog stresa

Završni rad

Rujan 2024

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Fakultet prirodnih znanosti

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

LARA NEDELJKOVIĆ

Određivanje bioakumulacije polistirenske nanoplastike u dagnji *Mytilus galloprovincialis* i njihov učinak na enzimske i neenzimske mehanizme antioksidativnog stresa

Završni rad

JMBAG: 0303105179, redoviti student

Studijski smjer: Znanost o moru

Predmet: Nanotehnologija u istraživanju mora

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Interdisciplinarno

Znanstvena grana: Znanost o moru

Mentor: prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

Pula, rujan 2024.



IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisani _____, kandidat za prvostupnika _____ 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 nedozvoljeni 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.

Student

U Puli, _____



IZJAVA O KORIŠTENJU AUTORSKOG DJELA

Ja, _____ dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj Završni rad pod nazivom

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, _____

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.

Povjerenstvo za ocjenjivanje i obranu:

Predsjednik: izv. prof. dr. sc. Mauro Štifanić

Fakultet prirodnih znanosti, Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Član: izv. prof. dr. sc. Gioconda Millotti

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, 2024.; 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

Veliko hvala mom profesoru i mentoru,

prof. dr. sc. Danielu Marku Lyonsu, na podršci, savjetima, pozitivnom stavu te stečenom znanju i iskustvu tokom pisanja završnog rada.

Zahvaljujem svim profesorima i vanjskim

suradnicima Fakulteta prirodnih znanosti na predivnom

iskustvu stečenom tokom studija.

Zahvaljujem mojoj obitelji i prijateljima na

konstantnoj podršci.

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1. Nastanak polimerne nanočestice.....	1
1.2. Modelni organizam.....	3
1.3. Biomarkeri oksidativnog stresa.....	3
1.4. Cilj istraživanja	5
2. Materijali i metode.....	5
2.1. Kemikalije	5
2.2. Sinteza PSNPs.....	5
2.3. Karakterizacija PSNPs.....	7
2.3.1. Raspršenje svjetlosti.....	7
2.3.2. Elektronska mikroskopija.....	8
2.4. Testni organizmi.....	8
2.5. Biološki testovi.....	10
2.5.1. Aktivnost katalaze.....	10
2.5.2. Aktivnost glutation-s-transferaze.....	11
2.5.3. Aktivnost glutation reduktaze.....	12
2.5.4. Lipidna poeroksidacija.....	13
2.6. Određivanje koncentracije proteina.....	14
2.7. Statistička analiza.....	14
3. Rezultati	15
3.1. Karakterizacija PSNPs.....	15
3.2. Rezultati aktivnosti katalaze.....	18
3.3. Rezultati aktivnosti glutation-s-transferaze.....	20
3.4. Rezultati aktivnosti glutation reduktaze.....	22
3.5. Rezultati lipidne peroksidacije.....	24
3.6. Bioakumulacija PSPNs.....	26
4. Rasprava.....	29
5. Zaključak	32

6. Sažetak	32
7. Literatura	34

1. UVOD

1.1. Nastanak polimerne nanočestice

Onečišćenje plastikom postalo je jedan od ključnih ekoloških problema današnjice. Nepravilno odlaganje plastičnog otpada različite veličine, oblika i polimernog sastava rezultiralo je njihovim otkrivanjem diljem svijeta, uključujući prirodne ekosustave (Rai *et al.*, 2021). Pronađeni su i u udaljenim područjima poput Antarktika (Weller *et al.*, 2017), planinskim vrhovima (Free *et al.*, 2014) i dubokim oceanima (Courtene-Jones *et al.*, 2017), postajući dostupni za konzumaciju širokom rasponu organizama (npr. zooplankton, školjkašima, rakovima, ribama i kitovima). Nedavne studije procjenjuju da se 3 do 23 milijuna tona plastičnog otpada godišnje ispire kišom i rijekama iz kopnenih u morske ekosustave ili se izravno ispušta u obalne vode (Borrelle *et al.*, 2020; Kaandorp *et al.*, 2023). Većina plastičnog otpada s kopna dolazi od ambalaža, dok predmeti povezani s ribolovom mogu činiti do 70 % težine ukupnog plastičnog otpada morskog podrijetla (Kershaw, 2016). Bez obzira na izvore, onečišćenje plastikom stavlja oceane pod znatan pritisak jer su ujedno i krajnji primatelji većine zagađivača iz okoliša, što izravno utječe na zakiseljavanje oceana i porast temperature. Također, plastika u okolišu prolazi kroz razgradnju ili fragmentaciju nakon kemijskih, fizičkih i bioloških procesa, stvarajući plastične čestice, uključujući mikroplastiku (raspon veličine 1–1000 μm) i nanoplastiku (1–1000 nm) (Gigault *et al.*, 2018).

Iako je poznato da se nanoplastika ispušta u okoliš, podaci o njihovoj razini u okolišu još uvijek nedostaju zbog ograničenja analitičkih tehnika povezanih s njihovom malom veličinom (Bouwmeester *et al.*, 2015). Nanoplastika posjeduje jedinstvena fizikalno-kemijska svojstva koja im omogućuju prolazak kroz biološke barijere koje utječu na rad stanica i bioakumulaciju (Kolandhasamy *et al.*, 2018). Eksperimenti provedeni u laboratorijskim uvjetima pokazali su da izloženost nanoplastici različite veličine i polimernog sastava može inducirati negativne učinke uključujući pojavu oksidativnog stresa i modulaciju ekspresije gena, dok su uočene i promjene u ponašanju (smanjena aktivnost plivanja), reprodukciji (manji broj potomaka) i rastu i razvoju (urođene malformacije) vodenih organizama (Rist *et al.*, 2017; Zaki & Aris, 2022). Gutanje mikro i nanoplastike identificirano je u nizu vrsta od dagnji do sisavaca, s više od 220 vrsta s različitih trofičkih razina koje konzumiraju plastični otpad u prirodi, a predviđa se da će 99% svih vrsta morskih ptica gutati mikro i nanoplastiku do 2050. (Wilcox *et al.*, 2015; Lusher *et al.*, 2017a; Ter Halle *et al.*, 2017). Utjecaj morskih organizama može ubrzati prijenos mikroplastike s površine mora kroz vodeni stupac na morsko dno putem izmeta i morskog

snijega ili između trofičkih lanaca putem grabežljivaca (Farrell & Nelson, 2013.; Setälä *et al.*, 2014).

Industrija proizvodi primarnu mikro i nanoplastiku, uključujući čestice polistirena (Shim *et al.*, 2018). Primarni izvori tih čestica su: kozmetički proizvodi, lijekovi, boje, kao i medicinski i elektronički uređaji (Koelman *et al.*, 2015). Nanočestice se također oslobađaju visokotemperaturnim inženjerskim procesima (Snopczyński *et al.*, 2009). Ostali primarni izvori su tvornice za proizvodnju plastične ambalaže (De Falco *et al.*, 2018). Sekundarni izvori su čestice plastike koje se pod fizičkim i kemijskim procesima raspadaju u manje jedinice. To su čestice isprane sa sintetičkih vlakana i oslobođene kao rezultat nepravilnog gospodarenja plastičnim otpadom.

Jedna od najčešće korištenih vrsta plastike je polistiren (PS) – produkt polimerizacije monomera stirena. Koristi se za proizvodnju stiropora i drugih proizvoda kao što su igračke, CD-ovi i poklopci za šalice. Studije *in vivo* i *in vitro* sugerirale su da polistirenske nanočestice (PS-NP) mogu prodrijeti u organizme kroz kožu, dišni i probavni trakt, nakon čega ulaze kroz stanične membrane i čine interakciju sa staničnim strukturama. Mogu se taložiti u živim organizmima i akumulirati dalje duž hranidbenog lanca. Ovisno o tipu stanice, NP se mogu prenositi pinocitozom, fagocitozom ili se transportirati pasivno. Trenutno ne postoje studije koje bi ukazale na kancerogeni potencijal PS-NP. S druge strane, PS monomer (stiren) je Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) klasificirala kao potencijalno kancerogenu tvar (klasa kancerogenosti B2).

PS čestice se koriste kao modelne čestice u studijama učinka karakterističnih površina čestica na različite biološke parametre, jer se mogu lako sintetizirati u širokom rasponu veličina. NP karakterizira veći odnos površine prema volumenu, što ima važan učinak na njihovu reaktivnost. Zbog svoje veličine i oblika te raznih modifikacija površine, PS-NP se široko koriste u tehnološkim i biomedicinskim primjenama. Modifikacije kemijske površine NP od ključne su važnosti za topljivost i trajnost u biološkim agensima, kao i za biodistribuciju i biokompatibilnost (Xia *et al.*, 2008). Biokompatibilnost je svojstvo zbog kojeg se PS široko koristi za proizvodnju laboratorijske opreme i biomedicinskih uređaja. Ovo svojstvo također odlučuje da ovaj spoj ne bi trebao negativno utjecati na biološke sustave.

1.2. Modelni organizam

Jedan od glavnih problema s kojima se čovječanstvo suočava je zagađenje i njegovo razorno djelovanje na žive organizme. Često je teško procijeniti toksičnost pojedinih tvari ili proizvoda jer se otkrije prekasno, kada se već počinju akumulirati i prenose genotoksične i imunotoksikološke učinke kroz generacije. Iz tog razloga, jedan od interesa istraživačke zajednice je pronaći odgovarajuće životinjske modele koji se mogu koristiti kao toksikološki bioindikatori i također razviti dovoljno osjetljive tehnike za otkrivanje nakupljanja toksičnih spojeva i istovremeno biti isplativi i laki za manipulaciju (Ladhar-Chaabouni & Hamza-Chaffai, 2016).

Dagnje su se intenzivno koristile kao idealni biološki indikatori u praćenju trendova antropogenog onečišćenja u obalnim vodama zbog svojih posebnih karakteristika (Beyer *et al.*, 2017). Kao jedna od prvih organizama korištenih za procjenu ekološke kakvoće morske vode (Goldberg, 1975), dagnje zadovoljavaju gotovo sve potrebne kriterije za korisnu bioindikatorsku vrstu. Prvo, dagnje su globalno rasprostranjene, lako dostupne i imaju visoku toleranciju na širok raspon okolišnih parametara uključujući salinitet, temperaturu, razine kisika i dostupnost hrane (Bayne, 1976). Nadalje, kao reprezentativni bentoski filtratori, dagnje mogu učinkovito akumulirati kemijske onečišćivače iz morske vode kako bi osigurale integrativnu mjeru koncentracije i bioraspoloživosti onečišćujućih tvari morske vode *in situ* (Beyer *et al.*, 2017). Dagnje su hrana i stanište mnogim drugim vrstama, tvoreći važne veze između pelagičkih i bentoskih ekosustava. Oni također djeluju kao transportni put morskih zagađivača do viših trofičkih razina u obalnom morskom prehrambenom lancu (Strand & Jacobsen, 2005). *Mytilus galloprovincialis* odabrana je za ovu studiju jer se ova vrsta naširoko koristi kao bioindikator u studijama praćenja različitih okolišnih kontaminanata u ekotoksikološkim i radioekološkim istraživanjima (Franco *et al.*, 2016), a Međunarodno vijeće za istraživanje mora predložilo ju je za praćenje onečišćenja mikroplastikom i nanoplastikom u morskom okolišu (Brate *et al.*, 2018). *M. galloprovincialis* ima svjetsku distribuciju i visoku komercijalnu vrijednost. Kao često konzumirani proizvod, ova vrsta može predstavljati važan put ulaska zagađivala u ljude.

1.3. Biomarkeri oksidativnog stresa

Antioksidativni obrambeni enzimi igraju važnu ulogu u staničnim antioksidativnim obrambenim sustavima i štite od oksidativnog oštećenja uzrokovanog reaktivnim kisikovim

vrstama (ROS). Školjkaši pokazuju različite promjene u enzimskoj antioksidativnoj obrani nakon izlaganja zagađivačima (Regoli *et al.*, 2002a, Regoli *et al.*, 2002b). Enzimski testovi uključuju laboratorijske metode za identificiranje prisutnosti i količine specifičnog enzima u organizmu, tkivu ili uzorku. Primjeri takvih enzima uključuju katalazu, glutation - S - transferazu i glutation reduktazu, koji su uz metabolički proces lipidne peroksidacije služili kao biomarkeri u ovom istraživačkom radu za procjenu zagađenja jedinki vrste *Mytilus galloprovincialis* nanoplastikom.

Katalaza, enzim koji izaziva (katalizira) reakciju kojom se vodikov peroksid (H_2O_2), razgrađuje na vodu i kisik. Pronađena u velikoj mjeri u organizmima koji žive u prisutnosti kisika, katalaza sprječava nakupljanje i štiti stanične organele i tkiva od oštećenja peroksidom, koji kontinuirano nastaje brojnim metaboličkim reakcijama. Iako je prvenstveno lokalizirana u peroksisomima, također je prisutna u kloroplastima, citosolu i mitohondrijima.

Glutation transferaze (GST; poznate i kao glutation S-transferaze) glavni su enzimi detoksikacije faze II koji se nalaze uglavnom u citosolu. Glutation S- transferaze su multifunkcionalni proteini koji štite stanicu od oštećenja toksičnim egzogenim i endogenim spojevima katalizirajući njihovu konjugaciju na reducirani glutation. Štoviše, oni također služe kao vezni proteini za niz organskih tvari kao što su citotoksični proizvodi lipidne peroksidacije, uključujući lipidne hidroperokside i reaktivne karbonile. Takvi bi spojevi uzrokovali oštećenje membrane u odsutnosti GST-a.

Glutation reduktaza katalizira redukciju glutation disulfida (GSSG), uz sudjelovanje NADPH kao donora elektrona. Budući da je GR odgovoran za regeneraciju reduciranog glutationa (GSH), tijekom detoksikacije peroksida i slobodnih radikala nastalih u mitohondrijima, smatra se da je ovaj enzim važan za antioksidacijsku zaštitu, kao i za održavanje redoks potencijala stanice.

Peroksidacija lipida je mehanizam kojim lipide napada ROS s dovoljno energije za stvaranje organskog radikala koji reagira s kisikom i rezultira peroksilnim radikalom. Slobodni radikali napadaju nezasićene masne kiseline u lipidnoj membrani na način da izvlače atom vodika iz lipida ostavljajući za sobom lipidni radikal i pokrećući lančanu reakciju posredovanu kisikom koja ostavlja membranu prožetu lipidnim hidroperoksidima. Budući da peroksidacija lipida ima značajan potencijal pridonijeti u patogenezi brojnih bolesti, inicijacijom slobodnih radikala, što rezultira promijenjenim funkcijama receptora, gubitkom fluidnosti membrane i promjenama propusnosti. Malondialdehid (MDA) je jedan od glavnih produkata peroksidacije membranskih

lipida, a nastaje razgradnjom polinezasićenih masnih kiselina (PUFA). MDA je vrlo reaktivan i toksičan nusprodukt peroksidacije lipida jer može reagirati sa staničnim komponentama kao što su proteini, DNA i lipidi, što dovodi do oštećenja i disfunkcije stanica. Stoga se prisutnost MDA u stanicama i tkivima često koristi kao pokazatelj oksidativnog stresa, budući da odražava stupanj peroksidacije lipida i oštećenja posredovana ROS-om. Smatra se biomarkerom oksidativnog stresa jer je njegovo nakupljanje indikativno za povećanu peroksidaciju lipida i proizvodnju ROS-a.

1.4. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada je ispitati sposobnost bioakumuliranja polistirenske nanoplastike te analizirati njen učinak na enzimske i neenzimske mehanizme antioksidativnog stresa u organizmu dagnje *M. galloprovincialis*. Poseban naglasak je na procjeni promjene u aktivnosti antioksidativnih enzima i metaboličkih procesa, radi boljeg razumijevanja potencijalnih toksičnih učinaka nanoplastike na morske organizme.

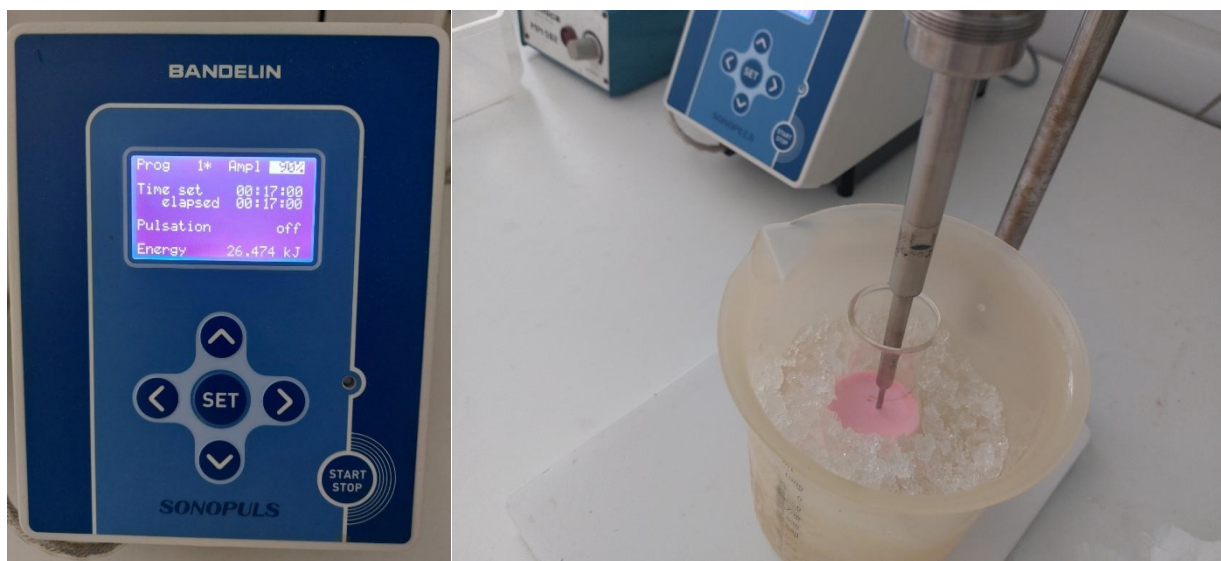
2. MATERIJALI I METODE

2.1. Kemikalije

Sve kemikalije su kupljene od Sigma Aldrich (St. Louis, MO, SAD) i korištene su kako su primljene. Ultračistu vodu ($18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) osigurao je TKA GenPur sustav (TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederelbert, Njemačka).

2.2. Sinteza PSNPs

Otopljena je određena masa natrijevog dodecilsulfata u 40 ml ultračiste vode (Milli-Q). Emulziji je dodano aliquot stirena i Nile Red boja te se zatim magnetski miješala 30 min. Sonificirana je ultrazvučnom sondom (Bandelin Sonoplus 4100, nominalna snaga 100 W) koristeći 90% amplitude kroz 17 min (slika 2.1.).



Slika 2.1. Prikaz (a) ultrazvučnog generatora i (b) sonotroda za prijenos mehaničke vibracije.

Emulzija je zatim prebačena u troglu tikvicu, te je dodano kalijevog persulfata. Reakcijska smjesa je zagrijavana 3 h (Slika 2.2.), nakon čega je suspenzija ohlađena na sobnoj temperaturi (22°C) i prebačena u epruvetu omotanu aluminijskom folijom kako bi se spriječio utjecaj svjetlosti na Nile Red.



Slika 2.2. Aparatura i reakcijska posuda za sintezu polimernih nanočestica. S lijeve strane nalazi se cjevčica koja dovodi dušik, a s desne strane termometar.

2.3. Karakterizacija PSNPs

2.3.1. Raspršenje svjetlosti

Raspodjela veličine čestica za nanočestice u ultra čistoj vodi određena je dinamičkim raspršenjem svjetlosti (eng. dynamic light scattering, DLS), s hidrodinamičkim promjerima (d_H) danim na temelju izračunate distribucije veličine volumena. Podaci su prikupljeni za disperzije nanočestice u kivetama od 10 mm polistirol/polistiren na Malvern-Panalytical Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK), s intenzitetom raspršene svjetlosti zelenog lasera (532 nm) mjerenom pod kutom od 173° . Uzorci su mjereni barem 10 puta, a podaci su obrađeni softverom Zetasizer v 6.32.

2.3.2. Elektronska mikroskopija

Morfologija i veličina nanočestica istraživana je elektronskom mikroskopijom, a podaci su prikupljeni na skenirajućem elektronskom mikroskopu JEOL JSM 7000F (Tokyo, Japan). Napon ubrzanja postavljen je na 10 kV, a radna udaljenost bila je 4 mm, sa slikama snimljenim sa sekundarnog detektora elektrona (SEI). Prije snimanja uzorci su nanoseni tankim zlatnim omotačem u uređaju za naparavanje PECS Gatan 682.

2.4. Testni organizmi

U svrhu istraživanja korištene su dagnje iz uzgajališta u Lirskom zaljevu (N 45.13286, E 13.6349). i prebačeni su protočnim bazenima vanjskog dvorišta Centra za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju. Uzorkovano je 70 jedinki sličnih dimenzija koje su donesene u laboratorij te potom ostrugane i očišćene. U laboratoriju pod kontroliranim uvjetima, temperature i svjetlosti, postavljeno je 10 bazena unutar kojih je smješteno 7 jedinki. Napunjeni su s 5 L morske vode po tretmanu, odnosno 0,75 L po dagnji (Slika 2.4.). U bazenima su postavljene pumpe sa zrakom kako bi dagnjama bila osigurana dostupnost kisika. Temperatura vode iznosila je 18°C, a salinitet S·38 za vrijeme trajanja eksperimenta.



Slika 2.4. Dagnje unutar bazena (s aeracijom) su međusobno odvojene kako bi se spriječilo njihovo spajanje bisusnim nitima.

Baze eksperimenta podijeljene su u dvije glavne skupine: jedna bez dodatka hrane (mikroalgi) i jedna s dodatkom hrane (mikroalga *Dunaliella salina*, koncentracije 4×10^6 stanice mL^{-1}). U prvoj skupini jedan bazen je služio kao kontrolna skupina u kojoj nisu bila prisutna polimerne nanočestice. U preostalih četiri bazena dodano je 1 mg L^{-1} sintetizirane nanoplastike. Ekspozicija za prvi bazen trajala je 24 h, nakon čega su dagnje secirane. Slično za ostala tri bazena, dagnje su sakupljene i secirane nakon 48 h, 72 h i 96 h. Dagnje iz netretiranog kontrolnog bazena sakupljene su nakon 96 h. Isti postupak proveden je u pet bazena u kojima su dagnje tretirane polimernim nanočesticama hranjene mikroalgama, tj. kontrolni bazen sadržavao je mikroalge bez nanoplastike, dok je u ostala četiri bazena dodana smjesa mikroalgi i nanoplastike. Svaki dan skupljano je 7 dagnji, dok su netretirane kontrolne dagnje sakupljane nakon 96 h. Škrge svake jedinice podijeljene su na četiri jednaka dijela i spremljene u epruvetice, koje su zatim bile prebačene u tekući dušik. Kasnije su škrge bile pohranjene na temperaturi od -80°C za daljnje analize.

2.5. Biološki testovi

2.5.1. Aktivnost katalaze (CAT)

Pripremljen je natrijev fosfatni pufer (0.02 M, pH 7) na način da je 0.774 g natrijevog fosfata dibazičnog heptahidrata (M_w 268.07 g mol⁻¹) i 0.291 g natrijevog fosfata monobazičnog monohidrata (M_w 147.99 g mol⁻¹) dodano u 200 ml destilirane vode. pH je iznosio približno 7. Dodano je 0.25 mL triton X-100, te je dodano još destilirane vode kako bi totalni volumen iznosio 250 mL.

Tkivo škrge je vagano pojedinačno i potom prebačeno u stakleni Potter – Elvehjem homogenizator. Zbog niske gramaže tkiva (oko 50 mg), dodano je 3 × volumena natrijev fosfatnog pufera koji je držan u ledu. Homogenizator je također držan u ledu, te je tkivo homogenizirano na način da je podizan i spuštano duž teflonskog tučka 10 puta. Nakon je homogenat prebačen u 1.5 mL Eppendorf tubu i držan je u ledu. Uzorci su centrifugirani na 10000 g, na 4°C i 30 min. Nakon centrifugiranja bio je prisutan talog i supernatant koji se ispipetirao u nove eppendorf tube pazeći da talog ne poremeti proces. Supernatant je prebačen u manje eppendorf tubice koje su netom prije ubacivanja u tekući dušik probijene iglom na poklopcu kako nebi došlo do otvaranja. Nakon su prebačene na -80°C.

Pripremljen je kalijev fosfatni pufer (50 mM, pH 7) tako da je 1.168 g dibaznog kalijevog fosfata (M_w 174.18 g mol⁻¹) i 0.789 g monobaznog kalijevog fosfata (M_w 136.09 g mol⁻¹) dodano u 250 mL destilirane vode.

Otopina vodikovog peroksida je pripremljena dodajući 0.34 mL 30% vodikovog peroksida u 99.66 mL kalijevog fosfatnog pufera. U kvarcnu kivetu dodano je 20 µL uzorka tkiva i 780 µL fosfatnog pufera. Otopina je naglo miješana 5 s.

Dodano je 700 µL otopine vodikovog peroksida, miješano je brzo i odmah stavljeno u spektrofotometar. Smanjenje apsorbancije zbog katalitičke razgradnje vodikovog peroksida mjerilo se 30 s na valnoj duljini od 240 nm.

Aktivnost enzima dobivena je prema formuli:

$$ACAT = (\Delta A / \text{vrijeme}) \cdot V_{\text{ukupni volumen}} \cdot 1000 / \epsilon \cdot d \cdot V_{\text{uzorak}}$$

A = smanjenje apsorbancije

V ukupni volumen = 1500 μL

V uzorak = 20 μL

$\epsilon = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

d = 1 cm

2.5.2. Aktivnost glutation – s – transferaze (GST)

Pripremljen je pufer kalijev fosfat-EDTA (50 mM, 1 mM Na₂EDTA, pH 7,4) dodavanjem 606 mg dvobaznog kalijevog fosfata (Mw 174,18 g mol⁻¹) i 207 mg kalijevog fosfata monobazičnog (Mw, 136,09 g mol⁻¹) u 80 ml destilirane vode. Potom je otopljeno 37 mg dihidrata dinatrijeve soli etilendaminetraoetene kiseline (Mw 372,24 g mol⁻¹) u puferskoj otopini i dopunjen je konačni volumen do 100 ml. pH je iznosio 7,4. Škržno tkivo, prebačeno je u Potter-Elvehjem homogenizator i dodan 3x volumen (m/v) pufera za homogenizaciju kalijevog fosfata i EDTA. Homogenizator je držan u ledu, te je tkivo homogenizirano podizanjem i spuštanjem teflonskog tučka 10 puta. Dobiveni homogenati su prebačeni su u eppendorfove epruvete od 1,5 ml nakon čega su ubačeni u centrifugu na 10000 g i +4°C 30 min. Supertanant je ispipetiran u eppendorfove epruvete, zamrznut u tekućem dušiku i održavan na -80°C.

Za CDNB (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene) otopljeno je 12 mg CDNB (Mw 202,55 g mol⁻¹) u 0.6 ml apsolutnog etanola. Dobivena otopina je prebačena u alikvotu od 600 μL i zamrznuta na -20 °C.

Za otopinu reduciranog glutationa otopljeno je 31 mg GSH (Mw 307,32 g mol⁻¹) u 0.5 ml destilirane vode, što je potom prebačeno u 300 μL alikvotu i zamrznuto na -20 °C.

Za pripremu reakcijskog pufera, otopljeno je 0.6397 g natrijevog fosfata dibazičnog dodekahidrata (Mw 268,07 g mol⁻¹) i 0.4435 mg monobazičnog natrijevog fosfata monohidrata (Mw 137,99 g mol⁻¹) u 50 ml destilirane vode.

Reakcijska smjesa je pripremljena dodavanjem 500 μL otopine CDNB i 250 μL GSH u 49,25 mL reakcijskog pufera. U jažice mikrotitarske ploče dodano je 5 μL uzorka i zatim 295 μL reakcijske smjese. Reakcijska smjesa i uzorci su inkubirani 1,5 min, nakon čega se mjerila apsorbancija svakih 30 s tijekom 5 min na valnoj duljini od 340 nm.

Aktivnost enzima izračunava se formulom:

$$A_{\text{GST}} = (\Delta A / \text{vrijeme}) \cdot V_{\text{ukupni volumen}} \cdot 1000 / \epsilon \cdot d \cdot V_{\text{uzorak}}$$

A = smanjenje apsorbancije

$V_{\text{ukupni volumen}} = 300 \mu\text{L}$

$V_{\text{uzorak}} = 5 \mu\text{L}$

$\epsilon = 9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$d = 1 \text{ cm}$

2.5.3. Aktivnost glutation reduktaze (GR)

Pripremljen je pufer kalijev fosfat-EDTA (50 mM, 1 mM Na₂EDTA, pH 7,4) dodavanjem 606 mg dvobaznog kalijevog fosfata (M_w 174,18 g mol⁻¹) i 207 mg kalijevog fosfata monobazičnog (M_w , 136,09 g mol⁻¹) u 80 ml destilirane vode. Potom je otopljeno 37 mg dihidrata dinatrijeve soli etilendamintetraoctene kiseline (M_w 372,24 g mol⁻¹) u puferskoj otopini i dopunjen je konačni volumen do 100 ml. pH je iznosio 7,4. Škržno tkivo, prebačeno je u Potter-Elvehjem homogenizator i dodan 3x volumen (m/v) pufera za homogenizaciju kalijevog fosfata i EDTA. Homogenizator je držan u ledu, te je tkivo homogenizirano podizanjem i spuštanjem teflonskog tučka 10 puta. Dobiveni homogenati su prebačeni su u eppendorfove epruvete od 1,5 mL nakon čega su ubačeni u centrifugu na 10000 g i 4 °C 30 min. Supertanant je ispipetiran u eppendorfove epruvete, zamrznut u tekućem dušiku i održavan na -80°C.

Otopljeno je 6 mg glutation disulfida (M_w 612,63 g mol⁻¹) u 1,2 mL destilirane vode.

Otopljeno je 1 mg NADPH-tetranatrijeve soli (M_w 833,40 g mol⁻¹) u 1,2 mL natrijev fosfatnom puferu (100 mM, pH 7,4) Za pripremu pufera otopljeno je 270 mg natrijevog fosfata dibazičnog dodekahidrata (M_w 358,14 g mol⁻¹) i 34 mg monobazičnog natrijevog fosfata monohidrata (M_w 137,99 g/mol) u 10 ml destilirane vode, pH je iznosio 7,4.

U jažice mikrotitarske ploče dodano je 100 μL pufera kalijev fosfat-EDTA, 100 μL otopine glutation disulfida, 20 μL uzorka i 10 μL otopine NADPH. Smanjenje apsorbancije mjeri se svakih 30 s tijekom 10 min na valnoj duljini od 340 nm.

Aktivnost enzima izračunava se formulom:

$$\text{AGR} = (\Delta A / \text{vrijeme}) \cdot V_{\text{ukupni volumen}} \cdot 1000 / \epsilon \cdot d \cdot V_{\text{uzorak}}$$

A = smanjenje apsorbancije

V ukupni volumen = 230 μL

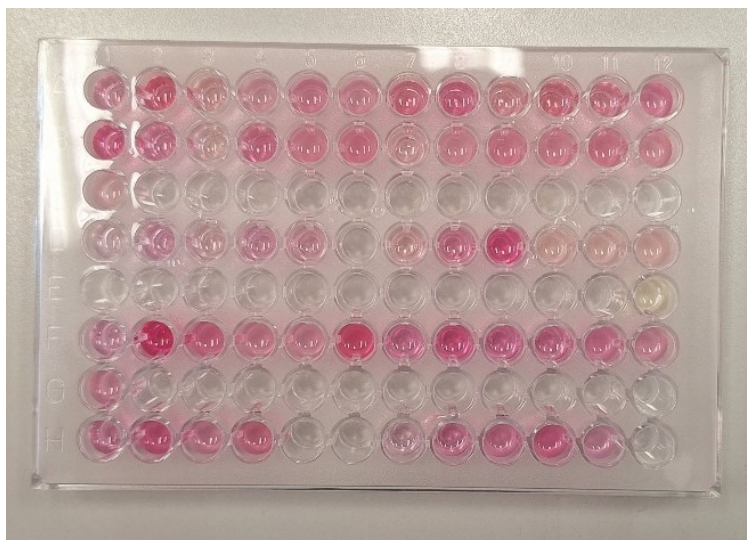
V uzorak = 20 μL

$\epsilon = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

d = 1 cm

2.5.4. Lipidna peroksidacija

Analiza količine produkata lipidne peroksidacije, odnosno TBARS-a (reaktivne tvari tiobarbiturne kiseline, *eng. thiobarbituric acid reactive substances*), odrađena je po sljedećoj metodi. U alikvotu od 150 μL supernatanta je dodan u 1 mL reakcijskog pufera (15% TCA, 0,1% BHT i 0,375% TBA prethodno otopljeno u 2 mL 12 M HCl). Otopina je inkubirana na 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 minuta, ostavljena da se ohladi na sobnoj temperaturi. Potom je otopina centrifugirana na 3000 g tijekom 15 minuta na 4 $^{\circ}\text{C}$. Razine peroksidacije lipida su određene mjerenjem apsorbancije na 530 nm (slika 2.5.4.). Kalibracijska krivulja je pripremljena korištenjem 1,1,3,3-tetrametoksiopropana (TPA) u reakcijskom puferu.



Slika 2.5.4. Mikrotitarska ploča koja pokazuje različite količine MDA (ružičaste boje) zbog peroksidacije lipida.

2.6. Određivanje koncentracije proteina

Uzorci su razrijeđeni 20x dodavanjem 5 μL uzorka u 95 μL ultračiste vode. Pufer je razrijeđen na isti način dodatkom 5 μL pufera u 95 μL ultračiste vode. Pripremljene su serije otopina goveđeg serumskog albumina (BSA) u puferu u rasponu koncentracija 0,005-2,000 mg mL^{-1} . Pomiješano je 5 μL uzorka ili BSA otopine s 250 μL Bradfordovog reagensa i inkubirano 45 min. Izmjerene su apsorbancije uzoraka, BSA otopine i pufera na valnoj duljini od 595 nm. Kalibracijska krivulja je nacrtana pomoću vrijednosti apsorpcije BSA te su iz toga određene koncentracije proteina u uzorcima.

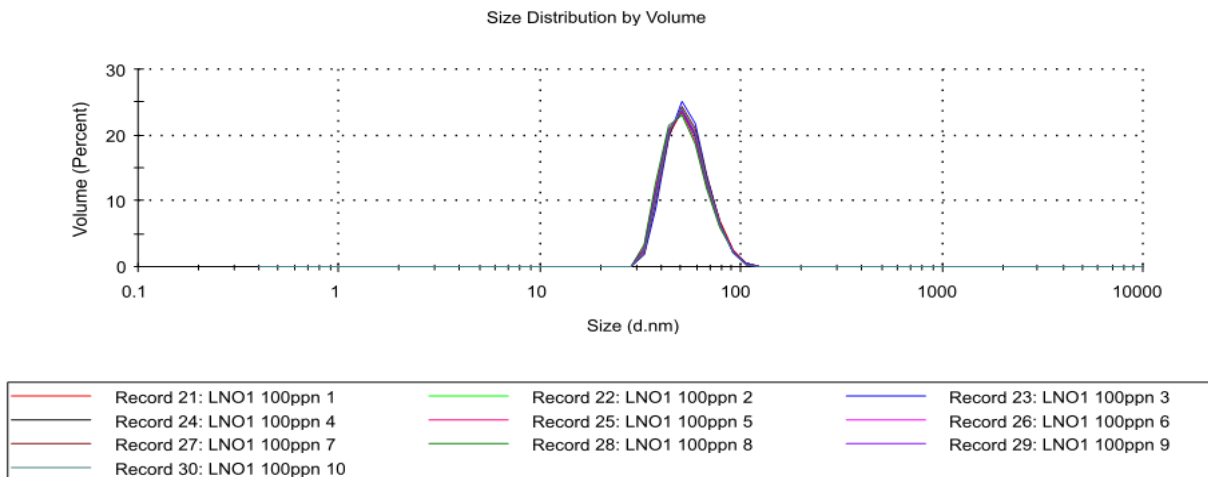
2.7. Statistička analiza

Prikupljeni podaci testirani su na odstupanja (*eng. outlier*) Grubbsovim testom. Podaci su naknadno testirani na normalnost distribucije Shapiro-Wilkovim testom i homogenost varijance Bartlettovim testom, nakon čega je slijedila parametarska ANOVA, s razlikama značajnosti utvrđenim Dunnettovim post hoc testom, ili neparametrijska Kruskal-Wallisova ANOVA praćena Dunnovim testom. Obrada podataka provedena je pomoću softvera Graphpad Prism 9 (GraphPad Software LLC, La Jolla, CA).

3. REZULTATI

3.1. Karakterizacija PSNPs

Raspodjela polistirenskih nanočestica (100 mg L^{-1} u ultračistoj vodi) po veličini s obzirom na volumen prikazano je na slici 3.1. a), uz izvrsnu ponovljivost dobivenu za raspodjelu veličina u deset uzastopnih mjerenja.



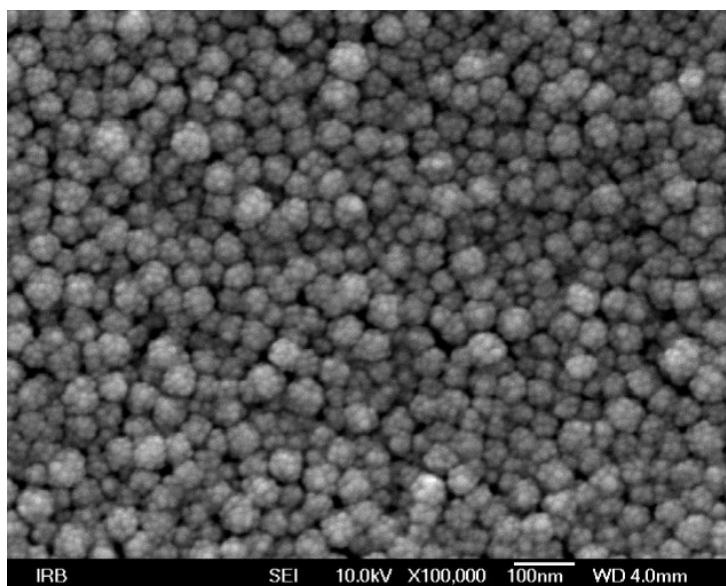
Slika 3.1. a) Grafički prikaz raspodjele polistirenskih nanočestica po veličini s obzirom na volumen.

Mjerenjem metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS) utvrđeno je da nanočestice imaju hidrodinamički promjer od $54,37 \pm 0,50 \text{ nm}$, dok vrh predstavlja 100% prisutnih nanočestica, što ukazuje da nema prisutnih aglomerata. Nadalje, izmjereni zeta potencijal od $-37,2 \pm 3,4 \text{ mV}$ ukazuje na dobru elektrostatičku odbojnost između nanočestica i stabilnost disperzije.

Mjerenje	d_H / nm	%
1	54.86	100.00
2	54.05	100.00
3	55.00	100.00
4	54.41	100.00
5	53.90	100.00
6	54.37	100.00
7	54.76	100.00
8	53.59	100.00
9	54.21	100.00
10	54.38	100.00
average	54.37	100.00
SD	0.50	0.00

Tablica 3.1. a) Prikazani podaci odnose se na hidrodinamički promjer disperzije PSNPs u Milli-Q vodi.

Morfologija sintetiziranih polimernih nanočestica određena je na temelju skenirajućih elektronskih mikrofotografija i utvrđeno je da su sfernog oblika, s karakterističnim naborima na površini koje podsjećaju na oblik “maline“ (Slika 3.1.b)). Promjeri nanočestica bili su relativno ujednačeni, $49,86 \pm 6,40$ nm (Tablica 3.1.b)) i nešto manji od promjera izmjerenih DLS metodom. To je u skladu s činjenicom da DLS mjeri hidrodinamički promjer, koji uključuje i vodensti solvacijski omotač oko nanočestica, sto nije vidljivo elektronskom mikroskopijom.



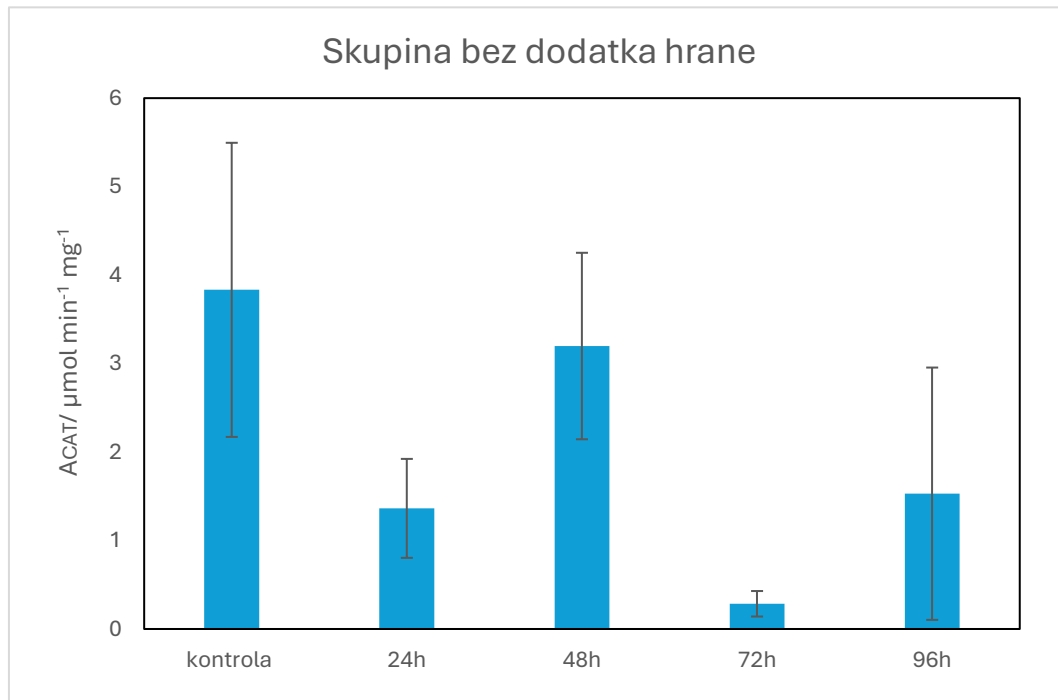
Slika 3.1.b) Skenirajuća elektronska mikrograf prikazuje PSNPs snimljene sa sekundarnog detektora elektrona (SEI).

Mjerenje	d / nm	Mjerenje	d / nm
1	63.3	9	46.5
2	53.8	10	43.7
3	47.4	11	49.2
4	39.7	12	59.2
5	56.8	13	50.1
6	47.1	14	49.5
7	53.1	15	43.1
8	45.5		
		average	49.86
		SD	6.40

Tablica 3.1.b) Prikazani podaci odnose se na stvarni promjer PSNPs mjereni iz SEM mikrografa.

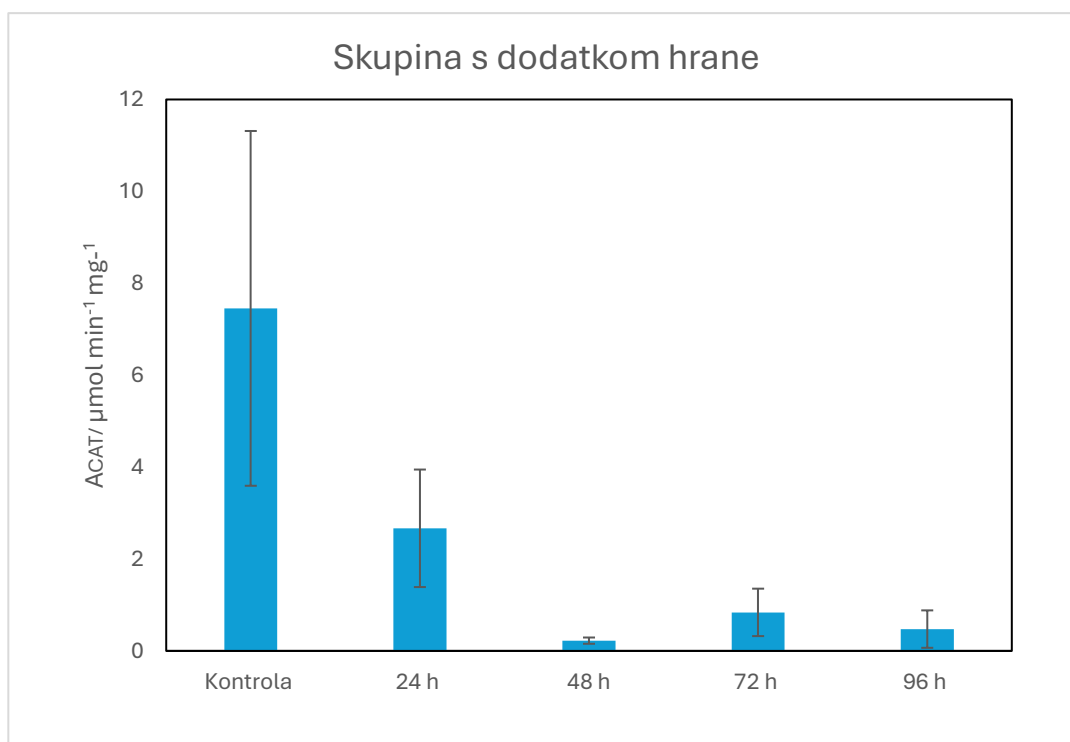
3.2. Rezultati aktivnosti katalaze

Aktivnost enzima katalaze izražena je po količini proteina u tkivu škrge dagnje *M. galloprovincialis*, a podaci za skupinu bez dodatka hrane prikazani su u obliku grafa (Slika 3.2. a)). Najveća zabilježena aktivnost unutar grupe koja nije hranjena zabilježena je u kontrolnoj grupi, gdje iznosi $3,83 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Ovaj podatak ukazuje na najvišu razinu CAT aktivnosti u uzorku koji nije bio izložen stresoru. Nakon 24 sata izlaganja PSNPs, CAT aktivnost opada i iznosi $1,36 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Uočava se znatno smanjenje aktivnosti u odnosu na kontrolnu grupu, što ukazuje na reakciju organizma na toksikante. Nakon 48 sati ponovno raste te iznosi $3,19 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, te se približava vrijednosti kontrolne grupe. Ovaj podatak ukazuje na moguću prilagodbu organizma nakon dva dana izloženosti. Nakon 72 sata, primijećena je najmanja aktivnost s iznosom od $0,38 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, što je značajno smanjenje u usporedbi s prethodnim mjerenjima. Ovaj podatak ukazuje na vrlo nizak odgovor enzima nakon tri dana izlaganja. U konačnici, nakon 96 sati, aktivnost katalaze iznosi $1,52 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, što predstavlja blagi porast u odnosu na prethodno mjerenje, ali i dalje ostaje niža od kontrolne vrijednosti.



Slika 3.2. a) Izmjerene aktivnosti katalaze po količini proteina u tkivu škrge dagnje *M. galloprovincialis* nakon izloženosti polistirenskim nanočesticama tijekom 4 dana.

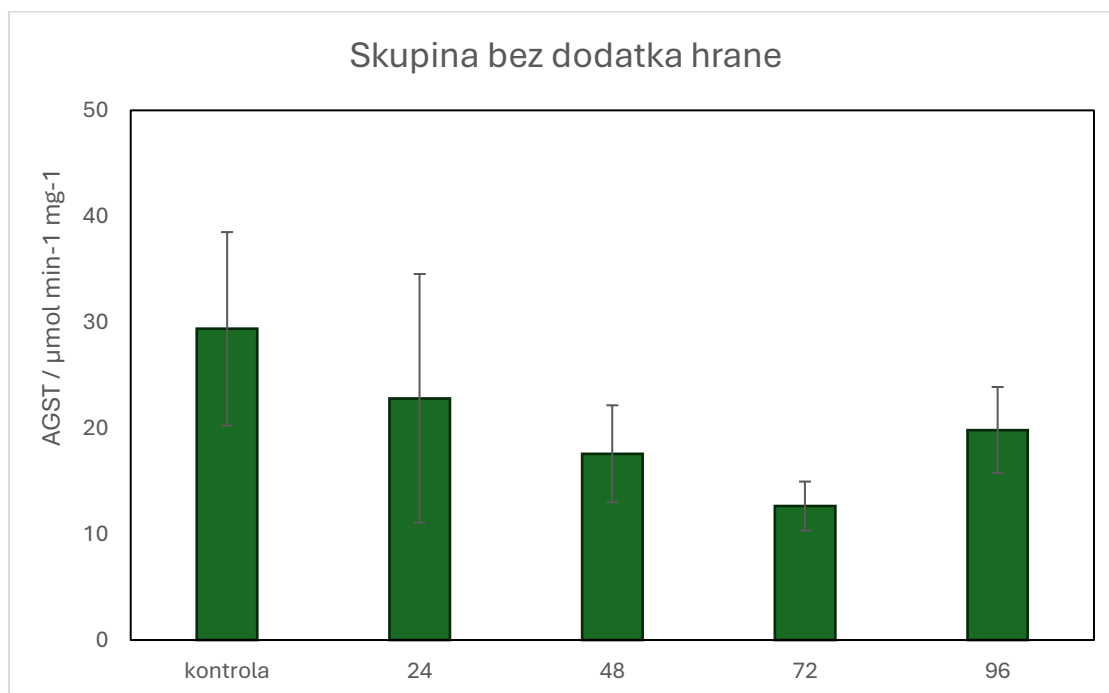
Podaci za skupinu s dodatkom hrane izraženi su na Slici 3.2.b). Najveća zabilježena CAT aktivnost također je zabilježena u kontrolnoj skupini, s $2 \times$ vrijednosti od kontrole unutar skupine koja nije imala pristup hrani. Iznosi $7,45 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Također je primijećeno veliko odstupanje od prosječne vrijednosti. Nakon 24 sata izlaganja PSNPs, CAT aktivnost opada i iznosi $2,66 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Za razliku od skupine bez pristupa hrani, nakon 3 dana izlaganja PSNPs CAT aktivnost se smanjuje. Ujedno je to i najniža zabilježena CAT aktivnost s iznosom od $0,22 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Nakon 72 sata CAT aktivnost raste, ali neznajno, te iznosi $0,83 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. U konačnici, nakon 96 sati CAT aktivnost se ponovno smanjuje, a iznos od $0,47 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ najbliži je iznosu aktivnosti nakon 48 sati. Nagli pad aktivnosti tokom ekspozicije u usporedbi s kontrolom ukazuje na značajnu reakciju organizma na PSNPs.



Slika 3.2. b) Izmjerene aktivnosti katalaze po količini proteina u tkivu škrga dagnje *Mytilus galloprovincialis* nakon Izloženosti polistirenskim nanočesticama tijekom 4 dana unutar skupine koja je nahranjena mikroalgama vrsta *D. salina*.

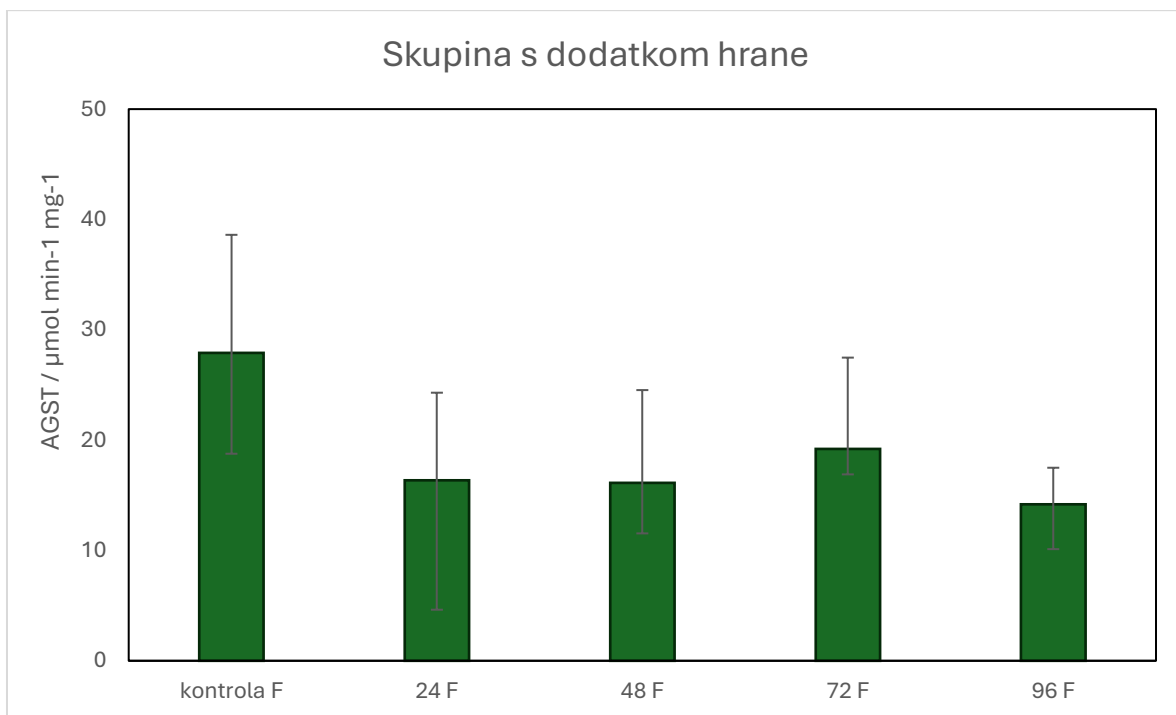
3.3. Rezultati aktivnosti glutation –S– transferaze

Aktivnost enzima glutation-s-transferaze izražena je po količini proteina u tkivu škrge dagnje *M. galloprovincialis*, a podaci za skupinu bez dodatka hrane prikazani su u obliku grafa (Slika 3.3. a)). Vrijednosti GST-a su poprilično više od vrijednosti CAT aktivnosti. Najviša GST aktivnost u skupini koja nije hranjena zabilježena je u kontroli, s vrijednosti od $29,37 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Nakon 24 sata aktivnost enzima u vremenu po količini proteina se smanjuje, i iznosi $22,81 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, što ukazuje na utjecaj nanočestica na tkiva. Nakon 48 sati GST aktivnost prati opadajući trend s iznosom od $17,58 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Nakon 72 sata izmjerena je najniža koncentracija GST-a u vremenu po količini proteina i približno je $2\times$ manja od kontrole. Mala standardna devijacija ($p < 0.01$) ukazuje na statistički značajan rezultat s iznosom od $12,64 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Nakon 96 sati primijećen blagi porast GST aktivnosti u odnosu na prethodni dan, a iznos od $19,82 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ najbliži je onom nakon drugog dana ekspozicije.



Slika 3.3. a) Izmjerene aktivnosti glutation –S– transferaze po količini proteina u tkivu škrge dagnje *M. galloprovincialis* nakon izloženosti polistirenskim nanočesticama tijekom 4 dana.

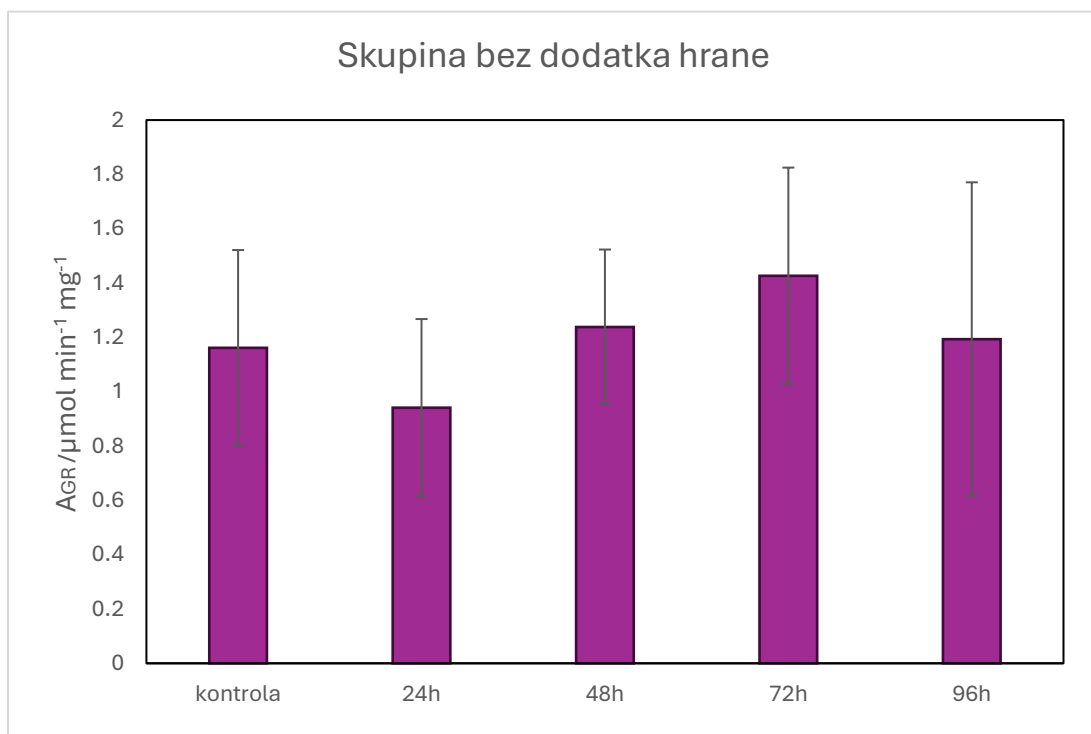
Aktivnost enzima glutation-s-transferaze izražena je po količini proteina u tkivu škrga dagnje *M. galloprovincialis*, a podaci za skupinu s dodatkom hrane prikazani su u obliku grafa (Slika 3.3. b)). Najveća zabilježena GST aktivnost je ponovo primijećena u kontroli s iznosom od $27,89 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, te je malo niža od kontrole unutar skupine bez prisutne hrane. Nakon 24 sata zabilježen je pad aktivnosti GST, koji je bitno niži od aktivnosti izmjerene nakon 24 sata u skupini bez prisutne hrane, s iznosom od $16,36 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Nakon 48 sati GST aktivnost se ne mijenja, što ukazuje na to da PSNPs nisu drastično utjecale na organizam, kao što je opisano u gornjim grafovima. Također je vrijednost vrlo slična GST aktivnosti nakon 48 sati u skupini bez pristupa hrani. Nakon 72 sata zabilježen je blagi porast GST aktivnosti što ukazuje na moguću prilagodbu organizma na djelovanje toksikanta. Iznos od $19,21 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ najbliži je kontrolnoj skupini. Nakon 96 sati ponovo je primijećen pad GST aktivnosti, s iznosom od $14,18 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, koja je ujedno najmanja aktivnost izmjerena tokom ekspozicije.



Slika 3.3. b) Izmjerene aktivnosti glutation-S-transferaze po količini proteina u tkivu škrga dagnje *M. galloprovincialis* nakon Izloženosti polistirenskim nanočesticama tijekom 4 dana, i koji su istovremeneno nahranjene mikroalgama *D. salina*.

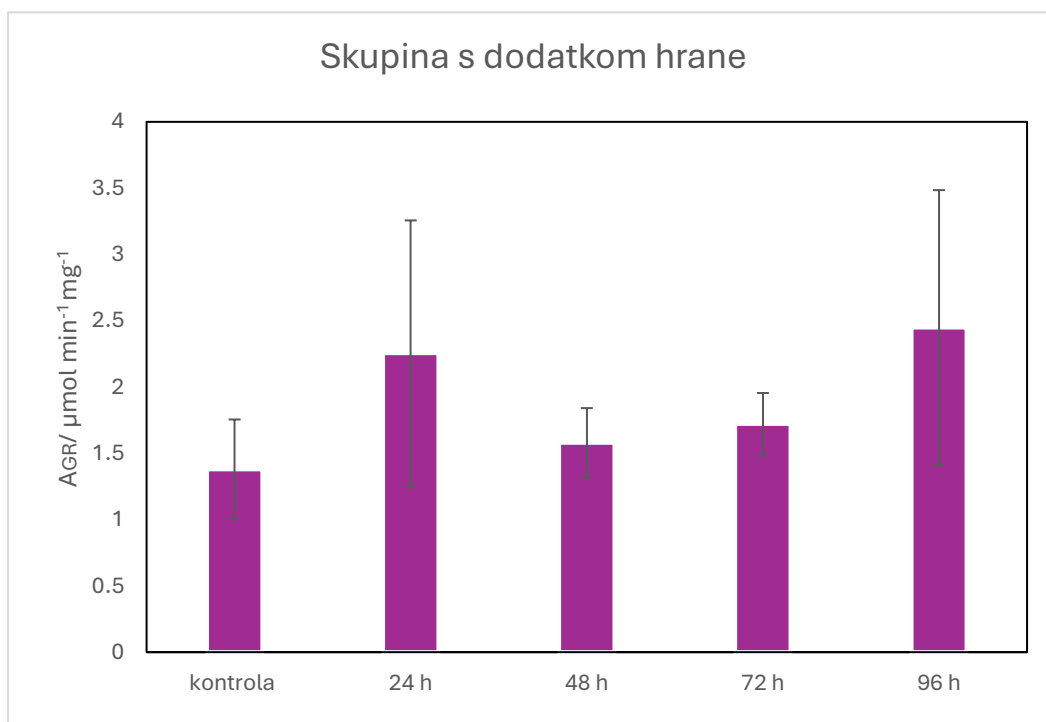
3.4. Rezultati aktivnosti glutation reduktaze

Aktivnost enzima glutation reduktaze izražena je po količini proteina u tkivu škrge dagnje *M. galloprovincialis*, a podaci za skupinu bez dodatka hrane prikazani su u obliku grafa (Slika 3.4. a)). Aktivnost enzima GR u vremenu po količini proteina u kontroli iznosi $1,16 \mu\text{mol} \mu\text{mol} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, i za razliku od CAT i GST, kontrola nema najveću zabilježenu aktivnost. Nakon 24 sata izlaganja PSNPs, GR aktivnoat se smanjuje i iznosi $0,94 \mu\text{mol} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Takvo ponašanje zajedničko je svim enzimima, dok je za GR to ujedno i najniža opažena aktivnost. Nakon 48 sati aktivnost blago raste, i iznosi $1,23 \mu\text{mol} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Nakon 72h zabilježena je najveća GR aktivnost s iznosom od $1,42 \mu\text{mol} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Nakon 96 sati izlaganja toksikantu, GR aktivnost se ponovo smanjuje, s iznosom od $1,19 \mu\text{mol} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Sve u svemu, GR aktivnost je poprilično niža uspoređujući s CAT i GST u obje skupine.



Slika 3.4. a) Izmjerene aktivnosti glutation reduktaze po količini proteina u tkivu škrge dagnje *M. galloprovincialis* nakon Izloženosti polistirenskim nanočesticama tijekom 4 dana.

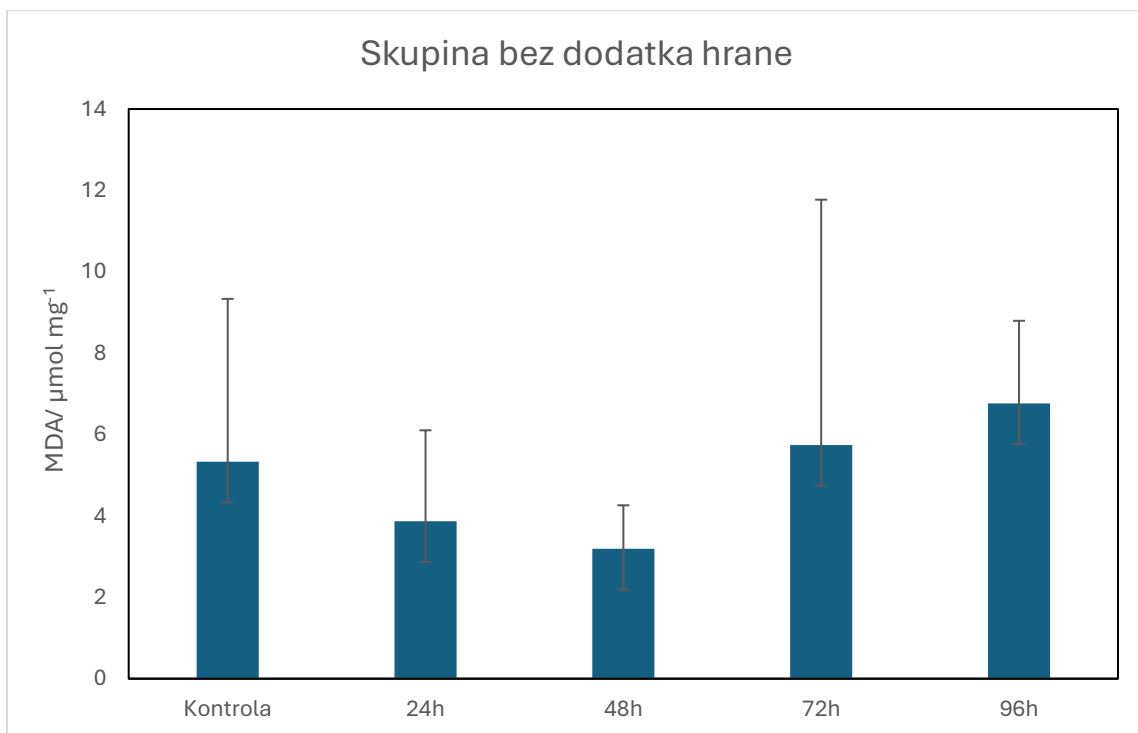
Aktivnost enzima glutation-s-transferaze izražena je po količini proteina u tkivu škrga dagnje *M. galloprovincialis*, a podaci za skupinu s dodatkom hrane prikazani su u obliku grafa (Slika 3.4. b)). Aktivnosti su veće u odnosu na skupinu bez prisustva hrane. GR aktivnost u kontrolnoj skupini s iznosom od $1,37 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ je ujedno najniža opažena aktivnost unutar skupine s dodatkom hrane, i vrijednosti su slične kontroli u skupini bez hrane. Nakon 24 sata primijećen je nagli porast GR aktivnosti, s iznosom od $2,25 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Takvo ponašanje enzima nije opaženo kod CAT i GST. Nakon 48 sati izlaganja PSNPs aktivnost naglo pada na iznos od $1,58 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Nakon 72 sata GR aktivnost blago raste, s iznosom od $1,72 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Nakon 96 sati izlaganja ponovo je primijećen nagli porast GR aktivnosti, te s iznosom od $2,44 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ čini najveću zabilježenu aktivnost u skupini koja je imala pristup hrani.



Slika 3.4.b) Izmjerene aktivnosti glutation reduktaze po količini proteina u tkivu škrga dagnje *M. galloprovincialis* nakon Izloženosti polistirenskim nanočesticama tijekom 4 dana, i koji su istovremeneno nahranjene mikroalgama *D. salina*.

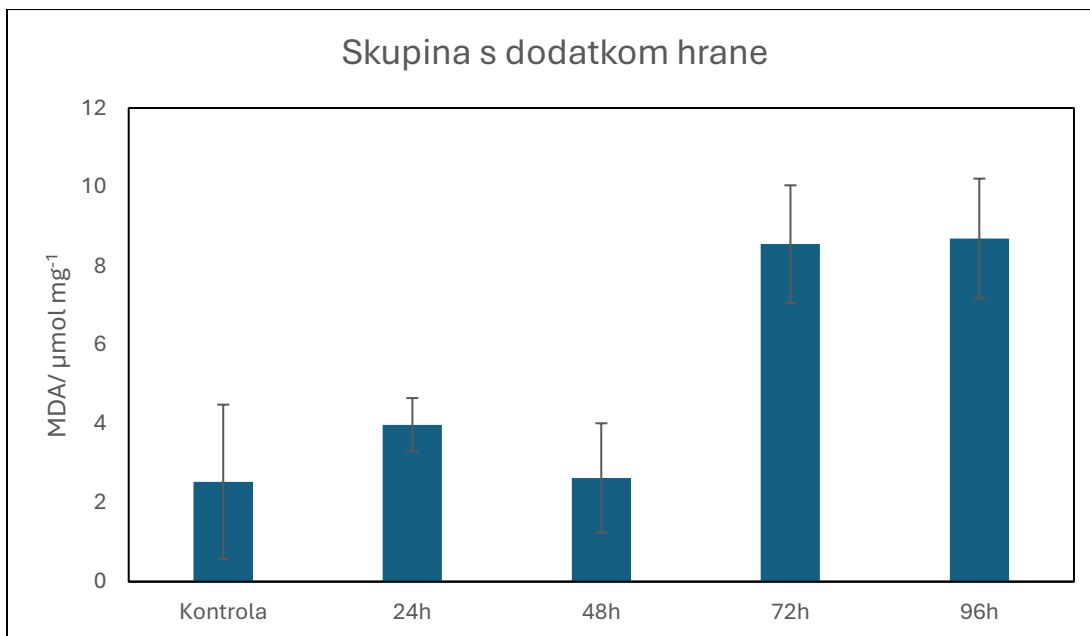
3.5. Rezultati lipidne peroksidacije

Koncentracija MDA izražena je po količini proteina u tkivu škrga dagnje *M. galloprovincialis*, a podaci za skupinu bez dodatka hrane prikazani su u obliku grafa (Slika 3.5. a)). Rezultati lipidne peroksidacije pokazali su značajne koncentracije MDA u obje skupine. Opaženo je postepeno smanjenje koncentracije od kontrolne skupine, sa značajnim opadanjem nakon 48 sati, nakon čega koncentracija raste. MDA koncentracija u kontrolnoj skupini iznosila je $5,33 \mu\text{mol mg}^{-1}$. Nakon 24 sata koncentracija MDA se smanjuje, s iznosom od $3,86 \mu\text{mol mg}^{-1}$, koji je sličan iznosu nakon 24 sata unutar skupine s dodatkom hrane. Nakon 48 sati primijećen je pad koncentracije MDA, s iznosom od $3,18 \mu\text{mol mg}^{-1}$, što je ujedno najniža zabilježena koncentracija MDA. Nakon 72 sata MDA koncentracija se naglo povećava, što je zajedničko unutar obje skupine, na $5,74 \mu\text{mol mg}^{-1}$. Nakon 96 sati opažena je najveća koncentracija s iznosom od $6,76 \mu\text{mol mg}^{-1}$. Velike standardne devijacije ukazuju na raspršenost rezultata, koji nisu statistički značajni.



Slika 3.5.a) Izmjerene aktivnosti MDA po količini proteina u tkivu škrga dagnje *M. galloprovincialis* nakon izloženosti polistirenskim nanočesticama tijekom 4 dana.

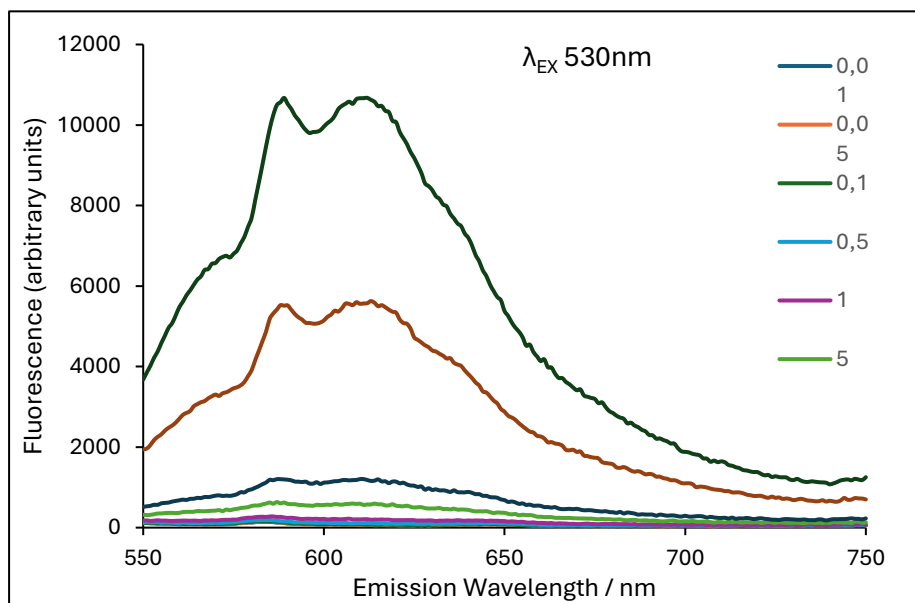
Koncentracija MDA izražena je po količini proteina u tkivu škrga dagnje *M. galloprovincialis*, a podaci za skupinu s dodatkom hrane prikazani su u obliku grafa (Slika 3.5. b)). Rezultati imaju nižu standardnu devijaciju od skupine bez dodatka hrane, što ukazuje na statistički značajne rezultate. MDA koncentracija u kontrolnoj skupini iznosila je $2,52 \mu\text{mol mg}^{-1}$. Nakon 24 sata koncentracija MDA se blago povećala, s iznosom od $3,97 \mu\text{mol mg}^{-1}$, što ukazuje na veće oštećenje tkiva u odnosu na kontrolu. Nakon 48 sati primijećen je pad koncentracije MDA, s iznosom od $2,62 \mu\text{mol mg}^{-1}$ koji je vrlo sličan kontrolnoj skupini. Nakon 72 sata MDA koncentracija se naglo povećava na $8,55 \mu\text{mol mg}^{-1}$. Nakon 96 sati koncentracija je vrlo slična onoj prethodnom danu, s iznosom od $8,69 \mu\text{mol mg}^{-1}$. Takvi podaci ukazuju na bitno oštećenje unutar tkiva uzrokovano utjecajem PSNPs.



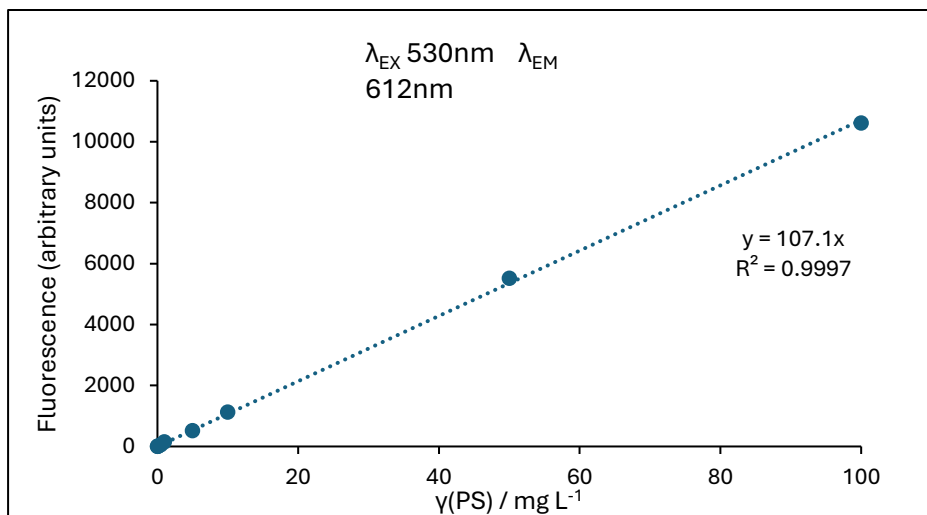
Slika 3.5.b) Izmjerene aktivnosti MDA po količini proteina u tkivu škrga dagnje *M. galloprovincialis* nakon Izloženosti polistirenskim nanočesticama tijekom 4 dana, i koji su istovremeneno nahranjene mikroalgama *D. salina*.

3.6. Bioakumulacija PSPNs

Rezultati mjerenja kalibracije za različite koncentracije PSPNs u vodenoj otopini dobiveni su pomoću fluorescencije Nile Reda (Slika 3.6.1.). Nile red ima ekscitacijski pojas centriran na 530 nm i široki emisijski pojas oko 610 nm, iako ekscitacijske i emisijske valne duljine uvelike ovise o kemijskom okruženju oko boje. Koncentracije se kreću od 0,01 mg L⁻¹ do 100 mg L⁻¹. Povećanjem koncentracije PSPNs, od 0,01 mg L⁻¹ do 100 mg L⁻¹, intezitet fluorescencijske emisije na valnoj duljini od 612 nm (λ_{EX} 530 nm) se također povećava (Slika 3.6.2.). Vrijednost koeficijenta korelacije ($R=0,9997$) ukazuje na linearnu vezu između koncentracije PSPNs i inteziteta fluorescencije (λ_{EM} 612 nm) (Slike 3.6.2.). Nagib pravca ($y = 107,1x$) predstavlja kalibracijski faktor proporcionalnosti između koncentracije i fluorescencije.

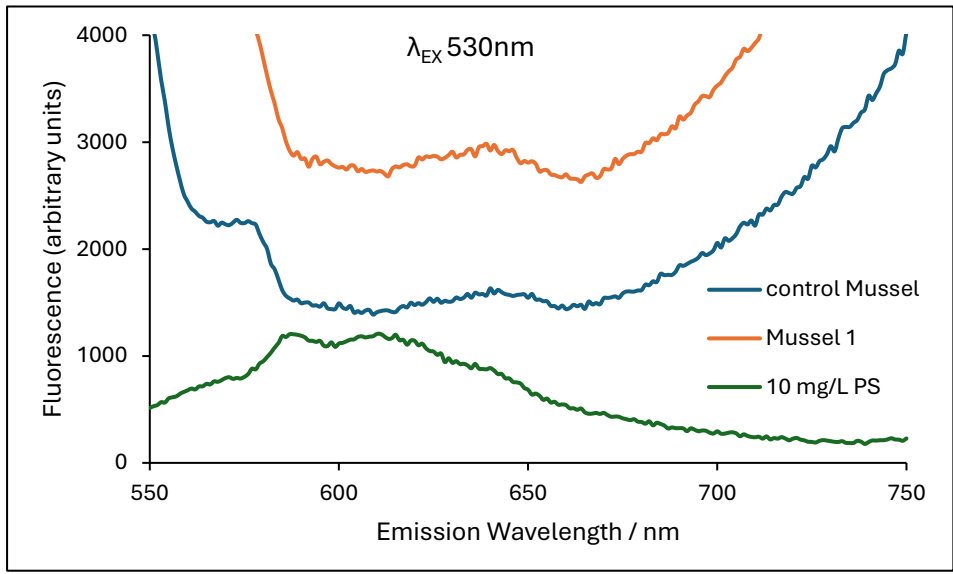


Slika 3.6.1. Spektri emisije (λ_{EX} 530 nm) za različite koncentracije PSPNs.



Slika 3.6.2. Kalibracijska krivulja prikazuje zavisnost intenziteta fluorescencije i koncentracije PSNPs.

Emisijski spektar (λ_{EX} 530 nm) probavljenog tkiva škrga pokazuje veći intenzitet fluorescencije na svim valnim duljinama zbog prisutnosti niza molekularnih vrsta u usporedbi s PSNP-ovima raspršenim u ultra čistoj vodi (Slika 3.6.3.). Međutim, kontrolni uzorak ima primjetno manji intenzitet fluorescencije u odnosu na tretirani uzorak, što može ukazivati na akumulaciju Nile Red (odnosno PSNPs-ova) unutar tkiva. Na temelju izmjerene fluorescentne apsorbance na 612 nm i primijenjene kalibracijske krivulje, izračunata je koncentracija PSNP-a, dok je bioakumulacija procijenjena usporedbom mase PSNP-a u tkivu s ukupno dodanom količinom. Masa PSNP-a po gramu škrga također je izračunata kako bi se kvantificirala distribucija nanočestica u tkivima. Bioakumulacija predstavlja procijenjenu količinu PSNP-a u tkivima u odnosu na inicijalno dodanu količinu u bazen. Masa PSNP-ova u tkivu škrga iznosi $80,851 \mu\text{g g}^{-1}$. Bioakumulacija iznosi 5%.



Slika 3.6.3. Grafički prikaz emisijskih spektara fluorescencije uzoraka tkiva dagnji (kontrolni i tretirani) i PSNPs (10 mg L⁻¹).

4. RASPRAVA

Stvaranje i eliminacija ROS-a u tijelu u normalnim uvjetima su u ravnoteži. Prilikom stresnih situacija ili tjelesnog oštećenja dinamička ravnoteža može biti poremećena, što rezultira povećanim razinama ROS-a. Visoke razine ROS-a mogu uzrokovati peroksidaciju lipida i oštećenje membrane, a time i utjecati na organizam (Lushchak, 2011). Stoga se putevi posredovani ROS-om često smatraju mehanizmima kojima strane tvari ili stresovi utječu na organizme. Prethodne studije pokazale su da nanoplastika može potaknuti stvaranje ROS-a u rotiferima (Jeong *et al.*, 2016), algama (Bhattacharya *et al.*, 2010) i kopepodima (Jeong *et al.*, 2017) te izazvati oksidativni stres kod morskih bakterija (Sun *et al.*, 2018).

Kad je riječ o aktivnosti enzima CAT, u ovom završnom radu nakon 4 dana tretmana s PSNPs uočljiv je značajan pad aktivnosti CAT. Inhibicija aktivnosti enzima CAT uslijed tretiranja s PSNPs dokazano je u prethodnim istraživanjima. Gonçalves *et al.* (2022.) procijenili su učinke polistirenske nanoplastike ($10 \mu\text{g L}^{-1}$; 50 nm nPS) na tkiva *Mytilus galloprovincialis* nakon 21 dana izlaganja. Podaci navode da je aktivnost CAT-a bila preopterećena u škragama i hepatopankreasu, gdje promatrana inhibicija predstavlja nemogućnost uklanjanja vodikovog peroksida koji nastaje kao rezultat nPS izloženosti. CAT aktivnost u škragama dagnji izloženih nPS-u bila je značajno izražena i razlikuje se od neizloženih dagnji tijekom cijelog razdoblja izlaganja, dok se smanjenje aktivnosti primijetilo tek nakon 7 dana. Nasuprot tome, podaci za druge vrste otkrili su povećanje CAT aktivnosti ili nisu zapazili nikakve promjene. Kod vrste *M. coruscus* (nPS; 70 nm; $3,64 \times 10^3$ čestica/L; 14 dana) nisu uočene značajne promjene u probavnoj žlijezdi (Wang *et al.*, 2021), a slične rezultate dobili su Ribeiro *et al.* (2017.) kod školjkaša vrste *S. plana* nakon izlaganja mikroplastici (PS; 20 μm ; $1000 \mu\text{g L}^{-1}$; 14 dana). Nasuprot tome, PS mikrosfere (2 μm ; 10^4 i 10^6 čestica/L; 7 dana) te mikroplastika PE i PP (<400 μm ; 10 dana) uzrokovali su povećanje aktivnosti CAT kod *M. coruscus* (Wang *et al.*, 2020) te u škragama i probavnim žlijezdama školjkaša iz roda *Mytilus* (Revel *et al.*, 2019). Studije o učinku starenja i veličine jedinki na aktivnost CAT u dagnjama doveli su do različitih rezultata, jer je taj učinak specifičan za vrstu, spol, tkivo i starost. Nekoliko je autora otkrilo smanjenje u CAT aktivnosti tijekom starenja u dagnji *Mytilus edulis* (Viarengo *et al.*, 1991). Naprotiv, Sukhotin *et al.* (2002.) pronašli su smanjenje CAT aktivnosti specifično za težinu unutar zasebnih starosnih grupa *M. edulis*. Ovo otkriće ukazuje na to da u studijama gdje je zabilježeno smanjenje aktivnosti CAT povezano s dobi, zapravo može biti posljedica povećanja veličine školjkaša zbog starenja. Istraživanja Borković *et al.* (2004.) pokazala su povećanje specifične i ukupne aktivnosti enzima CAT kod vrste *M. galloprovincialis* prikupljenih tokom

svibnja, što je vjerojatno povezano s povećanom metaboličkom aktivnošću uslijed sezonskog porasta temperature i intenzivne reproduktivne aktivnosti. Takvi rezultati objašnjavaju visoke razine CAT u kontrolnim skupinama. Aktivnost GST-a prati isti koncept kao katalaza, s najvišom aktivnošću enzima unutar kontrolnih skupina. Gonçalves *et al.* (2022.) opisali su isti opadajući trend, s naglim porastom nakon 21. dana ekspozicije. S druge strane, aktivnost GST-a je porasla u škrgama vrste *Scrobicularia plana*, a smanjena u probavnoj žlijezdi nakon izloženosti mikroplastici (20 μm ; 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$; 14 dana) (Ribeiro *et al.*, 2017). Takvi podaci ukazuju na važnost procjene veličine čestica na nanoskali, jer se njihovo ponašanje i posredovana toksičnost razlikuju. Veličina mikroplastike smatra se jednim od najvažnijih čimbenika koji utječe na njezin unos, translokaciju i eliminaciju od strane dagnji. To se može pripisati činjenici da je gutanje čestica ograničeno građom i veličinom tijela. Primjerice, hvatanje čestica ograničeno je veličinom i složenošću laterofrontalnih trepetljika (Ward i Shumway, 2004). Također je primijećeno da dagnje gutaju manje čestice (Wang *et al.*, 2021). Učinkovitost hvatanja pokazuje rastući trend s povećanjem veličine čestica iznad 1 μm do maksimalne učinkovitosti (blizu 100%) pri veličini od 2,5-3,5 μm (Ward *et al.*, 2019a). Jedno od mogućih objašnjenja je da se nanoplastika može pasivno progutati zajedno s protokom vode unatoč niskoj učinkovitosti hvatanja. Jedna je studija također pokazala različite obrasce kretanja mikroplastike kroz škrge dagnji ovisno o veličini PS kuglica između 1, 2 μm i 200 nm (Merzel *et al.*, 2019). Rezultati studije Liu *et al.* (2019b) na običnoj vodenbuhi *Daphnia pulex* pokazuju da uz povećanje koncentracije nanoplastike, razine ekspresije GST, SOD, CAT, GPx se smanjuju, čime se smanjuje antioksidativna obrana. Niska koncentracija nanoplastike uzrokuje prekomjernu proizvodnju ROS-a, dok visok sadržaj ROS-a izazvan visokim koncentracije nanoplastike mogu nadvladati antioksidativne sustave i izazvati značajna oksidativna oštećenja i gubitak kompenzacijskih mehanizama, potiskujući tako antioksidativno djelovanje (Liu *et al.*, 2018). Ovi rezultati potvrđuju razlike u toksičnosti nanoplastike i mikroplastike, sugerirajući da manja veličina plastičnih čestica dovodi do veće toksičnosti za školjkaše. Također, koncentracije koje su korištene mogu imati značajnu ulogu u toksičnosti koju plastične čestice ispoljavaju kod školjkaša, jer što je veća koncentracija, veća je vjerojatnoća agregacije/aglomeracije u morskoj vodi, što povećava veličinu agregata i moguće smanjuje sposobnost organizma da ih unese. Stoga je važno napomenuti kako su prethodna istraživanja s drugim NP koristila ipak nešto niže koncentracije nego u ovom radu (1 mg L^{-1}).

Studije su pokazale da mikroplastika stupa u interakciju s mikroalgama, potičući stvaranje heteroagregacije sastavljene od mikroplastike, mikroalgi i egzopolisaharida (Lagarde *et al.*,

2016; Long *et al.*, 2017). Ovaj proces može promijeniti gustoću, veličinu i bioraspoloživost mikroplastike (Lagarde *et al.*, 2016). Daljnje agregiranje nanoplastike također može poboljšati unos od strane dagnji (Ward & Kach, 2009). Prema dobivenim rezultatima dagnje nisu učinkovito razlikovale mikroalge od mikroplastike, te ih smatraju hranom niske vrijednosti. Usporedbom neuhranjene skupine sa skupinom koja je imala pristup hrani, uočena je razlika u vrijednostima aktivnosti CAT-a i GST-a. Aktivnost ovih enzima bila je smanjena u skupini hranjenoj mikroalgama, što sugerira poboljšani nutritivni unos u odnosu na skupinu koja nije bila hranjena. U studiji Rist *et al.* (2017.) opisana je interakcija čestica i mikroalgi na organizmu *Daphnia magna*. Opterećenje česticama bilo je znatno smanjeno u prisutnosti hrane: za 78% kod čestica od 100 nm i za 98% kod čestica od 2 mm, u usporedbi s gutanjem čestica bez prisutne hrane. Mogući razlog za to je što su plastične čestice u mediju 'razrijeđene' stanicama algi (ukupan broj stanica algi i plastičnih čestica bio je gotovo šest puta veći nego broj samih plastičnih čestica), što prirodno dovodi do manjeg gutanja čestica. Također, koncentracija čestica u mediju se smanjuje zbog aktivnije filtracije, čime dolazi do taloženja čestica u fecesu. Drugi mogući mehanizam mogao bi biti određeni stupanj selektivne ishrane. Dok neke studije opisuju *Daphnia magna* kao potpuno neselektivnog filtratora (DeMott, 1986), drugi su primijetili određenu selektivnost (DeMott, 1995; Kirk, 1991). Kirk (1991) otkrio je selektivno hranjenje fitoplanktona s česticama gline, što je opisano kao pasivna selektivnost jer životinje manje učinkovito hvataju te čestice, umjesto da ih aktivno odbijaju. Također je primijećeno da *D. magna* može razlikovati čestice različite tvrdoće i površinskih svojstava (DeMott, 1995). Kod aktivnosti GR enzima primijećen je rast nakon 72h u skupini bez hrane, i nakon 96h u skupini koja je hranjena mikroalgama. Vrijednosti su vrlo niske uspoređujući s aktivnošću GST-a, što može ukazivati na to da glutationski sustav sudjeluje u detoksikaciji peroksida. Niska GR aktivnost može ukazivati na to da nema dovoljno dostupne energije u obliku NADPH koji je potreban za regeneraciju glutaciona. Također je moguće da je visoka koncentracija GST-a mogla iscrpiti zalihe glutaciona, posebno ako je postojala konstantna izloženost oksidansima i peroksidima. Kada je obrambeni sustav antioksidansa preopterećen, membranski lipidi nisu isključeni od napada zaostalog ROS-a, što dovodi do peroksidacije lipida (LPO). Taj mehanizam dovodi do gubitka integriteta membrane i stanične smrti. Visoke koncentracije MDA ukazuju upravo na to, te su ujedno najviše koncentracije izmjerene nakon 72h i 96h.

Iako je u okruženju bila prisutna visoka koncentracija toksikanata, bioakumulacija je iznosila svega 5%. Moguće je da je smanjena sposobnost filtracije uslijed starosti organizma, dovela do manjeg unosa PSNPs. Također postoji mogućnost da je došlo do akumulacije u drugim

organima, poput hepatopankreasa. Uz to, izbacivanje čestica putem fecesa i pseudofecesa moglo je doprinjeti smanjenju koncentracije toksikanata u organizmu.

5. ZAKLJUČAK

Dagnje su jedan od najčešće korištenih organizmima za biomonitoring učinaka nanomaterijala poput nanoplastike i njezinih karakteristika. U *M. galloprovincialis*, 1 mg L⁻¹ PSNPs promjera 54,37 +/- 0,50 nm uzrokovale su preopterećeni antioksidativni sustav i dovele do oksidativnog oštećenja u škrgama. Inhibicija antioksidativne obrane može biti rezultat ROS-a koji je generiran toksičnošću PSNPs, uzrokujući vrlo niske aktivnosti enzima katalaze, glutation -S-transferaze i glutation reduktaze. Visoke koncentracije MDA u tkivu ukazuju na značajnu razinu oštećenja nastalu mehanizmom lipidne peroksidacije, što sugerira da je koncentracija PSNPs bila previsoka zbog čega je ROS nadjačao antioksidativni sustav dagnje. Visoke koncentracije enzima u kontrolnim skupinama upućuju na loše zdravstveno stanje uzrokovano starošću jedinki, što je moglo utjecati na njihovu ukupnu fiziološku otpornost i reaktivnost. Nije primijećena značajna razlika između neuhranjenih skupina i onih koje su imale pristup hrani, iako je CAT i GST aktivnost smanjena kod skupina hranjenim mikroalgama vrste *D. salina*. Masa PSNP-ova u tkivu škrge iznosila je 80,851 µg g⁻¹, dok je bioakumulacija iznosila 5%, također uzrokovana starošću jedinki i smanjenom sposobnošću filtracije. Ovaj rad potvrđuje da su dagnje korisni bioindikatori i dobar model za procjenu bioloških učinaka polistirenske nanoplastike. Važno je razumjeti ponašanje i toksičnost nanoplastike prema morskoj bioti radi predviđanja budućih učinaka na okoliš i razvoj strategija za očuvanje i zaštitu ekosustava, uključujući čovjeka.

6. SAŽETAK

Nanoplastika postaje sve veća globalna briga, a njeni štetni učinci na morske organizme su još uvijek neistraženi. Ovaj rad procijenio je učinke polistirenske nanoplastike (1 mg L⁻¹; 54,37 nm PSNPs) na dagnjama vrste *Mytilus galloprovincialis* tokom 4 dana izlaganja. Organizmi su podijeljeni u dvije skupine pri čemu je jedna bila hranjena mikroalgama vrste *Dunaliella salina*, dok druga nije imala pristup hrani. Toksičnost je procijenjena antioksidativnim enzimima (katalaza (CAT), glutation reduktaza (GR)), enzimom biotransformacije (glutacion - S -

transferaza (GST)) i oksidativnim oštećenjem (LPO) u škrgama. Niske aktivnosti enzima CAT, GST i GR tokom ekspozicijskog vremena ukazuju na previsoku koncentraciju PSNPs u vodenom okolišu, uzrokujući indukciju ROS-a koji je nadjačao antioksidativni obrambeni sustav. Takvo ponašanje potvrđeno je visokom koncentracijom MDA kao biomarkera oksidativnog stresa, nakon 72h i 96h ekspozicije. Nisu bile prisutne primjetne razlike između hranjene skupine i skupine bez pristupa hrani. Bioakumulacija je iznosila 5%. Potrebna su daljnja istraživanja o učincima nanoplastike na vodenim organizmima kako bi se razumjeli ekološki rizici te procijenili dugoročni utjecaji na bioraznolikost i funkcioniranje ekosustava.

ABSTRACT

Nanoplastics are becoming an increasing global concern, and their harmful effects on marine organisms remain underexplored. This study assessed the effects of polystyrene nanoplastics (1 mg L⁻¹; 54.37 nm PSNPs) on the mussel *Mytilus galloprovincialis* during a 4-day exposure period. The organisms were divided into two groups, one of which was fed microalgae of the species *Dunaliella salina*, while the other had no access to food. Toxicity was assessed using antioxidant enzymes (catalase (CAT), glutathione reductase (GR)), a biotransformation enzyme (glutathione S-transferase (GST)), and oxidative damage (LPO) in the gills. The low activities of CAT, GST, and GR enzymes during the exposure period indicate an excessive concentration of PSNPs in the aquatic environment, causing the induction of ROS, which overwhelmed the antioxidant defense system. This was further confirmed by increased levels of malondialdehyde (MDA), a biomarker of oxidative stress, after 72 and 96 hours. No significant differences were observed between the fed and unfed groups. Bioaccumulation was measured at 5%. Further research is necessary to assess the long-term ecological risks posed by nanoplastics on marine biodiversity and ecosystem functioning.

7. LITERATURA

- Bayne, B. L. (1976) *Marine Mussels: Their Ecology and Physiology*. Cambridge University Press.
- Beyer, J., Green, N. W., Brooks, S., Allan, I. J., Ruus, A., Gomes, T., Bråte, I. L. N., Schøyen, M. (2017) Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: A review. *Marine Environmental Research*, 130:338-365.
- Bhattacharya, P., Lin, S., Turner, J.P., Ke, P.C. (2010) Physical Adsorption of Charged Plastic Nanoparticles Affects Algal Photosynthesis. *The Journal of Physical Chemistry* 114, 16556-1656110.
- Borelle, B. S., *et al.* (2020) Predicted growth in plastic waste exceeds efforts to mitigate plastic pollution. *Science*, 369, 6510.
- Borković, S., S. (2005) The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 141, 366 – 374.
- Bouwmeester, H., Hollman, P. C. H., Ruud, J. B. P. (2015) Potential Health Impact of Environmentally Released Micro- and Nanoplastics in the Human Food Production Chain: Experiences from Nanotoxicology. *Environ Sci Technol.* 49, 15, 8932–8947.
- Bråte, I. L. N., Hurley, R., Iversen, K., Beyer, J., Thomas, K. V., Steindal, C. C., Green, N. W., Olsen, M., Lusher, A. (2018) *Mytilus* spp. As sentinels for monitoring microplastic pollution in Norwegian coastal waters: A qualitative and quantitative study. *Environmental Pollution*, 243.
- Courtene – Jones, W., Quinn, B., Gary, S. F., Mogg, A. O. M., Narayanaswamy, B. E. (2017) Microplastic pollution identified in deep-sea water and ingested by benthic invertebrates in the Rockall Trough, North Atlantic Ocean. *Environ. Pollut.*, 231, 271.
- De Falco *et al.* (2018) Evaluation of microplastic release caused by textile washing processes of synthetic fabrics. *Environ Pollut.* 236, 916-925.
- DeMott, W.R. (1995) The influence of prey hardness on *Daphnia*'s selectivity for large prey. *Hydrobiologia* 307, 127 – 138.
- DeMott, W.R. (1986) The role of taste in food selection by freshwater zooplankton. *Oecologia* 69, 334 – 340.

- Farrell, P., Nelson, K. (2013) Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.), *Environmental Pollution*, 177, 1-3.
- Franco, L., Romero, D., García-Navarro, J. A., Teles, M., Tvarijonaviciute, A. (2016) Esterase activity (EA), total oxidant status (TOS) and total antioxidant capacity (TAC) in gills of *Mytilus galloprovincialis* exposed to pollutants: Analytical validation and effects evaluation by single and mixed heavy metal exposure. *Marine Pollution Bulletin*, 102(1):30-35.
- Free, C. M., Jensen, O. P., Mason, S. A., Eriksen, M., Williamson, N. J., Boldgiv, B. (2014) High-levels of microplastic pollution in a large, remote, mountain lake. *Mar. Pollut. Bull.*, 85
- Gigault, J., ter Halle, A., Baudrimont, M., Pascal, P.-Y., Gauffre, F., Phi, T.-L., El Hadri, H., Grassl, B., Reynaud, S. (2018) Current opinion: What is a nanoplastic? *Environmental Pollution*, 235:1030-1034.
- Goldberg, E.D. (1975) The Mussel Watch: A First Step in Global Marine Monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, 6, 111-114.
- Gonçalves, J. M., Sousa, V. S., Teixeira, M. R., Bebianno, M. J. (2022) Chronic toxicity of polystyrene nanoparticles in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*, 287.
- Jeong, C.B., Won, E.J., Kang, H.M., Lee, M.C., Hwang, D.S., Hwang, U.K., Zhou, B., Souissi, S., Lee, S.J., Lee, J.S. (2016) Microplastic Size-Dependent Toxicity, Oxidative Stress Induction, and p- JNK and p- p38 Activation in the Monogonont Rotifer (*Brachionus koreanus*). *Environ. Sci. Technol.* 50, 8849-8857.
- Kaandorp, M. L. A., Lobelle, D., Kehl, C., Dijkstra, H., A., van Sebille, E. (2023) Global mass of buoyant marine plastics dominated by large long-lived debris. *Nature Geoscience*, 16, 689–694.
- Kelpsiene, E., Torstensson, O., Ekvall, M. T., Hansson, L. A., Cedervall, T. (2020) Long-term exposure to nanoplastics reduces life-time in *Daphnia magna*. *Scientific Reports*, 10: 5979.
- Kershaw, P. J. (2016) Marine plastic debris and microplastics – global lessons and research to inspire action and guide policy change. Nairobi : United Nations Environment Programme
- Kirk, K.L. (1991) In: Kirk, Kevin L. (1991), Inorganic Particles Alter Competition in Grazing Plankton: the Role of Selective Feeding. *Wiley. Stable*, 07: 40.

- Koelman, A., Besseling, E., Shim, W. J. (2015) Nanoplastics in the Aquatic Environment. Critical Review. *Marine Anthropogenic Litter*, 12, 325-340.
- Kolandhasamy, P., Su, L., Li, J., Qu, X., Jabeen, K., Shi, H. (2018) Adherence of microplastics to soft tissue of mussels: A novel way to uptake microplastics beyond ingestion. *Sci Total Environ.* 1;610-611:635-640.
- Ladhar-Chaabouni, R., Hamza-Chaffai, A. (2016) The cell cultures and the use of haemocytes from marine molluscs for ecotoxicology assessment. *Cytotechnology*, 68(5):1669-1685.
- Lagarde, F., Olivier, O., Zanella, M., Daniel, P., Hiard, S., Caruso, A., (2016) Microplastic interactions with freshwater microalgae: Hetero-aggregation and changes in plastic density appear strongly dependent on polymer type. *Environmental Pollution* 215, 331-339.
- Liu, Z., Cai, M., Yu, P., Chen, M., Wu, D., Zhang, M., Zhao, Y., (2018) Age-dependent survival, stress defense, and AMPK in *Daphnia pulex* after short-term exposure to a polystyrene nanoplastic. *Aquatic Toxicology* 204, 1-8.
- Liu, Z., Yu, P., Cai, M., Wu, D., Zhang, M., Huang, Y., Zhao, Y. (2018) Polystyrene nanoplastic exposure induces immobilization, reproduction, and stress defense in the freshwater cladoceran *Daphnia pulex*. *Chemosphere.* 176.
- Long, M., Paulpont, I., Hegaret, H., Moriceau, B., Lambert, C., Huvet, A., Soudant, P. (2017) Interactions between polystyrene microplastics and marine phytoplankton lead to species-specific hetero-aggregation. *Environmental Pollution*, 228, 454-463.
- Lushchak, V.I. (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13-30.
- Lusher, A., Hollman, P., Mendoza, J. (2017) Microplastics in fisheries and aquaculture: Status of knowledge on their occurrence and implications for aquatic organisms and food safety. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 615.
- Merzel, R. L., Purser, L., Soucy, T. L., Olszewski, M., Colón-Bernal, I., Duhaime, M., Elgin, A. K., Banaszak Holl, M. M. (2020) Uptake and retention of nanoplastics in quagga mussels. *Global Challenges*, 4:1800104.
- Rai, P. K., Lee, J., Brown, R. J. C., Kim, K.-H. (2021) Micro- and nano-plastic pollution: Behavior, microbial ecology, and remediation technologies. *Journal of Cleaner Production*, volume 291.

- Regoli F. *et al.* (2002) Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). *Marine Pollution Bulletin* 44, 912–922.
- Regoli, F., Gorbi, S., Frenzilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S., Winston, W. G. (2002) Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Marine Environmental Research*, Volume 54, 419-423.
- Revel, M., Lagarde, F., Perrein-Ettajani, H., Bruneau, M., Akcha, F., Sussarellu, R., Rouxel, J., Costil, K., Decottignies, P., Cognie, B., Chatel, A., Mouneyrac, C. (2019) Tissue-specific biomarker responses in the blue mussel *Mytilus* spp. Exposed to a mixture of microplastics at environmentally relevant concentrations. *Frontiers in Environmental Science* 7 (MAR), 1–14.
- Ribeiro, F., Garcia, A.R., Pereira, B.P., Fonseca, M., Mestre, N.C., Fonseca, T.G., Ilharco, L.M., Bebianno, M.J. (2017) Microplastics effects in *Scrobicularia plana*. *Mar. Pollut. Bull.* 122 (1–2), 379–391.
- Rist, S., Baun, A., Hartmann, N. B. (2017) Ingestion of micro- and nanoplastics in *Daphnia magna* – Quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction. *Environ Pollut.*, 228:398-407.
- Setälä, O., Fleming-Lehtinen, V., Lehtiniemi, M. (2014) Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environmental Pollution*, 185, 77-83.
- Shim, W. J., Hong, S. H., Eo, S. (2018) Chapter 1 – Marine Microplastics: Abundance, Distribution, and Composition, Editor(s): Eddy Y. Zeng, *Microplastic Contamination in Aquatic Environments*, Elsevier, 1-26.
- Snopczyński, T. (2009) Nanotechnology – possibilities and hazards. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* 60(2):101-11.
- Sukhotin, A., Abele, D., Pörtner, H. (2002) Growth, metabolism and lipid peroxidation in *Mytilus edulis*: age and size effects. *Marine Ecology Progress Series*, 226:223-234.
- Ter Halle, A., et al. (2017) Nanoplastic in the North Atlantic Subtropical Gyre. *Environ. Sci. Technol.*, 51, 23, 13689–13697.
- Strand, J., Jacobsen, J. (2005) Accumulation and trophic transfer of organotins in a marine food web from the Danish coastal waters. *The Science of the Total Environment*, 350:10.1016.

- Sun, X., Li, Q., Zhu, M., Liang, J., Zheng, S., Zhao, Y. (2017) Ingestion of microplastics by natural zooplankton groups in the northern South China Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 115, 217-224.
- Viarengo, A., Canesi, L. (1991) Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture*, 94:225-243.
- Waller, C. L., Griffiths, H. J., Waluda, C. M., Thorpe, S. E., Loaiza, I., Moreno, B., Pacherras, C. O., Hughes, K. A. (2017) Microplastics in the Antarctic marine system: An emerging area of research. *Sci. Total Environ.*, 598, 220.
- Wang, S., Zhong, Z., Li, Z., Wang, X., Gu, H., Huang, W., Fang, J. K.-H., Shi, H., Hu, M., Wang, Y. (2021) Physiological effects of plastic particles on mussels are mediated by food presence. *Journal of Hazardous Materials*, 404(Part A):124136.
- Wang, X., Huang, W., Wei, S., Shang, Y., Gu, H., Wu, F., Lan, Z., Hu, M., Shi, H., Y., (2020) Microplastics impair digestive performance but show little effects on antioxidant activity in mussels under low pH conditions. *Environ. Pollut.* 258, 113691.
- Ward, J.E., Kach, D.J. (2009) Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Marine Environmental Research* 68, 137-142.
- Ward, J. E., Shumway, S. E. (2004) Separating the grain from the chaff: Particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 300(1):83-130.
- Wilcox, C., Van Sebille, E., Hardesty, B. D. (2015) Threat of plastic pollution to seabirds is global, pervasive, and increasing. *Proc Natl Acad Sci.*, 112(38):11899-904.
- Xia, T., et al. (2008) Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties. *ACS Nano*. 2(10):2121-2134.
- Zaki, M. R. M., Aris, A. Z. (2022) An overview of the effects of nanoplastics on marine organisms. *Sci Total Environ.* 20;831:154757.