Utjecaj industrijski važnih nanočestica (CeO2, Ag, TiO2) na dagnji Mytilus Galloprovinciaus

Grujić, Jelena

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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:137:388333

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli
Sveučilišni preddiplomski studij
Znanost o moru

JELENA GRUJIĆ

UTJECAJ INDUSTRIJSKI VAŽNIH NANOČESTICA (CeO_2, Ag i TiO_2) NA DAGNJI *Mytilus galloprovincialis*

Završni rad

Pula, 2017.

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli
Sveučilišni preddiplomski studij
Znanost o moru

JELENA GRUJIĆ

UTJECAJ INDUSTRIJSKI VAŽNIH NANOČESTICA (CeO_2, Ag i TiO_2) NA DAGNJI *Mytilus galloprovincialis*

Završni rad

JMBAG: 0303019684
Status: redovna studentica
Kolegij: Nanotehnologija u istraživanju mora
Mentor: izv. prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons
Komentorica: mag. ing. mol. biotechnol. Petra Burić

Pula, 2017.

IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisana Jelena Grujić, kandidatkinja za prvostupnicu (*baccalaureus*) znanosti o moru ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mog vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima, i 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 necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da ni jedan dio rada nije iskorišten za neki drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

U Puli, 28.02.2017.

Studentica: Jelena Grujić

_____

IZJAVA
o korištenju autorskog djela

Ja, Jelena Grujić dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom **Utjecaj industrijski važnih nanočestica (CeO_2, Ag i TiO2) na dagnji *Mytilus galloprovincialis*** 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, 28.2.2017.

_____

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:

Predsjednica: doc. dr. sc. Giaconda Milotti
Sveučilište Jurja Dobrile u Puli
Mentor: izv. prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons
Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj

Članica: dr. sc. Ines Kovačić
Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Datum i mjesto obrane završnog rada: 28. veljače 2017.; Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Rad je rezultat samostalnog istraživačkog rada.

ZAHVALA

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Danielu Marku Lyonsu na povjerenju, savjetima i svoj pomoći u izradi ovog završnog rada.

Veliko hvala mag. ing. mol. biotechnol. Petri Burić na strpljenju za vrijeme laboratorijskog rada, pomoći u pisanju i izradi ovog završnog rada.

Zahvaljujem se Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju na ustupljenom prostoru i laboratorijskoj opremi.

Hvala mojoj sestri, svim prijateljicama i prijateljima na podršci kada je bila najviše potrebna i posebno hvala kolegi Victoru na savjetima i strpljenju.

Sadržaj

1. UVOD 1

2. NANOČESTICE 2

2.1. „ Nano“ na tržištu i opće karakteristike nanočestica 3

2.2. Industrijski važne nanočestice 4

2.2.1. Cerijev(IV) oksid 4

2.2.2. Srebro 5

2.2.3. Titanijev dioksid 5

2.3. Sinteza i karakterizacija nanočestica 6

2.4. Izvori i ulazi nanočestica u okoliš 7

2.5. Ponašanje nanočestica u okolišu 7

2.6. Unos i utjecaj nanočestica na živi organizam 9

2.7. Dagnje – prednosti i nedostaci rada s dagnjama 10

2.7.1. Stres na stres test 12

3. CILJ ISTRAŽIVANJA 14

4. MATERIJALI I METODE 15

4.1. Kemikalije 15

4.2. Izlaganje dagnji nanočesticama 15

4.3. UV- spektroskopija na spektrofotometru „ Shimadzu UV- 1800“ 20

5. REZULTATI 21

5.1. Stres na stres test 21

5.1.1. Stres na stres test na dagnjama izloženih CeO_2 nanočesticama 22

5.1.2. Stres na stres test na dagnjama izloženih nanočesticama Ag 23

5.1.3. Stres na stres test na dagnjama izloženih nanočesticama TiO_2 24

5.2. UV- spektroskopija na spektrofotometru „ Shimadzu UV- 1800“ 25

5.2.1. Metoda UV- spektroskopije na spektrofotometru „ Shimadzu UV- 1800“ za AgNP 25

5.2.2. Metoda UV- spektroskopije na spektrofotometru „ Shimadzu UV- 1800“ za R-TiO_2 26

5.2.3. Metoda UV- spektroskopije na spektrofotometru „ Shimadzu UV- 1800“ za A- TiO_2 27

6. RASPRAVA 28

7. ZAKLJUČAK 30

8. LITERATURA 31

1. UVOD

Razvojem tehnologije i korištenjem modernih instrumentalnih tehnika započelo se krajem 20. stoljeća s istraživanjima u novom području znanosti, nanoznanosti, te sintezom i primjenom umjetno sintetiziranih nanomaterijala u različitim područjima ljudske djelatnosti, nanotehnologijom. Nanoznanost nastoji razumjeti materijale na nanoskali, 0.1- 100 nm, dok nanotehnologija nastoji sintetizirati, mijenjati i manipulirati s materijom na toj razini (Royal Society and the Royal Academy od Engineering, 2004). Nanotehnologija se bavi materijalima i sustavima čije strukture i komponente pokazuju nova i znatno poboljšana fizička, kemijska i biološka svojstva (The USA National Nanotechnology Initiative).

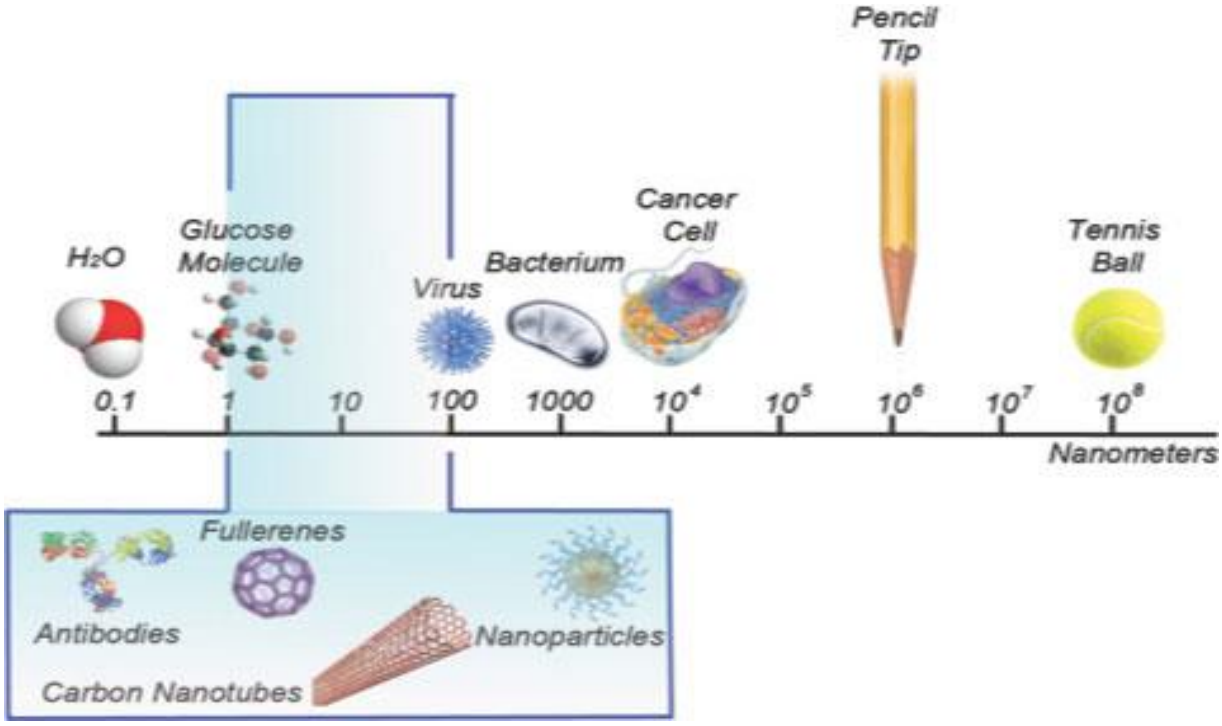
Sve veći broj nanomaterijala proizvodi se i koristi u komercijalne svrhe. Pronalazimo ih u medicini, farmaciji, tehnologiji, elektronici i telekomunikacijama. Međutim, kako raste interes o potencijalnim dobrobitima nanomaterijala raste i zabrinutost o potencijalnoj štetnosti njihovog utjecaja na okoliš i ljude (Griffitt i sur., 2007). Među ekotoksikolozima i patolozima glavna je briga kako će industrijski proizvedene nanočestice djelovati na organizme koji se tijekom biološke evolucije nisu susretali s takvim, industrijski proizvedenim materijalima (Moore, 2006).

Kroz temu ovog završnog rada analizirali smo utjecaj industrijski važnih nanočestica, srebra, cerija i titanija na dagnju *Mytilus galloprovincialis*, te prikazali rezultate dobivene fiziološkim testom općeg stresa *Stres na stres.*

.

2. NANOČESTICE

„Nano“ označava milijarditi dio te mu je faktor 10^{-9} i može se primijeniti na vrijeme (nanosekunde), volumen (nanolitar), masu (nanogram) ili duljinu (nanometar). Nanostrukture razlikujemo po broju dimenzija na nanoskali (Slika 1).



Slika 1. Nanoskala- prikazuje veličinu objekata (The International Iberian Nanotechnology Laboratory) (http://inl.int/inl-outreach-3).

Područje nanotehnologije može se podijeliti na tri dijela: nanomaterijale, nanoalate i nanouređaje.

Nanomaterijali su jednokomponentni ili višekomponentni materijali kod kojih je barem jedna dimenzija komponente u rasponu između 0,1 i 100 nm. Toj skupini pripadaju nanočestice, nanovlakna i nanocjevčice, nanokompoziti, nanostrukturirane površine i kvantne točke.

Nanoalati su alati i tehnike za sintezu nanomaterijala, manipuliranje atomima i proizvodnju struktura za uređaje te za mjerenja i karakterizaciju materijala i uređaja na nanoskali.

Nanouređaji su naprave na nanoskali važne u mikroelektronici i optoelektronici. Posebnu pozornost u novije vrijeme pobuđuju stanični motori, koji bi trebali oponašati rad bioloških sustava (Ivanković, 2011).

2.1. „ Nano“ na tržištu i opće karakteristike nanočestica

Čestice u nanodimenzijama prisutne su na Zemlji milijunima godina, nazivamo ih ultrafinim česticama, dok umjetno sintetizirane i ljudskom djelatnošću nastale nanočestice, čovječanstvo koristi tisućama godina u raznim područjima ljudske djelatnosti (Nowack i Bucheli, 2007). Nanotehnologija ima potencijal da se počne primjenjivati u širokom rasponu sektora, od energije (proizvodnja, kataliza, pohrana), materijala (sredstva za podmazivanje, abraziva, boja, guma, sportske obuće), elektronike (čipovi, ekrani), optike, sanacije (apsorpcija onečišćenje, filtriranje vode, dezinfekcija), na hranu (aditivi, ambalaža), kozmetiku (losioni za tijelo i kreme za zaštitu od sunca) i u medicini (dijagnostika, prijenos lijekova). Već danas, nanotehnologija se koristi za razvoj ili proizvodnju niza proizvoda od nano - poroznih membrana za filtriranje voda (za uklanjanje mikroba, zagađivača ili soli), do nano - ugraviranih računalnih čipova (kako bi se smanjila veličina i potražnja za energijom u mikroprocesorima) i premaza sa nanočesticama srebra u hladnjacima, tenisicama za tenis i zavojima (ubijaju bakterije i smanjuju neugodne mirise) (Joner i sur., 2007).

Nanočestice zbog dimenzija ispod 100 nm imaju veći omjer broja atoma smještenih na površini i broja atoma u unutrašnjosti nego što ga imaju veće čestice. To znatno utječe na strukturu, stabilnost i reaktivnost, čime materijal sastavljen od nanočestica dobiva nova svojstva (Brozović i Ladan, 1999). Zbog svojih površinskih mogućnosti i malih dimenzija, nanočestice, iako su netopljive u vodi ili organskim otapalima, imaju mogućnost prodiranja bioloških barijera, afinitet prema metalima te mogu na sebe vezati medicinske lijekove radi ciljanog mjesta djelovanja u organizmu. S druge strane, ista svojstva mogu ih činiti i toksičnima za živa bića. Metalne nanočestice imaju različita fizikalna i kemijska svojstva od sirovine od koje su dobivene. Neka od tih svojstava jesu: niže talište, veća specifična površina, specifična optička svojstva, mehanička snaga i specifična magnetizacija, zbog kojih su se pokazale privlačnima u različitim industrijskim područjima. Optička svojstva

nanočestica vrlo su zanimljiva. Primjerice, 20 nm- ska nanočestica zlata ima karakterističnu crvenu boju vina, nanočestica srebra je žućkasto sive boje, dok su nanočestice platine i paladija crne (Horikoshi i Serpone, 2013). Nanočestice mogu biti kuglastog, cjevastog ili nepravilnog oblika i postoje u kondenziranom, agregiranom ili aglomeriranom stanju (Nowack i Bucheli, 2007). Možemo ih podijeliti na prirodne i antropogene čestice. Antropogene čestice nehotice nastaju izgaranjem ili namjernim projektiranjem i izradom. Daljnjom podjelom baziranom na njihovom kemijskom sastavu dijelimo ih na anorganske i na nanočestice koje sadrže ugljik (Nowack i Bucheli, 2007).

Umjetno proizvedene nanočestice su klasificirane na temelju njihovog kemijskog sastava, veličinom ili morfološkim karakteristikama. Gruba podjela umjetno proizvedenih nanočestica je na bazi ugljika i mineralnih nanočestica. Detaljnijom klasifikacijom razlikujemo: fulerene, nanočestice metala (npr. Ag, Au, Fe), okside (npr. TiO_2), kompleksne spojeve (slitine, koji se sastoji od dva ili više elemenata), kvantne točke (ili Q-točke) i organske polimere (Joner i sur., 2007).

2.2. Industrijski važne nanočestice

2.2.1. Cerijev(IV) oksid

Cerij je kemijski element, koji nosi simbol Ce. Upotrebljava se sam ili u slitini kao legirani dodatak u proizvodnji željeza, čelika i drugih metala, za dobivanje kresiva za upaljače te za proizvodnju cerijeva stakla (Brozović i Ladan, 1999). Cerijevi(IV) spojevi, od svih lantanida, najstabilniji su (IV) spojevi i jedini stabilni u vodenim otopinama. Cerijev(IV) oksid (CeO_2) bijeli je prah, te ukoliko sadrži nečistoće poprima nijanse od žute do smeđe boje. Nanočestice CeO_2 upotrebljavaju se, zbog dobrih optičkih karakteristika i apsorpcije UV zraka, u proizvodnji optičkog stakla, za brušenje leća i zrcala. Osim toga, CeO_2NP koriste se kao katalizatori ispušnih plinova, kao dodatak porculanu, u kremama za sunčanje i kozmetičkim kremama te u drvnoj industriji (Dopuđa, 2017). *In vitro* i *in vivo* istraživanja pokazala su toksičnost nanočestica CeO_2 na stanicama raka. Naime, CeO_2NP inhibiraju širenje stanica raka te senzibiliziraju iste na terapiju zračenjem. Nadalje, CeO_2NP pokazuju minimalnu toksičnost na tkiva i pružaju zaštitu od raznih oblika reaktivnih kisikovih oksida (eng. reactive oxigen species, ROS). Antioksidativna sposobnosti nanočestica CeO_2 omogućuje zaštitu od zračenja, te dovodi do istraživanja primjene ovih nanočestica u

poremećajima karakteriziranim ROS akumulacijom, kao što su dijabetes i makularne degeneracije (Wason i Zhao, 2013).

2.2.2. Srebro

Srebro je kemijski element koji u periodnom sustavu elemenata nosi simbol Ag. Elementarno srebro je bijeli, sjajni, lako obradivi i mekan plemenit metal, s karakterističnim srebrnim sjajem (Royal Society of Chemistry, 2016). Zbog svojih poželjnih optičkih, vodljivih i antibakterijskih svojstava nanočestice srebra koriste se u brojnim tehnologijama i ugrađuju u široku lepezu potrošačkih proizvoda. Upotrebljavaju se kao biosenzori u raznim testovima gdje služe kao biološke oznake za kvantitativnu detekciju. Zbog antibakterijskih svojstava nalazimo ih u odjeći, obući, bojama, zavojima za rane, aparatima, kozmetici i plastici. Stavljaju se u vodljive tinte i integriraju u kompozite za poboljšanje toplinske i električne vodljivosti (Oldenburg, 2016). Antimikrobno svojstvo nanočestica srebra povezano je s količinom srebra i sa stopom otpuštanja iona srebra s površine nanočestica. Srebro je u svom metalnom stanju inertno, ali reagira s vlagom u koži i s tekućinom iz rane te se ionizira. Ionizirano srebro je visoko reaktivno, veže se na proteine tkiva i dovodi do strukturne promjene stanične stjenke bakterija i nuklearne membrane što u konačnici može rezultirati staničnom smrti. (Castellano i sur., 2007; Lansdown, 2002).

2.2.3. Titanijev dioksid

Titanij je kemijski element koji je u periodnom sustavu elemenata označen simbolom Ti. Od spojeva titanija najvažniji je prirodni oksid, titanijev dioksid (TiO_2) koji dolazi u obliku minerala: rutila i anatasa. U čistom stanju je bijeli (na visokoj temperaturi žućkasti) prah, netopljiv u vodi, kiselinama i lužinama, a upotrebljava se kao najkvalitetniji bijeli pigment (titanijsko bjelilo) u bojama, lakovima i emajlima, te u keramici, kozmetici (kremama za sunčanje) i kao dodatak kaučuku i plastičnim masama (Titanium Dioxide Pigment – Sigurnosno tehnički list, Du Pont, msds.dupont.com, 2012). Unatoč tome što se nanočestice koriste u sastavu kućnih i kozmetičkih proizvoda, njegova upotreba u programima za obradu otpadnih voda koji uključuje oksidativnu degradacije biomolekula i katalitičku redukciju metalnih iona ističe potencijal zagađenja okoliša (Cho i sur., 2004). Nanočestice titanijeva dioksida koriste se u kremama za sunčanje kako bi zaštitile kožu od štetnog utjecaja UV

zračenja. Međutim, već je dokazano kako CeO_2NP imaju potencijal proizvodnje reaktivnih kisikovih radikala koji dovode do oštećenja stanica (Gurr i sur., 2005).

2.3. Sinteza i karakterizacija nanočestica

Metode proizvodnje nanomaterijala možemo podijeliti u dvije grupe. Prva se sastoji od lomljenja mikrostrukture u nanostrukturu (*eng. top-down approach*), a druga je proizvodnja nanomaterijala "atom po atom" ili "sloj po sloj" (*eng. bottom-up approach*).

U prvu grupu ("top-down") se ubrajaju metode: mehaničko mljevenje/ legiranje (eng. "mechanical milling/alloying"-MM/MA), intenzivna plastična deformacija masivnih uzoraka ("severe plastic deformation"-SPD), litografija, a u drugu grupu ("bottom-up"): sol-gel metoda – kemijska metoda, depozicija pomoću pare (Physical vapour deposition, PVD) – fizikalna metoda, kondenzacija u inertnom plinu (Inert gas condensation), termičko isparavanje, naparavanje pomoću elektrona (e-beam), raspršivanje (sputtering), ablacija laserom, kemijska depozicija para (Chemical Vapor Deposition, CVD proces) i epitaksijalni rast (MolecularBeamEpitaxy (MBE)) (Bistričić, 2017).

Iako postoje različite tehnike sinteze nanočestica, smatra se da su neke značajke zajedničke svim postupcima. To jest, sinteza nanočestica zahtijeva korištenje uređaja ili procesa koji ispunjavaju određene uvjete, kao što su: kontrola veličine čestica, raspodjela veličine, oblika, kristalne strukture i raspodijele sastava, poboljšanje čistoće nanočestica (niže nečistoće), kontrola agregacije, stabilizacija fizičkih svojstava, strukture i reaktanata, veća obnovljivost, veća masovna proizvodnja i manji troškovi (Horikoshi i Serpone, 2013).

Nanočestice se karakteriziraju prema veličini, morfologiji i površinskom naboju. Za karakterizaciju koriste se napredne mikroskopske tehnike kao što su mikroskopija atomskih sila (eng. Atomic Force Microscopy, AFM), skenirajući elektronski mikroskop (eng. Scanning Electron Microscopy, SEM) i transmisijski elektronski mikroskop (engTransmission Electron Microscope, TEM) (Bhatia, 2016).

Mikroskop atomskih sila jest mikroskop sa skenirajućom sondom (Scanning Probe Microscope - SPM) čiji se rad temelji na mjerenju međumolekulskih sila koje djeluju između atoma mjerne sonde i atoma ispitivanog uzorka (Bhatia, 2016).

Skenirajuća elektronska mikroskopska tehnika određuje veličinu, oblik i površinsku morfologiju s izravnim uvidom u nanočestice (Bhatia, 2016.).

Transmisijska elektronska mikroskopija može pružiti slikovne, difrakcijske i spektroskopske informacije, istovremeno ili u nizu, od uzoraka s atomskom ili sub-nanometarskom prostornom rezolucijom (Bhatia, 2016).

2.4. Izvori i ulazi nanočestica u okoliš

Sintetički nanomaterijali ulaze u okoliš atmosferskom emisijom, rijekama, podmorskim izvorima, u koje mogu doći ispuštanjem iz proizvodnih pogona ili su posljedica neadekvatnog transporta, uporabe i odlaganja upotrjebljenih proizvoda. U urbanim sredinama, pogonska goriva kao što su to diesel i benzin, izgaranjem stvaraju čestični materijal različitih dimenzija, uključujući pri tom i nanočestice u značajnim koncentracijama. Kad dođu u doticaj s tlom mogu ga kontaminirati, migrirati u površinske i podzemne vode i stupiti u interakciju s biotom. Čestice donesene otpadnim vodama, izravnim ispuštanjem ili slučajnim izlijevanjem mogu se transportirati vodenim sustavom, vjetrom ili oborinama (Moore, 2006).

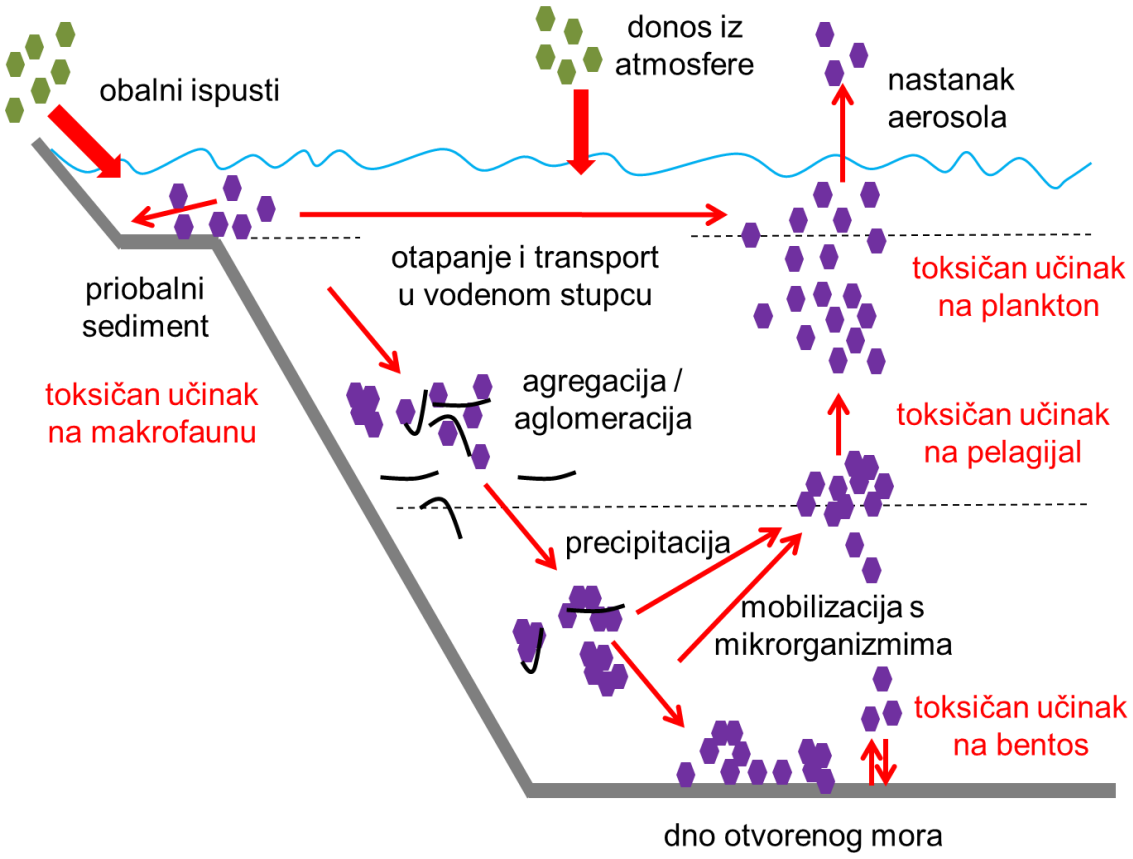
2.5. Ponašanje nanočestica u okolišu

Iako prirodne ultrafine čestice i umjetno proizvedene nanočestice pokazuju slična fizikalno-kemijska svojstva među njima postoje značajne razlike, koje mogu dovesti do različitih toksičnih učinaka u okolišu. Kod obiju skupina primarne su čestice dimenzija manjih od 100 nm, što im osigurava relativno veliku površinu po jedinici mase, samim time i relativno veliku površinsku aktivnost. Ovisno o koncentraciji i kemijskim svojstvima, obje vrste stvaraju aglomerate kada se nađu raspršene u plinovima ili tekućinama. Ultrafine čestice u okolišu lako stvaraju heterogene agregate dok sintetizirane nanočestice su najčešće u obliku monodispergiranih, individualnih čestica, koje mogu aglomerirati (Oberdörster i sur., 2007). Aglomerati su skupine čestice koje drže zajedno relativno slabe sile,dok su agregati skupina čestica u kojima se različite pojedinačne komponente ne mogu lako razdvojiti (Joner i sur., 2007). Daljnjim okupljanjem takvih struktura nastaju aglomerirani agregati prirodnih ultarfinih i umjetnih nanočestica kao i njihove smjese (Oberdörster i sur., 2007).

Istraživanja i saznanja o stabilnosti i agregaciji nanočestica u moru vrlo su oskudna. Prirodne vode imaju složene mehanizme i učinke na stabilnost, agregaciju i sedimentaciju nanočestica. Smatra se da u moru prevladavaju agregati nanočestica, a njihova struktura važan je faktor koji utječe na njihovo ponašanje, sudbinu i interakciju s tvarima u okolišu,

uključujući druga zagađivala i biotu (Slika 2). Što je agregat porozniji to mu je brzina sedimentacije veća u usporedbi s višim frakcijama agregata i nepropusnim sferama. Jednako tako, proces razgradnje ima važnu ulogu u nastanku mogućih interakcija nanočestica s okolišem. Ovisno u strukturi, do raspada agregata može doći na mjestima presjeka, gdje su oni najnestabilniji i mogu se lako slomiti, te na mjestima raslojavanja (površinska erozija i velika fragmentacija). Ti se procesi razlikuju po načinu na koji se odvijaju tj. samim mehanizmima raspadanja. Kod površinske erozije male čestice se odvajaju od površine agregata, dok se kod većih čestica ili većih fragmenata, agregati dijele na dva dijela usporedive veličine. Vrlo razgranati agregati malih dimenzija raspadaju se fragmentacijskim mehanizmima, dok se kompaktni agregati većih dimenzija raspadaju pomoću mehanizama površinske erozije (Christan i sur., 2008).

Morske vodene mase su općenito karakterizirane visokom ionskom jakošću i slabim alkalitetom te su bogate različitim koloidnim tvarima i prirodnim organskim tvarima. U more iz atmosfere i rijekama dospijevaju velike količine slatke vode te organska i anorganska zagađivala, uključujući nanočestice. Glavni izvori onečišćenja mora nanočesticama su kozmetički proizvodi i kreme za zaštitu od sunčevog zračenja, antivegetativni premazi i otpadne industrijske i komunalne vode. Sudbina nanočestica u moru ovisna je o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima, ali i o karakteristikama morske vodene mase. U priobalnim vodama može doći do taloženja nanočestica i njihovog daljnjeg otapanja i transporta do otvorenih voda. U vodenom stupcu dolazi do nastanka agregata i aglomerata nanočestica s organskim (fulvinskom i humičnom kiselinom, ugljikohidratima, aminokiselinama) i anorganskim tvarima. Takvi agregati/aglomerati se talože na morskom dnu ili mogu biti nošeni mikroorganizmima te se, uslijed specifičnih uvjeta, zadržavaju u dijelovima vodenog stupca i stupaju u interakcije s organizmima pelagijala. Nanočestice, sukladno svojim fizikalno-kemijskim svojstvima i morskim strujama, se raspršuju u vodenom stupcu otvorenog mora te prelaze u atmosferu pomoću aerosola. Taložeći se na morskom dnu aglomerirane ili raspršene u vodenom stupcu dolaze u kontakt s biotom pri čemu mogu izazvati toksičan učinak na organizme. Agregacijom, nanočestice mogu postati biološki dostupnije filtratorskim organizmima, poput raznih školjkaša (Matranga i Corsi, 2012).



Slika 2. Sudbina nanočestica u morskom ekosustavu (prema: Klaine i sur., 2008).

2.6. Unos i utjecaj nanočestica na živi organizam

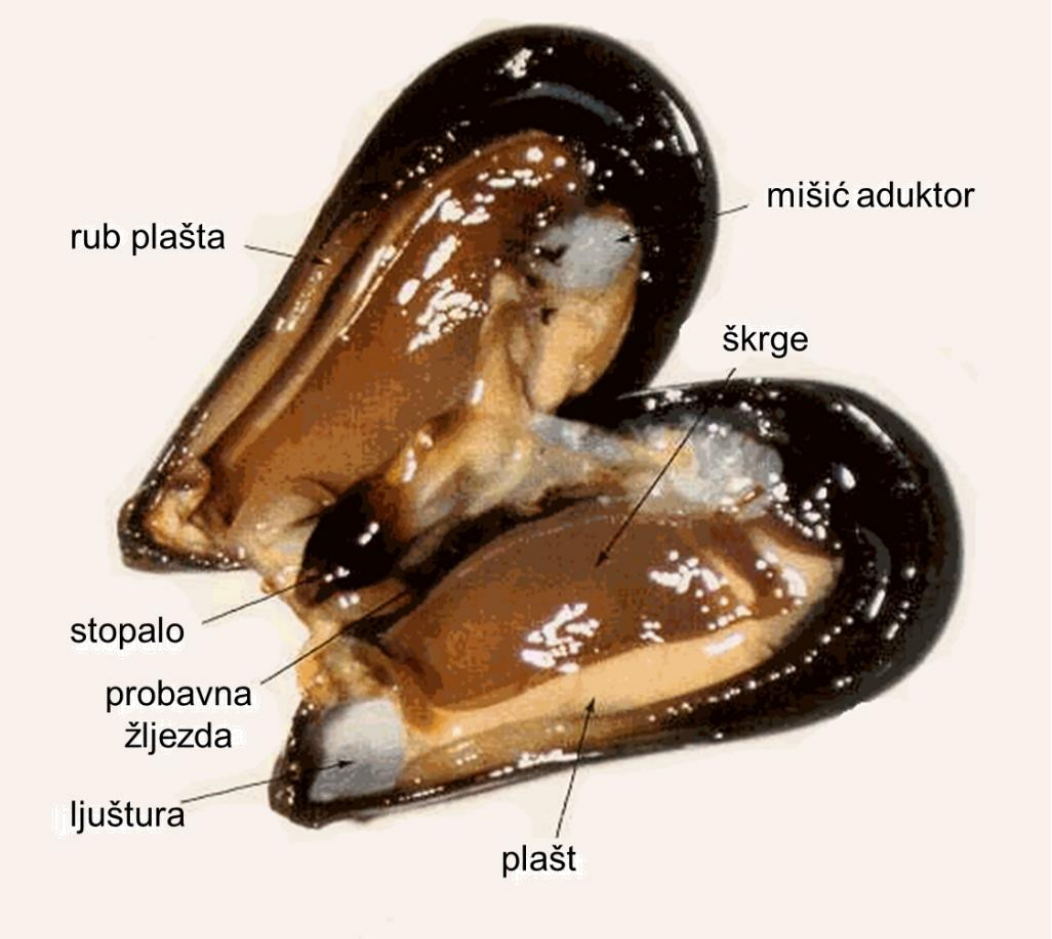
Glavnina unosa nanočestica kod kopnenih organizama odvija se disanjem ili gutanjem (Brigger i sur., 2002). Kod morskih organizama postoje i drugi načini unosa poput izravnog prijenosa preko škrga, mirisnih organa i vanjskog površinskog epitela (Oberdoster, 2004). Većina unosa nanočestica na staničnoj razini odvija se endocitozom. Endocitozom u stanici nanočestice mogu dospjeti uz pomoć endosomalnih i lizosomalnih odjeljaka ili putem stanično-površinskih lipidnih vezikula, kojima se izbjegava razgradnja materijala unesenog u stanicu (ili unutarstanični sustav). Ovaj put unosa koriste mnogi virusni patogeni, stoga su i u medicinskoj nanotehnologiji mnoge nanočestice dizajnirane s ciljem pronalaska specifičnih stanica (primjerice stanica raka) te ulaska u njih na ovaj način (Panyam i sur., 2003). Veliki površinski prostor ultra malih čestica može rezultirati direktnim stvaranjem štetnih kisikovih radikala (eng. Reactive Oxygen Species, ROS), koji uzrokuju oštećenja stanice napadajući DNA, proteine i membrane (Brown i sur., 2001). Za razliku od prokariota, beskralješnjaci su u mogućnosti usisati nanomaterijal prisutan u okolišu: direktnom ingestijom, kontaminiranim

plijenom, filtracijom vode, inhalacijom ili površinskim kontaktom. Nakon ulaska u more otopljene nanočestice i/ili njihovi agregati mogu u vodenom stupcu stupiti u interakcije s morskim algama, planktonom i drugim organizmima, a onaj dio koji se istaloži na morskom dnu postaje dostupan organizmima bentosa. Rizik za ljude povezan je s biokoncentracijom, bioakumulacijom i biomagnifikacijom toksikanta u beskralješnjacima (Baun i sur., 2008). Biokoncentracija je unos i čuvanje tvari u organizmu udisanjem iz vode u vodenim ekosustavima, ili iz zraka kod kopnenih organizama. Unos kemikalija i njihova koncentracija u organizmu, kroz sve moguće putove unosa, uključujući kontakte, disanje i gutanje, naziva se bioakumulacija. Biomagnifikacija se događa kada kemikalija pređe iz lanca hrane na više trofičke razine (Neely, 1980).

2.7. Dagnje – prednosti i nedostaci rada s dagnjama

Mediteranska dagnja, *Mytilus galloprovincialis* (Slika 3) je vrsta morskog školjkaša koja dominira u Mediteranu, također živi u Crnom moru te uz europske obale sjevernog Atlantika (Gardner i sur., 1992). Naseljava kamenitu zonu plime i oseke te uz to osigurava ekološke niše za druge organizme. Ima ljušturu trokutasta oblika, tamno modre do crne boje. Hrani se filtracijom morske vode, u čemu joj pomažu filibranhijalne škrge (Habdija i sur., 2011). Među morskim beskralješnjacima, upravo su se školjkaši pokazali kao pogodni biološki indikatorski organizmi za praćenje zagađenja morskog ekološkog sustava jer ukazuju ne samo na prisutnost ili odsutnost specifičnih zagađivala, već i na razinu zagađenja s periodičnim fluktuacijama (Jakšić, 2002). Oni ispunjavaju većinu kriterija važnih za dobre bioindikatore: vrlo su brojni, lako se sakupljaju tijekom cijele godine, široko su rasprostranjeni, predstavljaju bitnu kariku u hranidbenom lancu, sedentarni su organizmi, akumuliraju zagađivače, prikladne su veličine za istraživanja, dovoljno su robusni da prežive transport, preživljavaju u bočatim vodama, lako se određuju i imaju ekonomski veliku važnost (Raspor i sur., 2005). To su sesilni (sjedilački), eurihalini organizmi mediolitorala, koji naseljavaju i čista i zagađena područja. Prilagođavaju se različitim ekološkim parametrima (temperaturi, količini kisika, mogućnost prehrane), te su tolerantni na razne ekološke promjene. Hrane se suspendiranim česticama i neselektivno filtriraju velike količine vode (više od 4 l/h), te na taj način koncentriraju različite kemijske tvari u svojim tkivima, odnosno pokazuju veću bioakumulacijsku sposobnost od drugih organizama (Jakšić, 2002). Škrge školjkaša se koriste za istraživanja kratkoročnog onečišćenja metalima. Probavna žlijezda je bitna za metabolizam metala te predstavlja tkivo za dugotrajnu pohranu metala (Hamza-

Chaffai i sur., 2000). Dagnje se često uzgajaju u kavezima za procjenu kvalitete vode. Uzgoj u kavezima se primjenjuje jer sprječava izmjenu genetičkog materijala između populacija te omogućava kontrolu starosti i spolne zrelosti uzoraka (Pellerin i Amiard, 2009).



Slika 3. Dijelovi dagnje My*tilus galloprovincialis*

Biotestovi su alati koji se koriste za procjenu opasnosti po okoliš kako bi dobili odgovor na pitanja o opasnosti kemijskih tvari koje su puštene u okolinu. Kada se procjena opasnosti

usporedi s procjenom izloženosti, potencijalni rizik od štetnih učinaka može se okarakterizirati (Crane i sur., 2008).

Testovi toksičnosti se usredotočuju na učinke tvari na razini organizma, proučavaju štetne (toksične) učinke agensa, istraživanjem procesa unosa, raspodijele, metabolizma, transformacije te izlučivanja zagađivala - ksenobiotika na nivou pojedinog organizma, odnosno jedinke (Hamer, 2010).

Genotoksikologija je multidisciplinarna znanost koja utvrđuje negativan učinak tvari na strukturu i funkciju genetičkog materijala. Može uključivati promjene u jedinkama, kao npr. oštećenja molekule DNA, ili učinke na razini populacije, kao što su promjene u genetičkoj raznolikosti ili učestalosti pojedinih gena (Theodorakis, 2001).

Učinak različitih onečišćivača u dagnji može se procijeniti raznim testovima imunotoksičnosti *in vivo* i *in vitro*;

a) određivanjem stabilnosti lizosomalnih membrana (test zadržavanja neutralnog crvenila unutar lizosoma hemocita),

b) aktivnošću makrofaga,

c) određivanjem aktivnosti enzima oksidacijskog stresa (npr. katalaze, glutation-S-transferaze, superoksid dismutaze),

d) aktivnošću lizozima.

Specifični testovi imunotokstičnosti, genotoksičnosti ili oksidacijskog stresa, mogu pomoći u razumijevanju glavnih mehanizama toksičnosti i načina djelovanja koji bi mogli biti relevantni za različite vrste nanočestica u vodenim organizmima (Crane i sur., 2008).

2.7.1. *Stres na stres* test

Stres je fiziološko stanje organizma inducirano okolišnim čimbenicima u kojemu je narušena homeostaza i smanjuje se sposobnost preživljavanja organizma (Brett, 1958). Mjerenje stresa u organizmima moguće je morfometrijski, raznim indeksima, biokemijskim metodama i promjenama u ponašanju. U zoni plime i oseke gornja granica uvjetovana je abiotičkim faktorima kao što su suša i temperaturne promjene, a donja granica biotičkim

čimbenicima poput intra- i interspecijskih odnosa, predacijom, parazitima i slično (Conell, 1961). Test preživljavanja na zraku mjeri koliko dugo dagnje mogu preživjeti izvan mora. Riječ je o jeftinom testu koji ne zahtijeva skupu opremu. Ovim testom moguće je utvrditi opće fiziološko stanje školjkaša pod utjecajem okolišnih čimbenika (Viarengo i sur., 1995). Očekuje se da takav parametar može poslužiti u biomonitoringu morskog okoliša, uspoređujući vrijeme preživljavanja školjkaša na zraku sa čistog i zagađenog područja.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada jest:

a) analiza učinka različitih koncentracija nanočestica srebra, cerija i titanija na nivou cijelog organizma dagnje *Mytilus galloprovincialis*, pomoću SOS test metode,
b) usporedba učinka različitih koncentracija nanočestica na organizam,
c) opis dobivenih rezultata te
d) usporedba UV- apsorbancije nanočestica u ultračistoj i morskoj vodi

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Kemikalije

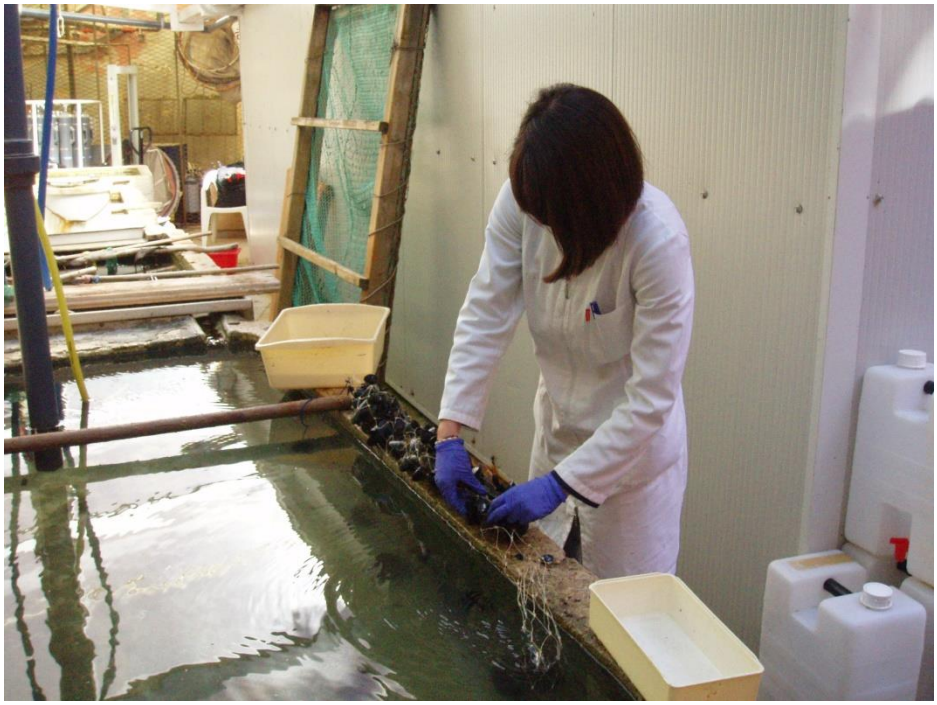
U radu su korištene sljedeće kemikalije: nanočestice srebra (AgNP), nanočestice cerijevog(IV) oksida (CeO_2NP) i nanočestice mineralnih formi titanijeva dioksida: anatasa i rutila (A-TiO_2 NP i R-TiO_2 NP).



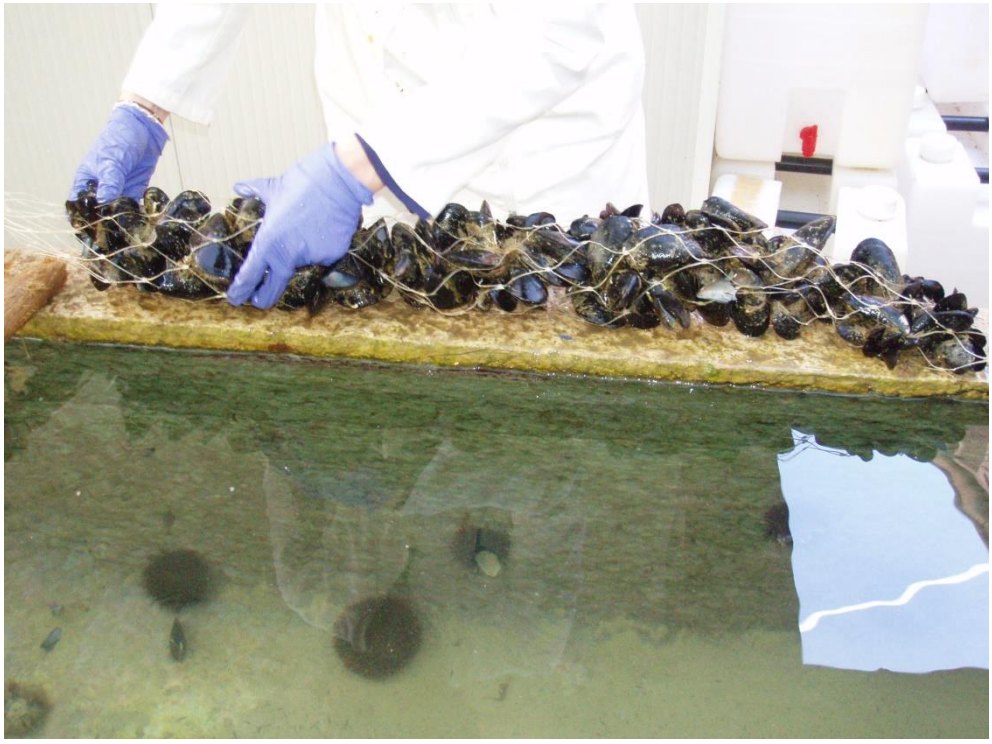
Slika 4. Otopine nanočestica srebra (lijevo), cerijevog(IV) oksida (sredina) i titanijeva dioksida (desno) (fotografije iz osobne arhive, 2013).

4.2. Izlaganje dagnji nanočesticama

U svrhu istraživanja korištene su dagnje iz uzgajališta u Limskom zaljevu. U protočnim bazenima vanjskog dvorišta Centra za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju, jedinke dagnji stajale su dulji vremenski period, što je utjecalo na njihovo biološko stanje (Slika 5 i 6).

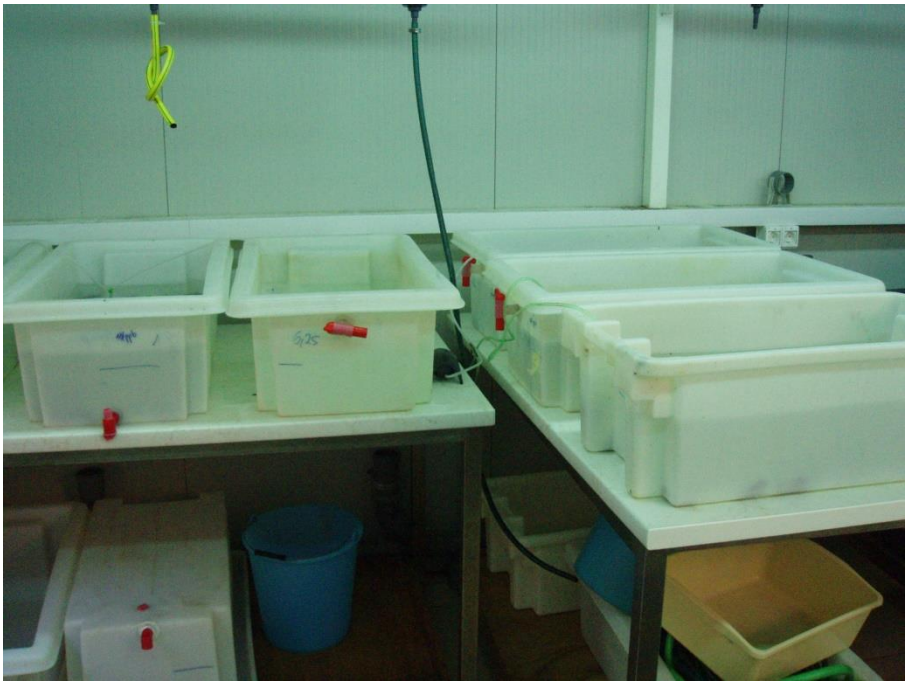


Slika 5. Protočni vanjski bazeni koji služe za aklimatizaciju dagnji u dvorištu Centra za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković.



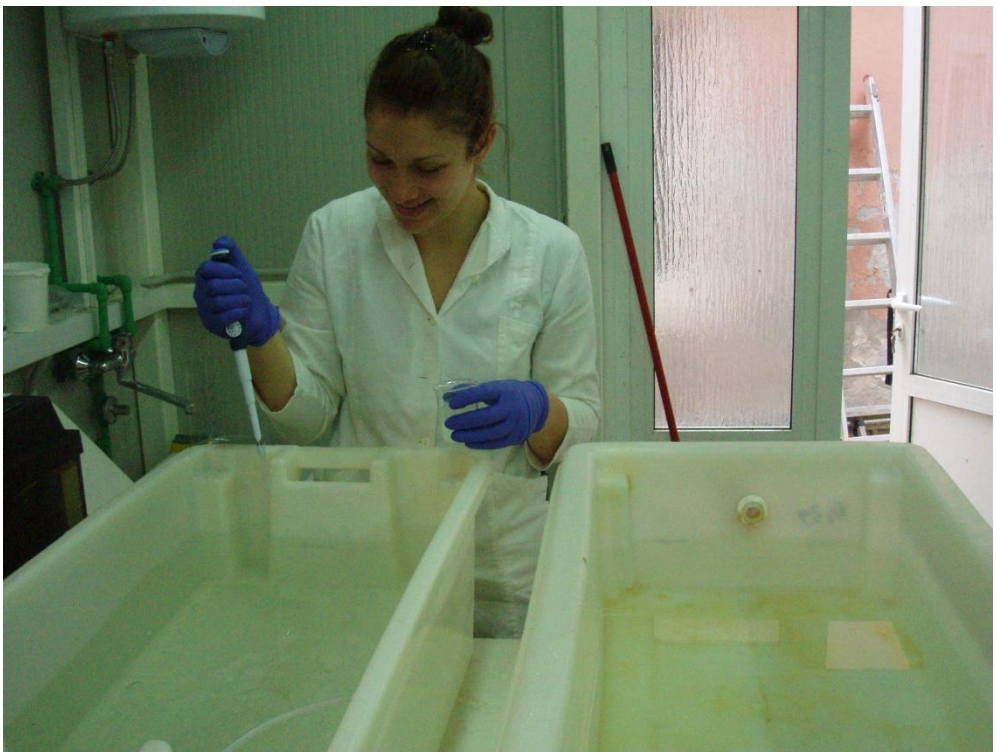
Slika 6. Dagnje iz protočnog vanjskog bazena u dvorištu Centra za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković.

U laboratoriju pod kontroliranim uvjetima, temperature i svjetlosti, postavili smo pet bazena s 37.5 L morske vode po tretmanu, odnosno vrsti ispitivanih nanočestica (Slika 7).



Slika 7. Bazeni s morskom vodom.

Bazeni u mokrom laboratoriju nisu bili protočni stoga smo u njih postavili pumpe, kako bi dagnjama bila osigurana dostupnost kisiku iz zraka. U svaki bazen stavili smo po 50 jedinki dagnji koje smo izložili nanočesticama cerijeva(IV) oksida, srebra i titanijeva dioksida (rutila i anatase) (Slika 8).

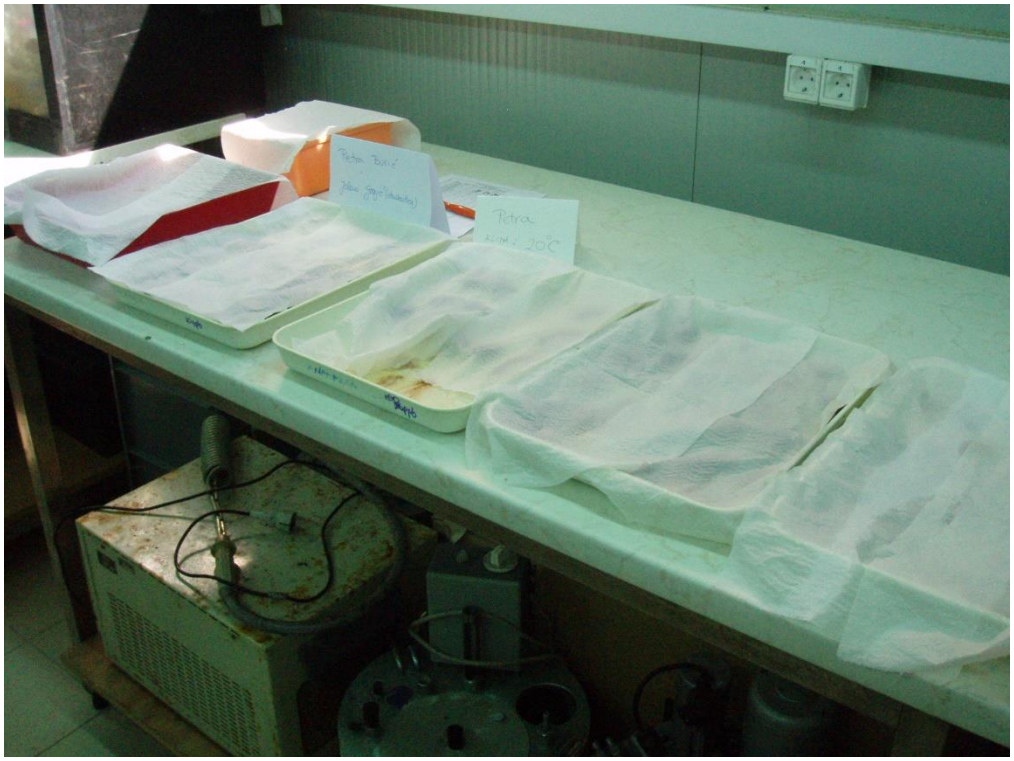


Slika 8. Unos nanočestica u bazene.

Jedan bazen u svakoj skupini nije izlagan te je on predstavljao kontrolni bazen. Dagnje u ostalih četiri bazena izlagane su različitim koncentracijama odabranih nanočestica (CeO_2NPs; 10 µg/L, 500 µg/L i 1000 µg/L; AgNPs; 1 µg/L, 10 µg/L, 50 µg/L i 100 µg/L i A-TiO_2 i R- TiO_2 NPs; 500 µg/L i 1000 µg/L). Školjke su bile izložene 24 h. Nakon uzorkovanja postavili smo ih na pladnjeve prethodno zaštićene papirnatim ubrusima i podvrgnuli testu preživljavanja na zraku kako bi utvrdili njihov fitnes. Svaki dan u isto vrijeme bilježen je broj mrtvih jedinki (Slike 9 i 10).



Slika 9. Pladnjevi s uzorkovanim dagnjama.



Slika 10. Dagnje na pladnjevima pokrivene vlažnim papirnatim ubrusima te izložene zraku.

4.3. UV- spektroskopija na spektrofotometru „ Shimadzu UV- 1800“

Apsorbcija elektromagnetskog zračenja u UV i vidljivom spektru rezultira promjenama u energiji elektrona ispitivanih molekula. Fenomen apsorbcije se može opisati Beer-Lambertovim zakonom ($\log (Io/I) = \varepsilon cl$). I_0 je intenzitet ulazne svjetlosti, I je intenzitet izlazne svjetlosti, c je molarna koncentracija, l je duljina puta svjetlosti, a ε je molarni ekstinkcijski koeficjent. Lijeva strana jednadžbe ($\log I_o/I$) označava apsorbanciju Aλ na određenoj valnoj duljini λ.

Spektrofotometar je uređaj kojim se mjeri apsorbcijski spektar. Glavni dijelovi spektrofotometra su izvor svjetlosti, monokromator, fotodetektor i kiveta. Kao izvor svjetlosti se najviše koriste deuterijeva (210-370 nm) i volfram-halogena (290-900 nm) žarulja. Monokromator služi da svjetlost iz žarulje, koja je različitih valnih duljina, razloži na pojedine valne duljine. Svjetlost koja je prošla kroz uzorak se detektira fotodetektorom koji može biti fotomultiplikatorska cijev ili fotodioda. Uzorak se nalazi u staklenoj, plastičnoj ili najčešće u kvarcnoj kiveti (Sheehan, 2009).

Mjerenje UV-Vis spektara otopina nanočestica srebra i titanij dioksida provodilo se u ultračistoj vodi (milli-Q vodi) te u umjetnoj morskoj vodi (eng. artificial sea water). Milli-Q H_2O je zaštitni znak Millipore korporacije koji označava ultračistu vodu tipa 1. Sukcesivnim koracima filtracije i deionizacije se dobiva čistoća karakterizirana električnom provodljivošću od 18.2 MΩ cm pri 25°C. Za mjerenja je korišten spektrofotometar Shimadzu UV- 1800 s konfiguracijom od dva snopa svijetlosti. Spektar je zabilježen na valnoj duljini od 300- 800 nm na rezoluciji od 1 nm, s uzorcima držanim u kvarcnim kivetama.

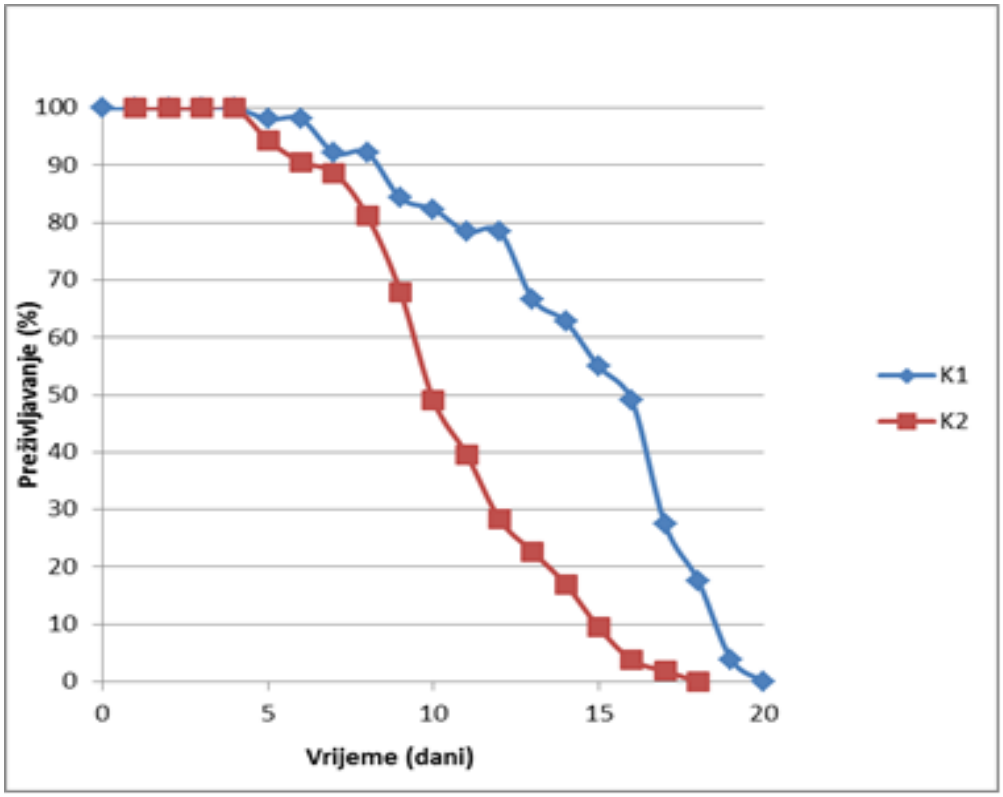
Nanočestice pokazuju fenomen površinske plazma rezonancije (SPR, od engl. Surface Plasmon Resonance) koji je posljedica kolektivnih oscilacija i fluktuacija u elektronskoj gustoći s interaktivnim električnim poljem, a koje su izrazito osjetljive na adsorpciju molekula na metalne površine (Klaine i sur., 2012).

5. REZULTATI

5.1. *Stres na stres* test

Rezultati SOS testa preživljavanja školjkaša na zraku između jedinki, pokazali su da najkraće preživljavaju dagnje izložene nanočesticama titanijeva dioksida, nakon njih slijede jedinke izložene nanočesticama srebra i zatim jedinke tretirane nanočesticama cerijeva(IV) oksida. Najduže vrijeme preživljavanja na zraku imaju netretirane dagnje (K1), što je bilo i za očekivati.

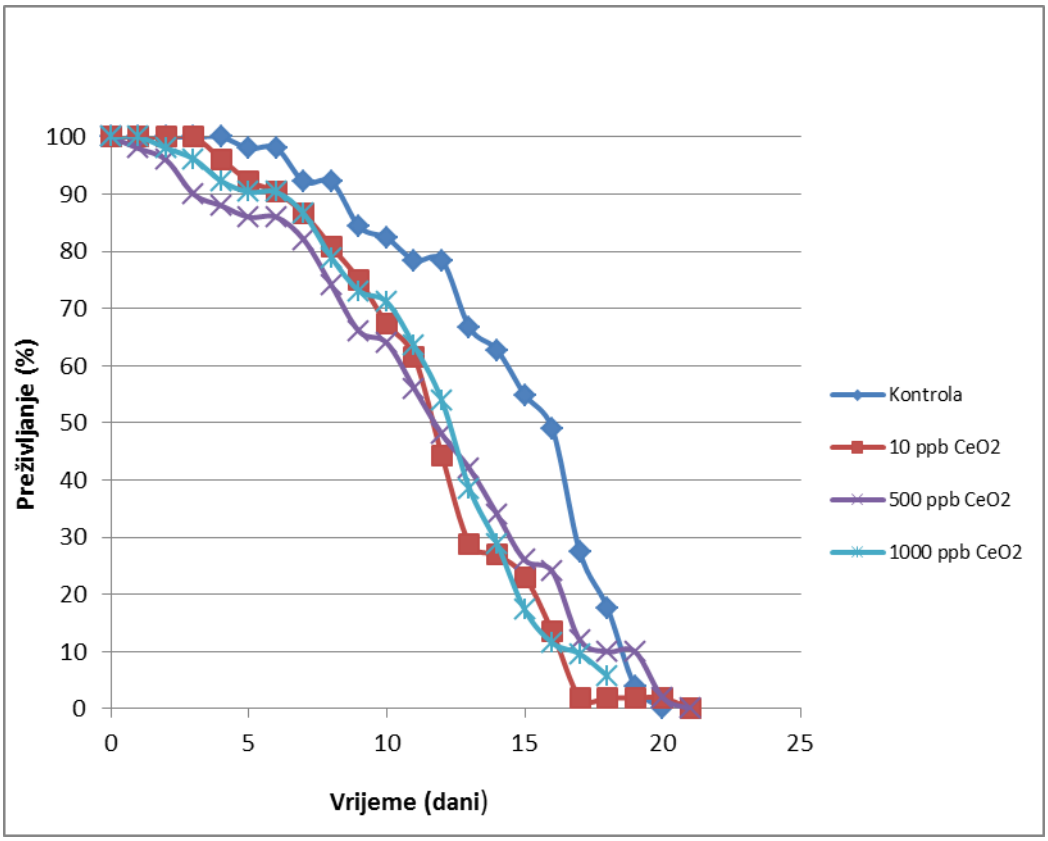
Dio dagnji, koje su se koristile za eksperiment, bio je u lošijem stanju. Dagnje su bile iz različitih pergolara i donesene iz Limskog kanala u razmaku od osam dana. Treba napomenuti da je kontrolna skupina (K2) postavljena nakon više od dva tjedna stajanja u vanjskim protočnim bazenima, te je moguće da je nedostatak hrane utjecao na fiziološko stanje dagnji što se pokazalo i u rezultatima. Eksperiment s drugom kontrolom i nanočesticama srebra dao je niže vrijednosti preživljavanja same kontrole. U prvoj kontroli preživljavanje je bilo iznad 80%, do 14- og dana, dok je u drugoj kontroli iznosilo svega 7 dana (Graf 1). Ovu pojavu možemo objasniti starošću dagnji odnosno duljim vremenom zadržavanja u vanjskom protočnom bazenu na aklimatizaciji. Usporedba dviju kontrola prikazana je na Graf 1 iz koje se vidi utjecaj stanja dagnji na preživljavanje na zraku.



Graf 1. Graf prikazuje usporedbu stope preživljavanja dagnji u kontroli 1 i kontroli 2.

5.1.1. *Stres na stres* test na dagnjama izloženih CeO_2 nanočesticama

Testom preživljavanja školjkaša na zraku i dobivenim rezultatima, može se vidjeti da su dagnje oslabljene izlaganjem zraku uz prethodno izlaganje CeO_2NPs ovisno o primijenjenoj koncentraciji (Graf 2). Dagnje korištene u eksperimentu 5. lipnja 2013. za ispitivanje toksičnosti CeO_2NPs bile su donesene iz Limskog zaljeva 22. svibnja 2013. i stavljene u vanjski protočni bazen. Veličina nanočestica cerijev(IV) oksida koje smo koristili je 10 nm. Krivulja kontrolnih dagnji pokazuje nešto bolje preživljavanje u usporedbi s uzorcima tretiranim različitim koncentracijama CeO_2NPs. Kod tretiranih uzoraka nema razlike ovisno o primijenjenoj koncentraciji, što može govoriti u prilog činjenici da se nanočestice u višim ispitivanim koncentracijama nakupljaju i agregiraju te samo dio dolazi u interakciju s dagnjama i izaziva negativan učinak na njihovo preživljavanje.

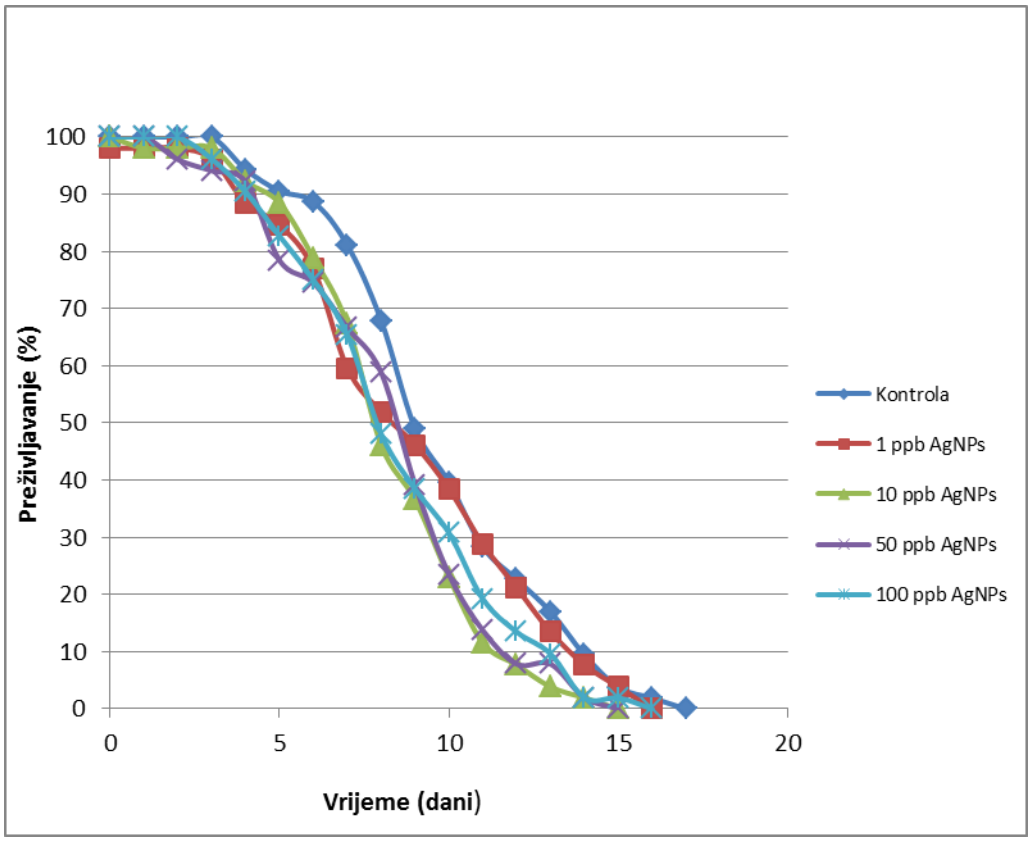


Graf 2. Graf prikazuje stopu preživljavanja dagnji izloženih nanočesticama cerijeva(IV) oksida.

Kod kontrolnog uzorka LT_{50} (eng. *Lethal Time*) iznosio je šesnaest dana. LT_{50} kod koncentracije od 10, 500 i 1000 µg/L bio je dvanaest dana.

5.1.2. *Stres na stres* test na dagnjama izloženih nanočesticama Ag

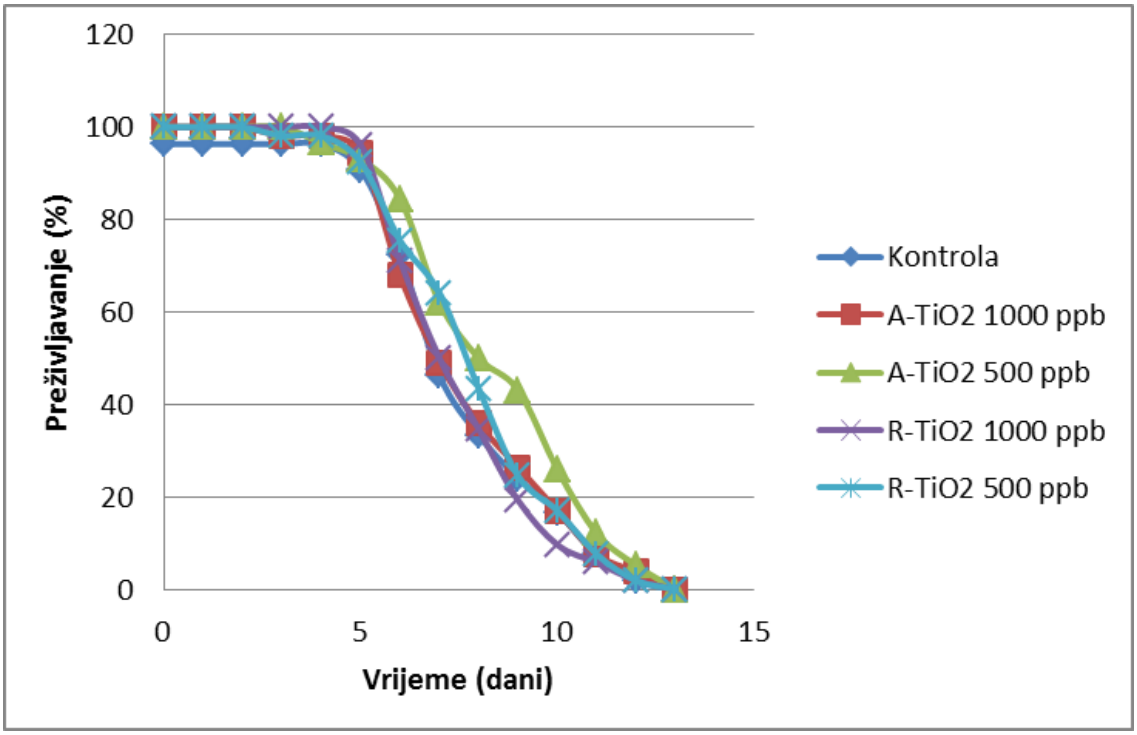
Eksperiment tretiranja dagnji s AgNPs koncentracija: 1, 10, 50, 100 µg/L postavljen je 18. lipnja 2013. Pergolar dagnji uzet je iz Limskog kanala 31. svibnja 2013. U ispitivanju utjecaja različitih koncentracija AgNPs, na preživljavanje dagnji na zraku nije došlo do značajne razlike u usporedbi s netretiranim uzorkom, odnosno kontrolom. Razlog tome može biti vrlo niska koncentracija primijenjenih nanočestica. Rezultati ukazuju i na loše fiziološko stanje uzorkovanih organizama zbog dužeg zadržavanja u vanjskom protočnom bazenu na aklimatizaciji. Kako su nanočestice srebra topive u vodi, kod njihovog učinka imamo djelovanje nanočestica od 60 nm, ali i djelovanje iona koji se s vremenom otpuštaju s površine nanočestica. Dok kod drugih dviju vrsta ispitivanog materijala nemamo takav slučaj. Srednje vrijeme preživljavanja (LT_{50}) jedinki kod svih koncentracija iznosi između osmog i devetog dana (Graf 3).



Graf 3. Graf prikazuje stopu preživljavanja dagnji izloženih nanočesticama srebra.

5.1.3. *Stres na stres test* na dagnjama izloženih nanočesticama TiO_2

Kod dagnji izloženih nanočesticama titanijeva dioksida; A-TiO_2 (50 nm) i R-TiO_2 (20 nm) primjećujemo sličnu pojavu kao kod nanočestica srebra (Graf 4). Eksperiment je postavljen 26. srpnja 2013. U ispitivanju utjecaja dviju koncentracija A-TiO_2 i R-TiO_2 na preživljavanje dagnji nije se pokazala nikakva razlika u usporedbi s kontrolom. LT_{50} kod kontrole iznosio je sedam dana. Kod koncentracija od 1000 µm/L A-TiO_2 i R-TiO_2 srednje vrijeme preživljavanja bilo je sedam dana, dok je kod 500 µm/L A-TiO_2 i R- TiO_2 iznosilo osam dana. Nanočestice u koncentraciji od 500 µm/L A-TiO_2 i R- TiO_2 izazvale su u malom omjeru specifičan odgovor na toksičnost, koji nazivamo hormezom. Hormeza je kontroverzna ideja, koja zagovara mišljenje da niža koncentracija može uzrokovat drugačiji i/ ili pozitivan odgovor od kontrolne skupine.

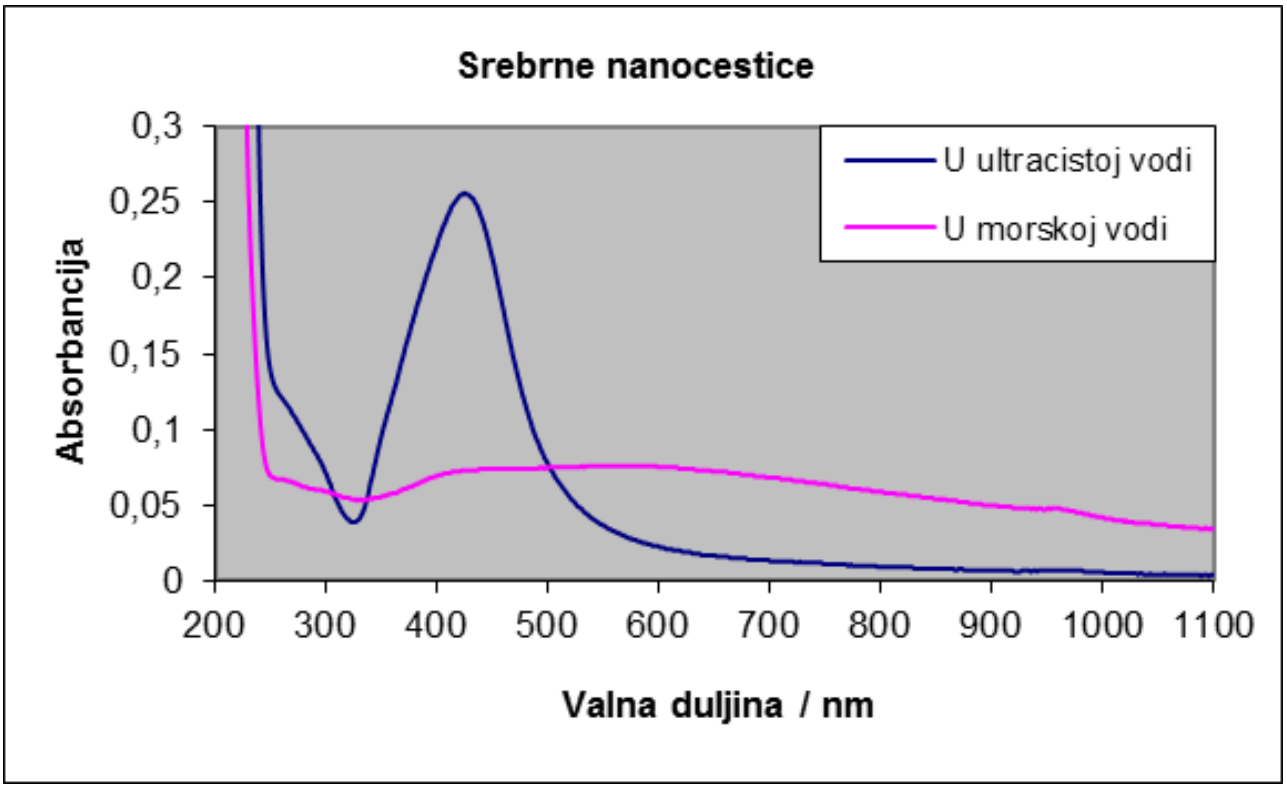


Graf 4. Graf prikazuje stopu preživljavanja dagnji izloženih nanočesticama titanijeva dioksida.

5.2. UV- spektroskopija na spektrofotometru „ Shimadzu UV- 1800“

5.2.1. Metoda UV- spektroskopije na spektrofotometru „ Shimadzu UV- 1800“ za AgNP

Kako bi ispitali razliku u ponašanju nanočestica srebra u ultračistoj i morskoj vodi koristili smo metodu UV- spektroskopije. Iz grafa UV- apsorbancije AgNP u ultračistoj vodi vidimo da je maksimum apsorbcije pri valnoj duljini od 425 nm i iznosi 0.256 (Graf 5). Ovako visok maksimum možemo pripisati površinskoj plazmonskoj rezonanciji (SRP) nanočestica srebra.

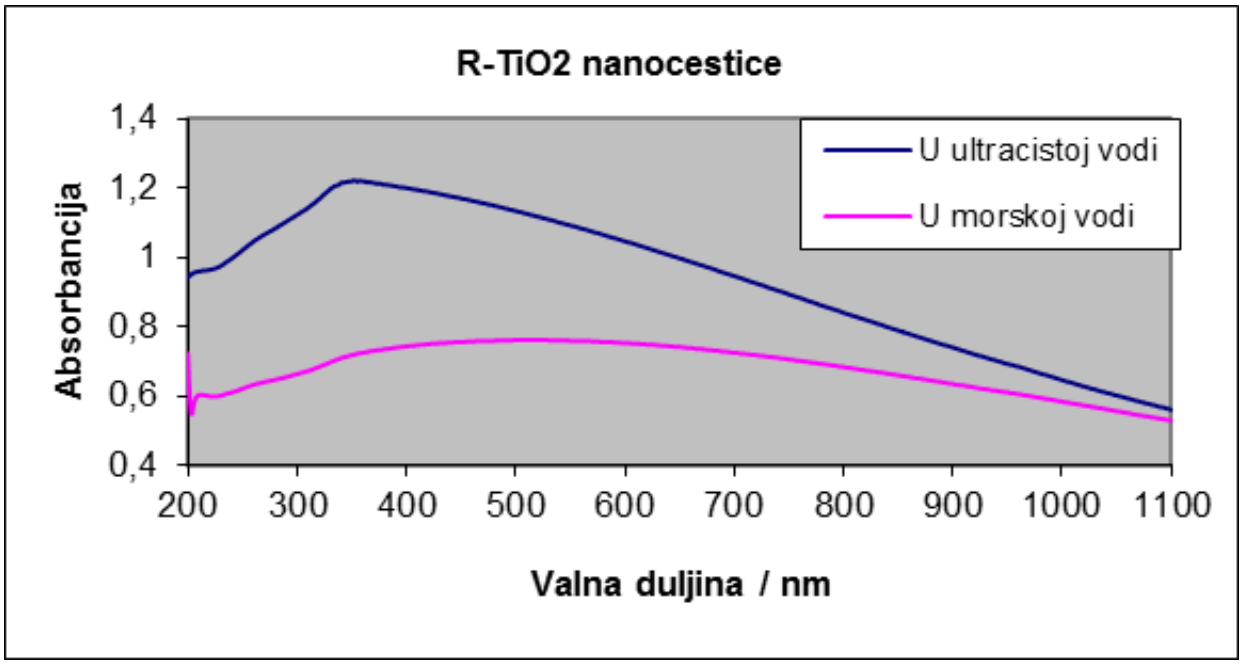


Graf 5. UV spektrofotometrijske krivulje AgNPs: plavom bojom prikazana je krivulja nanočestica srebra (100 µg/L) u ultračistoj vodi dok je ružicastom linijom prikazana krivulja apsorbancije AgNPs u umjetnoj morskoj vodi.

Ispitivanjem ponašanjem nanočestica srebra u morskoj vodi pak dobili smo sasvim drugačiju krivulju koja pokazuje maksimum apsorbcije pri valnoj duljini od 580 nm. Ovu pojavu pripisujemo stvaranju aglomerata što utječe na pada intenziteta apsorbcije.

5.2.2. Metoda UV- spektroskopije na spektrofotometru „ Shimadzu UV- 1800“ za R-TiO_2

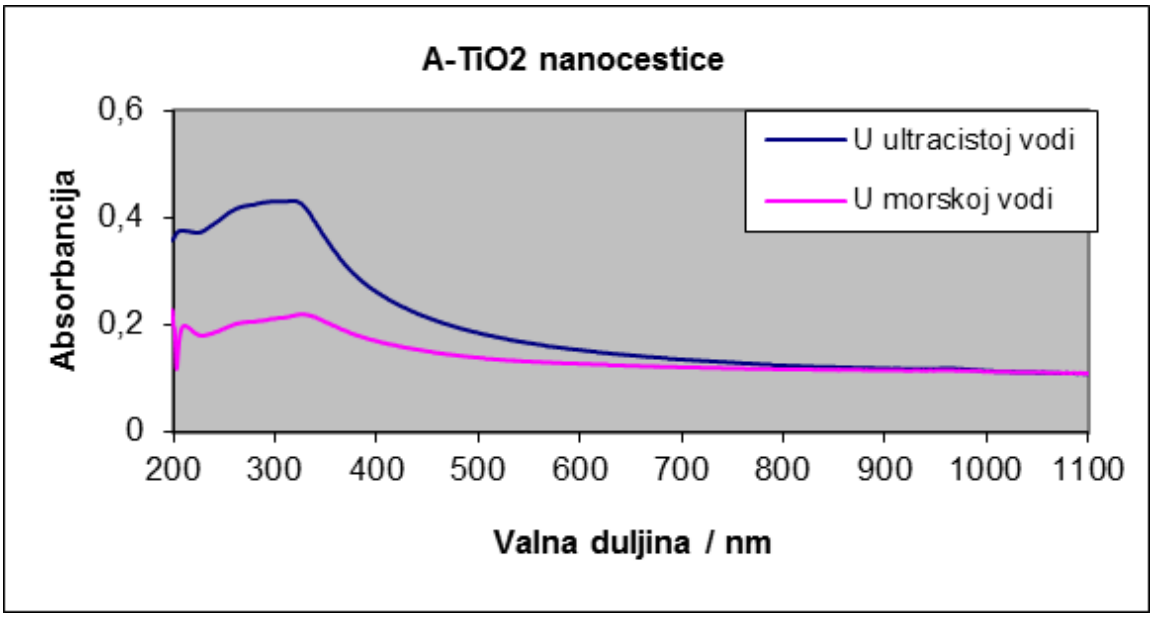
Krivulja nanočestica rutil titanij dioksida u ultračistoj vodi prikazuje maksimum apsorbcije od 1.22 pri valnoj duljini od 354 nm. Ulaskom u morsku vodu dolazi do slične pojave kao kod nanočestica srebra, gdje dolazi do pada intenziteta apsorbcije, širenje pika i pomak prema nižoj energiji koju dokazaju agregacija (Graf 6).



Graf 6. UV spektrofotometrijske krivulje R-TiO_2NPs: plavom bojom prikazana je krivulja nanočestica rutil titanijeva(IV) oksida (100 µg/L) u ultračistoj vodi dok je ružicastom linijom prikazana krivulja istih čestica u umjetnoj morskoj vodi.

5.2.3. Metoda UV- spektroskopije na spektrofotometru „ Shimadzu UV- 1800“ za A-TiO_2

Nanočestice anatas titanijeva dioksida ne pokazuju drastičnu razliku između ispitivanja u ultračistoj i morskoj vodi. U ultračistoj vodi vrhunac apsorbacije ostvaruje se pri valnoj duljini od 322 nm. U oba ispitivana uzorka otprilike nakon valne duljine od 350 nm dolazi do pada intenziteta apsorbancije.



Graf 7. UV spektrofotometrijske krivulje A-TiO_2NPs: plavom bojom prikazana je krivulja nanočestica anatasnog titanijeva(IV) oksida (100 µg/L) u ultračistoj vodi dok je ružicastom linijom prikazana krivulja istih čestica u umjetnoj morskoj vodi.

6. RASPRAVA

U ovom radu istraživan je biološki odgovor dagnji, najpogodnijih indikatora onečišćenja morskog ekosustava, izloženih različitim koncentracijama industrijski važnih nanočestica.

Thomas i sur. (1999) upozoravaju na dosadašnja istraživanja i uočene posljedice opravdanost i nužnost izučavanja mehanizma djelovanja i učinka novosintetiziranih umjetnih nanomaterijala i nanočestica na morske bioindikatorske organizme poput dagnje. Unatoč činjenici da su prethodna terenska istraživanja otkrila da izloženost zagađenju može smanjiti sposobnost opstanka na zraku, postoje rezultati koji pokazuju također da vrijeme preživljavanja nakon izlaganja zraku ne ovisi potpuno o zagađenju, jer se kod dagnji sa značajno višim koncentracijama štetnih tvari nije znatno smanjilo vrijeme preživljavanja u usporedbi s referentnim grupama. Koukouzika i Dimitriadis (2004) navode kao posljedicu mogućnost da su dagnje s onečišćenih područja razvile veću fiziološku toleranciju te iz tog razloga pokazuju povećani LT_{50}. Osim toga, preživljavanje na zraku direktno je povezano s koncentracijama onečišćenja u dagnji izloženih kratko vrijeme u laboratorijskim uvjetima (Koukouzika i Dimitriadis, 2004).

U ovom radu vidljivo je iz dobivenih rezultata da su dagnje koje su bile u boljem fiziološkom stanju u kontrolnom uzorku pokazale jasniji odgovor na utjecaj nanočestica. Možemo zaključiti kako promjene temperatura, morske struje, dostupnost hrane kao i drugi ekološki faktori bitno utječu na odgovor dagnji na onečišćenje.

Upotreba *stres na stres* testa kao metode u istraživanjima biomonitoringa podupiru i brojni radovi pa tako i Koukouzika i Dimitriadis (2004) koji smatraju kako su potrebna detaljnija istraživanja na terenu i u laboratoriju, da bi se ispitali mogući utjecaji onečišćenja i prirodni faktori na preživljavanje školjkaša na zraku.

Za estuarijska i obalna područja pretpostavlja se da predstavljaju krajnje odredište nanočestica, gdje bi njihovo kemijsko ponašanje, agregacija i aglomeracija, moglo biti kritično za utvrđivanje biološkog učinka. Zhang i sur. (2008, 2012) zaključuju kako veličina nanočestica u prirodnim vodama određuje njihovu stabilnost, toksičnost i na posljetku sudbinu. Keller i sur. (2010) smatraju da je veličina nanočestica povezana s kemijskim sastavom otopine, uključujući prirodne organske tvari (eng. NOM, Natural Organic Matter), ione i pH. Naime, oni su otkrili da tri vrste nanočestica (TiO_2, ZnO, CeO_2) mogu lako agregirati kada je ionska snaga visoka i ukupni organski ugljik nizak, i obrnuto. NOM u morskom sustavu ima važnu ulogu u transportu i transformaciji nanočestica. Apsorpcija

NOM-a smanjuje površinski zeta potencijal i mijenja elektrostatski otpor, što utječe na stabilnost nanočestica (Yang i sur., 2009).

Među nanomaterijalima, TiO_2 nanočestice se koriste u širokom rasponu prizvodu uključujući boje, građevinski materijal, kozmetika i kreme za sunčanje, te pronalaze svoj put do mora. Koriste se kako bi pojačale bjelinu i neprozirnost proizvoda. US Environmental Protection Agancy (2010) spominje kako su čiste nanočestice titanijeva dioksida pri izlaganju UV zračenju, fotokatalitičke. Ta sposobnost sve se više eksploatira za degradaciju organskih spojeva, za antimikrobnost i za konvertiranje metala u manje topive forme u otpadnim vodama i vodi za piće. Svijetlom induciran anatasni titanijev dioksid izaziva veću citotoksičnost i genotoksičnost nego rutil (Skocaj, 2011). Ove razlike, obješnjavaju Oberdoster i sur. (2005), moguće su zbog činjenice da čestice anatase posjeduju širu apsorpcijsku prazninu i manju efektivnu masu elektrona, koje rezultiraju većom mobilnošću nosača naboja i boljom generacijom reaktivnih kisikovih spojeva.

7. ZAKLJUČAK

Dobivenim rezultatima i njihovom obradom zaključujem da analiza učinka nanočestica na razini cijelog organizma nije dovoljan pokazatelj utjecaja nanočestica. Dobiveni rezultati nisu pokazali odgovor na nanočestice titanij dioksida i srebra na nivou cijelog organizma, što može aludirati na njihovu netoksičnost. Nanočestice cerijeva(IV) oksida kod dagnji su pokazale specifičan odgovor na toksičnost. Moguće je da su manje čestice (10 nm CeO_2NP) toksičnije od nešto većih zbog toga što je njihov unos u stanicu olakšan. Toksičnost ne djeluje na svim nivoima organizma jednako te je potrebno testirati utjecaj na nivou stanice i molekule kako bi dobili relevantnije podatke.

Metodom UV- spektroskopije utvrdili smo, pomoću praćenje intenziteta UV-apsorbancije, da nanočestice u morskoj vodi agregiraju. Sposobnost agregiranja može utjecati na dagnje, budući da se agregati lakše akumuliraju na škrgama nego individualne čestice.

8. LITERATURA

BAUN, A., HARTMANN, N. B., GRIEGER, K., I KUSK, K. O. (2008.) *Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: A brief review and recommendations for future toxicity testing. Ecotoxicology* 17(5), 387-395.

BHATIA, S. (2016.) Natural Polymer Drug Delivery Systems Springer International Publishing Switzerland 40-43.

BISTRIČIĆ L., *Uvod u nanoznanost: https://www.fer.unizg.hr/_download/repository/Uvod_u_nanoznanost_L._Bistricic.pdf*

BRETT J. R. (1958.): *Implications and assessments of environmental stress*. U: Larkin. P. A. (ur.) Investigation of Fish–power Problems. Vancouver, Univ. of British Columbia, 69–83.

CHO M., CHUNG H., CHOI W., YOON J. (2004.) *Linear correlation between inactivation of E. coli and OH radical concentration in TiO_2 photocatalytic disinfection.* Water Res. (38), 1069–1077.

CHRISTIAN, P., VON DER KAMMER, F., BAALOUSHA, M., & HOFMANN, T. (2008.) *Nanoparticles: Structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. Ecotoxicology,* 17(5), 326-343.

CONNELL, J. H. (1961.) *The influence of interspecific competition and other factors on the distribution of the barnacle Chthamalus stellatus*. Ecology. 42,710–723.

CRANE M., HANDY R. D., GARROD J., OWEN R. (2008.) *Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles*. Ecotoxicology.17, 421–437.

DU PONT (2012.) ; Sigurnosno tehnički list, Titanium Dioxide Pigment; msds.dupont.com

DOPUĐA B. (1999.-2008.) za PSB: http://www.pse.pbf.hr/

GARDNER J. P. A.,(1992.): *Mytilus galloprovincialis (Lmk) (Bivalvia, Mollusca): the taxonomic status of the Mediterranean mussel*. Ophelia 35, 219–243.

GRIFFITT R. J., WEIL R., HYNDMAN K., DENSLOW N. D., POWERS K., TAYLOR D. i BARBER D. S. (2007.) *Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish* (Danio rerio) Environmental Science and Technology, 41, 8178–8186.

HABDIJA I., PRIMC HABDIJA B., RADANOVIĆ I., ŠPOLJAR M., MATONIČKIN KEPČIJA R., VUJČIĆ Karlo S., MILIŠA M., OSTOJIĆ A., SERTIĆ PERIĆ M.(2011) *Protista-Protozoa i Metazoa- Invertebrata. Strukture i funkcije*. Alfa, Zagreb, 216- 279.

HAMER B., BIHARI N., REIFFERSCHEID G., ZAHN R. K., MÜLLER W. E. G., BATEL R. (1997.) *Evaluation of the SOS/umu-test post-treatment assay for the detection of genotoxic activities of pure compounds and complex environmental mixtures*. Mutat. Res.466,161-171.

HAMZA-CHAFFAI A., AMIARD J.C., PELLERIN J., JOUX L., BERTHET B.(2000)*The potential use of metallothionein in the clam Ruditapes decussatus as a biomarker of in situ metal exposure. Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 127, 185-197.

HORIKOSHI S. i SERPONE N. (2013.) *Microwaves in Nanoparticle Synthesis: Fundamentals and Applications*.

I. BRIGGER, C. DUBERNET, P. COUVREUR (2002.) *Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis Advanced Drug Delivery Reviews* (54)5 631

IVANKOVIĆ, M. (2007.) *Polimerni nanokompoziti, Polimeri,* 283, 156-167.

JAKŠIĆ, Ž. (2002.) *Razvoj i primjena brze mikrometode određivanja i praćenja oštećenja DNA u škrgama dagnje Mytilus galloprovinciallis (Lamarc, 1819)* / doktorska disertacija. Zagreb : Prehrambeno-biotehnooški fakultet

JONER E. J., HARTNIK T. and AMUNDSEN C. E.: *Environmental fate and ecotoxicity of engineered nanoparticles*; Norwegian Pollution Control Authority Report no. TA-2304/2007

KELLER, A., WANG H., ZHOU D., LENIHAN H.S., CHERR G., CARDINALE B.J., MILLER R. and JI Z. (2010.)*Stability and Aggregation of Metal Oxide Nanoparticles in Natural Aqueous Matrices* Environmental Science andTechnologie 44 (6), pp 1962–1967.

KLAINE, S. J., ALVAREZ, P. J. J., BATLEY, G. E., FERNANDES, T. F., HANDY, R. D., LYON, D. Y., i LEAD, J. R. (2008.) *Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects*. Environmental Toxicology and Chemistry, 27(9), 1825-1851.

KLAINE S. J. , et al.(2012) *Paradigms to Assess the Environmental Impact of Manufactured Nanomaterials*. Environmental Toxicology Chemistry, 31, 3-14.

KOUKOUZIKA N. i DIMITRIADIS V.K. (2005.) *Multiple biomarker comparison in Mytilus galloprovincialis from the Greece coast: ''Lysosomal membrane stability, neutral red retention, micronucleus frequency and stress on stress''*. Ecotoxicology. 14, 449–463

LADAN T. i BROZOVIĆ D. (1999.) *Hrvatska enciklopedija.*

LANDSDOWN ABG.(2002.) *Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action*. J Wound Care;11:125–38.

MATRANGA, V. i CORSI, I. (2012.) *Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: Model organisms and molecular approaches*. Marine Environmental Research,76, 32-40.

MOORE M.N. (2006.) *Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment?*. Environment International .32,967–976.

Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties, Royal Society and Royal Academy of Engineering, (2004.)

NEELY, W. B. (1980.) *Chemicals in the Environment: Distribution, Transport, Fate, Analysis*. New York: Marcel Dekker, 245 pp.

NOWACK B., BUCHELI T.D. (2007.) *Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. Environmental Pollution*.150,5-22.

OBERDORSTER, E. (2004.) *Manufactured nanomaterials (Fullerenes, C-60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass*. Environmental Health Perspectives. (112)10, 1058-1062.

OBERDÖRSTER, G., STONE, V., i DONALDSON, K. (2007.) *Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. Nanotoxicology*. (1)1, 2-25.

OLDENBURG S. J. (2016) *Silver nanoparticles: Properties and Applications*

PANYAMA, J., SAHOOA, S. K., PRABHAA, S., BARGARB, T., LABHASETWARA, V. (2003.) *Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles.* International Journal of Pharmaceutics (262)1–2, 27,1–11.

PELLERIN J., AMIARD J.-C.,(2009.)*: Comparison of bioaccumulation of metals and induction of metallothioneins in two marine bivalves (Mytilus edulis and Mya arenaria).* Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 150, 186-195.

RASPOR B., DRAGUN Z., ERK M.,(2005.): *Examining the suitability of mussel digestive gland to serve as a biomonitoring target organ*. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju 56, 139-147.

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY (2016.): http://www.rsc.org

SKOCAJ M., FILIPIC M. , PETKOVIC J. and NOVAK S.(2011.) *Titanium Deioxide in Our Everyday Life; Is It Safe?* Radiology and Oncology, 227-247.

SHEEHAN D.(2009.) *Physical Biochemistry: Principles and Applications*. 2. izdanje. Irska, WileyBlackwell58−63.

THEODORAKIS C. W. (2001.) *Integration of genotoxic and population genetic endpoints in biomonitoring and risk assessment*. Ecotoxicilogy.10, 245-256.

THOMAS, R.E., HARRIS, P.M. AND RICE, R.D (1999.) *Survival in air of Mytilus trossulus following long-term exposure to spilled Exxon Valdez crude oil in Prince William sound*. Comp. Biochem. Physiol. C: Comp. Pharm. Toxicol. 122(1), 147–52.

VEVERS W. F., JHA A. N. (2008.) *Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO2) nanoparticles on fish cells in vitro*. Ecotoxicology.17,410–420.

VIARENGO, A., CANESI, L., PERTICA, M., MANCINELLI, G., ACCOMANDO, R., SMAAL, A.C., ORUNESU, M. (1995.) *Stress on stress response: a simple monitoring tool in assessment of a general stress syndrome in mussels.* Mar. Environ. Res. 39, 245–248.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGANCY (US EPA). (2010.) Nanomaterial Case Studies: *Nanoscale Titanium Dioxide in Water Treatment and in Topical Sunscreen*

WASON, S. M., ZHAO, J. (2013.) *Cerium oxide nanoparticles: potential applications for cancer and other diseases*. Am J Transl Res. 5(2): 126–131.

ZHANG W., CRITTENDAN J.,LI K.G., CHEN Y.S. (2012.) *Attachment Efficiency of Nanoparticle Aggregation in Aqueous Dispersions: Modeling and Experimental Validation.* Environmental Science Technology; 46, 7054- 62.

ZHANG Y, CHEN Y, WESTERHOFF P, CRITTENDEN J.(2009.) *Impact of natural organic matter and divalent cations on the stability of aqueous nanoparticles.* Water Res 43, 4249-5.7

YANG K., LIN DH., XING BS. (2009.) *Interactions of humic acid with nanosized inorganic oxides*. Langmuir; 25,3571-6.

TEMELJNA DOKUMENTACIJASKA KARTICA

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli Završni rad

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

Utjecaj industrijski važnih nanočestica (CeO_2, Ag i TiO_2) na dagnji *Mytilus galloprovincialis*

JELENA GRUJIĆ

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

SAŽETAK

U ovom radu istražen je učinak industrijski važnih nanočestica cerija, srebra i titanija na dagnju *Mytilus galloprovincialis* pomoću testa preživljavanja na zraku (stres na stres test). Cilj je bio napraviti procjenu odgovora pomoću bioindikatorskog organizma, dagnji, kako bi dobili odgovor na pitanja o opasnosti kemijskih tvari u morskom okolišu. Kada se procjena opasnosti usporedi s procjenom izloženosti, pokaže se specifičan odgovor na određene nanočestice. Zaključak je da metoda stres na stres testa nije adekvatan pokazatelj toksičnosti nanočestica na organizam, te da je potrebno ispitati toksičnost na nivou stanice i molekule. Rezultati ovog istraživanja mogu poslužiti za buduća istraživanja učinka zagađivala u morskom okolišu.

Rad je pohranjen u knjižnicama Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli i Instituta Ruđer Bošković u Rovinju. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: nanočestice, nanočestice cerij (IV) oksida, nanočestice srebra, nanočestice titanijeva dioksida, *Mytilus galloprovincialis*, „stres na stres“ test

Mentor: Dr.sc. Daniel Mark Lyons

Ocjenjivači: Doc.dr. sc. Giaconda Milotti

Dr.sc. Daniel Mark Lyons

Dr.sc. Ines Kovačić

Datum obrane: 28. veljače 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Juraj Dobrila University of Pula Bachelor thesis

University Undergraduate Study Programme – Marine Sciences

Utjecaj industrijski važnih nanočestica (CeO_2, Ag i TiO_2) na dagnji *Mytilus galloprovincialis*

JELENA GRUJIĆ

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

ABSTRACT

In this study the effect of industrially important nanoparticles of cerium, silver and titanium in the mussel *Mytilus galloprovincialis* using survival in air test (stress on stress test) was investigated. The goal of this work was to assess risks to the marine environment using bioindicator organisms, mussels, to determine the danger of specific chemical substances. When risk assessment was compared with the estimate of exposure, individual nanoparticles gave specific answers. It was concluded that the method of determining the toxicity level at the whole organism level is not an adequate sole indicator of pollution, but that it is also necessary to examine the toxicity at the cellular level. The results of this study may be used for future studies of nanomaterial
contaminants in the marine environment.

This thesis is deposited in the Library of Juraj Dobrile University of Pula and Ruđer Bošković Institute in Rovinj. Original in Croatian.

Key words: nanoparticles, cerium (IV) oxide nanoparticles, silver nanoparticles, titanium dioxide nanoparticles, *Mytilus galloprovincialis*, "stress on stress test"

Supervisor: Dr.sc. Daniel Mark Lyons,

Reviewers: Doc.dr. sc. Giaconda Milotti
Dr.sc. Daniel Mark Lyons
Dr.sc. Ines Kovačić

Thesis defense: 28th of February 2017.