

SINTEZA I UTJECAJ NANOČESTICA SREBRA NA JAJNE STANICE MORSKOG JEŽINCA ARBACIA LIXULA

Peruško, Nensi

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:137:028458>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

Nensi Peruško

**SINTEZA I UTJECAJ NANOČESTICA SREBRA NA JAJNE STANICE MORSKOG
JEŽINCA *ARBACIA LIXULA***

Završni rad

Pula, 2017.

SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

Nensi Peruško

**SINTEZA I UTJECAJ NANOČESTICA SREBRA NA JAJNE STANICE MORSKOG
JEŽINCA *ARBACIA LIXULA***

Završni rad

JMBAG : 0303053711

Status : redovna studentica

Kolegij: Nanotehnologija u istraživanju mora

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

Komentorica: Petra Burić mag. ing. mol. biotechnol.

Pula, 2017.

IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI (završni rad)

Ja, dolje potpisana Nensi Peruško, 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: Nensi Peruško

U Puli, 08. rujna, 2017. godine

IZAJAVA
o korištenju autorskog djela
(završni rad)

Ja, Nensi Peruško dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom Sinteza i utjecaj nanočestica srebra na jajne stanice morskog ježinca *Arbacia lixula* 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, 08. rujna 2017.

Potpis

Ovaj rad, izrađen u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju pod vodstvom izv. 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 izv. prof. dr. sc. Daniela Marka Lyonsa i za komentoricu mag. ing. Petru Burić.

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

Komentorica: mag. ing. mol. biotechnol. Petra Burić

Povjerenstvo za ocjenjivanje i obranu:

Predsjednik: dr. sc. Mauro Štifanić

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

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

Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj

Članica: dr. sc. Ljiljana Iveša

Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj

Datum i mjesto obrane završnog rada: 08. rujna 2017.; Sveučilište Jurja Dobrile u Puli.

Rad je rezultat samostalnog istraživačkog rada.

Zahvala

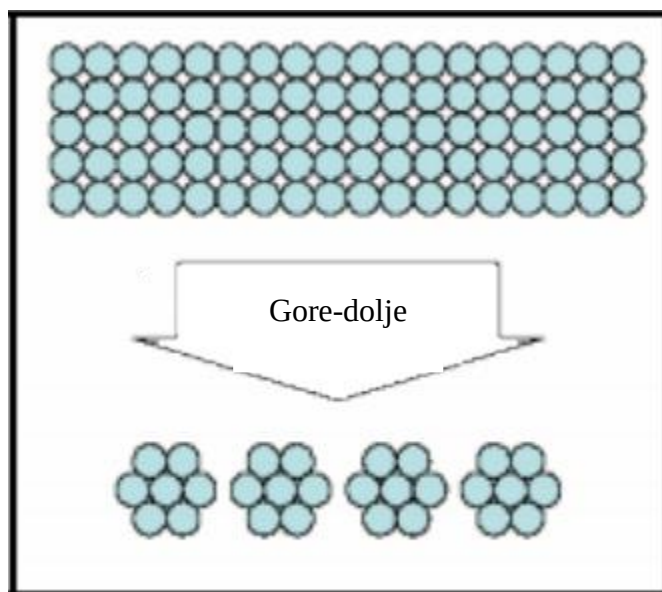
Prvenstveno se zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Danielu Mark Lyonsu na usmjeravanju i podršci u mojoj zadaći pisanja završnog rada. Isto tako, izražavam veliku zahvalnost komentorici mag. ing. mol. biotechnol. Petri Burić na savjetima i strpljenju te vodstvu pri izvršavanju praktičnog djela završnog rada. Hvala na sudjelovanju članovima komisije dr. sc. Ljiljani Iveši i dr. sc. Mauru Štifaniću. Također bih zahvalila svojim kolegicama i kolegama na podršci i svakoj pomoći pri radu. Na kraju zahvaljujem svojim roditeljima i obitelji koji su bili velika podrška kroz moje obrazovanje.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Nanočestice	3
1.2. Ponašanje nanočestica u okolišu	11
1.3. Karakterizacija nanočestica	14
1.4. Utjecaj na vodene organizme	22
2. Cilj istraživanja.....	28
3. Materijali i metode	29
3.1. Kemikalije	29
3.2. Sinteza nanočestica srebra	30
3.3. Karakterizacija AgNP u ultračistoj vodi pomoću UV_Vis spektroskopije	30
3.4. Predtretman jajnih stanica i eksperiment embrionalnog razvoja morskog ježinca	30
4. Rezultati.....	36
5. Diskusija	39
6. Zaključak	43
7. Literatura	44

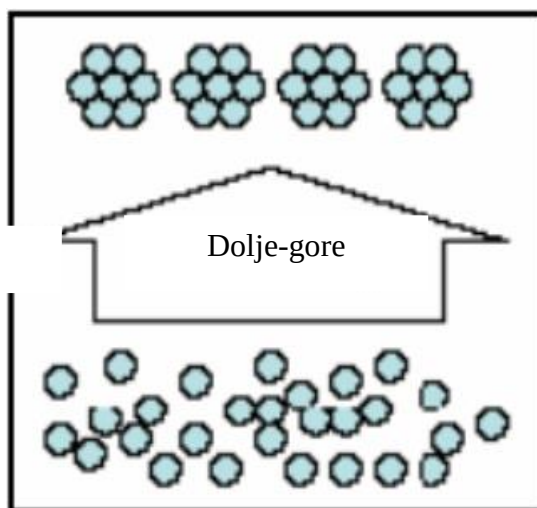
1. Uvod

Područje nanotehnologije ubrzano se mijenja, te bi u skoroj budućnosti moglo imati vrlo intenzivan učinak na svaki sektor društva. Iako je nanotehnologija moderna multidisciplinarna znanost, prirodne nanočestice te njihove interakcije s ostalim česticama postoje od davnina. Umjetno stvorene nanočestice uz pomoć svojih specifičnih svojstava pronašle su široku primjenu u području elektronike, biomedicine, agrikulture, tekstilne industrije, kemijske industrije, u farmaciji, proizvodnji hrane te u proizvodima za osobnu higijenu i kozmetici. Kako upotreba nanočestica u raznim područjima čovjekova djelovanja raste, povećava se i mogućnost ulaska nanočestica u vodene okoliše. Namjerno ili slučajno dospijevanje nanočestica u vodeni okoliš, bilo to rijeke, jezera ili mora, predstavlja rizik za odgovarajuće ekološke niše. Zbog sve češćeg izlaganja organizama česticama nano dimenzija povećava se potreba za ispitivanjem njihova štetnog učinka na žive organizme. Isto tako, za istraživače jedan od većih izazova prilikom ispitivanja ponašanja nanočestica u morskom okolišu predstavljaju mogućnost transformacije, interakcije i definiranje njihovog djelovanja u području visokog saliniteta te interakcije s organizmima (Burić i sur., 2015). Danas su proizvodi koji sadrže srebrne nanočestice (Ag-NP) u porastu, kao i njihova globalna difuzija u industrijske procese i tretmane. Srebrne nanočestice posjeduju antimikrobna svojstva te magnetska, optička, elektronska i katalitička svojstva, koje ih čine pogodnima za primjenu u širokom rasponu područja (Gambardella i sur., 2015). Sinteza nanočestica može se podijeliti na dva glavna mehanizma: od gore prema dolje (engl. *top-down*) (Slika 1) i od dolje prema gore (engl. *bottom-up*) (Slika 2). *Top – down* pristup funkcionira na principu stvaranja manjih struktura kao što su to nanostrukture iz njihovih većih preteča. Najčešće metode kod ovog pristupa su rezanje, drobljenje i graviranje. Ovim pristupom nastaju strukture u rasponu veličina između 10 i 100 nm.



Slika 1. Pristup od gore prema dolje; sinteza manjih čestica iz većih preteča (Landage i sur., 2014).

„Bottom–up“ pristup suprotan je „Top–down“ pristupu. Tu se određena struktura sastavlja atom po atom, molekula po molekula ili pak klaster po klaster. Ovim pristupom omogućena je veća preciznost stvaranja čestice, homogenost kemijskog sastava čestice i stvaranje struktura s manje mana.



Slika 2. Pristup od dolje prema gore; sinteza manjih čestica atom po atom, molekula po molekula ili klaster po klaster (Landage i sur., 2014).

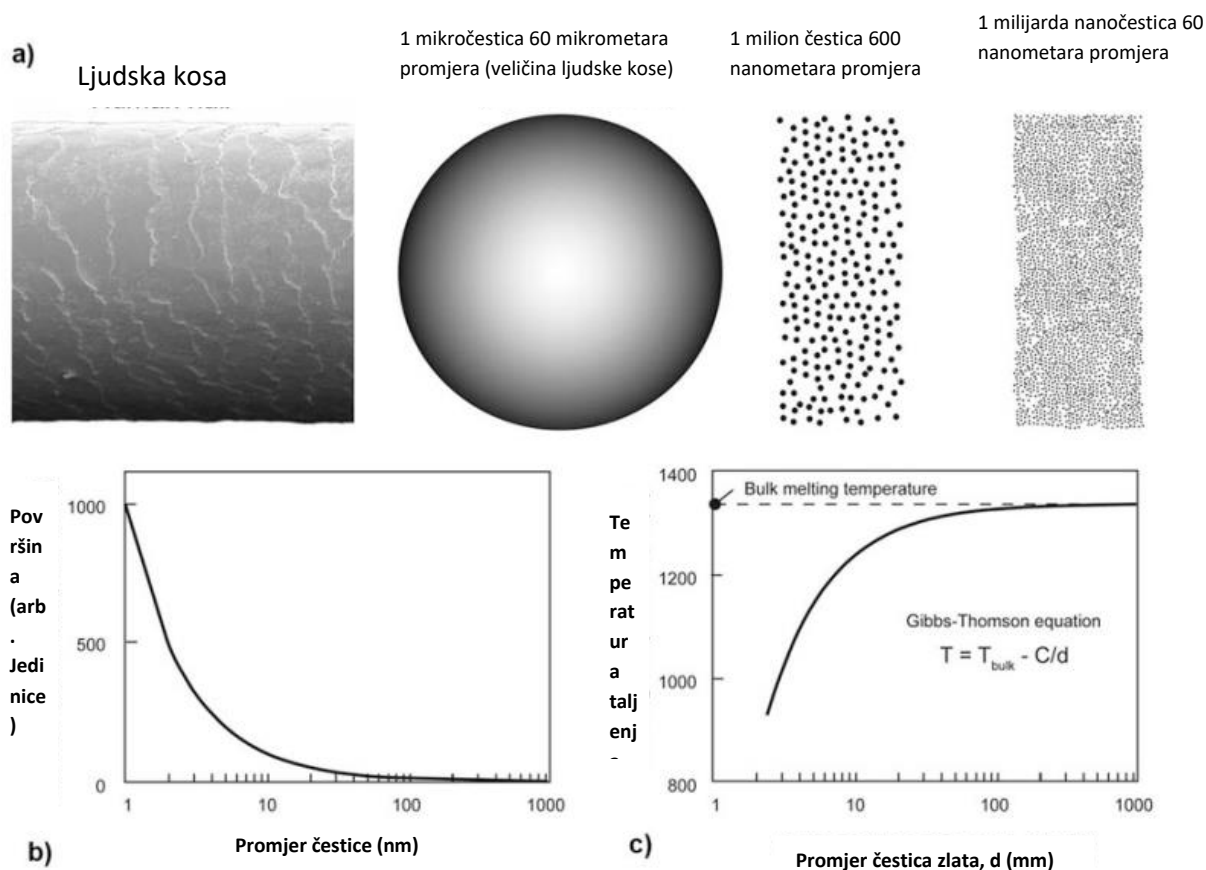
1.1. Nanočestice

Razvojem modernih znanosti, potreba za objektima minijturnih dimenzija ne jenjava. Tu nastupa nanoznanost, znanost o stvaranju i manipulaciji raznih materijala na razini atoma, molekula i makromolekula gdje se javljaju drugačija svojstva u usporedbi s materijalima većih dimenzija. Kako bi se nanoznanost implementirala u stvarnu proizvodnju javila se potreba za nanotehnologijom tj. dizajnom, karakterizacijom, proizvodnjom i upotrebom uređaja i sistema čije veličine i oblik ne prelaze granicu nano skale. Zatim dolazi se do definicije najvažnijeg elementa ove priče, nanočestica. Pod pojmom nanočestica podrazumijevaju se čestice koje imaju jednu ili više dimenzija u nano skali (SCENIHR, 2006).

Skupinu nanočestica općenito se može podijeliti u četiri glavne skupine. Fulereni su jedna od prirodnih formi ugljika koja je otkrivena 1980-ih godina. To su strukture koje se sastoje isključivo od atoma ugljika te zauzimaju oblik šuplje kugle ili cijevi. Strukturno su vrlo slični grafitu. U prirodi mala količina fulerena nastaje tijekom požara, a prvi puta su uočeni u čađi kao posljedica laserskog otapanja grafita. Ugljikove nanocijevi najčešći su proizvod u skupini nanocijevi. One čine specifični oblik fulerena. Strukturno su slične C_{60} , ali imaju izduženi oblik promjera 1–2 nm. Imaju veliki omjer površine i volumena, s dužinom ponekad i većom od 1 mm. Ugljikove nanocijevi jako su rastezljive i smatra se da su do sto puta čvršće od čelika iako čine samo jednu šestinu njegove težine. To ih čini najjačim i najmanjim poznatim vlaknima. Ugljik nije jedini element od kojega se proizvode nanocijevi, već se koriste i elementi kao što su silicij i germanij. Nanožice su male nanočestice, vodiči ili poluvodiči. Imaju monokristalnu strukturu promjera od nekoliko desetaka nm te veliki omjer površine naspram volumena. Za njihovu proizvodnju koriste se kobalt, zlato, bakar i silicij. Kvantne točke se sastoje od kombinacije elemenata druge i četvrte skupine ili treće i pete skupine periodnog sustava elemenata. Do sada su proizvedeni kao poluvodiči, izolatori, metali, magneti i metalni oksidi. Broj atoma može varirati od 1000 do 100 000. Svojom veličinom manjom od Bohrova polumjera kvantne točke ispoljavaju specifična optička i elektronska svojstva. Ove čestice mogu apsorbirati bijelo i ultraljubičasto svjetlo i emitirati svjetlo specifične valne duljine nekoliko sekundi nakon apsorpcije. Ovisno o veličini i sastavu kvante točke mogu emitirati svjetlo od plave boje pa skoro do infracrvenog svjetla.

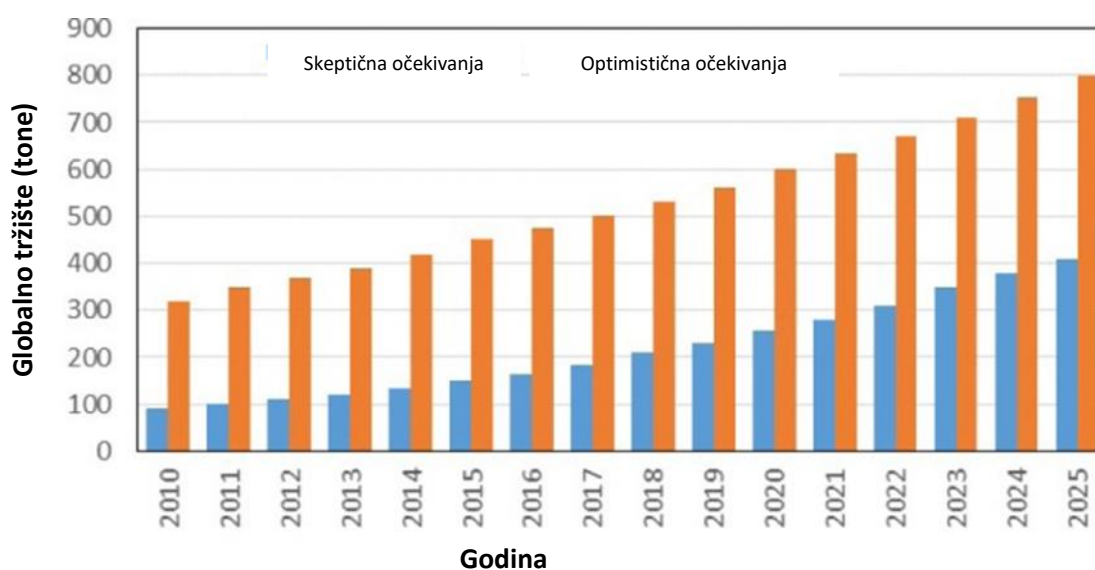
Nanočestice su sklone reakcijama s drugim nanočesticama ili nekim organskim tvarima, zagađivačima. Kako bi se spriječila njihova agregacija, nerijetko nanočestice posjeduju različite funkcionalne skupine ili sufraktante na površini. Posljedično, nanočesticu možemo podijeliti na tri sloja. Površinski sloj nanočestice mogu sačinjavati metalni ioni, proteini, ugljikohidrati (Christian i sur., 2008). Površinski sloj ima ključnu ulogu u ponašanju nanočestica u okolišu. Sufraktanti mogu promijeniti osobine čestice, kao što su magnetska, električna, optička svojstva te njihovu kemijsku aktivnost. Na taj način površinski sloj može izazvati citotoksični učinak, ali može i reducirati negativni učinak nanočestica. U vodenom okolišu nanočestice pribjegavaju agregaciji, posebno u morskom okolišu visokog saliniteta. Površinske tvari kao što su citrat, polivinilpirolidon (PVP), oleati, dodecilamin mijenjaju naboj čestice te sprječavaju njihovu agregaciju. Omotač je spoj koji se kemijskim sastavom razlikuje od jezgre čestice. Najbolji primjer čestice koja posjeduje jezgru i omotač jesu kvantne točke čiju jezgru čini jedan materijal, npr. CdSe, a ljusku drugi, npr. ZnS. Jezgra čini središnji dio nanočestice i ona je ishodišna nanočestica. Sastav jezgre i njezina svojstva te omotač određuju fizikalna i kemijska svojstva te toksičnost nanočestice. Jezgra nužno ne dominira u kontroli ponašanja nanočestice u okolišu i njezinog transporta (Christian i sur., 2008).

Površinska svojstva i kvantni efekt dva su temeljna faktora koja ukazuju na razliku u ponašanju između nanočestica i sirovog materijala. Ti faktori uzrokuju promjenu kemijske reaktivnosti čestica te promjenu njihovih mehaničkih, optičkih, električnih i magnetskih svojstava. Naime površinska frakcija atoma u nanočestici veća je nego kod mikročestica ili sirovog materijala. U usporedbi s mikročesticama, nanočestice imaju izrazito veliku površinu i veliki broj atoma po jedinici mase. Na primjer, čestica promjera 60 nm za razliku od čestice promjera 60 μm ima omjer površine i volumena ili površine i mase i do 1000 puta veći. Povećanjem površine stupanjem u nano-skalu posljedično dolazi do povećanja površinske kemijske reaktivnosti. Atomi smješteni na površini, za razliku od atoma u sirovom materijalu imaju manje susjednih atoma. Kao rezultat, smanjenjem veličine čestice dolazi do redukcije energije vezanja po atomu. Iz toga slijedi i redukcija točke otapanja čestica nano dimenzija. Na primjer, temperatura taljenja zlata promjera 3 nm je manja od taljenja sirovog zlata za više od 300 °C (Slika 3).



Slika 3. (a) Shematski prikaz mikročestice promjera 60 μm , što odgovara veličini ljudske vlasi prikazano s lijeve strane slike i broj nanočestica promjera 600 i 60 nm koji imaju istu masu kao i mikročestica promjera 60 μm . (b) Ovisnost omjera površine i mase o promjeru čestice. (c) Temperatura taljenja zlata u funkciji promjera slijedeći Gibbs – Thomson- ovu jednadžbu; temperatura taljenja sirovog zlata iznosi 1336 K (Buzea i sur., 2007).

Razvojem novih tehnologija i potreba današnjeg društva, korištenje nanočestica u naglom je porastu (Graf 1). Nanočestice omogućuju direktan pristup u dotad nedostupna područja kao što je to dostava lijekova tumorskim stanicama te primjenu u dijagnostici. Osim toga, nanočestice omogućuju redukciju dimenzija proizvoda i njegovih dijelova koje svakodnevno koristimo i na taj način ubrzavaju njihovu evoluciju i povećavaju njihovu kvalitetu te dostupnost široj masi, (npr. mobiteli, kompjutori, televizori, automobili, i sl.) (Tablica 1 i 2).



Graf 1. Udio nanoproizvoda na globalnom tržištu u tonama od 2010 do 2025., skeptična i optimistična predviđanja (Pulit – Prociak i Banach, 2016).

Tablica 1. Upotreba nanočestica po sektorima djelatnosti (Ostiguy i sur., 2010).

Elektronika i komunikacije	Razvoj minijaturnih procesora, jako oštih i svijetlih ravnih ekrana, dostupnost novih polimera i novih nanostrukturiranih kompozita dopušta razvoj fleksibilnih elektronskih komponenti
Kemijska industrija i industrija materijala	Razvoj keramike, pigmenata, praškova, učinkovitijih višenamjenskih katalizatora ili proizvodnja lakših i jačih žica, tvari koje sprečavaju koroziju, samočišćeće boje...
Zdravlje i lijekovi, biomedicina, biotehnologija i kozmetička industrija	Razvoj novih pristupa za postavljanje preciznije dijagnoze, preciznije i učinkovitije terapije, mini senzori, linije kozmetike protiv starenja, antibakterijske kreme...
Agrikultura	Razvoj metoda otapanja prema potrebi, bolja apsorpcija pesticida i fertilizatora, detekcija patogena u životinjama i biljkama
Energija	Poboljšana izvedba proizvodnih sustava i poboljšanje očuvanja energije, pohrana vodika, stvaranje nove generacije fotonaponskih ćelija, baterije, optimizacija učinkovitosti energije vjetra, pametni prozori, termalne prepreke...
Sektor proizvodnje	Dizajn razne opreme za proizvodnju NPs, precizno projektiranje za proizvodnju novih generacija mjernih instrumenata...

Okoliš i ekologija	Senzori koji imaju mogućnost praćenja u realnome vremenu više supstanci, smanjenje zagađenja, smanjenje emisije CO ₂ plinova, proizvodnja ultračiste vode..
Sigurnost proizvoda i same proizvodnje	Senzori koji prate u realnome vremenu kontrola na atomskom nivou.
Obrana	Proizvodnja eksplozivnijih dinamita, samopopravljajućih tekstila.
Gume i plastike	Pojačanje izvedbe pneumatskih guma, smanjenje njihove težine, produljenje njihovog ciklusa upotrebe...
Metalurgija	Poboljšanje svojstava metala, redukcija upotrebe lubrikanata, bolja otpornost na koroziju...
Automobilski, aeronautički i prostorni transport	Povećanje izvedbe motora, mehanička i termalna otpornost materijala i energetskog učinka, poboljšana sigurnost i udobnost korisnika, smanjena korozija i zagađenje, lakši dijelovi zrakoplova, manji troškovi..

Tablica 2. Prikaz pojedinih nanočestica i njihovih karakterističnih svojstava zbog kojih su prigodne za upotrebu u specifičnim područjima proizvodnje (Ostiguy i sur., 2010).

TIP NANOČESTICA	NOVA SVOJSTVA	UPOTREBA
C ₆₀ fulereni	Visok elektronski afinitet	Poboljšana magnetska svojstva, katalizator, piroliza, lubrikanti, solarne ćelije, elektrolitske membrane, pohrana kisika i metana, vektori prijenosa lijekova
TiO ₂	Anti-UV optička svojstva i transparentnost na vidljivoj svjetlosti, fotokatalitički učinak	Solarne ćelije, anti-UV kreme za sunce, anti-UV boja, okolišna obrada, prozirna obrada drvenih površina, samočišćeći materijali
Kvantne točke	Prilagodljiva kalorimetrijska i elektronska svojstva	Nanoelektronika i kvantni kompjuteri, medicinske terapije, solarne ćelije, katalizatori
NTC i anorganske nanocijevi	Dobri električni vodiči Veća mehanička čvrstoća	Nanoelektronika i kvantni kompjuteri, ultra jaki materijali, spremište vodika, biosenzori, kemijski senzori, visoki kapacitet pohrane, ojačani polimerni kompoziti, super jaki kablovi, tekstil, jako lagani dijelovi za zrak.

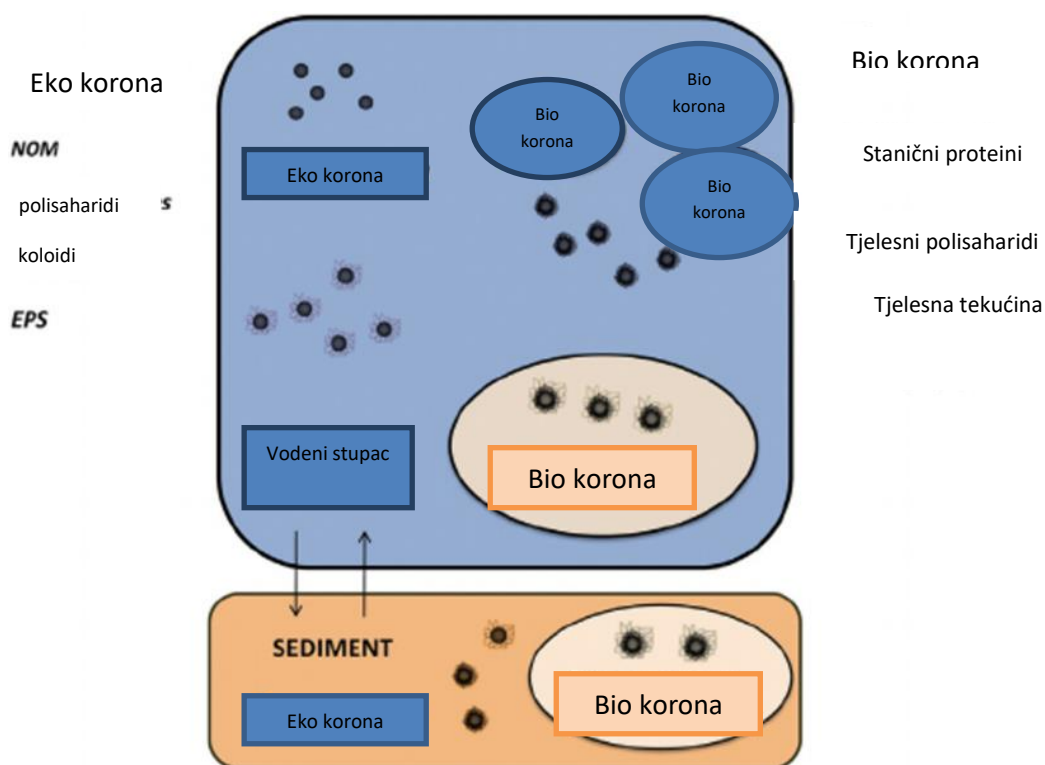
Polimeri/stakla	Minimalizatori kemijskih reakcija	Lab-on-chip
Liposomi	Biorazgradive komponente	Lijekovi, veterinarska upotreba
Nanokapsule	Šuplje ljuske	Medicinske upotrebe, ciljano dostavljanje lijeka
Fotonski materijali	Podesiva transmisija svjetla	Telekomunikacije, optički kompjuteri
Nanomagnetni materijali	Poboljšana magnetska svojstva	Pohranjivanje podataka
Metalni oksidi (Zn, Fe, Ce, Zr)	Velike površine, optička svojstva	Keramike, premazi za sprečavanje ogrebotina na lećama, kozmetička upotreba, kreme za sunce
Nanogлина	Katalizacija, čvrstoća, tvrdoća, otpornost na toplinu i otpornost na vatru	Pročišćavanje ulja, usporivači gorenja, aditivi za gume
Karbonsko crnilo	Velika površina	Guma i tinta
SiO ₄ dim	Reološka svojstva	Specijalni betoni (dugotrajni, čvrsti, samolivelirajući...)
Dendrimeri	Hidrofilni/hidrofobni	Uporaba u području medicine i biomedicine

1.2. Ponašanje nanočestica u okolišu

U novije vrijeme nanomaterijali se sve više koriste u raznim industrijama i komercijalnim proizvodima od tehnologije do medicine. Sa sve češćom upotrebom proizvoda koji sadrže nanočestice nakon njihova korištenja i degradacije nerijetko dolazi do otpuštanja nanočestica u okoliš. Nanomaterijali mogu dospjeti u more na indirektan i direktan način. Indirektno, gomilanjem raznih proizvoda na otpadu, nanočestice dolaze u kontakt s tlom, zemljom i kopnenim vodama, rijekama, jezerima, podzemnim vodama te na kraju dospijevaju u morska prostranstva. U morskom okolišu prisutstvo nanočestica može dovesti do negativnog učinka po morske organizme no na kraju i neželjenog učinka kod ljudi koji konzumiraju takve organizme ili borave u vodama obogaćenim nanočesticama te one dospijevaju u njihovo organizam direktnim putem (Slika 5) (Corsi i sur., 2014).

Tri su glavna izvora nanočestica koje dospijevaju u morski okoliš, a to su kozmetički proizvodi kao kreme za sunčanje, otpad i boje te ostali pripravci koji se koriste kao zaštita brodova i drugih objekata koji imaju doticaj s morskom vodom za zaštitu od obraštaja (Matranga i sur., 2012). Vodeni organizmi podložni su utjecaju zagađivala u okolišu zbog njihova respiratornog epitela koji je velik i krt. (Hyseni i sur., 2016). Disperzijska stabilnost nanočestica glavni je čimbenik koji određuje koliko će vremena određena čestica ostati u vodenom stupcu. Njihova disperzija ovisi o puno faktora kao što su otapanje i interakcija s okolnom sredinom. U vodenom stupcu ulogu u ponašanju čestica imaju hidrodinamički tokovi i Brown-ovo kretanje. Oni uzrokuju koloidno prenošenje čestica kroz vodeni stupac no njemu se suprotstavlja gravitacijska sila koja uzrokuje sedimentaciju materijala. Osim sile gravitacije kod sedimentacije važne su i veličina i gustoća nanočestica. U vodenom mediju nanočestice mogu tvoriti homogene ili heterogene agregate pa se kod veličine koja utječe na sedimentaciju može uzeti u obzir i veličina agregata. Efikasnost stvaranja agregata posljedica je stvaranja ravnoteže odbojnih i privlačnih sila između čestica. Takav odnos između čestica otkriva kako glavnu ulogu u održavanju stabilnosti elektrostatske disperzije čestica, izričito kod onih čestica koje su lišene steričke zaštite od agregacije, ima površinski naboj čestica koji strogo ovisi o pH i salinitetu okolnog medija. Gole nanočestice pokazuju manju disperzijsku stabilnost u vodi dok nanočestice koje su stabilizirane dodatkom funkcionalnih grupa pokazuju

stabilnost u okolišu većeg saliniteta nego li je on u morskoj vodi. U morskoj vodi osim živih organizama, prisutni su i produkti njihova metabolizma te ostale organske i anorganske tvari. Kao uzrok visoke razine površinske energije nanočestica često dolazi do interakcije između nanočestica i prirodno prisutnih koloida, tj. dolazi do heteroagregacije (Corsi i sur., 2014). Disperzija, agregacija i aglomeracija nanočestica u vodenom mediju ne ovise samo o površinskom naboju čestice i njezinoj veličini već i o uvjetima u okolišu kao što su to pH, salinitet i prisutnost organske tvari (primjerice humične i fulvinske kiseline). Pojava hetero- i homoagregacije ovisna je o površinskom naboju čestice i njezinom kemijskom sastavu, prisutnosti anorganskih iona, organske tvari kao što su polisaharidi, proteini i koloidi. Interakcijom koloida s različitim česticama povećava se učestalost agregacije. Primjerice, koloidni polimeri koje proizvode alge mogu potaknuti agregaciju i transformaciju nanočestica u vodenom okolišu. To postižu zbog hidrofobnih i elektrostatskih interakcija između nanočestice i polimera. Isto tako na ponašanje nanočestica u vodenom stupcu utječe i stvaranje bio-corone ili eko-corone (Slika 4) (Canesi i Corsi., 2016).

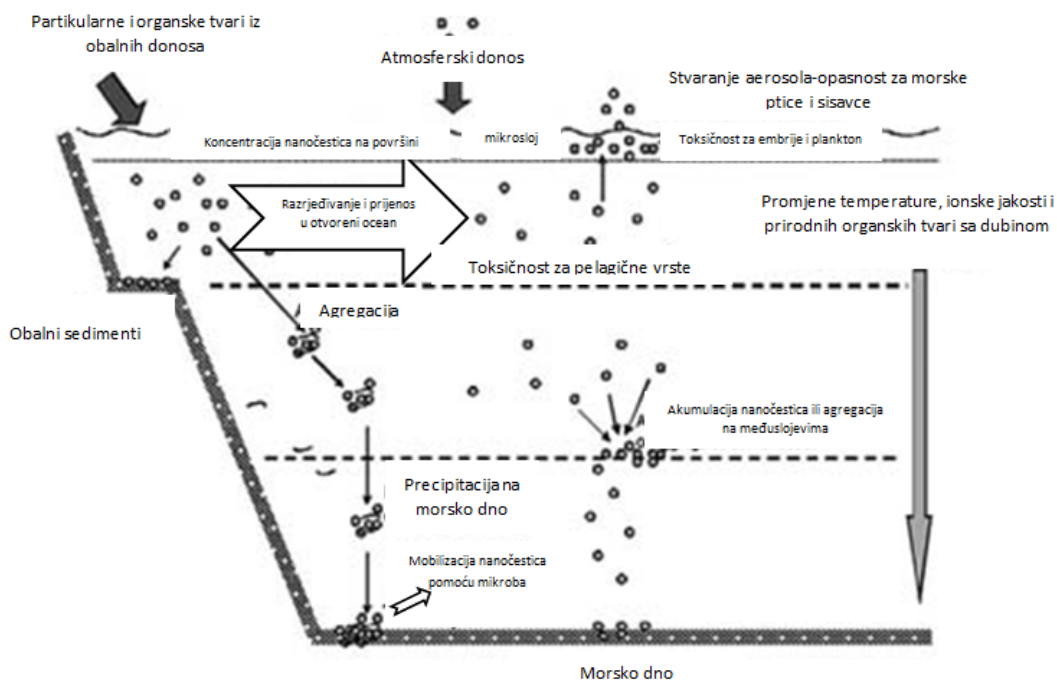


Slika 4. Shematski prikaz mogućih interakcija nanočestica s različitim prirodnim organskim spojevima u okolišu (lijevo) ili unutar organizma (desno) koje dovode do

stvaranja eko –korone ili bio – korone nanočestica u vodenom stupcu i sedimentu (Canesi i Corsi., 2016).

Obalna područja i estuariji su područja u kojima se stabilni koloidi doneseni kopnenim vodama susreću s morskom vodom. Takvi spojevi podvrgnuti su velikim promjenama saliniteta što može uzrokovati njihovu aglomeraciju i sedimentaciju. Takvo ponašanje dovodi do stvaranja muljevitih područja gdje se spojevi nanočestica i drugih zagađivala sa organskim koloidima akumuliraju i pohranjuju u sedimentu ili ostaju stabilni u vodenom stupcu. Konačnu sudbinu nanočestica u morskom okolišu definiraju veličina stvorenih agregata i gustoća čestica. Stvoreni spojevi veličine manje od 1 μm ostaju u aktivnom transportu kroz vodeni stupac te ostaju dostupni pelagičkim organizmima. Stvaranje većih spojeva i njihova sedimentacija postaju prijetnja bentosu (Corsi i sur., 2014). Uz sedimentaciju stvorenih agregata nanočestice se mogu akumulirati u zoni termokline. Ta pojava karakteristična je za morske ekosustave. Još jedan mogući put kruženja nanočestica je njihovo recikliranje od strane biote. Taj proces predstavlja novu dozu opasnosti za organizme koji se hrane u prijelaznim zonama kao što je tuna. Isto tako nanočestice mogu biti zarobljene u površinskom mikro sloju. Nanočestice se tamo zadržavaju zbog jake površinske napetosti i viskoznosti. Prisutnost nanočestica na površini izravna je opasnost morskim sisavcima i pticama. Za ptice opasnost može biti i stvaranje aerosola (Hyseni i sur., 2016).

Organizmi koji žive u vodi obogaćenoj nanočesticama unijeti će prisutne nanočestice u svoj organizam. Unos čestica većinom se vrši kroz usni otvor od kuda se čestice prenose dalje u tijelu. Kada se jednom nađu u unutrašnjosti tijela nanočestice mogu prodrijeti u stanice difuzijom kroz staničnu membranu, endocitozom ili adhezijom (Klaine i sur., 2008).



Slika 5. Izvori nanočestica, njihovo ponašanje i mogući putovi unosa u organizme u morskom okolišu (Klaine i sur., 2008).

1.3. Karakterizacija nanočestica

U novije vrijeme napredak nanotehnologije uzrokuje njeno prodiranje u sve veći broj raznovrsnih industrija povećava potrebu za novim saznanjima o karakteristikama nanočestica. Tim više što je veliki broj proizvoda namijenjen izravnom korištenju potrošača kao što su to proizvodi osobne higijene i kozmetike. Na nano-skali materijali istog sastava mogu imati različita svojstva te nova, dodatna svojstva za razliku od svojstava istog materijala u krutom stanju. Neka svojstva nanomaterijala mogu se predvidjeti na temelju svojstava krutoga stanja dok se druga ne mogu. Upravo zbog toga, vrlo je važno razumjeti njihove karakteristike i interakciju s okolišem. Iz toga razloga važno je eksperimentalno odrediti kemijska i fizikalna svojstva nanomaterijala koristeći se odgovarajućim metodama. Kod čestica mogu se mjeriti tri različita tipa veličine. To su primarna veličina čestice, hidrodinamička i aerodinamička veličina. Postoje različite metode za određivanje svojstva kao što je na primjer veličina nanočestice, no moguće je da različite metode daju različite rezultate jer ne mjere istu veličinu. Jedna metoda može mjeriti hidrodinamičku

veličinu dok druga mjeri aerodinamičku veličinu. Ova činjenica vrlo je važna prilikom uspoređivanja rezultata u različitim radovima. Metode karakterizacije nanočestica, čija dimenzija varira između 1 i 100 nm, moraju biti osjetljive na čestice veličine 0,1 nm. Isto tako važno je uzeti u obzir i promjenu fizikalno-kemijskih svojstava nanočestica ovisno o tome jesu li one u suhom stanju, tekućem ili u obliku aerosola. Sposobnost agregacije, površinski naboj i druga svojstva mogu se mijenjati promjenom medija. Umjetno proizvedeni nanomaterijali kao što su TiO_2 , CeO_2 , ZnO , Ag te ugljična nanovlakna smatraju se nanomaterijalima u regulatornom i pravnom smislu, ali prema drugim stručnjacima neće biti svrstani u nanomaterijale. Čak nakon optimalne disperzije plinovitih proizvoda kao što su *fumed silica*, *alumina* (engl.), samo mali dio tog proizvoda ostane u nano skali a ostatak se smatra nanostrukturiranim materijalom. Takvi nanostrukturirani materijali imaju vanjsku dimenziju i do mikrometra ili ukoliko se radi o suhom stanju i do nekoliko milimetara (Bhatia, 2016).

Spektroskopija

Grana fizike koja proučava efekte vezane uz emisiju i apsorpciju elektromagnetskog zračenja naziva se spektroskopija. Pod spektroskopijom se podrazumijeva korištenje apsorpcije, emisije ili raspršenja elektromagnetskog zračenja ispitujuće tvari kako bi se ispitala njena kvalitativna i kvantitativna svojstva ili neki prisutni fizički proces. Ispitivane tvari mogu biti atomi, molekule, atomski ili molekularni ioni te one mogu biti u tekućem ili krutom stanju. Posljedica interakcije radijacije i ispitujuće tvari može biti preusmjeravanje zračenja ili prijenos između energetske nivoa atoma ili molekula. Tako nastali emisijski (apsorpcijski) spektri karakteristični su za određenu tvar (Bhatia, 2016).

Dinamično raspršenje svjetlosti (DLS)

Dinamičko raspršenje svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS) poznato je još i kao spektroskopija fotonske korelacije ili kvazi-elastično raspršenje svjetlosti. To je jedna od najpopularnijih tehnika raspršivanja svjetlosti jer omogućuje određivanje veličine čestica čiji promjer ne prelazi nekoliko nm. Najčešće se ova metoda primjenjuje na emulzijama, micelama, polimerima, proteinima, nanočesticama ili koloidima. Osnovno načelo djelovanja ove metode jest: uzorak se

osvjetljuje laserskom zrakom, a promjene raspršenosti svjetlosti otkrivene su pod poznatim kutom raspršivanja θ brzim detektorom fotona.

Jednostavni DLS instrumenti koji mjere pod fiksnim kutom mogu odrediti srednju veličinu čestica u ograničenom rasponu veličina, dok višekanalni instrumenti mogu odrediti punu distribuciju veličine čestica. DLS se temelji na ekstrakciji spektralnih informacija izvedenih iz vremenski ovisnih fluktuacija svjetlosti raspršene iz prostorno ograničenog volumena unutar uzorka. Kada je suspenzija čestica pogođena monokromatskim koherentnim snopom svjetlosti, generirani raspršeni svjetlosni valovi šire se u svim smjerovima. Interferencija raspršenih valova u dalekometnom području stvara neto raspršeni intenzitet svjetla. Zbog slučajnog kretanja suspendiranih čestica unutar uzorka interferencija može biti stohastički konstruktivna ili destruktivna, što rezultira stohastičkim signalom intenziteta svjetla. Suspendirane čestice koloidne disperzije tijekom istraživanja pribjegavaju Brown-ovom kretanju. Ovo kretanje rezultira fluktuacijama udaljenosti između čestica i time fluktuacijama faznih odnosa raspršenog svjetla. Isto tako, broj čestica unutar volumena raspršivanja može s vremenom varirati. Korištenjem Stokes-Einsteinove jednadžbe može se dobiti hidrodinamički radijus kao $R = kT/6\pi\eta D$. Promjer koji se dobiva pomoću DLS-a je ustvari vrijednost koja opisuje raspršenje čestice u tekućini i zato se taj promjer naziva hidrodinamički promjer. Dobiveni promjer je promjer kugle koja ima isti koeficijent disperzije kao i sama čestica. Ova metoda nije pogodna za uzorke kod kojih je prisutna više modalna distribucija veličina čestica (Ansell i Rauscher, 2011). Anandalakshmi i sur. (2015) koristili su ovu metodu za određivanje distribucije veličine sintetiziranih nanočestica srebra. Dobivena distribucija veličine iznosi 10-150 nm.

Laser Doppler Electrophoresis

Ova metoda koristi se za mjerenje zeta potencijala tj. mjera za jačinu površinskog naboja čestica. Uz pomoć Dopplerovog efekta mjeri se kretanje nabijenih čestica kroz električno polje. Dolazi do promjene frekvencije svjetlosti raspršene sa čestica koje se kreću u električnom polju. Nakon toga izračunava se zeta potencijal. Mjerenje zeta potencijala jako je osjetljivo jer je zeta potencijal osjetljiv i na najmanje promjene okolišnih uvjeta te kontakt između dvaju uzastopnih

ispitivanih uzoraka može značiti promjenu zeta vrijednost. Doostmohammadi i sur. (2011) koristili su ovu metodu kako bi izmjerili zeta potencijal nanočestica bioaktivnog stakla koji iznosi -16.18 ± 1.8 mV pri pH 7.4 (Ansell i Rauscher, 2011).

UV / Vis spektroskopija

Ova metoda spektroskopije koristi se za kvantitativno određivanje prijelaznih metala i organskih komponenti u otopini. Ispitivana otopina može biti obojena, odnosno apsorbirati vidljivi dio spektra jer elektroni d orbitala mogu biti pobuđeni iz jednog stanja u drugo. Pomoću Beer-Lambertove jednadžbe izračunava se koncentracija ispitivane tvari.

$$A = -\log(I/I_0) = \epsilon \cdot c \cdot L$$

A-apsorbancija

I_0 -intenzitet upadnog svjetla

I-intenzitet propuštenog svjetla

ϵ -konstanta (molarna apsorptivnost)

c-tražena koncentracija

L-promjena valne duljine pri prolasku kroz uzorak

Instrument korišten u ovoj metodi je UV/Vis spektrofotometar. On mjeri intenzitet svjetla koje je prošlo kroz uzorak i uspoređuje ga s početnim odašiljanim intenzitetom. S izvora elektromagnetskog zračenja odašilje se elektromagnetsko zračenje širokog spektra koje ulazi u monokromator koji dalje odašilje valove točno određene valne duljine te ti valovi onda prolaze kroz uzorak. Dio zračenja je apsorbiran od strane uzorka, a preostalo zračenje prolazi kroz uzorak te se mjeri u detektoru i izražava se kao apsorbancija (A). Količina apsorbiranog zračenja proporcionalna je koncentraciji uzorka. Tijekom ovog istraživanja korištena je ova metoda. Dobiveni najveći „peak” iznosi oko 420 nm. Dobivene nanočestice prosječnog su promjera 60 nm (Ansell i Rauscher, 2011).

Kromatografija

Kromatografija je skupina metoda koje se baziraju na separaciji, odnosno odvajanju. Temelji se na prisutnosti promjene ponašanja tvari prilikom odvajanja tekuće mobilne faze i stacionarne faze u smjesi. Kako se različite komponente razdvajaju one mogu biti kvantificirane pomoću detektora ili kao takve mogu poslužiti za daljnja ispitivanja (Ansell i Rauscher, 2011).

Razdvajanje protočnim poljem (engl. *FieldFlow Fractination*, FFF)

FFF tehnika služi za razdvajanje nanočestica iz složenih uzoraka. Temelji se na koeficijentu difuzije kroz slobodno protočni kanal. Polje se aplicira na smjesu okomito od smjera protoka smjese kako bi došlo do razdvajanja komponenti smjese zbog razlike u mobilnosti pojedinih komponenti u polju. Polje može biti gravitacijsko, centrifugalno, magnetsko, termalno ili raskršće tekućina. Najvećim djelom dolazi do razdvajanja zbog razlike u Brownovom gibanju i difuziji nakon što je polje uzrokovalo premještanje svih komponenti smjese na jednu stranu. Postoji ravnoteža između difuzije i primijenjene sile čiji je izvor polje na svakoj pojedinoj čestici u smjesi što rezultira odvajanjem čestica okomito na smjer glavnog protoka. Kada je protok aktivan čestice su podložne tzv. *parabolic velocity profile* i čestice koje su udaljenije od baze protočnog kanala, odnosno manje čestice, kretat će se brže od onih na dnu i na taj način će se razdvojiti prilikom izlaska iz kanala. FFF metodom mogu se razdvojiti čestice u rasponu veličine od 1 do 100 μm . Ograničavajući faktori za ovu metodu mogu biti oticanje membrane, interakcije s membranom, učestalost postizanja ravnotežnog stanja i mogućnost agregacije u kanalu (Ansell i Rauscher, 2011) .

Mikroskopija

Mikroskopiranje je proces uvećavanja slike ili nekog objekta pritom se služeći zračenjem ili optikom. Kod svjetlosne mikroskopije granica difrakcije iznosi oko 1 mikrometar (10^{-6}), a kod transmisijske elektronske mikroskopije visoke rezolucije granica iznosi oko 1 Å (10^{-10}). Neke novije metode (AFM, TEM, SEM) ne koriste optička svojstva ili zračenje već koriste jako oštre iglice kako bi se postigla rezolucija na razini atoma (Ansell i Rauscher, 2011).

Skenirajuća elektronska mikroskopija (engl. *Scanning Electron Microscopy*, SEM)

SEM je vrsta elektronskog mikroskopa koji snima površinu uzorka tako da je skenira pomoću energetski bogatog snopa elektrona. Na taj način pruža 3D informacije o površini uzorka (Ansell i Rauscher, 2011). Tijekom interakcije elektrona s uzorkom stvaraju se sekundarni elektroni, reflektirajući elektroni i karakteristične X zrake. Ti signali se sakupljaju pomoću jednog ili više detektora kako bi se stvorila slika analizirane površine koja je prikazana na računalnom monitoru. Kada snop elektrona dođe do površine uzorka on zadire do nekoliko mikrona u unutrašnjost uzorka ovisno o voltaži elektrona i gustoći uzorka. Signali kao što su X zrake i sekundarni elektroni, nastaju tijekom interakcija u unutrašnjosti uzorka. SEM tehnikom postiže se rezolucija od 1 – 20 nm a kod nekih i ispod 1 nm (Ansell i Rauscher, 2011). Magesky i sur. (2016) koristili su ovu metodu kako bi utvrdili veličinu i oblik nanočestica srebra u njihovom radu te dobiveni prosječni promjer nanočestica iznosi je 15 +/-5 nm.

Mikroskopija atomskih sila

Mikroskopija atomskih sila (engl. *Atomic Force Microscopy*, AMF) se koristi za topografska mjerenja površina na atomskoj razini, za mjerenja adhezije, elektrostatskih sila i s dijamantnim vrškom služi za brazdanja, trošenja, utiskivanja te za nano obradu. U ovoj metodi koristi se konzola s vrlo oštrim vrhom za skeniranje površine uzorka. Kako se vrh približava površini, privlačna sila između površine i vrha uzrokuje primicanje vrha prema površini. Ukoliko se vrh toliko približi površini da ju dodiruje, sve jača odbojna sila prevladava i uzrokuje odmicanje vrha od površine. Kako bi se otkrilo gibanje vrha prema i od površine uzorka koristi se laserski snop. Laserski snop se reflektira sa samoga vrha konzole, svako odstupanje konzole uzrokovati će blagu promjenu smjera reflektiranog snopa. Fotodioda osjetljiva na promjenu položaja, bilježi promjene smjera reflektiranog snopa. Kod AMF-a postoje tri načina rada: kontaktni, bez kontaktni i „*tapping*” (engl.). Kontaktni način je pod utjecajem sile trenja i adhezije i može oštetiti uzorak te dati iskrivljene rezultate. Metoda bez kontakta sa snimanom površinom daje lošiju rezoluciju te rad AFM može biti ometan dodatnim slojem neke tvari na površini kao što je to voda. „*Tapping*” način rada obuhvaća prednosti oba prethodna načina. Povremenim dodirivanjem sa ispitivanom površinom eliminira se djelovanje sile trenja te uz pomoć dovoljno velike amplitude osciliranja vrha izbjegava se negativan učinak dodatnog sloja kontaminanata na površini uzorka (Bhatia, 2016).

Transmisijski elektronski mikroskop

Transmisijskim elektronskim mikroskopom (engl. *transmission electron microscopy*, TEM) mjere se veličine čestica, agregata te aglomerata. Za rad TEM-a koristi se elektronski snop koji se prenosi kroz tanki sloj uzorka. Prilikom prolaska elektrona kroz uzorak dolazi do interakcije između elektrona i uzorka. Slika uzorka se formira uz pomoć tih interakcija. Područja uzorka koja su veće gustoće apsorbiraju elektrone i na slici se pojavljuju kao tamna područja, dok područja manje gustoće olakšavaju prolaz elektronima i čine svjetlije strukture na slici. Magesky i sur. (2016) koristili su ovu metodu kako bi determinirali veličinu i disperziju sintetiziranih nanočestica srebra što je rezultiralo prosječnim promjerom nanočestica 15 ± 7 nm (Ansell i Rauscher, 2011).

Usporedba AFM-a sa SEM-om i TEM-om

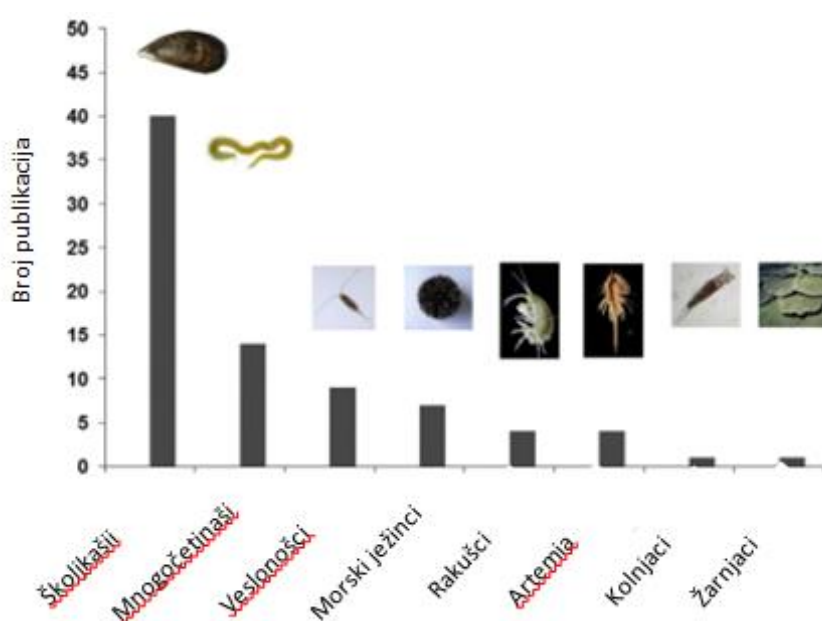
AFM ima nekoliko prednosti u odnosu na SEM i TEM u karakterizaciji nanočestica. Slike dobivene AFM-om predstavljaju podatke u tri dimenzije, pa je kvantitativno moguće izmjeriti visinu nanočestica. SEM i TEM metodom dobivene slike su dvodimenzionalne. AFM omogućuje još istvaranje slika u svim medijima: u ambijentalnom zraku, tekućinama i vakuumu. Skeniranje upotrebom AFM-a sporije je od skeniranja SEM-om ili TEM-om, ali cjelokupan proces traje kraće upotrebom AFM-a. Trajanje cjelokupnog procesa AFM-a iznosi jednu četvrtinu od trajanja procesa prilikom uporabe TEM-a ili SEM-a, zbog toga što je priprema uzoraka za SEM i TEM dugotrajna. Te u konačnici, AFM je i cjenovno efektivniji te njegovo rukovanje ne zahtjeva posebno obučeno osoblje (Scalf i West, 2006).

Ostale fizikalne metode

Tu se ubrajaju : metode koje se temelje na centrifugalnoj sili te mjere distribuciju veličine čestica na način da se određuje razina sedimentacije čestica, apsorpcija plinana površini čestica, metoda koja se koristi kretanjem nabijenih čestica kroz električno polje te metoda raspršenja monokromatske svjetlosti (Ansell i Rauscher, 2011).

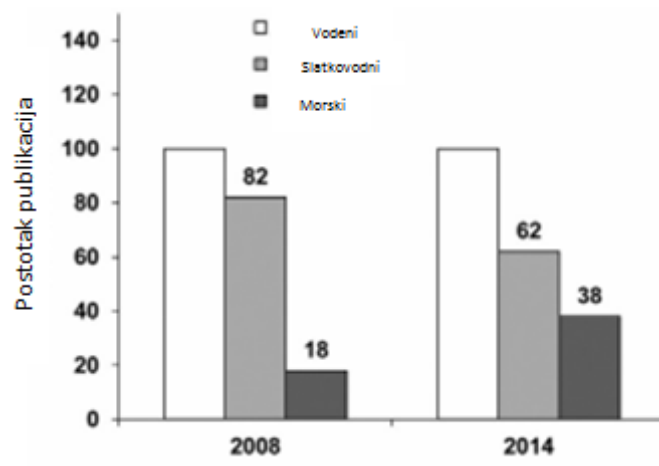
1.4. Utjecaj na vodene organizme

Kako teče razvoj nanotehnologije i povećava se njena upotreba u industriji i drugim aspektima ljudske djelatnosti doticaj vodenih sustava i nanočestica je neizbježan. Dostupnost nanočestica u vodenom okolišu može utjecati na prirodne ekosustave i zdravlje organizama kako vodenih tako i na zdravlje ljudi. Ekotoksikološka istraživanja morskih organizama dosad su ukazala na prisutnost različitih bioloških oštećenja u vrstama različitih trofičkih nivoa, od planktonskih pa do bentičkih vrsta uključujući i ribe.

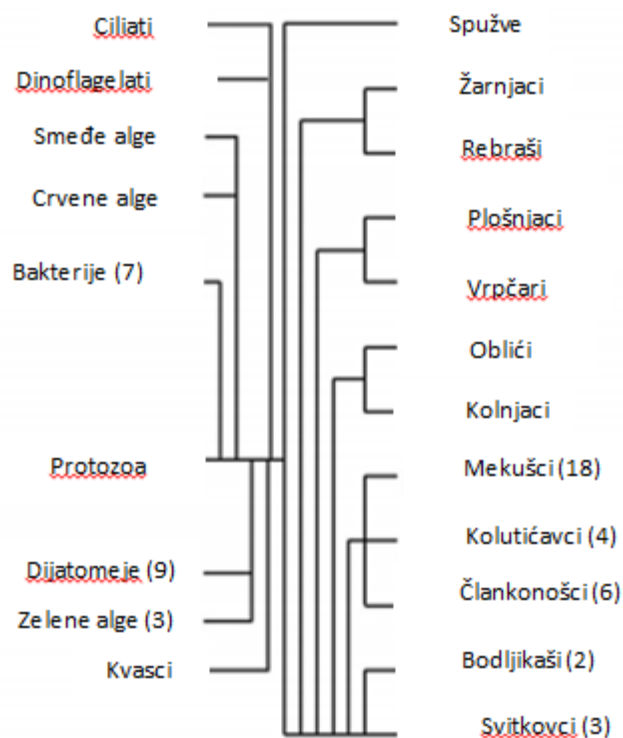


Slika 6. Ukupan broj izdanih radova za različite skupine organizama (Canesi i Corsi, 2016).

Prva istraživanja u glavnini su bila usredotočena na slatkovodne organizme. Manje od dvadeset posto objavljenih radova odnosilo se na morske organizme. U zadnjih nekoliko godina broj radova o ekotoksičnosti nanočestica eksponencijalno raste. Isto tako i udio istraživanja o utjecaju nanočestica na morske organizme značajno je porastao (Slika 6, 7 i 8).



Slika 7. Postotak objavljenih radova o vodenim ekosustavima (slatkovodnim i morskim ekosustavima), (Canesi i Corsi, 2016).



Slika 8. Filogenetsko stablo morskih organizama. Broj u zagradi označava broj radova u kojima su provedeni testovi toksičnosti nanočestica (Baker i sur., 2013).

Broj objavljenih radova o akumulaciji nanočestica unutar organizma je vrlo mali. Organizmi koji žive u okolišu u kojemu se nalaze nanočestice, te će nanočestice akumulirati u svoje tijelo. Nanočestice se mogu akumulirati u tijelo različitih organizama gdje mogu izazvati i negativne posljedice po organizam. Način ulaska i djelovanje nanočestica prvenstveno ovisi o vrsti čestice (Tablica 3). Nanočestice se mogu vezati adhezijom na stanicu i na taj način blokirati esencijalne pore i normale funkcije membrane. Isto tako one mogu ući u stanicu endocitozom, difuzijom kroz stanične membrane te ionskim transportnim putevima. Neke od negativnih posljedica koje mogu izazvati ulaskom u stanicu jesu: interakcija s elektron posredovanim transportom, indukcija proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta čijim nastankom može doći do oštećenja nukleinskih kiselina, oksidacije proteina te oštećenja staničnih membrana (Baker i sur., 2013). Nenamjerna toksičnost nanomaterijala vrlo je česta pojava. Takvi slučajni mehanizmi toksičnosti teško se izoliraju i njihov učinak razlikuje se ovisno o vrsti čestica. Stanična membrana ima važnu ulogu u životu stanice. Ona vrši nekoliko osnovnih funkcija, kao što su regulacija transporta materijala u stanicu i izvan nje, provođenje energije i interstanična komunikacija. Neke nanočestice imaju mogućnost vezivanja na površinu stanice i na taj način ugrožavaju integritet i funkciju stanične membrane. Tako primjerice nanočestice zlata mogu svojim vezanjem na površinu stanice oslabiti membranu i inducirati aktivnost stresnih proteina kod vrste bakterije *Escherichia coli* (Klaine i sur., 2008). Isto tako nanomaterijal može i indirektno uzrokovati oštećenje membrane. Indirektan način oštećenja membrane događa se pomoću oslobođenih reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS). ROS-ovi mogu oksidirati dvostruke veze masnih kiselina membranskih fosfolipida kroz proces peroksidacije. Peroksidacija fosfolipida povećava propusnost i fluidnost membrane što dovodi do osmotskog stresa i poremećenog transporta nutrijenata. Takve masne kiseline mogu inducirati proizvodnju slobodnih radikala koji mogu uzrokovati još veća oštećenja membrane i oštećenja DNA. Interakcija nanočestica i proteina pronašla je primjenu u biomedicini. Na primjer, kvantne točke koriste se kao agenti koji ciljaju fluorescentno označene proteine u procesu slikanja. Nanočestice svoju toksičnost ispoljavaju direktnim interakcijama s proteinima ili produkcijom ROS-ova. Reaktivne kisikove vrste mogu uzrokovati nastanak disulfidnih veza između aminokiselina koje sadržavaju sumpor. Nastanak disulfidnih veza narušava strukturu i funkciju proteina (Klaine i sur., 2008). Uz oštećenja membrana, proteina i genotoksičnost nanočestice

moгу posredovati procesima prijenosa energije. Prijenos elektrona moųe biti prekinut ukoliko redoks osjetljive nanoćestice stupe u kontakt s membranskim prenosiocem elektrona. Tada takva nanoćestica odvlaći elektrone iz transportnog lanca i na taj naćin prekida prijenos energije u stanici. Na primjer derivati fulerena mogu inhibirati respiraciju glukoze kod *E. coli* (Klaine i sur., 2008). Neke vrste nanoćestica, otpuštanjem štetnih spojeva, kao što su to teški metali ili ioni, izazivaju toksićni ućinak u stanici (Klaine i sur., 2008). Kvantne toćke su nanokristali, poluvodići koji sadrųe plemenite ili prijelazne metale i prisutan je organski omotać. Ulaskom kvantnih toćaka u stanicu dolazi do akumulacije potencijalno toksićnih metala. Unutar stanice ćestice metala izazivaju toksićan ućinak. Uz toksićnost metala u unutrašnjosti kvantnih toćaka, organski omotać isto taklo moųe biti toksićan (Klaine i sur., 2008).

Kod morskih beskraljeųnjaka, glavnu metu nanoćestica predstavlja imunološki sustav. U primjeru školjkaša *Mytilus galloprovincialis* *in vitro* istraųivanja pokazala su da se razlićite vrste nanoćestica poput fulerena, crnog ugljika (engl. Carbon black) i nano metalnih oksida, u vrlo kratkom vremenu nakupljaju u hemocitama dagnje. Dolaskom u hemocite nanoćestice utjeću na razlićite funkcije stanice od lizosomalne aktivnosti, sposobnosti fagocitoze, proizvodnje ROS-ova pa sve do indukcije apoptotićkih procesa (Canesi i Corsi, 2016). U primjeru vrsta *Crassostrea gigas* i *Ruditapes decussatus*, pod utjecajem razlićitih nanoćestica, fagocitorna aktivnost hemocita, pokazala se kao meta djelovanja nanoćestica (Canesi i Corsi, 2016). Imuno stanice morskih jeųinaca joų su jedan od modela prikladnih za testiranje utjecaja nanoćestica na imunološki sustav morskih beskraljeųnjaka (Canesi i Corsi, 2016). Vrsta *Paracentrotus lividus* jedan je tih modela. Jedinke te vrste, podvrgnute prisilnom hranjenju nano metalnim oksidima, nakon pet dana pokazale su prisutnost agregata ili aglomerata unutar imuno stanica tj. unutar celomocita. Prisutnost agregata i aglomerata nanoćesica uzrokovala je modifikacije trans Golgi aparata i subcelularnih komponenti endoplazmatskog retikuluma. Uz to dolazi do inhibicije aktivnosti svih triju kolinesteraznih izoformi što dovodi do promjene na razini ekspresije stresnih proteina *HSC70* i *GRP78* (Canesi i Corsi, 2016). U vrste *Hediste diversicolor*, unutar celomocita, primijećena su lizosomalna i oųtećenja inducirana djelovanjem AgNP (Canesi i Corsi, 2016). Ovi rezultati ukazuju na posljedice djelovanja nanoćestica na imunološki sustav kod skupine školjkaša, bodljikaša, ali i poliheta.

Osim utjecaja na imunološki sustav, nanočestice uzrokuju i različite promjene na razini tkiva. Oksidativni stres te oštećenja proteina, membrana i DNA predstavljaju još jedan način djelovanja nanočestica kod morskih beskralježnjaka. Različite vrste nanočestica imaju različit utjecaj na produkciju oksidativnog stresa (Canesi i Corsi, 2016). Oksidativna oštećenja nastala djelovanjem nanočestica ovise o više faktora. Ti faktori su veličina čestica, kompozicija, koncentracija čestica, način i vrijeme izloženosti te vrsta organizma. U morskoj vodi (prirodnoj, ali i umjetnoj), ponašanje nanočestica, odnosno agregacija i aglomeracija, igra glavnu ulogu u njihovoj akumulaciji i djelovanju na različita tkiva. Kod školjkaša škrge su prva barijera, odnosno doticajni organ s okolnom vodom. Upravo zbog toga škrge su pogodan medij za interakciju čestica i akumulaciju individualnih nanočestica ili njihovih iona. Aglomerati nanočestica uglavnom dolaze do probavnog sustava endocitozom (Canesi i Corsi, 2016). Kod školjkaša, organ koji predstavlja glavno područje akumulacije nanočestica je probavna žlijezda ili tzv. hepatopankreas. Unutar probavne žlijezde unutarstanična sudbina i djelovanje nanočestica ovisi o vrsti čestica i eksperimentalnim uvjetima. Kako ima glavnu ulogu u unutarstaničnoj razgradnji hrane, endosomalno–lizosomalni sistem probavnih stanica predstavlja glavnu metu djelovanja nanočestica na substaničnoj razini kod skupine školjkaša.

Korištenje ranijih stadija života organizama, kao predmeta istraživanja koje uključuje izlaganje tih stadija okolišnom stresu, znatno doprinosi procesu prepoznavanja kemijskih spojeva koji dospijevaju u morski okoliš i nanose štetu morskim organizmima. Primjena ovih najosjetljivijih stadija života organizama može se koristiti i u mjerenju utjecaja nanočestica na razvojni ciklus morskih beskralježnjaka. Bodljikaši su do sada najproučavanija taksonomska skupina morskih beskralježnjaka. Najčešće se koriste za procjenu toksičnosti nanočestica na razvojni ciklus. Burić i sur., (2015) pokazali su da je učinak nanočestica srebra na embrionalni razvoj kod mediteranskih vrsta morskih ježinaca ovisan o vrsti ježinca.

Dosadašnji rezultati pokazali su da u velikoj mjeri toksičnost metalnih nanočestica ovisi o topljivosti metalnih iona u morskoj vodi. Osim toga toksični učinak nekih nanočestica može biti vezan za samu vrstu čestice, a sklonost nanočestica vezanju s drugim česticama doprinosi njihovoj toksičnosti.

Tablica 3. Načini unosa nanočestica u morske organizme i toksični učinak nanočestica na morske organizme (Baker i sur., 2013).

ORGANIZMI	METODE NAKUPLJANJA I UČINAK
Bakterije	Gram-pozitivne bakterije osjetljivije od Gram- negativnih. NPs mogu utjecati na kompoziciju, ali ne i funkciju biofilmova; akumulacijom postaju dostupne predatorima
Alge	Nanočestice se mogu adsorbirati na površinu stanica. Ioni otpušteni s nanočestica mogu interferirati s unosom nutrijenata te stoga ograničiti rast algi. Negativan naboj omotača dijatomeja može privlačiti otopljene katione.
Arthropoda	Nauplii se mogu hraniti nanočesticama. Adsorpcija nanočestica na naupliijima može ograničiti kretanje. Otopljeni Zn^{2+} izazivaju subletalni učinak.
Annelida	Konzumiranje istaloženih nanočestica u sedimentu (detritivori) i onih u vodenom stupcu (filtratori). Uočen je toksični učinak i kod netopljivih nanočestica.
Bivalvia	Neke nanočestice ostaju zarobljene u škrgama, druge se prenose u probavni sustav, a većina se izbacuje pseudofecesom. Uočene su posljedice oksidativnog stresa i kod djelovanja netopljivih nanočestica.

Gastropoda	Adsorpcija nanočestica na tijelo gastropoda može izazvati oksidativni stres <i>in situ</i> . Ne spadaju u značajne akumulatore.
Echinodermata	Kod kronične izloženosti nanočesticama može doći do povećane smrtnosti u fazi larve.
Stenohaline ribe	Nanočestice se mogu gomilati u mukusu škrga i otopiti se, a do nakupljanja dolazi i u crijevu pijući vodu.
Eurihaline i diadromne ribe	Otapanje iona interferira s promjenom funkcije crijeva tijekom migracije iz morske u slatku vodu. Povećanjem količine unesene vode kao posljedice stresa migracije povećava se i količina unesenih nanočestica u crijevu.
Mezokozmos	Školjkaši i biofilmovi predstavljaju najveće akumulatore nanočestica tijekom provođenja jednostavnih mezokozmos testova uzimajući u obzir omjer mase i akumulacije.

2. Cilj istraživanja

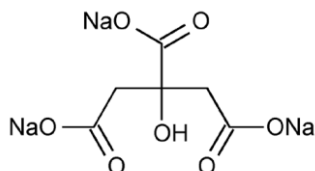
Cilj istraživanja bio je saznati kakav će utjecaj predtretman jajnih stanica morskog ježinca *Abracia lixula* s nanočesticama srebra imati na uspješnost oplodnje te nadalje na uspješnost dostizanja faze pluteusa nakon 72 sata.

3. Materijali i metode

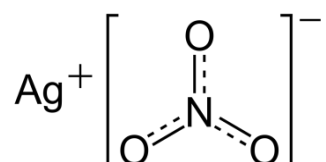
3.1. Kemikalije

U radu su korištene slijedeće kemikalije :

- Natrijev citrat, $C_6H_5Na_3O_7$



- Srebrov nitrat, $AgNO_3$



- Kalijev klorid, KCl
- Krom sulfat $CrSO_4$
- Ultračista voda (18 MΩ)
- Filtrirana morska voda

3.2. Sinteza nanočestica srebra

Nanočestice srebra sintetizirane su redukcijom srebrovog nitrata, AgNO_3 , s natrijevim citratom, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$. Srebrov nitrat, mase 0,02125 g razrjeđuje se u 125 ml ultračiste vode (18 M Ω) te se zagrijava do vrenja. U dobivenu otopinu dodaje se 0,5 ml 1% $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ kap po kap. Smjesu se zagrijava na grijaču te miješa uz pomoć magnetske miješalice sve do vidljive promjene boje u svijetlo žutu.

Dobivena disperzija nanočestica je koncentracije srebra 100 $\mu\text{g/mL}$. Od te otopine rade se dva razrjeđenja, od 10 i 100 puta (10 $\mu\text{g/mL}$ i 1 $\mu\text{g/mL}$) u svrhu mjerenja na UV – Vis spektrofotometru.

3.3. Karakterizacija AgNP u ultračistoj vodi pomoću UV_Vis spektroskopije

Uzorak za UV-Vis spektroskopiju pripremljen je sljedećim načinom. Prethodno pripremljena AgNP otopina razrijeđena je u ultračistoj vodi da bi se dobile konačne koncentracije od 1 i 10 mg / L. Sve tri otopine (1, 10 i 100 mg / L) stavljene su u kvarcne staklene kivete s duljinom optičke staze od 10 mm. Uzorci, UV-vidljivi podaci, prikupljeni su na Shimadzu UV-1800 spektrofotometru s konfiguracijom dvostrukih zraka. Spektar valne duljine kretao se od 300 do 800 nm pri razlučivosti od 1 nm. Prikupljeni podaci obrađeni su sa softverom UVProbe 2.3.1 (Shimadzu, Kyoto, Japan).

3.4. Predtretman jajnih stanica i eksperiment embrionalnog razvoja morskog ježinca

Dana 18.07.2016. u uvali Valkane za vrijeme oseke sakupljene su 24 jedinke ježinca vrste *Abracia lixula*. Pripremljena je 0,5 M otopina KCl-a (3,75 g KCl-a otopljeno je u 100 mL destilirane vode), koja se koristila za injektiranje ježinaca kako bi ih potaknula na izlučivanje gameta. Većina ježinaca započela je s lučenjem gameta odmah nakon trešenja. U ostatak ježinaca bilo je potrebno injektirati 0,5 ml 0,5 M KCl-a. Jedinke koje su započele sa ispuštanjem gameta stavljane su u čašu sa morskom vodom okrenute aboralnom stranom prema dolje. Jajne stanice tamno-crvene boje istaložene na dnu čaše sakupljaju se pipetom. Muške gamete nakon

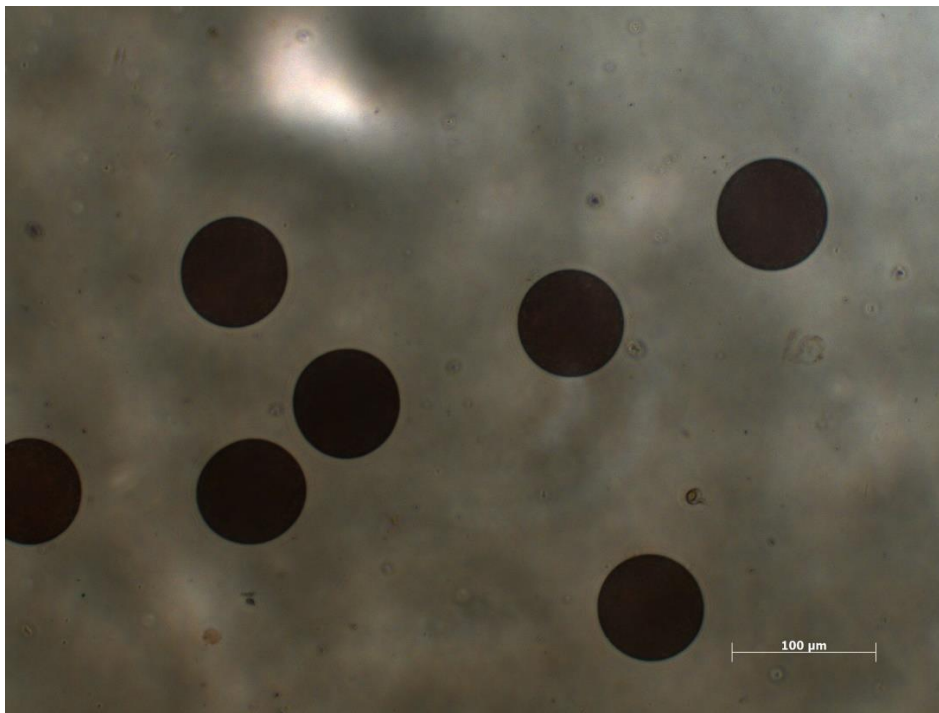
sakupljanja drže se na ledu do daljeg tretiranja. Gamete ježinca *A. lixula* prikazane su na slikama 9 i 10 te 11 i 12.



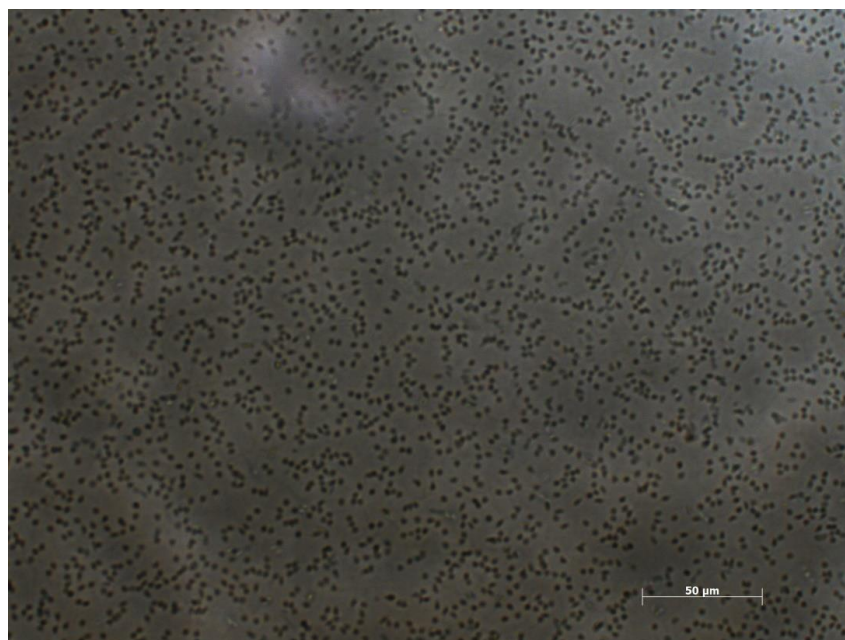
Slika 9. Prikaz izlučivanja ženskih gameta u morskog ježinca *Arbacia lixula*.



Slika 10. Prikaz izlučivanja muških gameta u morskog ježinca *A. lixula*.



Slika 11. Jajne stanice morskog ježinca *A. lixula*.



Slika 12. Spermiji morskoj ježinca *A. lixula*.

Priprema otopina AgNP

Početnu otopinu AgNP (100 $\mu\text{g/mL}$) potrebno je razrijediti i to tako što se 1 mL doda u 9 mL ultračiste vode. Zatim su originalna otopina (otopina 1) i razrijeđena otopina (otopina 2) AgNP sonificirane 30 minuta. Nakon što su otopine pripremljene bilo je potrebno pravilno označiti čaše koncentracijama kojima će jajne stanice biti izložene: (0, 1, 10, 50, 100, 500, 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$). Označene se čaše zatim tretiraju :

1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ – 100 μL otopinom 1

500 $\mu\text{g L}^{-1}$ – 50 μL otopinom 1

100 $\mu\text{g L}^{-1}$ – 100 μL otopinom 2

50 $\mu\text{g L}^{-1}$ – 50 μL otopinom 2

10 $\mu\text{g L}^{-1}$ – 10 μL otopinom 2

1 $\mu\text{g L}^{-1}$ – 1 μL otopinom 2

0 $\mu\text{g L}^{-1}$ – 100 μL ultračiste vode

U iste čaše zatim je dodano 10 mL filtrirane morske vode. Slijedilo je dodavanje još 2,5 mL koncentrirane otopine jajnih stanica. Jajne stanice ostavljene su u predtretmanu s AgNP 10 minuta.

Oplodnja morskih ježinaca

Oplodnja morskih ježinaca vrši se u pločama sa 6 jažica. Svaka je označena slučajnim brojem kako bi se izbjegao subjektivni utjecaj na konačni rezultat. U svaku jažicu dodalo se 5 ml filtrirane morske vode. Nakon toga, potrebno je dodati 250 μL predtretiranih jajnih stanica. Zatim se dodaje 10 μL razrijeđene otopine sperme. Ona se dodaje kružnim pokretima kako bi se postigla ravnomjerna raspodjela sperme unutar jažice. Nakon toga dodaje se preostali volumen filtrirane morske vode tj. 5 mL. Pri završetku prethodnih postupaka svaka se jažica miješa kružnim pokretima.

Ostavlja se na 2 sata. Nakon dva sata broji se uspješnost oplodnje na 100 embrija u svih 6 jažica (Slika 13).



Slika 13. Prikaz oplodnje morskih ježinaca u pločama sa 6 jažica.

Uspješnost dostizanja faze pluteusa nakon 72 sata od oplodnje

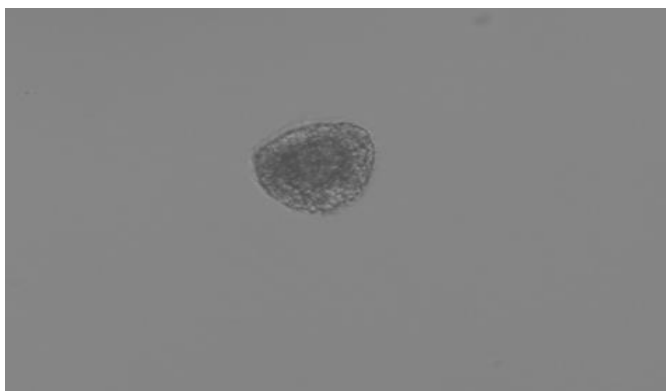
Dvije jažice u kontrolnoj ploči nisu dale više od 50 % uspješnosti oplodnje, stoga su eliminirane u svim ostalim pločama te je uspješnost brojana u četiri jažice. Svaka od jažica prebrojena je na 100 zigota (oplođenih jajnih stanica). Nakon 72 h brojana je uspješnost dosezanja faze larvi u pluteus fazi. Pratila se je normalno razvijena larva u fazi pluteusa s četiri ruke (dvije prednje kraće i stražnje dulje) te u potpunosti razvijenim gastrointestinalnim traktom u sredini (Slika 14), pluteus čija je veličina u pola manja od veličine kontrole (Slika 15) ili pluteus s nekim drugim anomalijama (kao što su kraća noga ili ruka), te nerazvijeni pluteus koji je zaostao u nekoj od ranijih fazi razvoja (blastula, gastrula) (Slika 16). Neoplođene jajne stanice nisu se brojale. Brojanje je vršeno pod inverznim mikroskopom.



Slika 14. Normalno razvijena larva u pluteus fazi.



Slika 15. Zaostala larva.

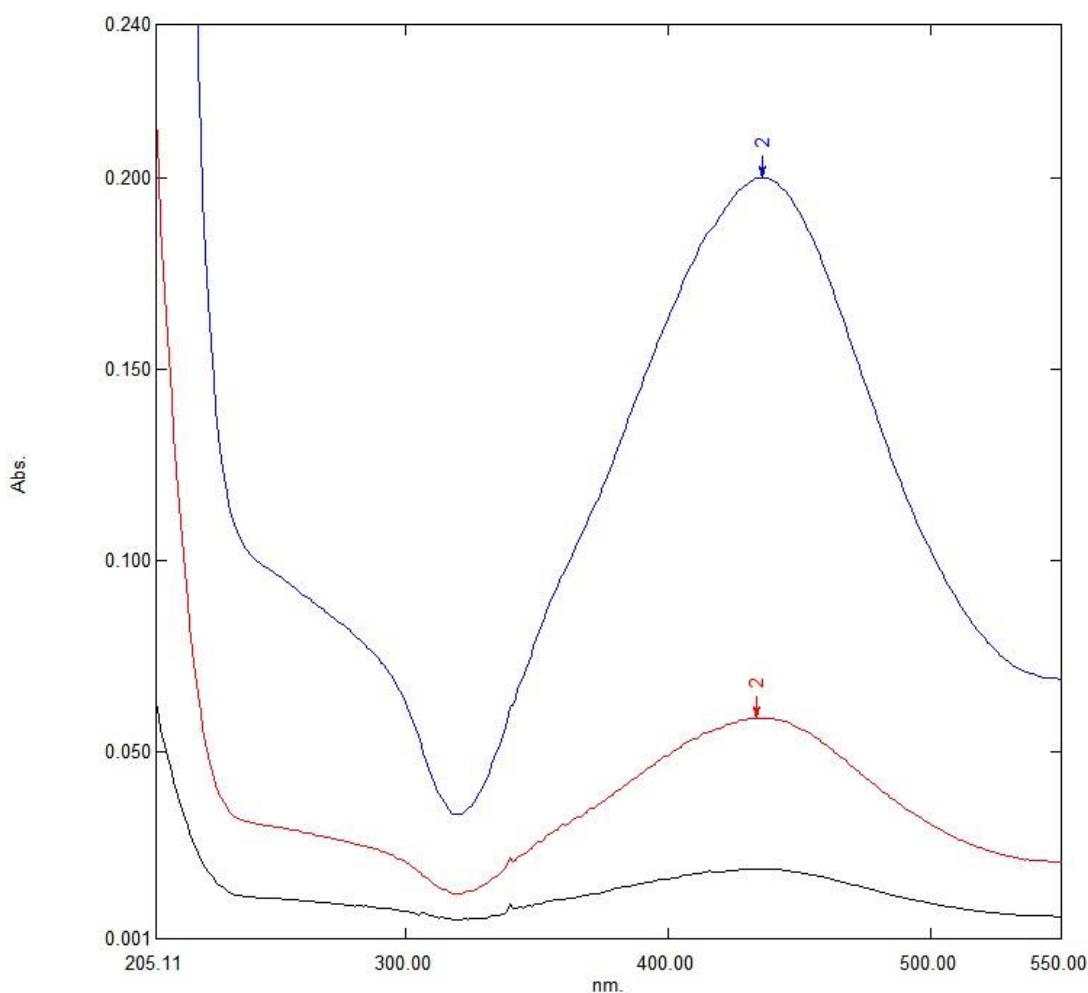


Slika 16. Nerazvijeni pluteus.

4. Rezultati

Karakterizacija AgNP u ultračistoj vodi pomoću UV_Vis spektroskopije.

Tri pripremljena razrjeđenja AgNP mjerena su uz pomoć Shimadzu UV-1800 spektrofotometra. Mjeren je spektar od 200 do 800 nm valne duljine (Slika 17). Na prikazanom grafu na x osi prikazana je valna duljina izražena u nanometrima, a na y osi prikazana je apsorbancija triju razrjeđenja. Maksimalna apsorbancija je pri 420 nm što odgovara veličini nanočestica od 60 nm.

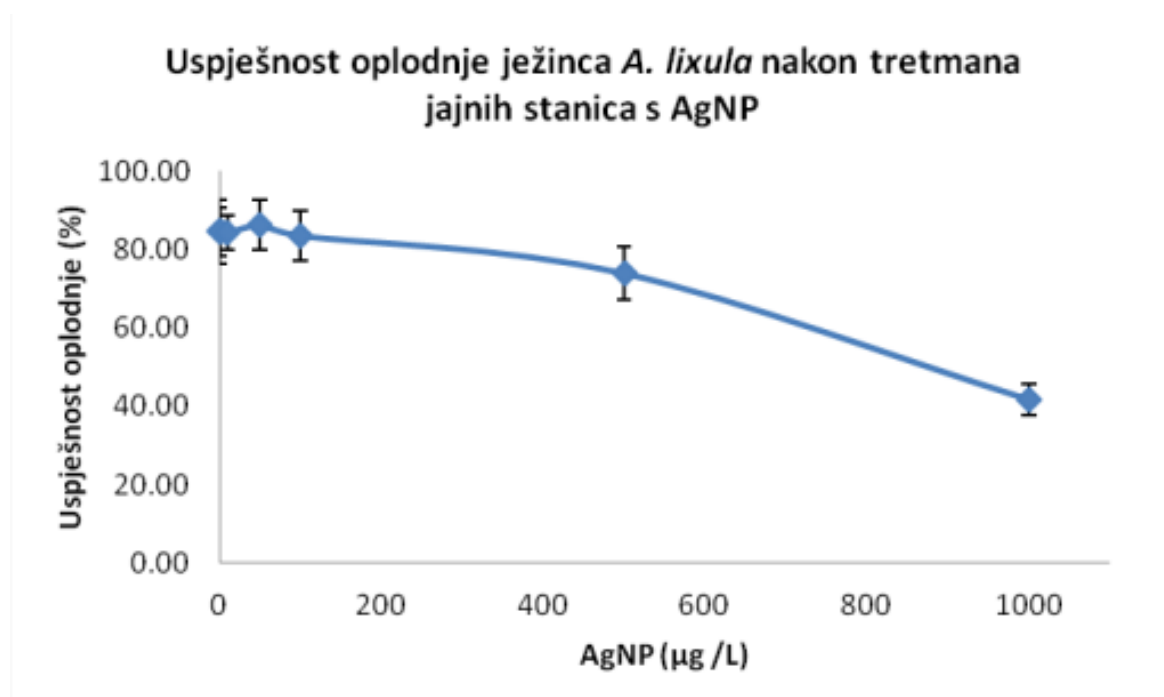


Slika 17. Prikaz pripremljene otopine AgNP u ultračistoj vodi. Plava linija označava otopinu AgNP koncentracije – 50 µg/mL, crvena – 10 µg/mL, siva – 1 µg/mL.

Intenzivna absorpcija nanočestica srebra disperzije oko 420 nm karakteristična je *surface plasmon resonance* (engl.) za nanočestice srebra veličine 60 nm.

Brojanje uspješnosti oplodnje nakon dva sata.

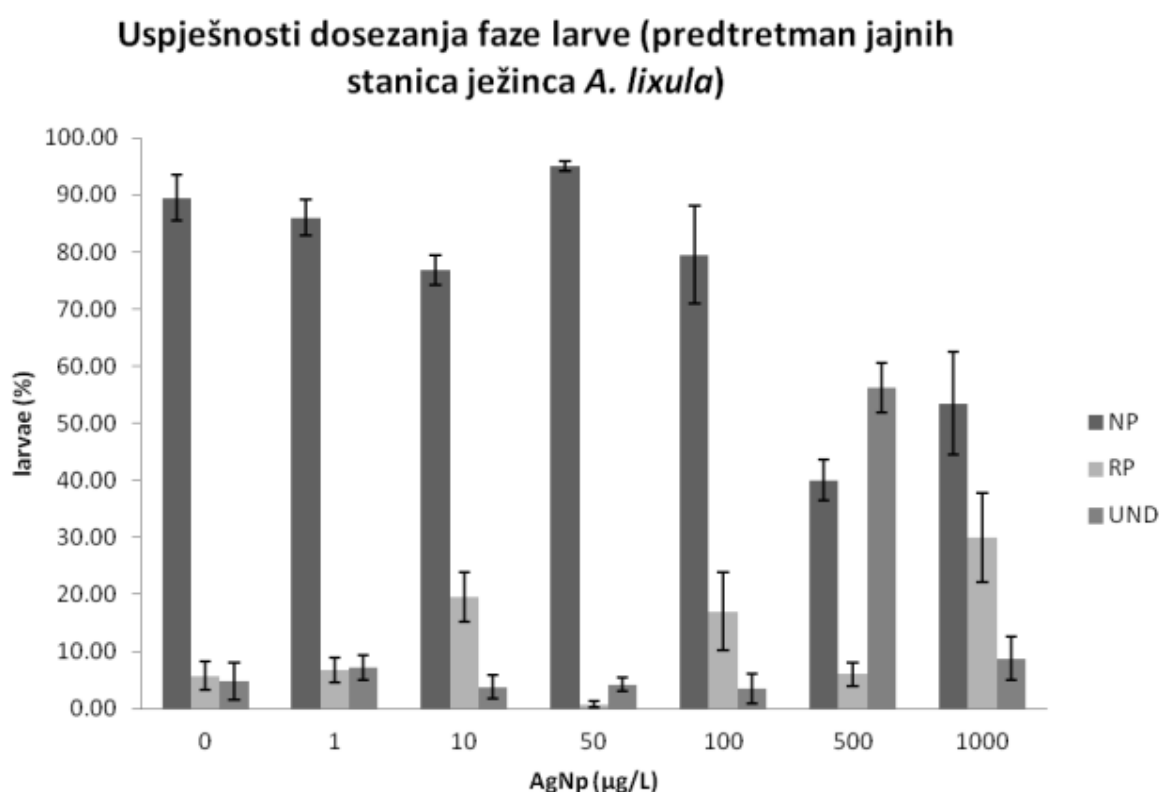
Dvije jažice u kontrolnoj ploči nisu dale više od 50 % uspješnosti oplodnje, stoga su eliminirane su u svim ostalim pločama te je uspješnost brojana u četiri jažice. Razlog tome može biti njihov boravak na osunčanom mjestu što je moguće dovelo do prezagrijavanja uzorka. Uspješnost oplodnje ježinaca *Arbacia lixula* nakon tretmana jajnih stanica s nanočesticama srebra ovisno o koncentraciji nanočestica vidno je u padu (Graf 3). Pri tretiranju jajnih stanica s koncentracijom od 1, 10 i 100 µg/L nanočestica uspješnost oplodnje tek neznatno varira od uspješnosti oplodnje kontrole. Kod koncentracije od 50 µg/L nanočestica dolazi do blagog porasta uspješnosti oplodnje za 1,6% u usporedbi s kontrolom. Koncentracija nanočestica od 500 µg/L izazvala je izraženiji pad uspješnosti oplodnje za 10,7% u usporedbi s kontrolom dok koncentracija od 1000 µg/L pokazuje najveći utjecaj na uspješnost oplodnje te je smanjuje za čak 43%. Uspješnost oplodnje ježinaca proporcionalno pada s porastom koncentracije nanočestica osim neznatnog odstupanja kod koncentracije od 50 µg/L.



Graf 3. Uspješnost oplodnje ježinaca *Abracia lixula* nakon tretmana jajnih stanica s AgNP.

Brojanje uspješnosti dostizanja faze pluteusa nakon 72 sata.

Uspješnost dostizanja faze larve nakon predtretmana jajnih stanica ježinca *A. Lixula* razlikuje se ovisno o koncentraciji nanočestica (Graf 4). Uspješnost dostizanja faze larve pri koncentraciji nanočestica od 1 µg/L reducirana je za 3,5% od kontrolnog uzorka koji nije bio tretiran nanočesticama, a pri koncentraciji od 10 µg/L za 12,75%. Nakon toga javlja se nagli porast normalno razvijenih larvi tj. uspješno dostignute faze larve i to čak za 5,5% u usporedbi s kontrolnim uzorkom pri koncentraciji nanočestica od 50 µg/L. Zatim slijedi ponovni pad normalno razvijenih larvi s povećanjem koncentracije nanočestica. Najveći je postotak zaostalih larvi pri koncentraciji nanočestica od 1000 µg/L, dok je najveći postotak nerazvijenih larvi pri koncentraciji od 500 µg/L.



Graf 4. Uspješnost dostizanja faze pluteusa nakon predtretmana jajnih stanica morskog ježinca *A. lixula* s AgNP. Prikaz postotka razvijenih (NP), duplo manjih od kontrole (RP) i nerazvijenih larvi (UND).

5. Diskusija

Iz dobivenih rezultata vidi se kako toksikanti prisutni u morskom okolišu mogu nanijeti štetu morskim organizmima. U našem slučaju zagađivalo su bile sintetizirane nanočestice srebra veličine 60 nm. Njihov utjecaj na uspješnost oplodnje ježinaca vrste *Arbacia lixula* ovisan je o primijenjenoj koncentraciji. Iz prije prikazanih grafova vidimo kako uspješnost oplodnje ježinaca proporcionalno pada s porastom koncentracije nanočestica osim odstupanja kod koncentracije od 50 µg/L. Isto tako kod razvoja larvi ježinaca vidljiv je znatan utjecaj nanočestica. Postotak normalnih larvi s povećanjem koncentracije nanočestica u padu je no ponovno dolazi do anomalije. Kod koncentracije nanočestica srebra od 50 µg / L dolazi do porasta učestalosti normalnih larvi u usporedbi s kontrolom i nižim ispitanim koncentracijama. Veće koncentracije nanočestica povećale su brojnost nerazvijenih larvi te umanjile broj normalno razvijenih.

Magesky i Pelletier (2015) u svojem su se radu usredotočili na utjecaj ionskog srebra i njegovih nanočestica na fiziološke promjene i stanični učinak kod ježinaca. Njihovim istraživanjem primijećen je učinak ovisan o veličini nanočestica srebra posebice u perimetamorfnoj fazi. U njihovim rezultatima pri izloženosti larvi ježinca koncentraciji 100 µg/ L nanočestica srebra dolazi do prekida metamorfoze, dok ioni srebra iste koncentracije uzrokuju redukciju brzine procesa metamorfoze čime dolazi do povećanja smrtnosti tijekom izloženosti. Magesky i sur. (2016) potvrdili su kako je gastro-intestinalni sustav glavni način ulaska nanočestica u organizam, koristeći se nano-flourescentnim markerima. Imajući na umu moguće otpuštanje Ag iona iz njegovih nanočestica ipak su došli do spoznaje da su nanočestice odgovorne za toksične učinke tijekom metamorfoze. U postlarvalnom i juvenilnom stadiju kao smrtonosna doza pokazala se koncentracija 500 µg/L, a subletalna 50 – 100 µg/L. U juvenilno m stadiju veću toksičnost ispoljili su ioni srebra, 100 µg/L Ag⁺ uzrokovalo je nepokretnost i smrtnost. Prilikom ispitivanja toksičnosti Ag⁺ i polimerom modificiranih nanočestica srebra u interakciji s funkcionaliziranim nanočesticama ugljika na rane razvojne stadije morskog ježinca *Strongylocentrotus droebachiensis*, Magesky i sur. (2016) pokazali su kako je u ovom slučaju veću toksičnost uzrokovala izloženost Ag⁺.

Prema rezultatima Magesky i Pelletier (2015), moguće da i u istraživanju Magesky i sur., (2016) ulogu u toksičnosti igra veličina čestica kako se pokazalo da veći učinak imaju ioni srebra naspram njegovim nanočesticama.

Prema rezultatima ovog rada nanočestice srebra prisutne u okolnom mediju utječu na smanjenje uspješnosti oplodnje ježinca vrste *A. lixula*, no i pri velikim koncentracijama ne pokazuju drastičan utjecaj na dostizanje faze larvi. Razlog tomu može biti prilagođavanje jedinki na povećanu koncentraciju zagađivala u organizmu nakon tretmana jajnih stanica nanočesticama srebra. Novim rezultatima dokazano je veći utjecaj nanočestica srebra na uspješnost oplodnje i dostizanje faze larvi ima tretiranje muških gameta jedinki *A. lixula* nanočesticama srebra (D. Vodopia, neobjavljeni podatci). Takvi podaci mogu biti posljedica smanjenja pokretljivosti muških gameta nakon tretmana s AgNP ili pak zbog oštećenja genetskog materijala koji oni prenose.

Burić i sur. (2015) u svojem su radu ispitali utjecaj post-fertilizacijskog izlaganja embrija *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* i *S. granularis* nanočesticama srebra. Njihovo istraživanje bilo ponajviše usmjereno na utjecaj malih koncentracija AgNP na embrije različitih vrsta ježinaca u njihovim različitim stadijima razvoja. Rezultati tog istraživanja pokazali su kako je od triju ispitivanih vrsta, najosjetljivija na utjecaj Ag^+ upravo *A. lixula*. Pri tretmanu 30 minuta nakon oplodnje već kod koncentracije od 5 $\mu\text{g/L}$ Ag^+ došlo je do značajne promjene broja normalnih i zaostalih larvi za razliku od kontrolnog uzorka. S povećanjem koncentracije Ag^+ povećavao se broj zaostalih larvi, nakon 48 sati rezultat je bio od 92 do 97% nerazvijenih embrija pri koncentraciji od 50 i 100 $\mu\text{g/L}$ Ag^+ . Osim toga Burić i sur. (2015) podvrgnuli su ježinca *A. lixula* tretmanu s 1-100 $\mu\text{g/L}$ AgNP, 30 minuta, 90 minuta, 6 sati i 24 sata nakon oplodnje. Nakon trideset minuta došlo je do značajnog utjecaja u cijelom rasponu doza AgNP. Već pri koncentraciji od 1 $\mu\text{g/L}$ broj normalno razvijenih larvi smanjio se za 1,6 puta, a broj zaostalih larvi se povećao za 3 puta. Nakon 6 i 24 sati pri koncentracijama 1-10 $\mu\text{g/L}$ AgNP, broj zaostalih larvi nadmašio je broj normalno razvijenih larvi. Tretiranje najvećim koncentracijama, 50 i 100 $\mu\text{g/L}$, AgNP rezultiralo je gotovo u potpunosti zaustavljenim embrionalnim razvojem neovisno o vremenu prvotnog izlaganja nanočesticama. Najveću osjetljivost naspram nanočesticama srebra pa tako i srebrovim ionima pokazale su jedinke vrste *A. lixula*. Suprotno od rezultata Magesky i sur., (2016), primjećuje se blago veći utjecaj

nanočestica srebra u odnosu na utjecaj njegovih iona na embrionalni razvoj ježinca *A. lixula*. Kako je najveći utjecaj pri najmanjim koncentracijama bio kod tretiranja nakon 30 minuta od oplodnje moguće je da na krajnji toksični učinak utječe i faza u kojem se embrio nalazi.

Mesarič i sur. (2015) testirali su utjecaj ugljikovih nanočestica (crni ugljik (CB) i grafen oksid (GO)) na rane razvojne stadije morskog ježinca *Paracentrotus lividus*. Promatrana je uspješnost oplodnje jajnih stanica nakon tretiranja sperme nanočesticama ugljika koncentracije 0,0001 – 1,0 mg/L (CB ili GO). Uspješnost oplodnje znatno je reducirana nakon izlaganja sperme CB-u pri svim testiranim koncentracijama, dok se morfološke anomalije u fazi gastrule i pluteusa primjećuju i kod prisutnosti CB-a i GO-a. Kontrolni uzorak pokazao je 96 +/- 3% uspješnost oplodnje. Nakon izlaganja sperme CB-u uspješnost oplodnje smanjila se na 50% od kontrolne vrijednosti pri svim testiranim koncentracijama. Tretiranje sperme GO-om nije pokazalo utjecaj na oplodnju. Nakon 24 sata od oplodnje u stadiju gastrule primijećene su nepravilnosti i zaostatak u razvoju kod onih embrija koji su oplođeni spermom tretiranom nanočesticama ugljika (CB i GO). Najveći učinak javlja se pri najvećoj testiranoj koncentraciji nanočestica (1,0 mg/L), više od 80 % embrija sa malformacijama. 72 sata nakon oplodnje, u stadiju pluteusa, nakon tretiranja sperme s CB-om dolazi do zaostalih razvojnih oblika i oštećenjima skeleta u najvećoj mjeri (87 – 80 %) pri najmanjoj koncentraciji CB-a (0,0001 – 0,001 mg/L), dok kod najvećih koncentracija CB-a anomalije su prisutne samo u 54 % pluteusa. Mesarič i sur. (2015) Prikazali su kako izlaganje sperme i najmanjim koncentracijama CB-a uzrokuje štetne posljedice po embrionalni razvoj i morfologiju jedinki dok izlaganje samih embrija *P. lividus* istim nanočesticama koncentracije 66 mg/L ne rezultira štetnim učincima. Kao razlog tome naveli su kako u morski okoliš sperma dolazi bez ikakve zaštitne ovojnice prilikom čega su njihova membrana i površinski receptori izloženi okolišu i tamo prisutnim zagađivačima uključujući i nanočestice, dok embriji posjeduju fertilizacijski omotač koji ih štiti od neposrednog utjecaja okoline. U morskom okolišu puno faktora može utjecati direktno na prisutnu spermu što dovodi do redukcije sposobnosti oplodnje jajnih stanica i/ ili indirektno tako da se nastalo oštećenje može prenijeti na sljedeću generaciju. Kao glavni razlog redukcije uspješnosti oplodnje nakon tretiranja sperme s CB-om naveli su vezanje nanočestica CB-a na površinu muških gameta i time onemogućili oplodnju.

Šiller i sur. (2013) u svojem su radu pokazali kako nanočestice srebra imaju snažan utjecaj na javljanje anomalija u razvoju jedinki ježinca *P. Lividus* ovisno o koncentraciji Ag nanočestica. Neke od posljedica su sporiji razvoj jedinki, asimetrija tijela, kraće i nepravilne nožice, promjene u ponašanju npr. Promjene u načinu plivanja pri koncentraciji ~ 0,3 mg/L AgNP-a. Pokazali su i da veći toksični učinak izazivaju nanočestice srebra što potvrđuje naše rezultate, za razliku od Ag iona iste koncentracije.

Gambardella i sur. (2015) istražili su utjecaj Ag nanočestica na morske organizme različitih trofičkih nivoa. U njih se ubrajaju: alge *Dunaliella tertiolecta* i *Skeletonema costatum*, žarnjaci *Aurelia aurita*, rakovi *Amphibalanus amphitrite* i *artemia salina* te bodljikaš *Paracentrotus lividus*. Od promatranih organizama najosjetljivija na utjecaj AgNP je meduza *Aurelia aurita*. Jedna od promatranih karakteristika je pokretljivost sperme ježinaca. Sa povećanjem koncentracije nanočestica dolazi do smanjenja pokretljivosti sperme. Što prate i naši rezultati kod tretiranja jajnih stanica. Već pri koncentraciji od 0,02 mg/L AgNP-a dolazi do značajne razlike od kontrolnih vrijednosti. Isto tako Gambardella i sur. (2013) izložili su spermu morskoj vodi koja sadrži suspenzije nanočestica srebra, titanij oksida i kobalta što je rezultiralo bez posljedica na uspješnost oplodnje no primijećene su nepravilnosti u razvojnim fazama od gastrule do pluteusa za razliku od rezultata Mesarić i sur. (2016) gdje se već pri svim testiranim koncentracijama AgNP-a (0,0001 – 1,0 mg/L) uspješnost oplodnje reducirala 50% od kontrolnog uzorka.

6. Zaključak

S rastućim rasponom i volumenom nanočestica koje se proizvode svake godine, i njihovom sposobnošću da na kraju uđu u okoliš, istraživanja o negativnim učincima nanočestica na žive organizme sve su važnija. U ovom radu pokazano je da jajne stanice imaju smanjenu uspješnost oplodnje nakon što dođu u dodir sa srebrnim nanočesticama u ovisnosti o koncentraciji nanočestica. Nadalje, vidljiv je utjecaj na larvalni razvoj povećanjem uspješno oplođenih jajnih stanica u čijem su daljnjem razvoju prisutne anomalije u rastu, zaostali razvoj ili smrt . Na temelju tih rezultata potrebno je daljnje istraživanje kojim bi se utvrdio točan način interakcije nanočestica s jajnim stanicama, njihovu eventualnu internalizaciju i način na koji utječu na ključne puteve tijekom embrionalnog razvoja morskih ježinaca.

7. Literatura

Anandalakshmi, K., Venugobal, J., Ramasamy, V.(2015.) Characterization of silver nanoparticles by green synthesis method using *Pedaliium murex* leaf extract and their antibacterial activity. *Applied Nanoscience*. 6. Pp 399-408.

Ansell, J., Rauscher, H. (2011.) Report of the Joint Regulator - Industry Ad Hoc Working Group: Currently Available Methods for Characterization of Nanomaterials. *International cooperation on cosmetic regulation report template*. pp 5-30.

Baker, T.J., Tyler R.C., Galloway S.T. (2013.) Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms, *Environmental Pollution*. 186. str. 257-271.

Bhatia, S. in: Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications. *Natural Polymer Drug Delivery Systems*, Springer International Publishing, Švicarska, 2016, pp 33-93.

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

Buzea, C., Pacheco Blandino, I., Robbie, K. (2007.) Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*. 2. str. 17–71.

Canesi, L., Corsi, I. (2016.) Effects of nanomaterials on marine invertebrates. *Science of the Total Environment*. 565. str. 933-940.

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

Corsi, I., Cherr, N. I., Lenihan, S. H., Labille, J., Hasselov, M., Canesi, L., Dondero, F., Frenzilli, G., Hristozov, D., Puentes, V., Della Torre, C., Pinsino, A., Libralato, G., Marcomini, A., Sabbioni, E., Matranga, V. (2014.) Common Strategies and Technologies for the Ecosafety Assessment and Design of Nanomaterials Entering the Marine Environment. *ACSNANO*. 8. str. 9694-9709.

Doostmohammadi, A., Monshi, A., Salehi, R., Fathi, M.H., Golniya, Z., Daniels, A.U. (2011.) Bioactive glass nanoparticles with negative zeta potential. *Ceramics International*. 37. str. 2311-2316.

Gambardella, C., Costa, E., Piazza, V., Fabbrocini, A., Magi, E., Faimali, M., Garaventa, F. (2015.) Effect of silver nanoparticles on marine organisms belonging to different trophic levels. *Marine Environmental Research*. 111. str. 41-49.

Gambardella, C., Aluigi, M.G., Ferrando, S., Gallus, L., Ramoino, P., Gatti, A.M., Rottigni, M., Falugi, C. (2013.) Developmental abnormalities and changes in cholinesterase activity in sea urchin embryos and larvae from sperm exposed to engineered nanoparticles. *Aquatic Toxicology*. 130. str. 77-85.

Hyseni S. (2016.) Toxicological Effects of Nanomaterials on Aqueous and Terrestrial Ecosystems. *Center for Development and Strategy*.

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 affects. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27. str. 1825-1851.

Landage S.M., Wasif A.I., Dhuppe P. (2014.) Synthesis of Nanosilver Using Chemical Reduction Methods. *International Journal of Advanced Research in Engineering and Applied Sciences*. 3. str. 14-22.

Magesky, A., Pelletier, E. (2015.) Toxicity mechanisms of ionic silver and polymer-coated silver nanoparticles with interactions of functionalized carbon nanotubes on early development stages of sea urchin. *Aquatic Toxicology*. 167. str. 106-123.

Magesky, A., Pelletier, E., Ribeiro, C. A. O. (2016.) Physiological effects and cellular responses of metamorphic larvae and juveniles of sea urchin exposed to ionic and nanoparticulate silver. *Aquatic Toxicology*. 174. str. 208-227

Matranga V., Corsi I. (2012.) Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: Model organisms and molecular approaches. *Marine Environmental Research* 76. Str. 32 – 34.

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

Ostiguy, C., Roberge, B., Woods, C., Soucy, B. (2010.) Engineered Nanoparticles Current Knowledge about OHS Risks and Prevention Measures, Second Edition. *Studies and Research Projects*. IRSST Research and Studies Series, report R-455; www.irsst.qc.ca.

Pulit-Prociak, J., Banach, M. (2016.) Silver nanoparticles – a material of the future...? *Open Chemistry*. 14.

Scalf, J., West, P. (2006.) Part I: Introduction to Nanoparticle Characterization with AFM. <http://www.nanoparticles.org/pdf/Scalf-West.pdf>

SCIENTIFIC COMMITTEE ON EMERGING AND NEWLY IDENTIFIED HEALTH RISKS (SCENIHR) (2006). Modified Opinion (after public consultation) on the appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. SCENIHR/002/05.

http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_003b.pdf

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

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Završni rad

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

Sinteza i utjecaj nanočestica srebra na jajne stanice morskog ježinca *Arbacia lixula*

NENSI PERUŠKO

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

Sažetak

Nanočestice su sve više prisutne u svakodnevnom životu. Time se pospješuje mogućnost njihova doticaja sa našim okolišem kako zrakom, kopnom tako i vodama, morskim i slatkim. Jednom prisutne u okolišu mogu stupiti u razne interakcije s tamošnjim organizmima ponekad uzrokujući i negativne posljedice po doticajnu jedinku. Cilj ovog rada bio je ispitati učinak sintetiziranih nanočestica srebra na oplodnju i embrionalni razvoj ježinca *Arbacia lixula* nakon tretmana jajnih stanica prethodno pripremljenim česticama. Istraživanje je pokazalo kako povećanjem koncentracija nanočestica dolazi do redukcije same oplodnje ježinaca tj. smanjuje se uspješnost oplodnje ježinaca i to proporcionalno opada s porastom koncentracije nanočestica. Isto tako uspješnost dostizanja faze larve opada porastom koncentracije nanočestica. Veće koncentracije nanočestica povećale su brojnost nerazvijenih larvi te umanjile broj normalno razvijenih.

Ključne riječi: nanočestice srebra, *Arbacia lixula*, jajne stanice

Mentor: Dr.sc. Daniel Mark Lyons

Ocjenjivači: Dr. sc. Mauro Štifanić

Dr. sc. Ljiljana Iveša

Dr.sc. Daniel Mark Lyons

Datum obrane: 08.09.2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Juraj Dobrila University of Pula

Bachelor thesis

University Undergraduate Study Programme – Marine Sciences

Synthesis and impact of silver nanoparticles on the eggs of the sea urchin

Arbacia lixula

NENSI PERUŠKO

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

ABSTRACT

Nanoparticles are increasingly present in everyday life. This increases the likelihood of their contact with our environment such as air, land and water (sea and sweet waters). Once present in the environment, they can participate in various interactions with organisms, sometimes causing negative consequences for the touching individual. The aim of our work was to examine the effect of synthesized silver nanoparticles on fertilization and embryonic development in ovarian *A. lixula* after the treatment of egg cells of pre-prepared parts. Research has shown that increasing nanoparticle concentrations results in reductions in the insemination of sea urchin, i.e., the efficiency of fertilizer growth proportionally decreases with the increase in nanoparticle concentration. Likewise, the success of reaching the larvae stages decreases with the increase in the concentration of nanoparticles. Larger concentrations of nanoparticles increase the number of underdeveloped and reduce the number of normally developed larvae.

Key words: nanoparticles, silver nanoparticles, *Arbacia lixula*, egg cells

Supervisor: Dr.sc. Daniel Mark Lyons

Reviewers: Dr. sc. Mauro Štifanić

Dr. sc. Ljiljana Iveša

Dr.sc. Daniel Mark Lyons

Thesis defense: 08.09.2017.