

MORFOLOŠKI, FIZIOLOŠKI I PROTEOMSKI ODGOVORI SLATKOVODNE ALGE *Chlorella vulgaris* NA IZLAGANJE NANOČESTICAMA SREBRA, BAKRA I POLISTIRENA

komazec, Bruno

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:252131>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Bruno Komazec

**MORFOLOŠKI, FIZIOLOŠKI I PROTEOMSKI
ODGOVORI SLATKOVODNE ALGE
Chlorella vulgaris NA IZLAGANJE
NANOČESTICAMA SREBRA, BAKRA I
POLISTIRENA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF SCIENCE

BIOLOGY DEPARTMENT

Bruno Komazec

**MORPHOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL AND
PROTEOMIC RESPONSES OF THE
FRESHWATER ALGA *Chlorella vulgaris*
EXPOSED TO SILVER, COPPER AND
POLYSTYRENE NANOPARTICLES**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024

Ovaj je doktorski rad izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u okviru projekta Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava i toksičnosti nanočestica srebra, bakra i plastike kao potencijalno štetnih novih materijala u obalnim vodama (IP-2018-01-5351), financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Petre Peharec Štefanić, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

INFORMACIJE O MENTORICI

Izv. prof. dr. sc. Petra Peharec Štefanić završila je 2004. godine studij biologije, smjer molekularna biologija, na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Iste godine zaposlila se na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka PMF-a. Doktorsku disertaciju izradila je pod voditeljstvom prof. dr. sc. Marijane Krsnik-Rasol i obranila ju 2010. godine. U znanstveno-nastavno zvanje docentice izabrana je 2015. godine, a 2021. godine u zvanje izvanredne profesorice na istoj instituciji. Su-nositeljica je obaveznog kolegija Biologija stanice i nositeljica izbornog kolegija Uvod u elektronsku mikroskopiju koji se izvodi i na engleskom jeziku na prijediplomskom studiju molekularne biologije. Nositeljica je i izbornog kolegija Elektronska mikroskopija i su-nositeljica kolegija Regulacijski mehanizmi u fotosintezi na diplomskom studiju molekularne biologije te nositeljica izbornog kolegija Svjetlosna i elektronska mikroskopija na diplomskog studiju eksperimentalne biologije. Bila je voditeljica 10 diplomskih radova i četiri završna rada prijediplomskih studija te jednog studentskog rada za Rektorovu nagradu. Ko-autorica je jednog sveučilišnog priručnika te četiri sveučilišne skripte za praktikumsku nastavu na hrvatskom i engleskom jeziku. Područje njenog znanstvenog interesa je u području nanotoksikologije, elektronske mikroskopije i biljne proteomike. Ima veliko iskustvo u analizama odgovora biljnih stanica povezanih s procesima diferencijacije, kao i izloženosti stresnim okolišnim uvjetima (vodni i osmotski stres) te teškim metalima na ultrastrukturnoj i proteinskoj razini. Trenutno se bavi biljnim nanotoksikološkim studijama utjecaja različitih nanočestica i njihove uloge u izazivanju ultrastrukturnih promjena, kao i promjena u proteomu kopnenih i vodenih biljaka. Znanstveno se usavršavala kroz duže i kraće boravke u Izraelu, Češkoj, Austriji, Portugalu, Italiji, Nizozemskoj i Njemačkoj. 2010. g. primila je nagradu "Za žene u znanosti" u organizaciji L'ORÉAL ADRIA d.o.o. i Hrvatskog povjerenstva za UNESCO pri Ministarstvu kulture. Bila je voditeljica nekoliko znanstvenih projekata te je aktivno sudjelovala na 6 znanstvenih projekata financiranih od HRZZ i MZOS te 3 međunarodna projekata. Do danas je objavila 44 rada u znanstvenim časopisima i tri poglavlja u znanstvenim knjigama. Na domaćim i inozemnim stručnim i znanstvenim skupovima sudjelovala je s više od 80 usmenih i posterskih priopćenja. Glavna je tehnička urednica časopisa *Acta Botanica Croatica*. Aktivna je i u radu udruga: Hrvatskog društva za biljnu biologiju (predsjednica: 2017.-2021.; dopredsjednica: 2015.-2017), Hrvatskog mikroskopijskoga društva (dopredsjednica: 2011.-2012.; tajnica: 2008.-2011.) te Hrvatskog biološkog društva (blagajnica: 2005.-2010.).

S dubokim poštovanjem zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Petri Peharec Štefanić na nesebičnoj podršci, neprocjenjivim prijedlozima te strpljivim vođenjem kroz izradu ovog rada.

Također, želim izraziti iskrenu zahvalnost svojim trenutnim i bivšim kolegama iz Laboratorija za elektroforezu proteina. Posebno želim zahvaliti dr. sc. Karli Košpić i dr. sc. Renati Biba za njihovu neumornu podršku, zajedničke trenutke i neizmjernu pomoć u svim aspektima koji su olakšali cjelokupnu izradu ovog rada.

Htio bih zahvaliti i prof. dr. sc. Biljani Balen, prof. dr. sc. Mirti Tkalec i dr. sc. Tei Mišić Radić na pomnom čitanju i ispravljanju rada, čime su doprinjele njegovoj kvaliteti.

Nadalje, želim se zahvaliti kolegi prof. dr. sc. Danielu Lyonsu na vrijednoj pomoći u sintezi AgNP, kao i kolegama dr. sc. Ameli Hozić i prof. dr. sc. Mariu Cindriću za njihovu pomoć u pripremi uzoraka i snimanju MS spektara. Također, zahvaljujem kolegi dr. sc. Ninu Dimitrovu na pomoći pri analizi uzoraka metodom Py-GC-MS.

Srdačne zahvale također idu svim kolegama sa Zavoda za molekularnu biologiju za inspirativnu radnu atmosferu, zanimljive rasprave i neizmjernu podršku koju sam dobio tijekom svojeg istraživanja.

Također, želim izraziti veliku zahvalnost svim prijateljima koji su uvijek bili tu za mene - slušali me u teškim situacijama, ohrabivali me i pružali neizmjernu podršku.

Konačno, želim izraziti najveću zahvalnost svojoj obitelji - mami, tati, Petri, Marku, maloju Pauli i Neli - za neograničenu podršku kroz sve faze mog studija i vjeru koju su uvijek imali u mene. Bez njihove ljubavi i podrške, ovo iskustvo bi ostalo samo pusti san.

**MORFOLOŠKI, FIZIOLOŠKI I PROTEOMSKI ODGOVORI SLATKOVODNE ALGE
Chlorella vulgaris NA IZLAGANJE NANOČESTICAMA SREBRA, BAKRA I
POLISTIRENA**

BRUNO KOMAZEC

Zavod za molekularnu biologiju, Biološki odsjek, Prirodoslovno-
matematički fakultet, Horvatovac 102a, 10000 Zagreb

Nanočestice srebra (AgNP), bakrovog(I) oksida (Cu₂ONP) i bakrovog(II) oksida (CuONP) te polistirena imaju široku primjenu u komercijalnim proizvodima, zbog čega predstavljaju opasnost za različite ekosustave, uključujući i vodene. U ovom radu istražen je utjecaj AgNP stabiliziranih omotačima citrat i cetiltrimetilamonij bromid, CuONP i Cu₂ONP te nanočestica polistirena bez funkcionalne skupine i s amino i karboksilnom skupinom na algu *Chlorella vulgaris*. Dodatno je analiziran utjecaj AgNO₃ i CuSO₄, kao srebra i bakra u ionskom obliku. Usporedba vrijednosti EC₂₅ pokazala je da su tretmani s AgNP najtoksičniji za alge, što je vjerojatno posljedica njihove slabije aglomeracije u odnosu na nanočestice bakra i veće reaktivnosti u odnosu na nanočestice polistirena. Oba tipa AgNP kao i CuONP i Cu₂ONP izazvali su oksidacijski stres, oštećenje strukture stanica i makromolekula te promjene u procesu fotosinteze, iako je najjači učinak na parametre fotosinteze i staničnu ultrastrukturu zabilježen nakon izlaganja nanočesticama polistirena, što se može pripisati njihovom velikom afinitetu vezanja na površinu stanice. Dobiveni rezultati pokazuju da površinski omotači, funkcionalne skupine i oksidacijska stanja imaju veliku ulogu u stabilnosti nanočestica, što posljedično utječe na njihovu toksičnost, dok se disocijacija iona s nanočesticama metala pokazala kao ključni mehanizam njihove toksičnosti.

(272 stranice / 64 slike / 21 tablica / 525 literaturnih navoda / jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: zelena alga, stabilizirajući omotači, oksidacijska stanja, funkcionalne skupine, oksidacijski stres, fotosinteza, ekspresija proteina

Mentor: dr. sc. Petra Peharec Štefanić, izv. prof.

Ocjenjivači: dr. sc. Biljana Balen, prof.

dr. sc. Mirta Tkalec, prof.

dr. sc. Tea Mišić Radić, viša znanstvena suradnica

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

**MORPHOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL AND PROTEOMIC RESPONSES OF THE
FRESHWATER ALGA *Chlorella vulgaris* EXPOSED TO SILVER, COPPER AND
POLYSTYRENE NANOPARTICLES**

BRUNO KOMAZEC

Division of Molecular Biology, Department of Biology, Faculty
of Science, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb

Silver (AgNP), copper(I) oxide (Cu₂ONP) and copper(II) oxide (CuONP), and polystyrene nanoparticles are widely used in commercial products and therefore they pose a risk to various ecosystems, including aquatic ones. In this work, the influence of AgNPs stabilised with citrate and cetyltrimethylammonium bromide coatings, CuONP and Cu₂ONP, and polystyrene nanoparticles without a functional group and with amino and carboxyl groups on the algae *Chlorella vulgaris* was investigated. The influence of AgNO₃ and CuSO₄, as silver and copper in ionic form, was additionally analysed. A comparison of EC₂₅ values showed that AgNP treatments are the most toxic to algae, which is probably due to their weaker agglomeration compared to copper nanoparticles and higher reactivity compared to polystyrene nanoparticles. Both types of AgNP as well as CuONP and Cu₂ONP caused oxidative stress, damage to the cell structure and the macromolecules, and changes in the photosynthetic process, although the strongest effect on photosynthesis parameters and cellular ultrastructure was recorded after treatment with polystyrene nanoparticles, which can be attributed to their high binding affinity to the cell surface. The obtained results show that surface coatings, functional groups and oxidation states have a major role in the stability of nanoparticles, which consequently affects their toxicity, while the dissociation of ions from metal nanoparticles proved to be a key mechanism of their toxicity.

(272 pages / 64 figures / 21 tables / 525 references / original in Croatian)

Keywords: green algae, stabilising coatings, oxidation states, functional groups, oxidative stress, photosynthesis, protein expression

Supervisor: Dr. Petra Peharec Štefanić, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Biljana Balen, Prof.

Dr. Mirta Tkalec, Prof.

Dr. Tea Mišić Radić, Senior Research Associate

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	LITERATURNI PREGLED	5
2.1	Nanomaterijali.....	5
2.1.1	Nanočestice srebra.....	6
2.1.2	Nanočestice bakra	7
2.1.3	Nanočestice polistirena	8
2.2	Stabilnost i funkcionalnost nanočestica	9
2.3	Fitotoksični učinak nanočestica na alge.....	12
2.3.1	Utjecaj nanočestica na morfologiju.....	14
2.3.2	Utjecaj nanočestica na pojavu oksidacijskog stresa	15
2.3.2.1	Oksidacijsko oštećenje biomolekula.....	18
2.3.2.1.1	Peroksidacija lipida.....	18
2.3.2.1.2	Oksidacija proteina	20
2.3.2.1.3	Oksidacija molekule DNA.....	22
2.3.3	Antioksidacijski odgovor	23
2.3.3.1	Enzimski antioksidansi	23
2.3.3.2	Neenzimski antioksidansi	26
2.3.4	Utjecaj nanočestica na fotosintezu	28
2.3.5	Utjecaj nanočestica na proteom.....	31
3.	MATERIJALI I METODE	34
3.1	Nanomaterijali.....	35
3.1.1	Priprema suspenzija nanočestica	35
3.1.1.1	Nanočestice srebra	35
3.1.1.2	Nanočestice bakra	35
3.1.1.3	Nanočestice polistirena	35
3.1.2	Karakterizacija fizikalno-kemijskih svojstava	36
3.1.2.1	UV/Vis spektrofotometrija.....	36
3.1.2.2	Određivanje koncentracije matičnih suspenzija AgNP.....	36
3.1.2.3	Određivanje količine iona Ag ⁺ u matičnim suspenzijama AgNP	36
3.1.2.4	Određivanje veličine i naboja nanočestica u matičnim suspenzijama	36
3.1.2.5	Vizualizacija i elementarna analiza nanočestica	37
3.2	Eksperimentalni uvjeti održavanja i izlaganja kulture stanica.....	37
3.2.1	Eksperimentalni uvjeti kulture stanica	37
3.2.2	Određivanje krivulje rasta	38
3.2.3	Izlaganje kulture stanica tretmanima.....	38
3.2.4	Određivanje vijabilnosti algi	39

3.3	Karakterizacija nanočestica u podlozi BBM korištenih za tretiranje algi.....	40
3.3.1	Spektrofotometrijsko određivanje stabilnosti AgNP-citrat, AgNP-CTAB i AgNO ₃	40
3.3.2	Određivanje promjene veličine i naboja čestica.....	40
3.4	Lokalizacija i akumulacija nanočestica u stanicama te analiza morfoloških promjena.....	41
3.4.1	Analiza morfoloških promjena stanica.....	41
3.4.2	Kvantifikacija sloja EPS.....	42
3.4.3	Analiza promjene ultrastrukture i lokalizacija nanočestica u stanicama.....	42
3.4.4	Određivanje količine srebra, bakra i polistirena u stanicama i sloju EPS.....	44
3.5	Određivanje parametara oksidacijskog stresa	45
3.5.1	Ekstrakcija ukupnih topivih proteina	45
3.5.2	Određivanje sadržaja ROS	46
3.5.2.1	Fluorimetrijsko određivanje sadržaja ROS	46
3.5.2.2	Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja H ₂ O ₂	47
3.5.3	Određivanje oštećenja biološki važnih molekula.....	47
3.5.3.1	Određivanje sadržaja MDA	47
3.5.3.2	Određivanje sadržaja proteinskih karbonila.....	48
3.5.3.3	Određivanje oštećenja molekule DNA	49
3.5.4	Određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima.....	50
3.5.4.1	Određivanje aktivnosti APX	50
3.5.4.2	Određivanje aktivnosti PPX.....	50
3.5.4.3	Određivanje aktivnosti CAT	51
3.5.4.4	Određivanje aktivnosti SOD	51
3.5.5	Određivanje sadržaja neenzimskih antioksidansa	52
3.5.5.1	Određivanje sadržaja prolina	52
3.5.5.2	Određivanje sadržaja glutationa.....	53
3.6	Učinak na parametre fotosinteze.....	53
3.6.1	Određivanje količine fotosintetskih pigmenata klorofila <i>a</i> i <i>b</i> te karotenoida ...	53
3.6.2	Određivanje stope fotosinteze	54
3.6.3	Određivanje parametara fluorescencije klorofila <i>a</i>	55
3.7	Određivanje ekspresije proteina D1, RuBisCo, Hsp70 i Hsp90 imunodetekcijom	55
3.7.1	SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza	55
3.7.2	Prijenos proteina na membranu.....	56
3.7.3	Imunodetekcija proteina	56
3.8	Analiza diferencijalne ekspresije proteina dvodimenzionalnom elektroforezom..	57
3.8.1	Ekstrakcija proteina fenolom	57
3.8.2	1. dimenzija - IEF.....	58

3.8.3	2. dimenzija - SDS-PAG elektroforeza	59
3.8.4	Analiza 2-D gelova.....	60
3.9	Analiza proteina spektrometrijom masa	61
3.9.1	Priprema uzoraka i digestija u gelu	61
3.9.2	Izolacija i pročišćavanje peptida	61
3.9.3	Analiza peptida na spektrometru masa.....	62
3.10	Statistička i grafička obrada rezultata	64
4.	REZULTATI.....	65
4.1	Karakteristike nanočestica	65
4.1.1	Nanočestice srebra.....	65
4.1.2	Nanočestice bakra	67
4.1.3	Nanočestice polistirena	69
4.2	Određivanje eksponencijalne faze rasta	69
4.3	Određivanje EC ₂₅ vrijednosti	70
4.4	Stabilnost nanočestica u podlozi BBM	74
4.4.1	Nanočestice i ioni srebra	74
4.4.2	Nanočestice i ioni bakra	76
4.4.3	Nanočestice polistirena	78
4.5	Lokalizacija i akumulacija nanočestica u stanicama i morfološke promjene	79
4.5.1	Nanočestice i ioni srebra	79
4.5.2	Nanočestice i ioni bakra	84
4.5.3	Nanočestice polistirena	89
4.6	Fitotoksični učinci nanočestica i iona	95
4.6.1	Nanočestice i ioni srebra	95
4.6.1.1	Sadržaj ROS.....	95
4.6.1.2	Oštećenja biomolekula.....	96
4.6.1.3	Aktivnost antioksidacijskih enzima	97
4.6.1.4	Sadržaj neenzimskih antioksidansa.....	97
4.6.1.5	Ekspresija proteina Hsp90 i Hsp70.....	98
4.6.2	Nanočestice i ioni bakra	99
4.6.2.1	Sadržaj ROS.....	99
4.6.2.2	Oštećenja biomolekula.....	100
4.6.2.3	Aktivnost antioksidacijskih enzima	101
4.6.2.4	Sadržaja neenzimskih antioksidansa.....	102
4.6.2.5	Ekspresija proteina Hsp90 i Hsp70.....	103
4.6.3	Nanočestice polistirena	104
4.6.3.1	Sadržaj ROS.....	104

4.6.3.2	Oštećenja biomolekula	104
4.6.3.3	Aktivnost antioksidacijskih enzima	105
4.6.3.4	Sadržaj neenzimskih antioksidansa.....	106
4.6.3.5	Ekspresija proteina Hsp90 i Hsp70.....	107
4.7	Učinak nanočestica i iona na proces fotosinteze.....	108
4.7.1	Nanočestice i ioni srebra	108
4.7.1.1	Količina fotosintetskih pigmenata klorofila <i>a</i> i <i>b</i> te karotenoida.....	108
4.7.1.2	Stopa fotosinteze	109
4.7.1.3	Fluorescencija klorofila <i>a</i>	110
4.7.1.4	Ekspresija proteina RuBisCo i D1	111
4.7.2	Nanočestice i ioni bakra	112
4.7.2.1	Količina fotosintetskih pigmenata klorofila <i>a</i> i <i>b</i> te karotenoida.....	112
4.7.2.2	Stopa fotosinteze	113
4.7.2.3	Fluorescencija klorofila <i>a</i>	114
4.7.2.4	Ekspresija proteina RuBisCo i D1	115
4.7.3	Nanočestice polistirena	116
4.7.3.1	Količina fotosintetskih pigmenata klorofila <i>a</i> i <i>b</i> te karotenoida.....	116
4.7.3.2	Stopa fotosinteze	117
4.7.3.3	Fluorescencija klorofila <i>a</i>	118
4.7.3.4	Ekspresija proteina RuBisCo i D1	119
4.8	Utjecaj nanočestica i iona na diferencijalnu ekspresiju proteina	121
4.8.1	Nanočestice i ioni srebra	121
4.8.1.1	Promjene u proteomu	121
4.8.1.2	Klasifikacija diferencijalno eksprimiranih proteina.....	123
4.8.2	Nanočestice i ioni bakra	134
4.8.2.1	Promjene u proteomu	134
4.8.2.2	Klasifikacija diferencijalno eksprimiranih proteina.....	136
4.8.3	Nanočestice polistirena	146
4.8.3.1	Promjene u proteomu	146
4.8.3.2	Klasifikacija diferencijalno eksprimiranih proteina.....	148
5.	RASPRAVA.....	159
5.1	Nanočestice i ioni srebra	159
5.1.1	Stabilnost u hranjivoj podlozi	159
5.1.2	Unos nanočestica i iona srebra u stanice i utjecaj na morfologiju algi	160
5.1.3	Utjecaj na pojavu oksidacijskog stresa.....	164
5.1.4	Utjecaj na fotosintetski sustav	169
5.1.5	Utjecaj na proteom	171

5.2	Nanočestice i ioni bakra	175
5.2.1	Stabilnost nanočestica u hranjivoj podlozi.....	175
5.2.2	Unos nanočestica i iona bakra u stanice i utjecaj na morfologiju algi	176
5.2.3	Utjecaj na pojavu oksidacijskog stresa.....	179
5.2.4	Utjecaj na fotosintetski sustav	182
5.2.5	Utjecaj na proteom	184
5.3	Nanočestice polistirena	187
5.3.1	Stabilnost nanočestica u hranjivoj podlozi.....	188
5.3.2	Unos nanočestica polistirena u stanice i utjecaj na morfologiju algi	189
5.3.3	Utjecaj na pojavu oksidacijskog stresa.....	192
5.3.4	Utjecaj na fotosintetski sustav	195
5.3.5	Utjecaj na proteom	197
5.4	Usporedba toksičnosti različitih nanočestica i iona na stanice alge <i>C. vulgaris</i> ..	199
6.	ZAKLJUČAK	203
7.	POPIS LITERATURE	204
8.	PRILOZI.....	263
9.	ŽIVOTOPIS	272

UVOD

1. UVOD

Brojna pozitivna svojstva nanomaterijala dovela su do njihove sve veće prisutnosti, zbog čega su postali tema od velikog interesa. Samim time, njihova proizvodnja i uporaba kontinuirano rastu u raznim granama industrije (Da Costa i Sharma 2016). Među različitim vrstama nanomaterijala, sve veći značaj dobivaju nanočestice metala, osobito srebra i bakra te plastike, osobito polistirena (PS-NP). Nanočestice srebra (AgNP) i bakra se zbog svojih iznimnih antibakterijskih i antifungalnih svojstava sve više koriste u agronomiji u obliku pesticida, ali i u medicinskoj i tekstilnoj industriji, dok se nanočestice polistirena koriste od sredine prošlog stoljeća u mnogim komercijalnim proizvodima, kao što su ambalaža za hranu i igračke, ali i u poljoprivredi u svrhu kontroliranog ispuštanja kemikalija (Kurbanova i sur. 1998; Oukarroum i sur. 2012a; Da Costa i Sharma 2016). Zbog kontinuiranog porasta proizvodnje i korištenja, nanočestice srebra, bakra i polistirena izravno ili neizravno završavaju u raznim vodenim ekosustavima, gdje je još uvijek nedovoljno istražen njihov utjecaj (Gusev i sur. 2021).

Jedan od razloga velike uporabe nanočestica je njihova povećana reaktivnost koja proizlazi, između ostalog, iz velikog omjera površine i volumena. Zbog velike reaktivnosti, nanočestice metala često su nestabilne u suspenzijama, što nerijetko rezultira njihovom aglomeracijom te promjenom oblika, veličine i površine (Oukarroum i sur. 2012a; Djamila i sur. 2024), a može doći i do disocijacije metalnih iona s površine nanočestica (Li i sur. 2020a). Navedene promjene mogu imati snažan utjecaj na sama svojstva nanočestica pa i na njihovu reaktivnost, mobilnost i unos u organizme (Ranjan i sur. 2021). Kako bi se smanjila njihova reaktivnost, AgNP često imaju dodatne omotače koji ih sterički ili elektrostatski stabiliziraju zbog čega im se povećava primjena u medicini i elektroindustriji (Dawadi i sur. 2021). Neki od najčešće korištenih steričkih omotača su polivinilpirolidon (PVP) i polietilen glikol (PEG), dok su najčešći elektrostatski omotači citrat i cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB) (Biba i sur. 2021). Komercijalno dostupne nanočestice bakra postoje u više kemijskih oblika gdje svaki oblik ima njemu svojstvene karakteristike. Zbog svoje niske cijene i velikog antioksidacijskog potencijala, među raznim metalnim oksidima, nanočestice bakrovog(I) oksida (Cu_2ONP) i termodinamički najstabilnije nanočestice bakrovog(II) oksida (CuONP) najviše se primjenjuju u industriji (Djamila i sur. 2024). I nanočestice polistirena koriste se u mnogim granama industrije, budući da je površina ovih nanočestica hidrofobna po prirodi te se na nju, procesom oksidacije, mogu vezati razni spojevi, koji mogu promijeniti svojstva samih nanočestica (Loos i sur. 2014). Među najčešće korištenim površinskim skupinama polistirena su amino ($-\text{NH}_2$) i

karboksilne (-COOH) skupine koje poboljšavaju fizikalno-mehanička svojstva polistirena, kao što su povećana elastičnost i otpornost na visoke temperature (Kurbanova i sur. 1998).

Imajući u vidu da sve navedene nanočestice mogu završiti u vodenim ekosustavima, od velike je važnosti istražiti njihov utjecaj na alge, koje su jedan od najbrojnijih organizama u takvim staništima. Kako su alge i primarni proizvođači hrane i energije, mogući toksični učinci raznih nanočestica na njih mogu putem procesa bioakumulacije imati opasne posljedice za cijeli ekosustav (Oukarroum i sur. 2012a).

Toksični učinak nanočestica srebra i bakra primjetan je primarno na morfološkoj razini. Svjetlosnom i elektronskom mikroskopijom uočeno je da navedene nanočestice dovode do oštećenja stanične stijenke i membrane, čime destabiliziraju mnoge stanične procese među kojima i fotosintezu (Wang i sur. 2019). Osim na stijenk, nanočestice srebra, bakra i polistirena vežu se i na mukozni sloj izvanstaničnih polimernih tvari (eng. *extracellular polymeric substances*, EPS), koji se nalazi oko stanica. Kvalitativnom i kvantitativnom analizom utvrđeno je da se sloj EPS sastoji ponajviše od ugljikohidrata uz manje količine proteina, lipida i nukleinskih kiselina. Pretpostavlja se da alge u stresnim uvjetima pojačavaju proizvodnju sloja EPS kako bi mogle ublažiti negativni učinak na samu stanicu. Neka istraživanja su zabilježila akutni toksični učinak nanočestica polistirena na vodene organizme zbog olakšane adsorpcije polistirena na površinu algi, čime se smanjuje respiracija i protok svjetla do stanica alge, što posljedično umanjuje i fotosintetsku aktivnost (Bhattacharya i sur. 2010; Khoshnamvand i sur. 2021; Xiang i sur. 2023a). Iako je veći broj istraživanja pokazao značajne promjene u ultrastrukturi stanica nakon djelovanja nanočestice srebra, bakra i polistirena (Zhao i sur. 2016; Hou i sur. 2017; Hazeem i sur. 2020; Romero i sur. 2020; Huang i sur. 2021; Zhao i sur. 2021), samo ih je nekolicina istražila i ulogu sloja EPS u odgovoru na utjecaj navedenih nanočestica (Nam i sur. 2018; Zheng i sur. 2019; Babiak i Krzemińska 2021).

Glavni mehanizam toksičnosti nanočestica srebra i bakra je povećanje proizvodnje reaktivnih oblika kisika (eng. *reactive oxygen species*, ROS) (Zhang i sur. 2022b). Najrelevantniji ROS u biološkim uzorcima su superoksidni ($O_2^{\bullet -}$) i hidroksilni radikali (HO^{\bullet}), singletni kisik (1O_2) i vodikov peroksid (H_2O_2). ROS mogu oksidirati lipide, čime se narušava integritet membranskog pa time i fotosintetskog sustava, karbonilirati proteine, čime oni gube funkcije, ali i narušiti stabilnost nukleinskih kiselina, što dovodi do promjena u ekspresiji gena (Yu i sur. 2020). Toksičnost nanočestica polistirena u algama djelomično proizlazi iz povećane proizvodnje ROS, no njihova fitotoksičnost nije do kraja razjašnjena. Kao odgovor na povećanu

sintezu ROS, a u cilju smanjenja njihovog negativnog učinka, alge su razvile mehanizme obrane u djelovanjem raznih antioksidansa. Jedni od biološki najvažnijih su antioksidacijski enzimi. Superoksid dismutaza (SOD) je antioksidacijski enzim koji katalizira promjenu $O_2^{\bullet -}$ u H_2O_2 , koji se zatim razgrađuje uz pomoć katalaze (CAT) i više tipova peroksidaza. Osim navedenih enzima, ulogu u smanjenju negativnih učinaka ROS imaju i neenzimski antioksidansi poput glutationa i prolina, koji zbog jakog redukcijskog potencijala uklanjaju elektrofilne i oksidativne vrste. Dodatni antioksidacijski mehanizam algi su i proteini toplinskog šoka (eng. *heat shock proteins*, Hsp), koji ponovnim uspostavljanjem normalne strukture inaktiviranih proteina vraćaju staničnu homeostazu (Rezayian i sur. 2019).

Budući da nanočestice srebra, bakra i polistirena mogu reagirati s proteinima direktno, vezanjem na tiolne skupine (Matysiak i sur. 2016), ili indirektno putem promjene njihove ekspresije (Juan i sur. 2021), važno je sagledati njihov učinak na proteomskoj razini. Kvalitativnom i kvantitativnom analizom utjecaja nanočestica na proteom algi moguće je odrediti karakteristične biomarkere koji upućuju na stresne uvjete. Malobrojna dosadašnja istraživanja utjecaja nanočestica na alge pokazala su značajnu promjenu u ekspresiji proteina uključenih u stabilnost stanične stijenke, fotosintezu, transport te metabolizam i proizvodnju energije (Matysiak i sur. 2016).

Dosadašnja istraživanja pokazala su učinke i mehanizme djelovanja nanočestica srebra, bakra i polistirena na različite biomolekule i/ili stanične procese (Kurbanova i sur. 1998; Oukarroum i sur. 2012a; Da Costa i Sharma 2016; Babiak i Krzemińska 2021). Rezultati nezavisnih istraživanja su nerijetko različiti, što uvelike otežava donošenje jednoznačnih zaključaka o fitotoksičnosti nanočestica. Takva neusklađenost je ponajviše rezultat različitih eksperimentalnih uvjeta, analiziranih organizama i korištenih nanočestica (Biba i sur. 2021). Zbog toga je potrebno usporedno istražiti utjecaj različitih nanočestica te njihovih omotača, oksidacijskih stanja ili funkcionalnih skupina u istim eksperimentalnim uvjetima u cilju određivanja adaptacijskog odgovora algi na populacijskoj razini te razini jedne stanice.

Cilj ovog istraživanja je bio usporediti učinke toksičnosti AgNP s dva tipa omotača (citrat i CTAB), nanočestica bakra u dva oksidacijska stanja (CuONP i Cu_2ONP) i polistirena bez modifikacije i modificiranog s dvije funkcionalne skupine (amino i karboksilne) na morfološke i ultrastrukturne promjene, pojavu oksidacijskog stresa te promjene u fotosintezi i proteomu stanica slatkovodne alge *Chlorella vulgaris* kako bi se utvrdili mehanizmi toksičnosti pojedinih nanočestica. Nadalje, ispita se i učinak ionskog oblika srebra i bakra kako bi se razlučilo je li

fitotoksičnost nanočestica metala posljedica djelovanja nanočestičnog oblika i/ili iona koji se s njih otpuštaju. Budući da nanočestice mogu aglomerirati i/ili disocirati u podlogama visoke ionske jakosti, analizirao sam stabilnost svih korištenih nanomaterijala u podlozi za uzgoj algi.

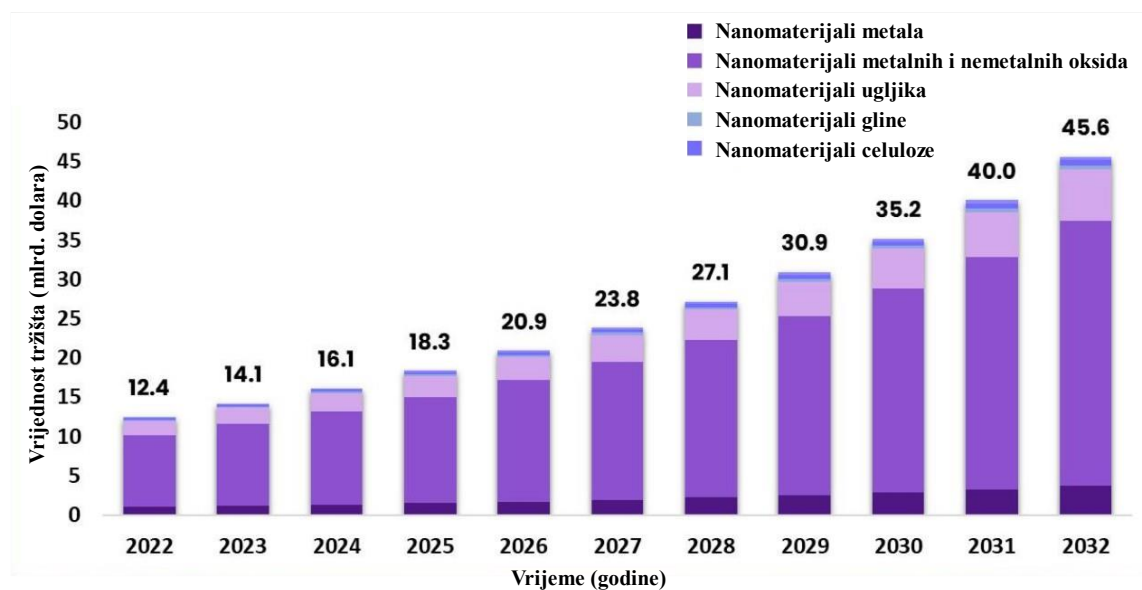
Hipoteza istraživanja bila je da nanočestice srebra, bakra i polistirena izazivaju toksične učinke djelovanjem različitih mehanizama.

LITERATURNI PREGLED

2. LITERATURNI PREGLED

2.1 Nanomaterijali

U 21. stoljeću, nanomaterijali dobivaju na sve većem značaju. Pod pojmom „nanomaterijali“ podrazumijevaju se prirodno nastali, umjetni ili antropogeni materijali koji imaju barem jednu dimenziju između 1-100 nm (Peralta-Videa i sur. 2011). Uporabom nanomaterijala, nanotehnologija se sve više koristi u raznim granama industrije, od medicine, agronomije, inženjerstva pa sve do tekstilne industrije. Globalna vrijednost tržišta nanomaterijala je 2021. godine iznosila 16,3 milijarde američkih dolara te se procjenjuje njen rast na 62,8 milijarde dolara do 2031. godine. Navedeni rast se opravdava povećanom potrebom za nanomaterijalima ponajviše u medicinskoj industriji, ali i primjenom u raznim elektroničkim uređajima zbog njihove velike reaktivnosti i super magnetskih svojstava (www.alliedmarketresearch.com/nano-materials-market, pristupljeno 16.02.2024.). Nanomaterijali metala, metalnih i nemetalnih oksida te nanomaterijali ugljika (među kojima se nalazi i plastika) su industrijski najkorišteniji nanomaterijali (Slika 1) (www.market.us/report/nanomaterials-market/, pristupljeno 16.02.2024.).



Slika 1. Grafički prikaz procijenjenih vrijednosti globalnog tržišta nanomaterijala metala, metalnih i nemetalnih oksida, ugljika, gline i celuloze u razdoblju od 2022. – 2032. godine izraženo u američkim dolarima. Preuzeto i prilagođeno prema www.market.us/report/nanomaterials-market/ (Pristupljeno 16.02.2024.).

Među raznim nanomaterijalima poput nanoploča, koje imaju jednu dimenziju na nano razini, i nanožica, koje imaju dvije dimenzije na nano razini, nanočestice se ističu zbog svojih

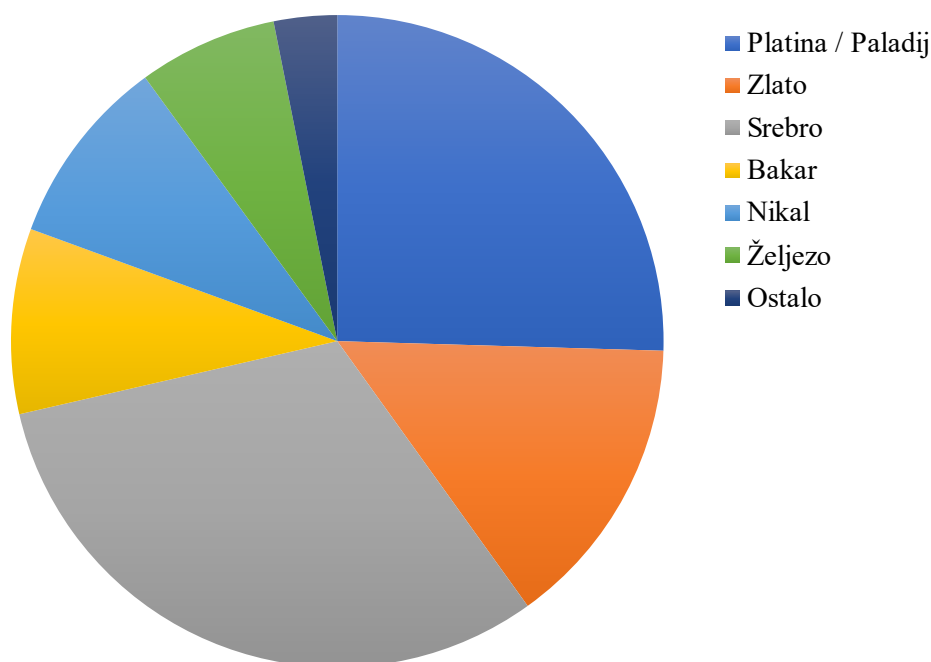
jedinstvenih karakteristika. Naime, nanočestice imaju promjer od 1-100 nm te na takvoj nano-razini sadrže promijenjena fizikalno kemijska svojstva zbog velikog omjera površine i volumena. Naime, u nano oblicima, nanočestice imaju znatno veću reakcijsku površinu na kojoj se nalazi veći broj atoma (Roduner 2006). Kombinacijom navedenog, s velikim brojem čestica po jedinici mase, ali i smanjenjem broja izravnih susjednih atoma na površini nanočestica čime se smanjuje potrebna energija vezanja atoma, znatno se povećava reaktivna sposobnost nanočestica u odnosu na veće elemente (Buzea i sur. 2007). Zbog velike reaktivnosti, nanočestice se sve više ističu kao dobri kandidati u biomedicinskim i biotehnološkim primjenama (Gherasim i sur. 2020).

2.1.1 Nanočestice srebra

AgNP su među najkorištenijim nanomaterijalima, a sve veću primjenu nalaze u medicini gdje se koriste protiv širokog spektra gram pozitivnih i gram negativnih bakterija, naročito protiv sojeva otpornih na antibiotike. Dodatno, ranija istraživanja su pokazala da AgNP imaju sinergijski učinak s antibioticima u djelovanju protiv određenih bakterija (Pulit-Prociak i Banach 2016; Gherasim i sur. 2020). U medicini, AgNP se koriste kao antikancerogeno i antidiabetičko sredstvo te u pojačavanju aktivnosti, ciljanoj dostavi i kontroliranom oslobađanju postojećih lijekova (Dawadi i sur. 2021). Zbog svojih iznimnih antibakterijskih i antifungalnih svojstava te zbog manje toksičnosti u odnosu na druge baktericide, AgNP se koriste u raznim potrošačkim proizvodima poput tekstila, a primjenu pronalaze i u dezinfekciji zraka i voda (Rana i Parmar 2023). Zbog navedenih raznolikih primjena, globalna proizvodnja AgNP je procijenjena na 500 tona godišnje s predviđenim daljnjim rastom (Temizel-Sekeryan i Hicks 2020; Bruna i sur. 2021). Vrijednost samog tržišta AgNP-a je 2022. godine iznosila 1,3 milijarde dolara s očekivanim rastom na 3,1 milijarde dolara do 2028. godine (www.markwideresearch.com/silver-nanoparticles-market/, pristupljeno 16.02.2024.). Povećana proizvodnja i upotreba AgNP neminovno dovodi do povećanog otpuštanja u okoliš, što predstavlja veliki rizik za biljni i životinjski svijet pa u konačnici i na ljudsko zdravlje. Naime, AgNP se vrlo lako akumuliraju u okolišu te je izračunato da se 2005. godine iz raznih izvora u okoliš otpustilo oko 4 tona AgNP, dok se 2008. godine količina povećala na 563 tone (Pulit-Prociak i Banach 2016). Imajući u vidu da je nemoguće točno utvrditi količinu otpuštenih AgNP godišnje zbog limitiranosti analitičkih tehnika, razni dobiveni podaci u sprezi s matematičkim modelima upućuju na značajno povećanje njihovog otpuštanja u okoliš, što povećava njihovu akumulaciju pa samim time i potencijalni toksični učinak (Fabrega i sur. 2011).

2.1.2 Nanočestice bakra

Elementarni bakar jedan je od najzastupljenijih elemenata na Zemlji. Kao esencijalni element u svim živim bićima nalazi se u brojnim enzimima koji sudjeluju u transportu kisika kod ljudi i životinja (Kim i sur. 2008), dok kod biljaka sudjeluje u transportu elektrona tijekom fotosinteze, u staničnom disanju, održavanju integriteta stanične stijenke te u regulaciji aktivnosti proteina mijenjanjem njihove strukture ili katalitičkog mjesta (Crisan i sur. 2021; José Rodrigues Cruz i sur. 2022). Bakar se zbog korisnih svojstava, poput termičke i električne provodljivosti, koristio te se i dalje koristi u mnogim proizvodima široke primjene, a nanočestice bakra se, uz ranije navedene AgNP, nalaze u „top 5“ najviše proizvedenih i korištenih nanočestica metala (Slika 2) (www.shingetsuresearch.com/metal-nanoparticles-market/, pristupljeno 10.02.2024.). Velika popularnost nanočestica bakra proizlazi iz njihovih iznimnih mehaničkih, električnih, termalnih i magnetskih svojstava zbog čega se koriste u brojnim industrijama. Zahvaljujući svojim antimikrobnim i antifungalnim svojstvima, koriste se u tekstilnoj industriji i medicini, dok primjenu pronalaze i kao dodatak prehrani, ali i u poboljšanju transporta lijekova (Cholewińska i sur. 2018). Intenzivno se koriste i u brojnim komercijalno-dostupnim i visoko korištenim proizvodima poput senzora, katalizatora ili surfaktanata, zbog čega je njihova proizvodnja u kontinuiranom porastu (Wu i sur. 2020). Nakon pandemije COVID-19, tržište nanočestica bakra je procijenjeno na vrijednost od 13 milijuna dolara u 2022. godini, dok su predviđanja rasta na 25 milijuna dolara do 2028. (www.precisionreports.co/global-nano-copper-particles-market-21982066, pristupljeno 10.02.2024). Tako značajan rast posljedica je povećane potrebe i korištenja elektroničkih uređaja, u kojima su nanočestice bakra prisutne zbog svojih iznimnih termofizikalnih karakteristika. Detaljna analiza otpuštanja nanočestica bakra u okoliš iz tvornica i komercijalnih proizvoda iznimno je komplicirana, ali se procjenjuje da se u vodene ekosustave Europe otpušta od 0,1 do 10 tona nanočestica bakra godišnje (Wang i Qi 2022), dok je procjena da se u Kini u tlo otpušta oko 4,6 tona svake godine (Wu i sur. 2020). Povećana proizvodnja i uporaba nanočestica bakra opravdava zabrinutost za njihov štetni utjecaj na okoliš.

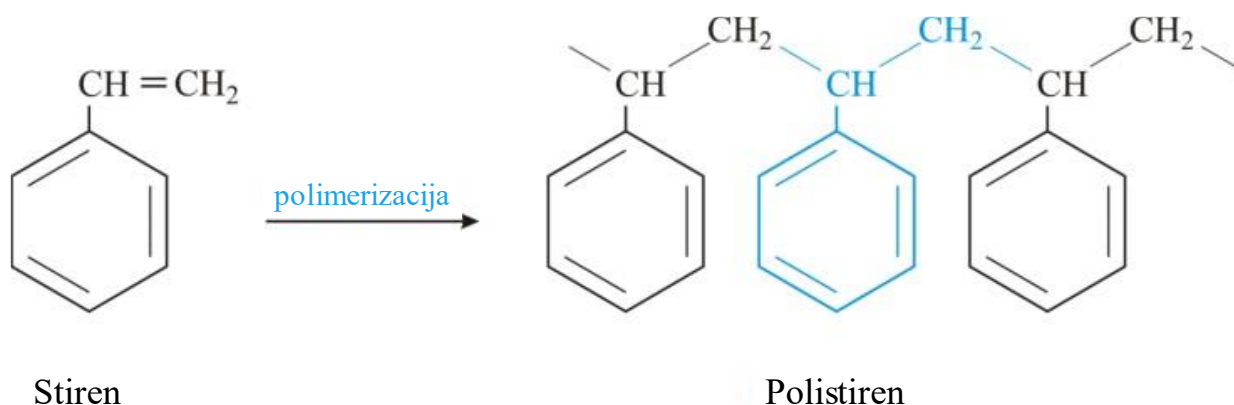


Slika 2. Grafički prikaz zastupljenosti globalnih tržišta nanomaterijala prema njihovom tipu. Preuzeto i prilagođeno prema www.shingetsuresearch.com/metal-nanoparticles-market/ (Pristupljeno 10.02.2024.).

2.1.3 Nanočestice polistirena

S razvitkom društva, jedan od najčešće korištenih materijala postala je i plastika. Od njezinog otkrića 1907. godine, zabilježena je značajno povećana proizvodnja i upotreba. Sredinom prošlog stoljeća, globalna godišnja proizvodnja plastike iznosila je otprilike 1,7 milijuna tona. Taj broj je porastao na 300 milijuna tona u 2013. godini, dok se pretpostavlja da će do 2050. godine ta brojka doseći 590 milijuna tona proizvedene plastike godišnje (www.statista.com/statistics/664906/plastics-production-volume-forecast-worldwide/, pristupljeno 10.02.2024.). Tako velika razina proizvodnje i upotrebe plastike zasigurno će dovesti do ekološke katastrofe i drastičnih promjena u životnim procesima flore i faune, mijenjajući kvalitetu vode i hrane i utječući na zdravlje ljudi. Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj (eng. *Organisation for economic co-operation and development*, OECD) navela je da se u 2019. godini oko 353 milijuna tona plastike otpustilo u okoliš, dok je do 2060. godine procijenjeno otpuštanje 1014 milijuna tona plastike svake godine (OECD 2022). Pojam plastika podrazumijeva skup sintetičkih organskih polimera. Postoji nekoliko visoko korištenih vrsta koje se razlikuju po kemijskom sastavu: polistiren (PS), polietilen tereftalat (PET), poli(metil-metakrilat) (PMMA), polivinil klorid (PVC) i drugi (Okunola i sur. 2019). Općenito, svojstvo svakog tipa plastike je termoplastičnost, odnosno mogućnost oblikovanja prilikom

zagrijavanja (Jin i sur. 2019). Jedan od češće korištenih tipova plastike je aromatski polimer PS koji nastaje polimerizacijom stirenskih monomera (Slika 3). Zbog svojih pozitivnih karakteristika, među kojima su navedena termoplastičnost, prozirnost, elastičnost i dugotrajnost, PS se nalazi u mnogim komercijalno dostupnim proizvodima poput igračaka i četkica za zube. Također, zbog iznimno male biorazgradivosti, PS se koristi u raznim proizvodima prehrambene i medicinske industrije, dok se zbog svoje čvrstoće koristi za proizvodnju tanjura, zdjela i čaša za jednokratnu uporabu (Loos i sur. 2014). PS-NP kao i drugi nanomaterijali, imaju poboljšana svojstva u odnosu na veće oblike zahvaljujući svojoj povećanoj reaktivnosti pa se koriste kao biosenzori (Velev i Kaler 1999), za pročišćavanje i razdvajanje biomolekula (Cortés i sur. 2020), za dostavu lijekova u specifične stanice ili organe (Loos i sur. 2014) te u optoelektronici zbog svojih svojstava emitiranja i apsorpiranja svjetla (Chen i sur. 2015).



Slika 3. Prikaz strukture i polimerizacije polistirena. Preuzeto i prilagođeno prema Prabhu i sur. (2019).

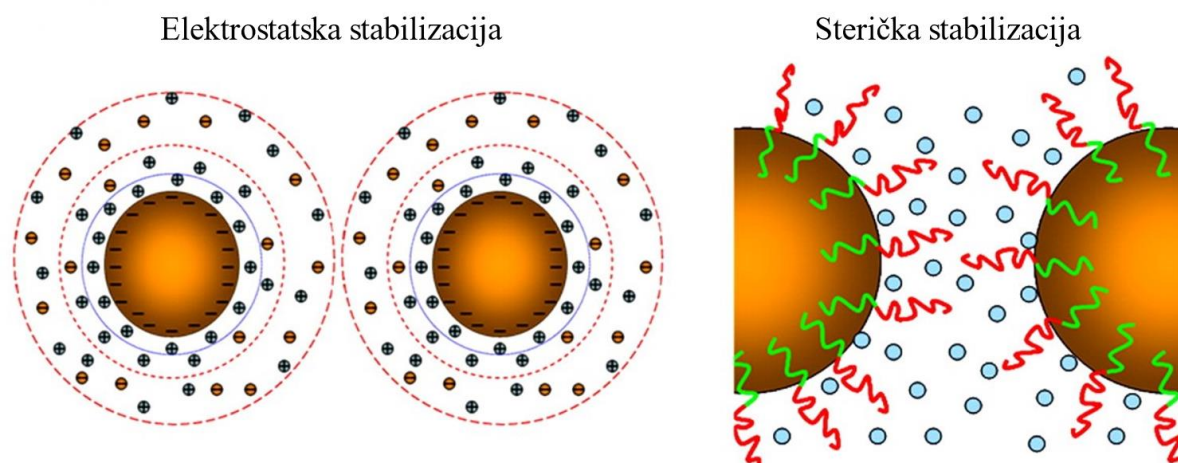
2.2 Stabilnost i funkcionalnost nanočestica

Nanočestice duguju široki spektar uporabe svojoj visokoj reaktivnosti, koja je posljedica njihove veličine. Pri tako malim veličinama, odnos njihove površine i volumena se značajno povećava, što iznimno utječe na promjenu njihovih karakteristika. Naime, usporedbom s velikim „makro“ oblicima, nanočestice imaju poboljšana mehanička svojstva, među ostalim zbog nerijetko pravilne kristalne strukture i smanjenih kristalografskih nepravilnosti (Saxena i Jyoti 2021). No, najveći razlog njihove rasprostranjenosti u raznim industrijama je upravo povećana reaktivnost u odnosu na velike oblike, što se reflektira u poboljšavanju električnih svojstava (Alivisatos 1996), kvantnim efektima u poluvodičima (Geoffrion i Guisbiers 2020),

visokoj termalnoj i električnoj vodljivosti (Krishnan i sur. 2019), pojavi magnetizma (Roduner 2006), ali i antimikrobnim svojstvima (Makvandi i sur. 2020; Baig i sur. 2021).

Navedena visoka reaktivnost, ujedno je i glavni uzročnik njihove visoke nestabilnosti (Biba i sur. 2021). Naime, zbog visoke površinske energije, nanočestice lako reagiraju s ostalim česticama u okolišu, ali i međusobno (Wu i sur. 2011). Rezultat takvih reakcija može biti aglomeracija u veće čestice, sedimentacija, promjena oblika, kristalizacija, promjena površine, disocijacija ili razne kemijske reakcije koje mogu voditi do promjene kemijske strukture (Wu i sur. 2011; Baig i sur. 2021; Altammar 2023). Sve navedene promjene znatno utječu na početne karakteristike nanočestica, čime se može smanjiti i njihova pokretljivost u raznim medijima (Tkalec i sur. 2019).

S ciljem njihove djelomične stabilizacije, ali uz zadržavanje dovoljne razine reaktivnosti radi pozitivnih karakteristika, AgNP se nerijetko stabiliziraju raznim omotačima u postupku njihove sinteze (Biba i sur. 2021). Dva najčešća tipa stabilizacije su korištenjem steričkih ili elektrostatskih omotača (Slika 4). Sterički omotači su određene velike molekule ili razni polimeri koji se vežu na površinu AgNP te time stvaraju fizičku barijeru koja onemogućuje aglomeraciju čestica (Rónavári i sur. 2021). Neki od najčešćih steričkih omotača su polivinilpirolidon (PVP) i polietilen glikol (PEG) (Shkilnyy i sur. 2009; Rónavári i sur. 2021). S druge strane, elektrostatski omotači su nabijene molekule ili ioni koji vezivanjem na površinu AgNP blokiraju aglomeraciju pomoću elektrostatskog odbijanja istoimenih iona (Filipczak i sur. 2020). Primjeri najčešćih elektrostatskih omotača su citrat, cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB), natrijev dodecil sulfat (SDS) i polietilenimin (PEI) (Sui i sur. 2006; Kora i sur. 2009; Zhang i sur. 2020a; Komazec i sur. 2023). Navedeni omotači stabiliziraju AgNP, čime se smanjuje disocijacija iona Ag^+ s njihove površine, no ujedno mogu i promijeniti njihove karakteristike (Biba i sur. 2021). Naime, vezanjem molekula na površinu nanočestica može se promijeniti veličina i oblik samih nanočestica, ali i smanjiti reaktivnost zbog blokiranja difuzije visoko reaktivnih molekula na površinu (Tolstov i Lebedev 2012; Fleitas-Salazar i sur. 2017; Fahmy i sur. 2019). Također, dodavanjem spojeva na površinu AgNP može doći do promjene optičkih svojstva radi interakcije svjetla s površinskim omotačima (Fahmy i sur. 2019). AgNP stabilizirane s omotačima imaju široku primjenu u mnogim industrijama upravo zbog povećane stabilnosti te se koriste u medicini, pakiranju hrane te pročišćavanju voda (Dawadi i sur. 2021; Rana i Parmar 2023).

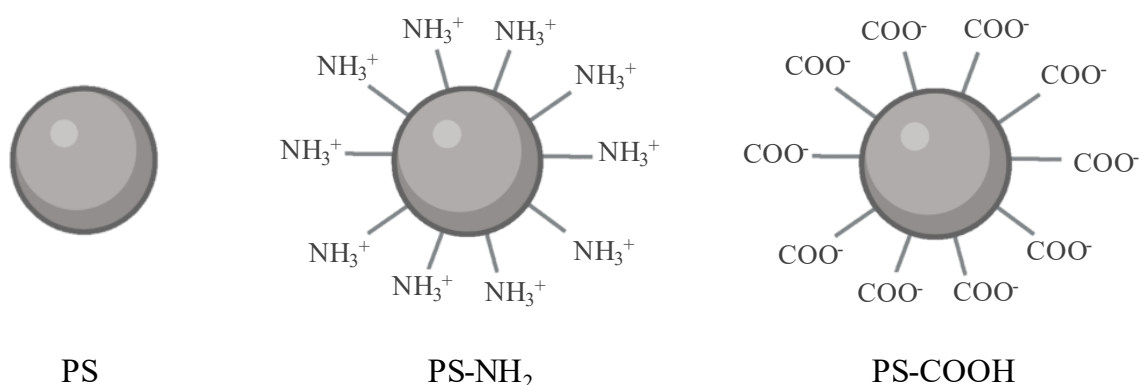


Slika 4. Prikaz modela elektrostatske i steričke stabilizacije nanočestica. Preuzeto i prilagođeno prema Wu i sur. (2011).

Zbog svoje reaktivnosti, nanočestice bakra u vodenim medijima teže ka aglomeraciji, ali i oksidaciji u druge, termostabilnije oblike (Michaud i sur. 2019). Naime, nezaštićene nanočestice bakra su izrazito nestabilne u kontaktu sa zrakom prilikom čega dolazi do reakcije s O_2 i njihove oksidacije u nanočestice bakrovog(I) oksida (Cu_2ONP) i u termodinamički najstabilnije nanočestice bakrovog(II) oksida ($CuONP$) (Pacioni i sur. 2013; Kumar i sur. 2022). $CuONP$ se često koriste u liječenju bakterijskih infekcija i malignih bolesti zbog svojih antitumorskih i antibakterijskih svojstava (Chauhan i sur. 2021; Maliki i sur. 2022). Cu_2ONP se zbog svojih iznimnih svojstava poluvodiča koriste u baterijama i solarnim ćelijama te kao senzori razine glukoze u krvi, dok se zbog katalitičkih karakteristika, zajedno s $CuONP$, koriste u tretmanu otpadnih voda (Du i sur. 2017; Gupta i sur. 2018; Mikami i sur. 2019; Ighalo i sur. 2021; Xiang i sur. 2023b). Zbog različite stabilnosti i reaktivnosti, nanočestice bakrovih oksida pokazuju i različitu toksičnost. Istraživanja pokazuju da je potencijalna toksičnost Cu_2ONP rezultat otapanja i disocijacije bakrovih(I) iona (Cu^+) koji u vodenim otopinama brzo prelaze u bakrove(II) ione (Cu^{2+}) (Vavra i sur. 2024), dok $CuONP$ pokazuju intrinzičnu citotoksičnost bez otpuštanja iona Cu^{2+} (Henson i sur. 2019). Takva razlika u mehanizmima toksičnosti ukazuje na potrebu razumijevanja specifičnih interakcija nanočestica i bioloških sustava radi procjene njihove sigurnosti i potencijalnih utjecaja na zdravlje.

U odnosu na nanočestice metala, PS-NP pokazuju veću stabilnost i manju reaktivnost u vodenim medijima (Kik i sur. 2020). Iako imaju izvrsna intrinzična svojstva poput visokog kapaciteta vezanja (Fertsch-Gapp i sur. 2011), visoke specifičnosti (Woo i sur. 2022) i termalne stabilnosti (Asandulesa i sur. 2023), radi dobivanja dodatnih svojstava ili radi pojačavanja već

postojećih, na njihovu površinu mogu se vezati razne funkcionalne skupine (Jiang i Thayumanavan 2005; Herzog i sur. 2012; Loos i sur. 2014; Fuchs i sur. 2016; Perini i sur. 2022) procesom oksidacije, a najistaknutije su amino i karboksilne skupine (van Midwoud i sur. 2012; Loos i sur. 2014; Fuchs i sur. 2016; Zhang i sur. 2022a) (Slika 5). U kemijskom smislu, funkcionalne skupine su skupina atoma u sklopu drugih molekula koje imaju vlastita karakteristična svojstva, zbog čega uzrokuju karakteristične kemijske reakcije te mijenjaju fizikalno-kemijska svojstva molekule. Navedeno svojstvo omogućuje sustavno predviđanje kemijskih reakcija što je od iznimne koristi u dizajnu kemijske sinteze, ali i bioreakcija (Kofoed i Miller 2023). PS-NP funkcionalizirane amino skupinom (PS-NH₂-NP) koriste se u proučavanju bio-nano interakcija, imaju poboljšanu disperziju i mogućnost otapanja u otopinama te pojačanu međufaznu aktivnost, odnosno mogućnost odvajanja dviju faza spontanom nakupljanjem na njihovoj granici (Loos i sur. 2014; Garrido i sur. 2020; Makkad 2020; Shi i sur. 2020a). PS-NP funkcionalizirane karboksilnom skupinom (PS-COOH-NP) također se koriste u proučavanjima bio-nano interakcija, imaju poboljšanu pokretljivost i disperzijsku stabilnost u otopinama zbog jakih vodikovih veza te su vrlo homogene u biološkim tekućinama (Jiang i sur. 2011; Loos i sur. 2014; Bahk i sur. 2015).



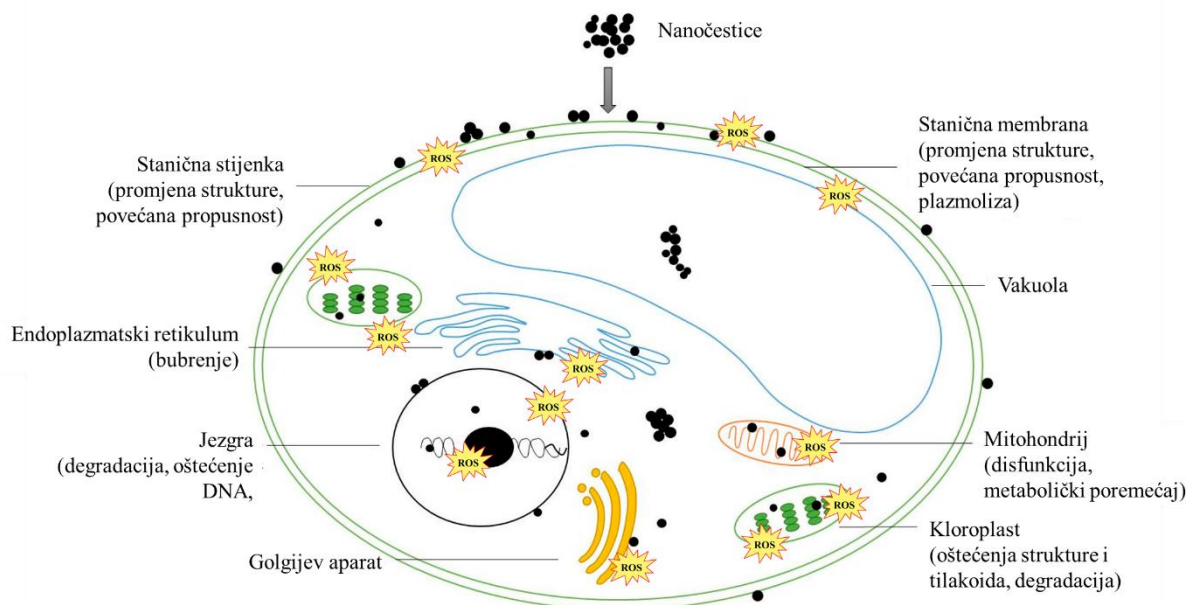
Slika 5. Model nanočestice polistirena (PS-NP) bez modifikacija te nanočestica polistirena modifikiranih s amino (PS-NH₂-NP) ili karboksilnom (PS-COOH-NP) funkcionalnom skupinom.

2.3 Fitotoksični učinak nanočestica na alge

Povećano korištenje proizvoda koji sadrže nanočestice, ali i povećane industrijske potrebe u kojima su nanočestice nerijetki nusprodukt, dovodi do njihovog sve većeg otpuštanja u okoliš (Vineeth Kumar i sur. 2022). Najviše su ugroženi vodeni ekosustavi jer djeluju kao slivnik u kojem dolazi do značajnog nakupljanja nanočestica (Turan i sur. 2019). Nanočestice do različitih ekosustava mogu doći prirodnim putem, primjerice vulkanskim erupcijama (Ermolin

i sur. 2018), šumskim požarima, pustinjskim olujama (Smita i sur. 2012) ili otpuštanjem iz živih organizma kao što su bakterije i kvasci (Griffin i sur. 2017). Antropogenim djelovanjem, s druge strane, nanočestice u okoliš dospijevaju odbacivanjem kozmetičkih proizvoda (Wiechers i Musee 2010), primjenom u pesticidima (Singh i sur. 2021), ispušnim plinovima motora s unutarnjim izgaranjem (Hirano i sur. 2003), otpadnim vodama koja sadrže sredstva za pranje rublja (Capjak i sur. 2018), ali i putem remedijacije podzemnih voda (Zhang i Elliott 2006). Nanočestice u okolišu zatim se, direktno ili putem slivnih voda i kiša, koncentriraju u vodenim ekosustavima, gdje su najrašireniji organizmi autotrofni protisti, odnosno alge (Shalaby 2011; Turan i sur. 2019), koji su, uz cijanobakterije, jedni od najvećih proizvođača O₂ procesom fotosinteze (Aljaghoub i sur. 2023; Field i sur. 1998). Među raznim vrstama algi, *C. vulgaris* je dobar modelni organizam za potrebe istraživanja zbog lakoće uzgoja, brzog rasta i široke primjene u znanosti o okolišu, biotehnologiji te istraživanju fotosinteze (de Abreu i sur. 2014; Dall'Osto i sur. 2019).

Fitotoksičnost nanočestica uvjetovana je raznim čimbenicima, od njihovog tipa, veličine sve do kristalne strukture i površine (Turan i sur. 2019). Poznato je da kod biljaka i algi nanočestice srebra i bakra mogu dovesti do destabilizacije stanične membrane, redukcije biomase, usporavanja rasta, dok kod biljaka izazivaju i deformaciju korijena (Stampoulis i sur. 2009; Hazeem i sur. 2019; Yan i Chen 2019; Wang i sur. 2020a; Janova i sur. 2021). Veliku ulogu u toksičnosti nanočestica srebra i bakra ima proces disocijacije odnosno otpuštanja iona s nanočestica (Turan i sur. 2019; Li i sur. 2021a). Navedeni ioni puno lakše ulaze u stanice kroz membranske proteine i ionske kanale, gdje mogu reagirati s nizom drugih elemenata te tako dovesti do destabilizacije staničnog integriteta (Xiu i sur. 2012; Turan i sur. 2019; Sabourian i sur. 2020). S druge strane, jednostanične alge na svojoj površini imaju mukozni sloj EPS za kojeg je pokazano da može djelovati kao filter za redukciju unosa nanočestica u njihove stanice (Hund-Rinke i sur. 2020). Sloj EPS se u većoj mjeri sastoji od polisaharida uz prisustvo manjih količina proteina, lipida i nukleinskih kiselina (Babiak i Krzemińska 2021). Nanočestice ovih metala, koje ipak prođu kroz sloj EPS te uđu u stanice, mogu reagirati s molekulom DNA te tako utjecati na genom i posljedično na proteom algi (Huang i sur. 2022), a mogu i međudjelovati s proteinima i lipidima te tako destabilizirati čitave stanice i inhibirati njihov rast (Ji i sur. 2011; Chen i sur. 2019; Wang i sur. 2019; Janova i sur. 2021). Jedna od značajki fitotoksičnosti nanočestica je i pojačana produkcija ROS molekula, koje daljnjom interakcijom s biomolekulama pridonose negativnom učinku nanočestica na alge (He i sur. 2012; Hazeem i sur. 2019) (Slika 6).



Slika 6. Prikaz distribucije, akumulacije i potencijalnih toksičnih učinaka nanočestica na stanice alge putem izravne interakcije ili kroz povećanu proizvodnju reaktivnih oblika kisika (ROS). Preuzeto i prilagođeno prema Wang i sur. (2019).

Za razliku od nanočestica srebra i bakra, PS-NP pokazuju slabiju akutnu toksičnost zbog njihovog zadržavanja u sloju EPS, odnosno vezanja na površinu samih stanica algi (Nolte i sur. 2017; Sabourian i sur. 2020; Khoshnamvand i sur. 2021), gdje mogu promijeniti transmembranski potencijal, ograničiti prijenos materijala, plinova i energije između okoline i stanica algi, ali i blokirati količinu svjetlosti koja dolazi do klorofila (Hazeem i sur. 2020; Khoshnamvand i sur. 2021; Perini i sur. 2022). Takvim djelovanjem PS-NP mogu dovesti do pojačane produkcije ROS-a, oksidacije lipida, smanjenja fotosinteze i usporavanja rasta algi (Hazeem i sur. 2020; Natarajan i sur. 2022; Xiang i sur. 2023a). Usprkos smanjenoj fitotoksičnosti PS-NP u usporedbi s nanočesticama metala, zabrinutost raste zbog njihove izrazito spore biorazgradnje (Balema i sur. 2021; Ullah i sur. 2023), koja doprinosi postupnom povećanju njihove koncentracije u okolišu, opravdavajući zabrinutost u vezi s mogućim dugoročnim posljedicama kroničnog izlaganja (Awet i sur. 2018).

2.3.1 Utjecaj nanočestica na morfologiju

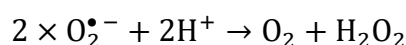
Uzimajući u obzir da su nanočestice sve prisutnije u vodenim ekosustavima, iznimno je važno promatrati njihov kontinuirani utjecaj na biom takvih staništa. Kako su alge jedna od najbrojnijih skupina organizama vodenih sustava, u njima lako može doći do bioakumulacije nanočestica. Jedan od prvih parametara kojim se može utvrditi moguća toksičnost nekog kontaminata na zelene alge je upravo promijenjena morfologija stanica, koja je ponajprije

posljedica promjena u sintezi sloja EPS (Babiak i Krzemińska 2021). U stresnim uvjetima, kao što su izloženost nanočesticama srebra, bakra i polistirena, alge mogu pojačati sintezu sloja EPS (Zhao i sur. 2016). Naime, alge koriste sloj EPS kao zaštitni sloj koji u sebi zadržava nanočestice i time sprječava direktan kontakt nanočestica i stanice (Chen i sur. 2019). Dodatno, vezanjem nanočestica i sloja EPS može se smanjiti površinska energija nanočestica, a posljedično i njihova reaktivnost, transport te fitotoksičnost (Nasser i Lynch 2016). Nanočestice koje uspiju ući u stanicu mogu izazvati plazmolizu, oštetiti staničnu stijenku ili izazvati njezino pucanje (Abdul Razack i sur. 2016; Zhou i sur. 2016). Nadalje, ulazak nanočestica može rezultirati destabilizacijom tilakoidnih membrana kloroplasta, ali i dovesti do povećanog stvaranja lipidnih kapljica kao pokazatelja stresa zbog manjka nutrijenata (Yan i Chen 2019; McKeel i sur. 2024). Svi navedeni učinci mogu poslužiti kao rani biljezi pokazatelja stresa uzrokovanog nanočesticama. Istraživanja su pokazala da tretmani s nanočesticama srebra i bakra mogu izazvati značajno povećanje veličine stanica i njihovu aglomeraciju, smanjiti njihovu gustoću u suspenziji (Romero i sur. 2020; Janova i sur. 2021; Artiukh i sur. 2022), pojačati stupanj plazmolize (Yan i Chen 2019; Solomonova i sur. 2023) i dovesti do puknuća stanične stijenke i membrane (Abdul Razack i sur. 2016), uz značajno povećanje količine sloja EPS i lipidnih kapljica (Miao i sur. 2017; Nam i sur. 2018; Romero i sur. 2020). PS-NP su pokazale slične ultrastrukturne promjene, kao što su povećanje volumena i pojačana aglomeracija stanica, povećana sinteza sloja EPS i značajno povećanje broja lipidnih kapljica (Giri i Mukherjee 2021; Huang i sur. 2021; Xiang i sur. 2023a), ali nisu bile toliko izražene kao nakon tretmana nanočesticama metala.

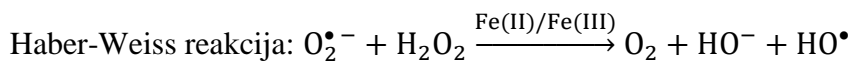
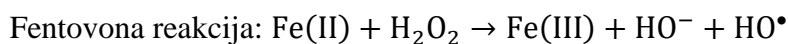
2.3.2 Utjecaj nanočestica na pojavu oksidacijskog stresa

Jedan od najzastupljenijih mehanizama fitotoksičnosti nanočestica srebra, bakra i polistirena je povećana proizvodnja ROS (Khanna i sur. 2015; Dayem i sur. 2017; Flores-López i sur. 2019), koje nastaju kao međuprodukti metabolizma O_2 kroz enzimske ili neenzimske reakcije ili elektronskom ekscitacijom (Sies i Jones 2020; Mansoor i sur. 2022), a u fiziološkim uvjetima imaju ulogu u staničnoj signalizaciji (Rezayian i sur. 2019). Budući da ROS imaju nespareni elektron, mogu se podijeliti na slobodne kisikove radikale ili na neradikalne reaktivne oblike kisika (Flores-López i sur. 2019). Pokazano je da se u biljkama i algama, $O_2^{\bullet -}$ u najvećoj količini stvara u lancu prijenosa elektrona unutar fotosustava I (eng. *photosystem I*, PSI) i fotosustava II (eng. *photosystem II*, PSII), gdje O_2 može reagirati s njihovim raznim komponentama (Khan i sur. 2023). Naime, u normalnim uvjetima, apsorbirana svjetlosna energija se koristi za pokretanje lanca prijenosa elektrona na tilakoidnim membrana kloroplasta

u procesu fotosinteze. No, u stresnim uvjetima može doći do gubitka ravnoteže prijenosa elektrona te redukcije O_2 pomoću raznih komponenata PSI, poput ferredoksina, i PSII, poput plastokinona, čime nastaje $O_2^{\bullet-}$ (Palma i sur. 2019). Dodatno, enzimi poput citokroma P450 i ksantin oksidaze također mogu reducirati elektron O_2 i tako stvoriti $O_2^{\bullet-}$ (Galbusera i sur. 2006; Veith i Moorthy 2018), Među različitim ROS, $O_2^{\bullet-}$ se najčešće prvi stvara te se njegovom daljnjom reakcijom mogu formirati drugi oblici ROS (Fujii i sur. 2022; Khan i sur. 2023), kao što su HO^{\bullet} , 1O_2 , H_2O_2 , peroksilni radikal (ROO^{\bullet}) i alkoksi radikal (RO^{\bullet}) (Yin i sur. 2012; Khan i sur. 2023). H_2O_2 se u biljkama i algama stvara protonacijom, odnosno redukcijom $O_2^{\bullet-}$ prema formuli:



H_2O_2 se u biljnim stanicama primarno stvara u mitohondriju tijekom procesa oksidativne fosforilacije, ali velika većina dolazi i iz lanca prijenosa elektrona u kloroplastima (Saxena i sur. 2016; Palma i sur. 2019). Nadalje, HO^{\bullet} nastaje Fentonovom reakcijom iz H_2O_2 ili putem Haber-Weiss reakcije iz $O_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 uz pomoć prijelaznih metala poput željeza prema jednadžbama (Barbusiński 2009):



U biljnim stanicama i stanicama algi, različiti ROS djeluju kao signalne molekule (Khan i sur. 2023). $O_2^{\bullet-}$ ima ključnu ulogu u prekidanju dormancije sjemena kod biljaka do koje dolazi smanjenjem razine glutaciona što mobilizira dušik i ugljikohidrate potrebne za klijanje (Bykova i sur. 2011). Nadalje, niske razine H_2O_2 služe kao regulatorni signal u mnogim biološkim procesima poput rasta i razvoja, fotosinteze i fotorespiracije (Miller i sur. 2010). Za HO^{\bullet} se prvotno smatralo da ima isključivo negativno djelovanje, ali novija istraživanja ukazuju na njegovu važnu ulogu u rastu i razvoju, zatvaranju puči te adaptaciji na stresne uvjete upravo zbog njegove jake oksidacijske mogućnosti (Richards i sur. 2015). 1O_2 nastaje u kompleksu antena i reakcijskom centru fotosutava II (eng. PSII prijenosom viška energije na O_2 te je pokazano da stimulira odgovor na razne stresne uvjete oksidacijom karotenoida, proteina i lipida (Dogra i Kim 2020).

Suprotno pozitivnim učincima oblika ROS u staničnoj signalizaciji kada su prisutni u niskim koncentracijama, njihova povećana količina dovodi do značajnih štetnih učinaka (Rezayian i sur. 2019). $O_2^{\bullet-}$ može inaktivirati antioksidacijske enzime (Fridovich 1986), dok se HO^{\bullet}

akumulira u stanicama zbog nedostatka enzima koji bi ga mogao neutralizirati te u većim koncentracijama može dovesti do stanične smrti (Bano i sur. 2022). Povećana količina svih oblika ROS može sinergistički rezultirati peroksidacijom lipida, oksidacijom proteina i molekule DNA i na taj način negativno utjecati na biološki važne procese: fotosintezu, izmjenu plinova, tvari i energije s okolinom te u konačnici na rast i razvoj stanica (Rezayian i sur. 2019; Khan i sur. 2023). Nanočestice mogu potaknuti stvaranje ROS doniranjem elektrona na O_2 , koji posljedično tvori $O_2^{\bullet-}$ (Flores-López i sur. 2019). Značajno povećanje u razini ROS primijećeno je u stanicama algi nakon izlaganja nanočesticama srebra (He i sur. 2012), bakra (Fathi i sur. 2020) i polistirena (Xiang i sur. 2023a), što posljedično može imati jako štetne učinke na biološki važne makromolekule.

Razina unutarstaničnog sadržaja ROS najčešće se detektira i kvantificira primjenom raznih fluorescentnih proba (Gomes i sur. 2005), među kojima se izdvajaju 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (H_2DCFDA), koji se koristi u detekciji ukupnog ROS i dihidroetidij (DHE), koji je specifičan za $O_2^{\bullet-}$ (Oparka i sur. 2016; Ng i Ooi 2021). Obje molekule mogu slobodno prolaziti kroz lipidni dvosloj te tako ući u stanicu (Oparka i sur. 2016; Wang i Zou 2018). Molekulu H_2DCFDA deacetiliraju stanične esterase do 2',7'-diklorodihidrofluoresceina (H_2DCF) koji se vrlo brzo oksidira djelovanjem različitih oblika ROS, čime nastaje fluorescentni 2',7'-diklorofluorescein (DCF) (Kim i Xue 2020; Ng i sur. 2020).

Molekula DHE se nakon internalizacije u stanicu oksidira pomoću $O_2^{\bullet-}$ nakon čega nastaju dvije fluorescentne probe koje se mogu detektirati. Naime, nespecifičnom redoks reakcijom nastaje etidij (E^+), dok oksidacijom ovisnom o $O_2^{\bullet-}$ nastaje 2-hidroksietidij (2-OH- E^+) (Wang i Zou 2018).

Kako je jačina fluorescencije navedenih proba ovisna o količini ROS unutar stanice, pomoću njih je vrlo lako moguće pratiti sadržaj staničnog ROS korištenjem mikroskopijskih tehnika, ali i relativno kvantificirati njihovu razinu korištenjem čitača mikrotitarskih pločica ili protočnog citometra (Wang i Zou 2018; Kim i Xue 2020).

Iako se H_2DCFDA nerijetko koristi kao proba specifična za H_2O_2 , pokazano je da hidrolizu H_2DCFDA mogu inducirati razni hidroksilni, karbonatni, dušikovi ili tioilni radikali te je H_2DCFDA zapravo indikator ukupnog sadržaja ROS u stanici (Oparka i sur. 2016). Kako najveći udio oblika ROS u biljnim stanicama odlazi na H_2O_2 , njegova relativna i apsolutna razina u stanicama često se koristi kao indikator fiziološkog statusa biljke (Rahman i sur. 2023).

Jedna od najraširenijih metoda kvantifikacije H_2O_2 je metoda FOX (eng. *ferrous oxidation-xylene orange assay*) u kojoj se spektrofotometrijski mjeri nastajanje kompleksa boje ksilenol narančasto i iona željeza (Fe^{3+}) nastalih oksidacijom iona Fe^{2+} putem H_2O_2 . Tako nastali kompleks apsorbira svjetlost na valnoj duljini od 560 nm (Moon i Shibamoto 2009; Ewing i sur. 2018).

Ranija istraživanja su pokazala da AgNP bez omotača i stabilizirane L-tirozinom, kurkuminom i epigalokatehin galatom uzrokuju značajno povećanje proizvodnje ROS u stanicama zelenih algi *C. vulgaris* i *Raphidocelis subcapitata* (Oukarroum i sur. 2012b; Lekamge i sur. 2019). S druge strane, tretman s AgNP-citrat u vrsti *C. vulgaris* nije izazvao značajno povećanje sadržaja slobodnih radikala (Qian i sur. 2016). Solomonova i sur. (2023) također su pokazali kako izlaganje stanica algi *Dunaliella salina*, *Isochrysis galbana*, *Thalassiosira weissflogii* i *Prorocentrum cordatum* CuONP izaziva povećanu proizvodnju oblika ROS. Nadalje, usporedna analiza utjecaja nanočestica polistirena s različitim funkcionalnim skupinama na alge *C. vulgaris* i *Scenedesmus* pokazala je da PS-NH₂-NP značajno povećavaju sadržaj ROS u obje vrste, dok su PS-COOH-NP izazvale značajno povećanje vrijednosti samo u vrsti *C. vulgaris* (Bhattacharya i sur. 2010). Iz dosadašnjih istraživanja vidljivo je kako postoji značajna potreba za komparativnom analizom utjecaja nanočestica sa i bez omotača, sa i bez funkcionalnih grupa i u različitim oksidacijskim stanjima u istim eksperimentalnim uvjetima, jer navedene karakteristike nanočestica mogu utjecati na razinu oksidacijskog stresa u stanicama algi.

2.3.2.1 Oksidacijsko oštećenje biomolekula

Kao što je navedeno, izlaganje različitim tipovima nanočestica može rezultirati povećanim sadržajem ROS, koji posljedično mogu međudjelovati s biološki važnim makromolekulama kao što su lipidi, proteini i nukleinske kiseline i na taj način oštetiti stanice algi, destabilizirati mnogobrojne stanične procese te u konačnici rezultirati staničnom smrću (Tripathy i Oelmüller 2012).

2.3.2.1.1 Peroksidacija lipida

Lipidi su male amfipatske molekule koje imaju hidrofилnu, polarnu stranu i lipofilnu, hidrofobnu stranu. Zbog svoje dualne prirode, lipidi se nalaze u raznim staničnim strukturama algi kao što su stanične membrane i membrane organela, lipidne kapljice te izvanstanične vezikule (Xu i sur. 2023). Lipidi imaju ključnu ulogu u mnogim staničnim procesima algi, zbog čega je njihov sastav strogo reguliran (Jouhet i sur. 2022). Zahvaljujući svojoj energetske gustoći, lipidi se koriste u skladištenju ugljika i energije u obliku triglicerida, dok u algama imaju i ulogu

signalnih molekula (Jouhet i sur. 2022; Parveen i Patidar 2022). Zbog svih navedenih karakteristika i posljedičnih uloga, lipidi su esencijalni za normalnu funkciju i preživljavanje stanica algi (Morales i sur. 2021).

Pojedini radikali, a primarno HO[•], mogu uzrokovati peroksidaciju lipida, odnosno procesa u kojem slobodni radikali uklanjaju elektron s dvostruke veze između dva atoma ugljika lipida, među kojima su polinezasićene masne kiseline (eng. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) najpodložnije oksidaciji (Yang i sur. 2016; Endale i sur. 2023). Njihovom oksidacijom nastaju razni međuprodukti koji dalje mogu reagirati s drugim molekulama (Su i sur. 2019). Peroksidacija lipida odvija se u tri uzastopna koraka: inicijacija, transmisija ili propagacija te terminacija (González-Minero i sur. 2020). U prvoj fazi tzv. fazi inicijacije, slobodni radikali reagiraju s dvostrukom C-C vezom te uklanjaju alilni vodik, čime nastaju slobodni lipidni radikali. U daljnjoj fazi transmisije ili propagacije, lipidni radikali brzo reagiraju s O₂ te se posljedično stvaraju peroksilni lipidni radikali, koji zatim mogu ponovno ukloniti vodik s druge molekule PUFA čineći tako kontinuiranu lančanu reakciju ili formirati razne dialdehide i ketoaldehide (Pamplona i sur. 2019). Iz jedne inicijalne reakcije, može nastati 200-400 propagacijskih ciklusa što znatno povećava oksidacijski stres u stanici (Mas-Bargues i sur. 2021). U konačnici, proces lipidne peroksidacije se zaustavlja tek stvaranjem lipidnog peroksida koji ne može dalje reagirati s drugim PUFA molekulama (Endale i sur. 2023).

U algama, proces lipidne peroksidacije može negativno djelovati na razne esencijalne procese poput fotosinteze i izmjene plinova i tvari s okolinom destabilizacijom stanične i tilakoidne membrane (Dall'Osto i sur. 2019; Zhao i sur. 2021). Također, na razini organela, oksidacijom lipida u membrani mitohondrija, lipidna peroksidacija dovodi do bubrenja membrane mitohondrija, što narušava njenu propusnost, rezultira njenim nepovratnim otvaranjem te može imati veliki utjecaj na metabolizam alge (Wang i sur. 2023a). U konačnici, lipidna peroksidacija, odnosno njen konačni produkt, lipidni peroksid, može u kombinaciji s redoks aktivnim željezom rezultirati ferroptozom, odnosno ne-apoptotskom staničnom smrću koja je specifična za lipidnu peroksidaciju (Conrad i sur. 2018). Iako još nije dovoljno razjašnjeno, jedno istraživanje pokazalo je da povećanje sadržaja ROS može rezultirati ferroptičnom staničnom smrću u stanicama alge *Chlamydomonas reinhardtii* (Srinivasan i sur. 2023)

Kao što je ranije navedeno, peroksilni radikali stvaraju i veliku količinu aldehida, među kojima su najčešći malondialdehid (MDA) i glioksal (Mas-Bargues i sur. 2021).

Stoga se jedna od najčešće primijenjenih spektrofotometrijskih metoda za detekciju i kvantifikaciju stupnja lipidne peroksidacije temelji na reakciji nastalog MDA s tiobarbiturnom kiselinom (TBA). Tom reakcijom nastaje kompleks MDA-TBA₂ koji apsorbira svjetlost na valnoj duljini od 532 nm (Mas-Bargues i sur. 2021). Kako TBA može reagirati i s drugim molekulama nastalim u procesu lipidne peroksidacije, navedena metoda je nazvana TBARS (eng. *thiobarbituric acid reactive substances*) (Zeb i Ullah 2016).

Istraživanja su pokazala da nanočestice srebra (Liu i sur. 2020a; Qiao i sur. 2022), bakra (Wan i sur. 2018; Janani i sur. 2020) i polistirena (Yan i sur. 2021; Xiang i sur. 2023a) značajno povećavaju stupanj lipidne peroksidacije u stanicama algi. Qiao i sur. (2022) su pokazali da komercijalne i biosintetizirane AgNP rezultiraju stvaranjem različitih vrijednosti sadržaja MDA u stanicama alge *Chlorella pyrenoidosa*, što je vjerojatno posljedica različitih funkcionalnih skupina na površini biosintetiziranih nanočestica, iako utjecaj različito stabiliziranih AgNP na stupanj lipidne peroksidacije u stanicama algi do sada nije istraživano. Slično tome, u stanicama algi nije analizirana razlika u stupanju lipidne peroksidacije kao posljedica različitih oksidacijskih stanja nanočestica bakra, dok je jedino u biljci *Nicotiana tabacum* utvrđeno da su Cu₂ONP toksičnije u odnosu na CuONP (Dai i sur. 2019). Nadalje, rijetka su istraživanja koja su analizirala fitotoksičnost različito funkcionaliziranih nanočestica polistirena na alge. Pokazano je da su PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP izazvale podjednako povećanje razine lipidne peroksidacije u mikroalgi *Cylindrotheca closterium* pri vrijednostima EC₅₀, ali je ta vrijednost za PS-COOH-NP bila 40 puta veća u odnosu na PS-NH₂-NP (Mišić Radić i sur. 2022).

2.3.2.1.2 Oksidacija proteina

Proteini imaju ključnu ulogu u normalnom rastu i razvoju stanica algi. Oni sudjeluju u metabolizmu, fotosintezi, djeluju kao šaperoni te kao enzimi. Zbog širokog spektra djelovanja proteina, njihova destabilizacija ili degradacija može imati vrlo nepovoljan utjecaj na normalan rast i razvoj algi. Razni ROS mogu oksidirati ostatke aminokiselina, cijepati peptidne veze te dovesti do agregacije proteina. Za razliku od aminokiselina, oksidirani proteini moraju se hidrolizirati ili proteolitički obraditi u proteosomu kako ne bi reagirali s drugim molekulama ili proteinima (Juan i sur. 2021).

Jedan od najčešćih mehanizama oksidacije proteina je putem oksidacije katalizirane metalima (Cecarini i sur. 2007). Naime, nikotinamid adenin dinukleotid (eng. *nicotinamide adenine dinucleotide*, NADH) i nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (eng. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH) oksidaze, u prisutnosti iona Fe³⁺ ili Cu²⁺ kataliziraju stvaranje iona Fe²⁺ ili Cu⁺ te dodatnog H₂O₂ u stanici. Metalni ioni se zatim vežu za specifična

mjesta za vezanje metala na proteinima koja reagiraju s H_2O_2 , čime se dodatno stvara HO^\bullet koji zatim reagira s aminokiselinskim ostacima blizu veznog mjesta metala (Stadtman i Levine 2000, 2003). Cijepanje peptidne veze proteina može nastati diamidnim putem i putem α -amidacije (Garrison 1989). Naime, HO^\bullet reagira s proteinima čime se stvara alkil radikal. On se može umrežiti s drugim istoimenim radikalima, čime dolazi do agregacije proteina ili u reakciji s O_2 može stvoriti alkil peroksid ili alkoksil radikal. Kako su određene aminokiseline podložnije oksidacijskoj promjeni, na primjer aromatske aminokiseline i aminokiseline sa sulfhidrilnom skupinom (-SH), stupanj i način oksidacije proteina primarno je određen aminokiselinskim sadržajem (Cecarini i sur. 2007). Oksidacijom proteina često nastaju krajnji proizvodi napredne glikacije (eng. *advanced glycation end products*) (Uribarri i sur. 2015), koji se zajedno s proteinskim produktima napredne oksidacije (eng. *advanced oxidation protein products*) (Witko-Sarsat i sur. 1996) koriste kao jedni od biljega oksidacijskog stresa u stanicama (Kalousova i sur. 2002). Uz navedeno, najčešći rezultat oksidacije proteina je njihova karbonilacija, koja je ireverzibilan proces i dovodi do gubitka funkcije proteina (Dalle-Donne i sur. 2006). Karbonilne skupine na proteinima mogu reagirati s α -amino skupinama i bočnim ograncima lizina, što rezultira umrežavanjem proteina i stvaranjem proteinskih agregata (Cecarini i sur. 2007). Tako stvoreni agregati ne mogu se razgraditi uobičajenim protelitičkim putem, što dovodi do njihove akumulacije i posljedičnog negativnog utjecaja na funkcije stanica algi (Stadtman i Levine 2000).

Za određivanje razine karbonilacije proteina najčešće se koristi spektrofotometrijska metoda uz primjenu 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) koji reakcijom s karbonilnom skupinom stvara hidrazone čija se razina može kvantificirati na valnoj duljini od 370 nm (Purdel 2014; Castegna i sur. 2003).

Iako je potvrđeno da nanočestice mogu direktno ili indirektno putem ROS inducirati oštećenje proteina, istraživanja same razine oksidacijskog oštećenja proteina kod algi nakon izlaganja nanočesticama srebra, bakra i polistirena nedostaju (Von Moos i Slaveykova 2014; Yan i Chen 2019; Zhang i sur. 2022a). Analiza oksidacije proteina vrste *Allium cepa* nakon izlaganja AgNP stabiliziranih s omotačima PVP, citrat i CTAB pokazala je da AgNP-PVP imaju najmanji toksični učinak (Cvjetko i sur. 2017). Izlaganje alge *C. reinhardtii* nanočesticama bakra rezultiralo je smanjenjem sinteze proteina (Janova i sur. 2021), dok se količina topivih proteina značajno smanjila u vrsti *Lactuca sativa* nakon izlaganja PS-NP (Lian i sur. 2021). Istraživanja utjecaja različitih omotača, funkcionalnih skupina ili oksidacijskih stanja nanočestica na oksidaciju proteina nedostaju kako na biljkama, tako i na algama.

2.3.2.1.3 Oksidacija molekule DNA

Molekula DNA nositelj je genetske informacije i daje upute za sintezu proteina i regulira stanične aktivnosti te je njen integritet kritičan za normalno funkcioniranje stanice (Shi i sur. 2021). Molekula DNA podložna je oksidaciji putem raznih oblika ROS, što može rezultirati promjenama u dušičnim bazama te jednolančanim i dvolančanim lomovima (Roldán-Arjona i Ariza 2009). Naime, HO^\bullet može reagirati s dvostrukom vezom pirimidina C5-C6, čime se stvaraju 5-hidroksi-6-il i 6-hidroksi-5-il radikali koji dalje mogu oksidirati DNA te tako akumulirati oštećenja, dok oksidacija veze C8-OH purina rezultira stvaranjem 7-hidro-8-oksogvanina (Juan i sur. 2021; Hahm i sur. 2022). Izuzev izravne oksidacije putem ROS, DNA se može oksidirati i radikalima nastalim iz oštećenja drugih makromolekula poput peroksidacije lipida. Naime, kako je već navedeno, peroksidacijom PUFA molekula, jedan od produkata je MDA koji može reagirati s ostacima gvanina u molekuli DNA, čime se stvaraju adukti M₁G (Marnett 2000). Oksidacijom DNA mogu nastati i lomovi u molekuli DNA (Roldán-Arjona i Ariza 2009). Naime, ROS mogu reagirati sa šećerima u molekuli DNA uklanjanjem atoma vodika s pozicije C4' u deoksiribozi, čime se stvara radikal koji posljedično inducira jednolančane lomove (Sharma i sur. 2012). Iako su jednolančani lomovi češći rezultat od dvolančanih lomova prilikom oksidacijskog oštećenja DNA, istraživanja su pokazala da oksidacijski stres može uzrokovati i dvolančane lomove (Sharma i sur. 2016).

Analiza genotoksičnosti, odnosno oštećenja DNA može se pratiti na više načina, a najčešće se primjenjuju tehnike lančane reakcije polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) i metode agarozne elektroforeze kojima se mogu detektirati lomovi i lezije u molekuli DNA (Figuroa-González i Pérez-Plasencia 2017). Primjenom tehnike PCR, zaustavlja se replikacija DNA na mjestu oštećenja gdje se enzim DNA polimeraza ne može vezati, što dovodi do nastajanja kraćih fragmenata DNA u PCR produktima (Grimaldi i sur. 2002; Figuroa-González i Pérez-Plasencia 2017). S druge strane, Comet test ili gel elektroforeza jedne stanice (eng. *single-cell gel electrophoresis*) jednostavna je i često korištena metoda za kvantifikaciju lomova molekule DNA u eukariotskim stanicama. Naime, stanice se uklapanjem u agarozu imobiliziraju te se daljnjim liziranjem pri visokom pH oslobađaju nukleoidi koji sadrže petlje molekule DNA. Petlje koje sadrže lomove DNA gube svoju strukturu pa se tijekom elektroforeze kreću prema anodi i time odvajaju od ostatka DNA čineći strukturu koja slična repu kometa (Azqueta i Collins 2013). Daljnjim obilježavanjem molekule DNA fluorescentnim bojama i analizom fluorescencijskim mikroskopom moguće je odrediti omjer intenziteta repa u

odnosu na intenzitet ostatka molekule DNA, odnosno glave kometa, čime se kvantificira količina lomova (Collins 2004).

Opsežnom analizom postojeće literature nije pronađeno istraživanje genotoksičnog utjecaja AgNP na stanice algi. S druge strane, Shoman i sur. (2022) pokazali su da CuONP induciraju morfološke promjene jezgre i kromatina u stanicama alge *P. cordatum* te da dovode do oštećenja molekule DNA. Nadalje, istraživanja su pokazala da tretman s PS-NP izaziva oštećenje DNA kod alge *Phaeodactylum tricornutum* (Sendra i sur. 2019), dok tretman s PS-COOH-NP usporava proces mitoze kod alge *R. subcapitata* (Bellingeri i sur. 2019).

Dosadašnja istraživanja oksidacijskog oštećenja biomolekula uslijed izlaganja stanica algi nanočesticama srebra, bakra i polistirena su vrlo ograničena, dok u potpunosti nedostaju istraživanja o utjecaju njihovih omotača, oksidacijskih stanja i funkcionalnih skupina na razinu toksičnosti. Putem neizravnih pokazatelja, kao što je povećan sadržaj oblika ROS i oštećenje membrana i stanične stijenke te smanjena učinkovitost različitih staničnih procesa, može se zaključiti da navedene nanočestice izazivaju značajna oštećenja lipida, proteina i molekula DNA u algama. Međutim, potrebno je dodatno razjasniti ulogu često korištenih omotača u fitotoksičnosti AgNP, oksidacijskih stanja kod nanočestica bakra i funkcionalnih skupina u toksičnosti nanočestica polistirena na biomolekule stanica algi.

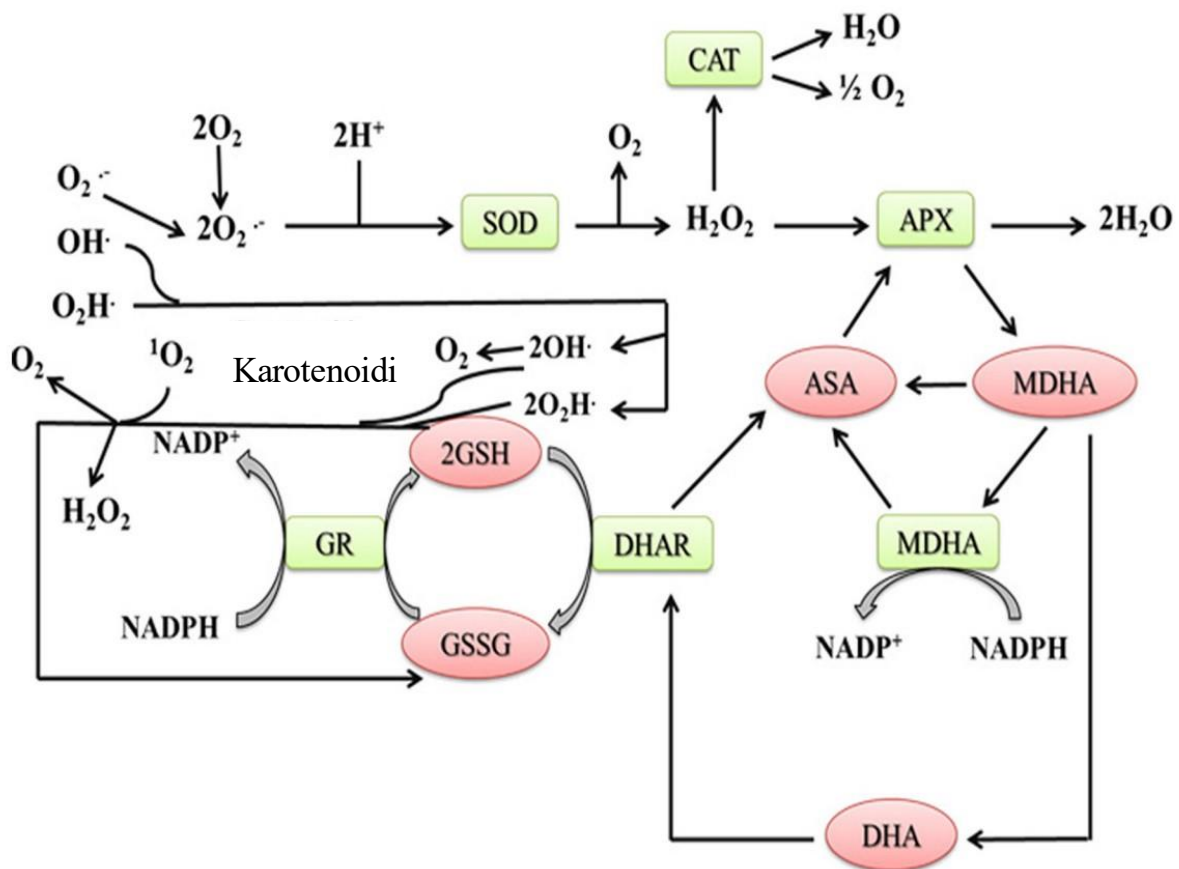
2.3.3 Antioksidacijski odgovor

Niske koncentracije ROS nužne su u stanicama algi radi sudjelovanja u brojnim staničnim procesima u obliku sekundarnih glasnika (Rezayian i sur. 2019). S druge strane, povećane količine ROS mogu iznimno naštetiti stanicama algi smanjujući njihovu vijabilnost i funkcionalnost. Kako bi u stanicama održale optimalnu oksidacijsku ravnotežu, alge su razvile mehanizme kojima ograničavaju prekomjernu akumulaciju ROS. Navedene mehanizme možemo podijeliti na enzimске i neenzimске sustave (Roy i sur. 2021).

2.3.3.1 Enzimski antioksidansi

Antioksidacijski enzimi prva su linija obrane stanica alge od oksidacijskog stresa te imaju ključnu ulogu u smanjenju štetnih učinaka ROS (Roy i sur. 2021). Putem transporta elektrona, odnosno smanjivanjem energije slobodnih radikala ili doniranjem elektrona slobodnim radikalima, antioksidacijski enzimi eliminiraju ROS, čime sprječavaju daljnju oksidaciju drugih molekula (Nimse i Pal 2015; Roy i sur. 2021). Većina antioksidacijskih enzima su metaloenzimi te sadrže metalni ion u katalitičkom mjestu, a zbog svoje se polarosti pretežito nalaze u citosolu (Gill i Tuteja 2010; Nimse i Pal 2015). Najčešći antioksidacijski enzimi u algama su

SOD, CAT, askorbat peroksidaza (APX), glutation peroksidaza (GP), glutation reduktaza (GR) i glutation transferaza (GST) (Slika 7) (Roy i sur. 2021).



Slika 7. Shematski prikaz enzimskih i neenzimskih antioksidacijskih mehanizama u stanicama algi. SOD – superoksid dismutaza, CAT – katalaza, APX – askorbat peroksidaza, MDHA – monodehidroaskorbat, ASA – askorbat, DHAR – dehidroksiaskorbat, GSSG – disulfidni glutation, GSH – glutation, GR – glutation reduktaza. Preuzeto i prilagođeno prema Rezayian i sur. (2019).

Prva linija obrane protiv oksidacijskog stresa u pogledu antioksidacijskih enzima je metaloprotein SOD koja katalizira dismutaciju $O_2^{\bullet -}$ u H_2O_2 kojeg neutraliziraju drugi enzimi (Ighodaro i Akinloye 2018). Po različitom kofaktoru metalnog iona u katalitičkom centru, razlikuju se tri izoforme enzima SOD. Enzim Cu/Zn SOD najčešće se nalazi u tilakoidnim membranama kloroplasta te u citosolu biljaka i algi, enzim Mn SOD se najčešće lokalizira u mitohondrijima, dok se enzim Fe SOD najčešće nalazi u stromi kloroplasta (Rezayian i sur. 2019). CAT i razne peroksidaze imaju ključnu ulogu u razgradnji molekule H_2O_2 (Gauthier i sur. 2020). Naime, CAT sudjeluje u pretvorbi dvije molekule H_2O_2 u dvije molekule H_2O i O_2 u dva koraka. U prvom koraku, jedna molekula H_2O_2 se reducira u H_2O , dok se ion Fe^{3+} iz hem skupine enzima CAT mijenja u Fe^{4+} . U slijedećem koraku, prijenosom elektrona s druge

molekule H_2O_2 , ion željeza u katalitičkom mjestu enzima CAT se ponovno vraća u originalni oblik Fe^{3+} , dok se druga molekula H_2O_2 pretvara u H_2O i O_2 (Maté i sur. 1999). Jedna od češćih peroksidaza u stanicama algi je APX koja, kao i enzim CAT, uz pomoć hem skupine u katalitičkom mjestu, sudjeluje u pretvorbi H_2O_2 u H_2O i O_2 koristeći askorbat kao donor elektrona (Shigeoka i sur. 2002). U stanicama algi, APX se nalazi u staničnom citosolu te su potvrđene dvije izoforme u vrstama *Galdieria partita* (Sano i sur. 2001) i *Galdieria sulphuraria* (Oesterhelt i sur. 2007). Suprotno enzimima CAT i APX, GR je oksidoreduktaza koja sudjeluje u ciklusu askorbat-glutation te održava optimalnu razinu reduciranog oblika glutaciona (GSH) (Rezayian i sur. 2019).

Spektrofotometrija je jedna od najčešće korištenih metoda za analize aktivnosti antioksidacijskih enzima. Aktivnost enzima SOD može se mjeriti direktno ili indirektno. Češće su korištene indirektno metode u kojima se analizira sposobnost inhibicije $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Cheng i sur. 2015). U metodi, koju su razvili Beauchamp i Fridovich (1971), riboflavin se koristi kao izvor $^1\text{O}_2$ i $\text{O}_2^{\bullet-}$. Naime, riboflavin je izuzetno osjetljiv na ultraljubičasto i vidljivo svjetlo te se njegovim raspadanjem stvaraju slobodni radikali. Inkubacijom nitro plavog tetrazolija (eng. *nitro blue tetrazolium*, NBT) s radikalima, primarno $\text{O}_2^{\bullet-}$, dolazi do redukcije NBT i nastanka formazana, čime se povećava apsorbanacija na valnoj duljini od 560 nm. Kako enzim SOD može neutralizirati $\text{O}_2^{\bullet-}$ i pretvoriti ga u H_2O_2 , simultano inhibira i proces redukcije NBT. Što je djelovanje enzima SOD jače, to je jače smanjenje apsorbanacije pri navedenoj valnoj duljini (Cheng i sur. 2015). Među različitim protokolima za spektrofotometrijsko mjerenje aktivnosti enzima CAT, najčešće primijenjena metoda analizira sadržaj H_2O_2 u uzorku. H_2O_2 apsorbira svjetlost pri valnoj duljini od 240 nm. Kada CAT pretvori H_2O_2 u H_2O i O_2 , promjena u apsorbanaciji na valnoj duljini od 240 nm može se koristiti kao indirektna mjera aktivnosti enzima CAT, budući da je aktivnost izravno povezana s brzinom disocijacije H_2O_2 (Hadwan 2018; Hamza i Hadwan 2020). Enzim APX koristi askorbat kao donor elektrona prilikom pretvorbe H_2O_2 u H_2O i O_2 , pri čemu askorbat oksidira u monodehidroaskorbinsku kiselinu (MDASA). Kako askorbat apsorbira svjetlost valne duljine od 290 nm, mjerenje aktivnosti enzima APX temelji se na smanjenju količine askorbata, odnosno smanjenju apsorbanacije pri valnoj duljini od 290 nm (Senthilkumar i sur. 2021). Aktivnost peroksidaza također se može mjeriti korištenjem pirogalola kao donora elektrona. Naime, oksidacijom pirogalola putem H_2O_2 stvara se H_2O i purpurogalin koji apsorbira svjetlost na valnoj duljini od 430 nm. Iz povećane vrijednosti apsorbanacije, može se izračunati aktivnost enzima pirogalol peroksidaze (PPX) (Mitra i sur. 2019). Mjerenje aktivnosti GR temelji se na reakciji NADPH i spoja 5,5'-

ditiobis(2-nitrobenzojeva kiselina) (DTNB), prilikom čega nastaje 5'-tionitrobenzoat (TNB) posredstvom enzima GR. Aktivnost se posljedično može mjeriti ili smanjenjem količine NADPH, pri čemu se mjeri smanjenje apsorbancije svjetlosti na valnoj duljini od 340 nm ili povećanjem sinteze TNB, pri čemu se mjeri povećanje apsorbancije na valnoj duljini od 412 nm (Smith i sur. 1988).

2.3.3.2 Neenzimski antioksidansi

Neenzimski antioksidansi su molekule male molekulske mase koje su iznimno učinkovite u uklanjanju ROS (Rezayian i sur. 2019), a u stanicama algi najčešći su glutacion, askorbat, karotenoidi, polifenoli te aminokiseline poput prolina (Rezayian i sur. 2019; Gauthier i sur. 2020; Roy i sur. 2021). Reducirani oblik glutaciona, GSH, ima ključnu ulogu u smanjivanju količine ROS poput $O_2^{\bullet -}$ i HO^{\bullet} putem oksidacije svoje tiolne skupine (Baba i Bhatnagar 2018). Naime, GSH je tripeptid čijom se oksidacijom uklanjaju ROS, ali se obnavlja i askorbat putem ciklusa askorbat-glutacion (Jajic i sur. 2015; Rezayian i sur. 2019). Askorbat je polarni antioksidans koji doniranjem elektrona molekulama ROS poput HO^{\bullet} sudjeluje u smanjivanju njihove količine, ali djeluje i kao substrat za enzim APX (Gill i Tuteja 2010; Nimse i Pal 2015). Karotenoidi su pigmenti koji u tilakoidnim membranama sudjeluju u apsorpciji svjetlosne energije za korištenje u procesu fotosinteze, dok s druge strane imaju značajnu ulogu u antioksidacijskom odgovoru alge (Rezayian i sur. 2019). Naime, zbog svoje strukture dugačkih lanaca s mnogo dvostrukih veza, karotenoidi mogu donirati elektrone ROS poput 1O_2 te ih tako neutralizirati, ali mogu i odvoditi višak energije s reakcijskih centara u fotosustavima čime se može spriječiti nastanak novih ROS (Gill i Tuteja 2010; Faraloni i Torzillo 2017). Najčešći karotenoidi pronađeni u algama su neoksantin, violaksantin, zeaksantin, astaksantin, lutein i β -karoten (Rezayian i sur. 2019; Gauthier i sur. 2020). Polifenoli obuhvaćaju više od 8000 spojeva koji doniranjem protona ili elektrona mogu neutralizirati ROS te tako smanjiti njihov štetan utjecaj na algu (Rezayian i sur. 2019). Prolin je aminokiselina koja ima višestruku ulogu u zaštiti stanica algi i održavanju stanične homeostaze. Kao topiva molekula male molekulske mase, prolin ima ulogu u održavanju osmotskog tlaka, dok se pomoću pirolidinskog prstena može vezati za hidrofobne regije proteina te stabilizirati njihove strukture (Shafi i sur. 2019; Barera i Forlani 2023). Jedna od važnijih uloga prolina je u neutralizaciji ROS. Naime, prolin može direktno reagirati s radikalom HO^{\bullet} ili 1O_2 , čime nastaju stabilni radikali prolina (Liang i sur. 2013), te indirektno neutralizirati oblike ROS pojačavanjem ekspresije određenih antioksidacijskih enzima poput CAT i APX (Bauduin i sur. 2022). Također, raspadanjem,

odnosno katabolizmom prolina nastaje H_2O_2 kao nusprodukt, što može dodatno aktivirati signalne puteve antioksidacijskog sustava (Zhang i Becker 2015).

Mjerenje količine neenzimskih antioksidansa najčešće se izvodi spektrofotometrijski. Analize ukupnog sadržaja reduciranog i oksidiranog glutaciona, prolina i askorbata temelje se na reakciji neenzimskih antioksidansa s određenim reagensom pri čemu se nastali produkt može kvantificirati na određenoj valnoj duljini. Tako se prolin najčešće kvantificira korištenjem ninhidrina koji pri visokim temperaturama oksidira prolin, čime se stvara kompleks prolina i ninhidrina. Navedeni kompleks apsorbira svjetlost na valnoj duljini od 520 nm te je vrijednost apsorbancije direktno proporcionalna količini prolina u uzorku (Shabnam i sur. 2016). Slično se izvodi i analiza količine askorbata. Naime, oksidacijom askorbata u otopini broma nastaje dehidroaskorbinska kiselina koja reakcijom s DNPH tvori crveni kompleks. Intenzitet obojenja nastalog kompleksa određuje se spektrofotometrijski na valnoj duljini od 540 nm i na taj način se određuje i koncentracija askorbata u uzorku (Terada i sur. 1978). Za kvantifikaciju glutaciona koristi se tzv. Elmanov reagens, odnosno DTNB. Naime, reakcijom glutaciona i DTNB nastaje 2-nitro-5-tiobenzojeva kiselina koja apsorbira svjetlost na valnoj duljini od 412 nm te je vrijednost apsorbancije direktno proporcionalna koncentraciji glutaciona u uzorku (Smith i sur. 1988). Za analizu ukupnih karotenida potrebno ih je ekstrahirati iz stanica algi pomoću organskog otapala poput acetona, dietil etera ili metanola (Ashenafi i sur. 2023), nakon čega se provodi mjerenje apsorbancije na valnim duljinama specifičnim za karotenoide, ali i za odabrano otapalo. Koncentracija karotenoida u uzorku se potom određuje uz korištenje specifičnih apsorpcijskih koeficijenata karotenoida (Bulda i sur. 2008).

Dosadašnja istraživanja su pokazala da nanočestice srebra, bakra i polistirena uzrokuju povećanu aktivnost određenih antioksidacijskih enzima (Qian i sur. 2016; Fazelian i sur. 2019; Li i sur. 2023). Lekange i sur. (2020) pokazali su da postoji značajan utjecaj omotača AgNP na promjenu aktivnosti antioksidacijskih enzima poput CAT i GST u stanicama alge *R. subcapitata*, dok tretman s AgNP-citrat te AgNP-PVP rezultiraju povećanom količinom prolina u vrstama *Poterochromonas malhamensis* (Liu i sur. 2020a) i *Microcystis aeruginosa* (Zhang i sur. 2018). Izlaganje vrste *Nannochloropsis oculata* CuONP rezultiralo je značajnim povećanjem aktivnosti enzima CAT i APX uz porast sadržaja polifenola i smanjenje količine karotenoida (Fazelian i sur. 2019). Tretman s PS-NP inducirao je aktivaciju enzima SOD i CAT u stanicama vrste *Scenedesmus quadricauda* (Li i sur. 2023), dok su navedene nanočestice rezultirale smanjenjem aktivnosti enzima SOD u stanicama alge *M. aeruginosa* (Zheng i sur. 2021). Istraživanja o utjecaju nanočestica polistirena s različitim funkcionalnim skupinama

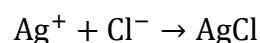
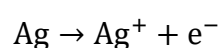
nedostaju, iako istraživanje na cijanobakteriji *Synechococcus elongatus* pokazuje da PS-NH₂-NP mogu smanjiti metabolizam glutationa (Feng i sur. 2019). Poznato je da različito stabilizirane ili funkcionalizirane nanočestice, kao i nanočestice u različitim oksidacijskim stanjima, diferencijalno induciraju proizvodnju ROS (Bhattacharya i sur. 2010; Oukarroum i sur. 2012b; Lekamge i sur. 2019). Iz toga se može lako zaključiti kako su nužna nova istraživanja utjecaja navedenih omotača ili oblika nanočestica na aktivaciju antioksidacijskog sustava kod algi, ali pri jednakim eksperimentalnim uvjetima kako bi se omogućila njihova usporedba te smanjio broj dijametralno suprotnih rezultata.

2.3.4 Utjecaj nanočestica na fotosintezu

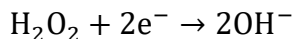
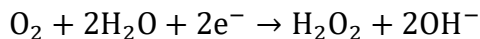
Kako je pokazano da razni tipovi nanočestica direktno ili indirektno kroz povećanu sintezu ROS, negativno djeluju na proteine i lipide što posljedično destabilizira i tilakoidnu membranu kloroplasta, potrebno je istražiti i njihov utjecaj na fotosintezu (Von Moos i Slaveykova 2014; Liu i sur. 2020a; Zhang i sur. 2022a). Fotosinteza je proces u kojem se svjetlosna energija pretvara u kemijsku prilikom čega se CO₂ pretvara u organske molekule. Odvija se u dvije skupine reakcija: reakcije na svjetlu i Calvin-Bensonovom ciklusu (Johnson 2016). Reakcije na svjetlu uključuju apsorpciju svjetlosne energije korištenjem fotosintetskih pigmenata, primarno klorofila *a* i *b* te karotenoida (Lokstein i sur. 2021). Neke alge sadrže i dodatne molekule poput drugih klorofila, klorolipida i fikobiliproteina kako bi apsorbirale svjetlost drugih valnih duljina (Larkum 2016), zbog čega je učinkovitost fotosinteze generalno veća kod algi u odnosu na više biljke (Ma i sur. 2023). Nakon apsorpcije svjetlosti pomoću antenskih pigmenata u PSII, energija se prenosi do klorofila *a* smještenog u reakcijskom centru, gdje se koristi za fotolizu H₂O, stvarajući O₂, protone i elektrone (Hader 2022). Elektroni se dalje prenose na PSI, dok se povećavanjem koncentracije protona u lumenu kloroplasta stvara gradijent protona čime se stvara energija za sintezu adenzin trifosfata (eng. *adenosine triphosphate*, ATP), prolaskom kroz ATP sintazu (Allen 2002). Dodatno, apsorpcijom svjetlosti na kompleksu antena PSI dolazi do sinteze NADPH, koji se, zajedno s proizvedenim molekulama ATP, koriste u sljedećem koraku fotosinteze, Calvin-Bensonovom ciklusu koji se odvija u stromi kloroplasta (Johnson 2016). U navedenom procesu se ATP i NADPH, uz prisustvo CO₂, koriste kako bi se sintetizirali šećeri u tri koraka: fiksacija ugljika, redukcija te regeneracija ribuloza 1,5-bisfosfata (RuBP). U prvom koraku, enzim ribuloza 1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza (RuBisCo) katalizira reakciju vezanja CO₂ na RuBP, čime nastaje 3-fosfoglicerat (3-PGA). Alge sadrže i određene sustave za povećanje količine CO₂ oko enzima RuBisCo, što je još jedan razlog povećane fotosintetske učinkovitosti u odnosu na više biljke (Ma i sur. 2023). U drugom

koraku, redukciji, 3-PGA pretvara se u gliceraldehid 3-fosfat (G3P) korištenjem ATP i NADPH nastalim u reakcijama na svjetlu. Dio molekula G3P se u trećem koraku regenerira u RuBP kako bi ciklus mogao ponovno započeti, dok ostatak izlazi iz ciklusa te se koriste u proizvodnji šećera i drugih ugljikohidrata (Johnson 2016; Lopez i Barclay 2017).

Kako autotrofni mikroorganizmi, među njima i alge, procesom fotosinteze proizvode preko 50% kisika na Zemlji i velike količine šećera koji se koristi kao hrana, od iznimne je važnosti istražiti učinak različitih vrsta nanočestica na fotosintezu (Ma i sur. 2023; Field i sur. 1998). Jedan od načina analize učinkovitosti fotosinteze je mjerenje količine fotosintetskih pigmenata, primarno klorofila *a* i *b* uz karotenoide, što se može provesti spektrofotometrijski ili tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC). Za određivanje količine pigmenata spektrofotometrijski, pigmente je potrebno ekstrahirati iz algi u odgovarajućem otapalu, izmjeriti apsorbancije ekstrakta na karakterističnim valnim duljinama te izračunati njihove koncentracije uporabom specifičnih koeficijenata (Dudek i sur. 2014). Na proteinskoj razini moguće je analizirati oštećenje fotosintetskog aparata kvantitativnim analizama proteina uključenih u proces fotosinteze, kao što su RuBisCo i D1. Naime, protein D1 je ključni dio reakcijskog centra PSII, gdje se odvija prijenos elektrona. U stresnim uvjetima može doći do oštećenja proteina D1, što smanjuje učinkovitost fotosinteze i može izazvati fotoinhibiciju (Edelman i Mattoo, 2008). Biljke i alge razvile su učinkovite mehanizme za zamjenu oštećenih D1 proteina, održavajući funkcionalnost PSII. Budući da je protein D1 osjetljiv na stres i ima kratko vrijeme oporavka, njegova razina ekspresije može biti dobar indikator stresa u biljkama i algama (Edelman i Mattoo, 2008; Banu i sur. 2021). Metoda kojom se može analizirati ekspresija ciljanih proteina je imunodetekcija, gdje se ukupni topivi proteini elektroforetski razdvoje i prenesu na membranu, na kojoj se potom proteini vizualiziraju koristeći specifična antitijela za traženi protein (Vitale i sur. 2022). Kako je jedan od nusprodukata procesa fotosinteze O₂, stopa fotosinteze može se mjeriti određivanjem brzine nastanka O₂ u suspenziji stanica algi. Takve metode temelje se na korištenju tzv. Klarkove elektrode gdje se između katode i anode najčešće koristi kalijev klorid (KCl) kao elektrolitni most. Uz stabilnu voltažu, srebrova anoda reagira s anionima klora prema sljedećoj jednadžbi:



Tako oslobođeni elektroni se koriste kao katalizatori u redukciji nastalog O₂ na katodi prema jednadžbi:



S tako nastalim ionima, promjena jačine struje proporcionalna je količini O₂ u suspenziji (González i sur. 2001).

S druge strane, pomoću instrumenta AquaPen (Photon Systems Instruments, Češka) moguće je odrediti brojne parametre fluorescencije koji mogu direktno ili indirektno upućivati na stanje fotosintetskog sustava. Metoda se temelji na obasjavanju algi pulsom plave svjetlosti čiju energiju apsorbiraju pigmenti, ponajviše klorofil *a*. Dio apsorbirane energije otpušta se kao fluorescencija čijom je detekcijom i kvantifikacijom moguće izračunati različite parametare poput maksimalnog kvantnog prinosa (F_v/F_m) i indeksa učinkovitosti PSII (PI_{abs}) (Kristoffersen i sur. 2016).

Istraživanja su pokazala kako nanočestice srebra, bakra i polistirena imaju učinak na različite parametre povezane s fotosintezom. Oukarroum i sur. (2012a) su pokazali kako izlaganje alge *C. vulgaris* česticama AgNP rezultira smanjenjem sadržaja klorofila, dok je Pham (2019) dobio isti rezultat nakon izlaganja alge *Scenedesmus* česticama AgNP koje su bile stabilizirane polivinil alkoholom. Također je pokazano kako AgNP bez omotača mogu dodatno izazvati strukturna oštećenja reakcijskog centra PSII i inhibirati transport elektrona u vrsti *C. reinhardtii* (Dewez i Oukarroum 2012), dok je u algi *R. subcapitata* tretman s AgNP-PVP smanjio učinkovitost fotosinteze (Wang i sur. 2015). Solomonova i sur. (2023) pokazali su da je fotosintetski sustav algi *D. salina*, *I. galbana*, *T. weissflogii* i *P. cordatum* visoko otporan na tretman s CuONP, dok je drugo istraživanje pokazalo kako izlaganje alge *R. subcapitata* istim nanočesticama povećava sintezu klorofila *a* i učinkovitost kompleksa za sintezu O₂, ali istovremeno smanjuje maksimalni kvantni prinos PSII (Alho i sur. 2020). S druge strane, PS-NH₂-NP značajno su smanjile koncentraciju klorofila *a* u stanicama alge *C. vulgaris* (Khoshnamvand i sur. 2021). Istraživanje usporedbe učinka PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP pokazalo je kako oba tipa nanočestica značajno inhibiraju proces fotosinteze u algama *C. vulgaris* i *Scenedesmus*, dok su negativno nabijene PS-COOH-NP pokazale jače negativno djelovanje na fotosintezu u vrsti *C. vulgaris* u odnosu na pozitivno nabijene PS-NH₂-NP (Bhattacharya i sur. 2010). Iz navedenih rezultata vidljivo je da različiti tipovi nanočestica

moгу pokazati drugačiji učinak na proces fotosinteze, pri čemu različiti površinski omotači ili funkcionalne skupine te različita oksidacijska stanja mogu imati veliki utjecaj.

2.3.5 Utjecaj nanočestica na proteom

Proteini u algama imaju ključnu ulogu u biološki važnim procesima poput fotosinteze, metabolizma ugljikohidrata, odgovoru na stres, staničnoj diobi i rastu, regulaciji drugih procesa, ali i sintezi novih proteina (Ismaiel i sur. 2024). Upravo zbog velikog broja uloga, učinak različitih stresnih uvjeta, što uključuje i izlaganja nanočesticama, potrebno je sagledati na ukupnoj, proteomskoj razini. Naime, nanočestice mogu promijeniti proteinski sadržaj algi interakcijom sa staničnom membranom, molekulom DNA, ometanjem raznih metaboličkih procesa pa i fotosinteze, čime se smanjuje sinteza proteina (Wang i sur. 2019). S druge strane, ROS mogu destabilizirati i degradirati postojeće proteine, čime se smanjuje njihova količina (Yu i sur. 2020). Proteomske analize omogućuju proučavanje fiziološkog stanja organizma na široj razini, što omogućuje uvid u učinke nanočestica na alge na molekularnoj razini, otkrivanje njihovog mehanizma djelovanja te procjenu potencijalnog ekološkog utjecaja (Huang i sur. 2022; Mustafa i Komatsu 2022).

Proteomske analize podrazumijevaju određivanje funkcije i posttranslacijskih modifikacija diferencijalno eksprimiranih proteina te se u praksi koriste dva glavna pristupa: „odozgo prema dolje“ (eng. *top-down proteomics*) i „odozdo prema gore“ (eng. *bottom-up proteomics*) (Mann i Jensen 2003; Feist i Hummon 2015). Oba pristupa koriste se za identifikaciju i karakterizaciju proteina primjenom spektrometrije masa, a razlikuju se u načinu pripreme uzorka i razini detalja analiziranih proteina (Cassidy i sur. 2021). Naime, pristup „odozgo prema dolje“ analizira cijele proteine, dok pristup „odozdo prema gore“ analizira peptide nastale digestijom proteina. Kod oba pristupa, temelj analize spektrometrijom masa (eng. *mass spectrometry*, MS) je isti, odnosno određuje se omjer mase i naboja (m/z) koji se usporedbom s bazom podataka molekula i spojeva poznatih masa, koristi za identifikaciju proteina (Feist i Hummon 2015).

U pristupu „odozgo prema dolje“, spektrometrom masa analiziraju se proteini u nativnom obliku, pri čemu se mjere mase cijelih i fragmentiranih iona. Prednost navedene metode očituje se u mogućnosti detekcije raznih varijacija proteina poput degradacijskih produkata, izoformi i posttranslacijskih modifikacija (Catherman i sur. 2014). Pristup „odozgo prema dolje“ najviše se koristi prilikom analize i identifikacije pojedinih proteina ili jednostavnih smjesa proteina, ali problem ovog pristupa nastaje kada je potrebno analizirati kompleksnu smjesu proteina (Durbin i sur. 2016). Za analize smjese veće količine proteina, najčešće se primjenjuje pristup „odozdo prema gore“ gdje su proteini prvo proteazama pocijepani u peptide. Tako

pripremljenim peptidima se spektrometrom masa određuje omjer m/z , koji se zatim uspoređuje s teorijskim vrijednostima dobivenim iz proteomskih ili genomskih baza podataka. Takvim pristupom se može u relativnom kratkom roku identificirati veći broj proteina u odnosu na pristup „odozgo prema dolje“ (Cassidy i sur. 2021).

Prije analize spektrometrom masa, kod oba pristupa potrebno je pripremiti proteinski ekstrakt. Naime, razni kontaminanti mogu ometati razdvajanje obrnutim fazama i samu analizu MS, dok detergentski mogu utjecati na enzimsku razgradnju u pristupu „odozdo prema gore“ (Zhou i sur. 2012). Kod biljaka i algi, jedan od problema je i relativno niska koncentracija proteina, što je rezultat slabe učinkovitosti izolacije proteina zbog prisustva stanične stijenke, polisaharida, lipida i fenolnih spojeva (Faurobert i sur. 2007). Za dobivanje uzoraka proteina prikladnih za analizu MS razvijeno je više metoda (Sheoran i sur. 2009; Wang i sur. 2018). Jedna od češće korištenih metoda je izolacija proteina uporabom fenola, nakon čega slijedi precipitacija proteina amonijevim acetatom (Hurkman i Tanaka 1986). Navedena metoda povećava učinkovitost izolacije proteina, ali i odstranjuje neproteinske spojeve poput genomske DNA, lipida i fenola koji mogu utišati signale ili interferirati s kromatografima prilikom analize MS (Faurobert i sur. 2007; Feist i Hummon 2015). Za bolju razlučivost i čistoću samih proteina, ali i za analizu njihove diferencijalne ekspresije, nakon izolacije proteina nerijetko se provodi dvodimenzionalna gel elektroforeza (eng. *two dimensional gel electrophoresis* 2-DE). Metoda 2-DE podrazumijeva elektroforetsko razdvajanje proteina prema njihovoj izoelektričnoj točki (izoelektrično fokusiranje, IEF) u prvoj dimenziji te prema molekularnoj masi u drugoj. Korištenje fenola prilikom izolacije proteina je nužno i u razdvajanju proteina metodom 2-DE, jer nukleinske kiseline mogu međudjelovati s proteinima, čime se smanjuje učinkovitost razdvajanja proteina i rezolucija proteinskih mrlja (Hurkman i Tanaka 1986; Dupree i sur. 2020).

Nedostatak proteomskih analiza na algama onemogućuje potpuno iskorištavanje navedenih metoda u određivanju funkcionalnih utjecaja nanočestica srebra, bakra i polistirena. Provedena istraživanja su pokazala da pozitivno (AgNP-PEI) i negativno (AgNP-citrat) stabilizirane AgNP imaju različiti utjecaj na proteomski profil alge *C. vulgaris* (Zhang i sur. 2020a). Čestice AgNP-citrat pokazale su veći utjecaj na ekspresiju proteina povezanih s funkcijom mitohondrija, čime su posljedično djelovale na metabolizam energije, oksidativnu fosforilaciju i sintezu aminokiselina. S druge strane, čestice AgNP-PEI primarno su djelovale na proteine povezane s funkcijom ribosoma te na razne puteve sinteze proteina i prijenosa DNA. U drugom istraživanju, izlaganje stanica vrste *M. aeruginosa* česticama AgNP bez omotača rezultiralo je

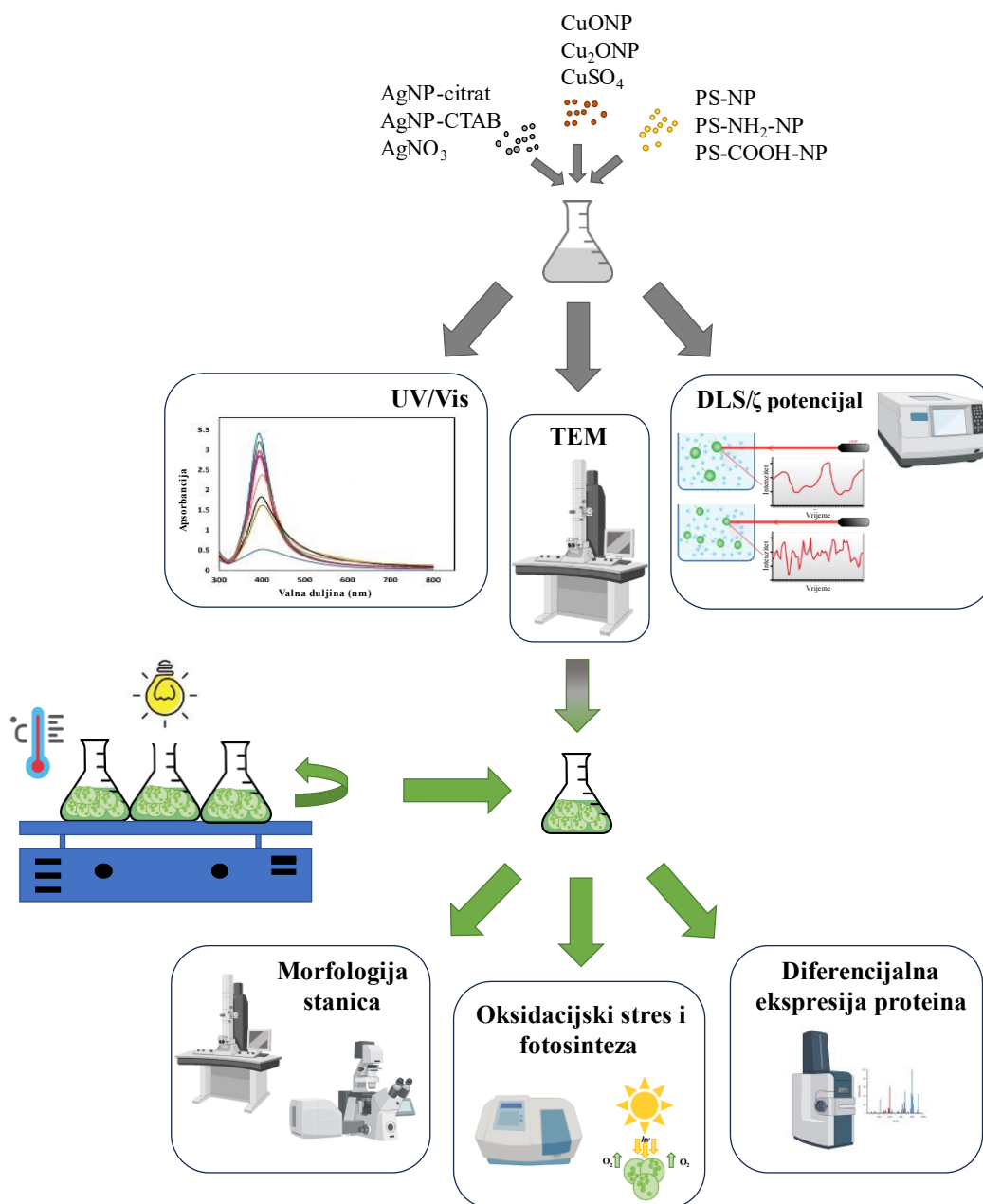
smanjenjem količine proteina povezanih s fotosintezom, poput citokrom *b₆f* kompleksa i F1 ATP sintaze (Qian i sur. 2016). Analize utjecaja nanočestica bakrovih oksida na proteom algi nedostaju, no Shakya i sur. (2022) pokazali su da tretman s elementarnim bakrom dovodi do promjena u profilima aminokiselina i proteoma pri čemu su pojačano eksprimirani signalni proteini i proteini uključeni u određene stanične procese, dok su proteini povezani s ribosomalnom strukturom i translacijom značajno utišani. Izlaganje alge *Scenedesmus quadratica* PS-NP rezultiralo je povećanom količinom toplivih proteina (Li i sur. 2023), dok je istraživanje na vrsti *Anabaena sp.* pokazalo da tretman PS-NP smanjuje ekspresiju proteina na površini stanica i signalnih proteina; istovremeno, PS-NP su pojačale ekspresiju proteina uključenih u oksidacijski odgovor i odgovor na stres, metabolizam ugljika, energije i nukleinskih kiselina te proteina uključenih u proces fotosinteze (Tamayo-Belda i sur. 2021). Iz navedenih rezultata vidljivo je kako različiti tipovi nanočestica, ali i različiti omotači i oksidacijska stanja nanočestica mogu imati značajan utjecaj na proteom, pa samim time i na funkciju stanica algi. Dosadašnja malobrojna proteomska istraživanja na algama nakon izlaganja nanočesticama srebra, bakra i polistirena većinom su se fokusirala na jedan tip nanočestica s jednim omotačem ili funkcionalnom skupinom. Stoga, od iznimne je važnosti komparativno analizirati utjecaj AgNP s različitim omotačima, nanočestica bakrovih oksida u različitim oksidacijskim stanjima i nanočestica polistirena s različitim funkcionalnim skupinama u istim eksperimentalnim uvjetima na diferencijalnu ekspresiju proteina. Takva analiza može pridonijeti razrješenju mehanizma fitotoksičnosti navedenih nanomaterijala, ali i otkriti potencijalne molekularne biomarkere toksičnosti istih na alge.

MATERIJALI I METODE

3. MATERIJALI I METODE

U ovom radu većinski sam koristio kemikalije proizvođača Sigma-Aldrich (SAD), osim ako nije drugačije istaknuto u tekstu.

Prvo sam okarakterizirao nanočestice srebra, bakra i polistirena u podlozi te zatim istražio njihove učinke na morfologiju algi, fiziološke promjene te promjene na proteomu (Slika 8).



Slika 8. Prikaz eksperimentalnog dizajna korištenog za utvrđivanje morfoloških, fizioloških i proteomskih promjena kod alge *C. vulgaris* nakon izlaganja nanočesticama i ionima srebra (AgNP-citrat, AgNP-CTAB, AgNO₃), nanočesticama i ionima bakra (CuONP, Cu₂ONP, CuSO₄) te nanočesticama polistirena (PS-NP, PS-NH₂-NP, PS-COOH-NP). UV/Vis – spektrofotometrija u području ultraljubičastog zračenja/vidljive svjetlosti, TEM – transmisijska elektronska mikroskopija, DLS – dinamičko raspršenje svjetlosti, ζ potencijal – zeta potencijal.

3.1 Nanomaterijali

3.1.1 Priprema suspenzija nanočestica

3.1.1.1 Nanočestice srebra

Istraživanje sam započeo sintezom AgNP s odgovarajućim omotačima. Kako je jedna od najčešćih metoda sinteze AgNP kemijska redukcija iona Ag^+ (Nguyen i sur. 2023), AgNP-citrat sam pripremio reduciranjem AgNO_3 pomoću natrijevog citrata. Prvo sam pripremio otopinu AgNO_3 (166 mg L^{-1}) otapanjem 0,02 g AgNO_3 u 120 mL ultra-čiste vode (Milli-Q, $18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$, Merck Millipore, SAD) u tikvici s okruglim dnom, koju sam potom zagrijavao na magnetskoj miješalici (Kartell Labware, Italija) do vrenja uz konstantno miješanje na 270 rpm. Nakon vrenja, u tikvicu sam ulio 5 mL ranije pripremljene 1% (w/v) otopine natrijeva citrata te dodatno zagrijavao uz jednako konstantno miješanje do promjene boje otopine iz prozirne u žutu, kada sam reakciju zaustavio naglim hlađenjem pod mlazom vode. Tako dobivenu suspenziju sam čuvao na $+4 \text{ }^\circ\text{C}$.

AgNP-CTAB sam sintetizirao otapanjem 0,02 g AgNO_3 i 0,0043 g CTAB u 62,5 mL ultra-čiste vode u tikvici s okruglim dnom, nakon čega sam tako priređenu otopinu stavio na magnetsku miješalicu na konstanto miješanje pri brzini od 270 rpm. Pomoću birete, u otopinu AgNO_3 i CTAB brzo sam dokapavao 62,5 mL otopine askorbinske kiseline u ultra-čistoj vodi (160 mg L^{-1}), koja je dobar reducens, nakon čega je suspenzija čestica promijenila boju u sivo-narančastu te sam suspenziju pohranio na $+4 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.1.1.2 Nanočestice bakra

Za potrebe ovog istraživanja koristio sam CuONP s promjerom od 77 nm i Cu_2ONP s promjerom od 80 nm u obliku suhog praha kupljene od tvrtke *Nanografi Nano Technology* (Turska). Suspenzije nanočestica u koncentraciji 1000 mg L^{-1} pripremio sam otapanjem 0,1 g svakog praha pojedinačno u 100 mL ultra-čiste vode, miješao 10 minuta na magnetskoj miješalici te sonicirao u ultrazvučnoj kupelji u ledenoj vodi u trajanju od 2 h. Nakon toga, suspenzije sam pohranio na $+4 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.1.1.3 Nanočestice polistirena

Za potrebe istraživanja koristio sam komercijalno dostupne PS-NP, PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP promjera 50 nm u obliku vodenih suspenzija. PS-NP i PS-COOH-NP kupljene su od tvrtke *Polysciences Europe d.o.o.* (Njemačka), dok je proizvođač PS-NH₂-NP tvrtka *Lab261* (SAD).

3.1.2 Karakterizacija fizikalno-kemijskih svojstava

3.1.2.1 UV/Vis spektrofotometrija

Pomoću UV/Vis spektrofotometrije potvrdio sam uspješnost sinteze suspenzija AgNP. Jedno od svojstava AgNP je apsorpcija svjetla u UV/Vis području što je posljedica pobuđivanja rezonancije plazmona na površini nanočestica. Naime, kada svjetlost dođe do AgNP, pobuđeni elektroni na površini čestica počnu zajedno oscilirati na frekvenciji nazvanoj rezonancija površinskih plazmona (eng. *surface plasmon resonance*, SPR). Maksimum apsorpcije SPR je osjetljiv na veličinu i oblik čime je navedena metoda pogodna za karakterizaciju sintetiziranih AgNP (Yang 2021).

Analizu sam izveo prebacivanjem po 1 mL pripremljene suspenzije AgNP-citrat ili AgNP-CTAB u metakrilatnu kivetu te izmjerio apsorpciju u rasponu valnih duljina od 300-800 nm spektrofotometrom Specord 50 PLUS (Analytik Jena, Njemačka), dok sam maksimume apsorpcije odredio programom WinASPECT PLUS (Analytik Jena, Njemačka).

3.1.2.2 Određivanje koncentracije matičnih suspenzija AgNP

Koncentraciju srebra u suspenzijama AgNP-citrat i AgNP-CTAB odredio sam atomskom apsorpcijskom spektroskopijom (AAS). Sintetizirane matične suspenzije AgNP razrijedio sam $50 \times$ u 5% (v/v) dušične kiseline (HNO_3) te sam koncentraciju srebra u njima izmjerio na uređaju SOLAAR S4 (Thermo Elemental, SAD). Koncentracija srebra u suspenzijama izračunata je iz baždarnog pravca dobivenog iz standardnih otopina srebra poznatih koncentracija.

3.1.2.3 Određivanje količine iona Ag^+ u matičnim suspenzijama AgNP

Za određivanje količine iona Ag^+ u matičnim suspenzijama AgNP-citrat i AgNP-CTAB odredio sam mjerenjem koncentracije srebra metodom AAS (opisano u poglavlju 3.1.2.2.) nakon centrifugalne ultrafiltracije (Millipore Amicon Ultra-4 3K, Merck Millipore, SAD) kroz membranu s granicom propuštanja mase od 3 kDa. Granica detekcije bila je $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$, dok je granica kvantifikacije iznosila 1 mg kg^{-1} .

3.1.2.4 Određivanje veličine i naboja nanočestica u matičnim suspenzijama

U cilju određivanja veličine nanočestica srebra, bakra i polistirena u matičnim suspenzijama, 1,5 mL pojedine suspenzije prebacio sam u polistirensku kivetu i uzorke analizirao metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (eng. *dynamic light scattering*, DLS) na uređaju NanoBrook 90Plus (Brookhaven Instruments, SAD) opremljenog s crvenim laserom (660 nm) i intenzitetom raspršene svjetlosti pod kutom od 180 stupnjeva. Podatke sam analizirao

programom Zeta Plus 5.71 (Brookhaven Instruments, SAD), a hidrodinamički promjeri (d_H) dobiveni su iz distribucije veličine volumena čestica. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 6 mjerenja \pm standardna pogreška.

Kako bi odredio naboj matičnih suspenzija nanočestica, izmjerio sam zeta (ζ) potencijal mjerenjem elektroforetskog raspršenja svjetlosti (eng. *electrophoretic light scattering*, ELS) korištenjem kapilarnih ćelija na uređaju NanoBrook 90Plus. 1,2 mL pojedinačne suspenzije prebacio sam u polistirensku kivetu u koju sam uronio anodu, nakon čega su rezultati ζ potencijala izračunati preko Smoluchowski jednadžbe programa Zeta Plus 5.71, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost pet mjerenja \pm standardna pogreška.

3.1.2.5 Vizualizacija i elementarna analiza nanočestica

Nanočestice srebra, bakra i polistirena vizualizirao sam primjenom transmisivne elektronske mikroskopije (TEM) na monokromatskom mikroskopu TF20 (FEI Tecnai G2, FEI, SAD) opremljenog sa *Schottky* katodom, dok sam za nanočestice srebra i bakra dodatno snimio elementarnu mapu i karakterističan spektar elementa tehnikom energijski razlučujuće, odnosno disperzivne rendgenske spektroskopije (eng. *energy dispersive X-ray analysis*, EDX) koristeći SiLi detektor na Institutu za elektronsku mikroskopiju i nanoanalizu, Graz, Austrija. Za analizu nanočestica srebra i polistirena koristio sam bakrene mrežice, dok sam za analizu nanočestica bakra koristio niklove mrežice. Obje vrste mrežica bile su presvučene tankim filmom polivin formala, odnosno Formvarom[®] (ThermoFisher Scientific, SAD) i naparene ugljikom. Na svaku mrežicu sam nakapao po 2 μ L pojedinačnih matičnih suspenzija nanočestica. Mrežice sam ostavio na sušenju na sobnoj temperaturi (eng. *room temperature*, RT) na zraku. Nakon sušenja, mrežice sam stavio na nosač, a nanočestice na mrežici analizirao sam pomoću TEM-a pri 200 kV.

3.2 Eksperimentalni uvjeti održavanja i izlaganja kulture stanica

3.2.1 Eksperimentalni uvjeti kulture stanica

Kultura alge *C. vulgaris* koju sam koristio u ovom istraživanju je soj SAG/211-11b, nabavljen od istraživačkog instituta *Experimentelle Phykologie und Sammlung von Algenkulturen* (EPSAG) Sveučilišta u Göttingenu (*Georg-August-Universität Göttingen*), Njemačka. Kulturu algi uspostavio sam inokulacijom stanica u pripremljenu sterilnu tekuću hranjivu podlogu BBM (eng. *Bold's Basal Medium*) (Tablica 1) u sterilnim tikvicama od 200 mL zatvorenih vatom i aluminijskom folijom u konačnoj koncentraciji od 1×10^5 stanica mL^{-1} . Alge su rasle četiri dana u komori za uzgoj biljaka na 24 °C u uvjetima dugog dana (16 h osvjetljenje, 8 h mrak) i

intenziteta svjetla od $80 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ uz konstantno miješanje na orbitalnoj miješalici. Kultura stanica održavana je svakih 14 dana presađivanjem u svježu podlogu BBM.

Tablica 1. Sastav tekuće hranjive podloge BBM.

Sastav	Konačna koncentracija / mol L ⁻¹
Makroelementi	
NaNO ₃	$2,94 \times 10^{-3}$
MgSO ₄ × 7H ₂ O	$3,04 \times 10^{-4}$
NaCl	$4,28 \times 10^{-4}$
K ₂ HPO ₄	$4,31 \times 10^{-4}$
KH ₂ PO ₄	$1,29 \times 10^{-3}$
CaCl ₂ × 2H ₂ O	$1,70 \times 10^{-4}$
Mikroelementi	
H ₃ BO ₃	$1,85 \times 10^{-4}$
Na ₂ EDTA × 2H ₂ O	$1,71 \times 10^{-4}$
KOH	$5,53 \times 10^{-4}$
FeSO ₄ × 7H ₂ O + H ₂ SO ₄ (1 mL L ⁻¹)	$1,79 \times 10^{-5}$
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	$3,07 \times 10^{-5}$
MnCl ₂ × 4H ₂ O	$7,28 \times 10^{-6}$
MoO ₃	$4,93 \times 10^{-6}$
CuSO ₄ × 5H ₂ O	$6,29 \times 10^{-6}$
Co(NO ₃) ₂ × 6H ₂ O	$1,68 \times 10^{-6}$
pH	6,6

3.2.2 Određivanje krivulje rasta

Krivulju rasta alge *C. vulgaris* u podlozi BBM odredio sam brojanjem stanica u kulturi pomoću automatiziranog brojača stanica (Luna II, Logos Biosystems, Republika Koreja) svaki dan u isto vrijeme kroz 15 dana kako bih odredio eksponencijalnu fazu rasta stanica. Određivanje krivulje rasta započeo sam inokulacijom koncentracije stanica od 1×10^5 stanica mL⁻¹ u podlogu BBM u sterilnim Erlenmeyerovim tikvicama. Za potrebe mjerenja, svaki dan sam uzeo alikvote iz 6 replika staničnih suspenzija te nanio po 10 μL suspenzije na nosač za brojač stanica te odredio koncentraciju stanica putem automatiziranog brojača stanica. Rezultat je prikazan kao srednja vrijednost 6 replika.

3.2.3 Izlaganje kulture stanica tretmanima

Nakon četiri dana rasta u ranije opisanim uvjetima, alge u eksponencijalnoj fazi rasta dosegnule su koncentraciju od 1×10^6 stanica mL⁻¹ te su bile izložene nanočesticama srebra, bakra i

polistirena, ali i otopinama AgNO_3 i $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (dalje u tekstu: CuSO_4) u trajanju od 72 sata. Kako bih mogao usporediti različite mehanizme toksičnosti između različitih nanočestica metala i pripadajućih iona, odredio sam koncentracije nanočestica srebra i bakra, ali i AgNO_3 i CuSO_4 koje omogućuju preživljenje 75% stanica algi (EC_{25} vrijednost). Budući da nanočestice polistirena uzrokuju staničnu smrt algi samo u ekstremno visokim koncentracijama, alge u eksponencijalnoj fazi rasta bile su izložene ovim nanočesticama u koncentraciji od 40 mg L^{-1} . Prema smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije navedena koncentracija smatra se gornjom dopuštenom granicom monomera stirena kojoj ljudi smiju biti izloženi (Todd i sur. 2003). Kultura stanica bez dodatka nanočestica ili iona poslužila je kao kontrolni uzorak. Nakon izlaganja, uzorke sam odmah koristio za daljnje analize. Inokulaciju stanica u hranjivu podlogu i izlaganje tretmanima odradio sam u sterilnim uvjetima u komori s horizontalnim strujanjem sterilnog zraka (Heraeus, Njemačka). Za svaki pokus postavio sam po 6 tikvica za svaki tretman te je svaki pokus ponovljen dva puta.

3.2.4 Određivanje vijabilnosti algi

Za određivanje koncentracije AgNP -citrat, AgNP -CTAB, AgNO_3 te CuONP , Cu_2ONP i CuSO_4 koje omogućuju preživljenje 75% stanica algi (EC_{25} vrijednost), odredio sam vijabilnost stanica nakon izlaganja različitim koncentracijama tretmana korištenjem protočne citometrije s fluorescentnom bojom propidij jodid (eng. *propidium iodide*, PI) (Ross i sur. 1989). Stanične suspenzije prvo sam izlagao rastućim koncentracijama tretmana opisanih u Tablici 2. u trajanju od 72 sata. Nakon izlaganja tretmanima, stanice sam centrifugirao pri 3500 g na RT u trajanju od 5 minuta u centrifugi (Eppendorf, Njemačka). Talog sam resuspendirao i isprao u podlozi BBM tri puta. Nakon svakog ispiranja stanice su ponovno centrifugirane u istim uvjetima. U konačnici, talog stanica sam resuspendirao u 20 mL otopine fosfatnih soli (eng. *phosphate buffer saline*, PBS) koja je sadržavala $10 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $1,7 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, $2,7 \text{ mM KCl}$, 130 mM NaCl (sve Gram-mol, Hrvatska). U alikvotne stanične suspenzije od 1 mL dodao sam PI u konačnoj koncentraciji od $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Stanice sam inkubirao 5 minuta u mraku, nakon čega sam ih analizirao na protočnom citometru (BD FACSVerser, SAD) primjenom plavog lasera (488 nm). Ukupno je analizirano oko 100000 stanica po uzorku te sam pomoću četveroparametarskog modela logističke regresije (eng. *four parameter logistic model*, 4PL) (Jarantow i sur. 2023) odredio koncentracije tretmana koje dovode do EC_{25} vrijednosti. Za svaki uzorak napravio sam tri biološke replike.

Tablica 2. Koncentracije primijenjenih tretmana korištenih za određivanje koncentracije koja omogućuju preživljenje 75% stanica algi (EC₂₅ vrijednosti).

AgNP-citrat (mg L ⁻¹)	AgNP-CTAB (mg L ⁻¹)	AgNO ₃ (mg L ⁻¹)	CuONP (mg L ⁻¹)	Cu ₂ ONP (mg L ⁻¹)	CuSO ₄ (mg L ⁻¹)
0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
0,0125	0,2	0,0125	10	10	10
0,025	0,8	0,025	15	30	30
0,05	1	0,05	30	40	50
0,075	1,2	0,075	50	50	70
0,1	1,4	0,1	80	80	90
0,125	1,5	0,125	100	100	100
0,15	1,8	0,15	120	120	120
0,2	2	0,2	140	140	140
0,4	2,2	0,4	150	150	150
0,8	2,4	0,8			
1	2,6	1			
1,5	2,8	1,5			
2	3	2			
	3,2				
	3,5				
	4				
	4,2				
	4,5				
	5				

3.3 Karakterizacija nanočestica u podlozi BBM korištenih za tretiranje algi

3.3.1 Spektrofotometrijsko određivanje stabilnosti AgNP-citrat, AgNP-CTAB i AgNO₃

Određivanje stabilnosti AgNP-citrat i AgNP-CTAB te otopine AgNO₃ u podlozi BBM pratio sam UV/Vis spektrofotometrijom na način kako je opisano u poglavlju 3.1.2.1. Prvo sam u metakrilatnim kivetama pripremio podlogu BBM s dodatkom AgNP-citrat, AgNP-CTAB i AgNO₃ u koncentracijama koje omogućuju preživljenje 75% stanica (EC₂₅) u konačnom volumenu od 1 mL. Kivete sam potom prekrrio parafilmom kako bih spriječio njihovo isušivanje, ali i moguće kontaminacije tijekom mjerenja. Kao slijepu probu koristio sam podlogu BBM bez dodataka AgNP ili iona Ag⁺. Za vrijeme mjerenja, kivete sam držao u komori za uzgoj biljaka pri istim uvjetima na kojima su rasle i tretirane alge. Za utvrđivanje stabilnosti AgNP i iona Ag⁺ u podlozi BBM, mjerio sam apsorbanciju u rasponu od 300-800 nm nakon 1, 2, 3, 4, 5, 24, 48 i 72 sata.

3.3.2 Određivanje promjene veličine i naboja čestica

Promjenu veličine i naboja nanočestica srebra (AgNP-citrat, AgNP-CTAB) i AgNO₃, nanočestica bakra (CuONP, Cu₂ONP) i CuSO₄ te nanočestica polistirena (PS-NP, PS-NH₂-NP,

PS-COOH-NP) u podlozi BBM nakon 1., 2., 3., 4., 5., 24., 48. i 72. sata odradio sam prema protokolu opisanom u poglavlju 3.1.2.4.

3.4 Lokalizacija i akumulacija nanočestica u stanicama te analiza morfoloških promjena

3.4.1 Analiza morfoloških promjena stanica

Metodom konfokalne mikroskopije analizirao sam promjene na strukturnoj razini stanice alge nakon izlaganja kulture stanica svim nanočesticama i otopinama AgNO_3 i CuSO_4 . Za tretmane sa srebrom i bakrom, alge sam izložio koncentracijama koje omogućuju preživljenje 75% stanica, dok sam za tretmane s nanočesticama polistirena koristio koncentracije od 40 mg L^{-1} . Budući da se sloj EPS oko stanica algi sastoji pretežno od ugljikohidrata, za njegovu vizualizaciju konfokalnom mikroskopijom koristio sam lektin konkavalin A (ConA) obilježen fluorescentnom probom fluorescein (FITC) (Vector Laboratories, SAD), koji se specifično veže na ostatke glukoze i manoze (Uthicke i sur. 2009). Za vizualizaciju stanične stijenke, koristio sam fluorescentnu boju Fluostatin I koja se specifično veže za staničnu stijenku alge (Yamamoto i sur. 2003), dok sam kloroplast vizualizirao putem autofluorescencije klorofila. Nakon izlaganja kulture stanica korištenim tretmanima, 10 mL stanične suspenzije centrifugirao sam pri 3500 g na RT u trajanju od 5 minuta. Talog sam potom isprao s $500 \mu\text{L } 1 \times \text{PBS}$ pufera (poglavlje 3.2.4), nakon čega sam suspenziju ponovno centrifugirao pri istim uvjetima. Nakon ispiranja, talog sam resuspendirao u $100 \mu\text{L } 1 \times \text{PBS}$ pufera te dodao $2 \mu\text{L}$ lektina ConA obilježenog probom FITC u konačnoj koncentraciji od $40 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nakon inkubacije od 15 minuta u mraku, stanice sam centrifugirao 5 minuta pri 3500 g na RT, nakon čega sam ih isprao u $1 \times \text{PBS}$ puferu. Stanice sam potom resuspendirao u $100 \mu\text{L } 1 \times \text{PBS}$ pufera te u suspenziju dodao $4 \mu\text{L}$ Fluostatina I u konačnoj koncentraciji od 1% (v/v). Nakon 5-minutne inkubacije u mraku, stanice sam vizualizirao na laserskom pretražnom konfokalnom mikroskopu Leica TCS SP2 AOBs (Leica Microsystems, Njemačka). Za vizualizaciju sloja EPS pomoću lektina ConA označenog probom FITC, vrijednost valne duljine pobuđujuće svjetlosti postavio sam na 495 nm, a emitirane svjetlosti na 519 nm. Za vizualizaciju stanične stijenke korištenjem probe Fluostatin I, vrijednost valne duljine pobuđujuće svjetlosti namjestio sam na 365 nm, a emitirane svjetlosti na 435 nm, dok sam za vizualizaciju kloroplasta vrijednost valne duljine pobuđujuće svjetlosti namjestio na 440 nm, a emitirane svjetlosti na 670 nm. Za svaki uzorak pregledao sam više od 100 stanica te sam prikazao reprezentativne slike.

3.4.2 Kvantifikacija sloja EPS

Budući da stanice algi oko sebe proizvode sloj EPS koji je vezan za stanice te sloj EPS koji se otpušta u okoliš, promjena u količini navedenih slojeva EPS, nakon izlaganja kulture stanica svim nanočesticama i otopinama AgNO_3 i CuSO_4 , određena je pomoću analizatora organskog ugljika. Za tretmane sa srebrom i bakrom, alge sam izložio koncentracijama koje omogućuju preživljenje 75% stanica, dok sam za tretmane s nanočesticama polistirena koristio koncentracije od 40 mg L^{-1} . Nakon rasta i izlaganja kulture stanica, prvo sam izmjerio koncentraciju stanica u suspenzijama kao što je opisano u poglavlju 3.2.2. U cilju kvantifikacije sloja EPS vezanog uz stanice algi, analizirana je količina partikularnog organskog ugljika (eng. *particular organic carbon*, POC), dok je za kvantifikaciju topivog sloja EPS otpuštenog u hranjivu podlogu izmjerena količina otopljenog organskog ugljika (eng. *dissolved organic carbon*, DOC). Od dobivene vrijednosti DOC oduzeta je izmjerena vrijednost ukupnog organskog ugljika (eng. *total organic carbon*, TOC) u podlozi BBM bez i s dodatkom odgovarajućeg tretmana radi korekcije vrijednosti DOC za ugljik koji se nalazi u pripadajućim podlogama. Vrijednosti DOC, POC i TOC su dobivene metodom visoko temperaturne katalitičke oksidacije u Laboratoriju za fiziku mora i kemiju vodenih sustava, Zavoda za istraživanje mora i okoliša, Instituta Ruđer Bošković, Zagreb. Rezultate vrijednosti DOC i POC koji prikazuju srednju vrijednost \pm standardna pogreška od tri biološke replike izrazio sam kao pg stanica^{-1} .

3.4.3 Analiza promjene ultrastrukture i lokalizacija nanočestica u stanicama

Analizu ultrastrukture stanica i lokalizacije nanočestica srebra, bakra i polistirena na ili u samim stanicama napravio sam TEM mikroskopijom. Za tretmane sa srebrom i bakrom, alge sam izložio koncentracijama koje omogućuju preživljenje 75% stanica, dok sam za tretmane s nanočesticama polistirena koristio koncentracije od 40 mg L^{-1} . Nakon izlaganja kulture stanica, ukupni volumen od 200 mL stanične suspenzije centrifugirao sam pri 3500 g na RT u trajanju od 5 minuta. Talog stanica sam isprao s ultra-čistom vodom tri puta, te nakon svakog ispiranja ponovno centrifugirao pri jednakim uvjetima. Nakon ispiranja, talog stanica sam resuspendirao u 500 μL fiksativa [2%-tni (*w/v*) glutaraldehid u 0,5 M kakodilatnom puferu (pH 7,2)]. Alikvotirao sam po 50 μL stanične suspenzije u fiksativu u mikropruvete od 1,5 mL te resuspendirao stanice u 100 μL 1,5%-tne (*w/v*) agaroze. Nakon hlađenja na RT, izrezao sam uklopljene stanice u agarozu na manje komadiće ($\approx 2 \times 2 \times 2 \text{ mm}$) te ih fiksirao u spomenutom fiksativu u trajanju od 90 minuta na $+4 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon fiksacije, alge uklopljene u agaru isprao sam dva puta s po 1 mL 0,5 M kakodilatnog pufera u trajanju od 10 minuta. Uzorke sam nakon

ispiranja postfiksirao u 1%-tnoj (*w/v*) otopini osmijevog tetroksida u 0,5 M kakodilatnom puferu u trajanju od 90 minuta na temperaturi od +4 °C. Uzorke sam ponovno isprao dva puta s po 1 mL ultra-čiste vode u trajanju od 10 minuta. Nakon postfiksacije, uzorci su dehidrirani u seriji rastuće koncentracije etanola na RT na način da sam ih inkubirao u otopini etanola u trajanju od 10 minuta. Uzorke sam inkubirao redom u 50%, 60%, 70%, 80% i 96% (*v/v*) etanolu te ih prebacio u otopinu 99-100% etanol (dalje u tekstu: 100% etanol) na prekonoćnu inkubaciju na +4 °C. Nakon dehidracije, uzorci su inkubirani 30 minuta na RT u smjesi 100% etanola i acetona (1:1), nakon čega su inkubirani u čistom acetonu u trajanju od 30 minuta. Potom su inkubirani na RT 30 minuta u smjesi acetona i epoksidne smole (Spurrovo sredstvo) omjera 3:1, zatim 30 minuta u smjesi acetona i Spurrovog sredstva omjera 1:1, zatim u smjesi acetona i Spurrovog sredstva omjera 1:3 te 2 h pri 40 °C u 100%-tnom Spurrovom sredstvu. Nakon uklapanja, u kalupe sam uz gornji rub postavio uzorak dok sam uz donji rub postavio identifikacijsku oznaku. Cijeli kalup sam zatim ispunio sa Spurrovim sredstvom te sve inkubirao 48 sati pri 65 °C. Nakon završene inkubacije, napravio sam ultratanke prereze debljine 70 nm pomoću ultramikrotoma (MT6000-XL, RMC Inc., SAD). Dobivene prereze sam prebacio na bakrenu mrežicu za analizu promjena nakon izlaganja nanočesticama srebra i polistirena te AgNO₃, dok sam za analizu stanica nakon izlaganja nanočesticama bakra i CuSO₄ dobivene prereze prebacio na niklove mrežice. Sve korištene mrežice bile su presvučene tankim filmom polivin formala, odnosno Formvarom® (ThermoFisher Scientific, SAD) i naparene ugljikom. Stanice izložene nanočesticama i ionima srebra i bakra, kao i kontrolne uzorke, analizirao sam mikroskopom TF20 pri 200 kV, a prisutnost nanočestica potvrdio sam analizom spektra energijski razlučujuće, odnosno disperzivne rendgenske spektroskopije (EDX) na Institutu za elektronsku mikroskopiju i nanoanalizu, Graz, Austrija. Stanice izložene nanočesticama polistirena analizirao sam mikroskopom Morgagni 268D (FEI, Nizozemska) pri 70 kV.

Taloženje nanočestica u sloju ESP vizualizirao sam TEM mikroskopijom u nativnim uvjetima bez prethodne preparacije uzorka. Nakon izlaganja kulture stanica, centrifugirao sam 10 mL stanične suspenzije pri brzini od 3500 g na RT u trajanju od 5 minuta. Stanice sam isprao ultra-čistom vodom tri puta te ponovio centrifugiranje pri jednakim uvjetima nakon svakog ispiranja. Talog stanica sam zatim resuspendirao u 1 mL podloge BBM te kapnuo 2 µl suspenzije algi na mrežicu. Za analizu taloženja AgNP-citrat, AgNP-CTAB, PS-NP, PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP te čestica nakon izlaganja kulture stanica AgNO₃ u sloju EPS koristio sam bakrenu mrežicu, dok sam za analizu taloženja nanočestica CuONP i Cu₂ONP te čestica nakon izlaganja kulture

stanica CuSO_4 koristio mrežice od nikla. Uzorke sam potom inkubirao na pripadajućim mrežicama u trajanju od 5 minuta, nakon čega sam višak suspenzije odstranio prislanjanjem mrežice na filter papir. Nakon kratkog sušenja na zraku u trajanju od 5 minuta, uzorke sam vizualizirao mikroskopom TF20 pri 200 kV. Nanočestice uočene u sloju EPS potvrdio sam analizom EDX.

3.4.4 Određivanje količine srebra, bakra i polistirena u stanicama i sloju EPS

Količinu srebra i bakra unesenih u stanice algi ili istaloženih u sloju EPS nakon izlaganja kulture stanica nanočesticama srebra i bakra te AgNO_3 i CuSO_4 odredio sam spektrometrijom masa uz induktivno spregnutu plazmu (eng. *inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS). Količinu akumuliranog polistirena odredio sam pirolitičkom plinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa (eng. *pyrolysis-gas chromatography - mass spectrometry*, Py-GC-MS).

Suspenziju stanica centrifugirao sam pri brzini od 3500 g 5 minuta na RT. Dobiveni talog sam resuspendirao u 10 mL pufera [$2 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, $4 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 9 mM NaCl , 1 mM KCl (pH 7,0)] s dodatkom 5 g smole za ionsku izmjenu Amberlite HPR1100 kako bih odvojio sloj EPS od samih stanica. Nakon inkubacije s miješanjem na $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od 2 sata, homogenat sam centrifugirao 30 minuta pri 4500 g na $+4 \text{ }^\circ\text{C}$. Supernatant sam prebacio u čiste epruvete od 50 mL, a talog sam isprao s $1 \times$ PBS puferom (poglavlje 3.2.4) te ponovno centrifugirao u jednakim uvjetima. Talog sam potom liofilizirao u trajanju od 24 sata na $-64 \text{ }^\circ\text{C}$ i $0,025 \text{ mbar}$ te je predstavljao uzorak stanica. Supernatant sam pomiješao s 10 mL hladnog acetona i inkubirao preko noći na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon inkubacije, uzorke sam centrifugirao 30 minuta pri 4500 g na $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ te sam tako dobiveni talog, koji je predstavljao frakciju sloja EPS, liofilizirao u trajanju od 24 sata na $-64 \text{ }^\circ\text{C}$ i $0,025 \text{ mbar}$. Uzorke sam spremio na RT u mraku do mjerenja.

Za analizu količine akumuliranog srebra i bakra, uzorke pripremljene na prethodno opisani način inkubirao sam u 10 mL koncentrirane 65% (v/v) HNO_3 , prvo na $130 \text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od 10 minuta te zatim 15 minuta na $180 \text{ }^\circ\text{C}$ pomoću mikrovalne pećnice (ETHOS SEL Milestone, SAD). Uzorak sam potom inkubirao u 1 mL 37% (v/v) H_2O_2 , prvo na $85 \text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od 5 minuta te zatim 44 minute na $130 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon hlađenja, uzorke sam razrijedio do konačnog volumena od 50 mL s 1% (v/v) HNO_3 . Ukupnu količinu srebra i bakra analizirao sam na instrumentu ELAN DRC-e ICP-MS (Perkin Elmer, SAD) te odredio pomoću baždarnih krivulje standarda poznatih koncentracija. Granica detekcija bila je $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$, a granica

kvantifikacije 0,1 mg kg⁻¹. Sadržaj srebra i bakra izražen je kao µg srebra odnosno bakra (10⁶ stanica)⁻¹.

Za određivanje količine akumuliranog polistirena, liofilizirane uzorke stanica i sloja EPS te po 2 µL matičnih suspenzija PS-NP, PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP (100 mg L⁻¹) stavio sam u deaktiviranu posudu za uzorke. Uzorci su zatim spaljeni u pirolizatoru (EGA/Py3030D, Frontier Laboratories Europe, Njemačka) na temperaturi od 600 °C, koji je opremljen uređajem za automatsko uzimanje uzoraka (AS-1020E, Frontier Laboratories Ltd., Japan). Pirolizator je bio spojen na *split/split* injekcijski priključak plinskog kromatografa spregnutog sa spektrometrom masa (GC-MS) (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu, Njemačka), dok je priključak za ubrizgavanje GC-a bio spojen na kvadrupolni detektor mase preko kolone za odvajanje (Ultra ALLOY ± 5, 30 m × 0,25 mm, Frontier Laboratories Ltd., Japan) i GC/MS adapter bez otvora (Frontier Laboratories, Ltd., Japan). Detaljniji analitički uvjeti navedeni su u Tablici 3. Identifikacije maksimuma u kromatogramima potvrdio sam usporedbom spektra svakog maksimuma u dobivenim pirogramima s onima u bibliotekama za pretraživanje podataka *F Search all in one* (ver.3.6) (Frontier Laboratories Ltd., Japan).

Tablica 3. Parametri analize akumulacije polistirena na sloju EPS i u stanicama alge *C. vulgaris* pirolitičkom plinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa (Py-GC-MS).

Instrument	Parametri	Uvjeti
Pirolizator	Temperatura peći	600 °C
	Temperatura sučelja	300 °C
GC	Temperatura ubrizgavanja	300 °C
	Temperatura pećnice kolone	40-320 °C (20 °C min ⁻¹)
	Način kontrole protoka	Tlak
	Temperatura sučelja	300 °C
MS	Način ubrizgavanja	<i>Split</i> (omjer dijeljenja: 1:16)
	Plinski nosač	Helij (brzina protoka kolone: 0,87 mL min ⁻¹)
	Temperatura izvora iona	250 °C
	Metoda ionizacije	Elektronska ionizacija, 70 eV
	Raspon skeniranja	<i>m/z</i> 29-350

3.5 Određivanje parametara oksidacijskog stresa

3.5.1 Ekstrakcija ukupnih topivih proteina

Za ekstrakciju topivih proteina, centrifugirao sam ukupni volumen od 200 mL stanične suspenzije pri brzini od 3500 g na RT u trajanju od 5 minuta. Talog stanica sam zatim isprao s ultra-čistom vodom tri puta, te nakon svakog ispiranja ponovno centrifugirao pri istim uvjetima.

Nakon ispiranja, talog stanica sam resuspendirao u 500 μL 0,1 M kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0), dodao 0,08 g silika kuglica (425-600 μm) te homogenizirao na uređaju Retsch MM200 (Retsch, Njemačka) na frekvenciji od 30 Hz tri puta po 4 minute. Između svakog koraka homogenizacije, nosač s uzorcima hladio sam na +4 °C u trajanju od 1 minute. Nakon homogenizacije, dobivene homogenate sam centrifugirao pri 20000 g na +4 °C u trajanju od 15 minuta, nakon čega sam supernatant prebacio u čiste epruvete od 1,5 mL i ponovo centrifugirao 45 minuta pod istim uvjetima. Supernatant sam prebacio u čiste epruvete od 1,5 mL i uzorke pohranio na -20 °C do korištenja.

Koncentraciju proteina odredio sam metodom po Bradfordu (Bradford 1976), koja se temelji na vezanju proteina i boje *Coomasie Brilliant Blue* (CBB) G-250. Prvo sam pripremio matičnu Bradford otopinu [350 mg CBB G-250, 30 mL 96% etanola, 200 mL 88% fosforne kiseline (H_3PO_4)] iz koje sam pripremio radnu Bradford otopinu tako što sam na 30 mL matične Bradford otopine dodao 15 mL 96% (v/v) etanola i 30 mL 88% (v/v) H_3PO_4 te sve nadopunio s 425 mL destilirane vode (deH_2O). Mjerenja sam proveo miješanjem 980 μL radne Bradford otopine i 20 μL uzorka, nakon čega sam uzorke inkubirao u mraku u trajanju od 5 minuta. Nakon inkubacije, izmjerio sam apsorbanciju na valnoj duljini od 595 nm. Konačne koncentracije proteina u uzorcima odredio sam primjenom baždarne krivulje napravljene za standard goveđeg seruma albumina (eng. *bovine serum albumin*, BSA) poznatih koncentracija (0,2-2,0 mg mL^{-1}) u 0,1 M kalij-fosfatnom puferu.

Dobivene uzorke koristio sam za određivanje sadržaja proteinskih karbonila, spektrofotometrijsku analizu aktivnosti antioksidacijskih enzima (APX, PPX, CAT, SOD) te za analizu ekspresije proteina Hsp70, Hsp90, Rubisco i D1 imunodetekcijskom metodom.

3.5.2 Određivanje sadržaja ROS

3.5.2.1 Fluorimetrijsko određivanje sadržaja ROS

Za određivanje količine različitih ROS molekula, koristio sam dvije fluorescentne probe: DHE i H_2DCFDA . Za tretmane sa srebrom i bakrom, alge sam izložio koncentracijama koje omogućuju preživljenje 75% stanica, dok sam za tretmane s nanočesticama polistirena koristio koncentracije od 40 mg L^{-1} . Nakon izlaganja kulture stanica, izmjerio sam koncentraciju stanica u suspenzijama kao što je opisano u poglavlju 3.2.2 te alikvotirao 100 μL stanične suspenzije u mikrotitarsku pločicu s ravnim dnom, pa ih pomiješao s 80 μL 20 μM probe DHE ili H_2DCFDA . Nakon 30-minutne inkubacije u mraku, probu DHE dodanu u suspenziju stanica pobudio sam svjetlom na valnoj duljini od 520 nm, a njenu fluorescenciju izmjerio na valnoj duljini od 600

nm. Probu H₂DCFDA dodanu u suspenziju stanica pobudio sam svjetlom valne duljine od 504 nm, a njenu fluorescenciju izmjerio na valnoj duljini od 550 nm. Za pobudu i mjerenje fluorescencije u uzorcima koristio sam čitač mikropločica GloMax (Promega, Madison, WI, SAD). Rezultate sam normalizirao na broj stanica u staničnoj suspenziji te ih izrazio kao postotak sadržaja ROS molekula u kontrolnim stanicama, a prikazani su kao srednja vrijednost 12 replika ± standardna pogreška iz dva nezavisna pokusa.

3.5.2.2 Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja H₂O₂

Za određivanje količine H₂O₂ u staničnim ekstraktima primijenio sam metodu koju su opisali Máta i Hideg (2017). Prvo sam izmjerio koncentraciju stanica u suspenzijama, kao što je opisano u poglavlju 3.2.2, a potom centrifugirao 200 mL stanične suspenzije pri 3500 g na RT u trajanju od 5 minuta te isprao talog tri puta s ultra-čistom vodom. Nakon svakog ispiranja, stanice sam ponovno centrifugirao pri istim uvjetima. Tako dobiveni talog sam resuspendirao u 500 µL hladnog 70%-tnog etanola, dodao 0,08 g silika kuglica (425-600 µm) i stanice homogenizirao na uređaju Retsch MM200 na frekvenciji od 30 Hz tri puta po 4 minute. Između svakog koraka homogenizacije, nosač s uzorcima sam hladio na +4 °C u trajanju od 1 minute. Nakon homogenizacije, dobivene homogenate sam centrifugirao pri brzini od 15000 g na +4 °C u trajanju od 10 minuta, nakon čega sam supernatant prebacio u čiste epruvete od 1,5 mL te ih čuvao na ledu u mraku. U 1 mL pripremljene reakcijske smjese [124 µM natrijeva sol ksilenol narančasto, 99 mM sorbitol, 0,248 mM amonijev željezo (II) sulfat] dodao sam 100 µL dobivenog staničnog ekstrakta te sam nakon 15-minutne inkubacije u mraku na RT, izmjerio apsorbanciju na valnoj duljini od 560 nm. Ukupni sadržaj H₂O₂ izračunao sam primjenom baždarnе krivulje otopina poznatih koncentracija H₂O₂ (1,82-72,8 µM), a rezultate sam izrazio kao µmol_{H₂O₂} (10⁶ stanica)⁻¹, te prikazao kao srednju vrijednost 12 replika ± standardna pogreška iz dva nezavisna pokusa.

3.5.3 Određivanje oštećenja biološki važnih molekula

3.5.3.1 Određivanje sadržaja MDA

Stupanj lipidne peroksidacije odredio sam indirektno mjerenjem sadržaja MDA prema metodi koju su opisali Heath i Packer (1968). Prvo sam izmjerio koncentraciju stanica na način opisan u poglavlju 3.2.2. Potom sam centrifugirao 200 mL stanične suspenzije pri 3500 g na RT u trajanju od 5 minuta te isprao talog tri puta s ultra-čistom vodom. Nakon svakog ispiranja, stanice sam ponovno centrifugirao pri jednakim uvjetima. Tako dobiveni talog sam resuspendirao u 700 µL 0,5% (w/v) TBA, koju sam pripremio u 20% (w/v) trikloroetanoj kiselini (eng. *trichloroacetic acid*, TCA) (TTT, Hrvatska) te dodao 0,08 g silika kuglica (425-

600 μm). Stanice sam homogenizirao na frekvenciji od 30 Hz u trajanju od 12 minuta. Ekstrakte sam potom inkubirao 30 minuta na 95 °C, nakon čega sam uzorke inkubirao na ledu u trajanju od 2 minute kako bi zaustavio reakciju. Ekstrakte sam potom centrifugirao pri 14000 g na +4 °C u trajanju od 30 minuta. Supernatante sam potom prebacio u čiste epruvete od 1,5 mL te izmjerio apsorbanciju na 532 nm. Kako bih napravio korekciju za nespecifično zamućenje uzoraka, od vrijednosti apsorbancije izmjerene na valnoj duljini od 532 nm, oduzeo sam izmjerenu vrijednost apsorbancije na 600 nm. Stupanj lipidne peroksidacije sam izračunao kao sadržaj MDA u nmol produkta po broju stanica [μmol/broj stanica], prema formuli:

$$\text{sadržaj MDA} = \frac{A_{532} - A_{600}}{\varepsilon * l * V * n}$$

gdje je:

A_{532} - apsorbancija uzorka izmjerena na 532 nm

A_{600} - apsorbancija uzorka izmjerena na 600 nm

ε - molarni apsorpcijski koeficijent (155 mM⁻¹ cm⁻¹)

l - duljina optičkog puta (1 cm)

V - volumen uzorka (0,7 mL)

n - koncentracija stanica algi u suspenziji (broj stanica mL⁻¹)

Rezultate sam izrazio kao μmol (10⁶ stanica)⁻¹ te prikazuju srednju vrijednost 12 replika ± standardna pogreška iz dva nezavisna pokusa.

3.5.3.2 Određivanje sadržaja proteinskih karbonila

Za određivanje oštećenja proteina, mjerio sam količinu proteinskih karbonila prema metodi koju su opisali Levine i sur. (1994). Prvo sam izolirao proteine iz suspenzija stanica u 0,1 M kalij-fosfatnom puferu (pH 7,0) na način opisan u poglavlju 3.5.1. U alikvote proteinskih ekstrakata od 20 μL dodao sam 180 μL 0,1 M kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0) i sve pomiješao sa 300 μL 10 mM DNPH otopljenog u 2 M klorovodičnoj kiselini (HCl) za određivanje sadržaja proteinskih karbonila ili sa 300 μL 2 M otopine HCl koja je služila kao referentna vrijednost za pojedinačni uzorak. Uzorke sam potom inkubirao 1 sat na RT u mraku, nakon čega sam proteine precipitirao dodavanjem 500 μL hladne 10%-tne (w/v) otopine TCA i inkubirao 5 minuta na -20 °C. Nakon toga sam uzorke centrifugirao 10 minuta pri 20000 g na +4 °C, a taloge isprao tri puta s 500 μL smjese 1:1 etanol/etil acetat (v/v) kako bih maknuo nevezani reagens. Nakon svakog ispiranja, uzorke sam centrifugirao pri istim uvjetima. Proteine u talogu otopio sam u 6 M urei u 20 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 2,4) uz korištenje ultrazvučne kupelji. Nakon otapanja proteina u talogu, uzorcima sam izmjerio apsorbanciju na valnoj duljini od 370 nm za određivanje proteinskih karbonila i na valnoj duljini od 280 nm za određivanje koncentracije proteina. Koncentraciju proteina izračunao sam preko baždarne krivulje napravljene od

standarda BSA poznatih koncentracija (0,2-2 mg mL⁻¹) kojima sam izmjerio apsorbanciju na valnoj duljini od 280 nm. Sadržaj proteinskih karbonila odredio sam prema formuli:

$$\text{Sadržaj proteinskih karbonila} = \frac{A_{370}}{c * \epsilon * l}$$

gdje je:

A_{370} - apsorbancija uzorka izmjerena na 370 nm

ϵ - molarni apsorpcijski koeficijent (22 mM⁻¹ cm⁻¹)

c - sadržaj proteina (mg mL⁻¹)

l - duljina optičkog puta (1 cm)

Rezultate sam izrazio kao $\mu\text{mol}_{\text{proteinskih karbonila}} \text{ mg}^{-1}_{\text{proteina}}$ koji prikazuju srednju vrijednost 12 replika \pm standardna pogreška iz dva nezavisna pokusa.

3.5.3.3 Određivanje oštećenja molekule DNA

Komet test odradio sam prema metodi opisanoj u Gichner i sur. (2004) s promjenama opisanim u Cvjetko i sur. (2017). Nakon izlaganja kulture stanica, 100 μL stanične suspenzije pomiješao sam s 100 μL 1% (w/v) otopine agaroze niskog tališta (eng. *low melting point*, LMP) koju sam pripremio u PBS puferu (poglavlje 3.2.4) na 42 °C. Uzorke sam zatim nakapao na predmetna stakla na koja sam prethodno nanio sloj 1% (w/v) otopine agaroze normalnog tališta (eng. *normal melting point*, NMP) koju sam pripremio u deH₂O uz konstantno zagrijavanje. Na uzorke sam stavio pokrovno staklo te inkubirao 10 minuta na +4 °C kako bi slojevi agaroze očvrtnuli, nakon čega sam maknuo pokrovna stakla. Uzorke sam potom denaturirao 60 minuta na +4 °C u puferu za lizu [2,5 M NaCl, 100 mM etilendiamintetraoctena kiselina (eng. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA), 10 mM Tris-HCl, 10% DMSO, 1% Triton X-100]. Nakon denaturacije, predmetna stakla s uzorcima stavio sam u kadicu za elektroforezu u koju sam ulio hladni pufer za elektroforezu [1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH (pH 13)] te pokrenuo elektroforezu u trajanju od 20 minuta pri 26 V i 300 mA. Nakon elektroforeze, uzorke sam neutralizirao ispiranjem tri puta s 0,4 M otopinom Tris-HCl te osušio na zraku. Jezgre sam vizualizirao fluorescentnom bojom *GelStarTM Nucleic Acid Gel Stain* (Lonza, Švicarska) koja se veže na molekulu DNA. Boju sam razrijedio 10000 \times i uzorke inkubirao 5 minuta u mraku na RT. Uzorke sam analizirao fluorescencijskim mikroskopom Olympus BX51 (Olympus, Japan) opremljenim s ekscitacijskim filterom BP 520/09 nm i graničnim filterom od 610 nm. Oštećenje molekule DNA izrazio sam kao postotak DNA u repu (eng. *tail DNA*, % tDNA) određenog tretmana u odnosu na kontrolu na 100 slučajno odabranih jezgara po staklu, koristeći alat OpenComet unutar programa ImageJ 1.53t (National Institutes of Health, SAD). Rezultate sam prikazao kao srednju vrijednost 100 jezgara \pm standardna pogreška.

3.5.4 Određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima

Za određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima koristio sam proteinske ekstrakte koje sam pripremio u 0,1 M kalij-fosfatnom puferu (pH 7,0) na način opisan u poglavlju 3.5.1. Za tretmane sa srebrom i bakrom, alge sam izložio koncentracijama koje omogućuju preživljenje 75% stanica, dok sam za tretmane s nanočesticama polistirena koristio koncentracije od 40 mg L⁻¹.

3.5.4.1 Određivanje aktivnosti APX

Aktivnost enzima APX (EC 1.11.1.11) odredio sam modificiranom metodom koju su opisali Nakano i Asada (1981) prateći smanjenje apsorbancije u reakciji askorbata i H₂O₂. 180 μL proteinskog ekstrakta pomiješao sam s 800 μL reakcijske smjese [50 mM kalij-fosfatni pufer, 10 mM EDTA (pH 7,0)], 10 μL 0,1 M askorbinske kiseline i 10 μL 12 mM H₂O₂. Smanjenje apsorbancije mjerio sam svakih 15 sekundi u ukupnom trajanju od 1 minute na valnoj duljini od 290 nm. Specifičnu aktivnost enzima APX izračunao sam prema formuli:

$$APX = \frac{\Delta A * 4 * V_{rs} * F. R.}{V_{uz} * \epsilon * l * c}$$

gdje je:

ΔA - srednja vrijednost promjene apsorbancije na 290 nm tijekom 15 sekundi

4 - faktor korekcije za ΔA za izražavanje rezultata u minuti

V_{rs} - volumen reakcijske smjese (1 mL)

F.R. - faktor razrjeđenja uzorka (1)

V_{uz} - volumen uzorka (0,18 mL)

ϵ - molarni apsorpcijski koeficijent askorbata (2,8 mM⁻¹ cm⁻¹)

l - duljina optičkog puta (1 cm)

c - koncentracija proteina (mg mL⁻¹)

Rezultati su izraženi kao $\mu\text{mol}_{\text{oksidirani askorbat}} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}_{\text{proteina}}$, a prikazuju srednju vrijednost 12 replika \pm standardna pogreška iz dva nezavisna pokusa.

3.5.4.2 Određivanje aktivnosti PPX

Aktivnost enzima PPX (EC 1.11.1.7) odredio sam metodom prema Nakano i Asada (1981), gdje se prati porast apsorbancije uslijed oksidacije pirogalola dodatkom H₂O₂. 20 μL proteinskog ekstrakta pomiješao sam s 980 μL reakcijske smjese [50 mM kalij-fosfatni pufer, 20 mM pirogalol i 5 mM H₂O₂, (pH 7,0)]. Povećanje apsorbancije sam mjerio svakih 15 sekundi u ukupnom trajanju od 2 minute na valnoj duljini od 430 nm. Specifičnu aktivnost PPX enzima izračunao sam prema formuli:

$$PPX = \frac{\Delta A * 4 * V_{rs} * F.R.}{V_{uz} * \epsilon * l * c}$$

gdje je:

ΔA - srednja vrijednost promjene apsorbancije na 430 nm tijekom 15 sekundi

4 - faktor korekcije za ΔA za izražavanje rezultata u minuti

V_{rs} - volumen reakcijske smjese (1 mL)

F.R. - faktor razrjeđenja uzorka (1)

V_{uz} - volumen uzorka (0,02 mL)

ϵ - molarni apsorpcijski koeficijent purpurogalina ($2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l - duljina optičkog puta (1 cm)

c - koncentracija proteina (mg mL^{-1})

Rezultati izraženi kao $\mu\text{mol}_{\text{purpurogalin}} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}_{\text{proteina}}$, a prikazuju srednju vrijednost 12 replika \pm standardna pogreška iz dva nezavisna pokusa.

3.5.4.3 Određivanje aktivnosti CAT

Aktivnost enzima CAT (EC 1.11.1.6) odredio sam prema modificiranom protokolu opisanom u Aebi (1984) prateći spektrofotometrijski brzinu katalitičke razgradnje H_2O_2 u uzorku. 30 μL proteinskog ekstrakta pomiješao sam s 970 μL reakcijske smjese [50 mM kalij-fosfatni pufer, 20 mM H_2O_2 (pH 7,0)]. Smanjenje apsorbancije sam mjerio svakih 10 sekundi u ukupnom trajanju od 1 minute na valnoj duljini od 240 nm. Specifičnu aktivnost enzima CAT izračunao sam prema formuli:

$$\text{CAT} = \frac{\Delta A * 6 * V_{rs} * F.R.}{V_{uz} * \epsilon * l * c}$$

gdje je:

ΔA - srednja vrijednost promjene apsorbancije na 240 nm tijekom 10 sekundi

6 - faktor korekcije za ΔA za izražavanje rezultata u minuti

V_{rs} - volumen reakcijske smjese (1 mL)

F.R. - faktor razrjeđenja uzorka (1)

V_{uz} - volumen uzorka (0,03 mL)

ϵ - molarni apsorpcijski koeficijent H_2O_2 ($40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l - duljina optičkog puta (1 cm)

c - koncentracija proteina (mg mL^{-1})

Rezultati izraženi kao $\mu\text{mol}_{\text{H}_2\text{O}_2} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}_{\text{proteina}}$, a prikazuju srednju vrijednost 12 replika \pm standardna pogreška iz dva nezavisna pokusa.

3.5.4.4 Određivanje aktivnosti SOD

Aktivnost enzima SOD (E.C. 1.15.1.1) odredio sam prema metodi opisanoj u Beauchamp i Fridovich (1971). Prvo sam pripremio reakcijsku smjesu [13 mM metionin, 0,1 M EDTA, 75 μM NBT (Alfa Aesar), 2 mM riboflavin, 50 mM kalij-fosfatni pufer (pH 7,8)]. Kako se

aktivnost, odnosno jedna jedinica (eng. *unit*, U) SOD enzima definira kao količina enzima koja uzrokuje 50%-tnu inhibiciju stope fotoredukcije NBT, reakcijskoj smjesi sam dodao onu količinu proteinskog ekstrakta koja uzrokuje 50%-tno smanjenje apsorbancije u kontrolnim uzorcima u odnosu na maksimalnu apsorbanciju koju sam izmjerio fotoredukcijom NBT u formazan s dodatkom riboflavina. Uzorke sam zatim inkubirao 8 minuta na RT u transiluminatoru (15 W), a formazan proizveden fotoredukcijom NBT-a, izmjerio sam na valnoj duljini od 560 nm. Specifičnu aktivnost SOD izračunao sam primjenom baždarne krivulje dobivene mjerenjem SOD standarda poznatih koncentracija (0,025 - 1 U μL^{-1}), a rezultate izrazio kao U mg^{-1} proteina te prikazao kao srednju vrijednost 12 replika \pm standardna pogreška iz dva nezavisna pokusa.

3.5.5 Određivanje sadržaja neenzimskih antioksidansa

Za analizu količine neenzimskih antioksidansa, mjerio sam sadržaje prolina i glutaciona. Za tretmane sa srebrom i bakrom, alge sam izložio koncentracijama koje omogućuju preživljenje 75% stanica, dok sam za tretmane s nanočesticama polistirena koristio koncentracije od 40 mg L^{-1} . Kako bih odredio količinu prolina i glutaciona u staničnim ekstraktima nakon izlaganja kulture stanica, prvo sam izmjerio koncentraciju stanica u suspenzijama kao što je opisano u poglavlju 3.2.2, a zatim centrifugirao 200 mL stanične suspenzije pri 3500 g na RT u trajanju od 5 minuta te isprao talog tri puta s ultra-čistom vodom. Nakon svakog ispiranja, stanice sam ponovno centrifugirao pri istim uvjetima. Tako dobiveni talog resuspendirao sam u 750 μL 3% (w/v) sulfosalicilne kiseline (eng. *sulfanilic acid*, SA), dodao 0,08 g silika kuglica (425-600 μm) te homogenizirao na frekvenciji od 30 Hz tri puta po 4 minute. Između svakog koraka homogenizacije, nosač s uzorcima hladio sam na +4 °C u trajanju od 1 minute. Nakon homogenizacije, dobivene homogenate centrifugirao sam 15 minuta pri 10000 g na +4 °C, nakon čega sam supernatant prebacio u čiste epruvete od 1,5 mL te ih čuvao na ledu u mraku do mjerenja.

3.5.5.1 Određivanje sadržaja prolina

Analizu količine prolina izveo sam prema metodi opisanoj u Bates i sur. (1973). Za mjerenje sam pripremio otopinu kiselog ninhidrina otapanjem 1,25 g ninhidrina u 30 mL ledene octene kiseline s dodatkom 20 mL 6 M fosfatne kiseline (H_3PO_4) uz stalno zagrijavanje. U 500 μL kiselog ninhidrina dodao sam 500 μL pripremljenog uzorka i 500 μL ledene octene kiseline te inkubirao 60 minuta na 95 °C. Reakciju sam zaustavio kratkom inkubacijom u ledenoj kupelji, nakon čega sam dodavanjem 1,2 mL toluena ekstrahirao kromofornu skupinu te uzorcima izmjerio apsorbanciju na valnoj duljini od 520 nm. Koncentraciju prolina u uzorcima izračunao

sam koristeći baždarnu krivulju dobivenu mjerenjem apsorbancije otopine standarda prolina poznatih koncentracija (0,5 - 200 μM). Rezultate sam izrazio kao $\mu\text{mol}_{\text{prolina}} (10^6 \text{ stanica})^{-1}$ te prikazao kao srednju vrijednost 12 replika \pm standardna pogreška iz dva nezavisna pokusa.

3.5.5.2 Određivanje sadržaja glutaciona

Analizu sadržaja oksidiranog i reduciranog glutaciona odradio sam prema modificiranoj metodi koju su opisali Salbitani i sur. (2017). U uzorcima sam prvo izmjerio količinu GSH miješanjem 100 μL ekstrakta u 3% (*w/v*) SA sa 750 μL reakcijske smjese [0,1 M kalij-fosfatni pufer, 1 mM EDTA, 1,5 mg mL^{-1} DTNB (pH 7,0)]. Uzorke sam inkubirao na RT 20 minuta prije mjerenja apsorbancije na valnoj duljini od 412 nm. Koncentraciju GSH izračunao sam korištenjem standarda poznatih koncentracija GSH (0,785 - 50 μM) te ih izrazio kao $\mu\text{mol glutaciona} (10^6 \text{ stanica})^{-1}$. Zatim sam svaki uzorak pomiješao s 50 μL NADPH (0,32 mg mL^{-1}) i 15 μL GR (1 U) te uzorke inkubirao 5 minuta na RT prije nego što sam izmjerio ukupni glutacion u stanicama mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 412 nm te rezultate izrazio kao $\mu\text{mol glutaciona} (10^6 \text{ stanica})^{-1}$. Količinu oksidiranog glutaciona (GSSG) izračunao sam prema formuli:

$$c(\text{GSH}_{\text{ukupni}}) = c(\text{GSH}) + 2 * c(\text{GSSG})$$

Rezultate sam izrazio kao omjer GSH i GSSG. Rezultati prikazuju srednju vrijednost 12 replika \pm standardna pogreška, iz dva nezavisna pokusa.

3.6 Učinak na parametre fotosinteze

3.6.1 Određivanje količine fotosintetskih pigmenata klorofila *a* i *b* te karotenoida

Kako bih odredio koncentraciju fotosintetskih pigmenata klorofila *a* (chl *a*) i *b* (chl *b*) te koncentraciju karotenoida nakon izlaganja kulture stanica, prvo sam izmjerio koncentraciju stanica u suspenzijama kao što je opisano u poglavlju 3.2.2. Za tretmane sa srebrom i bakrom, alge sam izložio koncentracijama koje omogućuju preživljenje 75% stanica, dok sam za tretmane s nanočesticama polistirena koristio koncentracije od 40 mg L^{-1} . Iz dobivenih podataka za koncentraciju stanica, alikvotirao sam u čiste epruvete od 1,5 mL potreban volumen stanične suspenzije koja sadrži $7,5 \times 10^6$ stanica te izolirao pigmente prema modificiranom protokolu opisanom u Schumann i sur. (2005). Uzorke sam centrifugirao pri 3500 g na RT u trajanju od 5 minuta, uklonio supernatant te isprao talog tri puta s ultra-čistom vodom. Nakon svakog ispiranja, stanice sam ponovno centrifugirao pri jednakim uvjetima. Tako dobiveni talog sam resuspendirao prvo u 800 μL hladnog 90%-tnog acetona, dodao 0,08 g silika kuglica (425-600 μm) te stanice homogenizirao na frekvenciji od 30 Hz u trajanju od 4 minute. Nakon homogenizacije, uzorke sam centrifugirao 5 minuta pri 3500 g na +4 °C, nakon čega sam

supernatant sakupio u zatamnjenu epruvetu od 1,5 mL te čuvao na +4 °C. Talog sam resuspendirao u 500 μL hladnog 90%-tnog acetona te ponovio postupak homogenizacije i centrifugiranja pri jednakim uvjetima te sam tako dobiveni supernatant spojio s prethodnim. Talog sam resuspendirao treći put u 500 μL hladnog 90%-tnog acetona te ponovio postupke homogenizacije i centrifugiranja pri istim uvjetima. Treći dobiveni supernatant sam spojio s prethodnima te nadopunio do 2 mL s hladnim 90%-tnim acetonom. Uzorcima sam izmjerio apsorbanciju na valnim duljinama od 647, 664 i 470 nm te izračunao koncentracije klorofila *a* i *b* te karotenoida prema formulama opisanim u Jeffrey i Humphrey (1975) i prema Dere i sur. (1998):

$$c(\text{chl } a) = 11,93 * A_{664} - 1,93 * A_{647}$$

$$c(\text{chl } b) = 20,36 * A_{647} - 5,50 * A_{664}$$

$$c(\text{karotenoidi}) = \frac{1000 * A_{470} - 2,270 * c(\text{chl } a) - 81,4 * c(\text{chl } b)}{227}$$

gdje je:

A_{470} - vrijednost apsorbancije na 470 nm

A_{664} - vrijednost apsorbancije na 664 nm

A_{647} - vrijednost apsorbancije na 647 nm

Rezultate sam izrazio kao μg chl *a* ili *b* (10^6 stanica)⁻¹ ili kao μg karotenoida (10^6 stanica)⁻¹ te prikazao kao srednju vrijednost 12 replika ± standardna pogreška iz dva nezavisna pokusa.

3.6.2 Određivanje stope fotosinteze

U cilju određivanja stope fotosinteze kao jednog od pokazatelja učinkovitosti procesa fotosinteze, prvo sam izmjerio koncentraciju stanica u suspenzijama kao što je opisano u poglavlju 3.2.2. Za analizu, 1,5 mL stanične suspenzije stavio sam u reakcijsku posudu uređaja Chlorolab 2 (Hansatech, UK) te sam analizirao količinu nastalog kisika na 30 °C i konstantnom miješanju od 30 okretaja u minuti pri rastućim intenzitetima svjetlosti od 40, 80 i 120 μmol fotona m⁻² s⁻¹. Suspenzija algi je osvjetljavana s pojedinačnim intenzitetima svjetla u trajanju od 20 minuta. Nakon svakog perioda osvjetljavanja, suspenzije algi sam inkubirao 20 minuta u mraku kako bih izmjerio i stopu staničnog disanja. Dobivene rezultate sam izrazio kao nmol_{kisika} unutar jednog sata po 10^6 stanica (nmol_{O₂} h⁻¹ (10^6 stanica)⁻¹) te prikazao kao srednju vrijednost tri replike ± standardna pogreška iz tri nezavisna pokusa.

3.6.3 Određivanje parametara fluorescencije klorofila *a*

Za određivanje parametara maksimalnog prinosa PSII (F_v/F_m) te indeksa učinkovitosti (PI_{abs}), prvo sam izmjerio koncentraciju stanica u suspenzijama, kao što je opisano u poglavlju 3.2.2. Zatim sam suspenzije algi inkubirao 1 sat u mraku kako bi se u potpunosti oksidirao PSII te kako bi se svi mehanizmi nefotokemijskog gašenja (eng. *non-photochemical quenching*, NPQ) ugasili. Zatim sam po 3 mL uzorka prenio u polistirensku kivetu te na uređaja AquaPen (Photon Systems Instruments, Češka) pokrenuo mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* OJIP testom pri super pulsu jačine 53%. Pripremu uzoraka za analizu i samo mjerenje izvodio sam pod crvenom svjetlošću niskog intenziteta ($1-3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) koja ne može pokrenuti fotokemijske reakcije na tilakoidnim membranama stanica algi. Izmjerene rezultate sam očitao preko programa FluorPen ver. 1.1.1.3 (Photon Systems Instruments, Češka) te izrazio kao omjer varijabilne i maksimalne fluorescencije algi prilagođenih na uvjete tame (F_v/F_m) ili kao arbitrarne jedinice učinkovitosti PSII (PI_{abs}). Rezultati predstavljaju srednju vrijednost 12 replika \pm standardna pogreška iz dva nezavisna pokusa.

3.7 Određivanje ekspresije proteina D1, RuBisCo, Hsp70 i Hsp90 imunodetekcijom

3.7.1 SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza

Za analizu ekspresije proteina D1, RuBisCo, Hsp70 i Hsp90 koristio sam proteinske ekstrakte ukupnih topivih proteina koji su pripremljen prema protokolu opisanom u poglavlju 3.5.1. Za razdvajanje proteina po njihovoj relativnoj molekulskoj masi koristio sam natrijevu dodecil sulfat-poliakrilamid gel elektroforezu (eng. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) jer se miješanjem s anionskim detergentom SDS proteini denaturiraju te im se maskira naboj i svi postaju negativno nabijeni (Balen i sur. 2011).

Za provođenje SDS-PAG elektroforeze koristio sam sustav *Mini-PROTEAN® 2 Cell* (Bio-Rad, SAD), a gelove za razdvajanje (12%) i gelove za sabijanje (4%) pripremio sam prema Tablici 4. Proteinske ekstrakte sam prvo denaturirao 5-minutnom inkubacijom na 95 °C u puferu za denaturaciju [eng. *sample buffer*; 187,5 mM Tris-HCl, 20% (v/v) glicerol, 6% (w/v) SDS, 5% (v/v), β -merkaptoetanol, 0,1% boje brom fenol modriilo omjeru 5:1. Nakon denaturacije, u svaku jažicu nanio sam 10 μg proteinskog uzorka, a u posebnu jažicu i 5 μL biljega molekulskih masa *Pierce™ Unstained Protein MW Marker* (ThermoFisher Scientific, SAD). Elektroforezu sam proveo na RT uz korištenje $10 \times$ razrijeđenog elektrodnog pufera za SDS-PAG elektroforezu [0,25 M Tris, 1,92 M glicin i 10% (w/v) SDS (pH 8,3)] prvih 15 minuta na 100 V, te na 190 V do završetka elektroforeze.

Tablica 4. Sastav otopina za pripremu gelova za razdvajanje i sabijanje za SDS-PAGE.

sastav	12% gel za razdvajanje (volumen)	4% gel za sabijanje (volumen)
ultra-čista H ₂ O	3,35 mL	3,05 mL
1,5 Tris/HCl M; pH 8,8	2,5 mL	
0,5 M Tris/HCl; pH 6,8		1,25 mL
30% akrilamid/bisakrilamid (AA/Bis)	4,0 mL	0,665 mL
	vakuum	
10% SDS	100 µL	50 µL
10% amonijev peroksodisulfat (APS)	50 µL	35 µL
tetrametiletilendiamin (TEMED)	5 µL	8 µL

3.7.2 Prijenos proteina na membranu

Nakon SDS-PAGE elektroforeze, gelove s razdvojenim proteinima prenio sam u vertikalni sustav za elektroprijenos *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad, SAD). Gelove sam položio na nitroceluloznu membranu koju sam namočio u pufer za prijenos [29 mM Tris, 192 mM glicin, 10% (v/v) metanol], a ispod koje su se nalazili redom papir *Whatmann* i spužvica. Na gel sam potom stavio drugi *Whatmann* papir i drugu spužvicu te nakon istiskivanja mjehurića zraka između membrane i gela, zatvorio okvir nosača za elektroprijenos proteina. Tako pripremljeni nosač prenio sam u uređaj za vertikalni elektroprijenos u kojem se već nalazio hladni pufer za prijenos te posuda s ledom za hlađenje sustava. Elektroprijenos proteina na nitroceluloznu membranu trajao je 60 minuta na 60 V, nakon čega sam provjerio kvalitetu prijenosa proteina inkubacijom nitrocelulozne membrane 5 minuta u boji *Rouge Ponceau S* [0,5% (w/v) *Rouge Ponceau S*, 1% (v/v) octena kiselina]. Nakon inkubacije, višak boje sam uklonio ispiranjem membrane u deH₂O te grafitnom olovkom označio položaje biljega molekulskih masa. Membranu sam potom inkubirao u puferu TBS (eng. *tris-buffered saline*; 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) u trajanju od 2 minute kako bih odstranio boju *Rouge Ponceau S* s membrane.

3.7.3 Imunodetekcija proteina

Nakon prijenosa proteina na membranu i označavanja položaja biljega molekulskih masa, membranu sam blokirao inkubacijom u otopini A [1 × TBS pufer, 1% (v/v) Tween 20, 5% (w/v) bezmasno mlijeko u prahu] u trajanju od 60 minuta na RT na tresilici. Nakon blokiranja, pripremio sam otopine primarnog poliklonalnog, kunićjeg anti-PsbA antitijela (AS05 084, Agrisera, Švedska) za protein D1, primarnog poliklonalnog, kunićjeg antitijela anti-Hsp70 (AS08 371) za protein Hsp70 i poliklonalnog, kunićjeg antitijela anti-Hsp90 (AS08 346,

Agrisera, Švedska) za protein Hsp90 njihovim razrjeđivanjem $3000 \times$ u otopini A. Za detekciju proteina RuBisCo, pripremio sam otopinu primarnog poliklonalnog, kunićjeg antitijela anti-RbcL (AS03 037, Agrisera, Švedska) razrijeđeno $1000 \times$ u otopini A. Membranu sam potom inkubirao u pripremljenim otopinama primarnih antitijela, prvo 60 minuta na tresilici na RT te preko noći na $+4 \text{ }^\circ\text{C}$. Membrane sam potom isprao tri puta inkubacijom u otopini A u trajanju od 10 minuta te ih inkubirao 60 minuta na RT na tresilici u $30000 \times$ razrijeđenim sekundarnim anti-kunićjim antitijelima IgG-HRP otopljenim u otopini A. Nakon inkubacije, membrane sam isprao u otopini B [$1 \times$ PBS pufer (poglavlje 3.2.4), 1% (v/v) Tween 20] tri puta inkubacijom po 10 minuta, poslije čega sam membrane inkubirao 5 minuta na RT u mraku u otopini za kemiluminiscenciju (*Western-Sure® Chemiluminescent Substrate*, LI-COR Biosciences, SAD) u cilju detekcije proteinskih vrpca na uređaju *C-DiGit Chemiluminescence Western Blot Scanner* (LI-COR Biosciences, SAD).

3.8 Analiza diferencijalne ekspresije proteina dvodimenzionalnom elektroforezom

U cilju razlučivanja većeg broja proteina iz ukupnog staničnog ekstrakta radi analize razlika u ekspresiji proteina nakon izlaganja kulture stanica korištenim tretmanima, primijenio sam metodu 2-DE. Navedena metoda omogućuje analizu ekspresije proteina u cijelim stanicama razlučivanjem velikog broja proteina prvo prema njihovom naboju te zatim prema njihovoj veličini (Balen i sur. 2011). Za tretmane sa srebrom i bakrom, alge sam izložio koncentracijama koje omogućuju preživljenje 75% stanica, dok sam za tretmane s nanočesticama polistirena koristio koncentracije od 40 mg L^{-1} .

3.8.1 Ekstrakcija proteina fenolom

Za analizu proteina 2-D elektroforezom i spektrometrijom masa, koristio sam proteinske ekstrakte izolirane modificiranom metodom pomoću fenola, jer su proteinski ekstrakti dobiveni navedenom metodom čišći u odnosu na klasičnu izolaciju u kalij-fosfatnom puferu (Pavoković i sur. 2012; Štefanić i sur. 2018). Prvo sam dvije replike svakog uzorka s ukupnim volumenom stanične suspenzije od 400 mL centrifugirao pri brzini od 3500 g na RT u trajanju od 5 minuta. Nakon centrifugiranja, odlio sam supernatant, a talog stanica resuspendirao u 1,3 mL ekstrakcijskog pufera [500 mM Tris, 50 mM EDTA, 700 mM saharoza, 100 mM KCl, 1 mM fenilmetilsulfonil fluorid (eng. *phenylmethylsulfonyl fluoride*, PMSF) i 2% (v/v) β -merkaptoetanol]. Suspenziju stanica u ekstrakcijskom puferu sam zatim razdijelio u dvije epruvete od 1,5 mL s konačnim volumenom od 625 μL u svakoj epruveti. Nakon dodavanja 0,08 g silika kuglica (425-600 μm) u svaku epruvetu, stanice sam homogenizirao na frekvenciji od 30 Hz tri puta po 4 minute. Između svake homogenizacije, nosač s uzorcima sam hladio na

+4 °C u trajanju od 1 minute. Nakon homogenizacije, prethodno razdijeljene homogenate sam spojio u čistim polipropilenskim epruvetama od 15 mL. Epruvete korištene u homogenizaciji sam potom dodatno isprao sa 700 µL ekstrakcijskog pufera kako bi pokupio sav homogenat te sve spojio s prethodno dobivenim homogenatom u polipropilenskim epruvetama od 15 mL. Uzorke sam potom inkubirao 10 minuta u ledu na tresilici. Svaki uzorak sam zatim pomiješao sa 2 mL fenola, pomiješao na vorteksu te inkubirao 10 minuta na RT na tresilici. Nakon inkubacije uzorke sam centrifugirao pri brzini od 4500 g 20 minuta na +4 °C, a supernatante prebacio u čiste polipropilenske epruvete od 15 mL. Uzorke sam potom pomiješao s 2 mL ekstrakcijskog pufera, pomiješao na vorteksu te inkubirao 3 minute na RT na tresilici. Nakon inkubacije, uzorke sam centrifugirao 20 minuta pri 4500 g na +4 °C, nakon čega sam supernatante prebacio u čiste polipropilenske epruvete od 50 mL te ih pomiješao s 4 × većim volumenom hladne precipitacijske otopine (0,1 M amonijev acetat u metanolu). Tako pripremljene uzorke sam inkubirao preko noći na -20 °C. Nakon inkubacije, uzorke sam centrifugirao 20 minuta pri 4500 g na +4 °C, a taloge isprao 3 × s 3 mL hladne precipitacijske otopine i jednom s 3 mL hladnog acetona. Nakon svakog ispiranja, uzorke sam ponovno centrifugirao pri jednakim uvjetima u trajanju od 10 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant sam odstranio te sam taloge osušio inkubacijom u horizontalnom položaju u digestoru. Nakon sušenja, taloge sam resuspendirao u 400 µL pufera za izoelektrično fokusiranje (IEF) [9 M urea, 4% (w/v) 3-[(3-kolamidpropinil) dimetilamonijev]-1-propansulfat (CHAPS), 2 mg mL⁻¹ ditiotritol (DTT), 5,2 µL mL⁻¹ amfoliti] i prebacio u čiste epruvete od 1,5 mL. Tako otopljene taloge centrifugirao sam 5 minuta pri 20000 g na +4 °C, a supernatante prebacio u čiste epruvete od 1,5 mL. Proteinske ekstrakte sam čuvao do analize na -20 °C.

Koncentraciju proteina u ekstraktima izmjerio sam modificiranom metodom po Bradfordu (Ramagli i Rodriguez 1985) koja uz pomoć zakiseljavanja poboljšava vezanje boje CBB G-250 i proteina (Pavoković i sur. 2012). U polipropilenskim epruvetama od 15 mL pomiješao sam 10 µL 0,1 M HCl, 70 µL deH₂O, 20 µL proteinskog ekstrakta i 3,5 mL Bradford radne otopine (poglavlje 3.5.1). Nakon inkubacije u mraku u trajanju od 10 minuta, očitao sam apsorbanciju na 595 nm te izračunao koncentraciju proteina preko baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancija otopina BSA poznatih koncentracija (0,2 - 2,0 mg mL⁻¹) otopljenih u IEF puferu uz dodatak DTT i amfolita.

3.8.2 1. dimenzija - IEF

Za razdvajanje proteina iz proteinskih ekstrakata prema njihovoj izoelektričnoj točki primijenio sam metodu IEF. Proteinske ekstrakte (poglavlje 3.8) razrijedio sam u IEF puferu do konačnog

volumena od 400 μL kako bi se u uzorcima nalazila jednaka masa proteina od 300 μg . Uzorke sam zatim pomiješao s 5 μL boje CBB G-250 te sve centrifugirao 5 minuta pri 20000 g na RT. Tako pripremljene uzorke prebacio sam u jažice u posudu za rehidraciju imobilina (eng. *immobiline drystrip*) te na uzorke položio imobiline duljine 13 cm s nelinearnim gradijentnim gelom (pH 3-10). Nakon što sam provjerio da je gel imobilina uronjen u uzorak te da nema mjehurića zraka koji bi mogli spriječiti unos proteina u gel, imobiline sam prekrpio s 900 μL mineralnog ulja kako bih spriječio isušivanje gela tijekom postupka rehidracije u trajanju od 12 - 16 sati na RT.

Nakon prekonoćne rehidracije, imobiline sam stavio na keramičku podlogu uređaja za IEF (Ettan IPHphore 3, GE Healthcare, SAD) pazeći na njihovu orijentaciju i položaj. Elektroodne papiriće sam zatim namočio u 150 μL deH₂O te ih postavio na krajeve imobilina na koje sam u postavio i elektrode uređaja i sve prelio sa 110 mL mineralnog ulja te pokrenuo IEF program uvjetovan dužinom i brojem imobilina. Napon se unutar prvog sata postupno povećavao do 500 V, nakon čega se postupno povećavao do 1000 V unutar 1 h, zatim postupno do 8000 V unutar 1 h, nakon čega je napon bio stalan na 8000 V do kraja elektroforeze. IEF je završio nakon prelaska 30 kVh te sam imobiline spremio na -80 °C do daljnje analize.

3.8.3 2. dimenzija - SDS-PAG elektroforeza

Imobiline sam prvo inkubirao u puferu za ekvilibraciju [0,05 M Tris-HCl, 6 M urea, 2% (w/v) SDS, pH 8,8] s dodatkom 130 mM DTT-a u trajanju od 15 minuta za redukciju disulfidnih veza između polipeptidnih lanaca, što omogućuje potpunu reakciju proteina sa SDS-om i točnu migraciju proteina SDS-PAG elektroforezom. Zatim sam ih 15 minuta inkubirao u ekvilibracijskom puferu s dodatkom 135 mM jodoacetamida (eng. *iodoacetamide*, IAA) radi alkiliranja sulfhidridnih skupina, čime sam inhibirao stvaranje novih disulfidnih veza.

Nakon ekvilibracije, pripremio sam 12% SDS poliakrilamidne gelove (Tablica 5). Imobilne sam isprao u 1 \times elektrodnom puferu (poglavlje 3.7.1.1) te ih postavio na SDS-poliakrilamidni gel, pritom pazeći na orijentaciju pozitivne strane imobilina koja se nalazila s lijeve strane SDS-poliakrilamidnog gela. S desne strane imobilina sam postavio *Whatmann* papir na koji sam nanio 5 μL biljega molekulske masa. Sve sam prekrpio s otopinom agaroze [0,5% (w/v) agaroz, 0,1% (v/v) BFB, 1 \times elektrodni pufer] kako bih osigurao dobro prijanjanje imobilina na SDS-gela bez mjehurića zraka koji bi mogli spriječiti prijenos proteina iz imobilina u gel te kako bih pratio tijek elektroforeze pomoću boje BFB koja putuje kroz gel jednakom brzinom kao i proteini najmanje molekulske mase. Elektroforezu sam proveo uz korištenje 10 \times razrijeđenog elektrodnog pufera za SDS-PAG elektroforezu u sustavu *PROTEAN II xi Cell* (Bio-Rad, SAD)

prvih 30 minuta na 100 V, te ostatak vremena na 220 V, dok plava boja nije došla do donjeg ruba gela. Cijeli sustav za elektroforezu je još dodatno bio povezan na sustav za dovod vode kako bi održavao konstantnu temperaturu tijekom cijele elektroforeze.

Tablica 5. Sastav otopina za pripremu 12% gelova za drugu dimenziju 2-DE.

sastav	volumen
ultra-čista H ₂ O	21 mL
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	15 mL
30% AA/Bis	24 mL
	vakuum
10% SDS	600 μL
10% APS	300 μL
TEMED	25 μL

3.8.4 Analiza 2-D gelova

Nakon provedene 2. dimenzije 2-DE, gelove sam obojao bojom CBB R-250 prema protokolu opisanom u Balen i sur. (2011) kako bih vizualizirao proteinske mrlje. Gelove sam prvo inkubirao 60 minuta u otopini za bojanje [0,1% (w/v) CBB R-250, 45% (v/v) etanol, 10% (v/v) ledena octena kiselina] na RT na tresilici. Potom, kako bih uklonio boju iz dijelova gela koji nisu sadržavali proteine, gelove sam inkubirao 60 minuta u otopini za uklanjanje boje [10% (v/v) octena kiselina i 20% (v/v) metanol] na tresilici na RT te preko noći na +4 °C uz redovitu zamjenu navedene otopine. Kada su se gelovi očistili, a proteinske mrlje bile jasno vidljive, gelove sam prenio u 10%-tnu (v/v) otopinu octene kiseline te pohranio na +4 °C.

Obojane gelove sam zatim skenirao pomoću skenera *Epson Perfection V700 Photo* (Nagano, Japan). U cilju identifikacije onih proteina koji su kvalitativno ili kvantitativno promijenjeni u odnosu na kontrolu, gelove sam analizirao programom ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare, SAD), koji izražava količinu proteina u pojedinačnim proteinskim mrljama u obliku volumnog postotka. Istim programom sam usporedio volumne postotke količine proteina između kontrole i tretmana u proteinskim mrljama na jednakim pozicijama na gelovima. Za daljnju analizu odabrao sam one proteinske mrlje koje su pokazivale razliku u ekspresiji koja je bila barem 1,5 × veća ili manja u odnosu na kontrolu.

3.9 Analiza proteina spektrometrijom masa

3.9.1 Priprema uzoraka i digestija u gelu

Za daljnju analizu, odabrane proteinske mrlje sam izolirao iz 2-D gela koristeći odrezani nastavak za pipetu te ih inkubirao do obezbojenja u epruvetama od 1,5 mL u otopini za odbojavanje [10% (v/v) octena kiselina i 40% (v/v) metanol] na termobloku na RT i miješanju od 550 rpm.

U cilju potpunog čišćenja gelova od ostataka detergenta SDS i boje CBB, komadiće gelova isprao sam 3 × po 30 minuta u otopini 5 mM amonijeva bikarbonata (NH_4HCO_3 ; eng. *ammonium bicarbonate*, ABC) i 50% (v/v) acetonitrila (CH_3CN ; ACN, Merck, Njemačka) na termobloku na RT i miješanju od 900 rpm. Gelove sam potom dehidrirao 20-minutnom inkubacijom u 100%-tnom ACN na RT i 900 rpm, nakon čega sam ih inkubirao 45 minuta u otopini 10 mM DTT u 20 mM ABC na 56 °C i 900 rpm kako bi reducirao disulfidne veze. Za alkilaciju cisteinskih ostataka, komadiće gelova sam inkubirao 30 minuta u mraku u otopini 55 mM IAA u 20 mM ABC na RT i 900 rpm. Tako pripremljene gelove sam zatim isprao 2 × po 20 minuta u otopini koja je sadržavala 5 mM ABC i 50% (v/v) ACN na RT i 900 rpm. Nakon ispiranja, gelove sam ponovno dehidrirao u 100%-tnom ACN kako je prethodno opisano. Nakon dehidracije, gelove sam osušio u vakuum centrifugi (Concentrator plus, Eppendorf, Thermo Scientific, SAD) na 30 °C. Na osušene gelove dodao sam 50 μL tripsina kojeg sam pripremio u 20 mM ABC puferu. Gelovi su se inkubirali u otopini tripsina preko noći na 37 °C i 600 rpm u cilju digestije proteina u gelu.

3.9.2 Izolacija i pročišćavanje peptida

Nakon digestije proteina tripsinom, supernatant iznad gela prebacio sam u čistu epruvetu te gel inkubirao 2 × po 30 minuta u 50 μL otopine za ekstrakciju [50% (v/v) ACN, 1% (v/v) trifluoroctena kiseline (eng. *trifluoroacetic acid*, TFA)] na RT i 900 rpm. Nakon svake inkubacije, dobiveni supernatant sam spojio sa supernatanom dobivenim nakon prekonoćne digestije. Gel sam potom inkubirao 30 minuta na RT i 900 rpm u 50 μL otopine 80% (v/v) ACN i 1% (v/v) TFA te supernatant spojio s prethodnima. Tako skupljene supernatante sam upario u vakuum centrifugi na 30 °C kako bih uklonio ACN i smanjio konačni volumen do približno 50 μL .

Za pročišćavanje dobivenih peptida primijenio sam metodu tekućinske kromatografije obrnutih faza pomoću kolone μSPE sa stacionarnom fazom C18 (Waters, SAD) uz korištenje uređaja PosiTip (Bene Lab, Hrvatska). Prvo sam kroz kolonu C18 μSPE propustio 100 μL metanola za

aktiviranje kolone, a zatim sam za ekvilibraciju kroz kolonu propustio 100 μL otopine A [2% (v/v) ACN, 1% (v/v) mravlja kiselina (eng. *formic acid*, FA)]. Nakon aktivacije i ekvilibracije, na kolonu sam nanio 40 μL otopine peptida uz protok brzine 10 $\mu\text{L min}^{-1}$ kako bi peptidi zaostali na koloni. Kroz kolonu sam zatim propustio 100 μL vodene otopine B [0,1% (v/v) FA] za pročišćavanje peptida od soli. Peptide sam potom eluirao u 25 μL otopine C [0,1% (v/v) FA u 80% (v/v) ACN], upario u čistoj epruveti od 1,5 mL pomoću vakuum centrifuge te pohranio na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize.

3.9.3 Analiza peptida na spektrometru masa

Prije snimanja, pročišćene i ukoncentrirane peptide otopio sam u 10 μL 0,1% (v/v) FA te prebacio u staklenu vijalu sa staklenim umetkom za snimanje. Za svaku analizu, na analitičku kolonu je injektirano 8 μL uzorka, a uzorci su snimani u *Auto MS/MS* načinu rada uz pozitivnu ionizaciju elektroraspršenjem. Uzorke sam analizirao koristeći spektrometar masa 6545 *Q-TOF* opremljen s izvorom elektroraspršenja *Jet Stream* (Agilent Technologies, SAD) spregnut s uređajem za tekućinsku kromatografiju ultra visoke učinkovitosti (eng. *ultra high performance liquid chromatography*, UHPLC) *Agilent 1290 Infinity II* (Agilent Technologies, SAD) uz određene parametre za analizu HPLC (Tablica 6) i MS (Tablica 7). Peptide sam razdvojio korištenjem analitičke kolone *AdvanceBio Peptide Map* (Agilent Technologies, SAD) s dimenzijama $1,0 \times 150\text{ mm}$ i veličinom čestica od $2,7\text{ }\mu\text{m}$.

Analizu dobivenih podataka odradio sam u program *ProteinPilot 4.5* (AB Sciex, Njemačka), gdje sam kao pozitivni rezultat identifikacije proteina iz proteinskih mrlji uzimao analize s razinom pouzdanosti preko 95%. Identificirane proteine sam potom okarakterizirao pretraživanjem baza podataka *UniProt* i korištenjem alata *ProtParam* (Expasy, Švicarska).

Tablica 6. Parametri analize peptida tekućinskom kromatografijom ultra visoke učinkovitosti (UHPLC).

Analitička kolona	<i>Agilent AdvanceBio Peptide Map</i> , 1,0 × 150 mm	
Temperatura kolone	60 °C	
Temperatura autouzorkivača	10 °C	
Protok	0,1 mL min ⁻¹	
Volumen injektiranja	8 µL	
Mobilna faza A	0,1% FA / H ₂ O	
Mobilna faza B	0,1% FA / 95% ACN	
Gradijent	Vrijeme	% B
	0	3
	10	40
	14	90
	16	90
	18	3
	21	3

Tablica 7. Parametri analize peptida spektrometrijom masa (MS).

Način ionizacije	ESI uz pozitivnu ionizaciju
Temperatura plina (N ₂)	325 °C
Protok plina	13 L min ⁻¹
Nebulizator	35 psi
Temperatura plinskog omotača	275 °C
Protok plinskog omotača	12 L min ⁻¹
Napon na kapilari	4000 V
Napon mlaznice	0 V
Napon fragmentora	175 V
Napon skimmera	65 V
Octopole RF V _{pp}	750 V
MS područje snimanja (m/z)	100 - 2000
MS brzina snimanja (spektri/s)	3
Auto MS/MS područje snimanja (m/z)	100 - 2000
MS/MS brzina snimanja (spektri/s)	2
Širina izolacija	Srednja (~4 amu)
Maksimalni broj prekursora po ciklusu	10
Sortiranje prekursora	Prvo po naboju, nakon toga po intenzitetu
Kolizijska energija	3,1 × (m/z)/100+1 za naboj 2 ⁺ 3,6 × (m/z)/100-4,8 za naboj 3 ⁺
Prag za MS/MS (apsolutni broj)	3000
Prag za MS/MS (rel.) (%)	0,001
Dinamičko isključivanje	Snimanje 2 spektra, te isključivanje na period od 0,05 min
MS/MS akumulacijski vremenski okvir	25000 „counts“ po spektru
Referentni ioni tijekom analize	m/z 121,050873 (purine) m/z 922,009798 (HP-921)

3.10 Statistička i grafička obrada rezultata

Statističku analizu rezultata ICP-MS mjerenja, mjerenja količine otopljenog i partikularnog organskog ugljika, fluorimetrijskih i spektrofotometrijskih mjerenja, komet testa, stope fotosinteze te parametara fluorescencije klorofila *a* proveo sam jednosmjernom analizom varijance (eng. *analysis of variance*, ANOVA) praćenom Newman-Keuls post hoc testom pomoću programskog paketa STATISTICA 14.0.0.15 (TIBCO Software, SAD). Razlike između srednjih vrijednosti smatrane su statistički značajnim pri $p \leq 0,05$. Za grafičku obradu i prikaz rezultata koristio sam programski paket Microsoft Office Professional Plus 2019 (Microsoft, SAD).

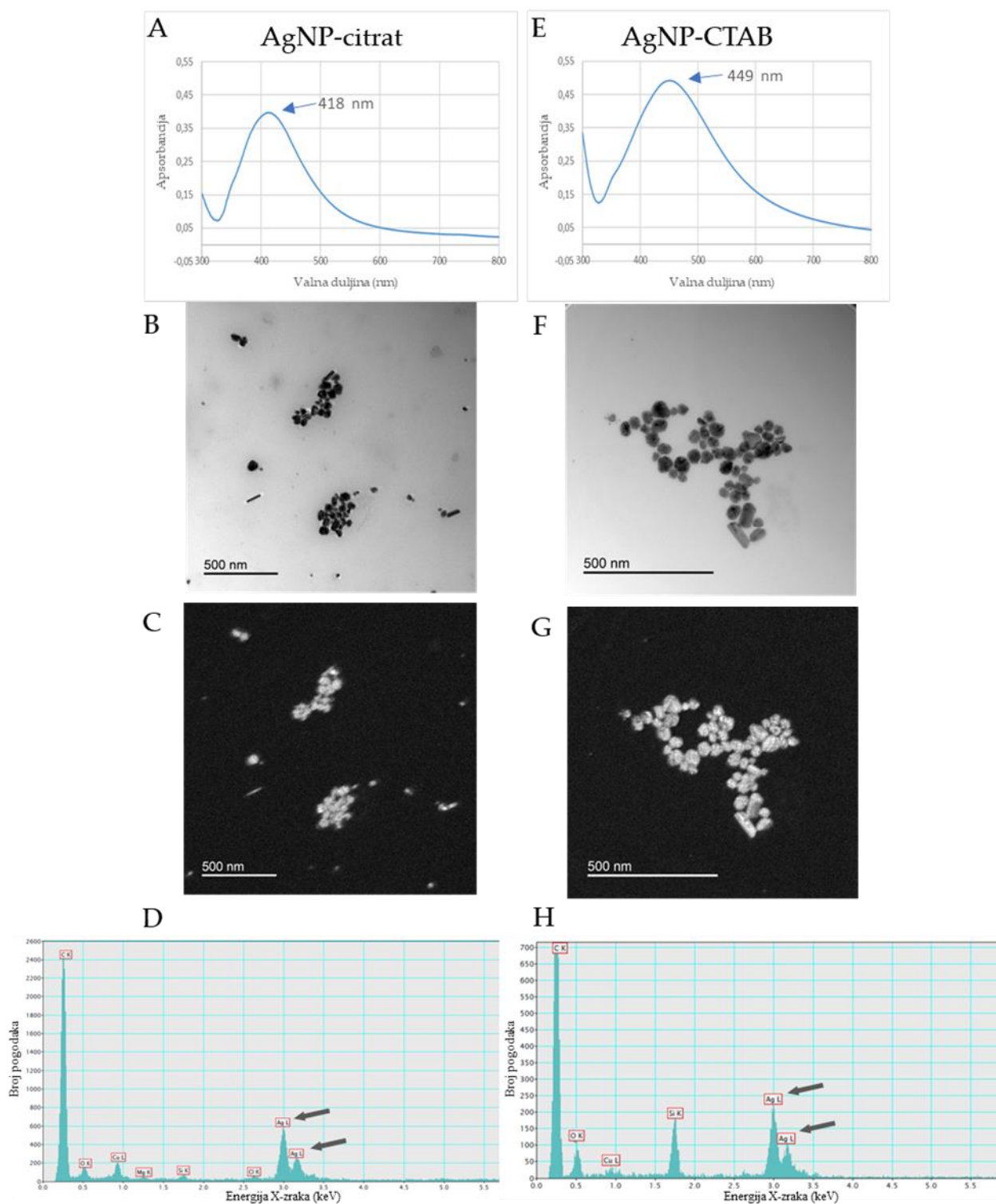
REZULTATI

4. REZULTATI

4.1 Karakteristike nanočestica

4.1.1 Nanočestice srebra

Analiza rezonancije površinskih plazmona suspenzije AgNP-citrat pokazala je maksimum apsorbanције na valnoj duljini od 418 nm, što ukazuje na promjer čestica od 47 nm te potvrđuje uspješnost sinteze, dok relativno uzak spektar upućuje na malu distribuciju veličina čestica u suspenziji (Slika 9.A). Maksimum apsorbanције suspenzije AgNP-CTAB izmjerio sam na valnoj duljini od 449 nm, što ukazuje na promjer čestica od 72 nm te potvrđuje uspješnost sinteze. Širina spektra ukazuje na veću distribuciju promjera nanočestica unutar suspenzije u usporedbi s česticama AgNP-citrat (Slika 9.E). Mikrofotografije dobivene elektronskim mikroskopom pokazale su da suspenzije oba tipa AgNP sadrže većinom čestice sferičnog oblika i manji udio štapićastih oblika, a promjer sferičnih čestica iznosi od 40-60 nm za AgNP-citrat (Slika 9.B), odnosno od 50-90 nm za AgNP-CTAB (Slika 9.F). EDX analiza potvrdila je da su AgNP-citrat i AgNP-CTAB sadržavale srebro (Slika 9.C, D, G, H; Prilog 2), dok je analiza DLS pokazala da je d_H čestica AgNP-citrat bio 41,4 nm, a čestica AgNP-CTAB 82,8 nm (Tablica 8). ζ potencijal suspenzije AgNP-citrat iznosio je -40,50 mV, a suspenzije AgNP-CTAB 51,34 mV. Koncentracija srebra u matičnoj suspenziji AgNP-citrat bila je 112,2 mg L⁻¹, dok je u matičnoj suspenziji AgNP-CTAB iznosila 94,6 mg L⁻¹. U obje suspenzije AgNP nalazilo se 0,5% iona Ag⁺.



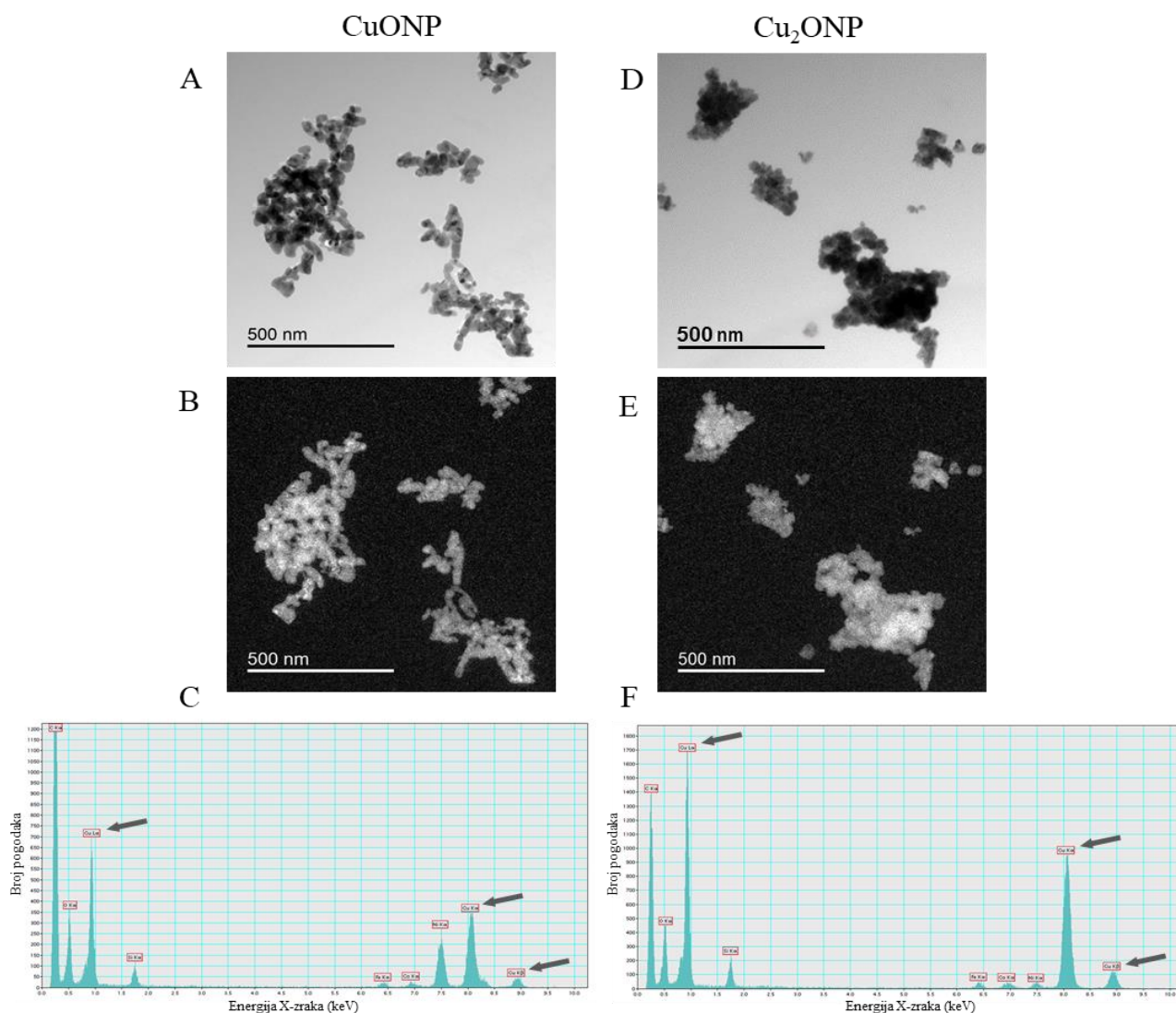
Slika 9. UV/Vis apsorpcijski spektri gdje strelice pokazuju na maksimum apsorbanije (A i E) i mikrofotografije čestica AgNP-citrat (B-D) i AgNP-CTAB (F-H) u matičnim suspenzijama dobivene transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM). Slike B i F – svijetlo vidno polje; C i G – mapa elementa srebra; D i H – spektar energijski razlučujuće/disperzivne rendgenske spektroskopije (EDX), gdje strelice pokazuju signal karakterističnih X-zraka srebra. Za svaku matičnu suspenziju analizirane su četiri replike (n = 4). Mjerilo prikazuje 500 nm.

Tablica 8. Fizikalno-kemijske karakteristike AgNP-citrat i AgNP-CTAB u matičnim suspenzijama: hidrodinamički promjer (d_H) određen iz distribucije veličine po volumenu, vrijednost ζ potencijala, koncentracija srebra i postotak ionskog srebra (Ag^+).

Karakteristike	AgNP-citrat	AgNP-CTAB
d_H , nm	$41,4 \pm 0,9$	$82,8 \pm 1,1$
ζ potencijal, mV	$-40,50 \pm 3,21$	$51,34 \pm 2,05$
Koncentracija srebra, mg L ⁻¹	112,2	94,6
Ag ⁺ , %	0,5	0,5

4.1.2 Nanočestice bakra

Mikrofotografije dobivene elektronskim mikroskopom pokazale su da su CuONP i Cu₂ONP u suspenziji bile prisutne ili u aglomeratima ili pojedinačno u sferičnom obliku s promjerom od 30-80 nm za CuONP (Slika 10.A, B) te od 30-60 nm za Cu₂ONP (Slika 10.D, E). EDX analiza potvrdila je da su oba tipa čestica sadržavale bakar (Slika 10.C, F; Prilog 3). DLS analizom izmjeren je d_H od 664,9 nm u suspenziji CuONP te od 432,0 nm u suspenziji Cu₂ONP (Tablica 9). ζ potencijal suspenzije CuONP iznosio je 7,04 mV, dok je za Cu₂ONP izmjerena manja vrijednost od -25,16 mV.



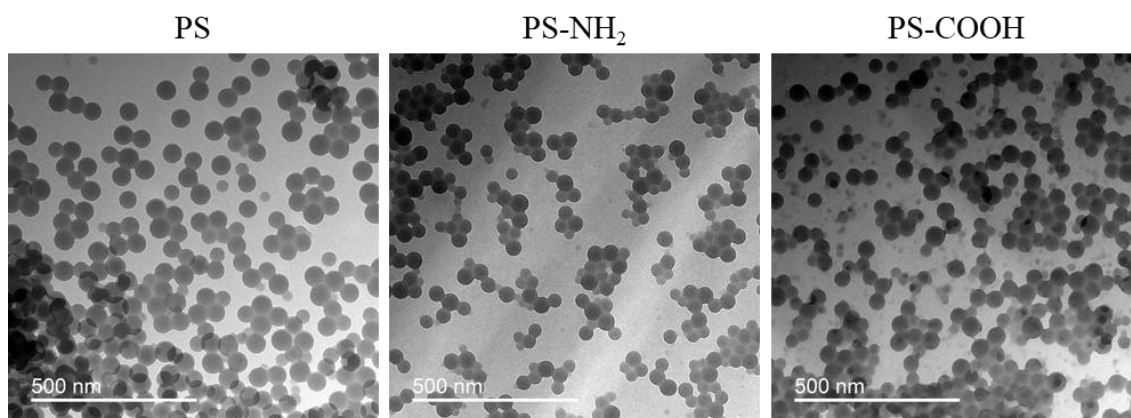
Slika 10. Mikrofotografije CuONP (A-C) i Cu₂ONP (D-F) u matičnim suspenzijama dobivene transmisivskim elektronskim mikroskopom (TEM). Slike A i D – svijetlo vidno polje; B i F – mapa elementa bakra; C i F – spektar energijski razlučujuće/disperzivne rendgenske spektroskopije (EDX). Za svaku matičnu suspenziju analizirane su četiri replike (n = 4). Strelice pokazuju signal karakterističnih X-zraka bakra. Mjerilo prikazuje 500 nm.

Tablica 9. Fizikalno-kemijske karakteristike CuONP i Cu₂ONP u matičnim suspenzijama: hidrodinamički promjer (d_H) određen iz distribucije veličine po volumenu, vrijednost ζ potencijala i koncentracija bakra.

Karakteristike	CuONP	Cu ₂ ONP
d_H , nm	664,9 ± 14,2	432 ± 3,9
ζ potencijal, mV	7,04 ± 0,53	-25,16 ± 3,72
Koncentracija bakra, mg L ⁻¹	1000	1000

4.1.3 Nanočestice polistirena

TEM analiza matičnih suspenzija PS-NP, PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP pokazala je nanočestice vrlo pravilnog sferičnog oblika (Slika 11). Promjer čestica PS-NP iznosio je 49-62 nm, čestica PS-NH₂-NP 40-52 nm, dok je za čestice PS-COOH-NP izmjerena vrijednost iznosila 45-55 nm. DLS analiza pokazala je d_H od 73,8 nm za PS-NP, 62,1 nm za PS-NH₂-NP, dok je za PS-COOH-NP izmjerena vrijednost od 63,2 nm (Tablica 10). ζ potencijal iznosio je 13,16 mV za suspenziju PS-NP, 11,83 mV za PS-NH₂-NP te 12,27 mV za suspenziju PS-COOH-NP.



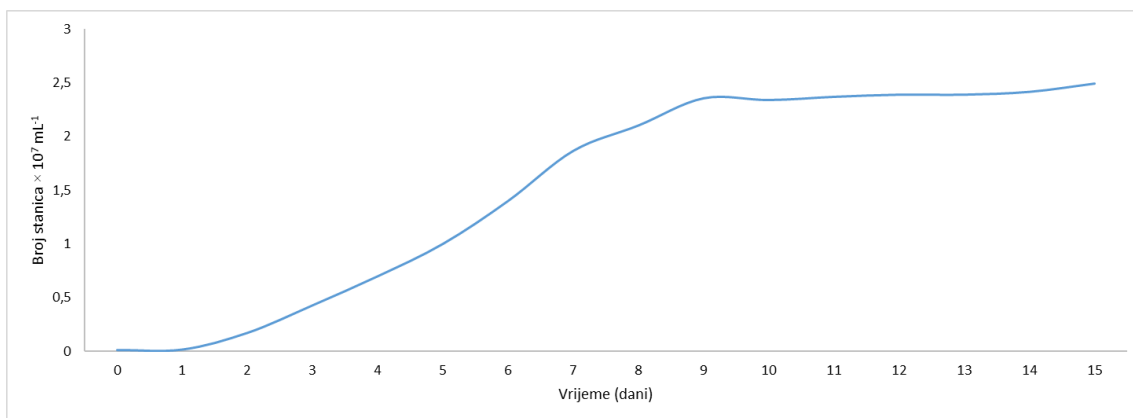
Slika 11. Mikrofotografije svijetlog vidnog polja PS-NP, PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP u matičnim suspenzijama dobivene transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM). Za svaku matičnu suspenziju analizirane su četiri replike ($n = 4$). Mjerilo prikazuje 500 nm.

Tablica 10. Fizikalno-kemijske karakteristike PS-NP, PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP u matičnim suspenzijama: hidrodinamički promjer (d_H) u nm određen iz distribucije veličine po volumenu, vrijednost ζ potencijala u mV i koncentracija polistirena u mg L⁻¹.

Karakteristike	PS-NP	PS-NH ₂ -NP	PS-COOH-NP
d_H , nm	73,8 ± 0,9	62,1 ± 0,9	63,2 ± 0,8
ζ potencijal, mV	13,16 ± 0,07	11,83 ± 0,03	12,27 ± 0,03
Koncentracija polistirena, mg L ⁻¹	27000	10000	27000

4.2 Određivanje eksponencijalne faze rasta

Eksponencijalni rast stanica algi počinje drugog i završava 9. dana, nakon čega alge ulaze u stacionarnu fazu rasta (Slika 12). Nakon inokulacije stanica u podlogu BBM (0. dan), stanice su dosegle koncentraciju od otprilike 1×10^6 stanica mL⁻¹ (4. dan) kada je započelo i izlaganje kulture stanica nanočesticama srebra, bakra i polistirena te AgNO₃ i CuSO₄ u trajanju od 72 h.

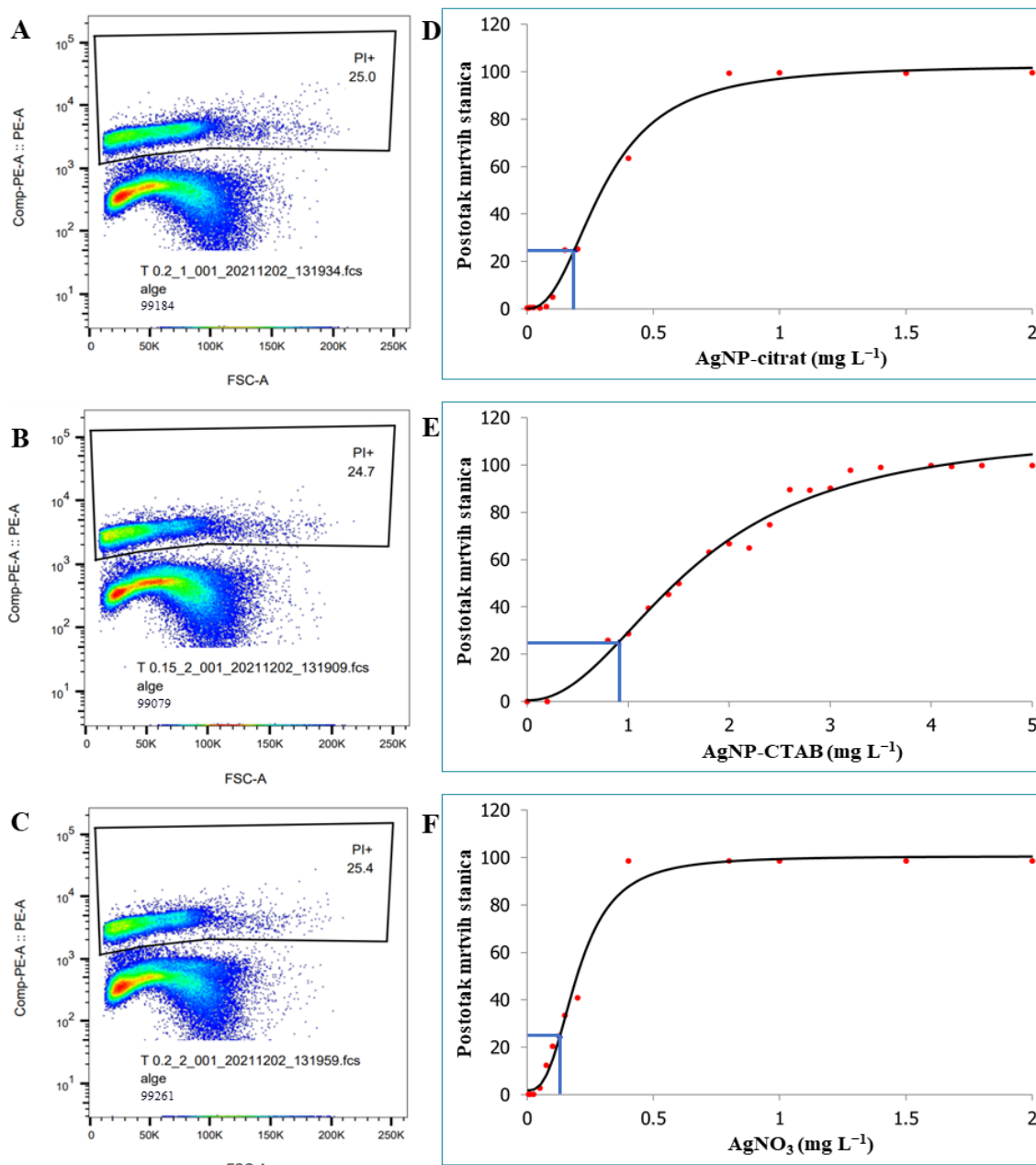


Slika 12. Krivulja rasta alge *C. vulgaris* u podlozi BBM praćena brojanjem stanica u periodu od 15 dana. Koncentracija stanica za svaki dan predstavlja srednju vrijednost koncentracije stanica dobivenih od 6 replika kulture stanica.

4.3 Određivanje EC₂₅ vrijednosti

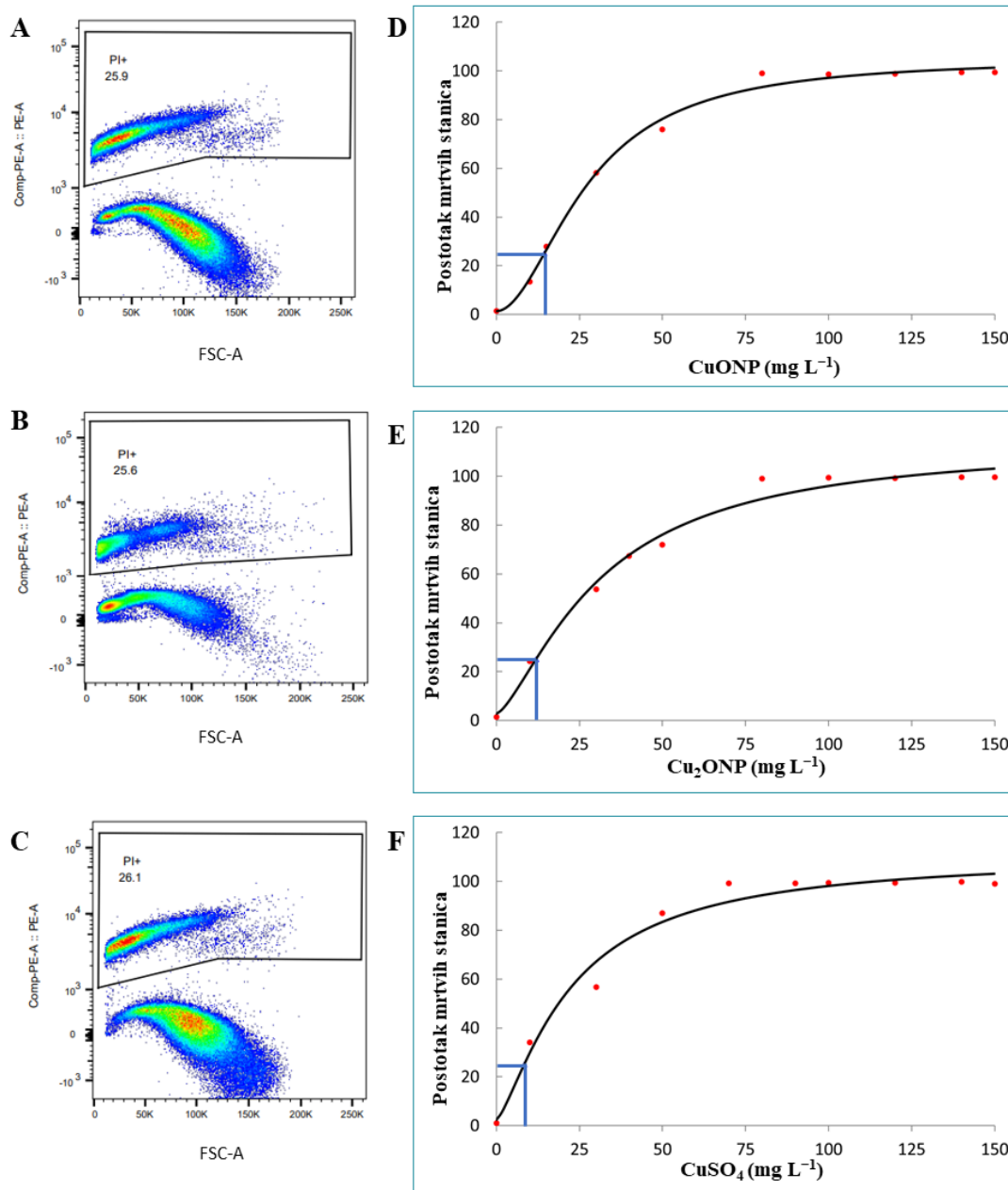
Metodom protočne citometrije uz primjenu fluorescentne boje PI napravljene su krivulje vijabilnosti stanica u ovisnosti o koncentraciji pojedinih tretmana srebra i bakra (Slika 13 i 14).

Za AgNP, EC₂₅ vrijednosti iznosile su 0,188 mg L⁻¹ za tretman s AgNP-citrat (Slika 13.A, D), odnosno 0,895 mg L⁻¹ za tretman s AgNP-CTAB (Slika 13.B, E), iz čega je jasno vidljivo da AgNP-citrat izazivaju smrt stanica pri nižim koncentracijama nego AgNP-CTAB. Izlaganje AgNO₃ rezultirao je najbržom smrću stanica od svih ispitanih tretmana srebrom, a izračunata EC₂₅ vrijednost iznosila je 0,130 mg L⁻¹ (Slika 13.C, F).



Slika 13. Analiza vijabilnosti stanica algi *C. vulgaris* nakon 72 h izlaganja rastućim koncentracijama AgNP-citrat, AgNP-CTAB i AgNO₃ u podlozi BBM. Postotak vijabilnih stanica je utvrđen protočnom citometrijom uz primjenu fluorescentne boje propidij jodid (PI). Slike protočne citometrije dobivene su za svaku primijenjenu koncentraciju tretmana te su prikazane one koje prikazuju približno 25% mrtvih stanica (A–C). Primjenom modela logističke regresije četiri parametra (4PL), koji je korišten za izradu krivulje vijabilnosti algi nakon primijenjenih tretmana, određene su i koncentracije AgNP-citrat, AgNP-CTAB i AgNO₃ koje dovode do EC₂₅ vrijednosti (D–F), koje su korištene u svim eksperimentima. Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti dva različita eksperimenta, svaki s tri ponavljanja (n = 6). Plava linija označava EC₂₅ vrijednost.

Nakon izlaganja nanočesticama bakra, EC_{25} vrijednosti iznosile su $14,45 \text{ mg L}^{-1}$ za tretman s CuONP (Slika 14.A, D), odnosno $11,89 \text{ mg L}^{-1}$ za tretman s Cu_2ONP (Slika 14.B, E), iz čega je jasno vidljivo da Cu_2ONP izazivaju bržu smrt stanica nego CuONP. Izlaganje CuSO_4 rezultirao je najbržom smrću stanica od svih ispitanih tretmana bakrom, a izračunata EC_{25} vrijednost iznosila je $8,36 \text{ mg L}^{-1}$ (Slika 14.C, F).



Slika 14. Analiza vijabilnosti stanica algi *C. vulgaris* nakon 72 h izlaganja rastućim koncentracijama CuONP, Cu₂ONP i CuSO₄ u podlozi BBM. Postotak vijabilnih stanica je utvrđen protočnom citometrijom uz primjenu fluorescentne boje propidij jodidom (PI). Slike protočne citometrije dobivene su za svaku primijenjenu koncentraciju tretmana te su prikazane one koje prikazuju približno 25% mrtvih stanica (A–C). Primjenom modela logističke regresije četiri parametra (4PL), koji je korišten za izradu krivulje vijabilnosti algi nakon primijenjenih tretmana, određene su i koncentracije CuONP, Cu₂ONP i CuSO₄ koje dovode do EC₂₅ vrijednosti (D–F), koje su korištene u svim eksperimentima. Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti dva različita eksperimenta, svaki s tri ponavljanja (n = 6). Plava linija označava EC₂₅ vrijednost.

4.4 Stabilnost nanočestica u podlozi BBM

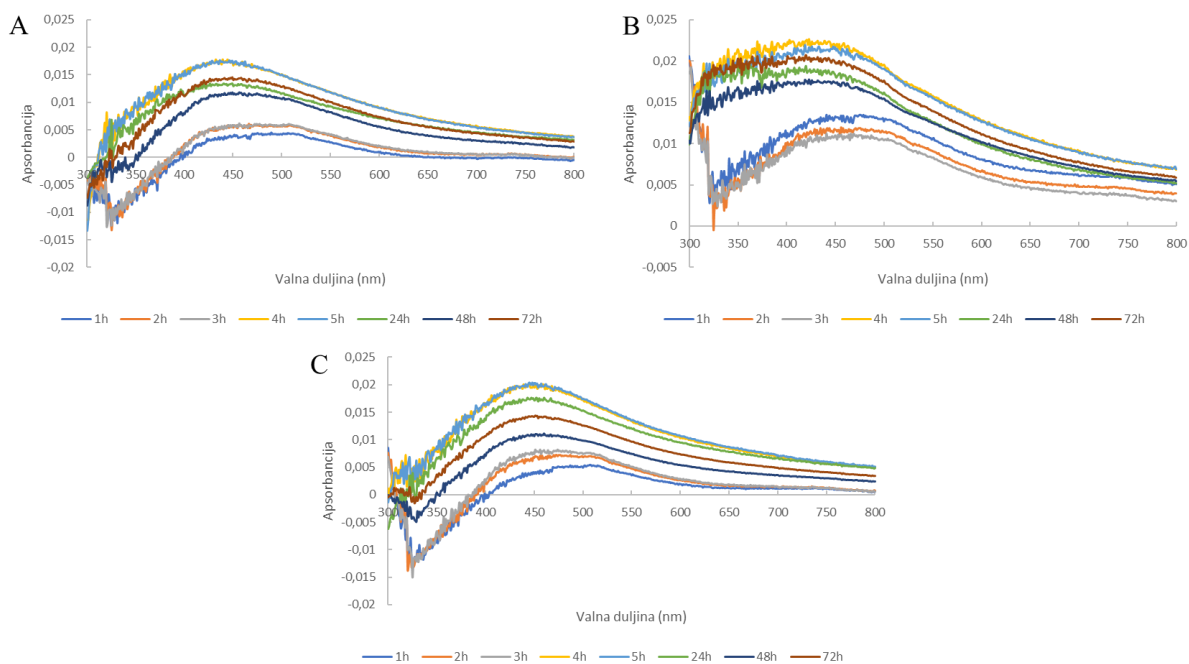
4.4.1 Nanočestice i ioni srebra

Stabilnost AgNP s različitim omotačima (AgNP-citrat i AgNP-CTAB) i AgNO₃ u koncentracijama koje uzrokuju preživljenje 75% stanica algi u podlozi BBM analizirao sam UV/Vis spektroskopijom (Slika 15). Oba tipa AgNP pokazala su brzu aglomeraciju nakon kontakta s hranjivom podlogom.

Dodatak AgNP-citrat u podlogu BBM izazvao je pomak maksimuma apsorbanije prema većim valnim duljinama (s 411 nm na 467 nm) unutar samo jednog sata, što sugerira početnu aglomeraciju nanočestica (Slika 15.A). Nakon trećeg sata primijećen je lagani pomak prema kraćim valnim duljinama (s 469 nm na 435 nm), što ukazuje na smanjenje promjera nanočestica, nakon čega položaj maksimuma apsorbanije ostaje relativno stabilan do 72 sata. Intenzitet maksimuma apsorbanije povećavao se do petog sata, nakon čega se smanjivao do 24. sata te zatim stabilizirao do kraja mjerenja. Navedena promjena u amplitudi upućuje na početnu redukciju iona Ag⁺ u elementarno srebro do petog sata, nakon čega je uslijedila disocijacija iona Ag⁺.

Čestice AgNP-CTAB pokazale su značajan pomak u maksimumu apsorbanije prema većim valnim duljinama (s 446 nm na 473 nm) nakon dodavanja u podlogu BBM, što označava početnu aglomeraciju (Slika 15.B). Nakon trećeg sata primijećen je lagani pomak prema kraćim valnim duljinama (s 467 nm na 426 nm), što ukazuje na smanjenje promjera AgNP-CTAB, nakon čega je položaj maksimuma apsorbanije ostao relativno konstantan do 72. sata. Intenzitet maksimuma apsorbanije ostao je stabilan do trećeg sata, nakon čega je uslijedio nagli porast, što upućuje na redukciju iona Ag⁺ i stvaranje AgNP do trećeg sata, nakon čega slijedi relativna stabilizacija.

Nakon dodatka AgNO₃ u podlogu BBM, zabilježeno je brzo stvaranje AgNP unutar prvog sata, što je vidljivo iz pojave karakterističnog SPR maksimuma apsorbanije na 485 nm (Slika 15.C). Nakon dva sata, maksimum apsorbanije se pomaknuo prema manjim valnim duljinama (457 nm), što upućuje na smanjenje promjera novonastalih AgNP, nakon čega nije bilo značajnih pomaka. Intenzitet maksimuma apsorbanije postupno se povećavao do četvrtog sata, potom smanjivao do 48. sata, nakon čega se stabilizirao do kraja mjerenja. Navedeni rezultat ukazuje na snažne interakcije između iona Ag⁺ oslobođenih iz AgNO₃ i drugih iona iz hranjive podloge, što posljedično dovodi do sinteze i disocijacije AgNP.



Slika 15. UV/Vis apsorpcijski spektri AgNP-citrat ($0,188 \text{ mg L}^{-1}$) (A), AgNP-CTAB ($0,895 \text{ mg L}^{-1}$) (B) i AgNO_3 ($0,130 \text{ mg L}^{-1}$) (C) nakon dodavanja u podlogu BBM snimljeni tijekom 72 sata.

DLS analize pokazale su trenutnu aglomeraciju oba tipa AgNP u podlozi BBM, što je rezultiralo povećanjem promjera čestica na 109 nm za AgNP-citrat, odnosno 106 nm za AgNP-CTAB (Tablica 11). Veličina AgNP-citrat je ostala stabilna do 24. sata, nakon čega se promjer postupno smanjivao na 61 nm do 72. sata. S druge strane, AgNP-CTAB aglomerati ostali su približno jednake veličine do 72. sata. Rezultati dobiveni DLS analizom otopine AgNO_3 podudaraju se s rezultatima UV/Vis spektroskopije i ukazuju na sintezu AgNP, čija se veličina smanjila s početnih 174 nm na 94 nm nakon 24 sata, nakon čega se dodatno smanjila na 84 nm nakon 72 sata.

Analiza ζ potencijala je pokazala da je promjena naboja AgNP bila ovisna o primijenjenom omotaču (Tablica 11). Dodatak AgNP-citrat u podlogu BBM, naboj na površini čestica ostao je negativan do 48. sata, nakon čega naboj postaje pozitivan. Suprotno tome, nakon dodatka AgNP-CTAB u podlogu, naboj čestica u suspenziji je ostao negativan do kraja mjerenja. AgNP nastale kao rezultat interakcije AgNO_3 i podloge BBM pokazivale su negativan neto naboj na površini do 48. sata, nakon čega je ukupni naboj čestica u suspenziji postao neutralan.

Tablica 11. Promjena hidrodinamičkog promjera (d_H) i zeta (ζ) potencijala AgNP-citrat ($0,188 \text{ mg L}^{-1}$), AgNP-CTAB ($0,895 \text{ mg L}^{-1}$) i AgNO₃ ($0,130 \text{ mg L}^{-1}$) zabilježena nakon dodavanja u podlogu BBM tijekom 72 sata. Rezultati su prikazani kao distribucija veličine volumena i predstavljaju srednju vrijednost \pm standardna pogreška od 10 mjerenja. ζ potencijali izraženi su kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška od 5 mjerenja.

Vrijeme (h)	Podloga BBM s dodatkom AgNP-citrat		Podloga BBM s dodatkom AgNP-CTAB		Podloga BBM s dodatkom AgNO ₃	
	d_H (nm)	ζ potencijal (mV)	d_H (nm)	ζ potencijal (mV)	d_H (nm)	ζ potencijal (mV)
0	$109,0 \pm 3,5$	$-29,23 \pm 0,02$	$106,5 \pm 1,1$	$-24,11 \pm 3,70$	$174,7 \pm 6,4$	$-11,17 \pm 9,98$
1	$109,9 \pm 2,6$	$-0,29 \pm 0,06$	$115,6 \pm 1,9$	$-23,14 \pm 2,05$	$163,5 \pm 5,3$	$-10,35 \pm 14,56$
2	$114,9 \pm 2,8$	$-35,89 \pm 3,07$	$115,1 \pm 1,3$	$-20,40 \pm 1,87$	$161,3 \pm 6,7$	$-27,46 \pm 2,97$
3	$119,3 \pm 1,5$	$-35,76 \pm 4,20$	$114,7 \pm 1,1$	$-25,13 \pm 5,00$	$173,9 \pm 3,7$	$-31,26 \pm 2,74$
4	$113,4 \pm 0,7$	$-29,43 \pm 0,26$	$117,6 \pm 2,4$	$-33,78 \pm 4,25$	$161,9 \pm 1,8$	$-15,62 \pm 9,86$
5	$112,4 \pm 2,5$	$-33,16 \pm 7,18$	$118,0 \pm 1,6$	$-24,93 \pm 3,17$	$155,9 \pm 4,4$	$-7,42 \pm 12,88$
24	$68,0 \pm 0,7$	$-25,97 \pm 11,29$	$114,3 \pm 1,7$	$-26,10 \pm 2,20$	$94,9 \pm 2,8$	$-26,76 \pm 2,25$
48	$63,7 \pm 0,9$	$-17,04 \pm 9,32$	$114,3 \pm 1,4$	$-26,92 \pm 4,08$	$94,8 \pm 4,1$	$-34,78 \pm 3,58$
72	$61,77 \pm 1,8$	$21,37 \pm 5,42$	$131,5 \pm 9,8$	$-10,01 \pm 11,80$	$84,8 \pm 8,2$	$0,00 \pm 0,00$

4.4.2 Nanočestice i ioni bakra

Analiza d_H nanočestica bakra u koncentracijama koje uzrokuju preživljenje 75% stanica algi u podlozi BBM ukazala je na značajnu aglomeraciju u svim ispitanim tretmanima (Tablica 12). Za čestice CuONP primijećeno je da stvaraju aglomerate promjera od 414,4 nm, koji se do petog sata smanjio na vrijednost od 370,7 nm. Nakon 24 sata, aglomerati CuONP su se povećali na početnu vrijednost te se nakon 48 sati smanjili na konačni promjer od 241,7 nm, koji se nije značajno promijenio do kraja mjerenja. Mjerenje d_H čestica Cu₂ONP pokazalo je početnu aglomeraciju s promjerom aglomerata od 361,8 nm koji je nakon jednog sata narastao na 457,5

nm te se zatim do četvrtog sata smanjio na vrijednost od 346,2 nm. Nakon pet sati, promjer se povećao na 378,8 nm te se nakon 48 h smanjio na 305,0 nm i do kraja mjerenja rastao do konačnog promjera od 330,6 nm. Dodatkom CuSO_4 u podlogu BBM, nastali su aglomerati promjera od 249,6 nm čiji je promjer do petog sata narastao na vrijednost od 518,7 nm. Nakon 24 sata pa sve do kraja mjerenja promjer aglomerata bio je veći od 20000 nm, što ukazuje na stvaranje velikih kompleksa.

Analiza ζ potencijala pokazala je da su CuONP nakon dodavanja u podlogu BBM postale negativno nabijene, s izuzetkom četvrtog sata kada je izmjereni naboj bio pozitivan (Tablica 12). I Cu_2ONP pokazale su negativni neto naboj, koji se s početnih -54,43 mV do kraja mjerenja povećao na -5,53 mV. S druge strane, dodatak CuSO_4 u podlogu BBM je u početku rezultirao stvaranjem pozitivnog naboja od 22,67 mV nakon prvog sata, ali je već nakon drugog sata postao negativan (-23,16 mV) te ponovno pozitivan (21,73 mV) nakon trećeg sata. Poslije trećeg sata, ukupan naboj na površini čestica postao je neutralan i iznosio 0,94 mV da bi nakon petog sata postao negativan i takav ostao do kraja mjerenja s konačnom vrijednosti od -25,62 mV.

Tablica 12. Promjena hidrodinamičkog promjera (d_H) i zeta (ζ) potencijala CuONP ($14,45 \text{ mg L}^{-1}$), Cu₂ONP ($11,89 \text{ mg L}^{-1}$) i CuSO₄ ($8,36 \text{ mg L}^{-1}$) nakon dodavanja u podlogu BBM tijekom 72 sata. Rezultati su prikazani kao distribucija veličine volumena i predstavljaju srednju vrijednost \pm standardna pogreška od 10 mjerenja. ζ potencijali izraženi su kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška od 5 mjerenja.

Vrijeme (h)	Podloga BBM s dodatkom CuONP		Podloga BBM s dodatkom Cu ₂ ONP		Podloga BBM s dodatkom CuSO ₄	
	d_H (nm)	ζ potencijal (mV)	d_H (nm)	ζ potencijal (mV)	d_H (nm)	ζ potencijal (mV)
0	$414,4 \pm 5,5$	$-37,17 \pm 1,80$	$361,8 \pm 3,8$	$-54,43 \pm 0,89$	$249,6 \pm 5,7$	$22,67 \pm 0,02$
1	$400,5 \pm 14,1$	$-22,52 \pm 2,19$	$457,5 \pm 16,8$	$-37,24 \pm 2,54$	$267,7 \pm 6,3$	$-23,16 \pm 10,47$
2	$369,3 \pm 3,1$	$-28,99 \pm 5,17$	$389,2 \pm 18,4$	$-29,44 \pm 3,65$	$311,9 \pm 7,5$	$21,73 \pm 0,01$
3	$371,4 \pm 5,3$	$-34,50 \pm 3,28$	$353,2 \pm 8,2$	$-23,57 \pm 5,52$	$365,3 \pm 24,0$	$-3,63 \pm 11,25$
4	$369,5 \pm 5,4$	$17,23 \pm 0,01$	$346,2 \pm 13,8$	$-33,54 \pm 1,33$	$455,8 \pm 12,1$	$0,94 \pm 8,97$
5	$370,7 \pm 12,8$	$-37,91 \pm 3,63$	$378,8 \pm 14,8$	$-25,84 \pm 1,17$	$518,7 \pm 13,4$	$-26,51 \pm 5,80$
24	$415,4 \pm 19,3$	$-30,34 \pm 2,78$	$337,5 \pm 3,2$	$-26,43 \pm 3,44$	$35163,8 \pm 3608,6$	$-37,15 \pm 2,79$
48	$241,7 \pm 9,4$	$-20,33 \pm 1,58$	$305,0 \pm 14,1$	$-12,87 \pm 1,80$	$26730,5 \pm 8507,9$	$-35,3 \pm 3,94$
72	$261,7 \pm 4,2$	$-3,26 \pm 2,72$	$330,6 \pm 7,2$	$-5,53 \pm 3,18$	$53084,7 \pm 2705,8$	$-25,62 \pm 8,28$

4.4.3 Nanočestice polistirena

Nakon dodatka svih tipova nanočestica polistirena u podlogu BBM u konačnim koncentracijama od 40 mg L^{-1} , njihov d_H nije se značajnije mijenjao do kraja pokusa (Tablica 13). Izmjerene vrijednosti d_H na početku i na kraju pokusa bile su $70,6 \text{ nm}$ i $69,8 \text{ nm}$ za PS-NP, $50,0 \text{ nm}$ i $53,7 \text{ nm}$ za PS-NH₂-NP te $55,5 \text{ nm}$ i $55,4 \text{ nm}$ za PS-COOH-NP, što pokazuje da su stabilne u podlozi BBM.

S druge strane, analiza ζ potencijala (Tablica 13) pokazala je da dodatak PS-NP u podlogu BBM rezultira stvaranjem pozitivnog naboja tijekom prvih pet sati mjerenja, nakon čega naboj postaje negativan do 48. sata ($-36,14 \text{ mV}$) te ponovno pozitivan do kraja mjerenja ($25,08 \text{ mV}$). Dodatak

PS-NH₂-NP u podlogu BBM također je rezultirao stvaranjem pozitivnog neto naboja do 24. sata (17,63 mV), nakon čega je naboj postao negativan i takvim ostao do kraja mjerenja (-16,99 mV). Sličan rezultat dobiven je i s česticama PS-COOH-NP, gdje je ukupan naboj na površini čestica bio pozitivan do kraja prvog dana, s izuzetkom prvog sata kada je analizom ζ potencijala utvrđen naboj od -29,57 mV. Nakon 24 sata, naboj je ostao negativan do kraja pokusa s vrijednošću ζ potencijala od -22,61 mV.

Tablica 13. Promjena hidrodinamičkog promjera (d_H) i zeta (ζ) potencijala PS-NP, PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP konačnih koncentracija od 40 mg L⁻¹ nakon dodavanja u podlogu BBM tijekom 72 sata. Rezultati su prikazani kao distribucija veličine volumena i predstavljaju srednju vrijednost ± standardna pogreška od 10 mjerenja. ζ potencijali izraženi su kao srednja vrijednost ± standardna pogreška od 5 mjerenja.

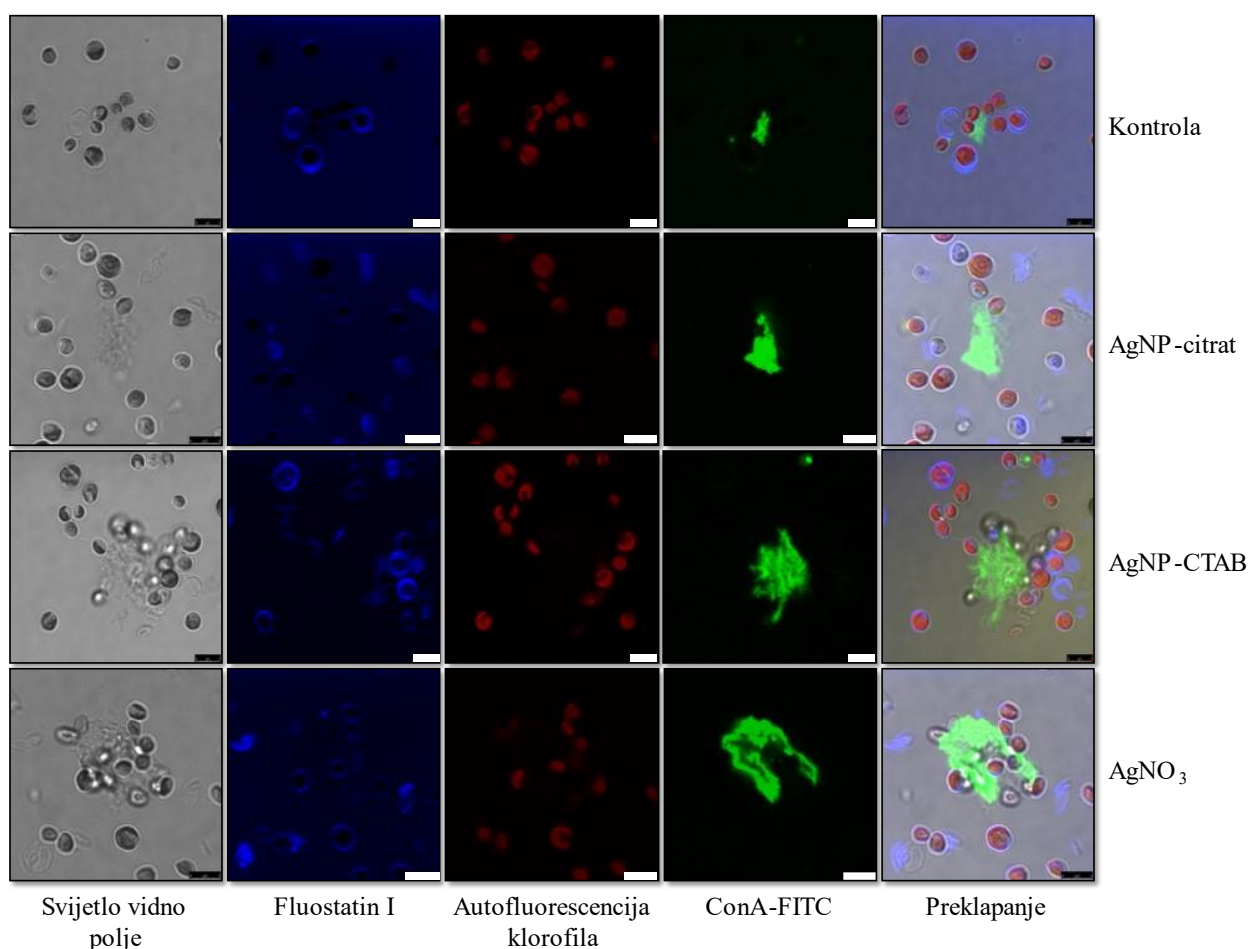
Vrijeme (h)	Podloga BBM s dodatkom PS-NP		Podloga BBM s dodatkom PS-NH ₂ -NP		Podloga BBM s dodatkom PS-COOH-NP	
	d_H (nm)	ζ potencijal (mV)	d_H (nm)	ζ potencijal (mV)	d_H (nm)	ζ potencijal (mV)
	0	70,6 ± 0,5	21,20 ± 0,62	50,0 ± 0,8	19,50 ± 0,01	55,5 ± 0,4
1	70,9 ± 0,6	18,66 ± 0,01	49,2 ± 0,4	19,96 ± 0,01	56,2 ± 0,3	-29,57 ± 3,26
2	71,7 ± 0,7	21,44 ± 0,04	48,8 ± 0,5	20,92 ± 0,49	57,3 ± 1,2	14,59 ± 0,43
3	71,2 ± 0,7	22,925 ± 0,01	47,6 ± 0,3	22,32 ± 0,65	56,6 ± 0,7	15,71 ± 0,01
4	69,7 ± 0,3	21,25 ± 0,62	49,0 ± 0,4	19,39 ± 0,48	56,9 ± 0,2	21,21 ± 0,52
5	70,8 ± 0,8	21,87 ± 0,88	48,8 ± 0,5	23,03 ± 0,03	56,5 ± 0,7	23,35 ± 0,02
24	70,6 ± 0,5	-36,14 ± 2,38	49,5 ± 0,6	17,63 ± 0,01	55,6 ± 0,6	22,87 ± 0,01
48	67,1 ± 0,9	-38,18 ± 4,56	48,0 ± 0,6	-24,23 ± 3,01	53,8 ± 0,5	-36,63 ± 0,90
72	69,8 ± 0,7	25,08 ± 0,02	53,7 ± 2,5	-16,99 ± 2,20	55,4 ± 0,5	-22,61 ± 7,29

4.5 Lokalizacija i akumulacija nanočestica u stanicama i morfološke promjene

4.5.1 Nanočestice i ioni srebra

Konfokalnom mikroskopijom vizualizirana je stanična stijenka, kloroplast i sloj EPS kontrolnih stanica alge *C. vulgaris* kao i stanica algi nakon izlaganja s oba tipa AgNP i AgNO₃ u koncentracijama koje uzrokuju preživljenje 75% stanica algi (Slika 16). Fluorescentnom bojom

Fluostatin I vizualizirane su stanične stijenke algi koje su u svim uzorcima bile dobro vidljive i jasno definirane. Nadalje, mjerenjem autofluorescencije jasno je uočen i jedan kloroplast u stanicama alge. Pomoću lektina ConA, koji se specifično veže na glukozu i manozu i koji je obilježen fluoroforom FITC, vizualiziran je sloj EPS oko kontrolnih stanica algi, ali i oko stanica algi nakon izlaganja svim tretmanima gdje se količina ovog sloja povećala u odnosu na kontrolu.



Slika 16. Slike kontrolnih stanica alge *C. vulgaris* i stanica alge nakon 72 sata izlaganja AgNP-citrat ($0,188 \text{ mg L}^{-1}$), AgNP-CTAB ($0,895 \text{ mg L}^{-1}$) i AgNO₃ ($0,130 \text{ mg L}^{-1}$). Stanice su snimljene konfokalnim mikroskopom u svjetlom vidnom polju; primjenom fluorescentne boje Fluostatin I označena je stanična stijenka (plavo); autofluorescencijom je označen kloroplast (crveno); lektinom ConA obilježenim s fluoresceinom (ConA-FITC) označen je sloj EPS (zeleno); dok zadnji stupac prikazuje rezultate preklapanja svih dobivenih slika. Mjerilo prikazuje $5 \mu\text{m}$.

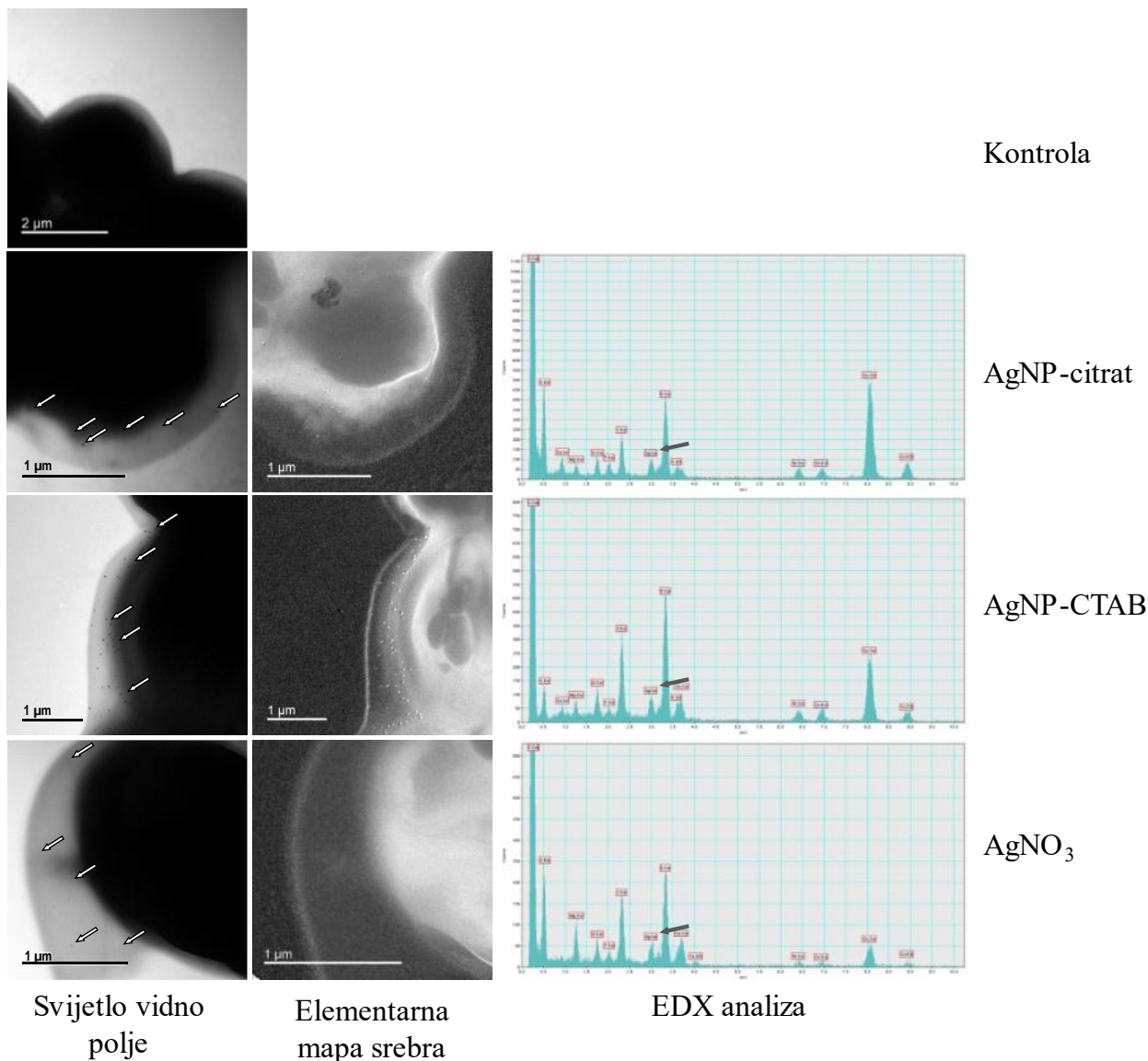
Količina sloja EPS vezanog uz stanice algi određena je iz vrijednosti POC, dok je količina topivog sloja EPS određena iz vrijednosti DOC nakon svih primijenjenih tretmana AgNP i AgNO₃. Rezultati upućuju da je nakon izlaganja svim tretmanima došlo do povećane sinteze

sloja EPS u odnosu na kontrolu (Tablica 14). Svi tretmani sa srebrom rezultirali su značajnim povećanjem vrijednosti DOC u odnosu na kontrolu, iako je najveća količina otopljenog ugljika (DOC) u hranjivoj podlozi izmjerena nakon tretman s AgNO₃, dok su vrijednosti DOC nakon izlaganja s oba tipa AgNP bile slične. S druge strane, niti jedan tretman nije izazvao značajno povećanje partikularnog ugljika (POC) u odnosu na kontrolu (Tablica 14, POC). Najveća vrijednost POC izmjerena je nakon izlaganja AgNO₃, dok su vrijednosti zabilježene nakon izlaganja s oba tipa AgNP bile nešto niže nego u kontroli, iako navedene promjene nisu bile statistički značajne. Ovi rezultati ukazuju na povećanu sintezu slobodnog sloja EPS otpuštenog u hranjivu podlogu u odnosu na sintezu sloja EPS vezanog za stanice, čija je količina bila podjednaka nakon izlaganja svim tretmanima.

Tablica 14. Otopljeni (DOC) i partikularni organski sadržaj ugljika (POC) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja AgNP-citrat (0,188 mg L⁻¹), AgNP-CTAB (0,895 mg L⁻¹) i AgNO₃ (0,130 mg L⁻¹). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna pogreška od tri biološke replike te izražene kao pg stanica⁻¹. Tretmani koji se značajno razlikuju pri $p \leq 0,05$ (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

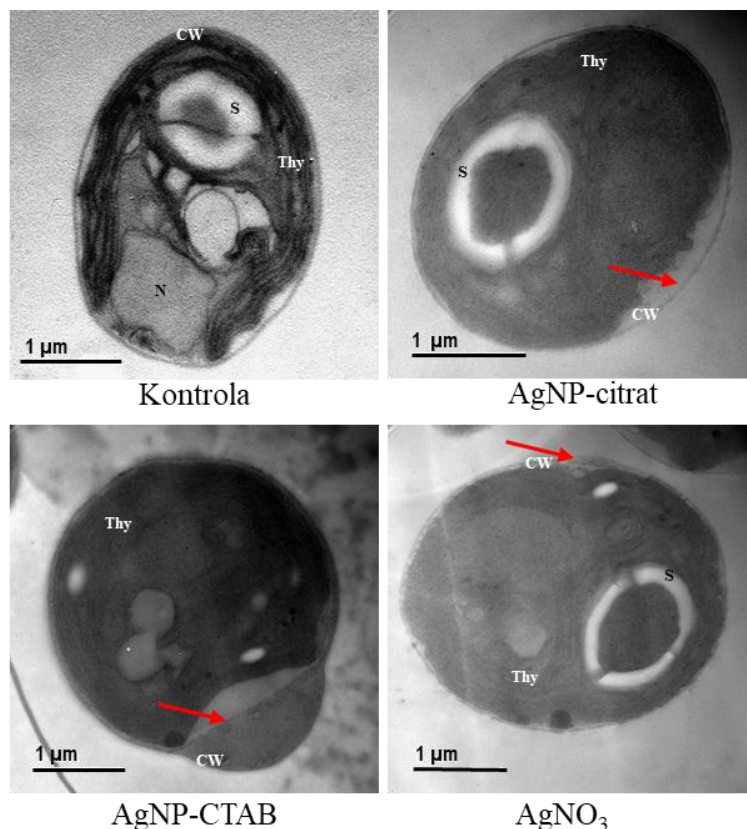
Tretman	DOC (pg stanica ⁻¹)	POC (pg stanica ⁻¹)
Kontrola	0,251 ± 0,0252 ^b	3,552 ± 0,115 ^a
AgNP-citrat	0,638 ± 0,185 ^a	3,458 ± 0,322 ^a
AgNP-CTAB	0,594 ± 0,068 ^a	3,233 ± 0,351 ^a
AgNO ₃	0,916 ± 0,067 ^a	4,128 ± 0,039 ^a

TEM-EDX analizom pokazano je da se AgNP nalaze zadržane na sloju EPS stanica algi nakon izlaganja stanica česticama AgNP-citrat i AgNP-CTAB (Slika 17; Prilog 4). Zanimljivo je da je sličan rezultat dobiven i nakon analize stanica izloženih AgNO₃, gdje su novonastale AgNP pronađene na sloju EPS. Također se može uočiti da je nakon svih primijenjenih tretmana došlo do povećane sinteze sloja EPS oko samih stanica algi u odnosu na kontrolu.



Slika 17. Slike kontrolne stanice alge *C. vulgaris* i stanica alge nakon 72 sata izlaganja AgNP-citrat ($0,188 \text{ mg L}^{-1}$), AgNP-CTAB ($0,895 \text{ mg L}^{-1}$) i AgNO₃ ($0,130 \text{ mg L}^{-1}$), snimljene transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM) u svjetlom vidnom polju te elementarna mapa srebra i spektar energijski razlučujuće/disperzivne rendgenske spektroskopije (EDX) dobiveni 72 sata nakon izlaganja navedenim tretmanima. Bijele strelice označavaju AgNP; sive strelice pokazuju na signale karakterističnih x-zraka srebra.

Analiza ultrastrukture stanica algi pokazala je da su svi tretmani sa srebrom doveli do značajnih promjena koje su vidljive u obliku plazmolize te oštećenja stanične stijenke (Slika 18). Plazmoliza je bila najizraženija u stanicama algi nakon izlaganja AgNP-citrat, iako je visoki stupanj plazmolize primijećen i u stanicama izloženim AgNP-CTAB. Nadalje, najizraženija dezintegracija stanične stijenke vidljiva je u stanicama izloženim AgNP-CTAB, iako je visoki stupanj dezintegracije uočen i nakon izlaganja stanica AgNO₃.



Slika 18. Ultrastruktura kontrolne stanice alge *C. vulgaris* i stanica alge nakon 72 sata izlaganja AgNP-citrat ($0,188 \text{ mg L}^{-1}$), AgNP-CTAB ($0,895 \text{ mg L}^{-1}$) i AgNO₃ ($0,130 \text{ mg L}^{-1}$) snimljena transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM) u svjetlom vidnom polju. Thy – tilakoidi; S – škrob; CW – stanična stijenka; crvene strelice označavaju promjene na staničnoj stijenci i membrani. Mjerilo prikazuje 1 µm.

Količina srebra koja je unesena u stanice ili koja se zadržala na sloju EPS izmjerena je tehnikom ICP-MS. Rezultati pokazuju da su svi tretmani sa srebrom rezultirali njegovim značajnim ulaskom u stanice, ali i zadržavanjem na sloju EPS (Tablica 15). Tretman s AgNP-CTAB rezultirao je najvećom akumulacijom srebra u stanicama i na sloju EPS u odnosu na ostale tretmane. Tretman s AgNO₃ doveo je do najmanje akumulacije srebra u stanicama, dok su tretmani AgNP-citrat i AgNO₃ doveli do najmanje akumulacije srebra na sloju EPS u odnosu na AgNP-CTAB. Tretman s AgNP-citrat je doveo do značajno veće akumulacije srebra u stanicama u odnosu na tretman s AgNO₃, no značajno manje u odnosu na tretman s AgNP-CTAB. Iz navedenih rezultata se može vidjeti kako je većina srebra ipak bila internalizirana u stanice dok je manja količina bila zadržana na sloju EPS samih stanica algi. Analizom omjera sadržaja srebra u samim stanicama u odnosu na njegov sadržaj na sloju EPS može se uočiti kako su tretmani s AgNP-citrat i AgNO₃ doveli do veće i podjednake

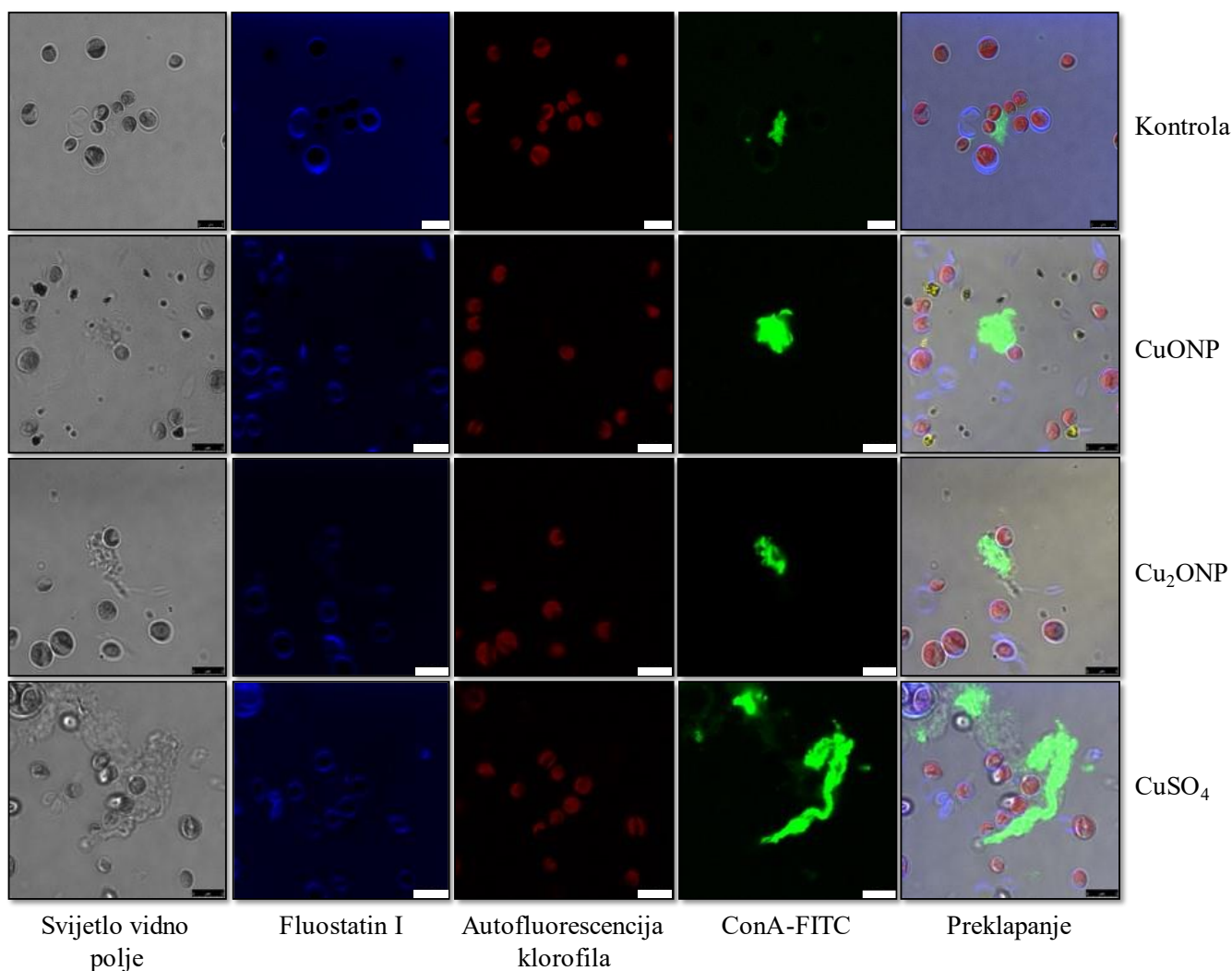
internalizacije u odnosu na zadržavanje na površini stanice, dok se AgNP-CTAB u većoj mjeri zadržao na sloju EPS.

Tablica 15. Sadržaj srebra u kontrolnim stanicama i sloju EPS alge *C. vulgaris* te stanicama i sloju EPS alge nakon 72 sata izlaganja AgNP-citrat (0,188 mg L⁻¹), AgNP-CTAB (0,895 mg L⁻¹) i AgNO₃ (0,130 mg L⁻¹) i omjer sadržaja srebra u stanicama i sloju EPS. Sadržaj srebra u kontrolnim stanicama bio je ispod granice kvantifikacije (< 0,1 µg srebra (10⁶ stanica)⁻¹). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna pogreška od tri biološke replike te izražene kao µg srebra (10⁶ stanica)⁻¹. Tretmani koji se značajno razlikuju pri p ≤ 0,05 (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

Tretman	µg srebra (10 ⁶ stanica) ⁻¹		
	Stanice	EPS	Stanice/EPS
Kontrola	0 ± 0,00 ^d	0 ± 0,0 ^c	0
AgNP-citrat	15,62 ± 1,74 ^b	0,17 ± 0,03 ^b	91,88
AgNP-CTAB	26,81 ± 1,54 ^a	0,47 ± 0,02 ^a	57,04
AgNO ₃	9,96 ± 1,35 ^c	0,10 ± 0,02 ^b	99,60

4.5.2 Nanočestice i ioni bakra

Slika 19 prikazuje staničnu stijenku, kloroplast i sloj EPS kontrolnih stanica alge *C. vulgaris* i stanica algi nakon izlaganja CuONP, Cu₂ONP i CuSO₄ u koncentracijama koje uzrokuju preživljenje 75% stanica algi, koji su vizualizirani konfokalnom mikroskopijom. Stanične stijenke algi, vizualizirane fluorescentnom bojom Fluostatin, bile su dobro i jasno definirane u svim uzorcima, dok je mjerenjem autofluorescencije jasno uočen i jedan kloroplast. Primjenom lektina ConA obilježenog fluoroforom FITC zapažen je sloj EPS oko kontrolnih stanica i stanica algi nakon svih tretmana, u kojima se njegova količina povećala u odnosu na kontrolu. Najveće povećanje količine sloja EPS u odnosu na kontrolu uočeno je nakon izlaganja stanica CuSO₄.



Slika 19. Slike kontrolnih stanica alge *C. vulgaris* i stanica alge nakon 72 sata izlaganja CuONP ($14,45 \text{ mg L}^{-1}$), Cu₂ONP ($11,89 \text{ mg L}^{-1}$) i CuSO₄ ($8,36 \text{ mg L}^{-1}$). Stanice su snimljene konfokalnim mikroskopom u svjetlom vidnom polju; primjenom fluorescentne boje Fluostatin I označena je stanična stijenka (plavo); autofluorescencijom je označen kloroplast (crveno); lektinom ConA obilježenim s fluoresceinom (ConA-FITC) označen je sloj EPS (zeleno); dok zadnji stupac prikazuje rezultate preklapanja svih dobivenih slika. Mjerilo prikazuje 5 μm .

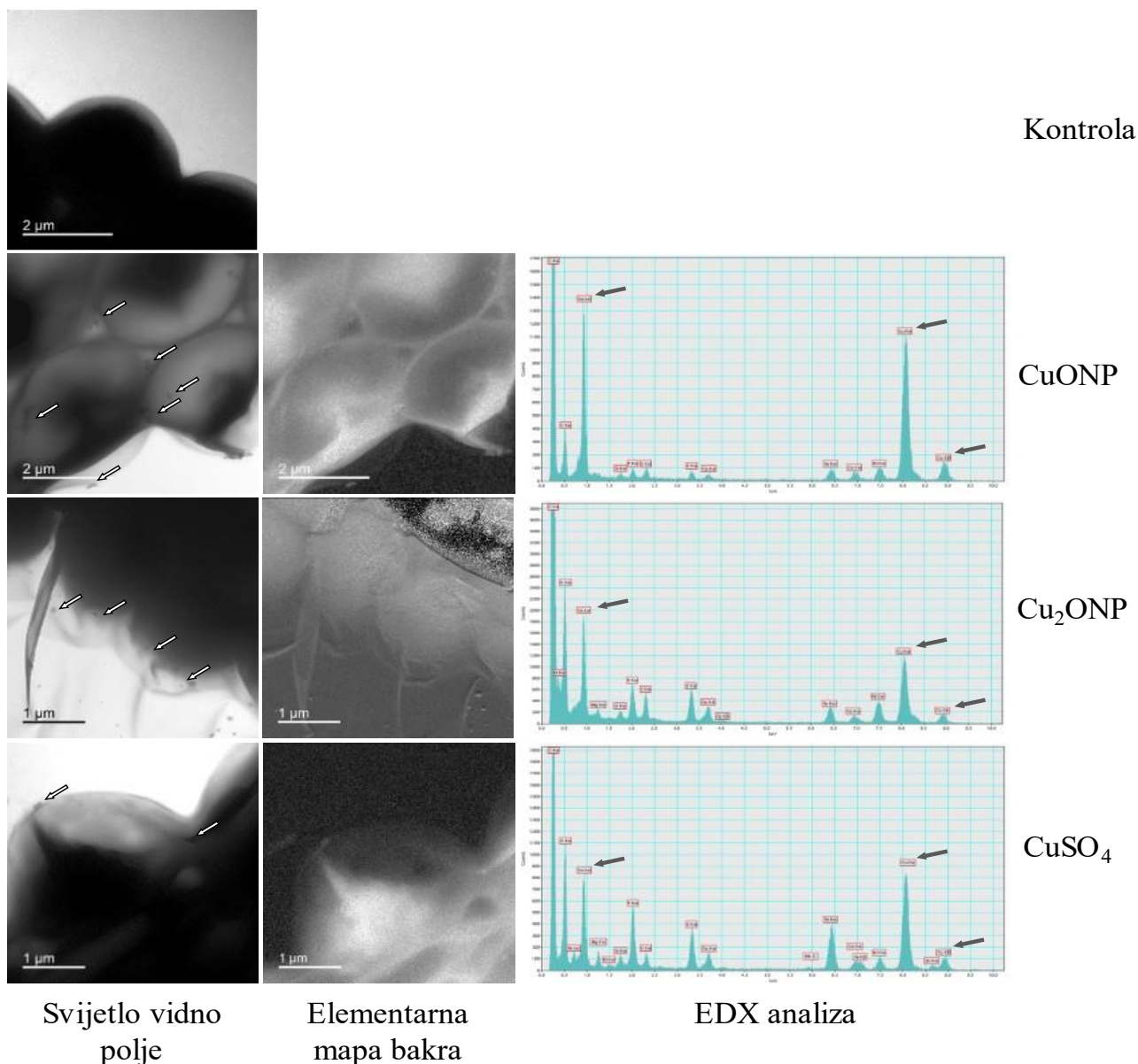
Kvantifikacija sloja EPS vezanog za stanicu izvedena je mjerenjem vrijednosti POC, dok je za kvantifikaciju slobodnog sloja EPS u hranjivoj podlozi izmjerena vrijednost DOC nakon izlaganja svim tretmanima nanočestica i iona bakra (Tablica 16). Statistički značajno povećanje količine otopljenog ugljika u hranjivoj podlozi u usporedbi s kontrolom zabilježeno je samo nakon izlaganja stanica CuSO₄, dok se vrijednosti DOC nakon izlaganja CuONP i Cu₂ONP nisu značajno promijenile u odnosu na kontrolu. S druge strane, niti jedan tretman nije izazvao značajne promjene u količini partikularnog ugljika u odnosu na kontrolu. Ovi rezultati pokazuju da jedino tretman s CuSO₄ u stanicama algi izaziva povećanu sintezu slobodnog sloja EPS

otpuštenog u hranjivu podlogu, dok niti jedan tretman s bakrom nema utjecaj na promjenu sinteze sloja EPS vezanog za stanice alge.

Tablica 16. Otopljeni (DOC) i partikularni organski sadržaj ugljika (POC) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja CuONP (14,45 mg L⁻¹), Cu₂ONP (11,89 mg L⁻¹) i CuSO₄ (8,36 mg L⁻¹). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna pogreška od tri biološke replike te izražene kao pg stanica⁻¹. Tretmani koji se značajno razlikuju pri p ≤ 0,05 (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

Tretman	DOC (pg stanica ⁻¹)	POC (pg stanica ⁻¹)
Kontrola	0,370 ± 0,024 ^b	5,225 ± 0,549 ^a
CuONP	0,454 ± 0,060 ^b	4,994 ± 0,265 ^a
Cu ₂ ONP	0,448 ± 0,041 ^b	5,045 ± 0,258 ^a
CuSO ₄	0,740 ± 0,105 ^a	5,232 ± 0,105 ^a

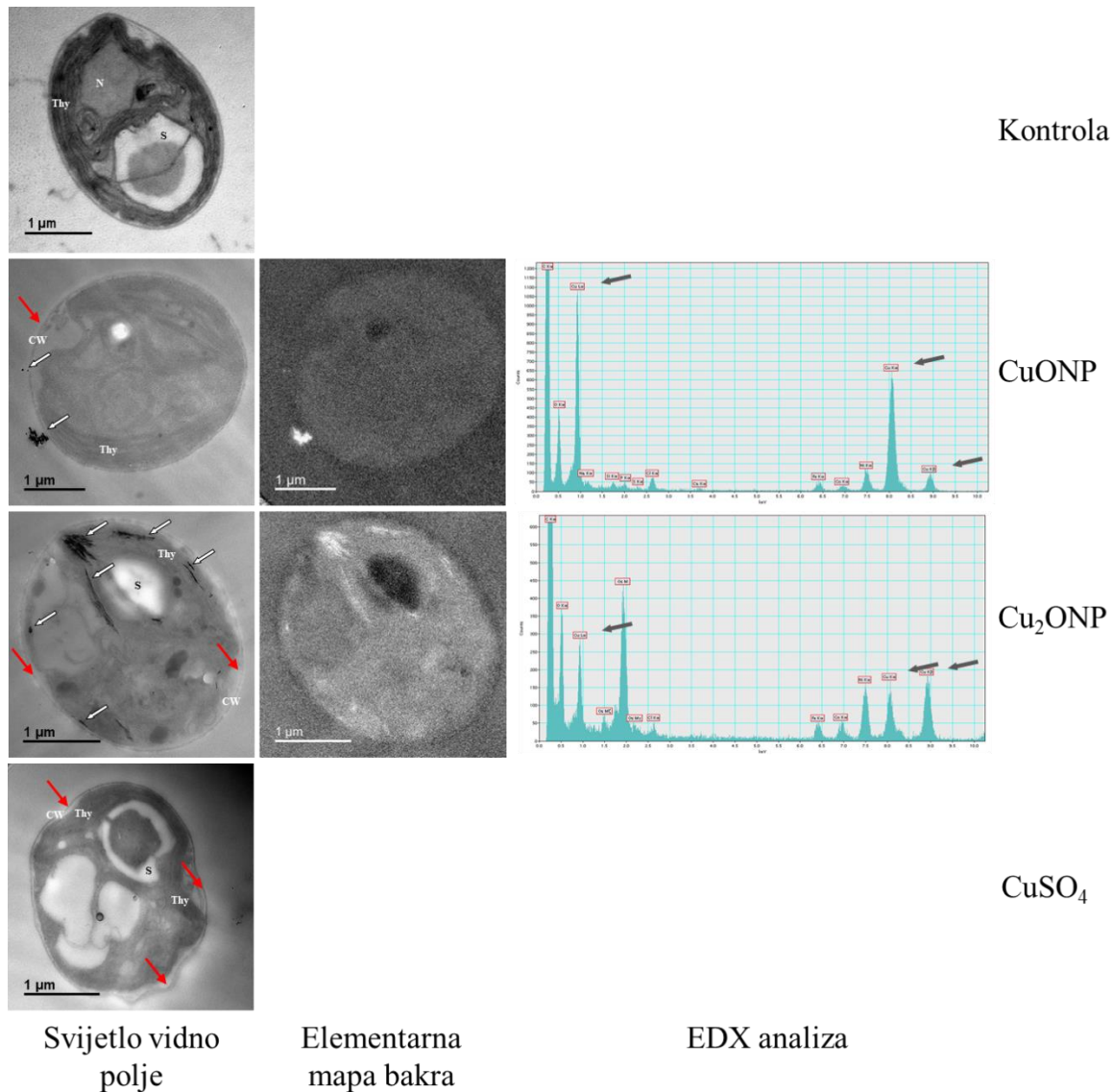
Oko stanica *C. vulgaris* koje su analizirane TEM mikroskopijom u nativnim uvjetima bez prethodne preparacije uzorka i uz EDX, lokalizirane su nanočestice bakra na sloju EPS nakon izlaganja svim tretmanima s bakrom (Slika 20; Prilog 5). Rezultati su pokazali da se CuONP i Cu₂ONP, ali i čestice nastale nakon izlaganja stanica s CuSO₄, nalaze na sloju EPS u obliku većih aglomerata.



Slika 20. Slike kontrolne stanice alge *C. vulgaris* i stanica alge nakon 72 sata izlaganja CuONP ($14,45 \text{ mg L}^{-1}$), Cu₂ONP ($11,89 \text{ mg L}^{-1}$) i CuSO₄ ($8,36 \text{ mg L}^{-1}$), snimljene transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM) u svjetlom vidnom polju te elementarna mapa bakra i spektar energijski razlučujuće/disperzivne rendgenske spektroskopije (EDX) dobiveni nakon 72 sata izlaganja navedenim tretmanima. Bijele strelice označavaju CuONP, Cu₂ONP i novonastale nanočestice bakra nakon tretmana s CuSO₄; sive strelice pokazuju na signale karakterističnih x-zraka bakra.

Analiza ultrastrukturnih promjena otkrila je da su svi tretmani s bakrom izazvali destabilizaciju stanične stijenke i pojavu plazmolize (Slika 21; Prilog 6). Najveći stupanj plazmolize uočen je nakon izlaganja stanica s CuSO₄, iako je značajna razina plazmoliza primijećena i nakon izlaganja stanica tretmanu s CuONP. Nadalje, izlaganje stanica tretmanu s CuSO₄ je izazvalo i najizraženiju destabilizaciju integriteta stanične stijenke i endomembranskog sustava. Nanočestice bakra

uočene su na staničnoj stijenci nakon izlaganja stanica s CuONP, dok je njihova značajna akumulacija zabilježena na tilakoidnom sustavu kloroplasta nakon izlaganja česticama Cu₂ONP, što je potvrđeno EDX analizom. S druge strane, u stanicama alge nisu detektirane čestice bakra nakon izlaganja s CuSO₄.



Slika 21. Ultrastruktura kontrolne stanice alge *C. vulgaris* i stanica alge nakon 72 sata izlaganja CuONP (14,45 mg L⁻¹), Cu₂ONP (11,89 mg L⁻¹) i CuSO₄ (8,36 mg L⁻¹) snimljena transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM) u svjetlom vidnom polju te elementarna mapa bakra i spektar energijski razlučujuće/disperzivne rendgenske spektroskopije (EDX) dobiveni nakon 72 sata izlaganja CuONP i Cu₂ONP. Thy - tilakoidi; S - škrob; CW - stanična stijenka; crvene strelice označavaju promjene na staničnoj stijenci i membrani; bijele strelice označavaju CuONP, Cu₂ONP; sive strelice pokazuju na signale karakterističnih x-zraka srebra. Mjerilo prikazuje 1 μm.

Količina bakra koja je unesena u stanice ili se zadržala na sloju EPS nakon tretmana s nanočesticama i ionima bakra izmjerena je tehnikom ICP-MS (Tablica 17). Tretmani s oba tipa nanočestica izazvali su značajno povećanje akumulacije bakra u stanicama i na sloju EPS u odnosu na kontrolu, ali i na tretman s CuSO₄. Izlaganje česticama CuONP rezultiralo je najvećom akumulacijom bakra u stanicama, statistički značajno većom i u usporedbi s tretmanom s Cu₂ONP. S druge strane, količina bakra u sloju EPS nije bila značajno različita između ova dva tretmana. Tretman s CuSO₄ je doveo do manjeg povećanja količine bakra u stanicama i na sloju EPS u odnosu na kontrolu, ali to povećanje nije bilo statistički značajno. Rezultati su također očekivano pokazali da i kontrolne stanice imaju malu količinu bakra u stanicama i na sloju EPS. Dodatno, rezultati su pokazali da je izlaganje CuONP i Cu₂ONP rezultiralo značajno većom količinom bakra unesenom u stanice u odnosu na količinu zadržanu na sloju EPS, dok je nakon tretmana s CuSO₄ nešto veća količina bakra izmjerena na samom sloju EPS u odnosu na bakar u stanicama.

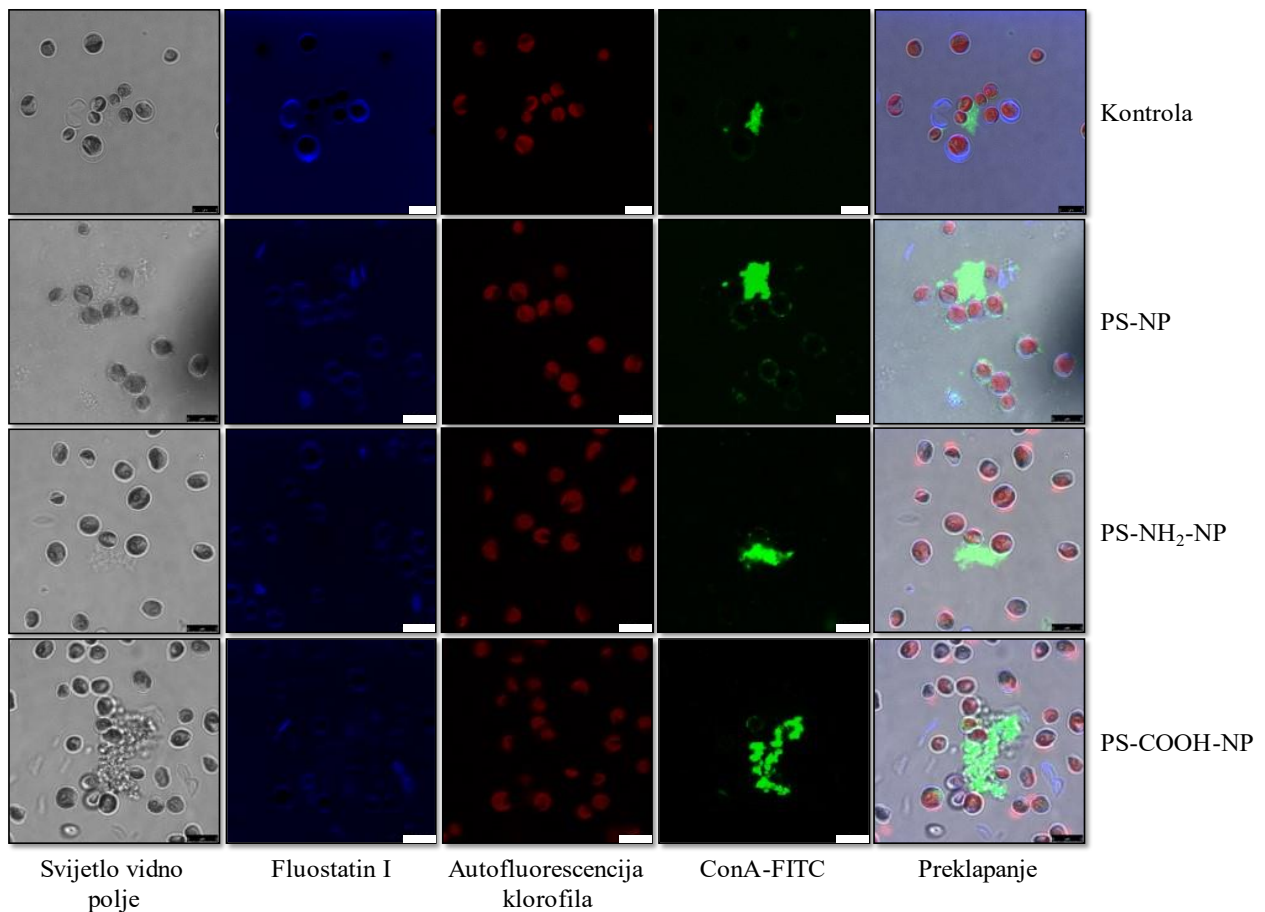
Tablica 17. Sadržaj bakra u kontrolnim stanicama i sloju EPS alge *C. vulgaris* te stanicama i sloju EPS alge nakon 72 sata izlaganja CuONP (14,45 mg L⁻¹), Cu₂ONP (11,89 mg L⁻¹) i CuSO₄ (8,36 mg L⁻¹) i omjer sadržaja bakra u stanicama i sloju EPS. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna pogreška od tri biološke replike te izražene kao µg bakra (10⁶ stanica)⁻¹. Tretmani koji se značajno razlikuju pri p ≤ 0,05 (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

Tretman	µg bakra (10 ⁶ stanica) ⁻¹		
	Stanice	EPS	Stanice/EPS
Kontrola	0,0811 ± 0,006 ^c	0,052 ± 0,008 ^b	1,55
CuONP	324,245 ± 62,541 ^a	18,934 ± 2,236 ^a	17,12
Cu ₂ ONP	202,811 ± 25,146 ^b	15,722 ± 3,520 ^a	12,90
CuSO ₄	3,560 ± 0,523 ^c	4,285 ± 1,614 ^b	0,83

4.5.3 Nanočestice polistirena

Konfokalnom mikroskopijom vizualizirani su stanična stijenka, kloroplast i sloj EPS kontrolnih stanica i stanica algi nakon tretmana s nanočesticama polistirena u konačnim koncentracijama od 40 mg L⁻¹ (Slika 22). Stanične stijenke, vizualizirane primjenom fluorescentne boje Fluostatin I, bile su dobro vidljive i jasno definirane u svim uzorcima, dok je mjerenjem autofluorescencije uočen kloroplast u svim analiziranim stanicama alge. Primjenom lektina

ConA vizaliziran je sloj EPS oko kontrolnih stanica i stanica algi nakon svih tretmana. Rezultati pokazuju da se količina sloja EPS povećala nakon svih tretmana u odnosu na kontrolu, a najveće povećanje zabilježeno je nakon izlaganja algi česticama PS-NP i PS-COOH-NP.



Slika 22. Slike kontrolnih stanica alge *C. vulgaris* i stanica alge nakon 72 sata izlaganja 40 mg L^{-1} PS-NP, PS-NH₂-NP ili PS-COOH-NP. Stanice su snimljene konfokalnim mikroskopom u svijetlom vidnom polju; primjenom fluorescentne boje Fluostatin I označena je stanična stijenka (plavo); autofluorescencijom je označen kloroplast (crveno); lektinom ConA obilježenim s fluoresceinom (ConA-FITC) označen je sloj EPS (zeleno); dok zadnji stupac prikazuje rezultate preklapanja svih dobivenih slika. Mjerilo prikazuje $5 \mu\text{m}$.

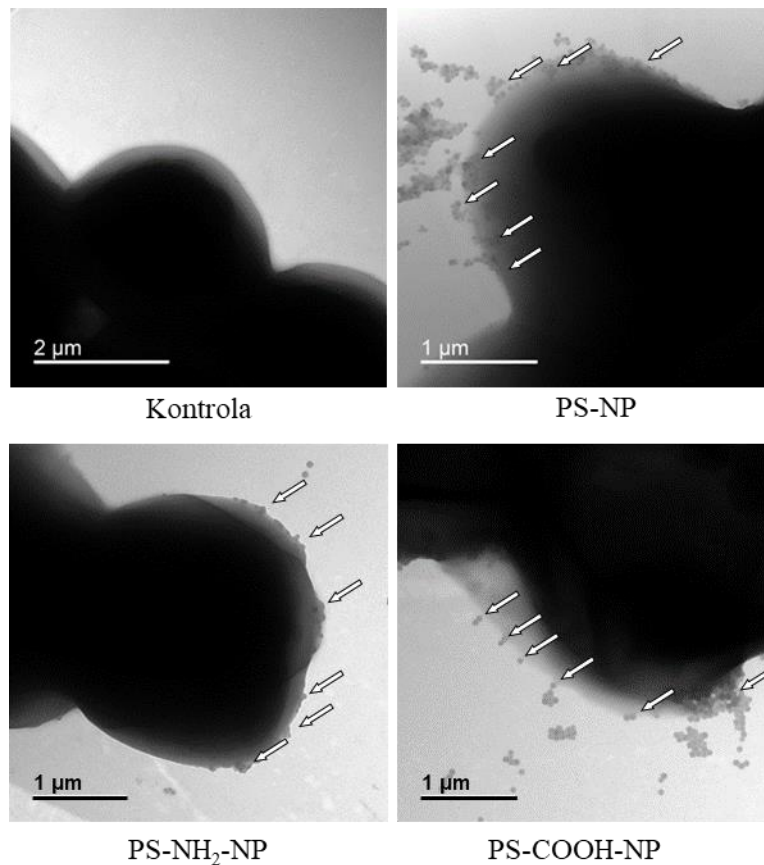
Značajno smanjeni sadržaj otopljenog ugljika zabilježen je nakon izlaganja algi česticama PS-NP i PS-NH₂-NP u odnosu na kontrolu (Tablica 18). Nakon tretmana s PS-COOH-NP, izmjerena je malo veća vrijednost DOC u odnosu na kontrolu, ali povećanje nije bilo statistički značajno. S druge strane, svi tretmani s nanočesticama polistirena izazvali su značajno i podjednako povećanje količine partikularnog ugljika u odnosu na kontrolu (Tablica 18), a najveća vrijednost izmjerena je nakon izlaganja PS-NP. Rezultati upućuju da su svi tretmani izazvali podjednako povećanje količine sloja EPS vezanog za stanice, dok su tretmani s PS-NP

i PS-NH₂-NP izazvali podjednako smanjenje sinteze sloja EPS otpuštenog u hranjivu podlogu u odnosu na kontrolu.

Tablica 18. Otopljeni (DOC) i partikularni organski sadržaj ugljika (POC) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja 40 mg L⁻¹ PS-NP, PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna pogreška od tri biološke replike te izražene kao pg stanica⁻¹. Tretmani koji se značajno razlikuju pri $p \leq 0,05$ (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

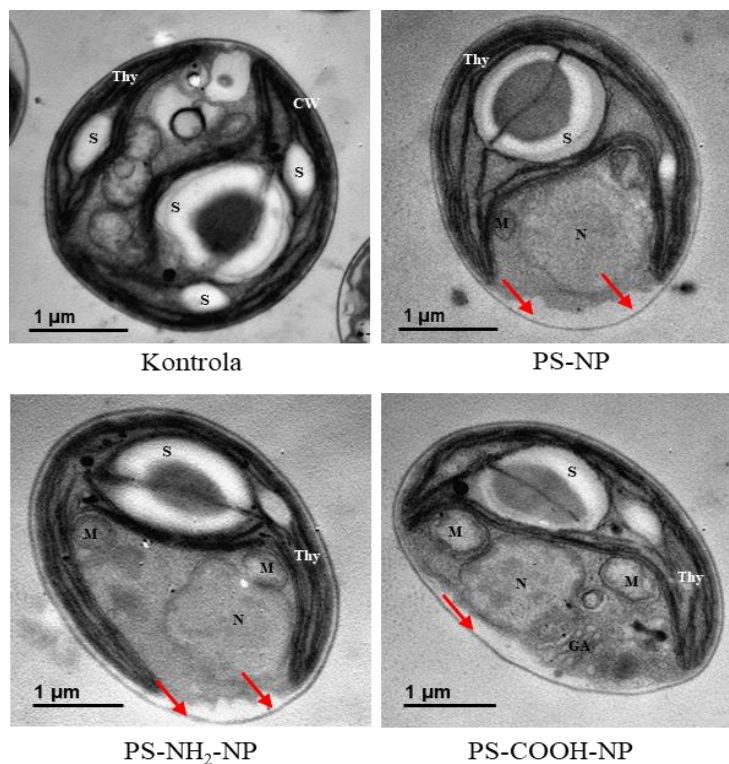
Tretman	DOC (pg stanica ⁻¹)	POC (pg stanica ⁻¹)
Kontrola	0,535 ± 0,222 ^b	4,795 ± 0,133 ^b
PS-NP	0,000 ± 0,000 ^a	8,835 ± 0,733 ^a
PS-NH ₂ -NP	0,082 ± 0,016 ^a	8,737 ± 0,332 ^a
PS-COOH-NP	0,621 ± 0,109 ^b	8,176 ± 0,055 ^a

Rezultati TEM analize u nativnim uvjetima, bez prethodne preparacije uzorka, pokazuju da se svi tipovi nanočestica polistirena zadržavaju na sloju EPS (Slika 23), dok je veći broj nanočestica uočen nakon tretmana s PS-NP i PS-COOH-NP u odnosu na tretman s PS-NH₂-NP koji je rezultirao najmanjim brojem nanočestica na sloju EPS.



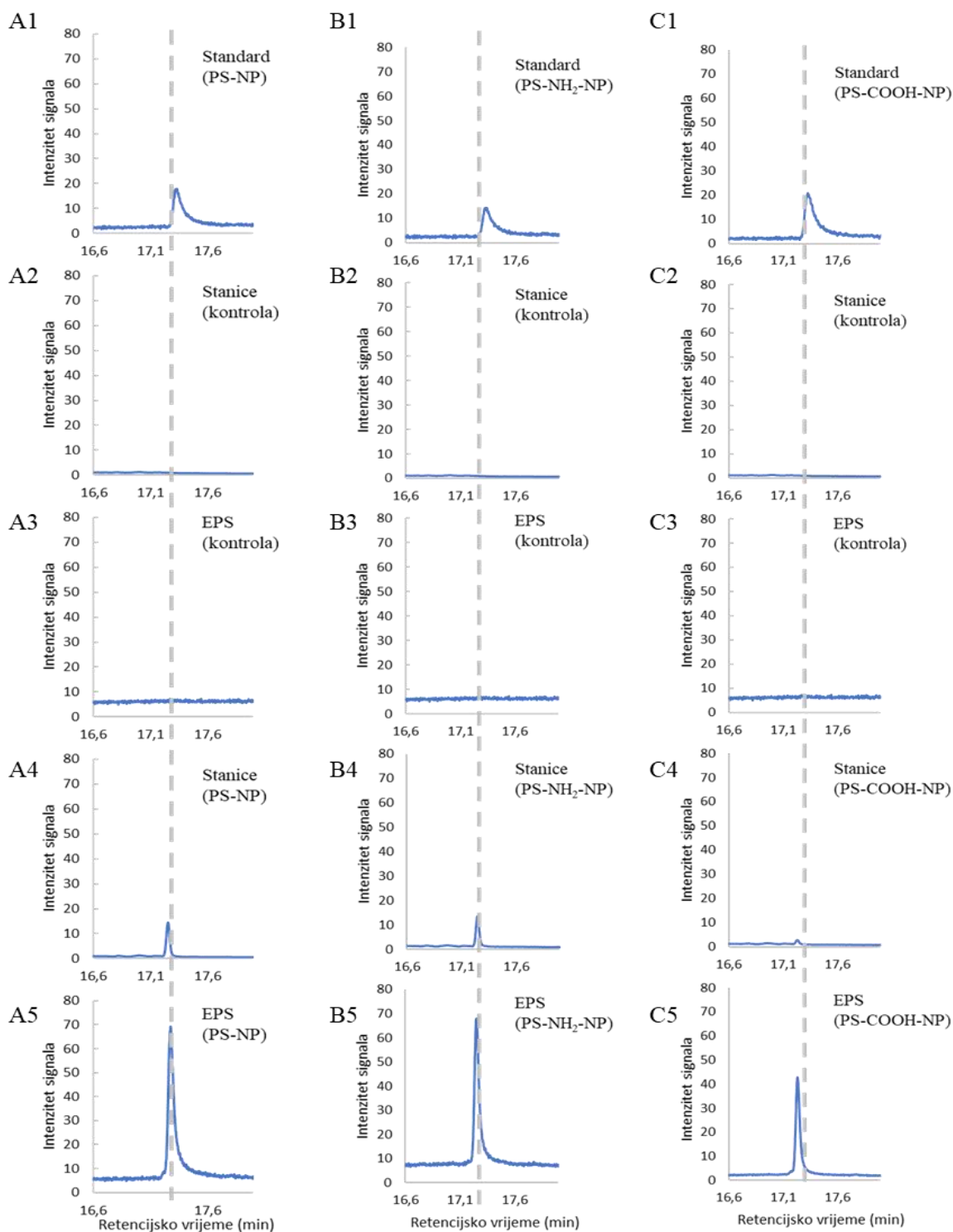
Slika 23. Slike kontrolne stanice alge *C. vulgaris* i stanica alge nakon 72 sata izlaganja 40 mg L^{-1} PS-NP, PS-NH₂-NP ili PS-COOH-NP, snimljene transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM) u svijetlom vidnom polju. Bijele strelice označavaju vjerojatne PS-NP, PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP.

Rezultati TEM analize pokazali su da su svi tretmani nanočesticama polistirena doveli do pojave plazmolize stanica (Slika 24), što je najviše bilo izraženo nakon izlaganja česticama PS-NP. Dodatno, nakon svih tretmana zabilježena je smanjena količina tilakoida i škroba u odnosu na kontrolu, što ukazuje na destabilizaciju tilakoidnog sustava.



Slika 24. Ultrastruktura kontrolne stanice alge *C. vulgaris* i stanica alge nakon 72 sata izlaganja 40 mg L^{-1} PS-NP, PS-NH₂-NP ili PS-COOH-NP snimljena transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM) u svijetlom vidnom polju. Thy – tilakoidi; S – škrob; CW – stanična stijenka; crvene strelice označavaju promjene na staničnoj stijenci i membrani. Mjerilo prikazuje $1 \mu\text{m}$.

Količina PS-NP, PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP unesenih u stanice algi ili zadržanih na sloju EPS analizirana je mjerenjem količine produkata pirolitičke razgradnje polistirena na njegove sastavnice (monomer, dimer, trimer). U cilju pronalaska signala produkata pirolize polistirena, prvo su analizirane matične suspenzije PS-NP, PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP koncentracija od 100 mg L^{-1} i za daljnju analizu su odabrani trimeri (Slika 25.A1, B1, C1; Prilog 7 i 8). Iz dobivenih rezultata je vidljivo da su svi tretmani nanočesticama polistirena rezultirali akumulacijom PS-NP, PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP u samim stanicama (Slika 25.A4, B4, C4) i na sloju EPS (Slika 25.A5, B5, C5), dok u kontrolnim stanicama (Slika 25.A2, B2, C2) i sloju EPS kontrolnih stanica (Slika 25.A3, B3, C3) nije pronađen signal trimera polistirena. Usporedbom intenziteta signala bilo je moguće napraviti relativnu usporedbu količine polistirena u stanicama i na sloju EPS stanica između tretmana. Rezultati pokazuju da su tretmani s PS-NP i PS-NH₂-NP doveli do veće akumulacije polistirena u stanicama i na sloju EPS u odnosu na tretman s PS-COOH-NP. Nadalje, analiza je pokazala da se značajno više nanočestica polistirena zadržalo na sloju EPS stanica u odnosu na količinu u stanicama nakon svih primijenjenih tretmana.



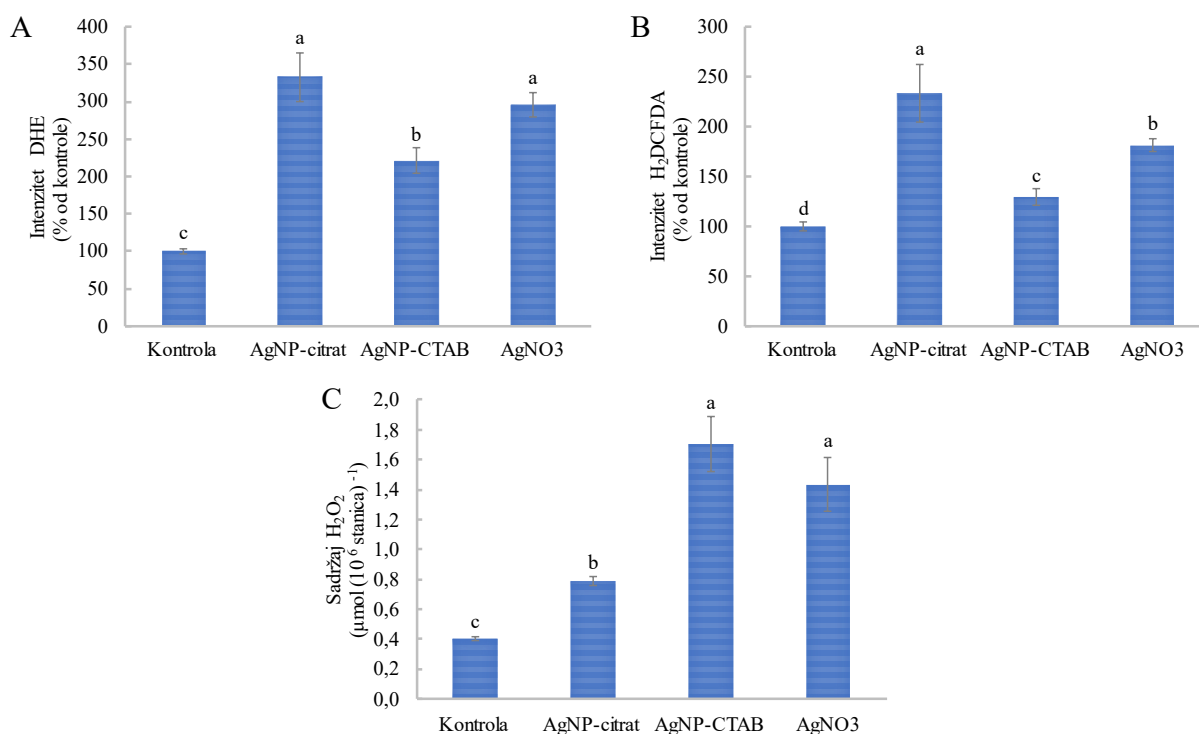
Slika 25. Ionski kromatogrami trimera stirena u kontrolnim stanicama (A2, B2, C2) i sloju EPS (A3, B3, C3) alge *C. vulgaris* te stanicama i sloju EPS alge nakon 72 sata izlaganja 40 mg L^{-1} PS-NP (A4, A5), PS-NH₂-NP (B4, B5) i PS-COOH-NP (C4, C5), dobiveni pirolitičkom plinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa (Py-GC-MS). Za svaki primijenjeni tretman prikazan je produkt pirolize matičnih suspenzija pripadajućih nanočestica polistirena (A1, B1, C1).

4.6 Fitotoksični učinci nanočestica i iona

4.6.1 Nanočestice i ioni srebra

4.6.1.1 Sadržaj ROS

Svi tretmani sa srebrom značajno su povećali proizvodnju ROS u stanicama algi (Slika 26). Najveći sadržaj ukupnih ROS, izmjeren *in situ* korištenjem fluorescentnih proba DHE i H₂DCFDA, izmjeren je nakon tretmana s AgNP-citrat, iako se nije značajno razlikovao u usporedbi s rezultatima tretmana s AgNO₃ korištenjem probe DHE (Slika 26.A, B). Izlaganje česticama AgNP-CTAB rezultiralo je značajno najnižim sadržajem ROS u usporedbi s ostalim tretmanima, ali su vrijednosti i dalje bile značajno povećane u odnosu na kontrolu. Što se tiče sadržaja H₂O₂, svi tretmani su doveli do povećanja vrijednosti u odnosu na kontrolu, pri čemu su tretmani s AgNP-CTAB i AgNO₃ rezultirali većim sadržajem H₂O₂ u usporedbi s AgNP-citrat (Slika 26.C).



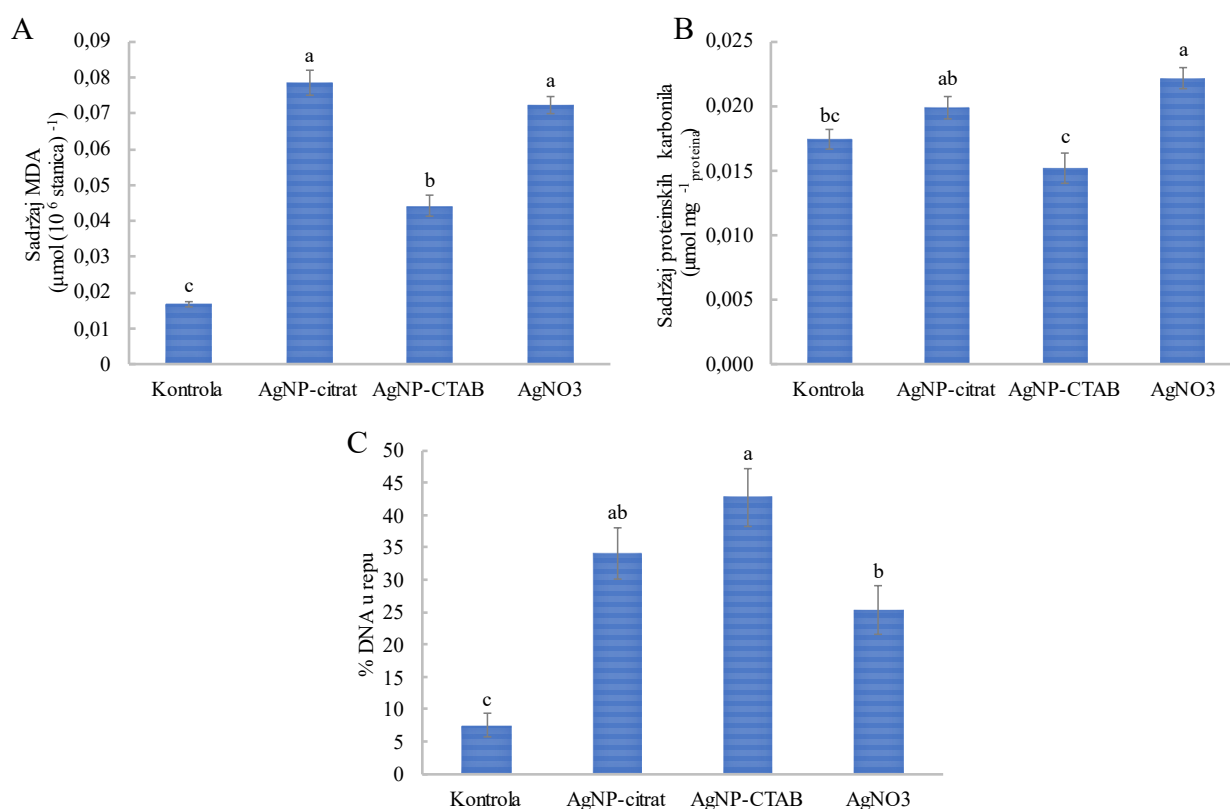
Slika 26. Sadržaj reaktivnih oblika kisika (ROS) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja AgNP-citrat (0,188 mg L⁻¹), AgNP-CTAB (0,895 mg L⁻¹) i AgNO₃ (0,130 mg L⁻¹). Sadržaj ukupnih ROS određen je *in situ* primjenom fluorescentnih proba dihidroetidij (DHE) (A) i 2,7-diklorodihidrofluorescein diacetat (H₂DCFDA) (B), dok je sadržaj vodikovog peroksida (H₂O₂) (C) izmjeren u ekstraktima stanica. Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti ± standardna pogreška od dva različita eksperimenta, svaki sa 6 ponavljanja (n = 12). Tretmani koji se značajno razlikuju pri p ≤ 0,05 (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

4.6.1.2 Oštećenja biomolekula

Svi tretmani izazvali su povećano oštećenje lipida, što je bilo najviše izraženo s tretmanima AgNP-citrat i AgNO₃, dok je tretman s AgNP-CTAB izazvao najmanje povećanje sadržaja MDA u odnosu na kontrolu (Slika 27.A).

Od svih tretmana sa srebrom, samo je tretman s AgNO₃ značajno povećao količinu proteinskih karbonila u usporedbi s kontrolom (Slika 27.B). AgNP-citrat rezultirao je blagim povećanjem, dok je tretman s AgNP-CTAB doveo do blagog smanjenja količine proteinskih karbonila, iako zabilježene promjene nisu bile statistički značajne u odnosu na kontrolu.

Analiza genotoksičnosti pokazala je da su svi tretmani izazvali oštećenje molekule DNA u stanicama algi u odnosu na kontrolu (Slika 27.C). Najjači genotoksični učinak izazvao je AgNP-CTAB, dok je tretman s AgNO₃ izazvao najmanje povećanje oštećenja DNA u odnosu na kontrolu.



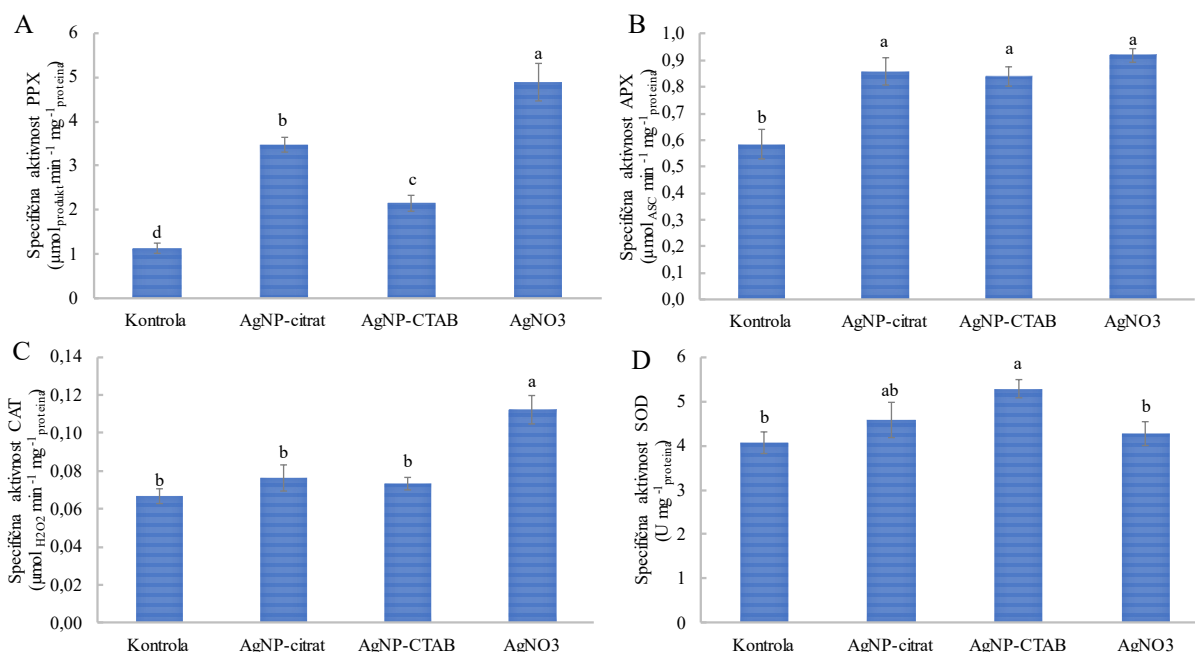
Slika 27. Sadržaj malondialdehida (MDA) (A), proteinskih karbonila (B) i postotak molekule DNA u repu (C) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja AgNP-citrat (0,188 mg L⁻¹), AgNP-CTAB (0,895 mg L⁻¹) i AgNO₃ (0,130 mg L⁻¹). Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti ± standardna pogreška od dva različita eksperimenta, svaki sa 6 ponavljanja (n = 12). Tretmani koji se značajno razlikuju pri p ≤ 0,05 (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

4.6.1.3 Aktivnost antioksidacijskih enzima

Svi tretmani značajno su povećali aktivnost peroksidaza APX i PPX u usporedbi s kontrolom (Slika 28.A, B). Tretman s AgNO_3 rezultirao je značajno najvećim, a AgNP-CTAB značajno najnižim povećanjem aktivnosti PPX u stanicama algi (Slika 28.A), dok je aktivnost APX bila jednako povećana u svim tretmanima u usporedbi s kontrolom (Slika 28.B).

Tretman s AgNO_3 jedini je značajno povećao aktivnost CAT u odnosu na kontrolu, dok je nakon tretmana s AgNP zabilježeno blago povećanje, ali nije bilo statistički značajno (Slika 28.C).

Povećanje aktivnosti SOD zabilježeno je nakon oba tretmana s AgNP, iako je samo AgNP-CTAB izazvao značajno povećanje u odnosu na kontrolu (Slika 28.D). Tretman s AgNO_3 nije rezultirao promjenom u aktivnosti enzima SOD u odnosu na kontrolu.

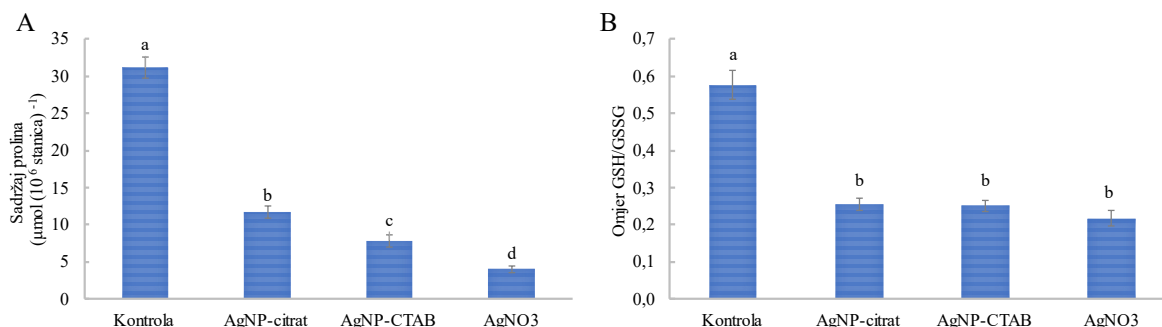


Slika 28. Aktivnosti antioksidacijskih enzima pirogalol peroksidaze (PPX) (A), askorbat peroksidaze (APX) (B), katalaze (CAT) (C) i superoksid dismutaze (SOD) (D) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja AgNP-citrat ($0,188 \text{ mg L}^{-1}$), AgNP-CTAB ($0,895 \text{ mg L}^{-1}$) i AgNO_3 ($0,130 \text{ mg L}^{-1}$). Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti \pm standardna pogreška od dva različita eksperimenta, svaki sa 6 ponavljanja ($n = 12$). Tretmani koji se značajno razlikuju pri $p \leq 0,05$ (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

4.6.1.4 Sadržaj neenzimskih antioksidansa

Količine neenzimskih antioksidansa bile su značajno smanjene nakon svih tretmana u odnosu na kontrolu (Slika 29). Svi tretmani uzrokovali su značajan pad sadržaja prolina; najjači učinak zabilježen je nakon tretmana s AgNO_3 , a najslabiji s AgNP-citrat (Slika 29.A). Nadalje, svi

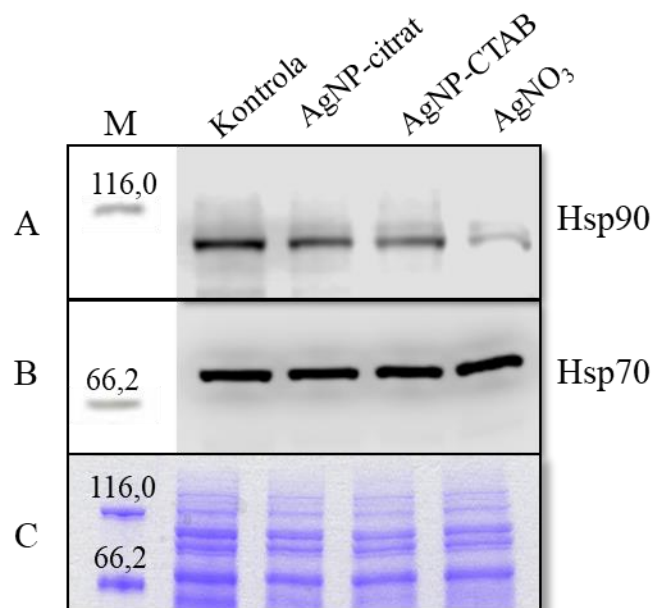
tretmani uzrokovali su značajno i podjednako smanjenje omjera GSH/GSSG u usporedbi s kontrolom (Slika 29.B).



Slika 29. Sadržaj neenzimskog antioksidansa prolina (A) i omjer reduciranog i oksidiranog glutationa (GSH/GSSG) (B) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja AgNP-citrat ($0,188 \text{ mg L}^{-1}$), AgNP-CTAB ($0,895 \text{ mg L}^{-1}$) i AgNO₃ ($0,130 \text{ mg L}^{-1}$). Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti \pm standardna pogreška od dva različita eksperimenta, svaki sa 6 ponavljanja ($n = 12$). Tretmani koji se značajno razlikuju pri $p \leq 0,05$ (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

4.6.1.5 Ekspresija proteina Hsp90 i Hsp70

Tretmani s AgNP-citrat i AgNP-CTAB rezultirali su podjednakim smanjenjem ekspresije proteina Hsp90 praćen jačinom obojenja proteinske vrpce, dok se njegova ekspresija najviše smanjila nakon tretmana s AgNO₃ (Slika 30.A). S druge strane, ekspresija proteina Hsp70 nije se značajno promijenila niti nakon jednog tretmana u odnosu na kontrolu (Slika 30.B).

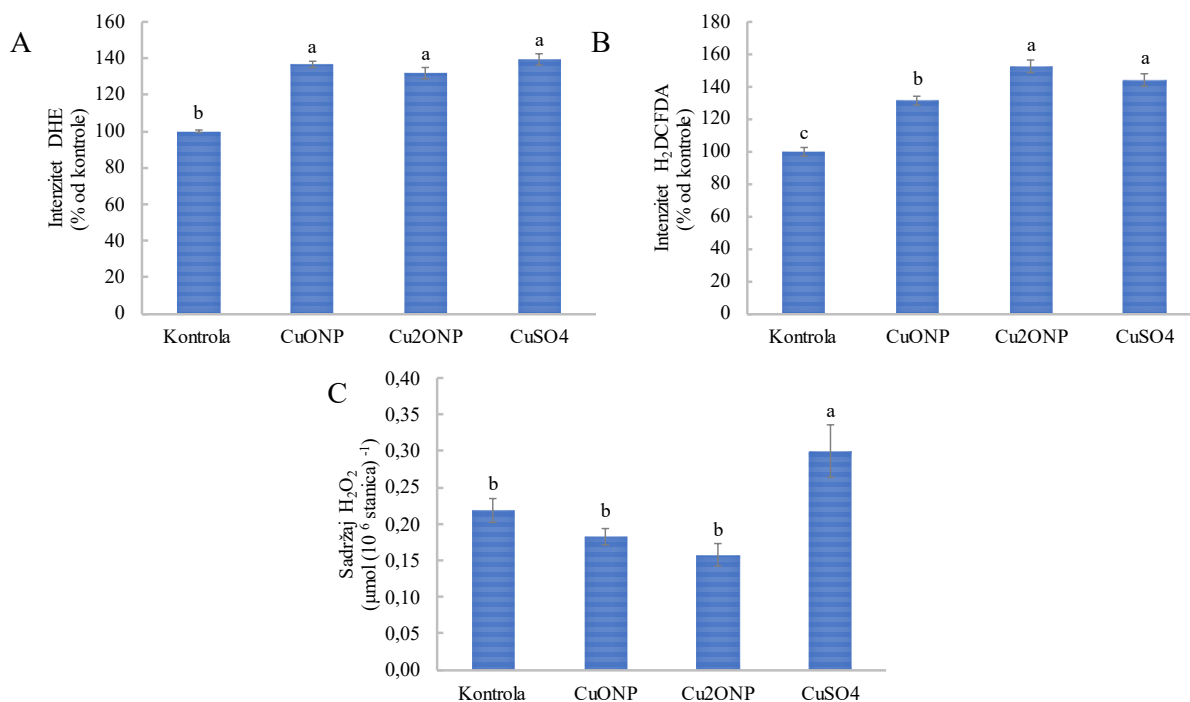


Slika 30. Imunodetekcija proteina Hsp90 (A) i Hsp70 (B) te ukupni topivi proteini obojani bojom *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 (C) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja AgNP-citrat ($0,188 \text{ mg L}^{-1}$), AgNP-CTAB ($0,895 \text{ mg L}^{-1}$) i AgNO₃ ($0,130 \text{ mg L}^{-1}$). Proteini su razdvojeni 12%-tnom SDS-PAG elektroforezom, preneseni na nitroceluloznu membranu koja je potom inkubirana sa specifičnim primarnim antitijelima. M – biljezi molekulskih masa (kDa).

4.6.2 Nanočestice i ioni bakra

4.6.2.1 Sadržaj ROS

Svi tretmani s bakrom značajno su i podjednako povećali ukupni sadržaj ROS u stanicama, određen *in situ* primjenom dviju fluorescentnih proba, u odnosu na kontrolu (Slika 31.A, B). Jedino je tretman s CuONP rezultirao s manjom vrijednosti korištenjem probe H₂DCFDA u odnosu na ostale tretmane, iako je i ona bila značajno veća u odnosu na kontrolu. S druge strane, količinu H₂O₂ u staničnim ekstraktima značajno je povećao samo CuSO₄, dok su tretmani s nanočesticama rezultirali blagim, iako ne statistički značajnim, smanjenjem količine H₂O₂ u odnosu na kontrolu (Slika 31.C).



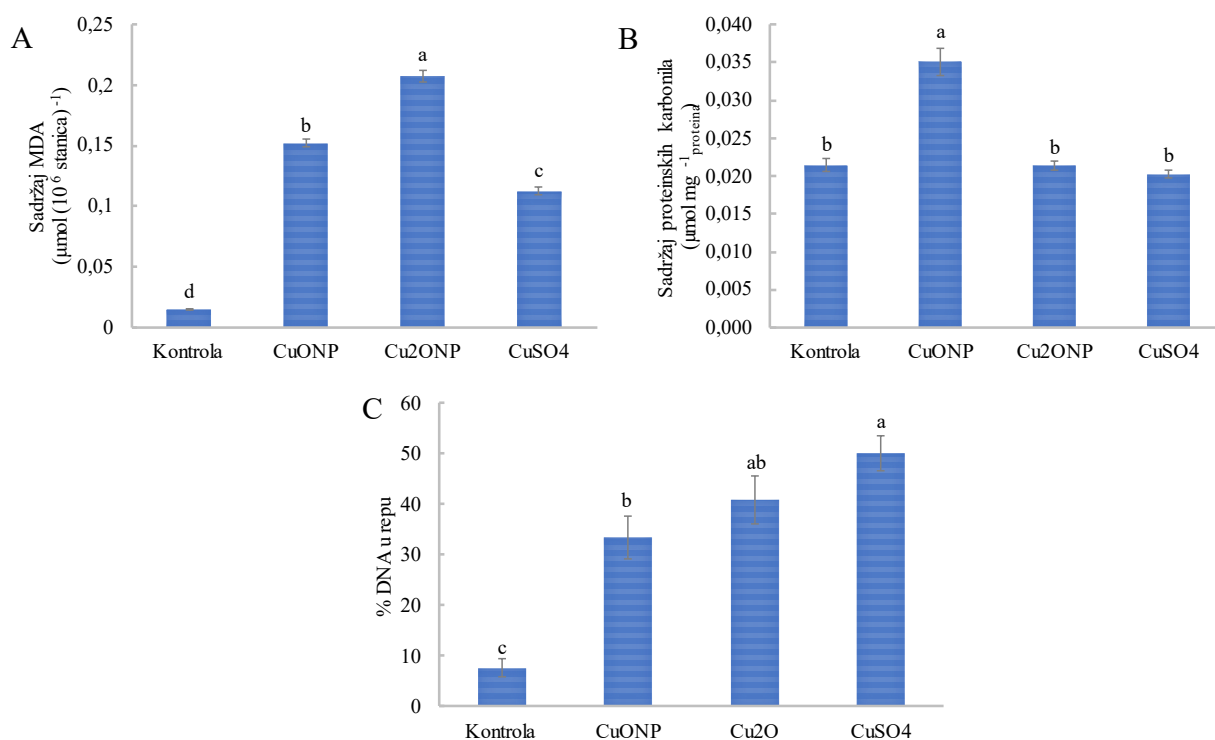
Slika 31. Sadržaj reaktivnih oblika kisika (ROS) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja CuONP (14,45 mg L⁻¹), Cu₂ONP (11,89 mg L⁻¹) i CuSO₄ (8,36 mg L⁻¹). Sadržaj ukupnih ROS određen je *in situ* primjenom fluorescentnih proba dihidroetidij (DHE) (A) i 2,7-diklorodihidrofluorescein diacetat (H₂DCFDA) (B), dok je sadržaj vodikovog peroksida (H₂O₂) (C) izmjereno u ekstraktima stanica. Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti ± standardna pogreška od dva različita eksperimenta, svaki sa 6 ponavljanja (n = 12). Tretmani koji se značajno razlikuju pri p ≤ 0,05 (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

4.6.2.2 Oštećenja biomolekula

Peroksidacija lipida u stanicama algi značajno se povećala nakon svih tretmana u odnosu na kontrolu (Slika 32.A), iako su nanočestice izazvale veće povećanje od CuSO₄. Među tretmanima, Cu₂ONP su izazvale najveće povećanje vrijednosti MDA, dok je tretman s CuSO₄ izazvao najmanje povećanje vrijednosti MDA u odnosu na kontrolu.

Od svih primijenjenih tretmana, samo je izlaganje CuONP značajno povećalo količinu proteinskih karbonila u usporedbi s kontrolom, dok ostali tretmani nisu izazvali oštećenje proteina (Slika 32.B).

Analiza genotoksičnosti pokazala je da su svi primijenjeni tretmani povećali oštećenje molekule DNA u stanicama algi u odnosu na kontrolu (Slika 32.C). Najveći genotoksični učinak pokazao je CuSO₄, a najmanje povećanje oštećenja DNA u odnosu na kontrolu je zabilježeno nakon tretmana s CuONP.



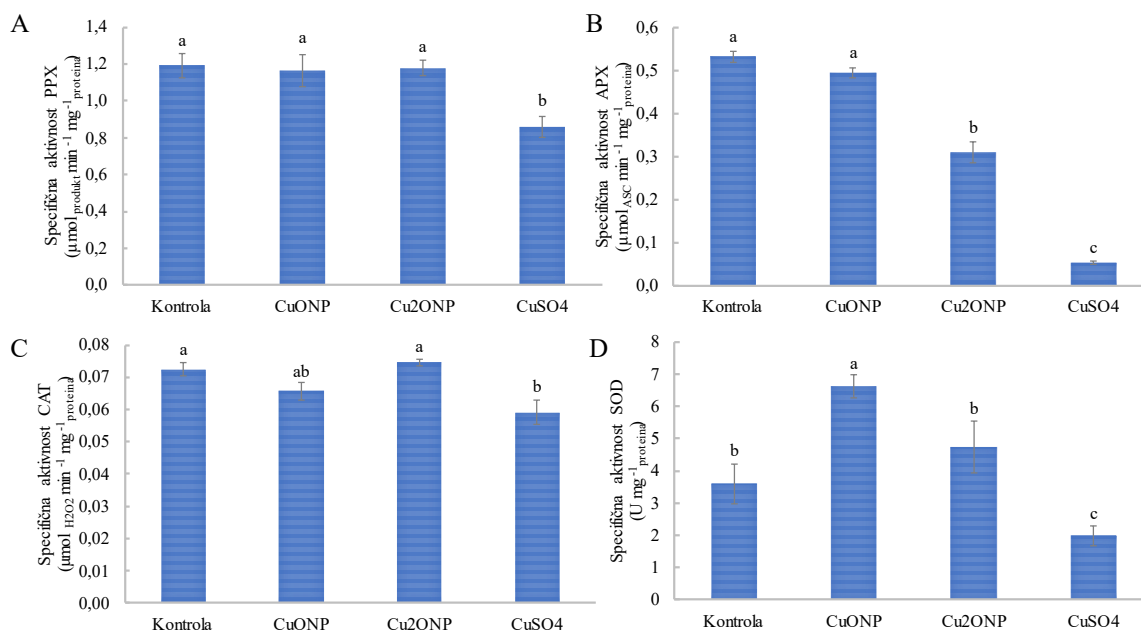
Slika 32. Sadržaj malondialdehida (MDA) (A), proteinskih karbonila (B) i postotak molekule DNA u repu (C) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja CuONP ($14,45 \text{ mg L}^{-1}$), Cu₂ONP ($11,89 \text{ mg L}^{-1}$) i CuSO₄ ($8,36 \text{ mg L}^{-1}$). Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti \pm standardna pogreška od dva različita eksperimenta, svaki sa 6 ponavljanja ($n = 12$). Tretmani koji se značajno razlikuju pri $p \leq 0,05$ (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

4.6.2.3 Aktivnost antioksidacijskih enzima

Analiza aktivnosti peroksidaza (APX i PPX) nakon tretmana s bakrom pokazala je najjači učinak kod tretmana s CuSO₄, koji je izazvao najveće smanjenje aktivnosti oba enzima u odnosu na kontrolu (Slika 33.A, B). Tretmani s nanočesticama bakra nisu značajno promijenili aktivnost PPX, dok je tretman s Cu₂ONP smanjio aktivnost enzima APX u odnosu na kontrolu, ali nije imao ni približno jak učinak kao CuSO₄.

Aktivnost enzima CAT također je značajno smanjio samo tretman s CuSO₄ u odnosu na kontrolu (Slika 33.C). Što se tiče tretmana s nanočesticama, CuONP je blago smanjio, a Cu₂ONP blago povećao CAT aktivnosti u odnosu na kontrolu, iako navedene promjene nisu bile statistički značajne.

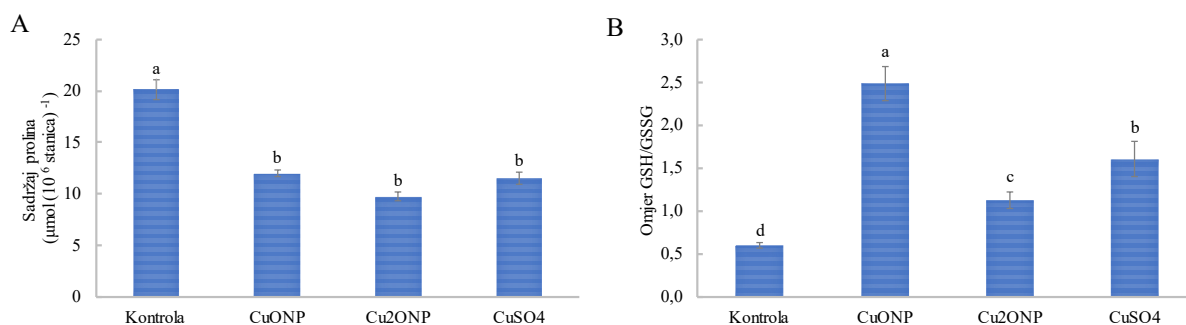
Tretmani s nanočesticama bakra izazvali su povećanje aktivnosti SOD, iako je ono bilo statistički značajno samo za CuONP (Slika 33.D). S druge strane, tretman s CuSO₄ rezultirao je značajnim smanjenjem vrijednosti u odnosu na kontrolu i oba tretmana s nanočesticama.



Slika 33. Aktivnosti antioksidacijskih enzima pirogalol peroksidaze (PPX) (A), askorbat peroksidaze (APX) (B), katalaze (CAT) (C) i superoksid dismutaze (SOD) (D) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja CuONP ($14,45 \text{ mg L}^{-1}$), Cu₂ONP ($11,89 \text{ mg L}^{-1}$) i CuSO₄ ($8,36 \text{ mg L}^{-1}$). Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti \pm standardna pogreška od dva različita eksperimenta, svaki sa 6 ponavljanja ($n = 12$). Tretmani koji se značajno razlikuju pri $p \leq 0,05$ (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

4.6.2.4 Sadržaja neenzimskih antioksidansa

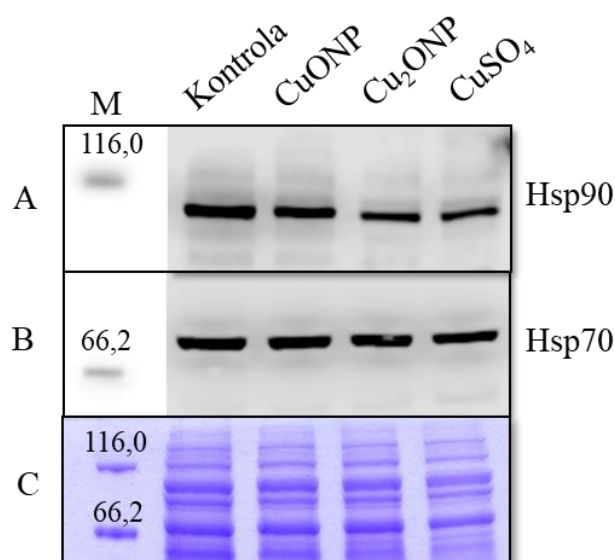
Svi tretmani s bakrom značajno su i podjednako smanjili sadržaj prolina u odnosu na kontrolu (Slika 34.A). S druge strane, svi tretmani izazvali su značajno povećanje omjera GSH/GSSG u odnosu na kontrolu (Slika 34.B). Najjači učinak zabilježen je nakon tretmana s CuONP, dok su Cu₂ONP izazvale najmanje povećanje omjera GSH/GSSG u odnosu na kontrolu.



Slika 34. Sadržaj neenzimskog antioksidansa prolina (A) i omjer reduciranog i oksidiranog glutationa (GSH/GSSG) (B) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja CuONP (14,45 mg L⁻¹), Cu₂ONP (11,89 mg L⁻¹) i CuSO₄ (8,36 mg L⁻¹). Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti ± standardna pogreška od dva različita eksperimenta, svaki sa 6 ponavljanja (n = 12). Tretmani koji se značajno razlikuju pri p ≤ 0,05 (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

4.6.2.5 Ekspresija proteina Hsp90 i Hsp70

Svi tretmani s bakrom smanjili su jačinu ekspresije proteina Hsp90 u odnosu na kontrolu, što je bilo jače izraženo nakon tretmana s Cu₂ONP i s CuSO₄ u usporedbi s CuONP (Slika 35.A). S druge strane, ekspresija proteina Hsp70 nije se značajno promijenila niti nakon jednog tretmana u odnosu na kontrolu (Slika 35.B).

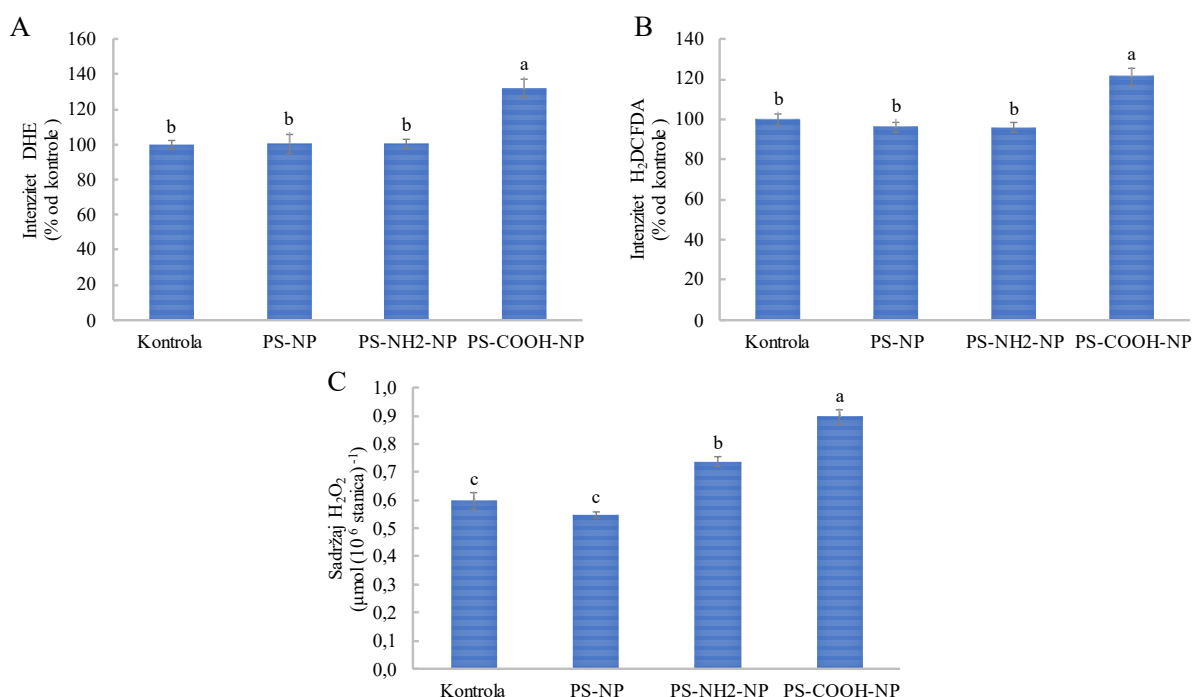


Slika 35. Imunodetekcija proteina Hsp90 (A) i Hsp70 (B) te ukupni topivi proteini obojani bojom *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 (C) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja CuONP (14,45 mg L⁻¹), Cu₂ONP (11,89 mg L⁻¹) i CuSO₄ (8,36 mg L⁻¹). Proteini su razdvojeni 12%-tnom SDS-PAG elektroforezom, preneseni na nitroceluloznu membranu koja je potom inkubirana sa specifičnim primarnim antitijelima. M – biljezi molekulskih masa (kDa).

4.6.3 Nanočestice polistirena

4.6.3.1 Sadržaj ROS

Analiza ukupnog sadržaja ROS *in situ* primjenom fluorescentnih proba DHE i H₂DCFDA pokazala je sličan rezultat, gdje je jedino tretman s PS-COOH-NP značajno povećao sadržaj ROS u odnosu na kontrolu (Slika 36.A, B). Ovi rezultati djelomično su u skladu sa sadržajem H₂O₂ izmjerenim u staničnim ekstraktima (Slika 36.C), gdje su samo tretmani s PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP rezultirali značajnim povećanjem vrijednosti, iako je tretman s PS-COOH-NP imao značajno najjači učinak na akumulaciju H₂O₂.



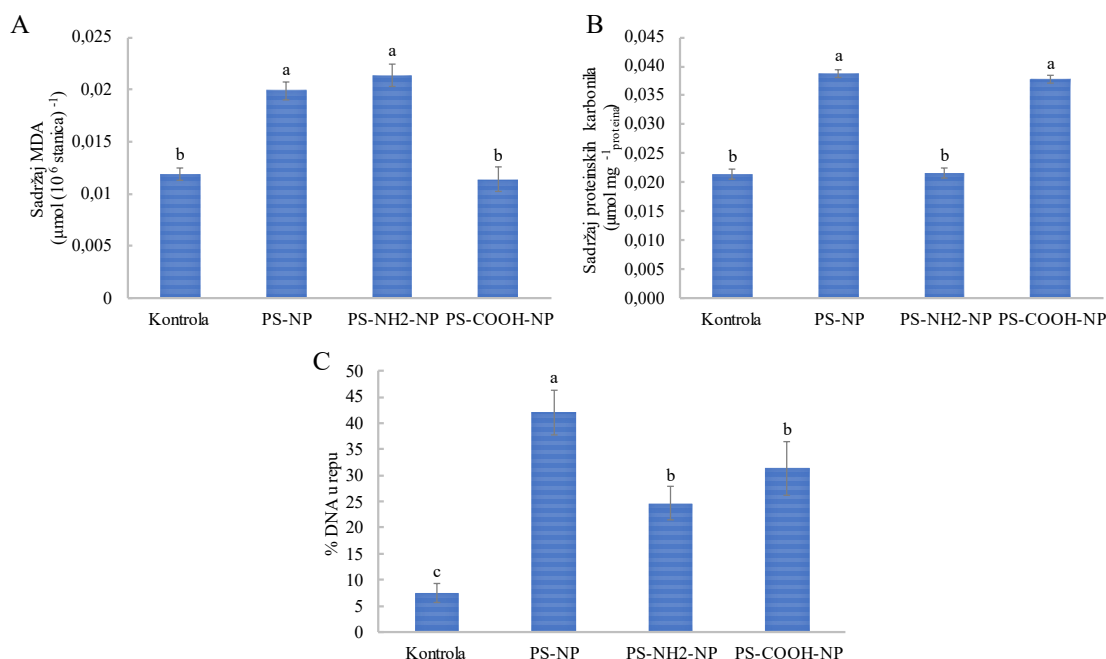
Slika 36. Sadržaj reaktivnih oblika kisika (ROS) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja 40 mg L⁻¹ PS-NP, PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP. Sadržaj ukupnih ROS određen je *in situ* primjenom fluorescentnih proba dihidroetidij (DHE) (A) i 2,7-diklorodihidrofluorescein diacetat (H₂DCFDA) (B), dok je sadržaj vodikovog peroksida (H₂O₂) (C) izmjeren u ekstraktima stanica. Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti ± standardna pogreška od dva različita eksperimenta, svaki sa 6 ponavljanja (n = 12). Tretmani koji se značajno razlikuju pri p ≤ 0,05 (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

4.6.3.2 Oštećenja biomolekula

Tretmani s PS-NP i PS-NH₂-NP izazvali su značajno i jednako povećanje lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu, dok čestice PS-COOH-NP nisu uzrokovale oštećenje lipida u stanicama algi (Slika 37.A).

Što se tiče oštećenja proteina, tretmani s PS-NP i PS-COOH-NP značajno su i podjednako povećali sadržaj proteinskih karbonila u odnosu na kontrolu, dok tretman s PS-NH₂-NP nije pokazao učinak (Slika 37.B).

Analiza genotoksičnosti pokazala je da su svi tretmani povećali oštećenje molekule DNA u odnosu na kontrolu, iako je je najjači učinak zabilježen s PS-NP (Slika 37.C). Tretmani s PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP imali su manju genotoksičnost u odnosu na tretman s PS-NP.



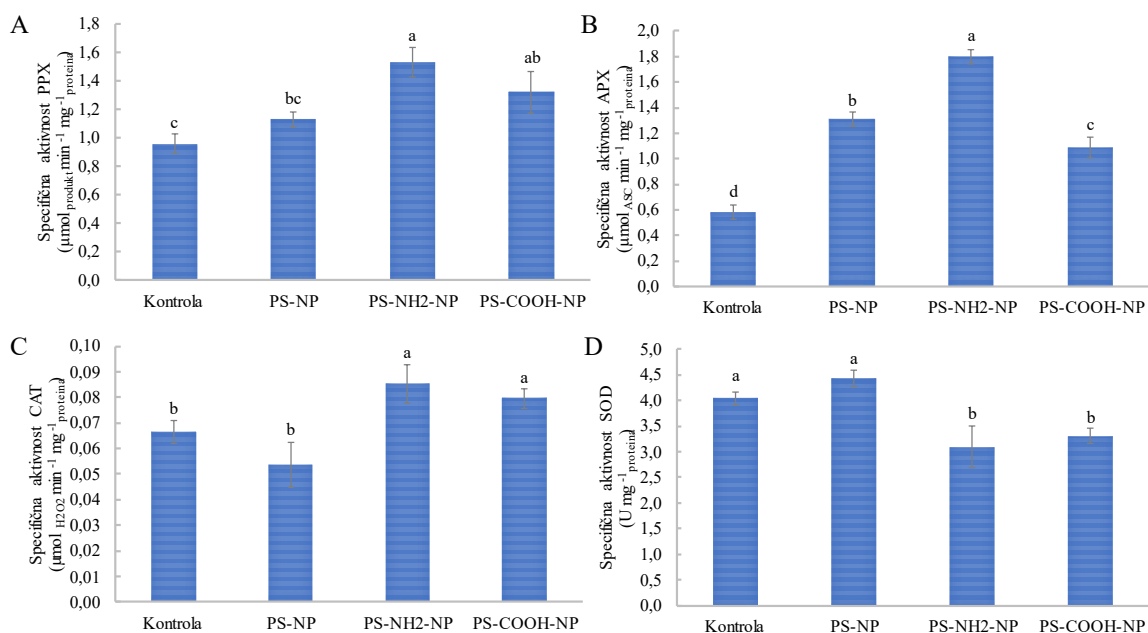
Slika 37. Sadržaj malondialdehida (MDA) (A), proteinskih karbonila (B) i postotak molekule DNA u repu (C) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja 40 mg L^{-1} PS-NP, PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP. Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti \pm standardna pogreška od dva različita eksperimenta, svaki sa 6 ponavljanja ($n = 12$). Tretmani koji se značajno razlikuju pri $p \leq 0,05$ (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

4.6.3.3 Aktivnost antioksidacijskih enzima

Svi tretmani s bakrom povećali su aktivnost peroksidaza APX i PPX u usporedbi s kontrolom (Slika 38.A, B), iako su se učinci razlikovali između tretmana. Tretman s PS-NH₂-NP izazvao je najveće povećanje aktivnosti oba enzima, iako za enzim PPX to povećanje nije bilo značajno u odnosu na PS-COOH-NP. Tretman s PS-NP rezultirao je blagim povećanjem vrijednosti koje nije bilo značajno u odnosu na kontrolu. Aktivnost enzima APX bila je značajno povećana nakon svih tretmana u usporedbi s kontrolom, a čestice PS-COOH-NP izazvale su najmanje, ali statistički značajno povećanje.

Aktivnost enzima CAT značajno se i podjednako povećala nakon tretmana s PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP, dok je tretmana s PS-NP blago smanjio aktivnost enzima CAT u odnosu na kontrolu, iako navedeno smanjenje nije bilo statistički značajno (Slika 38.C).

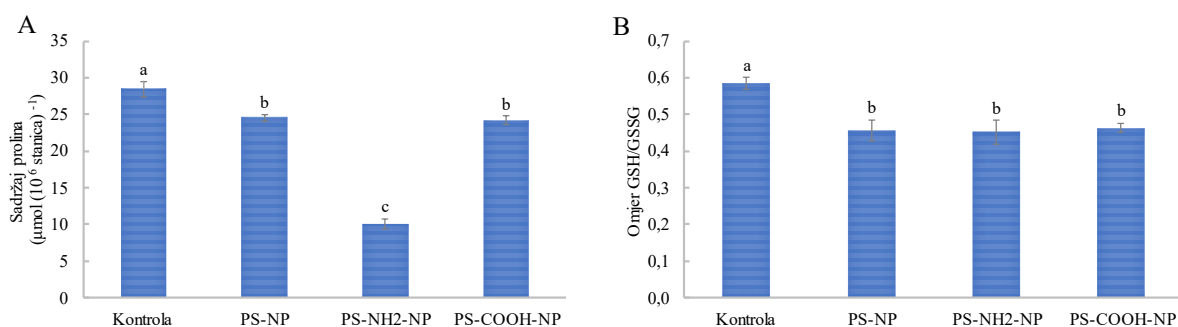
Što se tiče enzima SOD, tretmani s PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP značajno su i podjednako smanjili njegovu aktivnost u odnosu na kontrolu, dok tretman s PS-NP nije pokazao učinak na njegovu aktivnost (Slika 38.D).



Slika 38. Aktivnosti antioksidacijskih enzima pirogalol peroksidaze (PPX) (A), askorbat peroksidaze (APX) (B), katalaze (CAT) (C) i superoksid dismutaze (SOD) (D) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja 40 mg L⁻¹ PS-NP, PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP. Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti ± standardna pogreška od dva različita eksperimenta, svaki sa 6 ponavljanja (n = 12). Tretmani koji se značajno razlikuju pri p ≤ 0,05 (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

4.6.3.4 Sadržaj neenzimskih antioksidansa

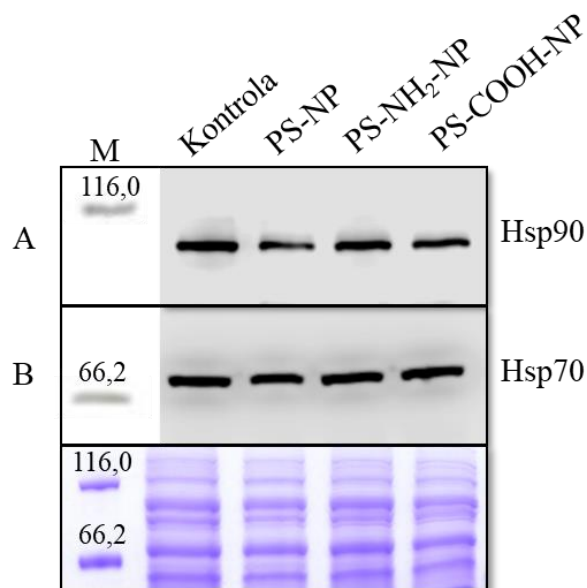
Sadržaj neenzimskih antioksidansa bio je smanjen nakon svih tretmana u odnosu na kontrolu (Slika 39). Svi tretmani uzrokovali su značajan pad sadržaja prolina u odnosu na kontrolu, što je bilo posebno izraženo nakon tretmana s PS-NH₂-NP (Slika 39.A). Analiza omjera GSH/GSSG pokazala je da su svi tretmani podjednako smanjili omjer GSH/GSSG u odnosu na kontrolu, odnosno da je jednako smanjena razina reduciranog, a povećana razina oksidiranog oblika glutationa u stanicama (Slika 39.B).



Slika 39. Sadržaj neenzimskog antioksidansa prolina (A) i omjer reduciranog i oksidiranog glutationa (GSH/GSSG) (B) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja 40 mg L⁻¹ PS-NP, PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP. Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti ± standardna pogreška od dva različita eksperimenta, svaki sa 6 ponavljanja (n = 12). Tretmani koji se značajno razlikuju pri p ≤ 0,05 (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

4.6.3.5 Ekspresija proteina Hsp90 i Hsp70

Tretmani s PS-NP i PS-NH₂-NP smanjili su ekspresiju proteina Hsp90 u odnosu na kontrolu, među kojima je tretman s PS-NP izazvao najjače smanjenje ekspresije, dok tretman s PS-COOH-NP nije imao utjecaj na njegovu ekspresiju (Slika 40.A). S druge strane, ekspresija proteina Hsp70 nije se značajno promijenila nakon niti jednog tretmana nanočesticama polistirena u odnosu na kontrolu (Slika 40.B).



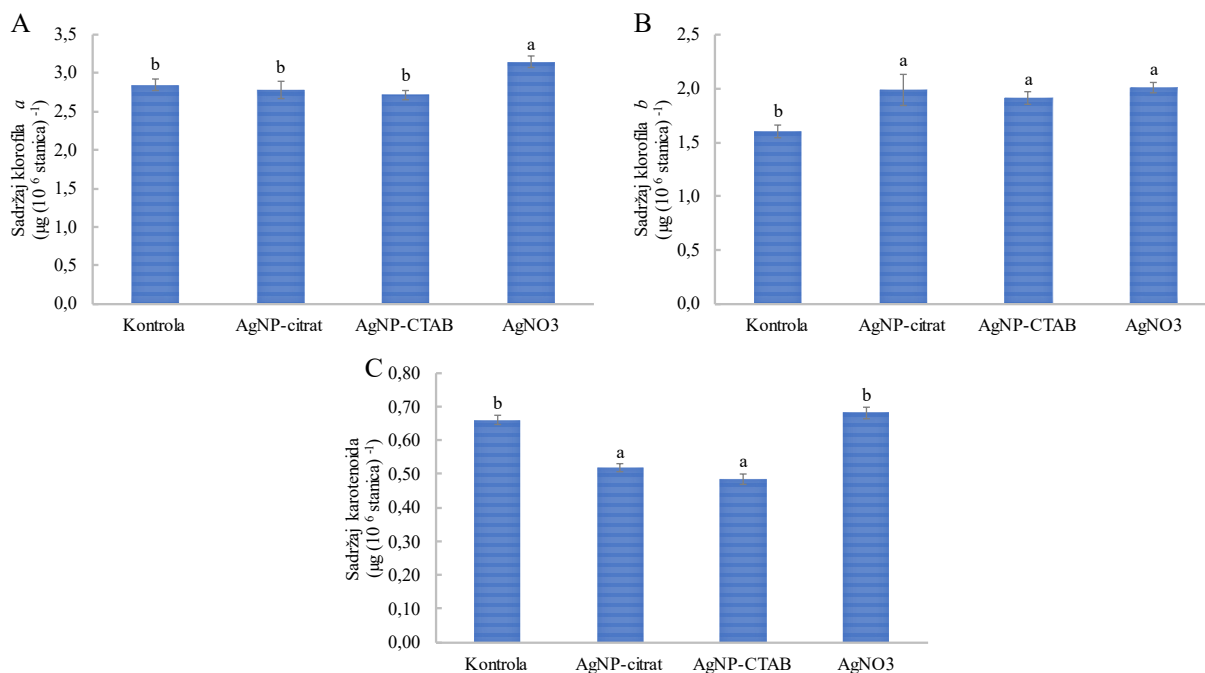
Slika 40. Imunodetekcija proteina Hsp90 (A) i Hsp70 (B) te ukupni topivi proteini obojani bojom *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 (C) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja 40 mg L^{-1} PS-NP, PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP. Proteini su razdvojeni 12%-tnom SDS-PAG elektroforezom, preneseni na nitroceluloznu membranu koja je potom inkubirana sa specifičnim primarnim antitijelima. M – biljezi molekulskih masa (kDa).

4.7 Učinak nanočestica i iona na proces fotosinteze

4.7.1 Nanočestice i ioni srebra

4.7.1.1 Količina fotosintetskih pigmenata klorofila *a* i *b* te karotenoida

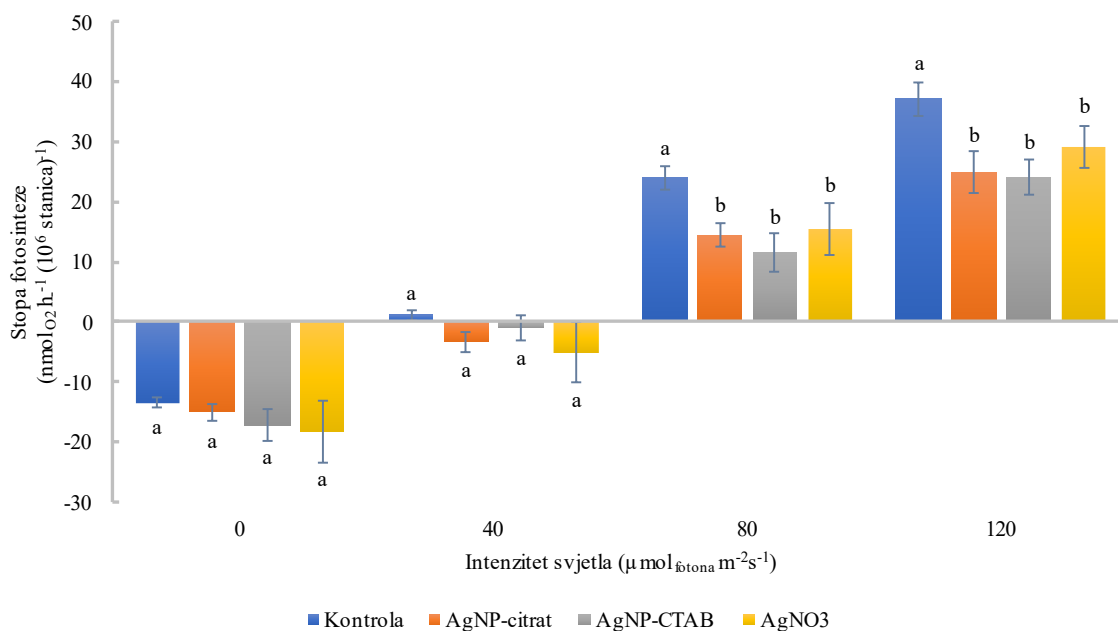
Tretman s AgNO₃ povećao je sadržaj klorofila *a* u odnosu na kontrolu, ali i na tretmane s oba tipa AgNP (Slika 41.A), dok su svi tretmani rezultirali značajnim i podjednakim povećanjem sadržaja klorofila *b* u odnosu na kontrolu (Slika 41.B). Zanimljivo je da su tretmani s oba tipa AgNP značajno i jednako smanjili količinu karotenoida u odnosu na kontrolu, dok tretman s AgNO₃ nije imao učinak (Slika 41.C).



Slika 41. Sadržaj klorofila *a* (A), klorofila *b* (B) i karotenoida (C) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja AgNP-citrat ($0,188 \text{ mg L}^{-1}$), AgNP-CTAB ($0,895 \text{ mg L}^{-1}$) i AgNO₃ ($0,130 \text{ mg L}^{-1}$). Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti \pm standardna pogreška od dva različita eksperimenta, svaki sa 6 ponavljanja ($n = 12$). Tretmani koji se značajno razlikuju pri $p \leq 0,05$ (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

4.7.1.2 Stopa fotosinteze

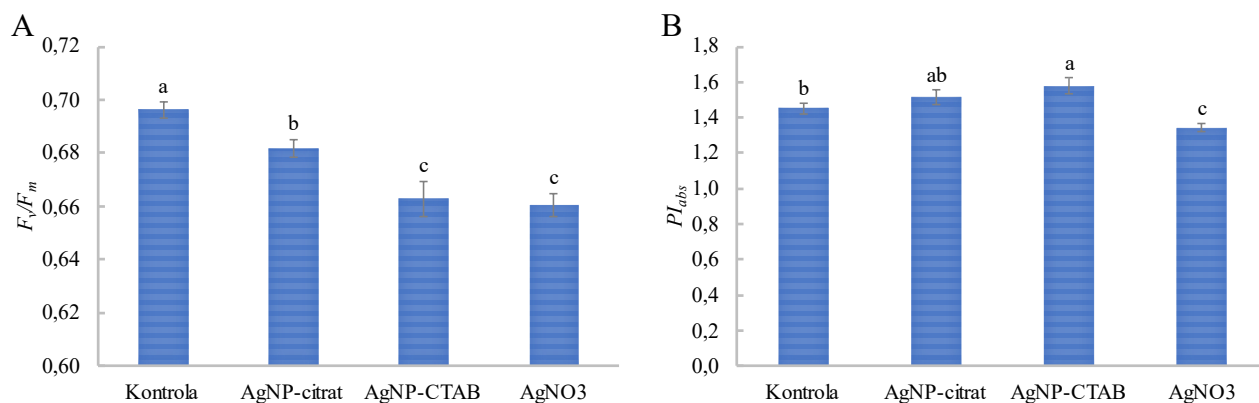
Niti jedan tretman sa srebrom nije izazvao značajne promjene u količini nastalog kisika u uvjetima mraka ($0 \mu\text{mol}_{\text{fotona}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) i obasjavanja svjetlom intenziteta $40 \mu\text{mol}_{\text{fotona}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, iako se uočava trend blagog pada zabilježene količine kisika nakon svih tretmana u odnosu na kontrolu. Pri intenzitetu osvjetljenja od 80 i $120 \mu\text{mol}_{\text{fotona}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ izmjerena je značajno i podjednako manja stopa fotosinteze nakon izlaganja svim tretmanima u odnosu na kontrolu (Slika 42).



Slika 42. Stopa fotosinteze u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja AgNP-citrat ($0,188 \text{ mg L}^{-1}$), AgNP-CTAB ($0,895 \text{ mg L}^{-1}$) i AgNO₃ ($0,130 \text{ mg L}^{-1}$) pri rastućim vrijednostima intenziteta svjetla (0, 40, 80 i $120 \mu\text{mol}_{\text{fotona}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti \pm standardna pogreška od tri ponavljanja. Tretmani koji se značajno razlikuju pri $p \leq 0,05$ (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

4.7.1.3 Fluorescencija klorofila *a*

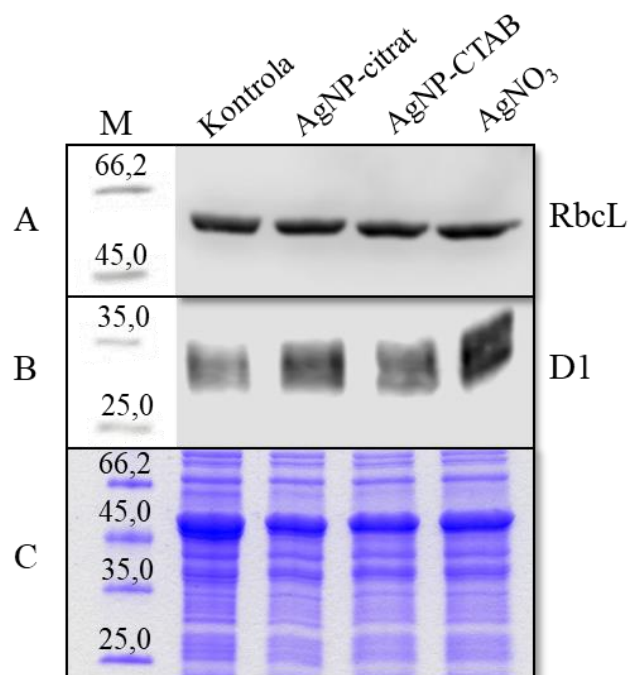
Svi tretmani sa srebrom značajno su smanjili maksimalni kvantni prinos PSII (F_v/F_m) u odnosu na kontrolu, što je bilo najjače izraženo nakon tretmana s AgNP-CTAB i AgNO₃ (Slika 43.A). S druge strane, vrijednost PI_{abs} (indeks učinkovitosti fotosinteze) značajno se smanjila nakon tretmana s AgNO₃, dok se povećala nakon tretmana s oba tipa AgNP u odnosu na kontrolu (Slika 43.B).



Slika 43. Maksimalni kvantni prinos PSII (F_v/F_m) (A) i indeks učinkovitosti fotosinteze (PI_{abs}) (B) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja AgNP-citrat ($0,188 \text{ mg L}^{-1}$), AgNP-CTAB ($0,895 \text{ mg L}^{-1}$) i AgNO₃ ($0,130 \text{ mg L}^{-1}$). Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti \pm standardna pogreška od dva različita eksperimenta, svaki sa 6 ponavljanja ($n = 12$). Tretmani koji se značajno razlikuju pri $p \leq 0,05$ (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

4.7.1.4 Ekspresija proteina RuBisCo i D1

Ekspresija proteina RuBisCo nije se značajno promijenila nakon niti jednog tretmana u odnosu na kontrolu (Slika 44.A). S druge strane, AgNP-citrat i AgNO₃ povećali su ekspresiju proteina D1, dok se njegova ekspresija nije značajno promijenila nakon tretman s AgNP-CTAB u odnosu na kontrolu (Slika 44.B).

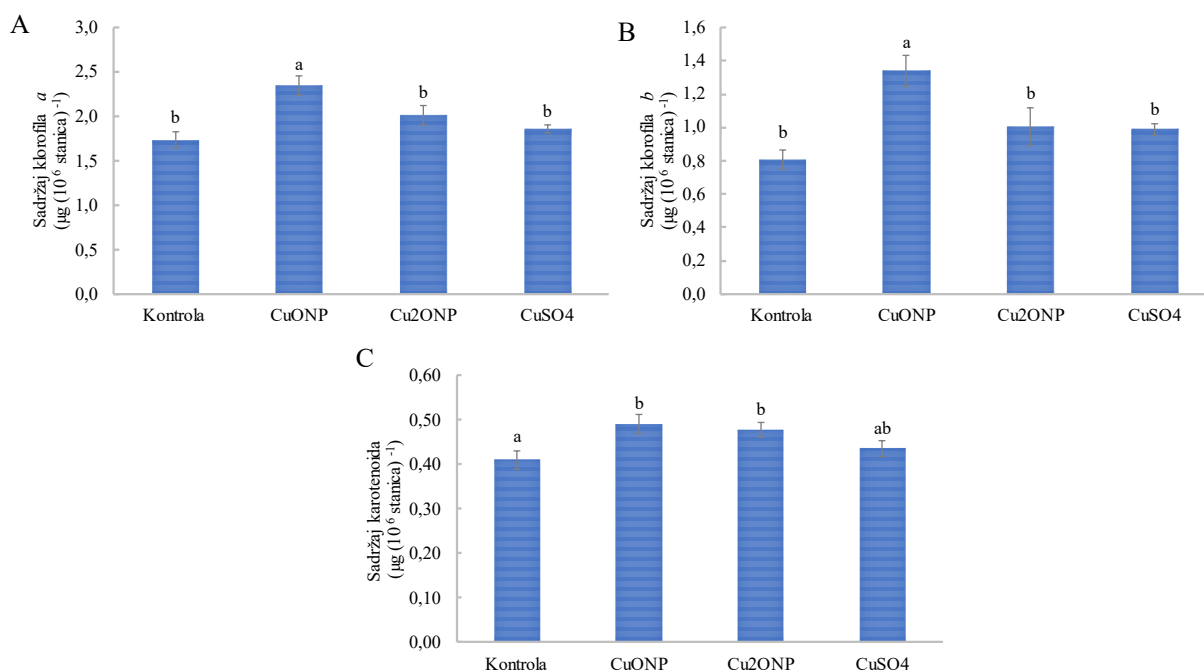


Slika 44. Imunodetekcija proteina RbcL (A) i D1 (B) te ukupni topivi proteini obojani bojom *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 (C) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja AgNP-citrat ($0,188 \text{ mg L}^{-1}$), AgNP-CTAB ($0,895 \text{ mg L}^{-1}$) i AgNO₃ ($0,130 \text{ mg L}^{-1}$). Proteini su razdvojeni 12%-tnom SDS-PAG elektroforezom, preneseni na nitroceluloznu membranu koja je potom inkubirana sa specifičnim primarnim antitijelima. M – biljezi molekularnih masa (kDa).

4.7.2 Nanočestice i ioni bakra

4.7.2.1 Količina fotosintetskih pigmenata klorofila *a* i *b* te karotenoida

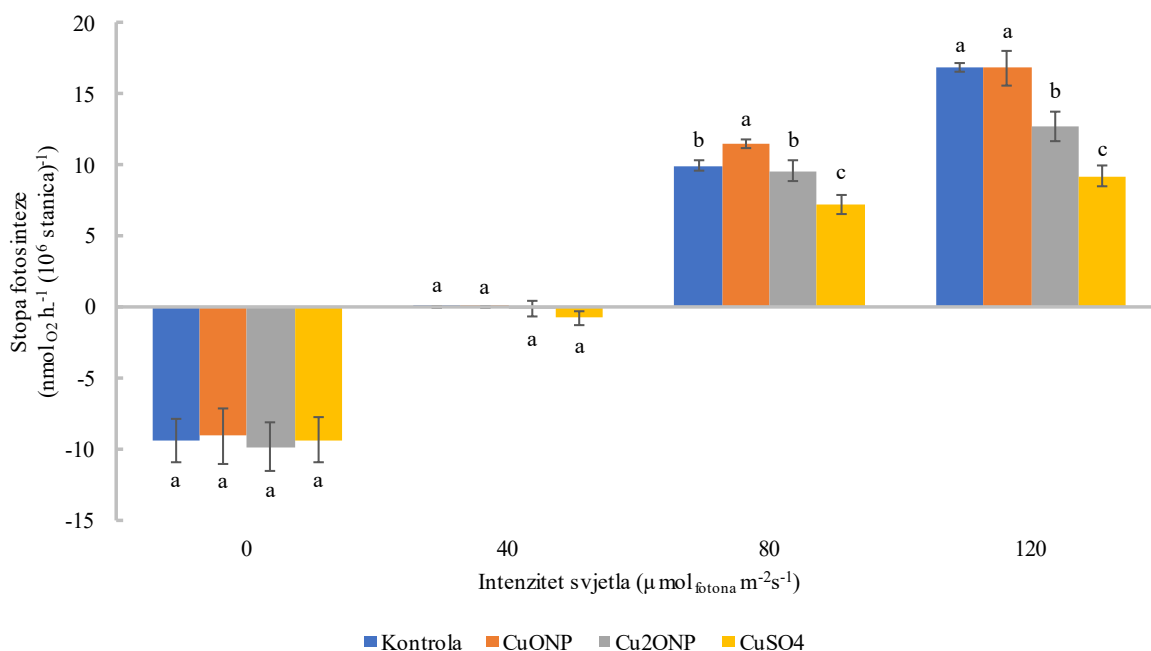
Analiza sadržaja količine fotosintetskih pigmenata klorofila *a* i *b* pokazala je sličan trend, budući da se sadržaj oba fotosintetska pigmenta značajno povećao samo nakon tretmana s CuONP, dok su druga dva tretmana rezultirala samo blagim povećanjem vrijednosti (Slika 45.A, B). S druge strane, svi tretmani sa srebrom povećali su sadržaj karotenoida u usporedbi s kontrolom, iako je povećanje bilo statistički značajno samo za tretmane s nanočesticama (Slika 45.C).



Slika 45. Sadržaj klorofila *a* (A), klorofila *b* (B) i karotenoida (C) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja CuONP (14,45 mg L⁻¹), Cu₂ONP (11,89 mg L⁻¹) i CuSO₄ (8,36 mg L⁻¹). Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti ± standardna pogreška od dva različita eksperimenta, svaki sa 6 ponavljanja (n = 12). Tretmani koji se značajno razlikuju pri p ≤ 0,05 (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

4.7.2.2 Stopa fotosinteze

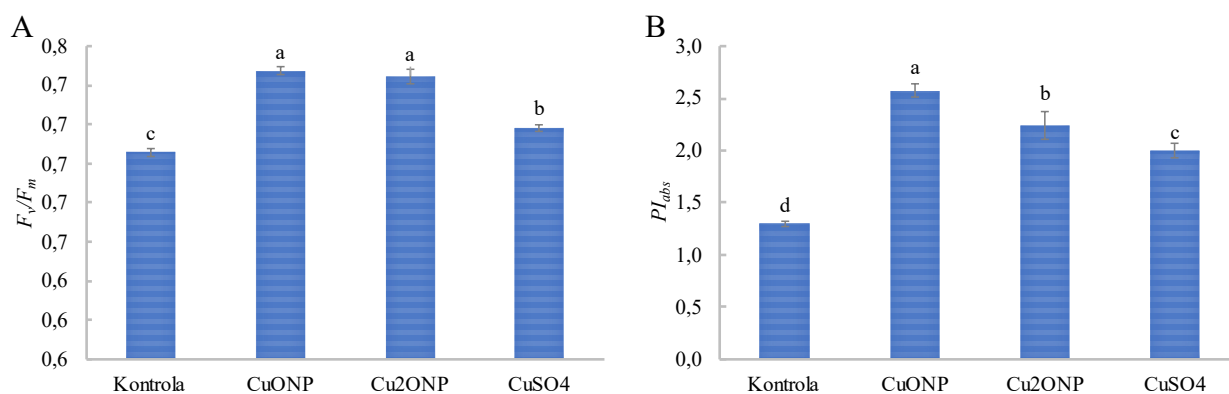
Niti jedan tretman s bakrom nije rezultirao značajnom promjenom u količini nastalog kisika u uvjetima mraka (0 µmol_{fotona} m⁻² s⁻¹) i obasjavanja svjetlom intenziteta 40 µmol_{fotona} m⁻² s⁻¹ (Slika 46). Pri intenzitetu osvjetljenja od 80 i 120 µmol_{fotona} m⁻² s⁻¹ mogao se uočiti donekle sličan trend; naime, pri intenzitetu svjetla od 80 µmol_{fotona} m⁻² s⁻¹ u usporedbi s kontrolom, tretman s CuONP značajno je povećao stopu fotosinteze, Cu₂ONP nije pokazao učinak, dok je tretman s CuSO₄ značajno smanjio stopu fotosinteze. Pri intenzitetu svjetla od 120 µmol_{fotona} m⁻² s⁻¹, tretman s CuONP nije rezultirao promjenom, dok su Cu₂ONP i CuSO₄ značajno smanjili stopu fotosinteze u usporedbi s kontrolom, s tim da je najveće smanjenje zabilježeno za CuSO₄.



Slika 46. Stopa fotosinteze u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja CuONP ($14,45 \text{ mg L}^{-1}$), Cu₂ONP ($11,89 \text{ mg L}^{-1}$) i CuSO₄ ($8,36 \text{ mg L}^{-1}$) pri rastućim vrijednostima intenziteta svjetla (0, 40, 80 i $120 \mu\text{mol}_{\text{fotona}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti \pm standardna pogreška od tri ponavljanja. Tretmani koji se značajno razlikuju pri $p \leq 0,05$ (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

4.7.2.3 Fluorescencija klorofila *a*

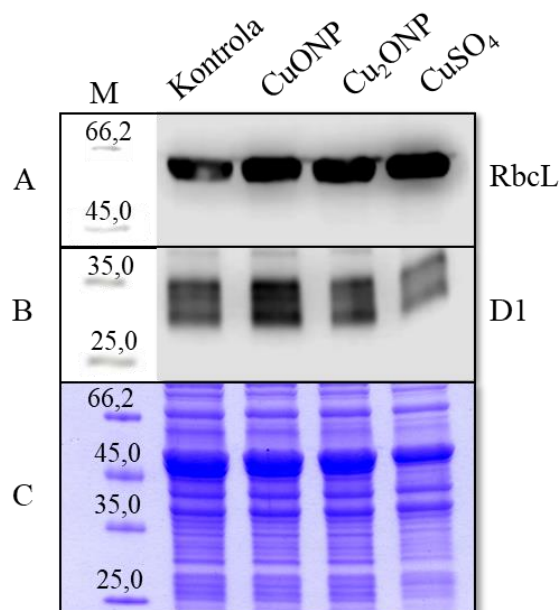
Svi tretmani sa srebrom povećali su oba parametra fluorescencije klorofila *a* u odnosu na kontrolu (Slika 47). Svi tretmani značajno su povećali vrijednost F_v/F_m , a najjači učinak zabilježen je nakon tretmana s nanočesticama (Slika 47.A). Što se tiče vrijednost PI_{abs} , ponovo su tretmani s nanočesticama imali jači učinak u usporedbi s CuSO₄, a tretman s CuONP rezultirao je najvećim povećanjem (Slika 47.B).



Slika 47. Maksimalni kvantni prinos PSII (F_v/F_m) (A) i indeks učinkovitosti fotosinteze (PI_{abs}) (B) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja CuONP (14,45 mg L⁻¹), Cu₂ONP (11,89 mg L⁻¹) i CuSO₄ (8,36 mg L⁻¹). Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti ± standardna pogreška od dva različita eksperimenta, svaki sa 6 ponavljanja (n = 12). Tretmani koji se značajno razlikuju pri p ≤ 0,05 (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

4.7.2.4 Ekspresija proteina RuBisCo i D1

Ekspresija proteina RuBisCo nije se značajno promijenila nakon niti jednog primijenjenog tretmana u odnosu na kontrolu (Slika 48.A). S druge strane, tretmani s CuONP i Cu₂ONP su povećali ekspresiju proteina D1, među kojima je tretman s CuONP rezultirao većim, a tretman s Cu₂ONP blažim povećanjem, dok je tretman s CuSO₄ smanjio ekspresiju proteina D1 u odnosu na kontrolu (Slika 48.B).

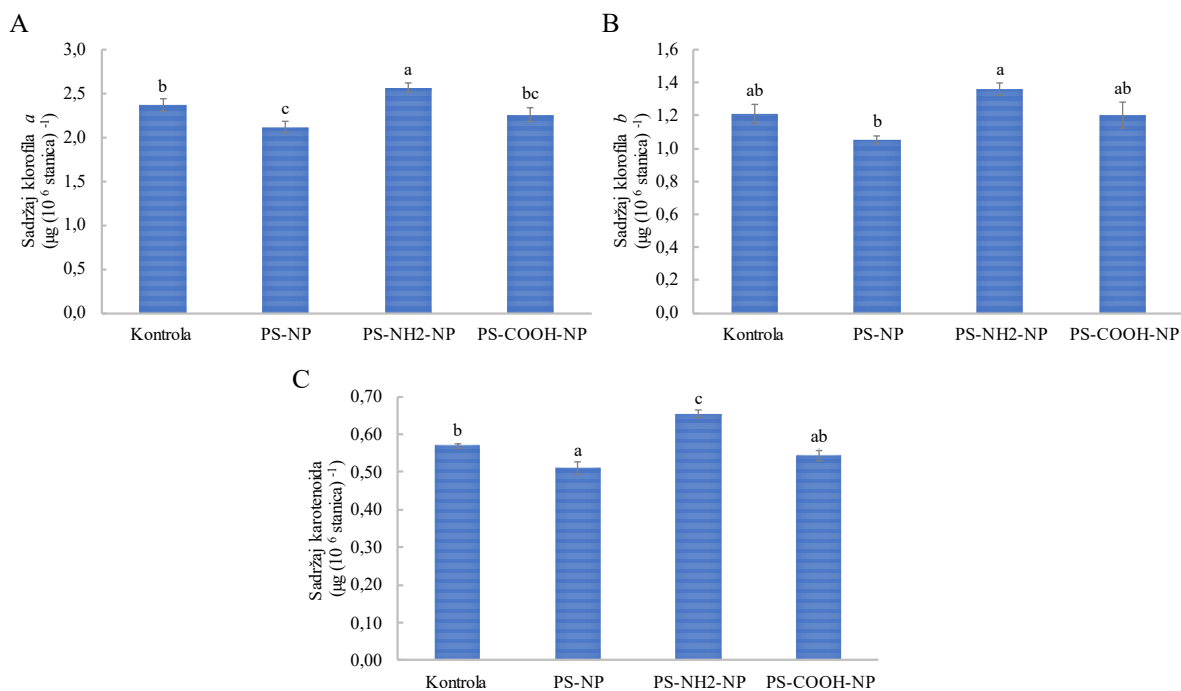


Slika 48. Imunodetekcija proteina RbcL (A) i D1 (B) te ukupni topivi proteini obojani bojom *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 (C) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja CuONP (14,45 mg L⁻¹), Cu₂ONP (11,89 mg L⁻¹) i CuSO₄ (8,36 mg L⁻¹). Proteini su razdvojeni 12%-tnom SDS-PAG elektroforezom, preneseni na nitroceluloznu membranu koja je potom inkubirana sa specifičnim primarnim antitijelima. M – biljezi molekulskih masa (kDa).

4.7.3 Nanočestice polistirena

4.7.3.1 Količina fotosintetskih pigmenata klorofila *a* i *b* te karotenoida

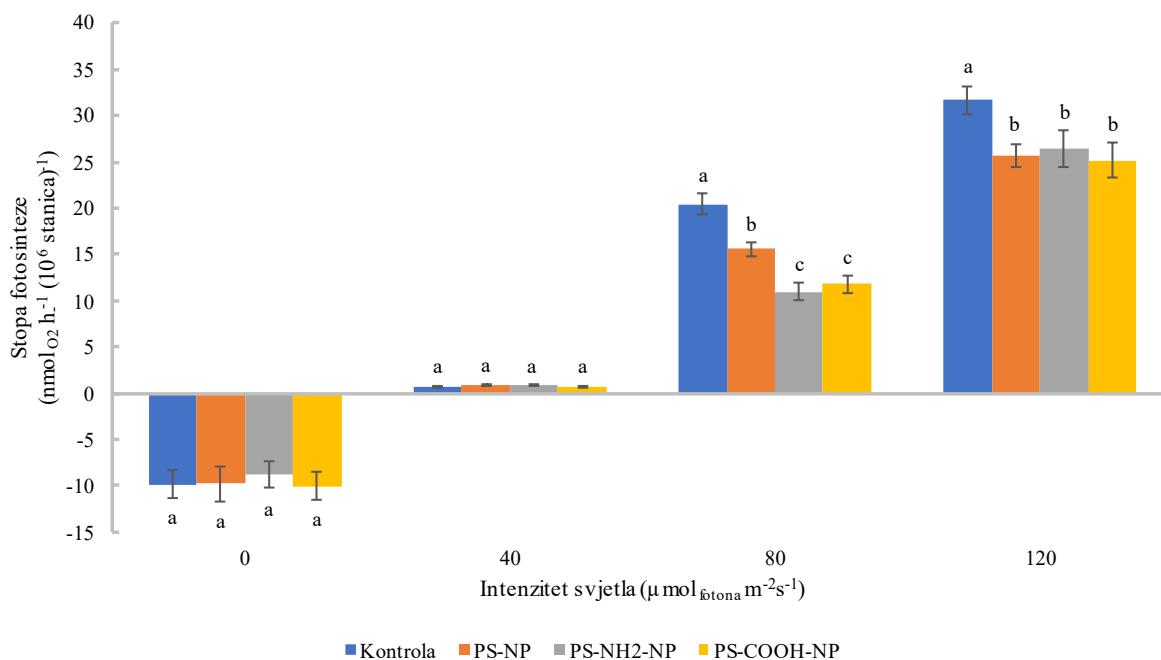
Analiza sadržaja fotosintetskih pigmenata pokazala je slične promjene za sva tri fotosintetska pigmenata (Slika 49). Sadržaj klorofila *a* i *b* te karotenoida značajno se povećao samo nakon tretmana s PS-NH₂-NP u odnosu na kontrolu; tretman s PS-NP značajno je smanjio sadržaj klorofila *a* i karotenoida te blago sadržaj klorofila *b*; dok PS-COOH-NP nije pokazao značajan učinak na sadržaj analiziranih pigmenata.



Slika 49. Sadržaj klorofila *a* (A), klorofila *b* (B) i karotenoida (C) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja 40 mg L⁻¹ PS-NP, PS-NH₂-NP ili PS-COOH-NP. Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti ± standardna pogreška od dva različita eksperimenta, svaki sa 6 ponavljanja (n = 12). Tretmani koji se značajno razlikuju pri p ≤ 0,05 (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

4.7.3.2 Stopa fotosinteze

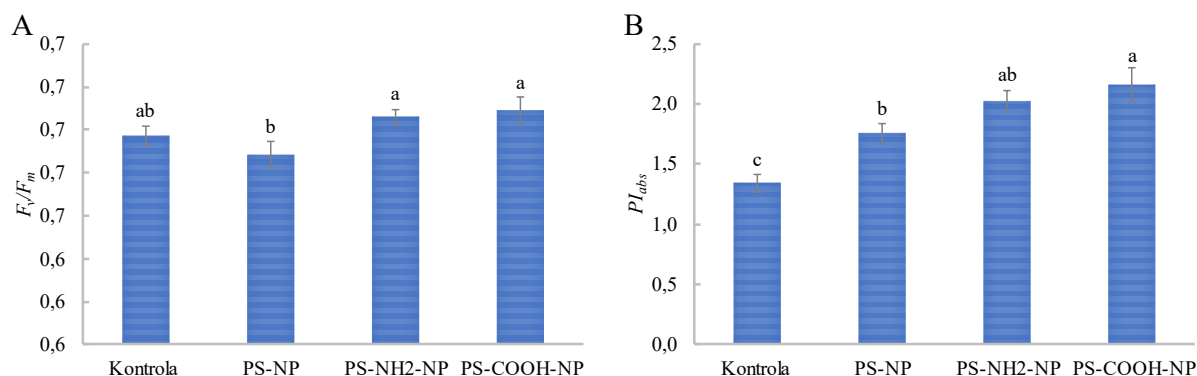
Tretmani s nanočesticama polistirena nisu izazvali značajne promjene u količini nastalog kisika u uvjetima mraka ($0 \mu\text{mol}_{\text{fotona}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) i intenziteta svjetla od $40 \mu\text{mol}_{\text{fotona}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Slika 50). Pri intenzitetu osvjetljenja od $80 \mu\text{mol}_{\text{fotona}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, svi tretmani smanjili su stopu fotosinteze u odnosu na kontrolu, što je bilo najjače izraženo za PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP. Pri intenzitetu svjetla od $120 \mu\text{mol}_{\text{fotona}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, svi tretmani su podjednako smanjili stopu fotosinteze u usporedbi s kontrolom.



Slika 50. Stopa fotosinteze u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja 40 mg L^{-1} PS-NP, PS-NH₂-NP ili PS-COOH-NP pri rastućim vrijednostima intenziteta svjetla (0, 40, 80 i $120 \mu\text{mol}_{\text{fotona}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti \pm standardna pogreška od tri ponavljanja. Tretmani koji se značajno razlikuju pri $p \leq 0,05$ (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

4.7.3.3 Fluorescencija klorofila *a*

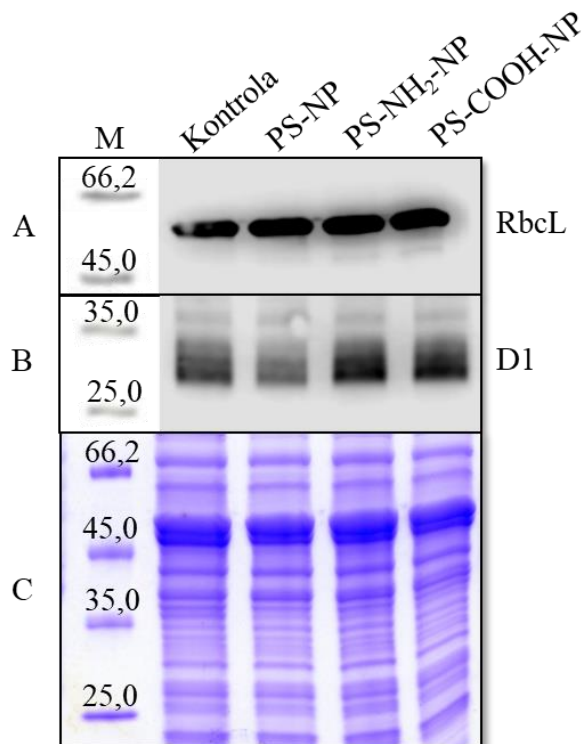
Niti jedan tretman s nanočesticama polistirena nije imao značajan utjecaj na promjenu vrijednosti F_v/F_m u odnosu na kontrolu (Slika 51.A), iako su čestice PS-NP pokazale značajno smanjenje u odnosu na nanočestice s funkcionalnim skupinama. S druge strane, svi tretmani značajno su povećali vrijednost PI_{abs} u odnosu na kontrolu, među kojima je tretman s PS-COOH-NP rezultirao najvećim, a tretman s PS-NP najmanjim povećanjem vrijednosti (Slika 51.B).



Slika 51. Maksimalni kvantni prinos PSII (F_v/F_m) (A) i indeks učinkovitosti fotosinteze (PI_{abs}) (B) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja 40 mg L⁻¹ PS-NP, PS-NH₂-NP ili PS-COOH-NP. Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti ± standardna pogreška od dva različita eksperimenta, svaki sa 6 ponavljanja (n = 12). Tretmani koji se značajno razlikuju pri p ≤ 0,05 (jednosmjerna ANOVA praćena Newman-Keulsovim post hoc testom) označeni su različitim slovima.

4.7.3.4 Ekspresija proteina RuBisCo i D1

Svi tretmani s nanočesticama polistirena rezultirali su podjednako blagim povećanjem ekspresije proteina RuBisCo u odnosu na kontrolu (Slika 52.A). S druge strane, tretmani s PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP izazvali su povećanje, a tretman s PS-NP smanjenje ekspresije proteina D1 u odnosu na kontrolu (Slika 52.B).



Slika 52. Imunodetekcija proteina RbcL (A) i D1 (B) te ukupni topivi proteini obojani bojom *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 (C) u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* i stanicama alge nakon 72 sata izlaganja 40 mg L^{-1} PS-NP, PS-NH₂-NP ili PS-COOH-NP. Proteini su razdvojeni 12%-tnom SDS-PAG elektroforezom, preneseni na nitroceluloznu membranu koja je potom inkubirana sa specifičnim primarnim antitijelima. M – biljezi molekulskih masa (kDa).

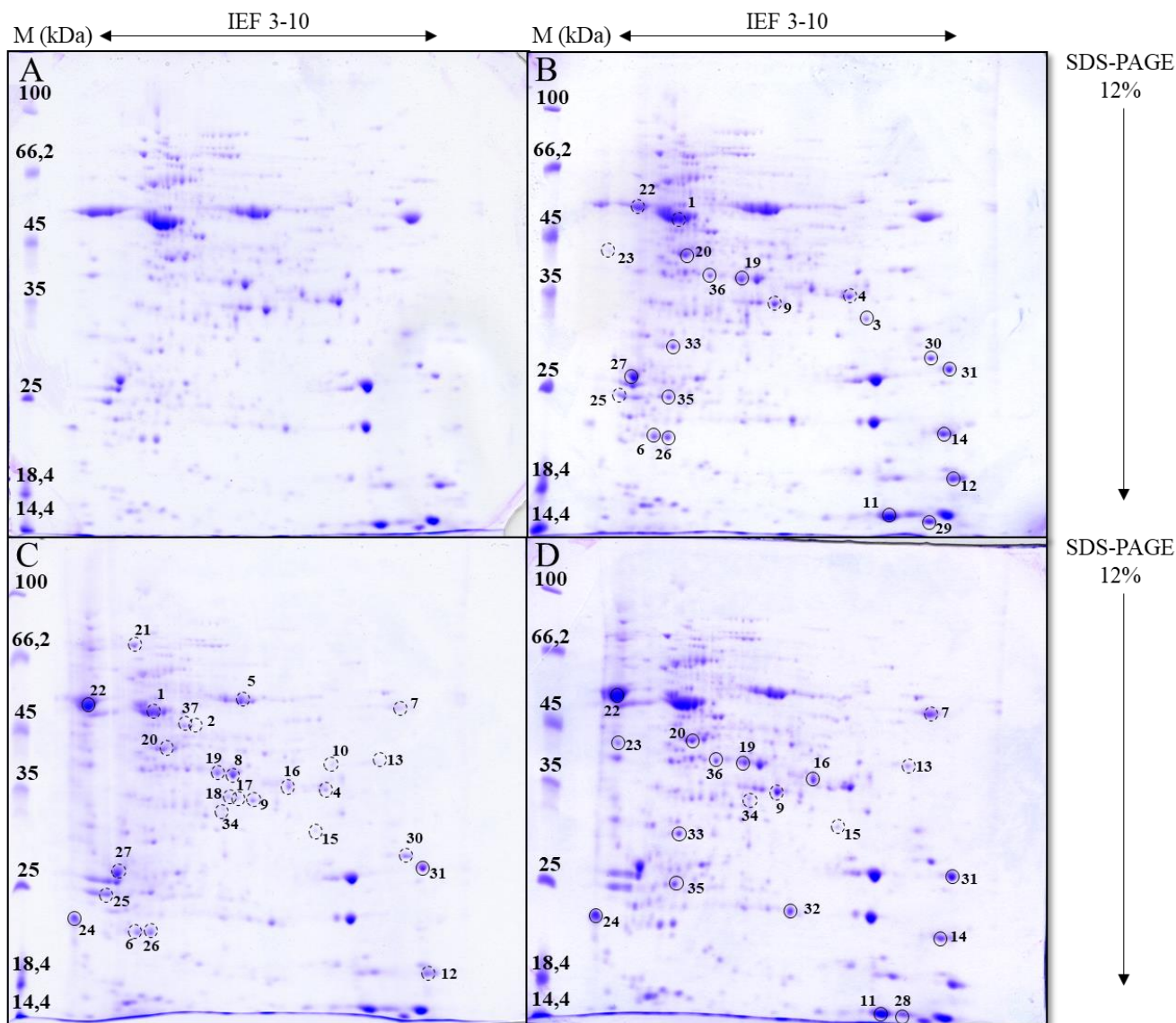
4.8 Utjecaj nanočestica i iona na diferencijalnu ekspresiju proteina

U cilju određivanja diferencijalno eksprimiranih proteina u stanicama alge *C. vulgaris* nakon njihovog izlaganja nanočesticama srebra i AgNO₃, nanočesticama bakra i CuSO₄ te nanočesticama polistirena primijenio sam tehniku 2-DE. Gelove sam računalno obradio te sam primjenom spektrometrije masa i proteinskih baza podataka identificirao one proteinske mrlje čiji se intenzitet ekspresije značajno razlikovao nakon određenog tretmana u odnosu na kontrolu.

4.8.1 Nanočestice i ioni srebra

4.8.1.1 Promjene u proteomu

Nakon tretmana s oba tipa AgNP i AgNO₃, u stanicama alge *C. vulgaris* detektirao sam ukupno 37 proteinskih mrlji čija se ekspresija razlikovala u odnosu na kontrolu te ih identificirao spektrometrijom masa (Slika 53). Nakon tretmana s AgNP-citrat identificiran je 21 diferencijalno eksprimirani protein, od kojih je 15 proteina imalo povećanu, a 6 smanjenju ekspresiju u odnosu na kontrolu (Slika 53. B). Nakon izlaganja česticama AgNP-CTAB, zabilježio sam najveći broj diferencijalno eksprimiranih proteina (27), od čega 24 sa smanjenom, a samo tri proteina s povećanom ekspresijom u usporedbi s kontrolom (Slika 53.C). Nakon tretmana s AgNO₃, zabilježeno je ukupno 20 proteina s različitom ekspresijom u odnosu na kontrolu, pri čemu je 14 proteina pokazalo povećanu, a pet proteina smanjenu ekspresiju (Slika 53.D).



Slika 53. Ukupni topivi proteini u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* (A) te stanicama alge nakon 72 sata izlaganja AgNP-citrat ($0,188 \text{ mg L}^{-1}$) (B), AgNP-CTAB ($0,895 \text{ mg L}^{-1}$) (C) i AgNO_3 ($0,130 \text{ mg L}^{-1}$) (D), razdvojeni 2-D elektroforezom. M – biljezi molekularnih masa (kDa), IEF 3-10 – relativan položaj proteina u gelu u odnosu na vrijednost njihove izoelektrične točke, SDS-PAGE – relativan položaj proteina u gelu u odnosu na njihove molekularne mase. Proteini čija se ekspresija statistički značajno razlikuje od kontrole ($p \leq 0,05$) označeni su brojevima 1-37. Proteini s povećanom ekspresijom u odnosu na kontrolu označeni su punim (●), a oni sa smanjenom ekspresijom isprekidanim kružnicama (○).

4.8.1.2 Klasifikacija diferencijalno eksprimiranih proteina

Pretragom baza podataka identificirano je svih 37 diferencijalno eksprimiranih proteina (Tablica 19). Od ukupnog broja, pet proteina pokazalo je promjenu u ekspresiji nakon svih tretmana srebrom. Nadalje, 8 proteina bilo je diferencijalno eksprimirano samo nakon tretmana s oba tipa AgNP, među kojima je tretman s AgNP-citrat izazvao povećanu, a tretman s AgNP-CTAB smanjenu ekspresiju većine proteina u odnosu na kontrolu. Nakon tretmana s AgNP-citrat i AgNO₃, 6 proteina je bilo diferencijalno eksprimirano u odnosu na kontrolu, među kojima je većina proteina pokazala povećanu ekspresiju nakon oba tretmana. Nakon tretmana s AgNP-CTAB i AgNO₃, također je za 6 proteina zabilježena promijenjena, uglavnom smanjena ekspresija. Nadalje, po dva su proteina imala povećanu ekspresiju nakon tretmana samo s AgNP-citrat ili s AgNO₃, dok je za 8 proteina zabilježena smanjena ekspresija tek nakon tretmana s AgNP-CTAB u odnosu na kontrolu.

Korištenjem baze podataka *UniProt* i alata *ProtParam*, identificiranim proteinima pronašao sam podatke o njihovoj molekularnoj masi, izoelektričnoj točki, staničnoj lokalizaciji, molekularnoj funkciji i biološkom procesu u kojem sudjeluju po kojima sam ih i kategorizirao. Navedeni podaci se nalaze u Tablici 19.

Tablica 19. Diferencijalno eksprimirani proteini, njihova stanična lokalizacija te biološka i molekularna funkcija u stanicama alge *C. vulgaris* nakon 72 sata izlaganja AgNP-citrat (0,188 mg L⁻¹), AgNP-CTAB (0,895 mg L⁻¹) i AgNO₃ (0,130 mg L⁻¹). Strelica prema gore (↑) označava pojačanu, strelica prema dolje (↓) smanjenu, a znak jednako (=) podjednaku ekspresiju u usporedbi s kontrolom. pI – izoelektrična točka, M – molekulska masa.

Oznaka proteinske mrlje	Naziv proteina	pI	M (kDa)	Lokalizacija	Biološki proces	Molekularna funkcija	Diferencijalna ekspresija		
							AgNP-citrat	AgNP-CTAB	AgNO ₃
Fotosinteza									
1	Beta ugljična anhidraza	5,74	51,9	Stroma kloroplasta	Fotosinteza	Povećavanje koncentracije CO ₂ oko enzima RuBisCo, ugljična anhidraza/metaloenzim	↓	↓	=
3	Protein PsbP	9,22	26,4	Tilakoidna membrana kloroplasta (PSII)	Fotosinteza, PSII	Dobivanje kisika	↑	=	=
5	Ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza, velika podjedinica	5,99	52,5	Tilakoidna membrana kloroplasta	Fotosinteza, fotorespiracija	Fiksacija CO ₂	=	↓	=
11 28	Ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza, mala podjedinica	9,32 9,44	20,12 20,04	Tilakoidna membrana kloroplasta	Fotosinteza, fotorespiracija	Fiksacija CO ₂	↑ =	= =	↑ ↑
12	Protein reakcijskog centra PSI, podjedinica 2	9,71	20,72	Tilakoidna membrana kloroplasta	Fotosinteza	Stvaranje kompleksa s feredoksinom i feredoksin-oksido-reduktazom	↑	=	=

Tablica 19. Nastavak

15		6,77	31,36				=	↓	↓
25	Klorofil a-b vezujući protein	4,85	26,85	Tilakoidna membrana kloroplasta (PSI i PSII)	Fotosinteza	Vežanje klorofila	↓	↓	=
34		6,19	30,70				=	↓	↓
6		5,93	22,94				↑	↓	=
26		5,93	22,94				↑	↓	=
27	Protein PsbO2	5,16	30,72	Tilakoidna membrana kloroplasta	Fotosinteza	Dobivanje kisika	↑	↓	=
29	Protein reakcijskog centra PSI, podjedinica 4	9,98	10,89	Tilakoidna membrana kloroplasta (PSI)	Fotosinteza	Pomaže spajanje feredoksina s PSI i feredoksin-NADP s oksidoreduktazom	↑	=	=
<i>Transport elektrona i dobivanje energije</i>									
10	ATP sintaza gama lanac	8,95	39,38	Tilakoidna membrana kloroplasta	Sinteza ATP-a, transport iona	Translokaza	=	↓	=
22	ATP sintaza, podjedinica beta	4,93	51,64	Tilakoidna membrana kloroplasta	Sinteza ATP-a, transport iona	Translokaza	↓	↑	↑
<i>Metabolizam ugljikohidrata</i>									
8	Fruktoza-bisfosfat aldolaza	6,49	40,95	Kloroplast, citoplazma	Glikoliza	Liza ugljikohidrata	=	↓	=
13	Glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza	9,05	43,20	Citoplazma	Glikoliza	Oksidoreduktaza	=	↓	↓
16		5,91	36,07				=	↓	↑
19	Malat dehidrogenaza	5,74	34,77	Citoplazma, mitohondrij	Ciklus limunske kiseline	Oksidoreduktaza	↑	↓	↑
20	Fosfoglicerat kinaza	6,93	48,48	Citoplazma	Glikoliza	Vežanje ATP-a, fosfoglicerat kinazna aktivnost	↑	↓	↑

Tablica 19. Nastavak

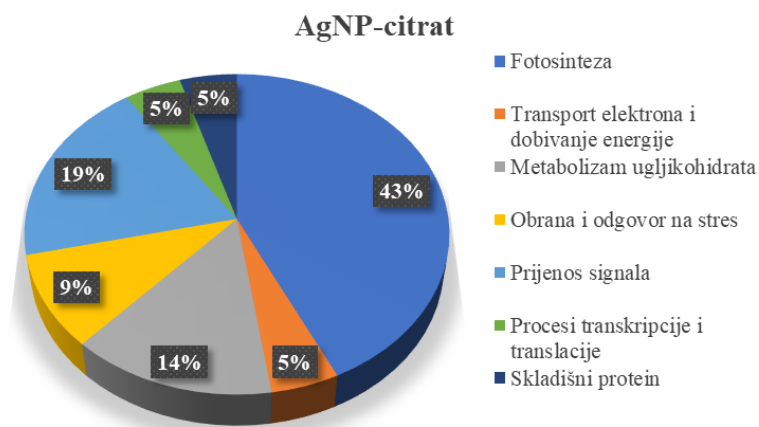
36	NADP-ovisna oksidoreduktaza	7,57	33,31	Citoplazma	Metabolizam malih molekula i organskih tvari	Oksidoreduktaza	↑	=	↑
<i>Obrana i odgovor na stres</i>									
21	Protein toplinskog šoka 70B	5,15	72,08	Citoplazma, endosomi	Odgovor na stres, smatanje proteina	Vežanje ATP-a, šaperon - vežanje proteina u nesmotanom stanju	=	↓	=
31	Protein <i>Antifreeze</i>	9,68	27,43	Citoplazma	Odgovor na stres, inhibicija rekristalizacije leda, obrana od patogena	Vežanje za čestice leda, termalna histereza	↑	↑	↑
32	Superoksid dismutaza	8,63	26,06	Citoplazma, kloroplast, mitohondrij, peroksisomi	Odgovor na oksidacijski stres	Vežanje metala, oksidoreduktaza, dismutaza superoksidnog radikala	=	=	↑
35	Laktat dehidrogenaza	4,98	24,34	Citoplazma	Odgovor na stres	Glikozilazna aktivnost između laktata i metilglioksala	↑	=	↑
<i>Prijenos signala</i>									
4		8,78	40,69				↓	↓	=
9	Protein kinaza ovisna o kalciju i kalmodulinu	7,71	38,49	Citoplazma	Prijenos signala	Vežanje ATP-a, protein serin treonin kinazna aktivnost	↓	↓	↓
17		7,71	38,49				=	↓	=
18		7,71	38,49				=	↓	=
23	Rodanaza	4,63	39,45	Mitohondrij	Odgovor na stimulans iona Ca ²⁺	Transport sumpora	↓	=	↑
30	Ionski kanal ovisan o naponu	8,51	28,73	Vanjska membrana mitohondrija	Transport iona, signala i kalcija	Ionski kanal	↑	↓	=
<i>Procesi transkripcije i translacije</i>									

Tablica 19. Nastavak

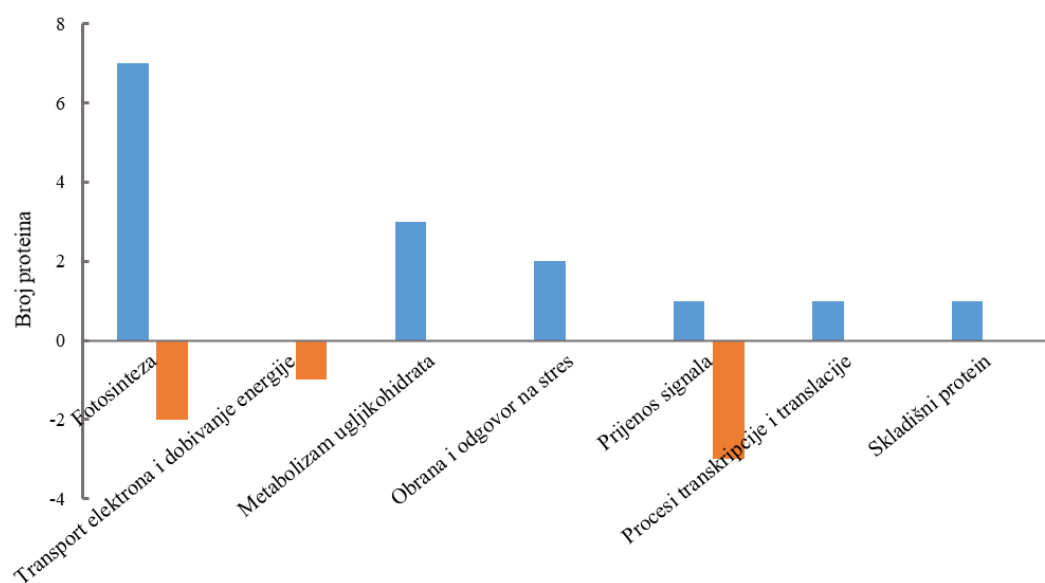
7	Translacijska GTPaza	8,73	50,82	Citoplazma	Biosinteza proteina	Vežanje GTP-a za spajanje aminoacil-tRNA za ribosom	=	↓	↓
37 2	Elongacijski faktor Tu	5,36 5,36	44,9 44,9	Mitohondrij, kloroplast	Sinteza proteina, translacija	Vežanje GTP-a, GTP-aza	=	↓ ↓	=
33	<i>RRM domain-containing protein</i>	5,07	25,57	Jezgra, ribosomi	Translacija, procesiranje mRNA	Vežanje RNA	↑	=	↑
<i>Skladišni protein</i>									
14	Kupin tip 1	9,26	21,9	Citoplazma	Skladišni protein	Skladištenje hranjivih tvari	↑	=	↑
<i>Mehanička potpora stanice</i>									
24	Aktin	5,3	41,77	Citoskelet	Održavanje stanične strukture	Hidrolaza	=	↑	↑

Nakon izlaganja stanica alge *C. vulgaris* tretmanu s AgNP-citrat, najviše diferencijalno eksprimiranih proteina bilo je iz kategorije Fotosinteza (43%) (Slika 54.A), od kojih je za 6 proteina povezanih sa PSI i PSII te za malu podjedinicu proteina RuBisCo zabilježena pojačana, a za dva proteina povezana s PSI i PSII te za beta ugljičnu anhidrazu, koja povećava koncentraciju CO₂ oko enzima RuBisCo, smanjena ekspresija u odnosu na kontrolu (Slika 54.B). Sljedeći po zastupljenosti bili su proteini uključeni u Prijenos signala (19%). Dvije protein kinaze te protein rodanaza, osjetljiv na koncentraciju iona Ca²⁺, bili su slabije eksprimirani u odnosu na kontrolu, dok je proteinski ionski kanal bio pojačano eksprimiran. Nadalje, diferencijalno eksprimirani proteini nakon tretmana s AgNP-citrat svrstani su i u kategoriju Metabolizam ugljikohidrata (14%), iz koje je po jedan protein uključen u proces glikolize, ciklusa limunske kiseline i razgradnju malih molekula i za sve je zabilježena pojačana ekspresija u odnosu na kontrolu. Sljedeća kategorija po zastupljenosti je Obrana i odgovor na stres (9%), gdje su oba identificirana proteina uključena u obranu od patogena i odgovora na stresne uvjete pokazala povećanu ekspresiju. Preostale kategorije Skladišni proteini, Procesi transkripcije i translacije te Transport elektrona i dobivanja energije imale su jednaku zastupljenost diferencijalno eksprimiranih proteina od 5%. Za proteine uključene u skladištenje energije i u proces transkripcije zabilježena je pojačana ekspresija, dok je za protein ATP sintazu, koja je uključena u transport elektrona, zabilježena smanjena ekspresija u odnosu na kontrolu.

A

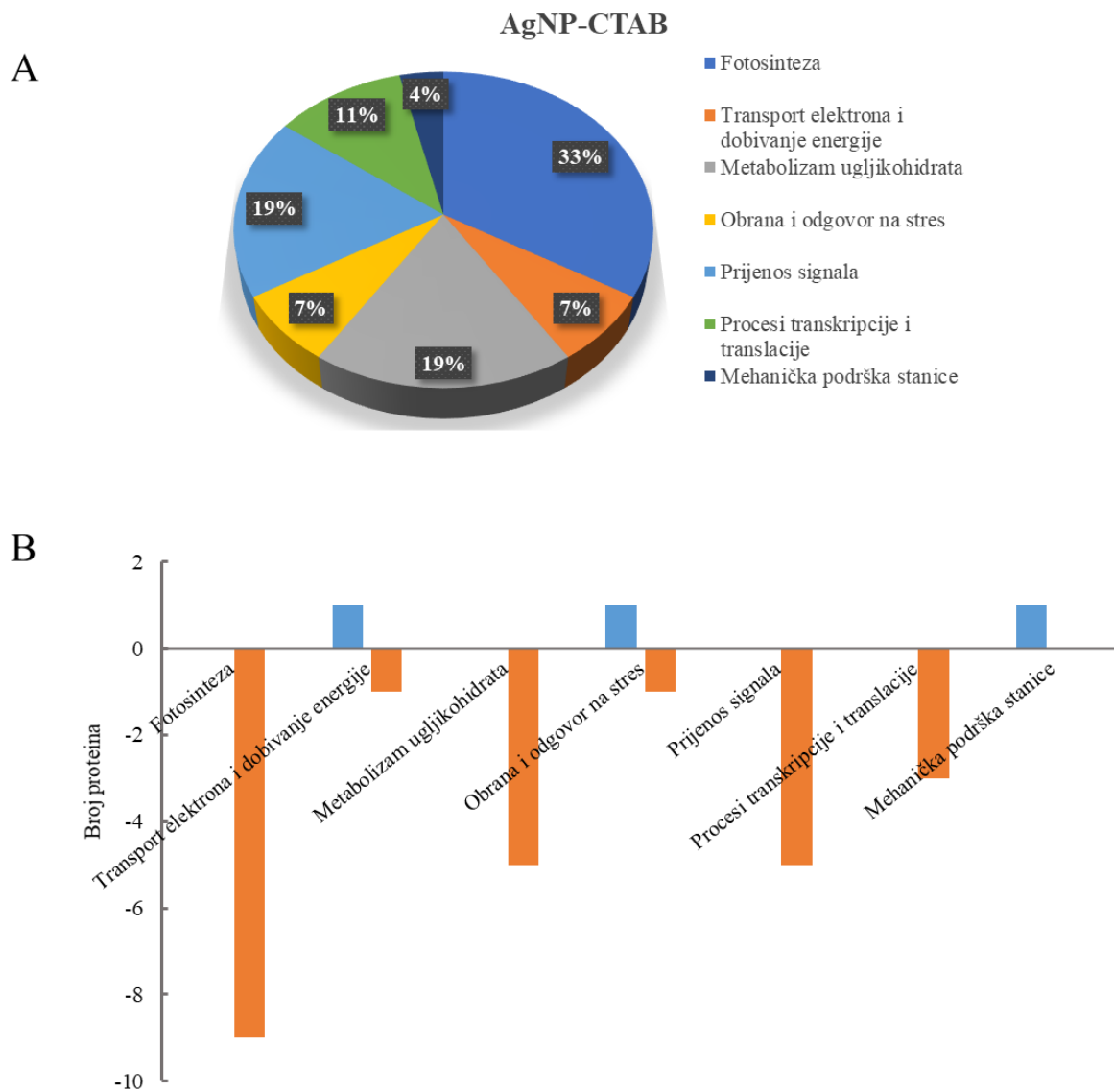


B



Slika 54. Zastupljenost funkcionalnih kategorija diferencijalno eksprimiranih proteina u stanicama alge *C. vulgaris* (A) i broj proteina u pojedinim funkcionalnim kategorijama s pojačanom (pozitivna os ordinate) ili smanjenom (negativna os ordinate) ekspresijom (B) nakon 72 sata izlaganja $0,188 \text{ mg L}^{-1}$ AgNP-citrat u odnosu na kontrolu.

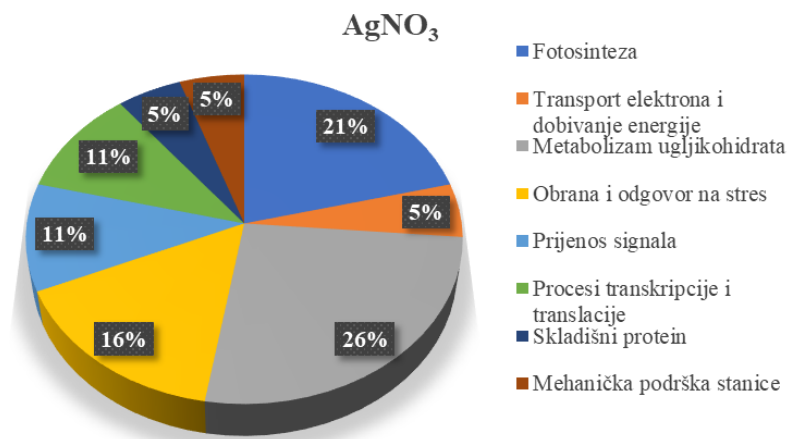
Nakon tretmana s AgNP-CTAB, najviše diferencijalno eksprimiranih proteina iz alge *C. vulgaris* zabilježeno je u kategoriji Fotosinteza (33%) (Slika 55.A), iz koje je za svih 9 proteina uključenih u procese na PSI i PSII, veliku podjedinicu enzima RuBisCo i beta ugljičnu anhidrazu koja djeluje sinergistički uz RuBisCo, zabilježena smanjena ekspresija u odnosu na kontrolu (Slika 55.B). Iduće kategorije po zastupljenosti su Prijenos signala te Metabolizam ugljikohidrata, obje s 19%. Proteini uključeni u Prijenos signala su pretežito protein kinaze uz ionski kanal ovisan o naponu, dok su proteini iz kategorije Metabolizma ugljikohidrata ponajviše uključeni u proces glikolize uz jedan protein uključen u ciklus limunske kiseline. Za sve proteine iz obje navedene kategorije zabilježena je smanjena ekspresija u odnosu na kontrolu. Idući po redu zastupljenosti su proteini iz kategorije Procesi transkripcije i translacije, među kojima je za sva tri proteina uključena u biosintezu proteina zabilježena smanjena ekspresiju. Kategorije Obrana i odgovor na stres te Transport elektrona i dobivanje energije zastupljene su jednakim postotkom diferencijalno eksprimiranih proteina (7%). Iz kategorije Obrane i odgovara na stres, protein toplinskog šoka 70B (Hsp70B) pokazao je smanjenu ekspresiju, dok je za protein uključen u očuvanje integriteta stanica u stresnim uvjetima (protein *Antifreeze*) zabilježena povećana ekspresija u odnosu na kontrolu. Slično, iz kategorije Transport elektrona i dobivanje energije, beta podjedinica ATP sintaze pokazala je povećanu ekspresiju, dok je za gama lanac ATP sintaze zabilježena smanjena ekspresiju. U konačnici, najmanje proteina identificirano je iz kategorije Mehaničke podrške stanice, gdje je identificiran aktin koji je važan dio citoskeleta, a pokazao je povećanu ekspresiju u odnosu na kontrolu.



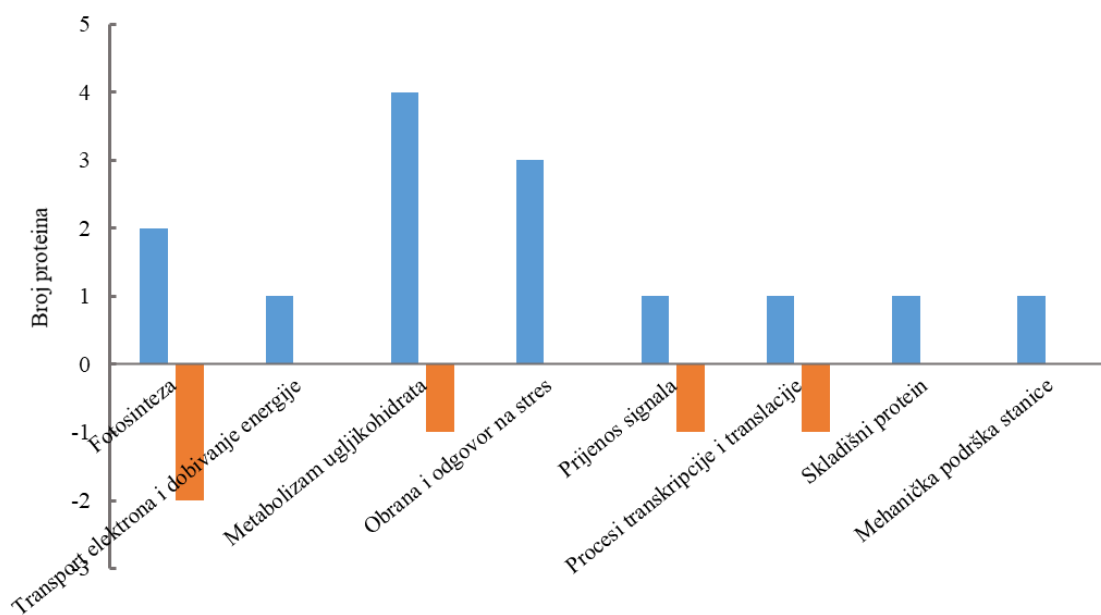
Slika 55. Zastupljenost funkcionalnih kategorija diferencijalno eksprimiranih proteina u stanicama alge *C. vulgaris* (A) i broj proteina u pojedinim funkcionalnim kategorijama s pojačanom (pozitivna os ordinate) ili smanjenom (negativna os ordinate) ekspresijom (B) nakon 72 sata izlaganja $0,895 \text{ mg L}^{-1}$ AgNP-CTAB u odnosu na kontrolu.

Nakon izlaganja stanica alge *C. vulgaris* tretmanu s AgNO_3 , najviše diferencijalno eksprimiranih proteina pripadalo je kategoriji Metabolizam ugljikohidrata (26%) (Slika 56.A), među kojima ja za proteine NADP-ovisna oksidoreduktazu, malat dehidrogenazu te dva proteina uključena u proces glikolize zabilježena povećana ekspresija, dok je protein gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, uključen u proces glikolize, pokazao smanjenu ekspresiju u odnosu na kontrolu (Slika 56.B). Sljedeću kategoriju po zastupljenosti čine proteini uključeni u proces Fotosinteze (21%), od kojih je za dva proteina uključena u vezanje klorofila na PSI i PSII zabilježena smanjena ekspresija, dok je za malu podjedinicu enzima RuBisCo zabilježena povećana ekspresija. Proteini povezani s Obranom i odgovorom na stres bili su zastupljeni sa 16% i za sve je zabilježena pojačana ekspresija. Iduće po zastupljenosti bile su kategorije proteina uključenih u Prijenos signala i Procese transkripcije i translacije, svaka s 11%. Za protein kinazu koja sudjeluje u prijenosu signala je zabilježena smanjena ekspresija, dok je za protein uključen u transport sumpora zabilježena povećana ekspresija u odnosu na kontrolu. Unutar kategorije Proces transkripcije i translacije, GTPaza uključena u translaciju pokazala je smanjenu ekspresiju, dok je protein s domenom za prepoznavanje RNA motiva (eng. *RNA recognition motif*, RRM) (*RRM domain-containing protein*) imao povećanu ekspresija u odnosu na kontrolu. Ostali proteini u kategorijama Transport elektrona i dobivanje energije, Skladišni proteini i Mehanička potpora stanice su bili jednako zastupljeni među diferencijalno eksprimiranim proteinima sa po 5%. Među njima, za beta podjedinicu ATP sintaze (kategorija Transport elektrona i dobivanje energije), za protein uključen u skladištenje hranjivih tvari (kategorija Skladišni proteini) i za aktin, uključen u održavanje stanične strukture (kategorija Mehanička potpora stanice) zabilježena je povećana ekspresija u odnosu na kontrolu.

A



B

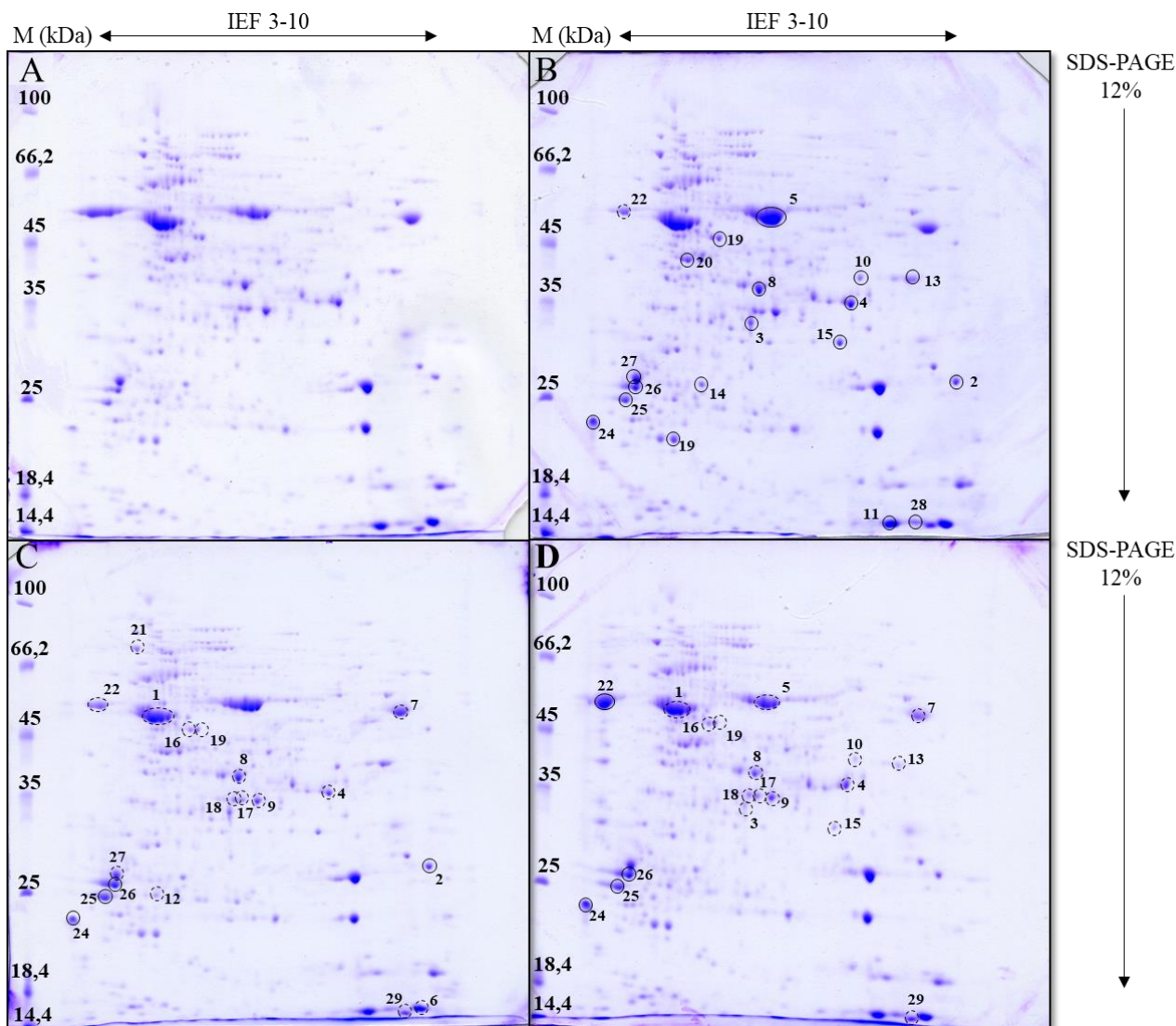


Slika 56. Zastupljenost funkcionalnih kategorija diferencijalno eksprimiranih proteina u stanicama alge *C. vulgaris* (A) i broj proteina u pojedinim funkcionalnim kategorijama s pojačanom (pozitivna os ordinate) ili smanjenom (negativna os ordinate) ekspresijom (B) nakon 72 sata izlaganja $0,130 \text{ mg L}^{-1} \text{ AgNO}_3$ u odnosu na kontrolu.

4.8.2 Nanočestice i ioni bakra

4.8.2.1 Promjene u proteomu

Nakon tretmana s CuONP i Cu₂ONP te s CuSO₄, u stanicama alge *C. vulgaris* detektirano je ukupno 29 proteinskih mrlja čija se ekspresija razlikovala u odnosu na kontrolu i sve su identificirane spektrometrijom masa (Slika 57). Nakon tretmana s CuONP, od ukupno 19 diferencijalno eksprimiranih proteina, za 18 ih je zabilježena povećana ekspresija, dok je za samo jedan protein zabilježena smanjena ekspresija u odnosu na kontrolu (Slika 57.B). Nakon tretmana s Cu₂ONP detektirano je ukupno 19 diferencijalno eksprimiranih proteina, pri čemu je za četiri proteina zabilježena povećana ekspresija, dok je 15 pokazalo smanjenu ekspresiju (Slika 57.C). Isti rezultat dobiven je i nakon tretmana s CuSO₄, gdje je od ukupno 19 diferencijalno eksprimiranih proteina, za njih četiri zabilježena povećana, a za 15 proteina smanjena ekspresija u odnosu na kontrolu (Slika 57.D).



Slika 57. Ukupni topivi proteini u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* (A) te stanicama alge nakon 72 sata izlaganja CuONP ($14,45 \text{ mg L}^{-1}$) (B), Cu₂ONP ($11,89 \text{ mg L}^{-1}$) (C) i CuSO₄ ($8,36 \text{ mg L}^{-1}$) (D), razdvojeni 2-D elektroforezom. M – biljezi molekularnih masa (kDa), IEF 3-10 – relativan položaj proteina u gelu u odnosu na vrijednost njihove izoelektrične točke, SDS-PAGE – relativan položaj proteina u gelu u odnosu na njihove molekularne mase. Proteini čija se ekspresija statistički značajno razlikuje od kontrole ($p \leq 0,05$) označeni su brojevima 1-29. Proteini s povećanom ekspresijom u odnosu na kontrolu označeni su punim (○), a oni sa smanjenom ekspresijom isprekidanim kružnicama (⊙).

4.8.2.2 Klasifikacija diferencijalno eksprimiranih proteina

Od ukupno 29 identificiranih proteina s diferencijalnom ekspresijom nakon tretmana s CuONP, Cu₂ONP te s CuSO₄, samo 7 ih je diferencijalno eksprimirano nakon svih primijenjenih tretmana, od kojih su tri pokazala povećanu ekspresiju (Tablica 20). Samo nakon tretmana s CuONP i Cu₂ONP zabilježena su dva proteina s promijenjenom ekspresijom u odnosu na kontrolu, među kojima je tretman s CuONP izazvao povećanu ekspresiju oba navedena proteina. Samo nakon tretmana s CuONP i CuSO₄, pet proteina je bilo diferencijalno eksprimirano u odnosu na kontrolu, među kojima je tretman s CuONP izazvao povećanu, a tretman s CuSO₄ smanjenu ekspresiju svih navedenih proteina. Nadalje, za 7 proteina zabilježena je smanjena ekspresija u odnosu na kontrolu samo nakon tretmana s Cu₂ONP i CuSO₄. Dodatno, za pet proteina je zabilježena povećana ekspresija samo nakon tretmana s CuONP, dok je za tri proteina zabilježena smanjena ekspresija u odnosu na kontrolu samo nakon tretmana s Cu₂ONP.

Tablica 20. Diferencijalno eksprimirani proteini, njihova stanična lokalizacija te biološka i molekularna funkcija u stanicama alge *C. vulgaris* nakon 72 sata izlaganja CuONP (14,45 mg L⁻¹), Cu₂ONP (11,89 mg L⁻¹) i CuSO₄ (8,36 mg L⁻¹). Strelica prema gore (↑) označava pojačanu, strelica prema dolje (↓) smanjenu, a znak jednako (=) podjednaku ekspresiju u usporedbi s kontrolom. pI – izoelektrična točka, M – molekulska masa.

Oznaka proteinske mrlje	Ime proteina	pI	M (kDa)	Lokalizacija	Biološki proces	Molekularna funkcija	Diferencijalna ekspresija		
							CuONP	Cu ₂ ONP	CuSO ₄
<i>Fotosinteza</i>									
1	Beta ugljična anhidraza	5,74	51,9	Stroma kloroplasta	Fotosinteza	Povećavanje koncentracije CO ₂ oko enzima RuBisCo, ugljična anhidraza/metaloenzim	=	↓	↓
5	Ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza, velika podjedinica	5,99	52,5	Tilakoidna membrana kloroplasta	Fotosinteza, fotorespiracija	Fiksacija CO ₂	↑	=	↓
6	Kloroplastni PsbP4 prekursor	9,55	22,1	Tilakoidna membrana kloroplasta	Fotosinteza, PSII	Dobivanje kisika	=	↓	=
11	Ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza, mala podjedinica	9,32	20,12	Tilakoidna membrana kloroplasta	Fotosinteza, fotorespiracija	Fiksacija CO ₂	↑	=	=
28		9,44	20,04				↑	=	=
15	Klorofil a-b vezujući protein	6,77	31,36	Tilakoidna membrana kloroplasta (PSI i PSII)	Fotosinteza	Vežanje klorofila	↑	=	↓
25		4,85	26,85				↑	↑	↑
3		6,19	30,70				↑	=	↓
23		5,93	22,94				↑	=	=
27	Protein PsbO2	5,16	30,72	Tilakoidna membrana kloroplasta	Fotosinteza	Dobivanje kisika	↑	↓	=

Tablica 20. Nastavak

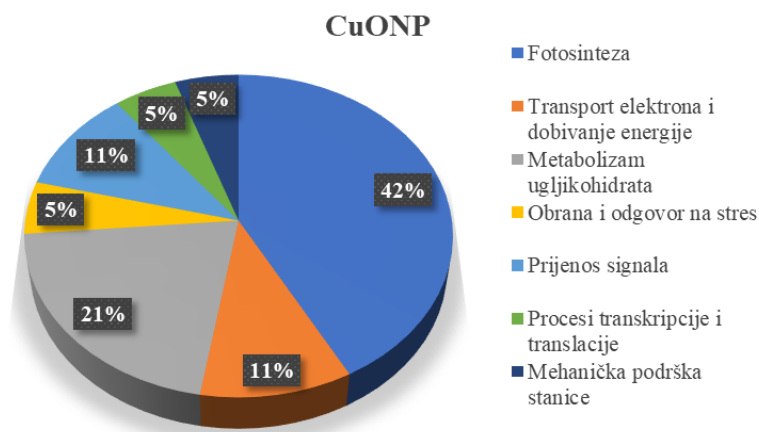
29	Protein reakcijskog centra PSI podjedinica 4	9,98	10,89	Tilakoidna membrana kloroplasta (PSI)	Fotosinteza	Pomaže spajanje feredoksina s PSI i feredoksin-NADP s oksidoreduktazom	=	↓	↓
<i>Transport elektrona i dobivanje energije</i>									
10	ATP sintaza, gama lanac	8,95	39,38	Tilakoidna membrana kloroplasta	Sinteza ATP-a, transport iona	Translokaza	↑	=	↓
22	ATP sintaza, podjedinica beta	4,93	51,64	Tilakoidna membrana kloroplasta	Sinteza ATP-a, transport iona	Translokaza	↓	↓	↑
<i>Metabolizam ugljikohidrata</i>									
8	Fruktoza-bisfosfat aldolaza	6,49	40,95	Kloroplast, citoplazma	Glikoliza	Liza ugljikohidrata	↑	↓	↓
13	Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza	9,05	43,2	Citoplazma	Glikoliza	Oksidoreduktaza	↑	=	↓
20	Fosfoglicerat kinaza	6,93	48,48	Citoplazma	Glikoliza	Vežanje ATP-a, fosfoglicerat kinazna aktivnost	↑	=	=
14	Trioza-fosfat izomeraza	5,22	27,01	Citoplazma	Glikoliza	Aktivnost trioza-fosfat izomeraze	↑	=	=
<i>Obrana i odgovor na stres</i>									
21	Protein toplinskog šoka 70B	5,15	72,08	Citoplazma, endosomi	Odgovor na stres, smatanje proteina	Vežanje ATP-a, šaperon - vežanje proteina u nesmotanom stanju	=	↓	=
2	Protein <i>Antifreeze</i>	9,68	27,43	Citoplazma	Odgovor na stres, inhibicija rekristalizacije leda, obrana od patogena	Vežanje za čestice leda, termalna histereza	↑	↑	=

Tablica 20. Nastavak

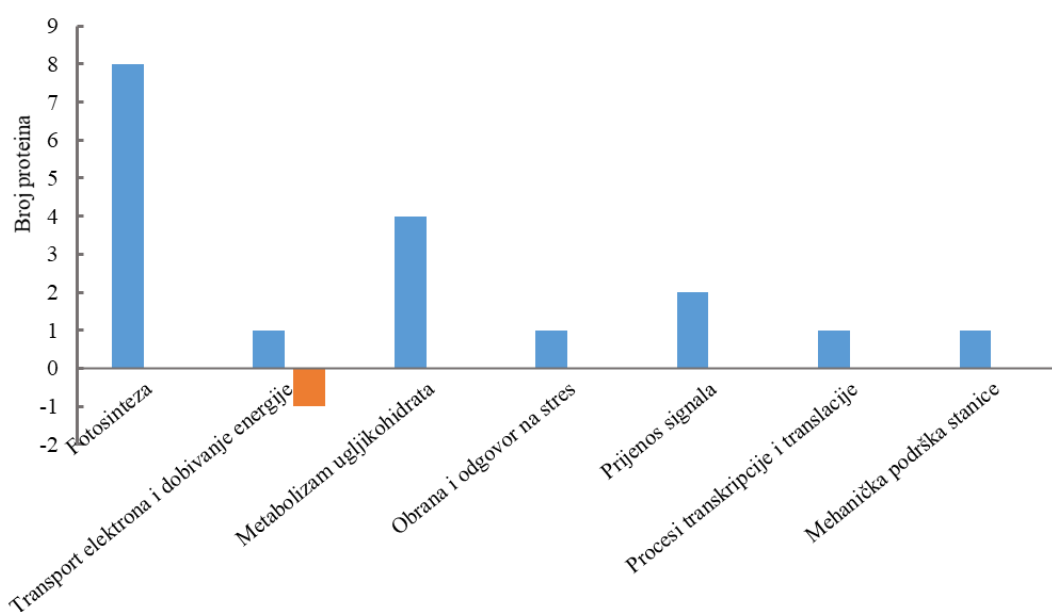
12	Laktat dehidrogenaza	4,98	24,34	Citoplazma	Odgovor na stres	Glikozilazna aktivnost između laktata i metilglioksala	=	↓	=
<i>Prijenos signala</i>									
4		8,78	40,69				↑	↓	↓
9	Protein kinaza ovisna o	7,71	38,49	Citoplazma	Prijenos signala	Vežanje ATP-a, protein serin treonin kinazna aktivnost	=	↓	↓
17	kalciju i kalmodulinu	7,71	38,49				=	↓	↓
18		7,71	38,49				=	↓	↓
26	Akonitaza A	5,05	24,3	Kloroplast	Biosinteza aminokiselina	Hidroksitransferaza, dehidrataza 3-izopropilmalata	↑	↑	↑
<i>Procesi transkripcije i translacije</i>									
7	Translacijska GTPaza	8,73	50,82	Citoplazma	Biosinteza proteina	Vežanje GTP-a za spajanje aminoacil-tRNA za ribosom	=	↓	↓
16	Elongacijski faktor Tu	5,36	44,90	Mitohondrij, kloroplast	Sinteza proteina, translacija	Vežanje GTP-a, GTP-aza	=	↓	↓
19		5,36	44,90				↑	↓	↓
<i>Mehanička potpora stanica</i>									
24	Aktin	5,3	41,77	Citoskelet	Održavanje stanične strukture	Hidrolaza	↑	↑	↑

Nakon tretmana stanica algi s CuONP, najzastupljenija kategorija diferencijalno eksprimiranih proteina bila je Fotosinteza (42%) (Slika 58.A), kojoj pripadaju proteini uključeni u procese vezanja klorofila, dobivanja kisika, odnosno fotolize vode i fiksacije CO₂ i za sve proteine zabilježena je povećana ekspresija u odnosu na kontrolu (Slika 58.B). Sljedeća kategorija po zastupljenosti bila je Metabolizam ugljikohidrata (21%), gdje su svi identificirani proteini uključeni u proces glikolize i za sve je zabilježena povećana ekspresija u odnosu na kontrolu. Kategorije Transport elektrona i dobivanja energije te Prijenos signala bile su zastupljene s 11%. Zanimljivo je da iz kategorije Transport elektrona i dobivanja energije za beta podjedinicu ATP sintaze zabilježena smanjena ekspresija, dok je za gama lanac ATP sintaze zabilježena povećana ekspresija. Protein akonitaza A i protein kinaza, uključeni u Prijenos signala, pokazali su povećanu ekspresiju u odnosu na kontrolu. Ostale kategorije, Obrana i odgovor na stres (protein *Antifreeze*), Procesi transkripcije i translacije (elongacijski faktor Tu) i Mehanička potpora stanice (aktin) bile su zastupljene s po jednim proteinom (5%), koji su svi pokazali pojačanu ekspresiju u odnosu na kontrolu.

A



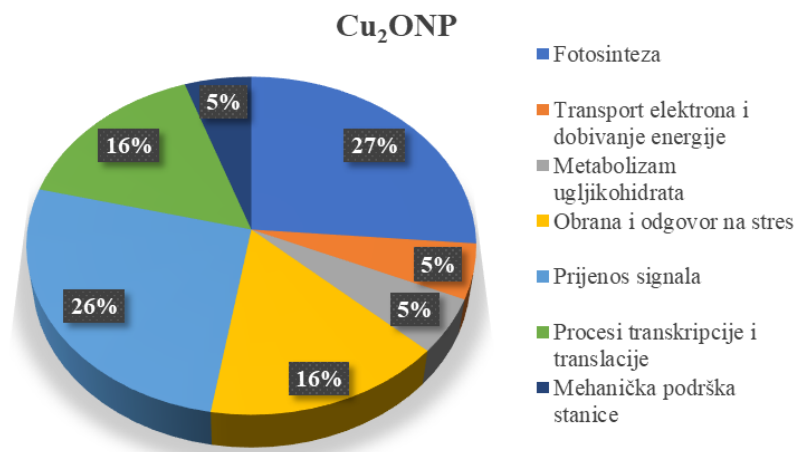
B



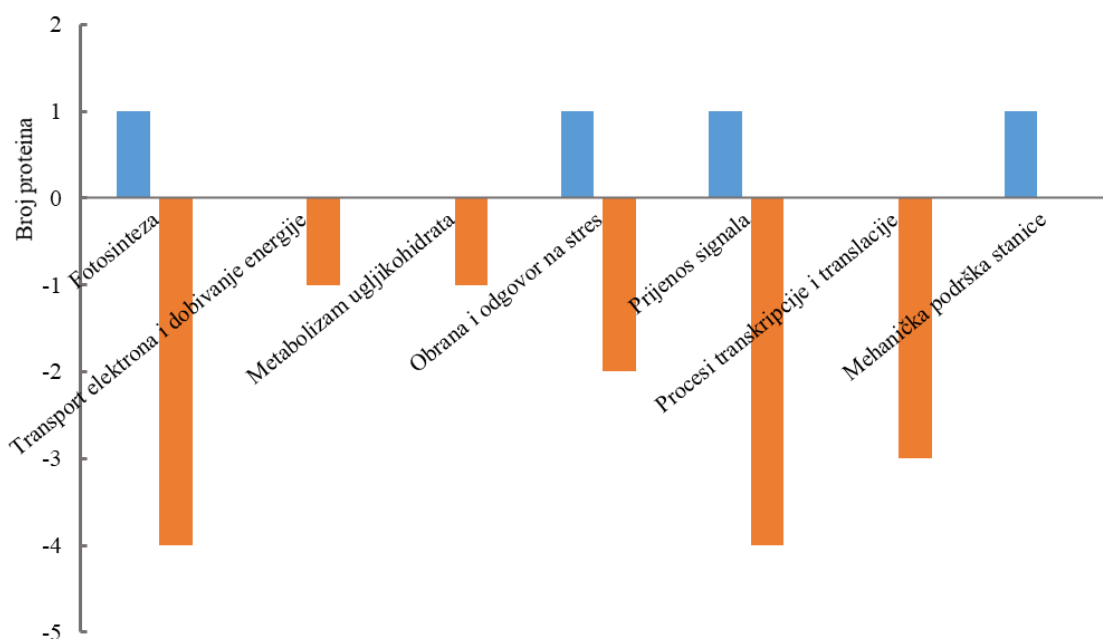
Slika 58. Zastupljenost funkcionalnih kategorija diferencijalno eksprimiranih proteina u stanicama alge *C. vulgaris* (A) i broj proteina u pojedinim funkcionalnim kategorijama s pojačanom (pozitivna os ordinate) ili smanjenom (negativna os ordinate) ekspresijom (B) nakon 72 sata izlaganja $14,45 \text{ mg L}^{-1}$ CuONP u odnosu na kontrolu.

Nakon tretmana s Cu₂ONP, najviše diferencijalno eksprimiranih proteina ponovo je pripadalo kategoriji Fotosinteza (27%) (Slika 59.A), u kojoj su proteini uključeni u reakcije na PSI i PSII te beta ugljična anhidraza pokazali smanjenu ekspresiju, dok je za protein uključen u vezanje klorofila zabilježena povećana ekspresija u odnosu na kontrolu (Slika 59.B). Visoko zastupljena bila je i kategorija Prijenos signala (26%), u kojoj je za četiri protein kinaze zabilježena smanjena ekspresija, dok je hidrositransferaza akonitaza A, koja ima ulogu u prijenosu signala za biosintezu aminokiselina, pokazala povećanu ekspresiju. Iduće kategorije po zastupljenosti diferencijalno eksprimiranih proteina bile su Obrana i odgovor na stres te Procesi transkripcije i translacije, svaka sa 16%. U kategoriji Obrana i odgovor na stres, za protein Hsp70B i laktat dehidrogenazu zabilježena je smanjena ekspresija, dok je protein *Antifreeze* imao povećanu ekspresiju. Iz kategorije Procesi transkripcije i translacije, za tri proteina uključena u translaciju zabilježena je smanjena ekspresija u odnosu na kontrolu. Kategorije Metabolizam ugljikohidrata, Transport elektrona i dobivanja energije te Mehaničke podrške stanice (5%) imale su po jedan protein. Protein uključen u proces glikolize (fruktoza-bisfosfat aldolaza) iz Metabolizma ugljikohidrata te beta podjedinica ATP sintaze iz Transporta elektrona pokazale su smanjenu ekspresiju, dok je za aktin uključen u održavanje citoskeleta (Mehanička potpora stanice) zabilježena povećana ekspresija u odnosu na kontrolu.

A



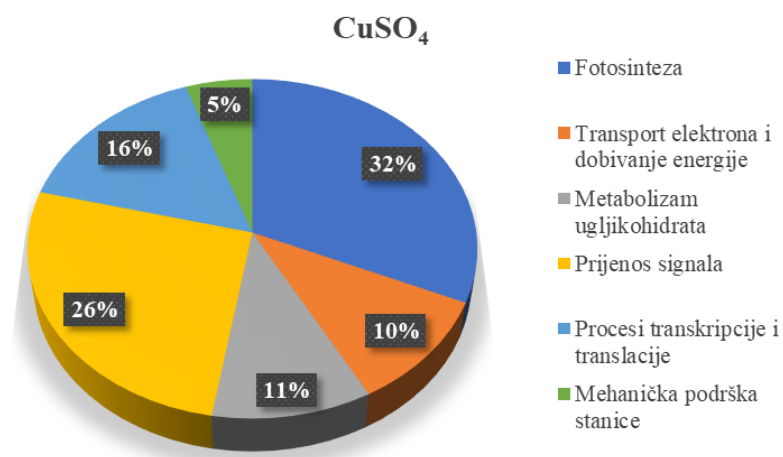
B



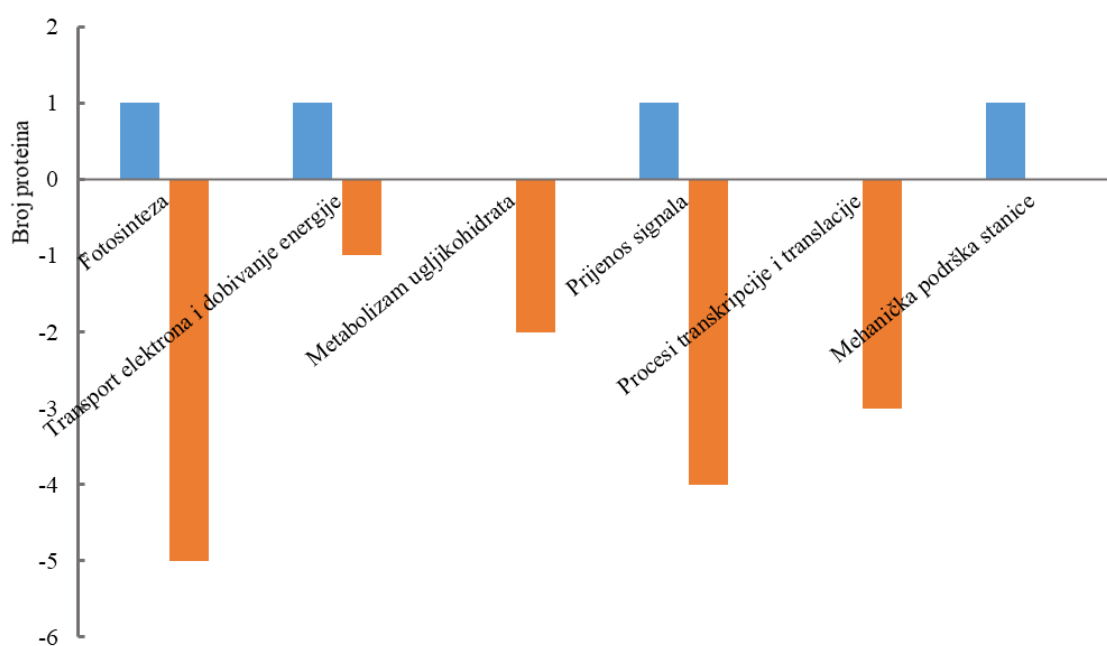
Slika 59. Zastupljenost funkcionalnih kategorija diferencijalno eksprimiranih proteina u stanicama alge *C. vulgaris* (A) i broj proteina u pojedinim funkcionalnim kategorijama s pojačanom (pozitivna os ordinate) ili smanjenom (negativna os ordinate) ekspresijom (B) nakon 72 sata izlaganja 11,89 mg L⁻¹ Cu₂ONP u odnosu na kontrolu.

Nakon tretmana stanica alge s CuSO_4 , najveći broj diferencijalno eksprimiranih proteina ponovo je bio uključen u kategoriju Fotosinteza (32%) (Slika 60.A), u kojoj je za proteine uključene u reakcije na PSI i PSII, za veliku podjedinicu enzima RuBisCo te za beta ugljičnu anhidrazu zabilježena smanjena ekspresija, dok je ekspresija proteina uključenog u vezanje pigmenata (klorofil a-b vezujući protein) bila povećana (Slika 60.B). Iduća kategorija po zastupljenosti bila je Prijenos signala (26%), u kojoj je za četiri protein kinaze zabilježena smanjena ekspresija, dok hidroksitransferaza akonitaza A, koja sudjeluje u prijenosu signala za biosintezu aminokiselina, pokazala povećanu ekspresiju u odnosu na kontrolu. Sljedeća kategorija po zastupljenosti diferencijalno eksprimiranih proteina bila je Procesi transkripcije i translacije (16%), gdje je za sve identificirane proteine uključene u biosintezu proteina zabilježena smanjena ekspresija u odnosu na kontrolu. Proteini uključeni u Transport elektrona i dobivanje energije (10%) i Metabolizam ugljikohidrata (11%) pokazali su podjednaku zastupljenost. Unutar kategorije Transport elektrona i dobivanje energije, beta podjedinica ATP sintaze imala je povećanu ekspresija, dok je ekspresija gama lanca ATP sintaze bila smanjena. S druge strane, za sve proteine iz kategorije Metabolizma ugljikohidrata koji sudjeluju u procesu glikolize zabilježena je smanjena ekspresija. Najmanja zastupljenost diferencijalno eksprimiranih proteina zabilježena je za kategoriju Mehanička podrške stanice (5%), gdje je aktin, uključen u održavanje integriteta citoskeleta, pokazao povećanu ekspresiju nakon tretmana s CuSO_4 u odnosu na kontrolu.

A



B

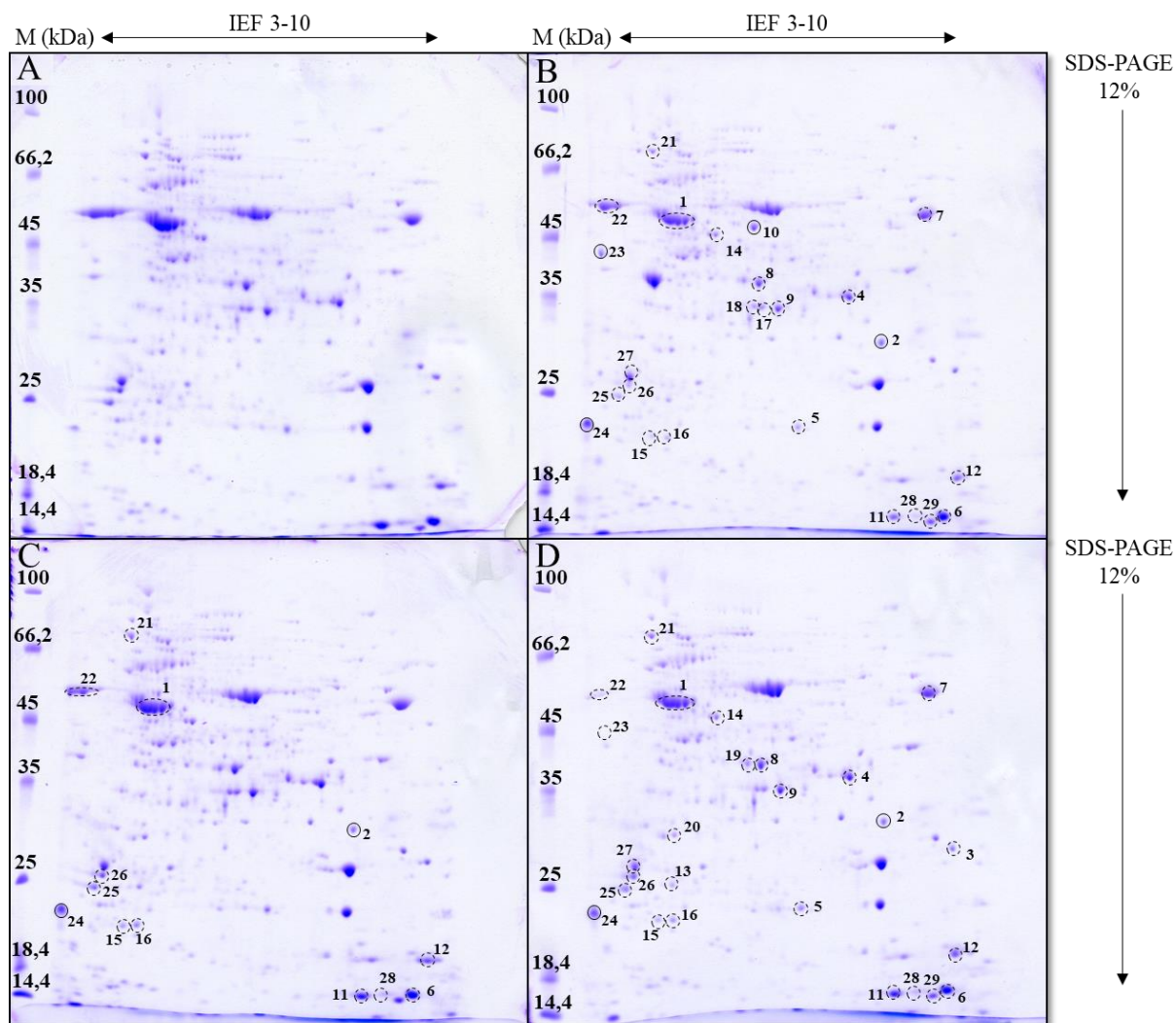


Slika 60. Zastupljenost funkcionalnih kategorija diferencijalno eksprimiranih proteina u stanicama alge *C. vulgaris* (A) i broj proteina u pojedinim funkcionalnim kategorijama s pojačanom (pozitivna os ordinate) ili smanjenom (negativna os ordinate) ekspresijom (B) nakon 72 sata izlaganja $8,36 \text{ mg L}^{-1}$ CuSO₄ u odnosu na kontrolu.

4.8.3 Nanočestice polistirena

4.8.3.1 Promjene u proteomu

Nakon tretmana s PS-NP, PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP, u stanicama alge detektirano je ukupno 30 proteinskih mrlja čija se ekspresija razlikovala u odnosu na kontrolu, dok je analizom spektrometrije masa identificirano 29 proteina (Slika 61). Nakon izlaganja stanica alge PS-NP ukupno je detektirano 25 proteina s promijenjenom ekspresijom, pri čemu je za četiri proteina zabilježena povećana, a za 21 protein smanjena ekspresija u odnosu na kontrolu (Slika 61.B). Nakon tretmana s PS-NH₂-NP, od ukupno 13 detektiranih proteina, za samo dva zabilježena je povećana ekspresija, dok je ekspresija 11 proteina bila smanjena (Slika 61.C). Nakon tretmana s PS-COOH-NP detektirano je ukupno 26 diferencijalno eksprimiranih proteina, od kojih su dva proteina imala povećanu ekspresiju, dok je ekspresija 24 proteina bila smanjena u odnosu na kontrolu (Slika 61.D).



Slika 61. Ukupni topivi proteini u kontrolnim stanicama alge *C. vulgaris* (A) te stanicama alge nakon 72 sata izlaganja 40 mg L⁻¹ PS-NP (B), PS-NH₂-NP (C) ili PS-COOH-NP (D), razdvojeni 2-D elektroforezom. M – biljezi molekularnih masa (kDa), IEF 3-10 – relativan položaj proteina u gelu u odnosu na vrijednost njihove izoelektrične točke, SDS-PAGE – relativan položaj proteina u gelu u odnosu na njihove molekulske mase. Proteini čija se ekspresija statistički značajno razlikuje od kontrole ($p \leq 0,05$) označeni su brojevima 1-29. Proteini s povećanom ekspresijom u odnosu na kontrolu označeni su punim (○), a oni sa smanjenom ekspresijom isprekidanim kružnicama (○).

4.8.3.2 Klasifikacija diferencijalno eksprimiranih proteina

Pretragom baza podataka identificirano je 29 diferencijalno eksprimiranih proteina nakon tretmana s nanočesticama polistirena (Tablica 21). Od ukupnog broja, 13 proteina pokazalo je promjenu u ekspresiji nakon svih tretmana, od kojih je za 11 zabilježena smanjena, a za 2 povećana ekspresija nakon svih tretmana nanočesticama polistirena. Samo nakon tretmana s PS-NP i PS-COOH-NP zabilježeno je 9 proteina s većinski smanjenom ekspresijom u odnosu na kontrolu. Nadalje, tri proteina je diferencijalno eksprimirano samo nakon tretmana s PS-NP, od kojih je za 2 zabilježena smanjena, a za jedan povećana ekspresija u odnosu na kontrolu. S druge strane, samo nakon tretmana s PS-COOH-NP zabilježena je samo smanjena ekspresija četiri proteina u odnosu na kontrolu, dok nijedan od proteina nije pokazao promijenjenu ekspresiju nakon samo tretmana s PS-NH₂-NP.

Tablica 21. Diferencijalno eksprimirani proteini, njihova stanična lokalizacija te biološka i molekularna funkcija u stanicama alge *C. vulgaris* nakon 72 sata izlaganja 40 mg L⁻¹ PS-NP, PS-NH₂-NP ili PS-COOH-NP. Strelica prema gore (↑) označava pojačanu, strelica prema dolje (↓) smanjenu, a znak jednako (=) podjednaku ekspresiju u usporedbi s kontrolom. pI – izoelektrična točka, M – molekulska masa.

Oznaka proteinske mrlje	Ime proteina	pI	M (kDa)	Lokalizacija	Biološki proces	Molekularna funkcija	Diferencijalna ekspresija		
							PS	PS-NH ₂ -NP	PS-COOH-NP
Fotosinteza									
1	Beta ugljična anhidraza	5,74	51,9	Stroma kloroplasta	Fotosinteza	Povećavanje koncentracije CO ₂ oko enzima RuBisCo, ugljična anhidraza/metaloenzim	↓	↓	↓
6	Kloroplastni PsbP4 prekursor	9,55	22,1	Tilakoidna membrana kloroplasta	Fotosinteza, PSII	Dobivanje kisika	↓	↓	↓
11 28	Ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza, mala podjedinica	9,32 9,44	20,12 20,04	Tilakoidna membrana kloroplasta	Fotosinteza, fotorespiracija	Fiksacija CO ₂	↓ ↓	↓ ↓	↓ ↓
12	Protein reakcijskog centra PSI, podjedinica 2	9,71	20,72	Tilakoidna membrana kloroplasta	Fotosinteza	Stvaranje kompleksa s feredoksinom i feredoksin-oksido reduktazom	↓	↓	↓
25 15 16	Klorofil a-b vezujući protein	4,85 5,93 5,93	26,85 22,94 22,94	Tilakoidna membrana kloroplasta (PSI i PSII)	Fotosinteza	Vežanje klorofila	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓

Tablica 21. Nastavak

27	Protein PsbO2	5,16	30,72	Tilakoidna membrana kloroplasta	Fotosinteza	Dobivanje kisika	↓	=	↓
29	Protein reakcijskog centra PSI podjedinica 4	9,98	10,89	Tilakoidna membrana kloroplasta (PSI)	Fotosinteza	Pomaže spajanje feredoksina s PSI i feredoksin-NADP s oksidoreduktazom	↓	=	↓
<i>Transport elektrona i dobivanje energije</i>									
22	ATP sintaza, podjedinica beta	4,93	51,64	Tilakoidna membrana kloroplasta	Sinteza ATP-a, transport iona	Translokaza	↓	↓	↓
<i>Metabolizam ugljikohidrata</i>									
8	Fruktoza-bisfosfat aldolaza	6,49	40,95	Kloroplast, citoplazma	Glikoliza	Liza ugljikohidrata	↓	=	↓
19	Malat dehidrogenaza	5,74	34,77	Citoplazma, mitohondrij	Ciklus limunske kiseline	Oksidoreduktaza	=	=	↓
<i>Obrana i odgovor na stres</i>									
2	Protein PCC13-62 povezan sa isušivanjem	7,56	29,3	Citoplazma, kloroplast	Odgovor na sušu/visoki salinitet (odgovor na stres)	Transkripcijska regulacija	↑	↑	↑
21	Protein toplinskog šoka 70B	5,15	72,08	Citoplazma, endosomi	Odgovor na stres, smatanje proteina	Vežanje ATP-a, šaperon - vežanje proteina u nesmotanom stanju	↓	↓	↓
3	Protein <i>Antifreeze</i>	9,68	27,43	Citoplazma	Odgovor na stres, inhibicija rekristalizacije leda, obrana od patogena	Vežanje za čestice leda, termalna histereza	=	=	↓

Tablica 21. Nastavak

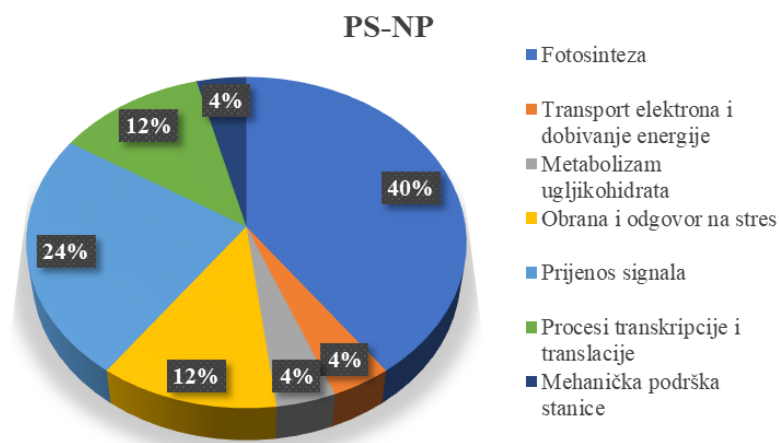
5	Superoksid dismutaza	8,63	26,06	Citoplazma, kloroplast, mitohondrij, peroksisomi	Odgovor na oksidacijski stres	Vežanje metala, oksidoreduktaza, dismutaza superoksidnog radikala	↓	=	↓
13	Laktat dehidrogenaza	4,98	24,34	Citoplazma	Odgovor na stres	Glikozilazna aktivnost između laktata i metilglioksala	=	=	↓
<i>Prijenos signala</i>									
4		8,78	40,69				↓	=	↓
9	Protein kinaza ovisna o kalciju i kalmodulinu	7,71	38,49	Citoplazma	Prijenos signala	Vežanje ATP-a, protein serin treonin kinazna aktivnost	↓	=	↓
17		7,71	38,49				↓	=	=
18		7,71	38,49				↓	=	=
23	Rodanaza	4,63	39,45	Mitohondrij	Odgovor na stimulans Ca ²⁺ iona	Transport sumpora	↑	=	↓
26	Akonitaza A	5,05	24,3	Kloroplast	Biosinteza aminokiselina	Hidroksittransferaza, dehidrataza 3- izopropilmalata	↓	↓	↓
<i>Procesi transkripcije i translacije</i>									
7	Translacijska GTPaza	8,73	50,82	Citoplazma	Biosinteza proteina	Vežanje GTP-a za spajanje aminoacil- tRNA za ribosom	↓	=	↓
10	tRNA riboziltransferaza katalitička podjedinica 1	6,43	51,21	Citoplazma	Transglikozilacija gvanin tRNA	Vežanje metala, glikoziltransferaza, procesiranje tRNA	↑	=	=
14	Elongacijski faktor Tu	5,36	44,9	Mitohondrij, kloroplast	Sinteza proteina, translacija	Vežanje GTP-a, GTP-aza	↓	=	↓
20	<i>RRM domain- containing protein</i>	5,07	25,57	Jezgra, ribosomi	Translacija, procesiranje mRNA	Vežanje RNA	=	=	↓

Tablica 21. Nastavak

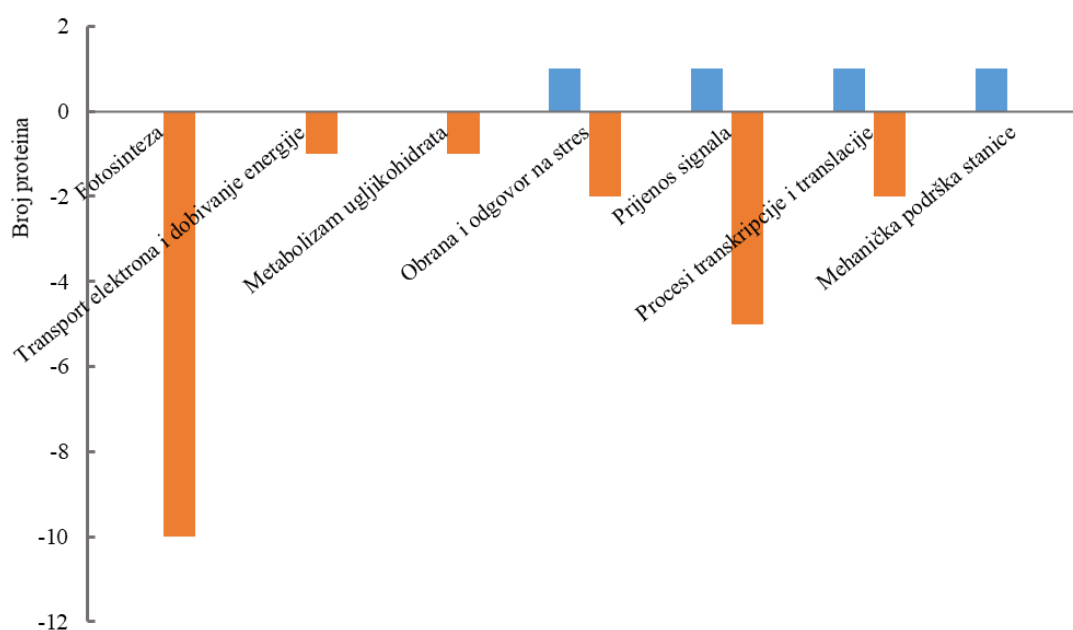
<i>Mehanička potpora stanice</i>									
24	Aktin	5,3	41,77	Citoskelet	Održavanje stanične strukture	Hidrolaza	↑	↑	↑

Nakon tretmana stanica algi s PS-NP, najviše diferencijalno eksprimiranih proteina bilo je uključeno u kategoriju Fotosinteza (40%) (Slika 62.A), u kojoj je za proteine uključene u reakcije na PSI i PSII te za enzim RuBisCo i beta ugljičnu anhidrazu zabilježena smanjena ekspresija (Slika 62.B). Sljedeća kategorija diferencijalno eksprimiranih proteina po zastupljenosti bila je Prijenos signala (24%), u kojoj su četiri protein kinaze i hidroksitransferaza pokazale smanjenu ekspresiju, dok je ekspresija proteina ovisnog o koncentraciji iona Ca^{2+} , koji je uključen u transport sumpora u mitohondrij, bila povećana u odnosu na kontrolu. Kategorije Obrana i odgovor na stres te Procesi transkripcije i translacije bile su jednako zastupljene po broju diferencijalno eksprimiranih proteina, svaka s 12%. Unutar kategorije Obrana i odgovor na stres, za protein uključen u pravilno smatanje proteina (protein Hsp70B) i održavanje oksidacijske homeostaze (enzim SOD) zabilježena je smanjena ekspresija, dok je protein koji odgovara na nepovoljne uvjete modulacijom transkripcije drugih proteina (protein PCC13-62 povezan sa isušivanjem) pokazao povećanu ekspresiju. U kategoriji Procesi transkripcije i translacije, za dva proteina povezana s biosintezom proteina preko vezanja GTP-a zabilježena je smanjena ekspresija, dok je ekspresija glikoziltransferaze, uključene u transglikozilaciju proteina, bila povećana. Kategorije Transport elektrona i dobivanja energije (beta podjedinica ATP sintaze), Metabolizam ugljikohidrata (fruktoza-bisfosfat aldolaza) te Mehanička potpora stanice (aktin) bile su zastupljene sa po jednim proteinom (4%) i za sve je zabilježena smanjena ekspresija u odnosu na kontrolu.

A



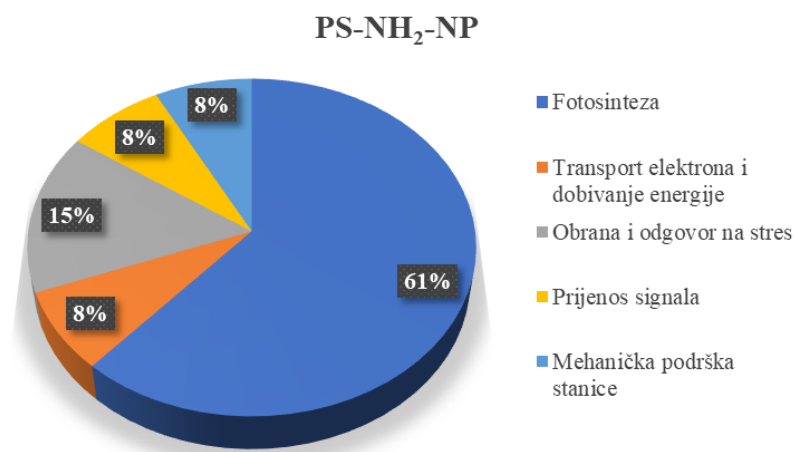
B



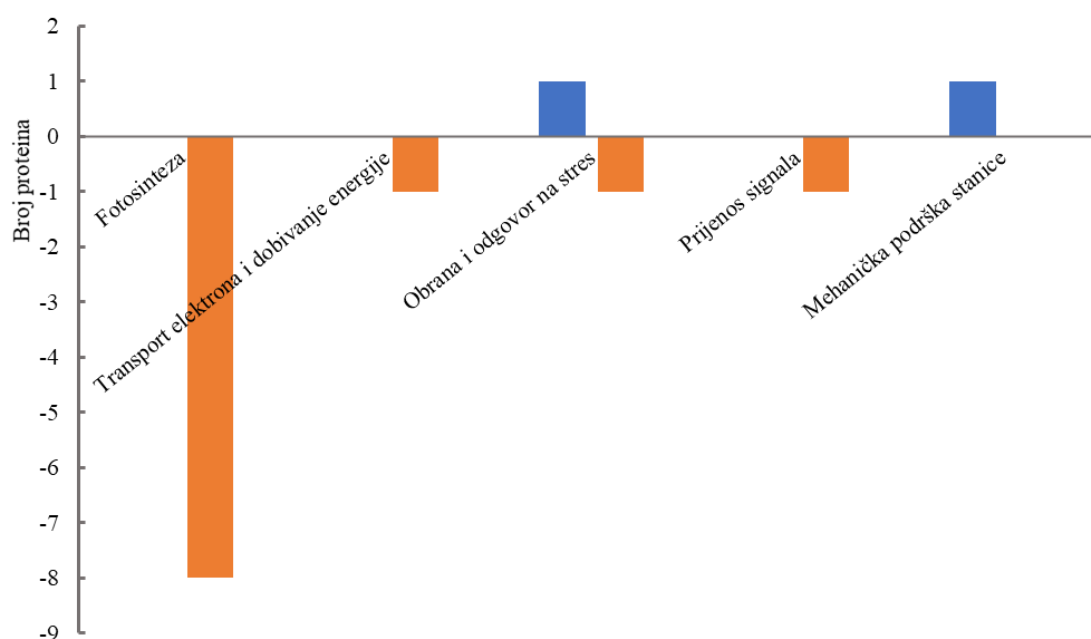
Slika 62. Zastupljenost funkcionalnih kategorija diferencijalno eksprimiranih proteina u stanicama alge *C. vulgaris* (A) i broj proteina u pojedinim funkcionalnim kategorijama s pojačanom (pozitivna os ordinate) ili smanjenom (negativna os ordinate) ekspresijom (B) nakon 72 sata izlaganja 40 mg L^{-1} PS-NP u odnosu na kontrolu.

Nakon izlaganja stanica alge PS-NH₂-NP, najveći broj diferencijalno eksprimiranih proteina ponovo je bio iz kategorije Fotosinteza (61%) (Slika 63.A), u kojoj je za sve proteine uključene u reakcije na PSI i PSII te za enzim RuBisCo i beta ugljičnu anhidrazu zabilježena smanjena ekspresija u odnosu na kontrolu (Slika 63.B). Druga kategorija po zastupljenosti diferencijalno eksprimiranih proteina bila je Obrana i odgovor na stres (15%), u kojoj je protein Hsp70B, uključen u pravilno smatanje proteina, pokazao smanjenu ekspresija, dok je ekspresija proteina uključenog u odgovor na stresne uvjete putem transkripcijske regulacije drugih proteina (protein PCC13-62 povezan s isušivanjem) bila povećana. Ostali identificirani diferencijalno eksprimirani proteini pripadali su kategorijama Transport elektrona i dobivanje energije, Prijenos signala te Mehanička potpora stanice (8%). Među njima, za beta podjedinicu ATP sintaze uključenu u sintezu ATP-a i transport iona (Transport elektrona i dobivanje energije) te za hidroksitransferazu uključenu u prijenos signala za sintezu aminokiselina (Prijenos signala) zabilježena je smanjena ekspresija, dok je ekspresija aktina, proteina važnog za održavanje integriteta citoskeleta (Mehanička potpora stanice), bila povećana u odnosu na kontrolu.

A



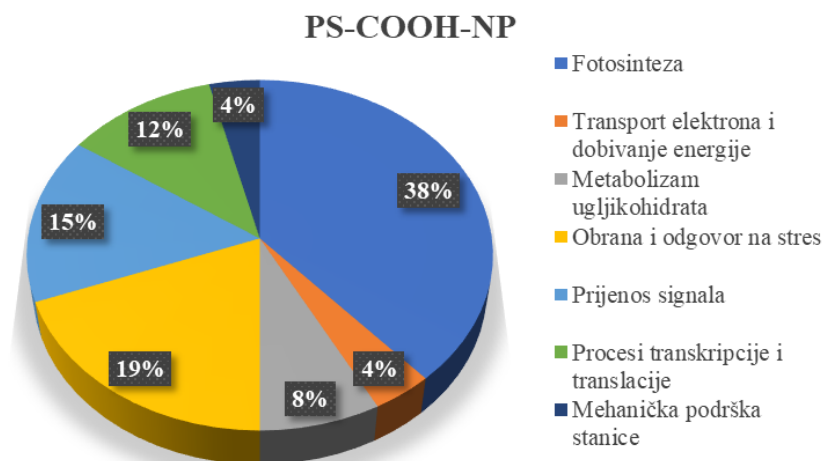
B



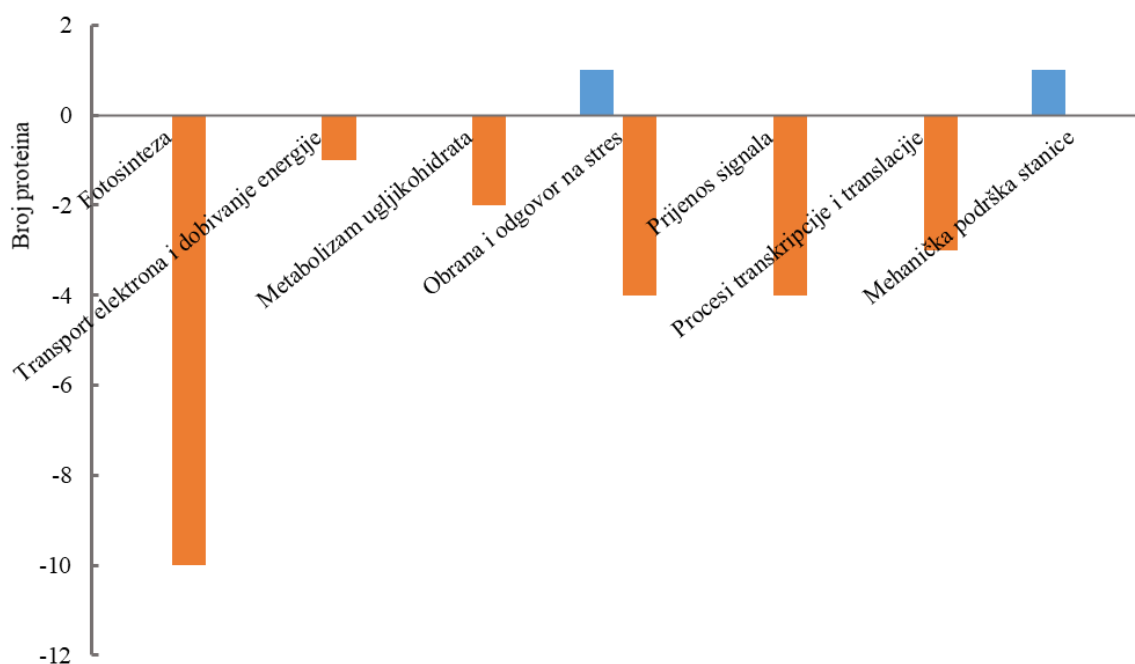
Slika 63. Zastupljenost funkcionalnih kategorija diferencijalno eksprimiranih proteina u stanicama alge *C. vulgaris* (A) i broj proteina u pojedinim funkcionalnim kategorijama s pojačanom (pozitivna os ordinate) ili smanjenom (negativna os ordinate) ekspresijom (B) nakon 72 sata izlaganja 40 mg L⁻¹ PS-NH₂-NP u odnosu na kontrolu.

I nakon tretmana s PS-COOH-NP, najveći broj diferencijalno eksprimiranih proteina pripadao je kategoriji Fotosinteza (38%) (Slika 64.A), u kojoj su proteini uključeni u reakcije na PSI i PSII te enzim RuBisCo i beta ugljična anhidraza pokazali smanjenu ekspresija u odnosu na kontrolu (Slika 64.B). Sljedeća kategorija po zastupljenosti diferencijalno eksprimiranih proteina bila je Obrana i odgovor na stres (19%), u kojoj je ekspresija proteina uključenih u odgovor na određene tipove stresnih uvjeta i proteina uključenog u odgovor na stres putem transkripcijske regulacije drugih proteina (protein PCC13-62 povezan sa isušivanjem) bila smanjena. Nadalje, za diferencijalno eksprimirane proteine iz kategorije Prijenos signala (15%), među kojima su protein kinaze, hidrositransferaze te protein uključen u transfer sumpora na membrani mitohondrija, zabilježena je smanjena ekspresija u odnosu na kontrolu. Iduća kategorija po zastupljenosti različito eksprimiranih proteina bila je Procesi transkripcije i translacije (12%), u kojoj je za dva proteina uključena u translaciju i za jedan protein uključen transkripciju zabilježena smanjena ekspresija. Smanjenu ekspresiju pokazali su i protein koji sudjeluje u glikolizi i oksidoreduktaza koja sudjeluje u ciklusu limunske kiseline, oba iz kategorije Metabolizam ugljikohidrata (8%). Kategorije Transport elektrona i dobivanje energije te Mehanička potpora stanice bile su zastupljene s po jednim diferencijalno eksprimiranim proteinom (4%), a za oba proteina, beta podjedinicu ATP sintaze uključene u transport iona i sintezu ATP-a i aktin uključen u održavanje citoskeleta, zabilježena je smanjena ekspresija u odnosu na kontrolu.

A



B



Slika 64. Zastupljenost funkcionalnih kategorija diferencijalno eksprimiranih proteina u stanicama alge *C. vulgaris* (A) i broj proteina u pojedinim funkcionalnim kategorijama s pojačanom (pozitivna os ordinate) ili smanjenom (negativna os ordinate) ekspresijom (B) nakon 72 sata izlaganja 40 mg L^{-1} PS-COOH-NP u odnosu na kontrolu.

RASPRAVA

5. RASPRAVA

U ovom istraživanju analizirao sam fitotoksični učinak nanočestica srebra s dva različita omotača (AgNP-citrat i AgNP-CTAB), nanočestica bakrovih oksida u dva oksidacijska stanja (CuONP i Cu₂ONP) te nanočestica polistirena bez modifikacije i modificiranih s dvije funkcionalne skupine (PS-NP, PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP) na stanice alge *C. vulgaris*. Kako ranija istraživanja ukazuju da veliki udio u fitotoksičnosti nanočestica metala imaju upravo ioni disocirani s njih (Mathur i sur. 2023), u ovom istraživanju sam primijenio i tretmane s AgNO₃ i CuSO₄ kao izvore iona Ag⁺ i Cu²⁺.

5.1 Nanočestice i ioni srebra

5.1.1 Stabilnost u hranjivoj podlozi

Ranija istraživanja pokazala su značajan utjecaj fizikalnih i kemijskih svojstava AgNP na njihovu stabilnost u tekućim hranjivim podlogama (Yu i sur. 2013; Li i sur. 2015; Yue i sur. 2017). U ovom istraživanju, oba tipa nanočestica brzo su aglomerirala u podlozi BBM, s tim da je aglomeracija AgNP-citrat bila izraženija. Nakon početne aglomeracije, promjer AgNP-citrat se smanjio nakon 24 sata te stabilizirao do 78. sata, što ukazuje na disocijaciju iona Ag⁺ nakon početne aglomeracije te postizanje stabilnosti unutar 24 sata. S druge strane, nakon početne aglomeracije AgNP-CTAB neposredno nakon dodavanja u podlogu BBM, njihov promjer je ostao isti do 78. sata kada je zabilježeno blago povećanje. Ranije istraživanje je pokazalo da su AgNP-CTAB stabilnije u podlozi Murashige i Skoog s polovičnom koncentracijom makroelemenata u odnosu na blago negativne AgNP-PVP, što zajedno s rezultatima ovog istraživanja pokazuje da početni naboj AgNP utječe na njihovu aglomeraciju, odnosno stabilnost u hranjivim podlogama (Biba i sur. 2020). Nadalje, AgNP-citrat su cijelo vrijeme zadržale negativan naboj, izuzev nakon inkubacije u podlozi BBM od 72 sata kada im je izmjeren pozitivan ζ potencijal. S druge strane, neposredno nakon dodatka u podlogu BBM, AgNP-CTAB su izgubile svoj pozitivni naboj koji se nije drastično mijenjao do kraja mjerenja. Ranija istraživanja pokazala su da smanjenje ζ potencijala nanočestica može biti posljedica povećane ionske jakosti hranjive podloge što ima negativni učinak na stabilnost samih čestica (Smith i sur. 2017; Dong i sur. 2019). Budući da je pokazano da su nanočestice koje dijele naboj s većinom iona u podlozi manje stabilne te podložne aglomeraciji i disocijaciji, negativni ζ potencijal oba tipa AgNP upućuje da se u podlozi BBM nalazi više iona s negativnim nabojem što je u skladu s manjom stabilnošću negativno nabijenih AgNP-citrat (Lavagna i sur. 2022).

Različite hranjive podloge imaju različitu ionsku jakost koja može znatno utjecati na ponašanje AgNP (Tolaymat i sur. 2010; Akter i sur. 2018; Matras i sur. 2022). U prilog tome, istraživanja

su pokazala da najveću stabilnost AgNP postižu u ultra-čistoj vodi pri neutralnom pH gdje nisu zamijećene značajne promjene veličine ili naboja (Barrena i sur. 2009; Yin i sur. 2011). S druge strane, istraživanje utjecaja pH otopine na stabilnost AgNP pokazalo je da su AgNP najstabilnije pri višim vrijednostima pH, dok su pri nižim vrijednostima AgNP sklone aglomeraciji i disocijaciji (Fernando i Zhou 2019). Također, pokazano je da su AgNP stabilnije u hranjivim podlogama s nižom ionskom jakosti i s višim vrijednostima pH (De Leersnyder i sur. 2019). Naime, u tekućoj podlozi Hewitt s 1/15 koncentracije makroelemenata, AgNP su pokazale iznimnu stabilnost (Yang i sur. 2020), dok je u podlozi Hewitt s 1/4 koncentracije makroelemenata došlo do aglomeracije (Yang i sur. 2019). Slično, u Hoaglandovoj tekućoj podlozi s 1/10 koncentracije makroelemenata, AgNP su bile stabilne s malim promjenama veličine (Jiang i sur. 2017), dok je u istoj podlozi, ali s 1/4 koncentracije makroelemenata zabilježena njihova aglomeracija i disocijacija (Nair i Chung 2014), što je bilo još izraženije u Hoaglandovoj podlozi s punim sastavom (Thwala i sur. 2013). Dodatno, Ke i sur. (2018) i Geisler-Lee i sur. (2013) pokazali su da u tekućim podlogama Murashige i Skoog te Hoagland dolazi do aglomeracije i disocijacije AgNP-citrat, što je u skladu s mojim rezultatima vjerojatno zbog sličnih pH vrijednosti navedenih podloga. S druge strane, početna aglomeracija i daljnja stabilnost AgNP-CTAB pokazana je i u ranijim istraživanjima gdje je značajna aglomeracija AgNP-CTAB dovela i do njihovog taloženja (Biba i sur. 2020). Dodatno, Biba i sur. (2022) su pokazali i smanjenje ζ potencijala AgNP-CTAB neposredno nakon dodatka u tekuću podlogu Murashige i Skoog s polovičnom koncentracijom makroelemenata, što je u skladu s rezultatima mog istraživanja te upućuje na veliku ovisnost svojstva AgNP o ionskoj jakosti podloge.

Rezultati analize stabilnosti otopine AgNO_3 u podlozi BBM pokazuju da su ioni Ag^+ reagirali s ionima iz podloge, što je rezultiralo sintezom čestica AgNP. Naime, ioni Cl^- ili S^{2-} iz podloge mogu reducirati AgNO_3 čime nastaju čestice AgCl ili Ag_2S (Trinh i sur. 2015; Sadovnikov i Gusev 2020). U ovom istraživanju, novonastale AgNP su formirale aglomerate unutar 24 sata, nakon čega se veličina čestica smanjila te stabilizirala do kraja mjerenja što je slično prikazanoj stabilnosti AgNP-citrat u podlozi BBM.

5.1.2 Unos nanočestica i iona srebra u stanice i utjecaj na morfologiju algi

Veličina, uz navedenu stabilnost AgNP, jedan je od ključnih faktora njihove fitotoksičnosti (Yan i Chen 2019). Naime, većina algi su okružene staničnom stijenkom čija obično porozna struktura olakšava adsorpciju mnogih tvari iz okoline, ali i omogućuje ulazak AgNP promjera do 20 nm u stanice (Behra i sur. 2013; Wang i sur. 2019) te su se AgNP ovog promjera pokazale i najtoksičnijima (Carlson i sur. 2008; Samberg i sur. 2011; Geisler-Lee i sur. 2013; Wang i sur.

2013; Tripathi i sur. 2017; Perde-Schrepler i sur. 2019; Ferdous i Nemmar 2020). Međutim, razni stresni faktori te stanični procesi poput diobe stanica mogu povećati propusnost stanične stijenke te omogućiti ulazak i većih čestica u stanicu, dok je pokazano da i AgNP veće od 20 nm u promjeru mogu inducirati stvaranje većih pora u staničnoj stijenci (Carlson i sur. 2008; Tripathi i sur. 2017), što negativno utječe na rast i morfologiju algi (Kalman i sur. 2015; Xia i sur. 2015).

Značajan utjecaj na fitotoksičnost AgNP imaju i površinski omotači, koji mijenjaju njihovu površinu te utječu na aglomeraciju i transformaciju u hranjivim podlogama pa posljedično i na reaktivnost i veličinu AgNP (Tolaymat i sur. 2010; Levard i sur. 2012; Biba i sur. 2021). Iako je provedeno mnogo ekotoksikoloških istraživanja koja su analizirala utjecaj AgNP bez omotača ili s jednim tipom omotača na alge (Oukarroum i sur. 2012a; Oukarroum i sur. 2012b; Qian i sur. 2016; Zhang i sur. 2018; Pham 2019; Liu i sur. 2020a; Qiao i sur. 2022), samo je nekolicina istraživanja usporedila učinke različitih omotača AgNP na alge u istom istraživanju (Angel i sur. 2013; Kalman i sur. 2015; Kleiven i sur. 2019; Lekamge i sur. 2020; Zhang i sur. 2020a; b). Rezultati tih istraživanja pokazuju da omotači utječu na fitotoksičnost AgNP, što se slaže s rezultatima moga istraživanja gdje su AgNP s različitim omotačima pokazale različite učinke na vijabilnost stanica algi. Naime, EC_{25} vrijednost je nakon 72 sata bila oko četiri puta veća za pozitivno nabijene AgNP-CTAB od vrijednosti izmjeren za negativno nabijeni AgNP-citrat. Takav rezultat sugerira da su AgNP-CTAB manje toksične od AgNP-citrat na stanice alge *C. vulgaris* u podlozi BBM, vjerojatno zbog povećane aglomeracije AgNP-CTAB koja može smanjiti njihovu toksičnost. S druge strane, Zhang i sur. (2020) pokazali su da negativno nabijeni AgNP-citrat rezultira višom vrijednosti EC_{50} za stanica *C. vulgaris* u odnosu na AgNP stabilizirane pozitivno nabijenim polietilenom u hranjivoj podlozi BG-11, što pokazuje da su u njihovim eksperimentalnim uvjetima AgNP s pozitivno nabijenim omotačima bile toksičnije od negativno nabijenih AgNP-citrat. Slično, Lekamge i sur. (2020) su pokazali da AgNP stabilizirane negativno nabijenim kurkuminom i epigalokatehin galatom inhibiraju rast stanica alge *R. subcapitata* pri nižoj koncentraciji od onih obloženih neutralnim L-tirozinom. Navedeni rezultati upućuju da površinski omotači mogu znatno utjecati na toksičnost AgNP na alge, dok razlika u rezultatima među istraživanjima ukazuje na veliku potrebu za usporednim istraživanjima toksičnosti AgNP s različitim omotačima na isti organizam pod jednakim eksperimentalnim uvjetima. S druge strane, tretman s $AgNO_3$ izazvao je najbržu staničnu smrt algi u usporedbi s obje vrste AgNP, gdje je izračunata EC_{25} vrijednost bila znatno bliže EC_{25} vrijednosti za AgNP-citrat nego za AgNP-CTAB. Takav rezultat je u skladu s ranijim

istraživanjima i upućuje da je toksični učinak AgNO_3 na alge rezultat novonastalih AgNP i iona Ag^+ zajedno (Ivask i sur. 2014; Kleiven i sur. 2019; Lekamge i sur. 2020).

Promjene u morfologiji stanica često se koriste kao biomarker toksičnog djelovanja biotičkih i abiotičkih stresora na alge (Mikami i sur. 2021; Kaur i sur. 2022; Yin i sur. 2022). Ranija istraživanja pokazala su da AgNP mogu izazvati značajne morfološke promjene u stanicama različitih vrsta algi. Romero i sur. (2020) pokazali su da AgNP izazivaju povećanje stanica alge *C. vulgaris*, dok je isti rezultat, uz povećanje propusnosti membrane, zabilježen i kod alge *C. reinhardtii* (Nam i sur. 2018). U mom istraživanju, tretmani s oba tipa AgNP u EC_{25} vrijednostima izazvali su destabilizaciju stanične stijenke i membrane, s time da je tretman s AgNP-CTAB uzrokovao veću deformaciju stanične stijenke i plazmolizu. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima ranijeg istraživanja na stanicama alge *C. reinhardtii*, gdje je tretman s AgNP izazvao plazmolizu, što posljedično vodi do povećane propusnosti membrane i drugih ultrastrukturnih promjena (Zhao i sur. 2021). Povećano oštećenje stanične stijenke i membrane nakon tretmana s AgNP-CTAB u odnosu na tretman s AgNP-citrat vjerojatno je posljedica intrizičnih svojstva molekule CTAB. Naime, pozitivno nabijeni CTAB spada u kvarterne amonijeve spojeve za koje je pokazano da se mogu lako vezati na negativno nabijenu staničnu stijenku i membranu čime mogu izazvati snažan negativni učinak na njihov integritet (Tkalec i sur. 2019; Biba i sur. 2022; Ameh i sur. 2023). S druge strane, tretman s AgNO_3 izazvao je smanjenu plazmolizu i smanjenu deformaciju stanične stijenke u odnosu na tretmane s oba tipa AgNP. Rezultati su u skladu s istraživanjima utjecaja AgNP i AgNO_3 na klijance pšenice (*Triticum aestivum* L.) (Vannini i sur. 2014) i na travu *Lolium multiflorum* (Yin i sur. 2011), gdje je zabilježen značajno veći negativni učinak AgNP na morfologiju u odnosu na AgNO_3 , što upućuje da negativni učinak AgNP nije isključivo posljedica disocijacije iona Ag^+ s njihove površine.

Budući da su alge primarni proizvođači, prijenos AgNP kroz vodene ekosustave putem procesa bioakumulacije uvelike ovisi o akumulaciji AgNP u njihovim stanicama (Wang i sur. 2019). Alge vrlo često oko svojih stanica izlučuju sloj EPS, koji je primarno sastavljen od ugljikohidrata uz niske koncentracije drugih biomolekula poput lipida, proteina i nukleinskih kiselina (Shi i sur. 2017). Taj sloj štiti stanicu od antimikrobnih spojeva i teških metala, ali i od nanočestica, zadržavajući štetne tvari kako bi se smanjila njihova koncentracija u stanici (Zheng i sur. 2019). Alge proizvode tri vrste sloja EPS: čvrsto i slabo vezani sloj oko stanica algi te topivi sloj koji se izlučuje u okolinu (Babiak i Krzemińska 2021). U ovom istraživanju, primjenom konfokalne mikroskopije vizualizirao sam čvrsto i slabo vezani sloj EPS oko

stanica, dok sam pomoću analizatora organskog ugljika kvantificirao topivi sloj EPS (DOC) otpušten u podlogu te čvrsto vezani sloj EPS oko stanica algi (POC). Rezultati konfokalne mikroskopije su pokazali kako tretmani s oba tipa AgNP dovode do povećane sinteze čvrsto i slabo vezanog sloja EPS, što je u skladu s rezultatima dobivenim na algi *C. reinhardtii*, nakon izlaganja AgNP-PVP (Nam i sur. 2018). S druge strane, kvantifikacija čvrsto vezanog sloja EPS pomoću analizatora organskog ugljika pokazala je da niti jedan tip AgNP nije izazvao njegovo povećanje, dok su oba tipa AgNP povećala sintezu topivog sloja EPS. Navedeni rezultati upućuju da su stanice povećale sintezu primarno slabo vezanog, ali i topivog sloja EPS nakon navedenih tretmana u cilju smanjivanja količine AgNP koji bi mogao ući u stanice. Naime, dosadašnja istraživanja upućuju da je slabo vezani sloj EPS najviše zaslužan za zadržavanje metala iz okoliša upravo zbog manjeg sadržaja hidrofilnih otopljenih organskih tvari (Fernando i sur. 2020; Li i sur. 2021b). Dodatno, pojačanu sintezu čvrsto i slabo vezanog sloja EPS zabilježio sam i nakon tretmana s AgNO₃, dok sam dodatnom kvantifikacijom pokazao kako tretman s AgNO₃ rezultira i najvećim povećanjem čvrsto vezanog sloja EPS oko stanica (POC), ali i topivog sloja EPS u podlozi (DOC). Pojačana sinteza svih vrsta slojeva EPS nakon tretmana s AgNO₃ moguće je posljedica otežanog vezanja iona Ag⁺ na vezani sloj EPS u odnosu na tretmane s AgNP. Naime, ranije istraživanje je pokazalo kako prisustvo sloja EPS na stanicama alge *C. vulgaris* nema učinak na sadržaj srebra u stanicama, odnosno da ioni Ag⁺ ulaze u stanice algi putem ionskih kanala neovisno o prisustvu sloja EPS (Zheng i sur. 2019). U takvim uvjetima, stanice mogu nastaviti ili pojačati proizvodnju sloja EPS u cilju ublažavanja nastalih negativnih učinka (Miao i sur. 2009).

Unatoč povećanoj sintezi sloja EPS nakon tretmana s oba tipa AgNP, nanočestice su ušle u stanice alge, što je vidljivo iz znatno većeg sadržaja srebra akumuliranog u stanicama u odnosu na sadržaj izmjeren u sloju EPS, a i u skladu je s rezultatima istraživanja drugih autora (Miao i sur. 2009; Zheng i sur. 2019). S druge strane, ja sam u svom radu analizirao sadržaj srebra u čvrsto vezanom sloju EPS, dok dosadašnja istraživanja upućuju da je slabo vezani sloj EPS najviše zaslužan za zadržavanje AgNP. Stoga, moguće je da je i u mom istraživanju slabo vezani sloj EPS, koji se lako otpusti od stanica u podlogu, na sebe vezao više srebra. Važno je istaknuti da je sadržaj akumuliranog srebra u stanicama, ali i sloju EPS, bio proporcionalan EC₂₅ vrijednosti za svaki tretman nanočesticama, odnosno veći sadržaj srebra izmjeren je u stanicama izloženim AgNP-CTAB u usporedbi s tretmanom s AgNP-citrat. No, analizom omjera sadržaja srebra na vezanom sloju EPS u odnosu na sadržaj srebra u stanicama, moguće je vidjeti kako je kod AgNP-CTAB više srebra zadržano na sloju EPS u odnosu na AgNP-citrat što je vjerojatno

posljedica njihovog različitog naboja. Naime, pozitivno nabijene AgNP-CTAB lakše se vežu na negativno nabijene karboksilne, hidroksilne i amino skupine u sloju EPS od negativno nabijenih AgNP-citrat (Babiak i Krzemińska 2021). Dodatno, zadržavanje oba tipa AgNP u sloju EPS dodatno sam potvrdio primjenom TEM-a, gdje sam također primijetio značajno više nanočestica srebra u sloju EPS nakon tretmana s AgNP-CTAB u odnosu na tretman s AgNP-citrat. Moji rezultati su u skladu s rezultatima Zhang i sur. (2020b), koji su pokazali da se pozitivno nabijene AgNP, stabilizirane s polietilenom, brže akumuliraju na površini stanica alge *C. vulgaris* u odnosu na negativno nabijene AgNP-citrat. Navedena pojava vjerojatno je rezultat elektrostatskog privlačenja, odnosno odbijanja između pozitivno ili negativno nabijenih AgNP i makromolekula u sloju EPS. S druge strane, zanimljivo je da je najmanji sadržaj srebra izmjeren nakon tretmana s AgNO₃ i u stanicama alge i u čvrsto vezanom sloju EPS. Unatoč činjenici da je EC₂₅ vrijednost za tretman s AgNO₃ bila najmanja u odnosu na oba tipa AgNP, ovaj rezultat upućuje da je alga uspješno zadržala dio srebra u sloju EPS u obliku novonastalih AgNP koji su vjerojatno nastali redukcijom u podlozi. U prilog tome, novonastale AgNP nakon tretmana AgNO₃ potvrđene su i vizualizacijom primjenom TEM mikroskopije. Analizom omjera sadržaja srebra na sloju EPS u odnosu na sadržaj srebra u stanicama može se uočiti kako je tretman s AgNO₃ sličniji tretmanu s AgNP-citrat nego tretmanu s AgNP-CTAB što ponovno upućuje da su AgNP-citrat nestabilnije u podlozi BBM od AgNP-CTAB.

Navedeni rezultati upućuju da je povećanje sloja EPS jedan od mehanizama ublaživanja toksičnih učinaka AgNP na stanice alge, no nije dovoljan za njegovo potpuno uklanjanje.

5.1.3 Utjecaj na pojavu oksidacijskog stresa

Istraživanja na slatkovodnim algama ponajviše su analizirala učinke AgNP na akumulaciju, unos i transformaciju srebra te na rast i fotosintetske parametre (Nam i sur. 2018; Zheng i sur. 2019; Wang i sur. 2019; Liu i sur. 2020a; Romero i sur. 2020; Zhao i sur. 2021), a samo je manji broj istraživanja pratio pojavu oksidacijskog stresa (Qian i sur. 2016; Lekamge i sur. 2020). Kako je jedan od glavnih mehanizama toksičnosti AgNP induciranje oksidacijskog stresa uslijed povećane proizvodnje ROS, praćenje parametara oksidacijskog stresa iznimno je važno u analizi fitotoksičnosti AgNP (Jiang i sur. 2017; Biba i sur. 2021 2022; Košpić i sur. 2022). Stoga, u cilju boljeg razumijevanja potencijalnog štetnog ekološkog utjecaja AgNP na alge, važno je istražiti mehanizme koji dovode do oksidacijskog stresa.

U mom istraživanju, oba tipa AgNP izazvali su značajno povećanje sadržaja ROS, što je u skladu s prethodnim istraživanjima utjecaja AgNP na stanice *C. vulgaris* (Oukarroum i sur. 2012a; Hazeem i sur. 2019) i *Chattonella marina* (He i sur. 2012). Uzimajući u obzir da su

fluorescentne probe DHE i H₂DCFDA indikatori sadržaja O₂^{•-} i ukupnog ROS (Nazarewicz i sur. 2013; Ng i Ooi 2021), rezultati ovog istraživanja pokazuju da negativno nabijene AgNP-citrat izazivaju veću proizvodnju ukupnog ROS u usporedbi s pozitivno nabijenim AgNP-CTAB. S druge strane, značajno veća količina H₂O₂ izmjerena je nakon izlaganja stanica AgNP-CTAB u usporedbi s AgNP-citrat, što upućuje na drugačiju reaktivnost AgNP s različitim omotačima u stanicama alge. Zanimljivo je da je tretman s AgNO₃ izazvao podjednaku sintezu ROS kao i tretman s AgNP-citrat, ali je izazvao slično povećanje sadržaja H₂O₂ kao i tretman s AgNP-CTAB, što ponovno upućuje da je mehanizam fitotoksičnosti AgNO₃ drugačiji od mehanizma fitotoksičnosti AgNP na alge, ali i da površinski omotači imaju važnu ulogu u samoj toksičnosti AgNP.

Nadalje, oba tipa AgNP izazvala su značajno povećanje peroksidacije lipida, što je u skladu s ranijim istraživanjima provedenim na algama *C. pyrenoidosa* (Qiao i sur. 2022) i *P. malhamensis* (Liu i sur. 2020a), iako je veće povećanje zabilježeno nakon tretmana s AgNP-citrat. Nadalje, značajno povećanje sadržaja proteinskih karbonila izmjereno je samo nakon tretmana s AgNP-citrat, dok AgNP-CTAB nije imao učinak na karbonilaciju proteina. Navedeni rezultati pokazuju jaču fitotoksičnost AgNP-citrat u odnosu na AgNP-CTAB na alge *C. vulgaris*. S druge strane, tretman s AgNO₃ je izazvao značajno povećanje razine MDA i sadržaja proteinskih karbonila i po svom učinku bio je sličan tretmanu s AgNP-citrat. Mogući uzrok koji je doveo do povećane peroksidacije lipida i karbonilacije proteina nakon tretmana s AgNP-citrat i AgNO₃ u odnosu na AgNP-CTAB je njihova manja stabilnost u podlozi BBM te veća proizvodnja sadržaja ROS. Naime, ranije istraživanje upućuje da ioni Ag⁺ povećavaju sadržaj ROS, odnosno pretežito sadržaj H₂O₂, što dalje potiče oksidacijski stres i apoptozu stanica (Rohde i sur. 2021). Dodatno, pokazano je da AgNP mogu vezati na sebe lipide i proteine zbog visokog površinskog reakcijskog potencijala te tako direktno inducirati i peroksidaciju lipida i oštećenje proteina (Rohde i sur. 2021; Waktole 2023). U mom istraživanju, analiza stabilnosti pokazala je da AgNP-citrat i AgNP nastale nakon dodavanja AgNO₃ u podlogu BBM, nakon 24 sata imaju znatno manji promjer u odnosu na AgNP-CTAB, kojima pozitivni naboj još dodatno otežava ulazak u stanicu. Budući da manji udio atoma srebra na površini aglomerata potencijalno smanjuje disocijaciju iona Ag⁺ s njihove površine, izmjereni stupanj aglomeracije AgNP-CTAB u podlozi BBM ukazuje na manji potencijal disocijacije iona Ag⁺ (Zook i sur. 2012). S druge strane, manji promjer AgNP-citrat kao i AgNP nastale od AgNO₃ navodi na potencijalno moguću povećanu disocijaciju iona Ag⁺, koji posljedično induciraju pojačanu proizvodnju ROS u stanicama i time destabiliziraju lipide i

proteine. Nadalje, oštećenje molekule DNA u stanicama algi značajno je povećano s oba tipa AgNP, među kojima je tretman s AgNP-CTAB izazvao veće povećanje postotka DNA u repu. U nedostatku istraživanja utjecaja AgNP na oštećenja DNA kod algi, rezultati su u skladu s istraživanjima genotoksičnosti drugih nanočestica metala, u kojima su tretmani željeznim, cinkovim i bakrovim oksidima izazvali značajno oštećenje DNA molekule u algama *Klisinema persicum* (Al-Khazali i Alghanmi 2023), *Dunaliella tertiolecta* (Schiavo i sur. 2016) i *M. aeruginosa* (Wang i sur. 2011a). Rezultati upućuju da AgNP-citrat izaziva oksidacijski stres te ima i posljedični genotoksični učinak, dok AgNP-CTAB izaziva slabiji oksidacijski stres, ali izaziva jak genotoksični učinak. S druge strane, tretman s AgNO₃ je izazvao najmanje povećanje postotka DNA u repu, čija je vrijednost ponovo bila vrlo slična onoj dobivenoj nakon tretmana s AgNP-citrat. Ranije istraživanje provedeno na animalnim stanicama je pokazalo kako tretman s ionima Ag⁺ nije doveo do značajnog genotoksičnog učinka, dok su čestice AgNP koje su pokazale veći stupanj aglomeracije izazvale i značajan genotoksični učinak (Nallanthighal i sur. 2017). Rezultati upućuju na to da je najveći dio genotoksičnog potencijala AgNP upravo oksidacijski stres, no povećano oštećenje DNA nakon tretmana s AgNP-CTAB pokazuje da je dodatni uzrok moguće i direktna interakcija između AgNP i molekule DNA pri diobi stanica (Nallanthighal i sur. 2017).

Kao odgovor na povećanu sintezu ROS zbog izlaganja AgNP, alge aktiviraju svoj antioksidacijski sustav sastavljen od enzimskih i neenzimskih komponenti, kako bi ublažile negativne posljedice oksidacijskog stresa (Lekamge i sur. 2020; Zhao i sur. 2021; Qiao i sur. 2022). U mom istraživanju samo je tretman s AgNP-CTAB izazvao značajno povećanje aktivnosti enzima SOD, što je u skladu s rezultatima sadržaja O₂^{•-} mjenenog probom DHE koji je bio značajno niži u usporedbi s drugim tretmanima. Naime, katalizom reakcije dismutacije O₂^{•-} u H₂O₂, SOD aktivno smanjuje sadržaj O₂^{•-}. Sličan rezultat povećanja aktivnosti enzima SOD pokazan je i u istraživanju utjecaja AgNP na algu *C. reinhardtii* (Zhao i sur. 2021). Navedeni rezultati ukazuju na to da povećana aktivnost enzima SOD učinkovito eliminira O₂^{•-} njegovim pretvaranjem u H₂O₂ (Kalita i sur. 2018), što je dodatno potvrdio i značajno povećani sadržaj H₂O₂ izmjeren nakon tretmana s AgNP-CTAB. Dodatno, povećana aktivnost enzima SOD, zabilježena samo nakon ovog tretmana, ukazuje na snažnu ulogu molekule CTAB kao surfaktanta koji inhibira moguće interakcije AgNP s drugim molekulama poput enzima SOD. Naime, pokazano je da SOD i AgNP mogu stvarati kompleks koji mijenja konformaciju enzima SOD, čime se posljedično mijenja i njegova aktivnost što je moguće uzrok izostanka njegove povećane aktivnosti nakon tretmana s AgNP-citrat (Liu i sur. 2020b). S druge strane, aktivnosti

enzima PPX i APX bile su povećane s oba tipa AgNP, što je u skladu s rezultatima prethodnih istraživanja utjecaja AgNP na algama *D. salina* (Bahador i sur. 2019) i *C. reinhardtii* (Zhao i sur. 2021). Međutim, povećanje aktivnosti PPX bilo je izraženije nakon tretmana s AgNP-citrat, što je u skladu sa smanjenim sadržajem H₂O₂ izmjerenim nakon tretmana s AgNP-citrat u odnosu na AgNP-CTAB. Budući da enzim PPX smanjuje količinu H₂O₂ njegovim pretvaranjem u H₂O, njegova povećana aktivnost nakon tretmana s AgNP-citrat dovodi do smanjene akumulacije H₂O₂ u stanicama. Zanimljivo je da ni jedan tip AgNP nije imao utjecaj na aktivnost enzima CAT, što se može objasniti ili zabilježenim oštećenjem DNA, čime dolazi do promjene regulacije gena za CAT (Cameron i sur. 2018), ili izravnom interakcijom enzima CAT i AgNP, koji mogu stvarati kompleks i na taj način inducirati konformacijske promjene u enzimu što dovodi do inaktivacije njegove aktivnosti (Liu i sur. 2020b). Tretman s AgNO₃ je, kao i tretmani s AgNP, povećao aktivnost enzima PPX i APX, iako je povećanje aktivnosti PPX bilo jače izraženo u usporedbi s oba tipa AgNP, a osobito s AgNP-CTAB. Također jedini nije izazvao promjenu aktivnosti enzima SOD, dok je s druge strane jedini povećao aktivnost enzima CAT. Budući da je povećana aktivnost enzima PPX i izostanak promjene aktivnosti enzima SOD nakon tretmana s AgNO₃ bila sličnija onoj nakon tretmana s AgNP-citrat, ovi rezultati još jednom ukazuju na sličan mehanizam fitotoksičnosti AgNP-citrat i AgNO₃ u algama te potvrđuju važnu ulogu površinskog omotača AgNP.

Odgovor na oksidacijski stres često uključuje i aktivaciju neenzimskih antioksidansa kao što su prolin i glutation (Chiang i Dandekar 1995; Szabados i Savouré 2010; Biba i sur. 2022). Akumulacija prolina zabilježena je nakon izlaganja algi *M. aeruginosa* česticama AgNP-PVP (Zhang i sur. 2018) i *P. malhamensis* česticama AgNP-citrat (Liu i sur. 2020a), što nije u skladu s rezultatima mog istraživanja u kojem je zabilježen smanjeni sadržaj prolina nakon svih tretmana, a osobito s AgNO₃. Smanjenje sadržaja prolina moguća je posljedica povećane potrebe za energijom u uvjetima stresa, što može potaknuti degradaciju aminokiselina u cilju proizvodnje dodatne energije (Ingrisano i sur. 2023). Naime, prolin je poznat kao jedna od energetske bogatih aminokiselina čijom degradacijom nastaju molekule FADH₂ i NADH, koje se dalje iskorištavaju za proizvodnju energije u mitohondriju (Ingrisano i sur. 2023). Stoga se manji sadržaj prolina izmjeren nakon svih tretmana može povezati s povećanom potrebom stanica alge za energijom. Dodatno, veće smanjenje prolina nakon tretmana s AgNP-CTAB u odnosu na tretman s AgNP-citrat može biti posljedica zabilježenog značajnog oštećenja stanične stijenke i membrane za čiji popravak je potrebna veća količina energije (Kaur i sur. 2022). S druge strane, najveće smanjenje sadržaja prolina u stanicama nakon tretmana s AgNO₃

upućuje na najveću potrebu stanice za energijom, što je vjerojatno posljedica intrinzičnog svojstva AgNO₃. Naime, AgNO₃ u stanicama djeluje kao inhibitor H⁺ pumpe u staničnoj membrani čime je pokazano da značajno smanjuje proizvodnju energije u stanicama alge *C. vulgaris* i *Dunaliella maritima* (Loseva i sur. 2007). Omjer GSH/GSSG također je važan pokazatelj razine oksidacijskog stresa jer GSH djeluje kao neutralizator H₂O₂ doniranjem iona H⁺, koji se zatim oksidira u GSSG (Khan i sur. 2020). Omjer GSH/GSSG bio je podjednako smanjen nakon svih tretmana, što pokazuje da je alga pokušala neutralizirati H₂O₂ kako bi smanjila oksidacijski stres. Rezultati ovog istraživanja su u skladu s ranijim istraživanjem na algi *C. reinhardtii*, u kojoj se nakon tretmana s AgNP značajno smanjio omjer GSH/GSSG (Xu i sur. 2022).

Povećana razina oksidacijskog stresa može dovesti do promjena i u ekspresiji proteina Hsp, čija se razina ekspresije može koristiti kao biljeg stresnih uvjeta u stanicama algi (Abassi i sur. 2020). Naime, proteini Hsp sudjeluju u održavanju stanične homeostaze sprječavajući pogrešno smatanje proteina i njihovu akumulaciju u stanicama (Kozeko 2021). U ovom istraživanju, ekspresija proteina Hsp70 nije se promijenila nakon tretmana sa srebrom, dok se ekspresija proteina Hsp90 značajno smanjila nakon svih tretmana, što je bilo osobito izraženo s AgNO₃. Slični rezultati zabilježeni su i u algi *Closterium ehrenbergii*, gdje je tretman s endosulfanom doveo do smanjenja ekspresije gena *hsp90*, ali ne i ekspresije gena *hsp70* (Abassi i sur. 2020). Proteini Hsp70 i Hsp90 imaju funkciju kao ATP-ovisni molekularni šaperoni te je poznato da se njihova ekspresija može promijeniti uslijed različitih stresnih uvjeta poput topline, hladnoće, izlaganja kemikalijama ili nanočesticama metala (Xin i sur. 2015; Kozeko 2021; Verma i sur. 2021). Razlike u njihovoj ekspresiji, zabilježene u ovom istraživanju, mogle bi biti posljedica njihove djelomično različite stanične lokalizacije, ali i različite uloge u smatanju proteina i odgovoru na stres (Kozeko 2021). Protein Hsp70 je jedan od najčešćih molekularnih šaperona te se primarno nalazi u citosolu stanica alge (Abassi i sur. 2020). S druge strane, protein Hsp90 se, osim u citosolu, nalazi i u jezgri stanica, a njegovi su paralozi prisutni u ER-u, mitohondriju i kloroplastu te je uključen u preživljavanje stanica, kontrolu staničnog ciklusa i proces apoptoze (Csermely i sur. 1998; Li i sur. 2012; Bettaieb i sur. 2020). Nadalje, proteini Hsp70 i Hsp90 imaju i različitu ulogu u smatanju proteina. Protein Hsp70 je primarno uključen u ranije faze sinteze proteina gdje se veže na nove, nesmotane dijelove te pomaže u njihovom pravilnom smatanju i daljnjoj translokaciji u organele. S druge strane, protein Hsp90 djeluje u kasnijim fazama sinteze proteina, gdje je primarno uključen u regulaciju konformacije i stabilizacije proteina koji već imaju većinski cjelovitu sekundarnu strukturu (Verma i sur. 2021). U mom

istraživanju, nepromijenjena ekspresija proteina Hsp70 ukazuje da oba tipa AgNP i AgNO₃ nisu značajno utjecali na ranije faze procesa smatanja proteina u kojima ovaj protein ima ključnu ulogu. Suprotno, značajno smanjenje ekspresije proteina Hsp90 upućuje da su svi tretmani sa srebrom značajno utjecali na stabilnost i konformaciju proteina u kasnijim fazama smatanja proteina, do te mjere da Hsp90 proteini nisu mogli popraviti njihovu strukturu. Dodatno, smanjenje ekspresije proteina Hsp90 vjerojatno je i rezultat oksidacijskog stresa u stanicama, a pokazano je da protein Hsp90 ima i značajnu ulogu u proliferaciji i rastu stanica te je njegova inhibicija povezana s indukcijom apoptoze (Xu i sur. 2017). Budući da su u ovom istraživanju korištene koncentracije tretmana koje omogućuju preživljenje stanica od 75%, smanjena ekspresija proteina Hsp90 mogući je rezultat visokog postotka apoptoze. Ovi rezultati upućuju da proteini Hsp70 i Hsp90 obavljaju različite i specijalizirane funkcije u obrani stanica alge uslijed djelovanja oba tipa AgNP i AgNO₃.

5.1.4 Utjecaj na fotosintetski sustav

Fotosintezom, cijanobakterije i alge proizvode polovicu ukupnog atmosferskog kisika (Field i sur. 1998; Ma i sur. 2023), a sam proces ovisi o svjetlosnoj energiji apsorbiranoj pomoću pigmenata, među kojima su najvažniji klorofil *a* i *b* te karotenoidi (Chen i sur. 2023b). Stoga, sastav i koncentracija fotosintetskih pigmenata imaju značajan utjecaj na količinu apsorbirane svjetlosti te posljedično na samu učinkovitost fotosinteze u algama (Larkum 2016). U ovom istraživanju, tretmani s oba tipa AgNP nisu imali učinak na sadržaj klorofila *a*, povećali su sadržaj klorofila *b* te smanjili proizvodnju karotenoida. Prijašnja istraživanja pokazala su da alge mogu povećati sadržaj fotosintetskih pigmenata, pogotovo klorofila *a* i *b*, u nepovoljnim uvjetima poput temperaturnih promjena i povišenog saliniteta, ali i nakon izlaganja metalima i nanočesticama metala, u cilju povećanja fotosintetske aktivnosti i pojačane proizvodnje energije (Wang i sur. 2019; Kaur i sur. 2022). Za razliku od tretmana s oba tipa AgNP, tretman s AgNO₃ rezultirao je povećanom proizvodnjom obje vrste klorofila, dok nije pokazao učinak na sadržaj karotenoida. Razlike u sadržajima fotosintetskih pigmentata nakon tretmana s oba tipa AgNP te nakon tretmana s AgNO₃ zabilježene u ovom istraživanju pokazuju različiti učinak samih AgNP na sadržaj pigmenta u odnosu na novonastale AgNP i ione Ag⁺ nakon tretmana s AgNO₃. Naime, značajno povećanje sadržaja obje vrste klorofila nakon tretmana s AgNO₃ upućuje na povećanu potrebu stanica za energijom, što je u skladu s rezultatima sadržaja prolina te s prijašnjim istraživanjem gdje je pokazano da AgNO₃ djeluje kao inhibitor H⁺ pumpe te inhibira proizvodnju energije u algama (Loseva i sur. 2007). S druge strane, budući da karotenoidi sudjeluju u rasipanju energije u PSII, značajno smanjenje njihovog sadržaja samo

nakon tretmana s oba tipa AgNP upućuje da AgNP smanjuju mogućnost zaštite PSII od fotooksidacije, što je u skladu s ranijim istraživanjem utjecaja AgNP na vodenu leću (*Spirodela polyrhiza*) (Jiang i sur. 2017). Unatoč različitom učinku AgNP i AgNO₃ na sadržaj klorofila *a* i *b*, svi tretmani doveli su do značajnog smanjenja stope fotosinteze i maksimalnog kvantnog prinosa PSII (F_v/F_m) u odnosu na kontrolu, što je u skladu s prijašnjim istraživanjem gdje je izlaganje alge *P. malhamensis* tretmanima s AgNP-citrat i AgNO₃ rezultiralo smanjenjem vrijednosti F_v/F_m (Liu i sur. 2020a). Smanjenje stope fotosinteze pokazuje da su svi tretmani sa srebrom imali značajan negativan učinak na fotosintetski aparat alge, dok smanjenje vrijednosti F_v/F_m upućuje na inhibiciju pretvorbe svjetlosne energije u kemijsku u procesu fotosinteze, odnosno inhibiciju prijenosa elektrona u fotokemijskim reakcijama (Zushi i sur. 2012; Zhou i sur. 2023). Naime, u uvjetima jakog oksidacijskog stresa može doći do razgradnje reakcijskih centara PSII i smanjenja prijenosa elektrona do plastokinona (Almeida i sur. 2019).

Imunodetekcija je pokazala da ni jedan tretman srebrom nije imao učinak na ekspresiju enzima RuBisCo, dok je razdvajanjem proteina 2-D elektroforezom smanjenje ekspresije velike podjedinice ovog enzima zabilježeno samo nakon tretmana s AgNP-CTAB, što ponovno ukazuje na sličniji mehanizam djelovanja AgNP-citrat i AgNO₃ u odnosu na AgNP-CTAB, ali i na visoku stabilnost enzima RuBisCo. Naime, RuBisCo je ključan enzim u fiksaciji ugljika u Calvinovom ciklusu te je njegova struktura i funkcija evolucijski očuvana, što može utjecati na stabilnost njegove ekspresije u stresnim uvjetima (Demirevska i sur. 2009; Wijewardene i sur. 2021). Nadalje, alge su razvile razne kompenzacijske mehanizme upravo s ciljem održavanja stabilne razine enzima RuBisCo u nepovoljnim uvjetima. Jedan od takvih mehanizama je i povećanje sinteze RuBisCo aktivaze, šaperona koji pomaže u održavanju pravilne strukture enzima RuBisCo u stresnim uvjetima (DeRidder i sur. 2012; Wijewardene i sur. 2021). Dodatno, istraživanja provedena na algama *C. reinhardtii* i *Coleochaete scutata* pokazala su da se RuBisCo i RuBisCo aktivaza nalaze zajedno u pirenoidima, strukturama lokaliziranim u kloroplastima algi, te se zbog povećane razine CO₂ u njima može učinkovito odvijati redukcija ugljika (McKay i sur. 1991; He i sur. 2023). S druge strane, nakon tretmana s AgNP-citrat i AgNO₃ zabilježena je pojačana ekspresija proteina D1, koji ima ključnu ulogu u reakcijskom centru PSII gdje utječe na prijenos elektrona u procesu fotosinteze (Edelman i Mattoo 2008). Stoga, povećana ekspresija ovog proteina nakon tretmana s AgNP-citrat i AgNO₃ može biti rezultat aktivacije stanične obrane zbog stresa izazvanog srebrom (Kaur i sur. 2022), što se može povezati s povećanim sadržajem MDA i proteinskih karbonila, odnosno pojačanim oksidacijskim stresom zabilježenim u ovim tretmanima, što je u konačnici dovelo i do

smanjenja stope fotosinteze. Naime, poznato je da za kompenzaciju smanjene učinkovitosti fotosinteze, alge mogu povećati ekspresiju proteina D1 (Banu i sur. 2021). Navedeni rezultat opet upućuje da je učinak AgNO₃ sličniji učinku AgNP-citrat na algu *C. vulgaris* u odnosu na tretman s AgNP-CTAB.

S druge strane, AgNP-CTAB nije imao učinak na ekspresiju proteina D1 u odnosu na kontrolu, što se može povezati sa slabijim oksidacijskim stresom, odnosno manjim sadržajem ROS koji je ovaj tretman izazvao u odnosu na AgNP-citrat i AgNO₃. Naime, AgNP-CTAB je izazvao manju oksidaciju lipida pa je samim time izazvao i manju destabilizaciju tilakoidne membrane. Stoga, zabilježeno smanjenje stope fotosinteze nakon navedenog tretmana je vjerojatno primarno posljedica veće količine srebra na površini stanica u odnosu na količinu srebra nakon drugih tretmana koja može smanjiti apsorpciju svjetlosti i time inhibirati proces fotosinteze (Wang i sur. 2019).

5.1.5 Utjecaj na proteom

AgNP mogu imati značajan utjecaj na količinu proteina i aktivnost enzima direktnom interakcijom ili indirektno induciranjem proizvodnje ROS koji mogu oksidirati proteine, ali i oštetiti molekulu DNA, čime se može smanjiti transkripcija (Biba i sur. 2021). Stoga, analiza proteoma može dati uvid u promjene u ekspresiji staničnih proteina, što može pomoći u razjašnjavanju pozadinskih molekularnih mehanizama fitotoksičnosti (Zhang i sur. 2020a). U cilju analize fitotoksičnosti oba tipa AgNP te AgNO₃ na stanice alge *C. vulgaris* na proteomskoj razini, analizirao sam promjene u ekspresiji proteina nakon svih tretmana. Nakon tretmana s AgNP-citrat i AgNO₃ većina diferencijalno eksprimiranih proteina imala je povećanu ekspresiju, dok je AgNP-CTAB smanjio ekspresiju većine detektiranih proteina u odnosu na kontrolu. Navedeni rezultat ponovno upućuje na sličnost učinaka AgNP-citrat i AgNO₃ na algu *C. vulgaris*.

Nakon svih tretmana, najviše diferencijalno eksprimiranih proteina bilo je iz kategorija: Fotosinteza, Metabolizam ugljikohidrata, Prijenos signala, Obrana i odgovor na stres te Procesi transkripcije i translacije. Nakon tretmana s AgNP-citrat, najviše proteina iz kategorije Fotosinteza imalo je povećanu ekspresiju, dok je AgNP-CTAB smanjio ekspresiju svih proteina uključenih u fotosintezu, što se može objasniti s rezultatima dobivenim mjerenjem maksimalnog kvantnog prinosa PSII. Naime, nakon tretmana s AgNP-citrat izmjeren je veći maksimalni kvantni prinos PSII u algama u odnosu na AgNP-CTAB. Nadalje, proteini s povećanom ekspresijom nakon tretmana s AgNP-citrat većinom su bili uključeni u reakcije na PSI i PSII poput vezanja klorofila *a* i *b* (klorofil a-b vezujući protein), dobivanja kisika, odnosno

fotolize vode (protein PsbO₂) ili stvaranja kompleksa s feredoksinom i feredoksin-oksido-reduktazom u lancu prijenosa elektrona čime se povećava količina NADPH za daljnju fiksaciju ugljika (protein reakcijskog centra PSI podjedinica 4). Navedeni rezultat u skladu je s rezultatima učinka AgNP-PEG na algu *C. reinhardtii* gdje je većina proteina s povećanom ekspresijom uključena upravo u fotosintezu i Calvin-Benson ciklus (Lindgren 2014). S druge strane, svi navedeni proteini pokazali su smanjenu ekspresiju nakon tretmana s AgNP-CTAB, što upućuje na to da je došlo do inhibicije stvaranja fotolize vode i kisika te aktivnosti feredoksina. Tretman s AgNO₃ rezultirao je najmanjim brojem diferencijalno ekspimiranih proteina iz skupine Fotosinteza među kojima je samo za dva klorofil a-b vezujuća proteina zabilježena smanjena ekspresija. Nakon tretmana s AgNO₃, većem broju proteina uključenih u reakcije na PSI i II je ekspresija ostala nepromijenjena, što je u skladu s blago povećanom stopom fotosinteze u odnosu na ostale tretmane.

Nakon tretmana s AgNP-citrat, smanjila se ekspresija beta podjedinice ATP-sintaze koja sudjeluje u sintezi ATP iz ADP i fosfata, čime se smanjuje i proizvodnja stanične energije, što je u skladu s ranijim istraživanjem utjecaja AgNP-citrat na proteom alge *C. vulgaris* (Qian i sur. 2016). U cilju moguće kompenzacije smanjene energetske razine, nakon navedenog tretmana primijećena je povećana ekspresija proteina iz skupine Metabolizam ugljikohidrata, što je u skladu i s rezultatima smanjena sadržaja prolina čijom se degradacijom također može povećati proizvodnja energije (Ingriso i sur. 2023). Dodatno, tretmani s AgNP-citrat i AgNO₃ izazvali su povećanje ekspresije malat dehidrogenaze koja je uključena u ciklus limunske kiseline (Cavalcanti i sur. 2014). Naime, pokazano je da u stresnim uvjetima, poput povećanog oksidacijskog stresa, alge mogu pojačati sintezu lipida u svrhu skladištenja energije (Shi i sur. 2020b). Budući da malat dehidrogenaza sudjeluje u ciklusu limunske kiseline, u kojem dolazi do otpuštanja energije iz ugljikohidrata, lipida i proteina, povećana ekspresija ovog enzima upućuje na potrebu stanice za povećanjem proizvodnje energije koja bi se mogla iskoristiti za aktivaciju antioksidacijske obrane (Lal 2018). Povećana ekspresija fosfoglicerat kinaze uključene u glikolizu te NADP-ovisne oksido-reduktaze, također zabilježena s AgNP-citrat i AgNO₃, upućuju na povećanu razgradnju drugih molekula u cilju povećavanja proizvodnje energije. S druge strane, nakon tretmana s AgNP-CTAB zabilježena je smanjena ekspresija proteina uključenih u metabolizam ugljikohidrata: fruktoza-bisfosfat aldolaze, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze i fosfoglicerat kinaze uključene u glikolizu te malat dehidrogenaze uključene u ciklus limunske kiseline, što upućuje na to da su alge usporile metabolizam u cilju preživljavanja stresnih uvjeta (Dhal i Harshata 2022). Naime, proteomska analiza alge *Pyropia*

haitanensis u uvjetima povišenog saliniteta pokazala je da se za veliki broj proteina povezanih sa glikolizom te putem pentoza fosfata značajno smanjila ekspresija u odnosu na kontrolu (Wen i sur. 2020a). Dodatno, istraživanje provedeno na algi *M. aeruginosa* također je pokazalo da izlaganje AgNP dovodi do smanjenja ekspresije proteina povezanih s metabolizmom ugljikohidrata (Qian i sur. 2016).

Iz skupine Obrana i odgovor na stres, jedini protein s promijenjenom, odnosno povećanom ekspresijom nakon sva tri primijenjena tretmana je bio protein *Antifreeze*. Ovaj protein ima ulogu u zaštiti stanica inhibiranjem kristalizacije leda (Atıcı i Nalbantoğlu 2003). Međutim, istraživanja su pokazala da se protein *Antifreeze* inducira i prilikom povišenog saliniteta (Kristiansen i sur. 2008) te da u biljkama može regulirati ekspresiju gena drugih proteina uključenih u obranu od stresa, poput enzima CAT i SOD (Pe i sur. 2019). Stoga je povećana ekspresija proteina *Antifreeze* vjerojatno posljedica oksidacijskog stresa detektiranog u algama nakon ispitanih tretmana. Također nakon tretmana s AgNP-citrat pojačana je ekspresija i proteina laktat dehidrataze koji ima ulogu u odgovoru na stres glikozilaznom aktivnosti metilglioksala (Pohanka 2020). Naime, metilglioksal je citotoksični metabolit koji nastaje kao nusprodukt raznih metaboličkih reakcija te sudjeluje u stvaranju krajnjih proizvoda napredne glikacije koji su jedan od biljega oksidacije proteina, odnosno oksidacijskog stresa (Kalousová i sur. 2002; Pohanka 2020). Laktat dehidrataza katalizira reakciju pretvorbe metilglioksala u laktat čime se smanjuje unutarstanični sadržaj metilglioksala i samim time njegov mogući negativni učinak na stanicu (Jain i sur. 2020). Nadalje, tretman s AgNO₃ je uz ekspresije proteina *Antifreeze* i laktat dehidrataze, dodatno pojačao ekspresiju i enzima SOD uključenog u antioksidacijski odgovor alge smanjivanjem količine O₂^{•-} što upućuje da je oksidacijski stres uzrokovan tretmanom s AgNO₃ bio značajan te su aktivirani razni stanični mehanizmi njegovog smanjivanja. S druge strane, osim proteina *Antifreeze*, tretman s AgNP-CTAB nije izazvao promjenu ekspresije drugih proteina uključenih u obranu ili odgovor na stres, što je u skladu s izmjerenom količinom ROS u stanicama.

Analizom diferencijalno eksprimiranih proteina uključenih u kategoriju Prijenos signala može se uočiti kako su svi tretmani izazvali smanjenje ekspresije Ca²⁺/kalmodulin ovisne kinaze II (CaMKII). Naime, CaMKII je kompleksna multifunkcionalna kinaza koja je uključena u mnoge stanične i fiziološke procese (Najar i sur. 2021). Smanjena ekspresija navedenog proteina može biti posljedica jakog oksidacijskog stresa uzrokovanog srebrom, koji može ometati razne stanične procese pa samim time i signalni put CaMKII. Smanjena ekspresija CaMKII također može biti i stanični odgovor na stres u cilju smanjivanja negativnih učinaka nanočestica i iona

srebra redukcijom određenih staničnih funkcija reguliranih pomoću ovog proteina (Zhao i sur. 2022; Rostas i Skelding 2023). S druge strane, tretman s AgNP-citrat izazvao je povećanje ekspresije ionskog kanala ovisnog o naponu (VDAC) na vanjskoj membrani mitohondrija koji sudjeluje u transportu iona Ca^{2+} i metabolita, moguće u cilju kompenzacije smanjenog prijenosa signala i staničnih procesa smanjenjem ekspresije CaMKII. Suprotno, AgNP-CTAB je izazvao smanjenu ekspresiju navedenog ionskog kanala, što je moguće posljedica smanjenja negativnih učinaka AgNP-CTAB jer je pokazano da su proteini VDAC uključeni u prijenos iona u signalnom putu apoptoze stanica (Reina i Checchetto 2022).

Iz skupine proteina uključenih u kategoriju Procesi transkripcije i translacije, AgNP-citrat i AgNO_3 su izazvali povećanu ekspresiju proteina s domenom RRM, što je u skladu s istraživanjem utjecaja AgNP-citrat na biljku soje (*Glycine max* L.) gdje je također zabilježena povećana ekspresija proteina s domenom RRM (Hashimoto i sur. 2020). Vezanjem molekule RNA, ovaj protein ima ulogu u procesiranju mRNA te posljedično u transkripciji i translaciji, što je vjerojatno uzrok povećane ekspresije drugih proteina uključenih u Fotosintezu te Obranu i odgovor na stresne uvjete. S druge strane, tretman s AgNP-CTAB smanjio je ekspresiju dva elongacijska faktora Tu i translacijske (tr) GTPaze koji imaju ulogu u dopremi molekule aminoacil-tRNA do ribosoma prilikom sinteze proteina. Iako analiza karbonilacije proteina nije pokazala njihovo značajno oštećenje nakon tretmana s AgNP-CTAB u odnosu na kontrolu, smanjena ekspresija proteina povezanih s biosintezom proteina u korelaciji je s primijećenim ukupnim smanjenjem ekspresije identificiranih proteina nakon tretmana s AgNP-CTAB u odnosu na ostale tretmane. Navedeni rezultati upućuju da je nakon tretmana s AgNP-CTAB, alga smanjila biosintezu proteina, a ne da je došlo do njihove oksidacije, odnosno degradacije.

Od ostalih diferencijalno eksprimiranih proteina, zamijećena je povećana ekspresija proteina s domenom *Cupin* tipa 1 nakon tretmana s AgNP-citrat i AgNO_3 . Navedeni protein ima primarnu ulogu u skladištenju energije, iako je novije istraživanje pokazalo kako može imati ulogu i u antioksidacijskom djelovanju gdje vezanjem metala može neutralizirati $\text{O}_2^{\bullet -}$ (Hu i sur. 2023). Nadalje, AgNP-CTAB i AgNO_3 izazvali su povećanu ekspresiju proteina aktina koji ima ključnu ulogu u izgradnji i održavanju integriteta citoskeleta alge te sudjeluje u brojnim staničnim procesima poput stanične diobe i unutarstaničnog transporta (Craig i sur. 2019). Povećana ekspresija aktina vjerojatno je posljedica aktivacije mehanizama popravka staničnog citoskeleta nakon zabilježenih morfoloških promjena stanica nakon tretmana s AgNP-CTAB i AgNO_3 .

Navedeni rezultati pokazuju da površinski omotači imaju značajnu ulogu u molekularnom mehanizmu fitotoksičnosti AgNP, što je u skladu s ranijim istraživanjem na algi *C. vulgaris* nakon izlaganja negativno nabijenim AgNP-citrat i pozitivno nabijenim AgNP-PEI. Naime, u navedenom istraživanju, AgNP-citrat su primarno imale utjecaj na ekspresiju proteina povezanih s funkcijom mitohondrija, dok su AgNP-PEI imale utjecaj ponajviše na proteine uključene u biosintezu proteina (Zhang i sur. 2020a). Dodatno, rezultati diferencijalne ekspresije proteina ovog istraživanja pokazuju da tretmani s AgNP-citrat i AgNO₃ imaju sličan molekularni obrazac fitotoksičnog djelovanja, gdje je za većinu proteina zabilježena povećana ekspresija. S druge strane tretman s AgNP-CTAB izazvao je uglavnom smanjenu ekspresiju identificiranih proteina, što ukazuje da su stanice najvećim dijelom smanjile upravo biosintezu proteina kako bi sačuvale energiju, ali i smanjile daljnji štetni učinak AgNP-CTAB.

5.2 Nanočestice i ioni bakra

5.2.1 Stabilnost nanočestica u hranjivoj podlozi

Kao što je već ranije navedeno, na fitotoksičnost nanočestica metala veliki utjecaj ima njihova stabilnost u mediju za izlaganje. Naime, nestabilne nanočestice metala mogu aglomerirati, čime im se fitotoksičnost smanjuje, ili pak može doći do disocijacije iona s njihove površine, čime se često fitotoksičnost povećava (Biba i sur. 2021). Pokazano je da nanočestice bakrovih oksida u vodenim medijima poput rijeka i jezera jako aglomeriraju, disociraju i sedimentiraju (Liu i sur. 2018), dok zbog različite stabilnosti u vodenim sustavima različite nanočestice bakrovih oksida imaju različite primjene u industriji (Chen i sur. 2014; Michaud i sur. 2019; Waleed i sur. 2020; Kanavi i sur. 2022). Za CuONP i Cu₂ONP zabilježena je različita stabilnost u okolišu, na koju utječu razni faktori poput ionske jakosti, pH vrijednosti i interakcije s drugim tvarima poput sloja EPS (Arshadi-Rastabi i sur. 2015; Kwon i sur. 2015; Miao i sur. 2015; Shah i sur. 2022). Istraživanja su pokazala da su Cu₂ONP manje stabilne u vodenim sustavima zbog lake promjene oksidacijskog stanja u stabilniji oblik CuONP (Kwon i sur. 2015). Dodatno, ranije istraživanje je pokazalo da se stabilnost CuONP smanjuje pri većim vrijednostima pH te pri većim vrijednostima ionske jakosti podloge, gdje dolazi do njihove aglomeracije (Sousa i Teixeira 2013). U ovom istraživanju, zabilježena je značajna aglomeracija CuONP i Cu₂ONP u ultra-čistoj vodi, ali i u podlozi BBM, što dodatno potvrđuje njihovu nestabilnost u vodenim medijima. Sličan rezultat aglomeracije CuONP u čistoj vodi pokazan je i u ranijem istraživanju (Ibrahim i sur. 2022), dok je isto zabilježeno i u morskoj vodi (Gomes i sur. 2012). Dodatno, aglomeracija Cu₂ONP zabilježena je i neposredno nakon njihovog dodavanja u razne biološke tekućine poput simulirane slin, ljudske krvne plazme te želučane tekućine (Woźniak-Budych

i sur. 2020), ali i u Steinbergovoj hranjivoj podlozi s 1/10 koncentracije makroelemenata (Song i sur. 2016). Zapažena nestabilnost CuONP i Cu₂ONP u ultra-čistoj vodi može biti rezultat niskog ζ potencijala ovih nanočestica u vodi. Naime, ζ potencijal ukazuje na razinu odbijanja slično nabijenih čestica u suspenziji. Visoki ζ potencijal ukazuje na tendenciju međusobnog odbijanja čestica, čime se sprječava njihovo grupiranje, odnosno aglomeracija. S druge strane, kada je ζ potencijal nizak, čestice su sklonije grupiranju, što može rezultirati stvaranjem aglomerata (Song i sur. 2016). Dodatno, istraživanja su pokazala da stabilnije čestice često imaju ζ potencijal veći od 30 mV ili manji od -30 mV (Mekhamer 2010). U mom istraživanju, izmjereni ζ potencijal od 7,04 mV za CuONP u ultra-čistoj vodi, odnosno -25,16 mV za Cu₂ONP upućuje da je upravo niska apsolutna vrijednost ζ potencijala navedenih nanočestica bila razlog njihovog aglomeriranja, što je u skladu s ranijim istraživanjem (Zhao i sur. 2011). S druge strane jedan od primarnih razloga zapažene značajne aglomeracije CuONP i Cu₂ONP u hranjivim podlogama u ovom i drugim istraživanjima je visoka ionska jakost korištenih podloga. Naime, pokazano je da prisustvo divalentnih kationa poput Mg²⁺ i Ca²⁺ u podlogama povećava aglomeraciju nanočestica stvaranjem divalentnih mostova gdje se dvije nanočestice povezuju preko navedenih iona (Wang i sur. 2011b). No, budući da je pokazano da se stabilnost CuONP može značajno poboljšati prisustvom sloja EPS (Miao i sur. 2015), čiju sintezu alge povećavaju u stresnim uvjetima (Babiak i Krzemińska 2021), moguće je da je realna stabilnost CuONP u suspenziji sa stanicama bitno drugačija, odnosno veća od one izmjerene u čistoj podlozi BBM. Tako povećana stabilnost CuONP u staničnoj suspenziji mogla bi se očitovati kroz njihovu manju fitotoksičnost u odnosu na veću fitotoksičnost nestabilnijih Cu₂ONP.

Rezultati stabilnosti otopine CuSO₄ u podlozi BBM pokazuju da su ioni Cu²⁺ reagirali s ionima iz podloge, što je rezultiralo sintezom aglomerata neposredno nakon njihovog dodatka u podlogu pri čemu su nakon 24 sata zabilježeni aglomerati s promjerom preko 26 μ m. Rezultati su u skladu s ranijim istraživanjem gdje je pokazana značajna redukcija iona Cu²⁺ u vodenim medijima (Haughey 2000).

5.2.2 Unos nanočestica i iona bakra u stanice i utjecaj na morfologiju algi

Na fitotoksičnost nanočestica bakrovih oksida uvelike utječe njihova stabilnost (Liu i sur. 2018). U ovom radu, analizom utjecaja CuONP i Cu₂ONP na vijabilnost stanica alge uočena je razlika u njihovoj fitotoksičnosti, gdje je zapaženo da CuONP uzrokuju smrtnost stanica od 25% pri koncentraciji od 14,45 mg L⁻¹, dok Cu₂ONP izazivaju isti postotak smrtnosti stanica već pri koncentraciji od 11,89 mg L⁻¹. Razlika u fitotoksičnosti nanočestica bakrovih oksida se može objasniti ranije navedenom povećanom stabilnosti CuONP u suspenziji stanica pomoću

sloja EPS kojeg alge izlučuju (Miao i sur. 2015). U prilog tome, tretman s CuSO_4 se pokazao najtoksičnijim, s izračunatom EC_{25} vrijednosti od $8,36 \text{ mg L}^{-1}$. Dobiveni rezultat je u skladu s ranijim istraživanjem gdje je pokazano da je CuSO_4 značajno toksičniji od CuONP na algu *Chlorella* sp što, zajedno s rezultatima stabilnosti, upućuje da je fitotoksičnost CuSO_4 rezultat novonastalih čestica te iona Cu^{2+} (Wan i sur. 2018).

Kao što je ranije navedeno, promijenjena morfologija stanica algi dobar je indikator stresnih uvjeta u stanicama (Kaur i sur. 2022). Ranija istraživanja pokazala su da tretman česticama CuONP izaziva izduživanje stanica, odnosno nepravilnu morfologiju stanica kod algi *C. pyrenoidosa* (Zhao i sur. 2016) i *M. aeruginosa* (Hou i sur. 2017). Sličan rezultat dobiven je i u ovom istraživanju gdje su tretmani s CuONP i Cu_2ONP izazvali destabilizaciju stanične stijenke i doveli do pojave plazmolize. Među oba korištena tretmana, veća razina plazmolize zabilježena je nakon tretmana s CuONP što može biti posljedica veće stabilnosti CuONP u podlozi zbog prisustva sloja EPS čime CuONP imaju manju veličinu od Cu_2ONP te posljedično lakše reagiraju sa staničnom stijenkom i membranom. S druge strane, najveću destabilizaciju strukturnog integriteta stanice izazvao je tretman s CuSO_4 , a sličan rezultat dobiven je i nakon izlaganja alge *C. pyrenoidosa* CuONP i ionima Cu^{2+} , gdje su oba tretmana rezultirala ultrastrukturnim promjenama i pojavom plazmolize, ali je tretman s ionima Cu^{2+} izazvao veće oštećenje stanica (Zhao i sur. 2016). Dobiveni rezultati upućuju da, uz reaktivnije nanočestice bakrovih oksida s manjim promjerom, i ioni Cu^{2+} imaju značajan utjecaj na morfologiju stanica algi.

Poznato je da alge mogu povećati proizvodnju sloja EPS oko stanica u raznim nepovoljnim uvjetima (Babiak i Krzemińska 2021). U ovom sam istraživanju, konfokalnom mikroskopijom pokazao povećanu sintezu slabo i čvrsto vezanog sloja EPS oko stanica algi nakon oba tretmana nanočesticama bakrovih oksida u odnosu na kontrolu. Rezultati su u skladu s prijašnjim istraživanjima, u kojima je zabilježena veća količina sloja EPS oko stanica alge *C. pyrenoidosa* (Zhao i sur. 2016) i *M. aeruginosa* (Hou i sur. 2017) nakon tretmana s CuONP u odnosu na kontrolu. S druge strane, nakon tretmana s CuONP i Cu_2ONP nije zabilježeno povećanje čvrsto vezanog sloja EPS (POC), dok je zabilježeno blago povećanje topivog sloja EPS (DOC) koje nije bilo statistički značajno u usporedbi s kontrolom. Navedeni rezultati upućuju da su nakon tretmana s CuONP i Cu_2ONP , stanice povećale sintezu primarno slabo vezanog sloja EPS za kojeg je pokazano da ima najveću ulogu u zadržavanju čestica metala iz okoliša u odnosu na čvrsto vezani i topivi sloj EPS (Fernando i sur. 2020; Li i sur. 2021b). S druge strane, nakon tretmana s CuSO_4 zabilježio sam najveću količinu slabo i čvrsto vezanog sloja EPS oko stanica

algi u odnosu na ostale tretmane, dok sam dodatnom kvantifikacijom pokazao kako tretman s CuSO_4 rezultira i najvećim povećanjem topivog sloja EPS u podlozi (DOC). Povećanje sloja EPS oko alge ima za cilj zadržavanje nanočestica i iona čime se sprječava njihov ulazak u stanicu i induciranje negativnih učinka. Stoga, značajno povećanje topivog i slabo vezanog sloja EPS nakon tretmana s CuSO_4 je moguće posljedica njegovog izrazito negativnog učinka na morfologiju stanica.

Usprkos povećanoj količini sloja EPS, znatna količina bakra je unesena u stanicu nakon tretmana s CuONP i Cu_2ONP , dok je samo manja količina bakra zadržana na sloju EPS izvan stanica. Name, ja sam u svom istraživanju analizirao sadržaj bakra u čvrsto vezanom sloju EPS, dok istraživanja upućuju da slabo vezani sloj EPS ima najveću ulogu u zadržavanju nanočestice metala, što je moguće posljedica male količine izmjerenog bakra na sloju EPS nakon tretmana s CuONP i Cu_2ONP . Dodatno, najviše bakra akumuliranog na sloju EPS i u stanicama izmjereno je nakon tretmana s CuONP , što je vjerojatno posljedica razlike u EC_{25} vrijednostima između navedenih tretmana. No, analizom omjera sadržaja bakra unesenog u stanice i zadržanog u sloju EPS vidljivo je da su se Cu_2ONP više zadržale na sloju EPS u odnosu na tretman s CuONP . Navedeni rezultat može biti posljedica manje stabilnosti Cu_2ONP u suspenziji stanica, pri čemu dolazi do aglomeracije i olakšane interakcije sa slojem EPS. U prilog tome, najmanja količina bakra u stanicama izmjerena je nakon tretmana s CuSO_4 što je vjerojatno posljedica visoke nestabilnosti CuSO_4 u podlozi BBM čijom interakcijom je pokazano da dolazi do stvaranja velikih aglomerata s promjerom preko 26 μm . Tako veliki aglomerati imaju tendenciju taloženja u tekućim podlogama, ali i vezanja na sloj EPS (Qiu i sur. 2020). S druge strane, najmanje bakra je izmjereno na sloju EPS nakon tretmana s CuSO_4 što je vjerojatno posljedica analiziranja čvrsto vezanog sloja EPS, dok slabo vezani sloj EPS, koji se lako otpušta u podlogu, ima najveći potencijal za vezanje čestica metala.

Analiza ultrastrukture stanica dodatno je pokazala da se CuONP primarno vežu uz staničnu stijenkicu, dok se Cu_2ONP ponajviše vežu na tilakoidne membrane kloroplasta. Naime, povećana prisutnost CuONP oko stanične stijenske zabilježena je i u drugim istraživanjima na biljkama, što potvrđuje olakšano vezanje CuONP na staničnu stijenkicu (Xiong i sur. 2021). Pretpostavlja se da se CuONP , osim za staničnu stijenkicu, mogu lako vezati i za staničnu membranu te se tek nakon dugotrajnog izlaganja stanica nanočesticama, endocitozom mogu prenijeti na membrane organela (Baylan i sur. 2020). S druge strane, mehanizam ulaska Cu_2ONP u stanice nije razjašnjen, no poznato je da ove nanočestice nemaju toliko potencijal za vezanje na površinu stanica, odnosno pokazano je da su njihova svojstva vezanja iznimno ovisna o kristalnoj ravnini

prisutnoj na površini čestica (Lee i sur. 2022). Stoga je moguće da su se Cu₂ONP pretežito vezale za tilakoidnu membranu zbog drugih razloga poput strukturalne kompatibilnosti ili zbog elektrostatskog privlačenja između naboja na površini nanočestica i tilakoidne membrane (Tenorio i sur. 2017; Che i sur. 2021; Dai i sur. 2022). Iz navedenih rezultata je vidljivo da oksidacijsko stanje nanočestica bakrovih oksida značajno utječe na intrinzična svojstva nanočestica, što posljedično ima utjecaj na mehanizam njihove fitotoksičnosti na alge. S druge strane nakon tretmana s CuSO₄ nisu uočeni aglomerati ili čestice bakra unutar stanica algi. Navedeni rezultati su u skladu s rezultatima analize ICP-MS, koja je pokazala da je znatno manje bakra uneseno u stanicu nakon tretmana s CuSO₄ u odnosu na tretmane s CuONP i Cu₂ONP. Budući da je sadržaj bakra u stanicama nakon tretmana s CuSO₄ bio za nekoliko redova veličine manji u odnosu na sadržaj bakra u stanicama nakon tretmana s nanočesticama bakrovih oksida, prikazana razlika nije odraz različitih početnih koncentracija tretmana nego vjerojatno rezultat vezanja nastalih aglomerata i sloja EPS algi.

5.2.3 Utjecaj na pojavu oksidacijskog stresa

Negativni utjecaj nanočestica bakrovih oksida primarno se očituje povećanjem oksidacijskog stresa (Feigl 2023). Zhao i sur. (2016) pokazali su da izlaganje alge *C. pyrenoidosa* česticama CuONP dovodi do značajnog povećanja unutarstaničnog sadržaja ROS. Povećana proizvodnja ROS zabilježena je i nakon tretmana s CuONP provedenim na drugim vrstama algi poput *C. vulgaris* (Fathi i sur. 2020) i mikroalgama *D. salina*, *I. galbana*, *T. weissflogii* i *P. cordatum* (Solomonova i sur. 2023). Fan i sur. (2019) također su zabilježili povećanu proizvodnju radikala HO• u stanicama alge *M. aeruginosa* nakon izlaganja nanočesticama Cu₂O/SiO₂. I u ovom istraživanju zapaženo je značajno povećanje ukupnog sadržaja ROS i O₂^{•-} nakon tretmana stanica s CuONP i Cu₂ONP, među kojima je tretman s Cu₂ONP izazvao veće povećanje ukupnog sadržaja ROS što je moguće posljedica zabilježene veće nestabilnosti Cu₂ONP što izaziva disocijaciju i jači oksidacijski stres. Zanimljivo je da niti jedan tretman nanočesticama bakrovih oksida nije izazvao povećanje sadržaja H₂O₂ u odnosu na kontrolu. S druge strane, tretman s CuSO₄ izazvao je veliko povećanje sadržaja H₂O₂ te jednako povećanje sadržaja ukupnog ROS i O₂^{•-} kao i nakon tretmana s Cu₂ONP. Naime, ioni Cu²⁺ su pozitivno nabijeni, što im olakšava interakciju s drugim ionima i molekulama (Monjaraz-Rodríguez i sur. 2018) te dalje vodi većem broju reakcija u stanicama, što može rezultirati i povećanom sintezom H₂O₂, odnosno ukupnog sadržaja ROS (Rakshit i sur. 2018; Hangan i sur. 2023).

Fitotoksični učinak povećanog sadržaja ROS u stanici ponajviše se očituje kroz interakciju s biološki važnim molekulama te njihovom djelomičnom degradacijom ili inhibicijom (Biba i

sur. 2021). U mom istraživanju, tretmani s CuONP i Cu₂ONP značajno su povećali peroksidaciju lipida, odnosno destabilizaciju stanične membrane što je vidljivo i iz analize ultrastrukture a u skladu je s oštećenjima stanične membrane zabilježenim nakon izlaganja alge *M. aeruginosa* česticama CuONP (Hou i sur. 2017). Među analiziranim tretmanima, tretman s Cu₂ONP rezultirao je značajno najvećim oštećenjem lipida što je u skladu s rezultatima sadržaja ukupnog ROS koji mogu negativno djelovati na membranski sustav (Greene 2002). S druge strane, tretman s CuSO₄ doveo je do najmanjeg povećanja sadržaja MDA, što je u skladu s rezultatima zabilježenim na algi *C. pyrenoidosa*, gdje je izlaganje česticama CuONP rezultiralo značajno većim oštećenjem membrane u odnosu na tretman ionima Cu²⁺ (Zhao i sur. 2016). Navedeni rezultati ukazuju na drugačiji mehanizam interakcije CuONP i Cu₂ONP sa staničnom membranom i stijenkom u odnosu na CuSO₄, što je u skladu s istraživanjem učinka CuONP na više vrsta algi gdje je pokazano da direktna interakcija CuONP sa staničnom membranom izaziva destabilizaciju i oštećenje same membrane (Solomonova i sur. 2023). Zanimljivo je da je samo tretman s CuONP izazvao značajno oštećenje proteina, što pokazuje da različiti tipovi nanočestica i iona bakra različito interagiraju s proteinima. Naime, CuONP imaju monoklinsku kristalnu strukturu, dok Cu₂ONP imaju pravilnu kubičnu kristalnu rešetku te su stabilnije i manje podložne interakciji s proteinima (Mallik i sur. 2020; Selvaraj 2022). S druge strane, visoka koncentracija iona Cu²⁺ može prouzročiti degradaciju proteina (Chen i sur. 2020). No, budući da su ioni Cu²⁺ integralni dio mnogih proteina i ključni su za njihovu funkciju, pokazano je da interakcija iona Cu²⁺ s proteinima ne vodi nužno degradaciji proteina (Ariöz i Wittung-Stafshede 2018). Nadalje, oštećenje molekule DNA u stanicama algi podjednako je povećano nakon tretmana s oba tipa nanočestica, dok je najveće oštećenje zabilježeno s CuSO₄. Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem učinka CuONP i CuSO₄ na biljku *Lolium perenne* gdje je zabilježeno značajno povećanje oštećenja DNA, među kojima je tretman s CuSO₄ pokazao veću genotoksičnost (Atha i sur. 2012). Dodatno, najveće oštećenje DNA nakon tretmana s CuSO₄ je moguće posljedica većeg sadržaja HO• u stanici budući da u prisustvu prijelaznih iona poput Cu²⁺, Fentonovom reakcijom iz H₂O₂ nastaje radikal HO• koji može izrazito negativno djelovati na molekulu DNA (Balasubramanian i sur. 1998). Prikazani rezultati dodatno potvrđuju da je induciranje oksidacijskog stresa jedan od glavnih mehanizama fitotoksičnosti nanočestica i iona bakra na stanice alge.

Kako povećane koncentracije ROS mogu imati izrazito negativne učinke na normalno funkcioniranje, ali i na vijabilnost stanica, alge aktiviraju mehanizme antioksidacijske obrane u uvjetima oksidacijskog stresa (Rezayian i sur. 2019). U ovom istraživanju, tretman s CuONP

povećao je aktivnost enzima SOD u odnosu na kontrolu, dok tretman s Cu₂ONP nije imao utjecaj na njegovu aktivnost. Budući da SOD aktivno smanjuje sadržaj O₂^{•-} katalizom reakcije dismutacije O₂^{•-} u H₂O₂, njegova povećana aktivnost je vjerojatno stanični odgovor na povećani sadržaj O₂^{•-} izmjeren nakon tretmana s CuONP. S druge strane, niti jedan tretman nanočesticama nije povećao aktivnost enzima PPX, APX i CAT, koji sudjeluju u katalizi H₂O₂, dok je Cu₂ONP smanjio aktivnosti enzima APX. Ovi rezultati, zajedno sa smanjenim sadržajem H₂O₂, izmjerenim nakon tretmana s CuONP i Cu₂ONP, upućuju da je aktivnost antioksidacijskih enzima u stanicama dovoljna kako bi održala stabilnu, netoksičnu unutarstaničnu razinu H₂O₂. Izostanak povećanja, odnosno smanjenje aktivnosti antioksidacijskih enzima pokazano je i u ranijem istraživanju na stanicama *Lyngbya* sp. nakon tretmana s CuONP (Janani i sur. 2020). S druge strane, unatoč povećanom sadržaju ukupnog ROS i H₂O₂, CuSO₄ izazvao je značajno smanjenje aktivnosti svih analiziranih antioksidacijskih enzima u odnosu na kontrolu, što je vjerojatno rezultat stvaranja metalnih kompleksa iona Cu²⁺ s proteinima ili njihovog vezanja na aktivno mjesto enzima čime im se inhibira aktivnost enzima te značajno povećava oksidacijski stres u algama (Kilpin i Dyson 2013; Chen i sur. 2020; Kim i sur. 2023). Rezultati parametara oksidacijskog stresa ponovno upućuju da je mehanizam toksičnosti CuSO₄ sličniji onom od Cu₂ONP nego CuONP što je vjerojatno rezultat manje stabilnosti Cu₂ONP u mediju te posljedične disocijacije iona Cu²⁺.

Dodatni mehanizam antioksidacijske obrane alge u uvjetima pojačanog oksidacijskog stresa uključuje neenzimske antioksidanse (Rezayian i sur. 2019). U mom istraživanju, svi tretmani s bakrom izazvali su značajno i podjednako smanjenje sadržaja prolina, što je vjerojatno posljedica povećane energetske potrebe stanica u uvjetima oksidacijskog stresa. Pod različitim stresnim uvjetima, kada se povećava potreba stanica za energijom, može doći do razgradnje energetskih bogatih aminokiselina, poput prolina, u FADH₂ i NADH. Tako nastale molekule se zatim koriste u mitohondriju za proizvodnju energije u obliku ATP-a (Ingrisano i sur. 2023). S druge strane, svi tretmani rezultirali su povećanjem omjera GSH/GSSG u stanicama u odnosu na kontrolu. Budući da GSH ima snažno antioksidacijsko djelovanje u stanicama, njegovo povećanje vjerojatno proizlazi iz mehanizma odgovora alge na oksidacijski stres uzrokovan tretmanima nanočesticama i ionima bakra. Među svim tretmanima, najveće povećanje omjera GSH/GSSH uočeno je nakon tretmana s CuONP, što je u skladu s izmjerenim najmanjim povećanjem sadržaja ROS u odnosu na ostale tretmane. S druge strane, najmanje povećanje omjera GSH/GSSH zabilježeno je nakon tretmana s Cu₂ONP, što je zajedno sa smanjenom ili nepromijenjenom aktivnosti antioksidacijskih enzima također u skladu s izmjerenim najvećim

sadržajem ukupnog ROS. Dodatno, alge sadrže i proteine Hsp koji ponovnim uspostavljanjem normalne strukture denaturiranih proteina smanjuju rezultat oksidacijskog stresa u stanicama (Kozeko 2021). U ovom istraživanju, niti jedan tretman s bakrom nije imao značajan utjecaj na ekspresiju proteina Hsp70, dok su svi izazvali značajno smanjenje ekspresije proteina Hsp90. Razlika u utjecaju navedenih tretmana na ekspresiju proteina Hsp70 i Hsp90 vjerojatno je posljedica ranije opisane različite lokalizacije u stanicama, ali i različite uloge u smatanju proteina (Csermely i sur. 1998; Abassi i sur. 2020; Kozeko 2021). Naime, protein Hsp70 pomaže u smatanju novo sintetiziranih proteina, dok Hsp90 regulira strukturu i stabilnost većinom smotanih proteina (Verma i sur. 2021). Ovi rezultati upućuju da nanočestice i ioni bakra imaju veći utjecaj na već sintetizirane proteine kada djeluje i protein Hsp90, čime dolazi do njegove destabilizacije i smanjenja njegove ekspresije. Veće smanjenje ekspresije proteina Hsp90, ali i značajno manje povećanje omjera GSH/GSSG uočeno nakon izlaganja algi tretmanima s Cu₂ONP i CuSO₄, ponovno ukazuje na sličnost u njihovim mehanizmima toksičnosti te je vjerojatno posljedica zabilježene povećane proizvodnje sadržaja ROS u stanicama u odnosu na tretman s CuONP.

5.2.4 Utjecaj na fotosintetski sustav

Fotosinteza je jedan od ključnih procesa u algama pomoću kojega alge koriste energiju Sunčeve svjetlosti za proizvodnju kemijske energije (Johnson 2016). Prvi korak u procesu fotosinteze je apsorpcija svjetlosne energije pomoću fotosintetskih pigmenata te su istraživanja pokazala da izlaganje nanočesticama metala često ima negativan učinak na njihov sadržaj (Hazeem i sur. 2019; Wang i sur. 2019; Lokstein i sur. 2021; Huang i sur. 2022; Ma i sur. 2023). U ovom istraživanju, samo je tretman s CuONP značajno povećao sadržaj klorofila *a* i *b* u odnosu na kontrolu. Izostanak smanjenja pigmenata nakon izlaganja više vrsta algi tretmanu s CuONP zabilježena je i u istraživanju Solomonova i sur. (2023), dok su druga istraživanja pokazala da tretman s većom koncentracijom CuONP izaziva smanjenje sadržaja pigmenata u stanicama alge *M. aeruginosa* (Hou i sur. 2017; Fan i sur. 2019) i *Platymonas helgolandica* (Liu i sur. 2022). Sadržaj karotenoida također je bio podjednako povećan nakon tretmana s CuONP i Cu₂ONP u odnosu na kontrolu. Jedno od mogućih objašnjenja za povećani sadržaj određenih fotosintetskih pigmenata u stanicama nakon izlaganja nanočesticama bakrovih oksida je njihovo vezanje na površinu alge, čime se smanjuje količina svjetla koja može doprijeti do tilakoidnih membrana kloroplasta te se iskoristiti u procesu fotosinteze. Naime, nanočestice bakrovih oksida imaju specifična optička svojstva te mogu raspršiti ili apsorbirati svjetlost određenih valnih duljina (Khalaji i sur. 2020; Poddar i sur. 2020). U cilju kompenzacije

smanjenog dotoka svjetlosti na pigmente, alge mogu povećati sadržaj fotosintetskih pigmenata kako bi se što više svjetlosne energije iskoristilo u procesu fotosinteze (Poddar i sur. 2020; Zia i sur. 2021). Dodatno, pokazano je da CuONP imaju veliki potencijal za vezanje na sloj EPS i površinu stanica, što bi moglo objasniti najveći sadržaj pigmenata nakon tretmana CuONP u odnosu na druge tretmane (Baylan i sur. 2020; Xiong i sur. 2021). Drugo objašnjenje povećanog sadržaja određenih pigmenata nakon tretmana s CuONP i Cu₂ONP je u ključnim ulogama bakra u staničnom metabolizmu. Naime, bakar je ključan kofaktor za brojne enzime uključene u proces fotosinteze, staničnog disanja i lanca prijenosa elektrona (Mir i sur. 2021; Chen i sur. 2022). Primjerice, u tilakoidnoj membrani kloroplasta, bakar je sastavni dio plastocijanina koji sudjeluje u lancu prijenosa elektrona u procesu fotosinteze (Aguirre i Pilon 2016). Ranije istraživanje je pokazalo da tretman sjemenki suncokreta (*Helianthus annuus* L.) nanočesticama bakrovih oksida pojačava rast i povećava proizvodnju klorofila u klijancima biljke (Lopes i sur. 2023). S druge strane, tretman s CuSO₄ nije izazvao promjenu u sadržaju obje vrste klorofila i karotenoida što je moguće posljedica njegovog slabijeg vezanja na površinu stanica čime bi se blokirala svjetlost za potrebe fotosinteze. No, budući da je jedino tretman s CuONP povećao sadržaj obje vrste klorofila te stopu fotosinteze pri intenzitetu svjetlosti na kojoj su alge uzgajane, ponovno se može uočiti veća sličnost mehanizama fitotoksičnosti između CuSO₄ i Cu₂ONP u odnosu na tretman s CuONP.

U ovom istraživanju, oba tretmana s nanočesticama povećala su maksimalni kvantni prinos i indeks učinkovitosti fluorescencije klorofila *a* te značajno povećala ekspresiju proteina D1. Navedeni rezultati pokazuju da je tretman nanočesticama bakrovih oksida pojačao proizvodnju pigmenata kako bi se povećalo primanje energije iz svjetlosti, ali i povećao ekspresiju proteina D1 uključenog u PSII kako bi se povećala učinkovitost fotosinteze. Sličan rezultat je dobiven izlaganjem alge *Ulva compressa* nanočesticama bakrovih oksida prilikom čega je došlo do značajnog povećanja transkripcije gena za proteine uključene u PSI, PSII, kompleks za hvatanje svjetlosti II (eng. *light harvesting complex II*, LHCII), citokrom *b6f*, ATP sintazu te proteine uključene u popravak PSII, ali i zaštitu PSI. Povećana ekspresija proteina uključenih u stanično disanje, fotosintezu i asimilaciju ugljika ukazuje na mogući mehanizam tolerancije algi na povećanu prisutnost bakra (Laporte i sur. 2020). U mom istraživanju, CuONP su izazvale veće povećanje vrijednosti većine parametara fotosinteze u odnosu na Cu₂ONP. Moguće objašnjenje se nalazi u unutarstaničnoj lokalizaciji nanočestica, gdje su CuONP ponajviše lokalizirane na staničnoj membrani i stijenci, dok su se Cu₂ONP primarno nalazile na tilakoidnoj membrani kloroplasta i bile s njom u direktnom kontaktu, što je moglo rezultirati povećanom

degradacijom ili inaktivacijom određenih fotosintetskih proteina i procesa. S druge strane, tretman s CuSO_4 je doveo do značajnog smanjenja stope fotosinteze i ekspresije proteina D1, uz najmanje povećanje maksimalnog kvantnog prinosa i fotosintetske učinkovitosti u odnosu na ostale tretmane. Navedeni rezultati upućuju da ioni Cu^{2+} izazivaju najviše negativnih učinaka na proces fotosinteze i na stabilnost fotosintetskog sustava. Naime, ioni Cu^{2+} su pozitivno nabijeni i visoko reaktivni te često sudjeluju u raznim redoks reakcijama u stanici (Chauhan i sur. 2021). U povećanim koncentracijama, interakcija iona Cu^{2+} s enzimima uključenim u fotosintezu može izazvati njihovu inaktivaciju ili inhibiciju, što negativno djeluje na učinkovitost fotosinteze (Mir i sur. 2021). Moji rezultati u skladu su s rezultatima izlaganja alge *Monoraphidium* sp. ionima Cu^{2+} , gdje su niže koncentracije stimulirale fotosintetski sustav, dok su više koncentracije ($> 7,4$ nM) smanjile učinkovitost fotosinteze i povećale rasipanje svjetlosne energije (Dauda i Lombardi 2023). S druge strane, niti jedan od tretmana s bakrom nije imao učinak na ekspresiju enzima RuBisCo, što je vjerojatno posljedica ranije opisane evolucijske očuvanosti, proteinske stabilnosti, ali i raznih kompenzacijskih mehanizama koji održavaju razinu enzima RuBisCo stabilnim (Demirevska i sur. 2009; DeRidder i sur. 2012; Wijewardene i sur. 2021). Prikazani rezultati upućuju na to da CuONP i Cu_2ONP mogu imati stimulirajući učinak na prinos i učinkovitost fotosinteze, dok tretman s CuSO_4 pretežito smanjuje samu stopu fotosinteze te negativno utječe na komponente PSII.

5.2.5 Utjecaj na proteom

U cilju daljnjeg razjašnjavanja mehanizama fitotoksičnosti nanočestica i iona bakra na algu *C. vulgaris*, analizirao sam promjene u ekspresiji proteina i identificirao ukupno 29 proteina čija se ekspresija promijenila u odnosu na kontrolu nakon pojedinog tretmana. Najviše proteina s povećanom ekspresijom zabilježeno nakon tretmana s CuONP , gdje je samo jedan protein imao smanjenu ekspresiju u odnosu na kontrolu. S druge strane, tretmani s Cu_2ONP i CuSO_4 rezultirali su većim brojem proteina sa smanjenom ekspresijom, a 13 proteina imalo je jednako promijenjenu ekspresiju nakon oba tretmana u odnosu na kontrolu. Veća sličnost u profilu diferencijalno eksprimiranih proteina između Cu_2ONP i CuSO_4 nego između Cu_2ONP i CuONP vjerojatno je rezultat manje stabilnosti Cu_2ONP kod kojih dolazi do disocijacije iona Cu^{2+} , koji potom izazivaju slične promjene na proteomskoj razini.

Nakon tretmana s bakrom, najviše diferencijalno eksprimiranih proteina bilo je iz kategorija: Fotosinteza, Prijenos signala, Metabolizam ugljikohidrata, Obrana i odgovor na stres te Procesi transkripcije i translacije. Tretman s CuONP je doveo do povećane ekspresije svih diferencijalno eksprimiranih proteina uključenih u proces fotosinteze. Među njima su se

primarno nalazili proteini kompleksa antena na PSI i PSII (klorofil a-b vezujući protein) te protein RuBisCo uključen u fiksaciju CO₂. S druge strane, tretmani s Cu₂ONP i CuSO₄ su smanjili ekspresiju proteina uključenih u kompleks antena za prikupljanje svjetlosne energije, ali i proteina uključenih u fotolizu vode u reakcijskom centru PSII (protein PsbO2). Dodatno, Cu₂ONP su smanjile ekspresiju beta ugljične anhidraze koji povećava koncentraciju CO₂ oko enzima RuBisCo, dok je tretman s CuSO₄ smanjio ekspresiju samog enzima RuBisCo. Navedeni rezultati upućuju da izlaganje stanica alge CuONP može pojačati učinkovitost fotosinteze, što je moguće i uzrok izmjerene pojačanog oksidacijskog stresa, dok Cu₂ONP i CuSO₄ nisu imale značajan učinak na fotosintezu. Rezultati proteomske analize dodatno prikazuju veću sličnost između djelovanja Cu₂ONP i CuSO₄ u odnosu na tretman s CuONP te su u skladu s prikazanim rezultatima fotosintetskih parametara. Naime, jedino je CuONP rezultirao značajnim povećanjem sadržaja klorofila *a* i *b* i stope fotosinteze pri intenzitetu svjetla na kojem su alge uzgajane i tretirane. Dodatno, tretman s CuONP doveo je do najvećeg povećanja učinkovitosti fluorescencije klorofila *a* te je izazvao najveće povećanje ekspresije proteina D1 koji se nalazi u reakcijom centru PSII. Navedeni rezultati su u skladu s drugim istraživanjima provedenim na biljnim vrstama gdje je pokazano da tretman s CuONP može dovesti do povećanja sadržaja fotosintetskih pigmenata, učinkovitosti fotosinteze i antioksidacijskog odgovora (Van Nguyen i sur. 2022; Feigl 2023; Mahawar i sur. 2024).

Nakon tretmana s CuONP primijećena je smanjena ekspresija beta podjedinice ATP sintaze, dok je simultano povećana ekspresija gama lanca ATP sintaze. ATP sintaza je proteinski kompleks koji ima ključnu ulogu u staničnoj proizvodnji energije. Beta podjedinica ATP sintaze ima ulogu u sintezi ATP iz ADP i fosfata, dok gama lanac ATP sintaze ima regulacijsku ulogu u aktivnosti ATP sintaze te kontrolira protok protona (Neupane i sur. 2019). Budući da tretman s CuONP izaziva pojavu oksidacijskog stresa, odnosno povećanja sadržaja ROS koji mogu oštetiti stanične komponente i time smanjiti proizvodnju ATP-a, povećana ekspresija gama lanca vjerojatno je rezultat kompenzacijskog mehanizma s ciljem održavanja protoka protona i sinteze ATP-a na optimalnoj razini. S druge strane, tretman s CuSO₄ je povećao ekspresiju beta podjedinice ATP sintaze te smanjio ekspresiju gama lanca. Budući da beta podjedinica ATP sintaze sadrži katalitičko mjesto za sintezu ATP-a, njena povećana ekspresija vjerojatno je odgovor alge kako bi povećala proizvodnju ATP-a za potrebe antioksidacijske obrane. Suprotno, povećani protok protona preko unutarnje membrane mitohondrija može poremetiti ravnotežu lanca prijenosa elektrona, pri čemu navedeni elektroni mogu reagirati s O₂ i formirati O₂^{•-} (Zhao i sur. 2019). Budući da ovaj proces može uzrokovati proizvodnju

ROS, smanjena ekspresija gama podjedinice ATP sintaze, koja regulira protok protona, vjerojatno je pokušaj stanice da smanji proizvodnju ROS (Zhao i sur. 2019; Sachdev i sur. 2023).

Analiza diferencijalno eksprimiranih proteina iz kategorije Metabolizam ugljikohidrata pokazala je oprečne rezultate budući da je tretman s CuONP izazvao povećanje, a Cu₂ONP i CuSO₄ smanjenje ekspresije proteina u odnosu na kontrolu. Fruktosa-bisfosfat aldolaza, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, fosfoglicerat kinaza te trioza-fosfat izomeraza, koje su uključene u proces glikolize, imale su povećanu ekspresiju nakon tretmana s CuONP. Budući da je pokazano da u stresnim uvjetima alge povećavaju metaboličku aktivnosti, navedeno povećanje proteina koji sudjeluju u procesu glikolize nakon tretmana s CuONP vjerojatno je posljedica veće energetske potrebe stanica za ublažavanjem negativnih učinaka (Liu i sur. 2020a). S druge strane, tretman Cu₂ONP smanjio je ekspresiju fruktoze bisfosfat-aldolaze, dok je CuSO₄ smanjio i ekspresiju proteina gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, što je vjerojatno posljedica poremećaja metabolizma zbog oksidacijskog stresa (de Abreu i sur. 2014).

Iz kategorije Obrana i odgovor na stres, jedino je protein *Antifreeze* imao povećanu ekspresiju nakon tretmana s oba tipa nanočestica. Kako je ranije navedeno, ovaj protein može regulirati ekspresiju gena za antioksidacijske enzime poput CAT i SOD, čime ublažava posljedice oksidacijskog stresa (Pe i sur. 2019). Tretman s Cu₂ONP jedini je izazvao smanjenje ekspresije proteina Hsp i laktat dehidrataze, što je vjerojatno rezultat prejakog oksidacijskog stresa. Naime, proteini Hsp imaju ulogu u pravilnom smatanju proteina te se aktiviraju u stresnim uvjetima, dok laktat dehidrataza ima ulogu u odgovoru na stresne uvjete smanjivanjem sadržaja citotoksičnog metabolita metilglioksala (Pohanka 2020).

Iz skupine proteina uključenih u Prijenos signala, jedino je protein akonitaza A imao povećanu ekspresiju nakon svih tretmana. Akonitaza A je hidroksitransferaza uključena u biosintezu aminokiselina, a povećanje njene ekspresije vjerojatno je posljedica povećane potrebe za sintezom proteina u uvjetima pojačanog oksidacijskog stresa. Nadalje, svi tretmani su imali učinak na razinu ekspresije protein kinaze CaMKII, među kojima je tretman s CuONP izazvao povećanje njegove ekspresije, dok su CuONP i CuSO₄ smanjili ekspresiju u odnosu na kontrolu, što je vjerojatno posljedica drugačijih interakcija navedenih nanočestica bakrovih oksida i iona Cu²⁺ s komponentama raznih staničnih puteva. Naime, smanjenja ekspresija CaMKII može biti stanični odgovor na stres u cilju smanjivanja određenih staničnih funkcija u uvjetima stresa (Zhao i sur. 2022; Rostas i Skelding 2023).

Analizom diferencijalno eksprimiranih proteina uključenih u Procese transkripcije i translacije može se uočiti kako je jedino tretman s CuONP povećao ekspresiju elongacijskog faktora Tu, dok su je Cu₂ONP te CuSO₄ smanjili, kao i ekspresiju translacijske (tr) GTPaze koja imaju ulogu u biosintezi proteina. Povećanje ekspresije elongacijskog faktora Tu nakon tretmana s CuONP u skladu je s pokazanom povećanom ekspresijom proteina akonitaza A koja ima ulogu u biosintezi aminokiselina. Zajedno, ovi rezultati upućuju da stanice alge povećavaju biosintezu proteina moguće radi ublažavanja negativnih učinaka oksidacijskog stresa djelovanjem raznih antioksidacijskih proteina. S druge strane, smanjenje ekspresije proteina iz ove skupine, zabilježeno nakon tretmana s Cu₂ONP te CuSO₄, dodatno potvrđuje da je izazivanjem oksidacijskog stresa, toksični učinak navedenih tretmana značajan.

Od ostalih diferencijalno eksprimiranih proteina nakon tretmana s bakrom, zapaženo je jedino povećanje ekspresije proteina aktin nakon svih tretmana, što je vjerojatno posljedica staničnog popravka citoskeleta nakon tretmana. Naime, aktin ima ulogu u mnoštvu biološki važnih procesa zbog sudjelovanja u izgradnji citoskeleta (Craig i sur. 2019).

Rezultati analize diferencijalne ekspresije proteina nakon tretmana s bakrom pokazuju kako Cu₂ONP i CuSO₄ imaju sličan molekularni mehanizam fitotoksičnosti, budući da je nakon oba tipa tretmana identificiran veći broj proteina sa smanjenom ekspresijom u odnosu na kontrolu. S druge strane, CuONP je uglavnom povećao ekspresiju identificiranih proteina, što je rezultiralo povećanom učinkovitosti fotosinteze i sinteze ATP-a u cilju daljnjeg ublažavanja negativnih učinaka inducirano oksidacijskog stresa.

5.3 Nanočestice polistirena

Povećana uporaba polistirena u proizvodima industrijske i komercijalne namjene ostavlja za sobom veliku količinu plastičnog otpada u okolišu (Gewert i sur. 2015). Zbog svoje male mase i gustoće, otpad koji sadrži polistiren nerijetko se akumulira na površini vodenih ekosustava, gdje je izložen raznim atmosferskim prilikama poput UV zračenja i visokih temperatura te raznim fizičkim utjecajima uzrokovanih vjetrom i gibanjem vode (Mattsson i sur. 2015). Mehaničkim utjecajem i procesom fotooksidacije, tijekom vremena dolazi do degradacije krupnih polimera polistirena u mikročestice i nanočestice (Yu i sur. 2019). Zbog sve veće potrebe za ugradnjom polistirena u razne komercijalne proizvode, među kojima su i proizvodi u medicini, često se površina PS-NP modificira dodavanjem različitih funkcionalnih skupina (Amstein i Hartman 1975; Loos i sur. 2014). Naime, funkcionalizirane nanočestice polistirena imaju različita termička i optička svojstva te drugačiju reakciju s biološkim organizmima od PS-NP, zbog čega se često koriste u području biomedicine (Perini i sur. 2022). Također, kad su

PS-NP izložene atmosferskim prilikama, na svoju površinu mogu vezati razne funkcionalne skupine čime im se bitno mijenjaju površinska svojstva i stabilnost (Gewert i sur. 2015). Budući da stabilnost i veličina nanočestica značajno utječu na njihovu fitotoksičnost, površinske funkcionalne skupine nanočestica polistirena mogu direktno utjecati na reaktivnost nanočestica te povećati ili smanjiti njihovu toksičnost u vodenim ekosustavima (Yu i sur. 2019).

5.3.1 Stabilnost nanočestica u hranjivoj podlozi

Dosadašnja istraživanja pokazala su da su nanočestice polistirena iznimno stabilne u vodenim suspenzijama (Loos i sur. 2014; Kik i sur. 2020; Asandulesa i sur. 2023). I u ovom istraživanju, rezultati analize matičnih suspenzija pokazuju kako se PS-NP, PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP nalaze uglavnom pojedinačno u suspenzijama, a ne u aglomeratima. Malobrojna istraživanja stabilnosti nanočestica polistirena u okolišnim vodama pokazala su da može doći do aglomeracije nanočestica polistirena s organskim molekulama, ali i s mikroorganizmima, te je pokazano da različiti kationi u otopini imaju utjecaj na njihovu aglomeraciju (Alimi i sur. 2018; Yu i sur. 2019). Analiza stabilnosti nanočestica polistirena u podlozi BBM, pokazala je da sama podloga nema značajan utjecaj na njihovu stabilnost. Naime, promjer svih korištenih nanočestica polistirena ostao je podjednak do kraja mjerenja, što je vjerojatno rezultat međusobnog steričkog odbijanja korištenih nanočestica polistirena u suspenziji (Yu i sur. 2019). S druge strane, mjerenjem ζ potencijala, mogu se uočiti manje razlike naboja na površini čestica inkubacijom u podlozi BBM. Naime, u ovom istraživanju, pokazano je da je površinski naboj svih korištenih nanočestica polistirena bio pozitivan prilikom dodavanja u podlogu BBM te se nije značajno mijenjao prvih 24 sata. Nakon 24 sata, PS-NP postaju negativne, dok je naboj PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP ostao nepromijenjen. Nakon inkubacije nanočestica polistirena u podlozi BBM u trajanju od 48 sati pa do kraja mjerenja, PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP poprimaju negativan naboj, dok PS-NP ponovno dobivaju pozitivan površinski naboj. Moguće objašnjenje za brže i češće promjene ζ potencijala PS-NP u odnosu na nanočestice s funkcionalnim skupinama je njihova interakcija s ionima iz podloge BBM. Naime, PS-NP mogu reagirati s kationima iz okoliša te tako mijenjati svoja svojstva, među kojima je i površinski naboj, dok površinske funkcionalne skupine mogu smanjiti potencijal nanočestica za vezanje drugih kationa iz suspenzije (Alimi i sur. 2018; Tallec i sur. 2019; Yu i sur. 2019; Zhang i sur. 2019). Navedeni rezultati ukazuju da PS-NP sadrže veći potencijal za reagiranje s ionima iz medija čime im se brže i češće mijenja površinski naboj, odnosno da površinske funkcionalne skupine imaju značajan utjecaj na stabilnost nanočestica polistirena u vodenim ekosustavima.

5.3.2 Unos nanočestica polistirena u stanice i utjecaj na morfologiju algi

Nanočestice polistirena su sveprisutne u okolišu, dok je njihova pojava u vodenim ekosustavima vrlo zabrinjavajuća zbog moguće bioakumulacije polistirena u živim sustavima (Alimi i sur. 2018). Istraživanja su pokazala da se polistiren može vrlo lako vezati na organske tvari poput sloja EPS stanica algi, čime, zbog bioakumulacije, može imati negativan učinak na više organizme, uključujući i ljude (Chae i sur. 2018; Pradel i sur. 2021; Li i sur. 2022b; Le Juge i sur. 2023). Akumulacija plastike kroz hranidbeni lanac od primarnih proizvođača poput algi do viših organizama je ranije potvrđena. Naime, nakon izlaganja alge *C. reinhardtii* nanočesticama plastike, nanočestice su detektirane u probavnim organima viših organizama koji su algu koristili kao hranu (Chae i sur. 2018). Jedan od prvih negativnih učinaka nanočestica polistirena na alge je promijenjena morfologija stanica (Mikami i sur. 2021), a pokazano je i da PS-NP mogu dovesti do povećanja stanica i deformacije stanične stijenke kod algi *C. vulgaris* (Hazeem i sur. 2020) i *P. helgolandica* (Wang i sur. 2020b). Naime, nanočestice polistirena mogu se vezati na sloj EPS, čime se potiče i agreagacija stanica algi, što može izazvati strukturne promjene stanične stijenke, ali i dovesti do oštećenja stanične membrane (Wang i sur. 2016b; Li i sur. 2020b). Izlaganje alge *Gymnodinium aeruginosum* česticama PS-NP rezultiralo je značajnim ultrastrukturnim promjenama stanica poput oštećenja kloroplasta, smanjenja količine škroba, zadebljanja stanične stijenke i plazmolize (Huang i sur. 2021). I ovo istraživanje pokazalo je da su svi tretmani s nanočesticama polistirena doveli do promjena u ultrastrukтури stanica u odnosu na kontrolu, koje su se manifestirale kao plazmoliza i destabilizacija integriteta tilakoidnih membrana.

U mom istraživanju, konfokalnom mikroskopijom pokazano je da su svi tretmani nanočesticama polistirena izazvali značajno povećanje čvrsto i slabo vezanog sloja EPS oko stanica u odnosu na kontrolu, što je u skladu s ranijim istraživanjima učinaka mikro- i nanoplastike na više vrsta algi (Hazeem i sur. 2020; Li i sur. 2020b; Huang i sur. 2021). Tretmani s PS-NP i PS-COOH-NP su izazvali veće povećanje količine vizualiziranog sloja EPS, pomoću fluorescentno obilježenog lektina ConA, oko stanica u odnosu na tretman s PS-NH₂-NP. Daljnja kvantifikacija topivog sloja EPS mjerenjem otopljenog organskog ugljika (DOC) nije se pokazala mogućom nakon tretmana nanočesticama polistirena, dok je analiza čvrsto vezanog sloja EPS mjerenjem partikularnog organskog ugljika (POC) pokazala njegovo značajno i jednako povećanje nakon svih tretmana u odnosu na kontrolu. Naime, metodom mjerenja otopljenog organskog ugljika (DOC) nije bilo moguće razaznati sloj EPS, koji se pretežito sastoji od ugljikohidrata, i nanočestica polistirena koji su polimeri sastavljeni od

monomera aromatskog ugljikovodika. Prijašnje istraživanje pokazalo je da se mjerenjem organskog ugljika može kvantificirati mikroplastika u uzorku, ali samo u slučaju da u uzorku nema drugih organskih spojeva koji mogu interferirati s mjerenjem (Schmidtmann i Peiffer 2024). Dobivena razlika količine sloja EPS vezanog na stanice nakon svih tretmana vizualiziranog konfokalnom mikroskopijom i mjerenjem vrijednosti POC upućuje da su tretmani s PS-NP i PS-COOH-NP izazvali veće povećanje slabo vezanog sloja EPS za kojeg je pokazano da ima najveću ulogu u vezanju čestica iz okoliša u odnosu na tretman s PS-NH₂-NP. U skladu s time, uočeno povećanje proizvodnje čvrsto i slabo vezanog sloja EPS oko stanica alge nakon svih tretmana dobro korelira s primijećenom adsorpcijom nanočestica polistirena na sami sloj EPS oko algi. Naime, veće povećanje čvrsto i slabo vezanog sloja EPS, ali i vizualizirana veća akumulacija nanočestica polistirena na sloju EPS primijećena je nakon tretmana s PS-NP i PS-COOH-NP, dok su se PS-NH₂-NP vezale na sloj EPS u manjoj mjeri. Razlika u vizualiziranoj akumulaciji nanočestica polistirena s različitim funkcionalnim skupinama vjerojatno je posljedica njihovih različitih površinskih naboja. Naime, pod povećanom ionskom jakosti, ali i povećanim organskim sadržajem, PS-NP i PS-COOH-NP gube svoju stabilnost što se primarno očituje njihovom aglomeracijom, dok PS-NH₂-NP pokazuju jaču stabilnost pod navedenim uvjetima (Tallec i sur. 2019). Budući da je pokazano da priroda površinskih skupina ima veći utjecaj na aglomeraciju nanočestica od prirode samih nanočestica polistirena, održana stabilnost PS-NH₂-NP je vjerojatno posljedica površinske amino skupine koja dovodi do međusobno jakog mehanizma odbijanja (Liu i sur. 2012). Povećana sinteza sloja EPS vjerojatno ima obrambenu ulogu djelujući kao fizička barijera u cilju smanjivanja količine nanočestica polistirena unesenog u stanicu (Zheng i sur. 2019). Analizom Py-GC-MS pokazano je da je nakon svih tretmana veća količina polistirena zadržana na sloju EPS, u odnosu na količinu izmjerenu u stanicama. Među svim korištenim tretmanima, najveća akumulacija nanočestica na sloju EPS, ali i u stanicama zabilježena je nakon tretmana s PS-NP i PS-NH₂-NP. Razlika u dobivenim rezultatima akumulacije nanočestica polistirena na vezanom sloju EPS oko stanica između metoda Py-GC-MS i TEM vjerojatno je posljedica analize različitih tipova sloja EPS. Naime, TEM mikroskopijom pokazano je da se PS-NP i PS-COOH-NP najviše akumuliraju na sloju EPS, dok je metodom Py-GC-MS isti rezultat dobiven za PS-NP i PS-NH₂-NP. Metoda TEM u nativnim uvjetima omogućuje vizualizaciju i čvrsto vezanog i slabo vezanog sloja EPS oko stanica zbog izostanaka kemijske preparacije uzorka putem kojih se slabo vezani sloj EPS može izgubiti. S druge strane, priprema uzoraka za analizu količine polistirena na sloju EPS putem Py-GC-MS analize zahtijeva razdvajanje sloja EPS od stanica algi, čime se dobiva frakcija samo čvrsto vezanog sloja EPS koji se nalazi

najbliže staničnoj stijenci (Chen i sur. 2013; Babiak i Krzemińska 2021). Kako je poznato da je slabo vezani sloj EPS najviše zaslužan za vezanje različitih nanočestica iz okoliša (Fernando i sur. 2020; Li i sur. 2021b), moguće je da rezultati dobiveni Py-GC-MS analizom ne predstavljaju realno stanje za usporedbu količine polistirena na sloju EPS stanica nakon tretmana stanica različito funkcionaliziranim nanočesticama polistirena. Uzimajući u obzir sva navedena ograničenja korištenih metoda, ovi rezultati upućuju da se PS-NP najviše akumuliraju na čvrsto i slabo vezanom sloju EPS oko stanica, dok se PS-COOH-NP pretežito vežu na slabo vezani, a PS-NH₂-NP na čvrsto vezani sloj EPS. Rezultati su u skladu s prijašnjim istraživanjem utjecaja površinskih funkcionalnih skupina nanočestica polistirena na adsorpciju na površinu stanice alge *P. subcapitata* (Nolte i sur. 2017), koje je pokazalo da PS-NP i PS-NH₂-NP imaju veći afinitet za vezanje na staničnu stijenu alge od negativno nabijenih PS-COOH-NP, što je vjerojatno posljedica elektrostatskog odbijanja negativno nabijenih PS-COOH-NP i negativno nabijene stanične stijene (Eslick i sur. 2014). S druge strane, rezultati Py-GC-MS analize pokazuju da dolazi do unosa nanočestica polistirena u stanice alge. Najveći sadržaj polistirena u stanicama izmjeren je nakon tretmana s PS-NP i PS-NH₂-NP, dok je tretman s PS-COOH-NP rezultirao najmanjom akumulacijom. Rezultati su u skladu s istraživanjem provedenim na stanicama alge *C. sorokiniana*, gdje je izlaganjem alge česticama PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP zapaženo da oba tipa nanočestica ulaze u stanice alge, dok PS-COOH-NP imaju manju fitotoksičnost u odnosu na PS-NH₂-NP (Xu i sur. 2024). Budući da je stanična stijena stanice alge polupropusna, nanočestice malih dimenzija mogu slobodno proći stijenu te doći do stanične membrane (Wang i Wang 2014). Međutim, one mogu dodatno destabilizirati staničnu stijenu, čime nastaju veće pore koje omogućuju prolaz većih nanočestica i aglomerata, nakon čega endocitozom ulaze u stanicu (Yang i sur. 2023; Xu i sur. 2024). Stoga je zabilježena manja količina PS-COOH-NP u odnosu na PS-NP i PS-NH₂-NP vjerojatno posljedica slabijeg vezanja PS-COOH-NP na staničnu stijenu alge. Naime, pokazano je da se PS-COOH-NP iznimno dobro vežu na vanjske dijelove sloja EPS, dok se manji broj nanočestica veže na čvrsto vezani sloj EPS koji je najbliži stanici. Nadalje, kako je stanična stijena alge *C. vulgaris* negativno nabijena, upravo zbog elektrostatskog odbijanja potrebna je veća energija za vezanje negativno nabijenih PS-COOH-NP na staničnu stijenu od PS-NP i PS-NH₂-NP (Parkinson i sur. 2022; Lesniewska i sur. 2024). Navedeni rezultati upućuju da funkcionalne skupine imaju značajan učinak na aglomeraciju nanočestica polistirena u vodenim sustavima, ali i na samo vezanje nanočestica na površinu stanica što posljedično utječe na njihovu fitotoksičnost.

5.3.3 Utjecaj na pojavu oksidacijskog stresa

Dosadašnja istraživanja su pokazala da je pojačana proizvodnja ROS jedan od ključnih mehanizama toksičnosti nanočestica polistirena u algama. Xiang i sur. (2023a) su pokazali da nakon izlaganja alge *C. vulgaris* česticama PS-NP u trajanju od 72 h dolazi do povećanog sadržaja ROS, a sličan rezultat zabilježen je i nakon tretmana stanica *C. vulgaris* česticama PS-COOH-NP (Hazeem i sur. 2020), ali i izlaganjem algi *Chlorella* i *Scenedesmus* česticama PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP (Bhattacharya i sur. 2010). U ovom istraživanju, tretman s PS-NP nije povećao ROS, ni ukupne ni u obliku H₂O₂, što je u skladu s rezultatima drugih istraživanja. Sendra i sur. (2019) su pokazali da PS-NP izazivaju jači akutni oksidacijski stres u stanicama alge *P. tricornutum* unutar prvih 24 sata izlaganja, dok nakon 72 sata količina sadržaja ROS pada do razine koja je izmjerena u kontrolnim stanicama. Navedeni rezultati ukazuju da PS-NP s vremenom postaju nestabilne u hranjivim podlogama, čime dolazi do njihove aglomeracije i smanjenja početnog oksidacijskog stresa. Ranija istraživanja su pokazala da se PS-NP u najvećoj mjeri aglomeriraju u suspenziji stanica što je vjerojatno posljedica manjka površinske funkcionalne skupine te lake interakcije s otpuštenim organskim tvarima i sa slojem EPS algi (Junaid i Wang 2021; Le Juge i sur. 2023). I u mom istraživanju je TEM mikroskopijom zapaženo stvaranje većih aglomerata PS-NP oko stanica u odnosu na ostale tretmane. S druge strane, značajno povećana proizvodnja ukupnih ROS zabilježena je nakon tretmana s PS-COOH-NP, dok je povećani sadržaj H₂O₂ izmjeren u oba tretmana s funkcionaliziranim nanočesticama. Rezultati su u skladu s prijašnjim istraživanjima gdje je pokazano da nanočestice polistirena s funkcionalnim skupinama izazivaju veći sadržaj ROS u biljnim stanicama u odnosu na PS-NP bez funkcionalnih skupina (Ekner-Grzyb i sur. 2022). Smatra se da funkcionalizirane nanočestice izazivaju veći oksidacijski stres zbog većeg potencijala interakcija funkcionalnih skupina sa staničnom i membranom mitohondrija što rezultira većim sadržajem ROS u stanici (Płuciennik i sur. 2024).

Tretmani nanočesticama polistirena pokazali su negativan učinak na određene biološki važne molekule. Tretman s PS-NP je rezultirao oštećenjem svih analiziranih biomolekula; PS-NH₂-NP izazvale su peroksidaciju lipida i genotoksični učinak, dok su PS-COOH-NP uz oštećenje molekule DNA dovele i do značajne karbonilacije proteina alge. Ovi rezultati upućuju da su svi tretmani nanočesticama polistirena izazvali oksidacijski stres u stanicama alge u ovisnosti o individualnim svojstvima samih nanočestica. Razlika u djelovanju nanočestica polistirena s različitim funkcionalnim skupinama na biološki važne molekule vjerojatno je rezultat njihovih različitih naboja. Naime, iako su oba tretmana s funkcionalnim skupinama

izazvala genotoksični učinak, PS-NH₂-NP su oštetile samo lipide, dok su pak PS-COOH-NP oštetile samo proteine. Naime, PS-NH₂-NP, zbog svog pozitivnog naboja, mogu lakše prolaziti staničnu membranu zbog elektrostatskih interakcija, uslijed čega dolazi do povećavanja postojećih i stvaranja novih pora te degradacije samih membrana (Dai i sur. 2022). S druge strane, PS-COOH-NP su negativno nabijene te adsorbiraju veliku količinu proteina na svoju površinu, čime dolazi do njihove degradacije (Kokkinopoulou i sur. 2017; Panico i sur. 2022). Dodatno, PS-COOH-NP su izazvale najznačajnije povećanje sadržaja ROS u stanicama, a poznato je da povećane količine sadržaja ROS mogu imati iznimno negativan učinak na strukturu i aktivnost proteina (Li i sur. 2022a). Iako tretman s PS-NP nije doveo do značajnog povećanja sadržaja ROS u stanicama, ove nanočestice izazvale su značajno oštećenje svih analiziranih biomolekula. Sendra i sur. (2019) pokazali su da PS-NP značajno induciraju sintezu ROS kod stanica alge *P. tricornutum*, ali unutar prvih 24 sata. Dodatno, nakon neutralizacije različitih ROS pomoću antioksidacijskih enzima i neenzimskim antioksidansima, moguće je da stanice nisu imale dovoljno vremena za potpuni popravak oštećenih proteina, lipida i molekule DNA. Naime, istraživanje vremena oporavka alge *Scenedesmus* sp. nakon oksidacijskog stresa pokazalo je da se aktivnost određenih metaboličkih enzima vratila u optimalno stanje tek nakon 72 sata (Tripathi i sur. 2004), dok je kod više vrsta biljaka zabilježeno i znatno dulje vrijeme oporavka nakon oksidacijskog stresa (Chmielowska-Bąk i Deckert 2021).

U uvjetima pojačanog oksidacijskog stresa, alge aktiviraju enzimске i neenzimске antioksidacijske mehanizme u cilju smanjivanja sadržaja ROS (Yasur i Rani 2013). U ovom istraživanju je pokazano da su svi tretmani, manje ili više, aktivirali antioksidacijski sustav stanica alge, što je u skladu s ranijim istraživanjima provedenim na algama nakon tretmana nanočesticama polistirena (Zhao i sur. 2020; Huang i sur. 2021; Xiang i sur. 2023a). Tretman s PS-NP povećao je aktivnost samo enzima APX, dok nije imao utjecaj na ostale antioksidacijske enzime, što je mogući pokazatelj dovoljnog kapaciteta peroksidaza u uklanjanju H₂O₂. Također, kako je pokazano da PS-NP induciraju povećanu proizvodnju oblika ROS u algama unutar prvih 24 sata, moguće je da je aktivnost antioksidacijskih enzima značajno povećana upravo u navedenom periodu nakon čega njihova aktivnost pada sa smanjenjem sadržaja ROS u cilju čuvanja energije (Sendra i sur. 2019). Nedavno istraživanje na algi *Scenedesmus obliquus* pokazalo je da se antioksidacijski enzimi aktiviraju unutar 24 sata od tretmana s mikročesticama polistirena, nakon čega aktivnost enzima pada (Wang i sur. 2023b). S druge strane, u ovom istraživanju, aktivnost enzima APX, PPX i CAT značajno se povećala nakon tretmana s PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP, što je pokazatelj značajnog oksidacijskog stresa te je u skladu s

rezultatima povećanog sadržaja H₂O₂ nakon navedenih tretmana u odnosu na kontrolu. S druge strane, ni jedan tretman nije izazvao značajno povećanje enzima SOD, dok su tretmani s PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP izazvali i njegovo smanjenje što je moguće posljedica interakcije funkcionalnih skupina s enzimom SOD ili indukcije oksidacijskog stresa pri čemu se inhibira njegova aktivnost nakon 72 h. No, izostanak povećane aktivnosti enzima SOD te povećana aktivnost barem jedne od peroksidaza nakon svih tretmana upućuje da su upravo peroksidaze jedne od ključnih antioksidacijski enzima uključenih u smanjivanje oksidacijskog stresa uzrokovanog nanočesticama polistirena. Analizom neenzimskog antioksidacijskog sustava vidljivo je da su svi tretmani nanočesticama polistirena izazvali značajno smanjenje prolina. Budući da je pokazano da nanočestice polistirena znatno utječu na metabolizam algi, smanjenje sadržaja prolina vjerojatno je posljedica povećane potrebe stanica za energijom, prilikom čega dolazi do degradacije prolina te proizvodnje energije u mitohondriju (Ingrisano i sur. 2023). S druge strane, jedino je tretman s PS-NH₂-NP doveo do blagog povećanja sadržaja karotenoida u odnosu na kontrolu. Naime, karotenoidi u algama imaju dvostruku ulogu. U procesu fotosinteze sudjeluju u prihvaćanju i prijenosu svjetlosne energije na klorofil, dok utišavanjem energije ¹O₂ i smanjenjem količine ROS djeluju kao antioksidansi (Faraloni i Torzillo 2017). Blago povećanje sadržaja karotenoida nakon izlaganja stanica algi PS-NH₂-NP je vjerojatno posljedica kompenzacijskog mehanizma antioksidacijskog sustava uslijed značajnog smanjenja sadržaja prolina u stanicama alge nakon navedenog tretmana u odnosu na ostale tretmane nanočestica polistirena. Nadalje, svi tretmani izazvali su značajno smanjenje GSH u stanicama algi u odnosu na kontrolu. Budući da GSH sudjeluje u smanjivanju sadržaja ROS oksidacijom u svoj oksidirani GSSG oblik, smanjenje GSH u stanicama može biti rezultat aktiviranog antioksidacijskog obrambenog mehanizma alge uslijed izlaganja nanočesticama polistirena (Manke i sur. 2013).

Dodatni mehanizam održavanja stanične homeostaze u uvjetima visokog oksidacijskog stresa je korištenje molekularnih šaperona proteina Hsp. Proteomska analiza učinka PS-NP je pokazala da navedeni tretman dovodi do povećane ekspresije porodice proteina Hsp u stanicama *Anabena sp.* (Kozeko 2021; Tamayo-Belda i sur. 2021). U ovom istraživanju niti jedan korišten tretman nanočestica polistirena nije imao značajni učinak na ekspresiju proteina Hsp70, dok su tretmani s PS-NP i PS-COOH-NP izazvali smanjenje ekspresije proteina Hsp90. Zabilježena promjena u ekspresiji proteina Hsp nakon tretmana s nanočesticama polistirena vjerojatno je posljedica njihove različite stanične lokalizacije ili njihove uloge u pravilnom smatanju proteina. Budući da protein Hsp70 sudjeluje u pravilnom smatanju proteina u ranijim

fazama, a protein Hsp90 u kasnijim fazama, navedeni rezultati upućuju da korišteni tretmani s nanočesticama polistirena ne utječu na destabilizaciju novosintetiziranih proteina (Verma i sur. 2021). S druge strane, smanjena ekspresija proteina Hsp90 nakon tretmana s PS-NP i PS-COOH-NP vjerojatno je posljedica njihovog značajnog utjecaja na povećanje karbonilacije proteina, prilikom čega je vjerojatno došlo i do degradacije samih proteina Hsp90.

5.3.4 Utjecaj na fotosintetski sustav

Dosadašnja istraživanja provedena na različitim vrstama algi pokazala su da nanočestice polistirena izazivaju smanjenje sadržaja obje molekule klorofila i karotenoida (Hazeem i sur. 2020; Wang i sur. 2020b; Xiang i sur. 2023a). U ovom istraživanju, samo je tretman PS-NP značajno smanjio sadržaj svih analiziranih fotosintetskih pigmenata u odnosu na kontrolu. S druge strane, PS-NH₂-NP značajno su povećale sadržaj klorofila *a* i karotenoida, dok PS-COOH-NP nisu izazvale značajne promjene u sadržaju pigmenata u odnosu na kontrolu. Rezultati su u skladu s ranijim istraživanjem gdje je pokazano da PS-NP bez funkcionalne skupine izazivaju veće smanjenje sadržaja klorofila *a* u odnosu na funkcionalizirane nanočestice u stanicama alge *C. vulgaris* (Hazeem i sur. 2020). Moguće obrazloženje smanjenog sadržaja pigmenata nakon tretmana s PS-NP u odnosu na kontrolu je zbog velikog potencijala vezanja navedenih nanočestica na površinu samih algi. Naime, pokazano je da se PS-NP vežu u velikoj količini na površinu stanica algi što može smanjiti količinu svjetla koja se može iskoristiti u fotosintezi (Bhattacharya i sur. 2010; Hazeem i sur. 2020). Nadalje, promijenjena količina pigmenata može poremetiti normalni metabolizam i prijenos energije u fotokemijskim reakcijama te tako inhibirati proces fotosinteze (Nguyen i sur. 2020). To potvrđuju i rezultati ovog istraživanja, budući da su svi tretmani nanočesticama polistirena izazvali značajno smanjenje stope fotosinteze pri intenzitetu svjetla na kojem su alge uzgajane, među kojima su funkcionalizirane nanočestice polistirena izazvale veću inhibiciju stope fotosinteze u odnosu na PS-NP. Rezultati su u skladu s istraživanjem Li i sur. (2020b) koji su pokazali da izlaganje alge *C. reinhardtii* PS-NP dovodi do smanjenja fotosintetske aktivnosti. Dodatno, svi tretmani povećali su indeks učinkovitosti PSII, što je u suprotnosti s rezultatima stope fotosinteze, dok niti jedan tretman nije značajno promijenio maksimalni kvantni prinos PSII u odnosu na kontrolu. Rezultati su u skladu s prijašnjim istraživanjima, u kojima nanočestice polistirena nisu pokazale značajan utjecaj na maksimalnu kvantnu učinkovitost fotosinteze u algama (Sjollema i sur. 2016; Wu i sur. 2021). Budući da maksimalna kvantna učinkovitost predstavlja maksimalni potencijal PSII za pretvaranje svjetlosne energije u kemijsku za potrebe prijenosa elektrona, dobiveni rezultati upućuju da navedeni tretmani

nanočesticama polistirena nisu imali značajni utjecaj na učinkovitost PSII prilikom pretvorbe svjetlosne energije (Maxwell i Johnson 2000). S druge strane, izlaganje morske alge *P. helgolandica* PS-NP u trajanju od 6 dana izazvalo je značajno povećanje maksimalnog kvantnog prinosa u odnosu na kontrolu. Ovaj rezultat vjerojatno je posljedica adaptacije stanica na dugotrajno izlaganje tretmanu te ulaska stanica alge u stacioniranu fazu rasta (Wang i sur. 2020b). Nadalje, povećan indeks učinkovitosti PSII nakon svih tretmana vjerojatno je posljedica adaptacijskog odgovora stanica alge na izlaganje nanočesticama polistirena povećanom ekspresijom enzima RuBisCO. Naime, RuBisCo ima ključnu ulogu u fiksaciji ugljika, prilikom čega dolazi do sinteze ugljikohidrata. Ranije istraživanje je pokazalo da rast algi pri nižim razinama svjetlosti rezultira povećanom količinom enzima RuBisCo, ali da je povećanje specifično za vrstu u uvjetima visoke ili niske razine dušika (Li i Campbell 2017). Dodatno, ranije istraživanje je pokazalo da su se mikročestice polistirena promjera 1 μm akumulirale u većoj mjeri na površini stanica alge *M. aeruginosa* te izazvale veću promjene u fotosintezi u odnosu na PS-NP promjera 100 nm (Wu i sur. 2021). Navedeni rezultati upućuju da se nanočestice polistirena vežu na površinu stanica algi te tako smanjuju količinu dostupnog svjetla za proces fotosinteze, te je moguće da povećana proizvodnja enzima RuBisCo predstavlja adaptacijski mehanizam stanica algi u uvjetima niske razine svjetlosti prilikom čega se povećava i indeks učinkovitosti PSII (Seemann 1989; Galmés i sur. 2013). S druge strane, tretman s PS-NP izazvao je znatno smanjenu, dok su tretmani s PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP izazvali znatno povećanu ekspresiju proteina D1. Naime, protein D1 je visoko osjetljiv protein na razne stresne uvjete te ima ključnu ulogu u reakcijskom centru PSII u prijenosu elektrona (Edelman i Mattoo 2008; Kaur i sur. 2022). Smanjena ekspresija proteina D1 detektirana nakon tretmana PS-NP, uz značajno smanjeni sadržaj pigmenata i smanjenu stopu fotosinteze, pokazuje da je ovaj tretman imao najveće negativno djelovanje na fotosintezu u stanicama *C. vulgaris*. Navedeni rezultat u skladu je s istraživanjem utjecaja mikročestica polistirena na algu *C. reinhardtii*, gdje su koncentracije tretmana veće od 50 mg L⁻¹ imale negativan učinak na parametre fotosinteze (Li i sur. 2020b). Budući da alge mogu pojačati biosintezu proteina D1 radi održavanja optimalne razine fotosinteze, povećanje ekspresije proteina D1 nakon tretmana s PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP mogući je kompenzacijski mehanizam održavanja integriteta PSII (Wang i sur. 2016a; Banu i sur. 2021). Dobiveni rezultati ukazuju na značajan utjecaj površinskih funkcionalnih skupina nanočestica polistirena na učinkovitost fotosinteze, ali i na mogućnost aktivacije kompenzacijskih mehanizama stanica algi na izlaganje nanočesticama polistirena s površinskim funkcionalnim skupinama.

5.3.5 Utjecaj na proteom

S ciljem daljnje analize mehanizama fitotoksičnosti nanočestica polistirena na algu *C. vulgaris*, analizirao sam diferencijalno eksprimirane proteine, koji su uglavnom pokazali smanjenu ekspresiju. Posebno, PS-NP i PS-COOH-NP rezultirali su s najviše proteina sa smanjenom ekspresijom, što je u skladu s rezultatima povećanja sadržaja proteinskih karbonila nakon ovih tretmana.

Nakon svih tretmana većina diferencijalno eksprimiranih proteina pripadala je kategorijama: Fotosinteza, Obrana i odgovor na stres, Prijenos signala i Procesi transkripcije i translacije. Najviše proteina s promijenjenom ekspresijom u svim tretmanima bilo je uključeno u proces Fotosinteze i svi su pokazali smanjenu ekspresiju. Nakon tretmana s PS-NP i PS-COOH-NP, detektirana je smanjena ekspresija proteina koji imaju ulogu u vezanju klorofila u kompleksu antena (klorofil a-b vezujući protein), fotolizi vode i dobivanju kisika (kloroplastni PsbP4 prekursor i protein PsbO₂) te prijenosu elektrona s PSI putem feredoksina (proteini reakcijskog centra PSI). Nakon istih tretmana zabilježena je i smanjena ekspresija enzima RuBisCo te beta ugljične anhidraze koja povećava koncentraciju CO₂ oko enzima RuBisCo. Sličan diferencijalno ekspresijski profil uočen je i nakon tretmana s PS-NH₂-NP, no bez promjene ekspresije proteina PsbO₂ i podjedinice 4 proteina reakcijskog centra PSI. Navedeni rezultati su u skladu sa smanjenja stope fotosinteze nakon svih tretmana s nanočesticama polistirena, što je vjerojatno posljedica njihovog vezanja na površinu stanica pa samim time i smanjenog intenziteta svjetla koji dolazi do tilakoidnih membrana. Dodatno, zabilježena smanjena ekspresija proteina povezanih s tilakoidnom membranom je u skladu i s rezultatima analize ultrastrukture stanica alge. Naime, nakon tretmana s nanočesticama polistirena može se uočiti destabilizacija integriteta tilakoidnih membrana, što se očituje u smanjenju njihove količine, ali i relativne gustoće u odnosu na kontrolu.

Svi tretmani izazvali su također i smanjenu ekspresiju beta podjedinice ATP sintaze, što ukazuje na smanjenje energetske stanja stanice. U prilog tome govore i smanjenje ekspresije proteina fruktoza-bisfosfat aldolaze, uključene u proces glikolize, s PS-NP i malat dehidrogenaze, uključene u ciklus limunske kiseline, s PS-COOH-NP. Smanjena ekspresija proteina uključenih u regulaciju energetske stanja stanica algi vjerojatno je posljedica poremećaja metabolizma i proizvodnje energije zbog oksidacijskog stresa (de Abreu i sur. 2014).

Iz kategorije Obrana i odgovor na stres, zabilježeno je povećanje ekspresije samo proteina PCC13-62 povezanih sa sušom nakon svih tretmana. Skupina proteina PCC13-62 putem regulacije transkripcije ima primarnu ulogu u odgovoru na manjak vode, odnosno na sušna

razdoblja, no pokazano je da je važna i u odgovoru na druge tipove stresnih uvjeta poput povećanog saliniteta (Giarola i sur. 2018). S druge strane, svi tretmani su smanjili ekspresiju proteina Hsp, uključenog u pravilno smatanje drugih proteina u uvjetima stresa, dok je tretman s PS-NP smanjio i ekspresiju enzima SOD uključenog u antioksidacijsku obranu. Najviše proteina sa smanjenom ekspresijom iz ove kategorije je zabilježeno nakon tretmana s PS-COOH-NP koji je uz ranije navedene proteine izazvao smanjenje ekspresije i proteina *Antifreeze* i laktat dehidrataze. Oba proteina sudjeluju u odgovoru stanice na oksidacijski stres, gdje protein *Antifreeze* aktivira druge antioksidacijske enzime, a laktat dehidrataza smanjuje sadržaj metabolita metilglioksala koji ima citotoksično djelovanje (Kristiansen i sur. 2008; Pe i sur. 2019; Pohanka 2020). Smanjena ekspresija navedenih proteina upućuje na pojavu jakog oksidacijskog stresa, prilikom čega dolazi do degradacije proteina, što je u skladu s rezultatima analize karbonilacije proteina. Naime, značajno veća količina oštećenih proteina zabilježena je upravo nakon tretmana s PS-NP i PS-COOH-NP u odnosu na tretman s PS-NH₂-NP.

Smanjenje ekspresije proteina akonitaze A zabilježeno je nakon svih tretmana, dok je smanjenje proteina CaMKII, zabilježeno nakon tretmana s PS-NP i PS-COOH-NP; oba proteina pripadaju kategoriji Prijenos signala. Kako je ranije navedeno, akonitaza A ima ulogu u biosintezi aminokiselina, dok je protein CaMKII kompleksna multifunkcionalna kinaza koja ima ulogu u procesima prijenosa signala. Nadalje, tretman s PS-NP je povećao, a tretman s PS-COOH-NP smanjio ekspresiju proteina rodanaze, koji je povezan s prijenosom signala u raznim metaboličkim i regulatornim putevima. Dodatno, pokazano je da domenu rodanaza imaju mnogi proteini uključeni u odgovor na stres poput raznih kinaza, ali i primjerice proteina Hsp (Hofmann i sur. 1998; Spallarossa i sur. 2001). Smanjenje ekspresije akonitaze A upućuje na smanjenu sintezu proteina u uvjetima stresa, dok je smanjenje ekspresije proteina uključenih u prijenos signala vjerojatno posljedica jakog oksidacijskog stresa, koji može izazvati degradaciju proteina zbog povećanog sadržaja ROS (Lian i sur. 2021; Zhao i sur. 2022; Rostas i Skelding 2023).

Tretmani s PS-NP i PS-COOH-NP izazvali su smanjenje ekspresije proteina uključenih u Procese transkripcije i translacije: elongacijskog faktora Tu i translacijske (tr) GTPaze koja sudjeluje u dopremi molekule aminoacil-tRNA do ribosoma tijekom biosinteze proteina. Tretman s PS-NP je također povećao ekspresiju glikoziltransferaze uključene u procesiranje molekule tRNA, dok je tretman s PS-COOH-NP smanjio ekspresiju proteina s RRM domenom koja ima ulogu u procesiranju molekule mRNA. Navedeno smanjenje proteina uključenih u biosintezu proteina, ali i proteina koji sudjeluju u procesiranju molekule mRNA ukazuju na

smanjenje sinteze proteina u prisutnosti jakog oksidacijskog stresa. Tretman s PS-NH₂-NP nije izazvao promjenu ekspresije niti jednog proteina iz skupine proteina uključenih u procese transkripcije i translacije, što potvrđuje da je izazvao slabije oksidacijsko oštećenje proteina u odnosu na ostale tretmane.

Od ostalih diferencijalno eksprimiranih proteina identificiran je jedino protein aktin čija se ekspresija povećala nakon svih tretmana nanočesticama polistirena. Aktin ima ulogu u izgradnji i održavanju citoskeleta, zbog čega je uključen u razne stanične procese poput diobe i transporta unutar stanice. Povećana ekspresija navedenog proteina vjerojatno je rezultat aktivacije mehanizama popravka oštećenih stanica te inducirane plazmolize nakon tretmana s nanočesticama polistirena.

Rezultati diferencijalne ekspresije proteina nakon tretmana s nanočesticama polistirena u skladu su s ranije prikazanim rezultatima oštećenja proteina. Naime obje analize pokazale su da su tretmani PS-NP i PS-COOH-NP izazvali značajno veće oštećenje i smanjenu količinu proteina u odnosu na tretman PS-NH₂-NP. No, svi tretmani izazvali su značajno oštećenje tilakoidne membrane i fotosintetskog sustava što je, zajedno sa smanjenom ekspresijom proteina uključenih u metabolizam ugljikohidrata, dovelo do smanjenog energetskeg stanja algi te posljedično smanjene biosinteze proteina.

5.4 Usporedba toksičnosti različitih nanočestica i iona na stanice alge *C. vulgaris*

Analiza fitotoksičnog utjecaja izlaganjem stanica alge *C. vulgaris* nanočesticama srebra s dva različita omotača (AgNP-citrat i AgNP-CTAB) te nanočesticama bakrovih oksida u dva oksidacijska stanja (CuONP i Cu₂ONP) u istim eksperimentalnim uvjetima omogućila je usporedbu mehanizama toksičnosti navedenih tretmana na stanice alge. Određivanjem koncentracije tretmana koja omogućava preživljenje stanica od 75% vidljivo je kako AgNP pokazuju znatno toksičniji učinak na algu *C. vulgaris* u odnosu na ostale korištene tretmane. Naime, dobivena EC₂₅ vrijednost je bila značajno manja nakon tretmana s oba tipa AgNP u odnosu na tretmane nanočesticama bakrovih oksida. Navedeni rezultat je vjerojatno posljedica veće stabilnosti AgNP u odnosu na nanočestice bakrovih oksida u podlozi BBM, ali i prisustva organskog sadržaja iz alge, odnosno sloja EPS. Ranija istraživanja su primjenjujući Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek (DLVO) teoriju o stabilnosti koloidnih suspenzija za predviđanje potencijalne aglomeracije nanočestica u vodenim ekosustavima, pokazali da se potrebna količina energije za interakciju atoma na površini nanočestica s drugim česticama smanjuje sa smanjenjem promjera samih nanočestica (Waychunas i sur. 2005; Peng i sur. 2017). Odnosno, povećanom aglomeracijom nanočestica, smanjuje se njihova površinska reaktivnost, što

posljedično smanjuje i njihovu potencijalnu fitotoksičnost (Tkalec i sur. 2019). Budući da su u ovom istraživanju nanočestice bakrovih oksida pokazale znatno veću aglomeraciju, ali i manju toksičnost od AgNP, rezultati ovog istraživanja dodatno potvrđuju utjecaj aglomeracije nanočestica na njihovu fitotoksičnost. Nadalje, nanočestice metala mogu reagirati s fosforilnim, karboksilnim, hidroksilnim i amino skupinama stanične stijenke, ali i s lipidima, proteinima i molekulama DNA prilikom čega dolazi do povećanja proizvodnje ROS pretežito prijenosom elektrona s nanočesticama na ciljane molekule (Omran 2020; Wen i sur. 2020b; Mukherjee i sur. 2021). I u ovom istraživanju su promatrane nanočestice metala, AgNP i nanočestice bakrovih oksida, inducirale oksidacijski stres, između kojih su AgNP izazvale veću proizvodnju ROS. S druge strane, nanočestice bakrovih oksida izazvale su veća oštećenja na biološki važnim molekulama što je vjerojatni rezultat veće aktivacije antioksidacijskog sustava alge nakon tretmana s AgNP u odnosu na tretmane s nanočesticama bakrovih oksida. Naime, disocijacija iona Cu^{2+} s nanočesticama bakrovih oksida može dovesti do inhibicije aktivnosti staničnih enzima stvaranjem metalnih kompleksa iona Cu^{2+} s proteinima ili njihovim vezanjem na aktivno mjesto enzima (Kilpin i Dyson 2013; Chen i sur. 2020; Kim i sur. 2023). Budući da je bakar esencijalan element u algama, on djeluje kao kofaktor raznih enzima uključenih u antioksidacijsku obranu (Mir i sur. 2021). Dodatno, bakar ima ključnu ulogu i u drugim staničnim procesima poput fotosinteze i staničnog disanja međudjelujući s proteinima poput citokrom *c*-oksidaze i plastocijanina (Chen i sur. 2022). U uvjetima povišene koncentracije iona Cu^{2+} , enzimi koji koriste bakar kao kofaktor mogu biti inhibirani što neminovno dovodi do oštećenja biološki važnih molekula poput lipida, proteina i molekule DNA te ukupnog negativnog učinka na stanične procese (Boulard i sur. 1972; Sharma i sur. 2012). Među tretmanima nanočestica srebra i bakrovih oksida, AgNP su izazvale značajno negativniji učinak na proces fotosinteze u stanicama alge *C. vulgaris*. Prikazano smanjenje stope fotosinteze, količine karotenoida i maksimalnog kvantnog prinosa PSII nakon tretmana s AgNP je vjerojatno rezultat značajnog povećanja sadržaja ROS u stanicama koji mogu reagirati s raznim sastavnicama fotosintetskog aparata (Jiang i sur. 2017). S druge strane, izlaganje stanica alge nanočesticama bakrovih oksida je izazvalo povećanje aktivnosti fotosintetskog procesa, odnosno povećanje sadržaja pigmenta, maksimalnog kvantnog prinosa i učinkovitosti fotosinteze. Stimulirajući učinak nanočestica bakrovih oksida na fotosintezu je vjerojatno posljedica njihovog vezanja na površinu, ali i interakcije bakra s ključnim proteinima fotosinteze (Chen i sur. 2022). Naime, bakar ima i ključnu ulogu u procesu fotosinteze djelovanjem s plastocijaninom ili s citokrom *c*-oksidazom u lancu prijenosa elektrona, ali sudjeluje i u fotosintetskim reakcijama neovisnim o plastocijaninu gdje stimulira proizvodnju kisika (Laporte i sur. 2020; Mydy i sur. 2021; Chen

i sur. 2022). Imajući u vidu da proteomske tehnike omogućavaju analizu raznih staničnih promjena na razini proteina, pomoću proteomskih analiza možemo dodatno razjasniti molekularne mehanizme fitotoksičnosti raznih tipova nanočestica (Zhang i sur. 2020a). U ovom istraživanju, rezultati promjene ekspresije proteina nakon izlaganja stanica alge *C. vulgaris* nanočesticama srebra i bakrovih oksida upućuju da stabilnije nanočestice metala poput AgNP-CTAB te CuONP uzrokuju globalno povećanje ekspresije proteina, što je vjerojatno posljedica aktivacije mehanizama za ublažavanje stresa uzrokovanog nanočesticama. S druge strane, nestabilnije nanočestice srebra i bakrovih oksida, odnosno nanočestice koje su više sklone disocijaciji poput AgNP-citrat i Cu₂ONP, zajedno s tretmanima ionskih kontrola (AgNO₃ i CuSO₄), izazivaju poglavito smanjenje ekspresije proteina uključenih u biološki važne procese poput fotosinteze, metabolizma ugljikohidrata i slično. Navedeni rezultati upućuju da je jedan od važnijih mehanizama fitotoksičnosti nanočestica metala upravo disocijacija iona metala s površine nanočestica pri čemu ioni uzrokuju značajan fitotoksični učinak.

Analiza fitotoksičnog utjecaja nanočestica polistirena bez (PS-NP) i s funkcionalnim skupinama (PS-NH₂-NP i PS-COOH-NP) na stanice alge *C. vulgaris* u istim eksperimentalnim uvjetima omogućila je međusobnu usporedbu mehanizama toksičnosti navedenih tretmana, ali i usporedbu s mehanizmima toksičnosti nanočestica metala na stanice alge. Mnoga istraživanja su već pokazala da kratkotrajno izlaganje nižim koncentracijama nanočestica polistirena ne dovodi do apoptoze stanica kao što je to slučaj kod nanočestica metala (Schirinzi i sur. 2017; Rudolph i sur. 2021; Chen i sur. 2023a; Ruan i sur. 2023). Naime, fitotoksičnost nanočestica metala na alge je uvelike povezana s induciranjem oksidacijskog stresa (Wang i sur. 2019), dok nanočestice polistirena pokazuju veću biokompatibilnost ponajviše zbog povećane stabilnosti, čime im se smanjuje reaktivnost i mogućnost induciranja oksidacijskog stresa (Pessoni i sur. 2019; Poddar i sur. 2020). U prilog tome, nanočestice polistirena su izazvale najmanji porast sadržaja ROS u stanicama u odnosu na tretmane s nanočesticama promatranih metala što je vjerojatno posljedica aktiviranog antioksidacijskog sustava, primarno peroksidaza. Adamczyk i sur. (2023) su pokazali da nanočestice polistirena mogu uzrokovati povećanje u sadržaju ROS te aktivirati značajan antioksidacijski odgovor stanica, ali da je razina izazvanog oksidacijskog stresa vrsno-specifična. Unatoč tome što nije bilo značajnog povećanja oksidacijskog stresa, nanočestice polistirena su izazvale najveće oštećenje proteina u odnosu na ostale tretmane što je vjerojatno posljedica učinkovitijeg vezanja proteina na površinu nanočestica polistirena, čime dolazi do značajnog oštećenja proteina, odnosno promjena u njihovoj konformaciji te

inhibicije funkcija proteina (Kihara i sur. 2020). Dodatno, pokazano je da akumulacija proteina na površini nanočestica polistirena uzrokuje morfološke promjene samih nanočestica, čime one postaju stabilnije te manje toksične što dodatno objašnjava izostanak značajnije peroksidacije lipida kao što je to slučaj nakon tretmana s korištenim nanočesticama metala (Lieberwirth i sur. 2018; Kihara i sur. 2021). Nadalje, smanjena reaktivnost nanočestica polistirena izazvala je i najmanje promjena u fotosintetskom sustavu alge *C. vulgaris* što je u skladu s ranijim istraživanjem utjecaja različitih metalnih i nemetalnih nanočestica na fotosintezu (Poddar i sur. 2020). Naime, nanočestice polistirena nisu imale veliki utjecaj na sadržaj pigmenata ili na maksimalni kvantni prinos, ali su izazvale smanjenje stope fotosinteze. Ranija istraživanja su pokazala da se nanočestice polistirena vrlo lako mogu akumulirati na površini stanica čime blokiraju izmjenu plinova te dovode do smanjenja količine svjetla koja dolazi do kloroplasta (Bhattacharya i sur. 2010; Sendra i sur. 2019; Li i sur. 2020b). Analiza diferencijalno eksprimiranih proteina nakon izlaganja alge nanočesticama polistirena je pokazala poglavito smanjenje ekspresije proteina uključenih u razne stanične procese što je vjerojatno posljedica velikog potencijala nanočestica polistirena za vezanjem proteina na svoju površinu čime se smanjuje ukupna količina proteina, ali i inhibira funkcija enzima (Kihara i sur. 2020).

U konačnici, dodatno je potvrđen učinak površinskih omotača, odnosno funkcionalnih skupina na fitotoksičnost nanočestica. Naime, tretiranje stanica alge s pozitivno nabijenim nanočesticama (AgNP-CTAB te PS-NH₂-NP) je izazvalo manju razinu oksidacijskog stresa, ali i manju količinu diferencijalno eksprimiranih proteina u odnosu na neutralno, odnosno negativno nabijene nanočestice (AgNP-citrat te PS-NP i PS-COOH-NP). Vjerojatan uzrok smanjenja toksičnosti pozitivno nabijenih nanočestica na stanice alge je njihovo olakšano vezanje za slabo vezani sloj EPS stanica algi koji se može otpustiti u okolišni medij u odnosu na neutralne i negativno nabijene nanočestice. Naime, slabo vezani sloj EPS alge *C. vulgaris* je negativno nabijen te se pozitivno nabijene nanočestice lakše vežu na njegove negativno nabijene karboksilne, hidroksilne i amino skupine (Babiak i Krzemińska 2021). Na ovaj se način više čestica zadržava izvan stanica čime se posljedično smanjuje i razina oksidacijskog stresa u stanicama alge.

ZAKLJUČAK

6. ZAKLJUČAK

Temeljem rezultata ovog istraživanja moguće je donijeti sljedeće zaključke:

- Usporedbom EC_{25} vrijednosti, vidljivo je da su tretmani s AgNP znatno toksičniji na alge od nanočestica bakrovih oksida, što je posljedica veće stabilnosti, tj. manje aglomeracije AgNP u podlozi BBM.
- Toksičnost nanočestica srebra i bakrovih oksida primarno je rezultat indukcije oksidacijskog stresa. Usporedba učinaka nanočestica metala na analizirane parametre pokazuje da nanočestice koje su sklonije disocijaciji iona, poput AgNP-citrat i Cu_2ONP , djeluju slično kao ionske kontrole, $AgNO_3$ i $CuSO_4$, što potvrđuje da je disocijacija iona metala s površine nanočestica ključan mehanizam njihove fitotoksičnosti.
- Nanočestice polistirena manje su reaktivne u odnosu na nanočestice metala te je njihov primarni mehanizam toksičnosti vezanje na površinu stanica, čime se blokira izmjena plinova i tvari te smanjuje količina svjetlosti za potrebe fotosinteze.
- Rezultati pokazuju da različiti površinski omotači, funkcionalne skupine ili oksidacijska stanja nanočestica utječu na stabilnost samih nanočestica, što posljedično utječe i na njihovu fitotoksičnost.

POPIS LITERATURE

7. POPIS LITERATURE

- Abassi, S., Wang, H. i Ki, J.-S. (2020). Molecular cloning of heat shock protein 70 and HOP from the freshwater green algae *Closterium ehrenbergii* and their responses to stress. *Cell Stress and Chaperones*, 25, 1117-1123. <https://doi.org/10.1007/s12192-020-01143-8>
- Abdul Razack, S., Duraiarasan, S. i Mani, V. (2016). Biosynthesis of silver nanoparticle and its application in cell wall disruption to release carbohydrate and lipid from *C. vulgaris* for biofuel production. *Biotechnology Reports*, 11, 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.07.001>
- Adamczyk, S., Chojak-Koźniewska, J., Oleszczuk, S., Michalski, K., Velmala, S., Zantis, L.J., Bosker, T., Zimny, J., Adamczyk, B. i Sowa, S. (2023). Polystyrene nanoparticles induce concerted response of plant defense mechanisms in plant cells. *Scientific Reports*, 13, 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50104-5>
- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*, u: *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc., SAD, 121-126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Aguirre, G. i Pilon, M. (2016). Copper delivery to chloroplast proteins and its regulation. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01250>
- Akter, M., Sikder, Md.T., Rahman, Md.M., Ullah, A.K.M.A., Hossain, K.F.B., Banik, S., Hosokawa, T., Saito, T. i Kurasaki, M. (2018). A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: physicochemical properties and perspectives. *Journal of Advanced Research*, 9, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.10.008>
- Alho, L. de O.G., Souza, J.P., Rocha, G.S., Mansano, A. da S., Lombardi, A.T., Sarmiento, H. i Melão, M.G.G. (2020). Photosynthetic, morphological and biochemical biomarkers as tools to investigate copper oxide nanoparticle toxicity to a freshwater chlorophyceae. *Environmental Pollution*, 265, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114856>
- Alimi, O.S., Farnar Budarz, J., Hernandez, L.M. i Tufenkji, N. (2018). Microplastics and nanoplastics in aquatic environments: aggregation, deposition, and enhanced contaminant transport. *Environmental Science and Technology*, 52, 1704-1724. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05559>
- Alivisatos, A.P. (1996). Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science*, 271, 933-937. <https://doi.org/10.1126/science.271.5251.933>

- Al-Khazali, Z.K.M. i Alghanmi, H.A. (2023). Environmental toxicity of nano iron oxides (Fe₂O₃NPs) on algal growth *Klisiinema persicum* and cellular DNA damage using comet assay. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 27, 431-453. <https://doi.org/10.21608/ejabf.2023.287731>
- Allen, J.F. (2002). Photosynthesis of ATP-electrons, proton pumps, rotors, and poise. *Cell*, 110, 273-276. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00870-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00870-x)
- Almeida, A.C., Gomes, T., Langford, K., Thomas, K. V. i Tollefsen, K.E. (2019). Oxidative stress potential of the herbicides bifenox and metribuzin in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*, 210, 117-128. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.02.021>
- Altammar, K.A. (2023). A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1-20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1155622>
- Aljaghoub, H., Alasad, S., Alashkar, A., AlMallahi, M., Hasan, R., Obaideen, K. i Alami, A.H. (2023). Comparative analysis of various oxygen production techniques using multi-criteria decision-making methods. *International Journal of Thermofluids*, 17, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.ijft.2022.100261>
- Ameh, T., Zarzosa, K., Dickinson, J., Braswell, W.E. i Sayes, C.M. (2023). Nanoparticle surface stabilizing agents influence antibacterial action. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1-18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1119550>
- Amstein, C.F. i Hartman, P.A. (1975). Adaptation of plastic surfaces for tissue culture by glow discharge. *Journal of Clinical Microbiology*, 2, 46-54. <https://doi.org/10.1128/jcm.2.1.46-54.1975>
- Angel, B.M., Batley, G.E., Jarolimek, C. V. i Rogers, N.J. (2013). The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems. *Chemosphere*, 93, 359-365. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.096>
- Ariöz, C. i Wittung-Stafshede, P. (2018). Folding of copper proteins: role of the metal? *Quarterly Reviews of Biophysics*, 51, 1-39. <https://doi.org/10.1017/S0033583518000021>
- Arshadi-Rastabi, S., Moghaddam, J. i Reza Eskandarian, M. (2015). Synthesis, characterization and stability of Cu₂O nanoparticles produced via supersaturation method considering

- operational parameters effect. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 22, 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.06.022>
- Artiukh, L., Povnitsa, O., Zahorodnia, S., Pop, C. V. i Rizun, N. (2022). Effect of coated silver nanoparticles on cancerous vs. healthy cells. *Journal of Toxicology*, 2022, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2022/1519104>
- Asandulesa, M., Solonaru, A.-M., Resmerita, A.-M. i Honciuc, A. (2023). Thermal and dielectric investigations of polystyrene nanoparticles as a viable platform-toward the next generation of fillers for nanocomposites. *Polymers*, 15, 1-14. <https://doi.org/10.3390/polym15132899>
- Ashenafi, E.L., Nyman, M.C., Shelley, J.T. i Mattson, N.S. (2023). Spectral properties and stability of selected carotenoid and chlorophyll compounds in different solvent systems. *Food Chemistry Advances*, 2, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100178>
- Atha, D.H., Wang, H., Petersen, E.J., Cleveland, D., Holbrook, R.D., Jaruga, P., Dizdaroglu, M., Xing, B. i Nelson, B.C. (2012). Copper oxide nanoparticle mediated DNA damage in terrestrial plant models. *Environmental Science and Technology*, 46, 1819-1827. <https://doi.org/10.1021/es202660k>
- Atıcı, Ö. i Nalbantoğlu, B. (2003). Antifreeze proteins in higher plants. *Phytochemistry*, 64, 1187-1196. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00420-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00420-5)
- Awet, T.T., Kohl, Y., Meier, F., Straskraba, S., Grün, A.-L., Ruf, T., Jost, C., Drexel, R., Tunc, E. i Emmerling, C. (2018). Effects of polystyrene nanoparticles on the microbiota and functional diversity of enzymes in soil. *Environmental Sciences Europe*, 30, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0140-6>
- Azqueta, A. i Collins, A.R. (2013). The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology*, 87, 949-968. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1070-0>
- Baba, S.P. i Bhatnagar, A. (2018). Role of thiols in oxidative stress. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 133-139. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.03.005>
- Babiak, W. i Krzemińska, I. (2021). Extracellular polymeric substances (EPS) as microalgal bioproducts: a review of factors affecting EPS synthesis and application in flocculation Processes. *Energies*, 14, 1-23. <https://doi.org/10.3390/en14134007>

- Bahador, E., Einali, A., Azizian-Shermeh, O. i Sangtarash, M.H. (2019). Metabolic responses of the green microalga *Dunaliella salina* to silver nanoparticles-induced oxidative stress in the presence of salicylic acid treatment. *Aquatic Toxicology*, 217, 1-37. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105356>
- Bahk, Y.K., He, X., Gitsis, E., Kuo, Y.-Y., Kim, N. i Wang, J. (2015). Enhanced dispersion stability and mobility of carboxyl-functionalized carbon nanotubes in aqueous solutions through strong hydrogen bonds. *Journal of Nanoparticle Research*, 17, 1-13. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-3203-2>
- Baig, N., Kammakakam, I. i Falath, W. (2021). Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Materials Advances*, 2, 1821-1871. <https://doi.org/10.1039/D0MA00807A>
- Balasubramanian, B., Pogozelski, W.K. i Tullius, T.D. (1998). DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 9738-9743. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.17.9738>
- Balema, V.P., Hlova, I.Z., Carnahan, S.L., Seyedi, M., Dolotko, O., Rossini, A.J. i Luzinov, I. (2021). Depolymerization of polystyrene under ambient conditions. *New Journal of Chemistry*, 45, 2935-2938. <https://doi.org/10.1039/d0nj05984f>
- Balen, B., Pavković, D., Peharec Štefanić, P. i Krsnik-Rasol, M. (2011). Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. *Sveučilišni priručnik: Hrvatska sveučilišna naknada, Zagreb*, 1-47
- Bano, A., Gupta, A., Rai, S., Fatima, T., Sharma, S. i Pathak, N. (2022). Mechanistic role of reactive oxygen species and its regulation via the antioxidant system under environmental stress u: *Plant Stress Physiology-Perspectives in Agriculture*. IntechOpen, UK, 1-18. <https://doi.org/10.5772/intechopen.101045>
- Banu, A.N., Kudesia, N., Raut, A.M., Pakrudheen, I. i Wahengbam, J. (2021). Toxicity, bioaccumulation, and transformation of silver nanoparticles in aqua biota: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 4275-4296. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01304-w>
- Barbusiński, K. (2009). Fenton reaction-controversy concerning the chemistry. *Ecological Chemistry and Engineering S*, 16, 347-358

- Barera, S. i Forlani, G. (2023). The role of proline in the adaptation of eukaryotic microalgae to environmental stress: an underestimated tool for the optimization of algal growth. *Journal of Applied Phycology*, *35*, 1635-1648. <https://doi.org/10.1007/s10811-023-03017-9>
- Barrena, R., Casals, E., Colón, J., Font, X., Sánchez, A. i Puntès, V. (2009). Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere*, *75*, 850-857. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.078>
- Bates, L.S., Waldren, R.P. i Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, *39*, 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Bauduin, S., Latini, M., Belleggia, I., Migliore, M., Biancucci, M., Mattioli, R., Francioso, A., Mosca, L., Funck, D. i Trovato, M. (2022). Interplay between proline metabolism and ROS in the fine tuning of root-meristem size in *Arabidopsis*. *Plants*, *11*, 1-12. <https://doi.org/10.3390/plants11111512>
- Baylan, N., İlalan, İ. i İnci, İ. (2020). Copper oxide nanoparticles as a novel adsorbent for separation of acrylic acid from aqueous solution: synthesis, characterization, and application. *Water, Air and Soil Pollution*, *231*, 1-19. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04832-3>
- Beauchamp, C. i Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, *44*, 276-287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Behra, R., Sigg, L., Clift, M.J.D., Herzog, F., Minghetti, M., Johnston, B., Petri-Fink, A. i Rothen-Rutishauser, B. (2013). Bioavailability of silver nanoparticles and ions: from a chemical and biochemical perspective. *Journal of The Royal Society Interface*, *10*, 1-15. <https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0396>
- Bellingeri, A., Bergami, E., Grassi, G., Faleri, C., Redondo-Hasselerharm, P., Koelmans, A.A. i Corsi, I. (2019). Combined effects of nanoplastics and copper on the freshwater alga *Raphidocelis subcapitata*. *Aquatic Toxicology*, *210*, 179-187. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.02.022>
- Bettaieb, I., Hamdi, J. i Bouktila, D. (2020). Genome-wide analysis of HSP90 gene family in the Mediterranean olive (*Olea europaea* subsp. *europaea*) provides insight into structural

- patterns, evolution and functional diversity. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26, 2301-2318. <https://doi.org/10.1007/s12298-020-00888-x>
- Bhattacharya, P., Lin, S., Turner, J.P. i Ke, P.C. (2010). Physical adsorption of charged plastic nanoparticles affects algal photosynthesis. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114, 16556-16561. <https://doi.org/10.1021/jp1054759>
- Biba, R., Matic, D., Lyons, D.M., Štefanić, P.P., Cvjetko, P., Tkalec, M., Pavoković, D., Letofsky-Papst, I. i Balen, B. (2020). Coating-dependent effects of silver nanoparticles on tobacco seed germination and early growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 3441-3460. <https://doi.org/10.3390/ijms21103441>
- Biba, R., Košpić, K., Komazec, B., Markulin, D., Cvjetko, P., Pavoković, D., Štefanić, P.P., Tkalec, M., Balen, B., Peharec Štefanić, P., Tkalec, M. i Balen, B. (2021). Surface coating-modulated phytotoxic responses of silver nanoparticles in plants and freshwater green algae. *Nanomaterials*, 12, 1-29. <https://doi.org/10.3390/nano12010024>
- Biba, R., Cvjetko, P., Tkalec, M., Košpić, K., Štefanić, P.P., Šikić, S., Domijan, A.-M. i Balen, B. (2022). Effects of silver nanoparticles on physiological and proteomic responses of tobacco (*Nicotiana tabacum*) seedlings are coating-dependent. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 1-28. <https://doi.org/10.3390/ijms232415923>
- Boulard, M., Blume, K.G. i Beutler, E. (1972). The effect of copper on red cell enzyme activities. *The Journal of clinical investigation*, 51, 459-461. <https://doi.org/10.1172/JCI106833>
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003>
- Bruna, T., Maldonado-Bravo, F., Jara, P. i Caro, N. (2021). Silver nanoparticles and their antibacterial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 1-21. <https://doi.org/10.3390/ijms22137202>
- Bulda, O. V., Rassadina, V. V., Alekseichuk, H.N. i Laman, N.A. (2008). Spectrophotometric measurement of carotenes, xanthophylls, and chlorophylls in extracts from plant seeds. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55, 544-551. <https://doi.org/10.1134/S1021443708040171>

- Buzea, C., Pacheco, I.I. i Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2, 1-55. <https://doi.org/10.1116/1.2815690>
- Bykova, N. V., Hoehn, B., Rampitsch, C., Hu, J., Stebbing, J.-A. i Knox, R. (2011). Thiol redox-sensitive seed proteome in dormant and non-dormant hybrid genotypes of wheat. *Phytochemistry*, 72, 1162-1172. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.12.021>
- Cameron, S., Hosseinian, F. i Willmore, W. (2018). A current overview of the biological and cellular effects of nanosilver. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 1-40. <https://doi.org/10.3390/ijms19072030>
- Capjak, I., Zebić Avdičević, M., Sikirić, M.D., Domazet Jurašin, D., Hozić, A., Pajić, D., Dobrović, S., Goessler, W. i Vinković Vrček, I. (2018). Behavior of silver nanoparticles in wastewater: systematic investigation on the combined effects of surfactants and electrolytes in model systems. *Environmental Science: Water Research and Technology*, 4, 2146-2159. <https://doi.org/10.1039/C8EW00317C>
- Carlson, C., Hussain, S.M., Schrand, A.M., K. Braydich-Stolle, L., Hess, K.L., Jones, R.L. i Schlager, J.J. (2008). Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112, 13608-13619. <https://doi.org/10.1021/jp712087m>
- Cassidy, L., Kaulich, P.T., Maaß, S., Bartel, J., Becher, D. i Tholey, A. (2021). Bottom-up and top-down proteomic approaches for the identification, characterization, and quantification of the low molecular weight proteome with focus on short open reading frame-encoded peptides. *Proteomics*, 21, 1-13. <https://doi.org/10.1002/pmic.202100008>
- Castegna, A., Drake, J., Pocernich, C. i Butterfield, D.A. (2003). Protein carbonyl levels- an assessment of protein oxidation, u: *Methods in Biological Oxidative Stress*, Humana Press, SAD, 161-168. <https://doi.org/10.1385/1-59259-424-7:161>
- Catherman, A.D., Skinner, O.S. i Kelleher, N.L. (2014). Top down proteomics: facts and perspectives. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 445, 683-693. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.041>
- Cavalcanti, J.H.F., Esteves-Ferreira, A.A., Quinhones, C.G.S., Pereira-Lima, I.A., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R. i Araújo, W.L. (2014). Evolution and functional implications of the tricarboxylic acid cycle as revealed by phylogenetic analysis. *Genome Biology and Evolution*, 6, 2830-2848. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu221>

- Cecarini, V., Gee, J., Fioretti, E., Amici, M., Angeletti, M., Eleuteri, A.M. i Keller, J.N. (2007). Protein oxidation and cellular homeostasis: emphasis on metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773, 93-104. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.039>
- Chae, Y., Kim, D., Kim, S.W. i An, Y.-J. (2018). Trophic transfer and individual impact of nano-sized polystyrene in a four-species freshwater food chain. *Scientific Reports*, 8, 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18849-y>
- Chauhan, A., Verma, R., Batoo, K.M., Kumari, S., Kalia, R., Kumar, R., Hadi, M., Raslan, E.H. i Imran, A. (2021). Structural and optical properties of copper oxide nanoparticles: A study of variation in structure and antibiotic activity. *Journal of Materials Research*, 36, 1496-1509. <https://doi.org/10.1557/s43578-021-00193-7>
- Che, X., Ding, R., Zhang, Q., Li, Y., Sun, Q., Li, Y., Zhang, Z., Wang, W. i Gao, H. (2021). The severe toxicity of CuO nanoparticles to the photosynthesis of the prokaryotic algae *Arthrospira* sp. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 54105-54116. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14341-3>
- Chen, Y.-P., Li, C., Guo, J.-S., Fang, F., Gao, X., Zhang, P. i Li, S. (2013). Extraction and characterization of extracellular polymeric substances in biofilm and sludge via completely autotrophic nitrogen removal over nitrite system. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169, 526-538. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9996-x>
- Chen, H., Zheng, X., Chen, Y., Li, M., Liu, K. i Li, X. (2014). Influence of copper nanoparticles on the physical-chemical properties of activated sludge. *PLoS ONE*, 9, 1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092871>
- Chen, Y., Guo, Y., Batra, S., Wang, E., Wang, Y., Liu, X., Wang, Y. i Cakmak, M. (2015). Transparent and through thickness conductive polystyrene films using external magnetic fields for “Z” alignment of nickel nanoparticles. *Nanoscale*, 7, 14636-14642. <https://doi.org/10.1039/C5NR03328D>
- Chen, F., Xiao, Z., Yue, L., Wang, J., Feng, Y., Zhu, X., Wang, Z. i Xing, B. (2019). Algae response to engineered nanoparticles: current understanding, mechanisms and implications. *Environmental Science: Nano*, 6, 1026-1042. <https://doi.org/10.1039/c8en01368c>

- Chen, J., Jiang, Y., Shi, H., Peng, Y., Fan, X. i Li, C. (2020). The molecular mechanisms of copper metabolism and its roles in human diseases. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 472, 1415-1429. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02412-2>
- Chen, G., Li, J., Han, H., Du, R. i Wang, X. (2022). Physiological and molecular mechanisms of plant responses to copper stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 1-18. <https://doi.org/10.3390/ijms232112950>
- Chen, J., Xu, Z., Liu, Y., Mei, A., Wang, X. i Shi, Q. (2023)(a). Cellular absorption of polystyrene nanoplastics with different surface functionalization and the toxicity to RAW264.7 macrophage cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 252, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114574>
- Chen, Z., Wu, W., Wen, Y., Zhang, L., Wu, Y., Farid, M.S., El-Seedi, H.R., Capanoglu, E. i Zhao, C. (2023)(b). Recent advances of natural pigments from algae. *Food Production, Processing and Nutrition*, 5, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s43014-023-00155-y>
- Cheng, C., Chen, L., Chou, C. i Liang, J. (2015). Investigations of riboflavin photolysis via coloured light in the nitro blue tetrazolium assay for superoxide dismutase activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology*, 148, 262-267. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.04.028>
- Chiang, H. i Dandekar, A. (1995). Regulation of proline accumulation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh during development and in response to desiccation. *Plant, Cell and Environment*, 18, 1280-1290. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1995.tb00187.x>
- Chmielowska-Bąk, J. i Deckert, J. (2021). Plant recovery after metal stress-a review. *Plants*, 10, 1-12. <https://doi.org/10.3390/plants10030450>
- Cholewińska, E., Ognik, K., Fotschki, B., Zduńczyk, Z. i Juśkiewicz, J. (2018). Comparison of the effect of dietary copper nanoparticles and one copper (II) salt on the copper biodistribution and gastrointestinal and hepatic morphology and function in a rat model. *PLOS ONE*, 13, 1-23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197083>
- Collins, A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*, 26, 249-261. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>

- Conrad, M., Kagan, V.E., Bayir, H., Pagnussat, G.C., Head, B., Traber, M.G. i Stockwell, B.R. (2018). Regulation of lipid peroxidation and ferroptosis in diverse species. *Genes and Development*, 32, 602-619. <https://doi.org/10.1101/gad.314674.118>
- Cortés, C., Domenech, J., Salazar, M., Pastor, S., Marcos, R. i Hernández, A. (2020). Nanoplastics as a potential environmental health factor: effects of polystyrene nanoparticles on human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Environmental Science: Nano*, 7, 272-285. <https://doi.org/10.1039/C9EN00523D>
- Craig, E.W., Mueller, D.M., Bigge, B.M., Schaffer, M., Engel, B.D. i Avasthi, P. (2019). The elusive actin cytoskeleton of a green alga expressing both conventional and divergent actins. *Molecular Biology of the Cell*, 30, 2827-2837. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-03-0141>
- Crisan, M.C., Teodora, M. i Lucian, M. (2021). Copper nanoparticles: synthesis and characterization, physiology, toxicity and antimicrobial applications. *Applied Sciences*, 12, 141-155. <https://doi.org/10.3390/app12010141>
- Csermely, P., Schnaider, T., So"ti, C., Prohászka, Z. i Nardai, G. (1998). The 90-kda molecular chaperone family. *Pharmacology and Therapeutics*, 79, 129-168. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(98\)00013-8](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(98)00013-8)
- Cvjetko, P., Milošić, A., Domijan, A.-M.M., Vinković Vrček, I., Tolić, S., Peharec Štefanić, P., Letofsky-Papst, I., Tkalec, M. i Balen, B. (2017). Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137, 18-28. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.009>
- Da Costa, M.V.J. i Sharma, P.K. (2016). Effect of copper oxide nanoparticles on growth, morphology, photosynthesis, and antioxidant response in *Oryza sativa*. *Photosynthetica*, 54, 110-119. <https://doi.org/10.1007/s11099-015-0167-5>
- Dai, S., Ye, R., Huang, J., Wang, B., Xie, Z., Ou, X., Yu, N., Huang, C., Hua, Y., Zhou, R. i Tian, B. (2022). Distinct lipid membrane interaction and uptake of differentially charged nanoplastics in bacteria. *Journal of Nanobiotechnology*, 20, 191-204. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01321-z>
- Dai, Y., Zhao, J., Liu, X., Yu, X., Jiang, Z., Bu, Y., Xu, Z., Wang, Z., Zhu, X. i Xing, B. (2019). Transformation and species identification of CuO nanoparticles in plant cells (*Nicotiana*

tabacum). *Environmental Science: Nano*, 6, 2724-2735.
<https://doi.org/10.1039/C9EN00781D>

Dall'Osto, L., Cazzaniga, S., Guardini, Z., Barera, S., Benedetti, M., Mannino, G., Maffei, M.E. i Bassi, R. (2019). Combined resistance to oxidative stress and reduced antenna size enhance light-to-biomass conversion efficiency in *Chlorella vulgaris* cultures. *Biotechnology for Biofuels*, 12, 221-233. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1566-9>

Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R. i Milzani, A. (2006). Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10, 389-406. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2006.tb00407.x>

Dauda, S. i Lombardi, A.T. (2023). Environmentally relevant copper concentrations stimulate photosynthesis in *Monoraphidium* sp.. *Photosynthesis Research*, 155, 49-58. <https://doi.org/10.1007/s11120-022-00976-x>

Dawadi, S., Katuwal, S., Gupta, A., Lamichhane, U., Thapa, R., Jaisi, S., Lamichhane, G., Bhattarai, D.P. i Parajuli, N. (2021). Current research on silver nanoparticles: synthesis, characterization, and applications. *Journal of Nanomaterials*, 2021, 1-23. <https://doi.org/10.1155/2021/6687290>

Dayem, A.A., Hossain, M.K., Lee, S. Bin, Kim, K., Saha, S.K., Yang, G.M., Choi, H.Y. i Cho, S.G. (2017). The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1-21. <https://doi.org/10.3390/ijms18010120>

de Abreu, F.C.P., da Costa, P.N.M., Brondi, A.M., Pilau, E.J., Gozzo, F.C., Eberlin, M.N., Trevisan, M.G. i Garcia, J.S. (2014). Effects of cadmium and copper biosorption on *Chlorella vulgaris*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 93, 405-409. <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1363-x>

De Leersnyder, I., De Gelder, L., Van Driessche, I. i Vermeir, P. (2019). Revealing the importance of aging, environment, size and stabilization mechanisms on the stability of metal nanoparticles: a case study for silver nanoparticles in a minimally defined and complex undefined bacterial growth medium. *Nanomaterials*, 9, 1684-1695. <https://doi.org/10.3390/nano9121684>

Demirevska, K., Zasheva, D., Dimitrov, R., Simova-Stoilova, L., Stamenova, M. i Feller, U. (2009). Drought stress effects on Rubisco in wheat: changes in the Rubisco large subunit.

Acta Physiologiae Plantarum, 31, 1129-1138. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0331-2>

- Dere, Ş., Güneş, T. i Sivaci, R. (1998). Spectrophotometric determination of chlorophyll-*a*, *b* and total caretenoid contents of some algae species using different solvents. *Turkish Journal of Botany*, 22, 13-16
- DeRidder, B.P., Shybut, M.E., Dyle, M.C., Kremling, K.A.G. i Shapiro, M.B. (2012). Changes at the 3'-untranslated region stabilize Rubisco activase transcript levels during heat stress in *Arabidopsis*. *Planta*, 236, 463-476. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1623-0>
- Dewez, D. i Oukarroum, A. (2012). Silver nanoparticles toxicity effect on photosystem II photochemistry of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* treated in light and dark conditions. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 94, 1536-1546. <https://doi.org/10.1080/02772248.2012.712124>
- Dhal, S. i Harshata, P. (2022). Regulation of glycolysis and krebs cycle during biotic and abiotic stresses, u: *Photosynthesis and respiratory cycles during environmental stress response in plants*, Apple Academic Press, SAD, 1-46. <https://doi.org/10.1201/9781003315162>
- Djamila, B., Eddine, L.S., Abderrhmane, B., Nassiba, A. i Barhoum, A. (2024). *In vitro* antioxidant activities of copper mixed oxide (CuO/Cu₂O) nanoparticles produced from the leaves of *Phoenix dactylifera* L. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14, 6567-6580. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02743-3>
- Dogra, V. i Kim, C. (2020). Singlet oxygen metabolism: from genesis to signaling. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1-9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01640>
- Dong, S., Zeng, Z., Cai, W., Zhou, Z., Dou, C., Liu, H. i Xia, J. (2019). The zeta potentials of g-C₃N₄ nanoparticles: effect of electrolyte, ionic strength, pH, and humic acid. *Journal of Nanoparticle Research*, 21, 233-245. <https://doi.org/10.1007/s11051-019-4686-z>
- Du, B.D., Phu, D. Van, Quoc, L.A. i Hien, N.Q. (2017). Synthesis and investigation of antimicrobial activity of Cu₂O nanoparticles/zeolite. *Journal of Nanoparticles*, 2017, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2017/7056864>
- Dudek, G., Strzelewicz, A., Krasowska, M., Rybak, A. i Turczyn, R. (2014). A spectrophotometric method for plant pigments determination and herbs classification. *Chemical Papers*, 68, 579-583. <https://doi.org/10.2478/s11696-013-0502-x>

- Dupree, E.J., Jayathirtha, M., Yorkey, H., Mihasan, M., Petre, B.A. i Darie, C.C. (2020). A critical review of bottom-up proteomics: the good, the bad, and the future of this field. *Proteomes*, 8, 1-25. <https://doi.org/10.3390/proteomes8030014>
- Durbin, K.R., Fornelli, L., Fellers, R.T., Doubleday, P.F., Narita, M. i Kelleher, N.L. (2016). Quantitation and identification of thousands of human proteoforms below 30 kDa. *Journal of Proteome Research*, 15, 976-982. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00997>
- Edelman, M. i Mattoo, A.K. (2008). D1-protein dynamics in photosystem II: the lingering enigma. *Photosynthesis Research*, 98, 609-620. <https://doi.org/10.1007/s11120-008-9342-x>
- Ekner-Grzyb, A., Duka, A., Grzyb, T., Lopes, I. i Chmielowska-Bąk, J. (2022). Plants oxidative response to nanoplastic. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1-15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1027608>
- Endale, H.T., Tesfaye, W. i Mengstie, T.A. (2023). ROS induced lipid peroxidation and their role in ferroptosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1226044>
- Ermolin, M.S., Fedotov, P.S., Malik, N.A. i Karandashev, V.K. (2018). Nanoparticles of volcanic ash as a carrier for toxic elements on the global scale. *Chemosphere*, 200, 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.089>
- Eslick, E.M., Beilby, M.J. i Moon, A.R. (2014). A study of the native cell wall structures of the marine alga *Ventricaria ventricosa* (Siphonocladales, Chlorophyceae) using atomic force microscopy. *Microscopy*, 63, 131-140. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dft083>
- Ewing, T., van Noord, A., Paul, C. i van Berkel, W. (2018). A xylenol orange-based screening assay for the substrate specificity of flavin-dependent para-phenol oxidases. *Molecules*, 23, 164-178. <https://doi.org/10.3390/molecules23010164>
- Fabrega, J., Luoma, S.N., Tyler, C.R., Galloway, T.S. i Lead, J.R. (2011). Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. *Environment International*, 37, 517-531. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.10.012>
- Fahmy, H.M., Mosleh, A.M., Elghany, A.A., Shams-Eldin, E., Abu Serea, E.S., Ali, S.A. i Shalan, A.E. (2019). Coated silver nanoparticles: synthesis, cytotoxicity, and optical properties. *RSC Advances*, 9, 20118-20136. <https://doi.org/10.1039/C9RA02907A>

- Fan, G., Bao, M., Wang, B., Wu, S., Luo, L., Li, B. i Lin, J. (2019). Inhibitory effects of Cu₂O/SiO₂ on the growth of *Microcystis aeruginosa* and its mechanism. *Nanomaterials*, 9, 1-15. <https://doi.org/10.3390/nano9121669>
- Faraloni, C. i Torzillo, G. (2017). Synthesis of antioxidant carotenoids in microalgae in response to physiological stress, u: *Carotenoids*. IntechOpen, UK, 1-20. <https://doi.org/10.5772/67843>
- Fathi, P., Sadeghi, G., Hosseini, M.-J., Farahmandkia, Z. i Mehrasbi, M.R. (2020). Effects of copper oxide nanoparticles on the *Chlorella* algae in the presence of humic acid. *SN Applied Sciences*, 2, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1812-6>
- Faurobert, M., Pelpoir, E. i Chaïb, J. (2007). Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues, u: *Plant Proteomics*, Humana Press, SAD, 9-14. <https://doi.org/10.1385/1-59745-227-0:9>.
- Fazelian, N., Movafeghi, A., Yousefzadi, M. i Rahimzadeh, M. (2019). Cytotoxic impacts of CuO nanoparticles on the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 17499-17511. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05130-0>
- Feigl, G. (2023). The impact of copper oxide nanoparticles on plant growth: a comprehensive review. *Journal of Plant Interactions*, 18, 1-14. <https://doi.org/10.1080/17429145.2023.2243098>
- Feist, P. i Hummon, A. (2015). Proteomic challenges: sample preparation techniques for microgram-quantity protein analysis from biological samples. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 3537-3563. <https://doi.org/10.3390/ijms16023537>
- Feng, L.-J., Li, J.-W., Xu, E.G., Sun, X.-D., Zhu, F.-P., Ding, Z., Tian, H., Dong, S.-S., Xia, P.-F. i Yuan, X.-Z. (2019). Short-term exposure to positively charged polystyrene nanoparticles causes oxidative stress and membrane destruction in cyanobacteria. *Environmental Science: Nano*, 6, 3072-3079. <https://doi.org/10.1039/C9EN00807A>
- Ferdous, Z. i Nemmar, A. (2020). Health impact of silver nanoparticles: a review of the biodistribution and toxicity following various routes of exposure. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1-31. <https://doi.org/10.3390/ijms21072375>

- Fernando, I. i Zhou, Y. (2019). Impact of pH on the stability, dissolution and aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Chemosphere*, 216, 297-305. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.122>
- Fernando, I., Lu, D. i Zhou, Y. (2020). Interactive influence of extracellular polymeric substances (EPS) and electrolytes on the colloidal stability of silver nanoparticles. *Environmental Science: Nano*, 7, 186-197. <https://doi.org/10.1039/C9EN00861F>
- Fertsch-Gapp, S., Semmler-Behnke, M., Wenk, A. i Kreyling, W.G. (2011). Binding of polystyrene and carbon black nanoparticles to blood serum proteins. *Inhalation Toxicology*, 23, 468-475. <https://doi.org/10.3109/08958378.2011.583944>
- Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T. i Falkowski J. (1998). Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, 281, 237-240. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.237>
- Figueroa-González, G. i Pérez-Plasencia, C. (2017). Strategies for the evaluation of DNA damage and repair mechanisms in cancer. *Oncology Letters*, 13, 3982-3988. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6002>
- Filipczak, P., Borkowski, M., Chudobinski, P., Bres, S., Matusiak, M., Nowaczyk, G. i Kozanecki, M. (2020). Sodium citrate stabilized AgNPs under thermal treatment, electron-beam and laser irradiations. *Radiation Physics and Chemistry*, 169, 107948. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2018.07.020>
- Fleitas-Salazar, N., Silva-Campa, E., Pedroso-Santana, S., Tanori, J., Pedroza-Montero, M.R. i Riera, R. (2017). Effect of temperature on the synthesis of silver nanoparticles with polyethylene glycol: new insights into the reduction mechanism. *Journal of Nanoparticle Research*, 19, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11051-017-3780-3>
- Flores-López, L.Z., Espinoza-Gómez, H., Somanathan, R., Flores-López, L.Z., Espinoza-Gómez, H. i Somanathan, R. (2019). Silver nanoparticles: electron transfer, reactive oxygen species, oxidative stress, beneficial and toxicological effects. Mini review. *Journal of Applied Toxicology*, 39, 16-26. <https://doi.org/10.1002/jat.3654>
- Fridovich, I. (1986). Biological effects of the superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 247, 1-11. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(86\)90526-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(86)90526-6)

- Fuchs, A.-K., Syrovets, T., Haas, K.A., Loos, C., Musyanovych, A., Mailänder, V., Landfester, K. i Simmet, T. (2016). Carboxyl- and amino-functionalized polystyrene nanoparticles differentially affect the polarization profile of M1 and M2 macrophage subsets. *Biomaterials*, 85, 78-87. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.064>
- Fujii, J., Homma, T. i Osaki, T. (2022). Superoxide radicals in the execution of cell death. *Antioxidants*, 11, 1-30. <https://doi.org/10.3390/antiox11030501>
- Galbusera, C., Orth, P., Fedida, D. i Spector, T. (2006). Superoxide radical production by allopurinol and xanthine oxidase. *Biochemical Pharmacology*, 71, 1747-1752. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.02.008>
- Galmés, J., Aranjuelo, I., Medrano, H. i Flexas, J. (2013). Variation in Rubisco content and activity under variable climatic factors. *Photosynthesis Research*, 117, 73-90. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9861-y>
- Garrido, M., Gualandi, L., Di Noja, S., Filippini, G., Bosi, S. i Prato, M. (2020). Synthesis and applications of amino-functionalized carbon nanomaterials. *Chemical Communications*, 56, 12698-12716. <https://doi.org/10.1039/D0CC05316C>
- Garrison, W.M. (1989). Comparative free radical chemistry in the radiolytic deamination and dephosphorylation of bio-organic molecules. II. Oxygenated solutions. *Free Radical Biology and Medicine*, 7, 171-175. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90009-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90009-9)
- Gauthier, M.R., Senhorinho, G.N.A. i Scott, J.A. (2020). Microalgae under environmental stress as a source of antioxidants. *Algal Research*, 52, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102104>
- Geisler-Lee, J., Wang, Q., Yao, Y., Zhang, W., Geisler, M., Li, K., Huang, Y., Chen, Y., Kolmakov, A. i Ma, X. (2013). Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. *Nanotoxicology*, 7, 323-337. <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.658094>
- Geoffrion, L.D. i Guisbiers, G. (2020). Quantum confinement: size on the grill! *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 140, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2019.109320>
- Gewert, B., Plassmann, M.M. i MacLeod, M. (2015). Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environmental Science: Processes and Impacts*, 17, 1513-1521. <https://doi.org/10.1039/C5EM00207A>

- Gherasim, O., Puiu, R.A., Bîrcă, A.C., Burduşel, A.-C. i Grumezescu, A.M. (2020). An updated review on silver nanoparticles in biomedicine. *Nanomaterials*, 10, 1-44. <https://doi.org/10.3390/nano10112318>
- Giarola, V., Jung, N.U., Singh, A., Satpathy, P. i Bartels, D. (2018). Analysis of *pcC13-62* promoters predicts a link between cis-element variations and desiccation tolerance in Linderniaceae. *Journal of Experimental Botany*, 69, 3773-3784. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery173>
- Gichner, T., Patková, Z., Száková, J. i Demnerová, K. (2004). Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 559, 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.12.008>
- Gill, S.S. i Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Giri, S. i Mukherjee, A. (2021). Ageing with algal EPS reduces the toxic effects of polystyrene nanoplastics in freshwater microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105978>
- Gomes, A., Fernandes, E. i Lima, J.L.F.C. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 65, 45-80. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.10.003>
- Gomes, T., Pereira, C.G., Cardoso, C., Pinheiro, J.P., Cancio, I. i Bebianno, M.J. (2012). Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 118-119, 72-79. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.03.017>
- González, L., Bolaño, C. i Pellissier, F. (2001). Use of oxygen electrode in measurements of photosynthesis and respiration, u: *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*. Kluwer Academic Publishers, Nizozemska, 141-153. https://doi.org/10.1007/0-306-48057-3_9
- González-Minero, F.J., Bravo-Díaz, L. i Ayala-Gómez, A. (2020). *Rosmarinus officinalis* L. (Rosemary): an ancient plant with uses in personal healthcare and cosmetics. *Cosmetics*, 7, 1-17. <https://doi.org/10.3390/cosmetics7040077>

- Greene, R. (2002). Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. *The Arabidopsis Book*, 1, 1-20. <https://doi.org/10.1199/tab.0036.1>
- Griffin, S., Masood, M., Nasim, M., Sarfraz, M., Ebokaiwe, A., Schäfer, K.-H., Keck, C. i Jacob, C. (2017). Natural nanoparticles: a particular matter inspired by nature. *Antioxidants*, 7, 1-21. <https://doi.org/10.3390/antiox7010003>
- Grimaldi, K.A., McGurk, C.J., McHugh, P.J. i Hartley, J.A. (2002). PCR-based methods for detecting DNA damage and its repair at the sub-gene and single nucleotide levels in cells. *Molecular Biotechnology*, 20, 181-196. <https://doi.org/10.1385/MB:20:2:181>
- Gupta, D., Meher, S.R., Illyaskutty, N. i Alex, Z.C. (2018). Facile synthesis of Cu₂O and CuO nanoparticles and study of their structural, optical and electronic properties. *Journal of Alloys and Compounds*, 743, 737-745. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2018.01.181>
- Gusev, A.A., Zakharova, O. V., Vasyukova, I.A., Evtushenko, N.A., Vasilieva, S.G., Lukyanov, A.A., Lobakova, E.S., Skripnikova, E. V. i Solovchenko, A.E. (2021). Nanoparticles in the aquatic environment: the risks associated with them and the possibilities of their mitigation with microalgae. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 76, 165-174. <https://doi.org/10.3103/S0096392521040039>
- Hader, D. (2022). Photosynthesis in plants and algae. *Anticancer Research*, 42, 5035-5041. <https://doi.org/10.21873/anticancer.16012>
- Hadwan, M.H. (2018). Simple spectrophotometric assay for measuring catalase activity in biological tissues. *BMC Biochemistry*, 19, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12858-018-0097-5>
- Hahm, J.Y., Park, J., Jang, E.-S. i Chi, S.W. (2022). 8-Oxoguanine: from oxidative damage to epigenetic and epitranscriptional modification. *Experimental and Molecular Medicine*, 54, 1626-1642. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00822-z>
- Hamza, T.A. i Hadwan, M.H. (2020). New spectrophotometric method for the assessment of catalase enzyme activity in biological tissues. *Current Analytical Chemistry*, 16, 1054-1062. <https://doi.org/10.2174/1573411016666200116091238>
- Hangan, A.C., Lucaciu, R.L., Turza, A., Dican, L., Sevastre, B., Páll, E., Oprean, L.S. i Borodi, G. (2023). New copper complexes with antibacterial and cytotoxic activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 1-21. <https://doi.org/10.3390/ijms241813819>

- Hashimoto, T., Mustafa, G., Nishiuchi, T. i Komatsu, S. (2020). Comparative analysis of the effect of inorganic and organic chemicals with silver nanoparticles on soybean under flooding stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1-18. <https://doi.org/10.3390/ijms21041300>
- Haughey, M. (2000). Forms and fate of Cu in a source drinking water reservoir following CuSO₄ treatment. *Water Research*, 34, 3440-3452. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00054-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00054-3)
- Hazeem, L.J., Kuku, G., Dewailly, E., Slomianny, C., Barras, A., Hamdi, A., Boukherroub, R., Culha, M. i Bououdina, M. (2019). Toxicity effect of silver nanoparticles on photosynthetic pigment content, growth, ros production and ultrastructural changes of microalgae *Chlorella vulgaris*. *Nanomaterials*, 9, 1-13. <https://doi.org/10.3390/nano9070914>
- Hazeem, L.J., Yesilay, G., Bououdina, M., Perna, S., Cetin, D., Suludere, Z., Barras, A. i Boukherroub, R. (2020). Investigation of the toxic effects of different polystyrene micro- and nanoplastics on microalgae *Chlorella vulgaris* by analysis of cell viability, pigment content, oxidative stress and ultrastructural changes. *Marine Pollution Bulletin*, 156, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111278>
- He, D., Dorantes-Aranda, J.J. i Waite, T.D. (2012). Silver nanoparticle-algae interactions: oxidative dissolution, reactive oxygen species generation and synergistic toxic effects. *Environmental Science and Technology*, 46, 8731-8738. <https://doi.org/10.1021/es300588a>
- He, S., Crans, V.L. i Jonikas, M.C. (2023). The pyrenoid: the eukaryotic CO₂-concentrating organelle. *The Plant Cell*, 35, 3236-3259. <https://doi.org/10.1093/plcell/koad157>
- Heath, R.L. i Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Henson, T.E., Navratilova, J., Tennant, A.H., Bradham, K.D., Rogers, K.R. i Hughes, M.F. (2019). *In vitro* intestinal toxicity of copper oxide nanoparticles in rat and human cell models. *Nanotoxicology*, 13, 795-811. <https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1578428>
- Herzog, G., Abul Kashem, M.M., Benecke, G., Buffet, A., Gehrke, R., Perlich, J., Schwartzkopf, M., Körstgens, V., Meier, R., Niedermeier, M.A., Rawolle, M., Ruderer,

- M.A., Müller-Buschbaum, P., Wurth, W. i Roth, S. V. (2012). Influence of nanoparticle surface functionalization on the thermal stability of colloidal polystyrene films. *Langmuir*, 28, 8230-8237. <https://doi.org/10.1021/la3007348>
- Hirano, S., Nitta, H., Moriguchi, Y., Kobayashi, S., Kondo, Y., Tanabe, K., Kobayashi, T., Wakamatsu, S., Morita, M. i Yamazaki, S. (2003). Nanoparticles in emissions and atmospheric environment: now and future. *Journal of Nanoparticle Research*, 5, 311-321. <https://doi.org/10.1023/A:1025519913811>
- Hofmann, K., Bucher, P. i Kajava, A. V. (1998). A model of Cdc25 phosphatase catalytic domain and Cdk-interaction surface based on the presence of a rhodanese homology domain. *Journal of Molecular Biology*, 282, 195-208. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1998>
- Hou, J., Yang, Y., Wang, P., Wang, C., Miao, L., Wang, X., Lv, B., You, G. i Liu, Z. (2017). Effects of CeO₂, CuO, and ZnO nanoparticles on physiological features of *Microcystis aeruginosa* and the production and composition of extracellular polymeric substances. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 226-235. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7387-5>
- Hu, F., Ye, Z., Dong, K., Zhang, W., Fang, D. i Cao, J. (2023). Divergent structures and functions of the Cupin proteins in plants. *International Journal of Biological Macromolecules*, 242, 1-25. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124791>
- Huang, W., Zhao, T., Zhu, X., Ni, Z., Guo, X., Tan, L. i Wang, J. (2021). The effects and mechanisms of polystyrene and polymethyl methacrylate with different sizes and concentrations on *Gymnodinium aeruginosum*. *Environmental Pollution*, 287, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117626>
- Huang, Y., Gao, M., Wang, W., Liu, Z., Qian, W., Chen, C.C., Zhu, X. i Cai, Z. (2022). Effects of manufactured nanomaterials on algae: implications and applications. *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, 16, 122-135. <https://doi.org/10.1007/s11783-022-1554-3>
- Hund-Rinke, K., Sinram, T., Schlich, K., Nickel, C., Dickehut, H.P., Schmidt, M. i Kühnel, D. (2020). Attachment efficiency of nanomaterials to algae as an important criterion for ecotoxicity and grouping. *Nanomaterials*, 10, 1-18. <https://doi.org/10.3390/nano10061021>

- Hurkman, W.J. i Tanaka, C.K. (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology*, *81*, 802-806. <https://doi.org/10.1104/pp.81.3.802>
- Ibrahim, A.S., Ali, G.A.M., Hassanein, A., Attia, A.M. i Marzouk, E.R. (2022). Toxicity and uptake of CuO nanoparticles: evaluation of an emerging nanofertilizer on wheat (*Triticum aestivum* L.) plant. *Sustainability*, *14*, 1-20. <https://doi.org/10.3390/su14094914>
- Ighalo, J.O., Sagboye, P.A., Umenweke, G., Ajala, O.J., Omoarukhe, F.O., Adeyanju, C.A., Ogunniyi, S. i Adeniyi, A.G. (2021). CuO nanoparticles (CuONPs) for water treatment: a review of recent advances. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, *15*, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100443>
- Ighodaro, O.M. i Akinloye, O.A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, *54*, 287-293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Ingrisano, R., Tosato, E., Trost, P., Gurrieri, L., Sparla, F. (2023). Proline, cysteine and branched-chain amino acids in abiotic stress response of land plants and microalgae. *Plants*, *12*, 1-15. <https://doi.org/10.3390/plants12193410>
- Ismail, M.M.S., Piercey-Normore, M.D. i Rampitsch, C. (2024). Biochemical and proteomic response of the freshwater green alga *Pseudochlorella pringsheimii* to iron and salinity stressors. *BMC Plant Biology*, *24*, 1-18. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04688-9>
- Ivask, A., Juganson, K., Bondarenko, O., Mortimer, M., Aruoja, V., Kasemets, K., Blinova, I., Heinlaan, M., Slaveykova, V. i Kahru, A. (2014). Mechanisms of toxic action of Ag, ZnO and CuO nanoparticles to selected ecotoxicological test organisms and mammalian cells *in vitro*: a comparative review. *Nanotoxicology*, *8*, 57-71. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.855831>
- Jain, M., Aggarwal, S., Nagar, P., Tiwari, R. i Mustafiz, A. (2020). A D-lactate dehydrogenase from rice is involved in conferring tolerance to multiple abiotic stresses by maintaining cellular homeostasis. *Scientific Reports*, *10*, 1-17. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69742-0>
- Jajic, I., Sarna, T. i Strzalka, K. (2015). Senescence, stress, and reactive oxygen species. *Plants*, *4*, 393-411. <https://doi.org/10.3390/plants4030393>

- Janani, B., Al Farraj, D.A., Raju, L.L., Elshikh, M.S., Alkubaisi, N.A., Thomas, A.M., Das, A. i Sudheer Khan, S. (2020). Cytotoxicological evaluation of copper oxide nanoparticles on green algae, bacteria and crustacean systems. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 18, 1465-1472. <https://doi.org/10.1007/s40201-020-00561-1>
- Janova, A., Kolackova, M., Bytesnikova, Z., Capal, P., Chaloupsky, P., Svec, P., Ridoskova, A., Cernei, N., Klejdus, B., Richtera, L., Adam, V. i Huska, D. (2021). New insights into mechanisms of copper nanoparticle toxicity in freshwater algae *Chlamydomonas reinhardtii*: effects on the pathways of secondary metabolites. *Algal Research*, 60, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102476>
- Jarantow, S.W., Pisors, E.D. i Chiu, M.L. (2023). Introduction to the use of linear and nonlinear regression analysis in quantitative biological assays. *Current Protocols*, 3, 1-56. <https://doi.org/10.1002/cpz1.801>
- Jeffrey, S.W. i Humphrey, G.F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 167, 191-194. [https://doi.org/10.1016/s0015-3796\(17\)30778-3](https://doi.org/10.1016/s0015-3796(17)30778-3)
- Ji, J., Long, Z. i Lin, D. (2011). Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella* sp. *Chemical Engineering Journal*, 170, 525-530. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.11.026>
- Jiang, J. i Thayumanavan, S. (2005). Synthesis and characterization of amine-functionalized polystyrene nanoparticles. *Macromolecules*, 38, 5886-5891. <https://doi.org/10.1021/ma0507286>
- Jiang, X., Musyanovych, A., Röcker, C., Landfester, K., Mailänder, V. i Nienhaus, G.U. (2011). Specific effects of surface carboxyl groups on anionic polystyrene particles in their interactions with mesenchymal stem cells. *Nanoscale*, 3, 2028-2037. <https://doi.org/10.1039/c0nr00944j>
- Jiang, H.S., Yin, L.Y., Ren, N.N., Zhao, S.T., Li, Z., Zhi, Y., Shao, H., Li, W. i Gontero, B. (2017). Silver nanoparticles induced reactive oxygen species via photosynthetic energy transport imbalance in an aquatic plant. *Nanotoxicology*, 11, 157-167. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1278802>

- Jin, Y., Lei, Z., Taynton, P., Huang, S. i Zhang, W. (2019). Malleable and recyclable thermosets: the next generation of plastics. *Matter*, 1, 1456-1493. <https://doi.org/10.1016/j.matt.2019.09.004>
- Johnson, M.P. (2016). Photosynthesis. *Essays in Biochemistry*, 60, 255-273. <https://doi.org/10.1042/EBC20160016>
- José Rodrigues Cruz, F., Leone da Cruz Ferreira, R., Silva Conceição, S., Ugulino Lima, E., Ferreira de Oliveira Neto, C., Rodrigues Galvão, J., da Cunha Lopes, S. i de Jesus Matos Viegas, I. (2022). Copper toxicity in plants: nutritional, physiological, and biochemical aspects, u: *Advances in Plant Defense Mechanisms*, IntechOpen, UK, 1-22. <https://doi.org/10.5772/intechopen.98128>
- Jouhet, J., Shimojima, M., Awai, K. i Maréchal, E. (2022). Editorial: lipids in cyanobacteria, algae, and plants—from biology to biotechnology. *Frontiers in Plant Science*, 12, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.834384>
- Juan, C.A., Pérez de la Lastra, J.M., Plou, F.J. i Pérez-Lebeña, E. (2021). The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 1-23. <https://doi.org/10.3390/ijms22094642>
- Junaid, M. i Wang, J. (2021). Interaction of nanoplastics with extracellular polymeric substances (EPS) in the aquatic environment: a special reference to eco-corona formation and associated impacts. *Water Research*, 201, 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117319>
- Kalita, J., Pradhan, A.K., Shandilya, Z.M. i Tanti, B. (2018). Arsenic stress responses and tolerance in rice: physiological, cellular and molecular approaches. *Rice Science*, 25, 235-249. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2018.06.007>
- Kalman, J., Paul, K.B., Khan, F.R., Stone, V. i Fernandes, T.F. (2015). Characterisation of bioaccumulation dynamics of three differently coated silver nanoparticles and aqueous silver in a simple freshwater food chain. *Environmental Chemistry*, 12, 662-678. <https://doi.org/10.1071/en15035>
- Kalousová, M., Zima, T., Tesař, V. i Lachmanová, J. (2002). Advanced glycation end products and advanced oxidation protein products in hemodialyzed patients. *Blood Purification*, 20, 531-536. <https://doi.org/10.1159/000066956>

- Kanavi, P.S., Meti, S., Fattepur, R.H. i Patil, V.B. (2022). Influence of copper oxide nanoparticles on ac conductivity of polyvinyl alcohol-polyaniline polymer blends. *Journal of Electronic Materials*, *51*, 5723-5734. <https://doi.org/10.1007/s11664-022-09798-y>
- Kaur, M., Saini, K.C., Ojah, H., Sahoo, R., Gupta, K., Kumar, A. i Bast, F. (2022). Abiotic stress in algae: response, signaling and transgenic approaches. *Journal of Applied Phycology*, *34*, 1843-1869. <https://doi.org/10.1007/s10811-022-02746-7>
- Ke, M., Qu, Q., Peijnenburg, W.J.G.M., Li, X., Zhang, M., Zhang, Z., Lu, T., Pan, X. i Qian, H. (2018). Phytotoxic effects of silver nanoparticles and silver ions to *Arabidopsis thaliana* as revealed by analysis of molecular responses and of metabolic pathways. *Science of The Total Environment*, *644*, 1070-1079. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.061>
- Khalaji, A.D., Pazhand, Z., Kiani, K., Macheh, P., Jarosova, M. i Mazandarani, R. (2020). CuO nanoparticles: preparation, characterization, optical properties, and antibacterial activities. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, *31*, 11949-11954. <https://doi.org/10.1007/s10854-020-03749-1>
- Khan, M., Samrana, S., Zhang, Y., Malik, Z., Khan, M.D. i Zhu, S. (2020). Reduced glutathione protects subcellular compartments from pb-induced ros injury in leaves and roots of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Frontiers in Plant Science*, *11*, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00412>
- Khan, M., Ali, S., Al Azzawi, T.N.I., Saqib, S., Ullah, F., Ayaz, A. i Zaman, W. (2023). The key roles of ROS and RNS as a signaling molecule in plant-microbe interactions. *Antioxidants*, *12*, 2682-2694. <https://doi.org/10.3390/antiox12020268>
- Khanna, P., Ong, C., Bay, B.H. i Baeg, G.H. (2015). Nanotoxicity: an interplay of oxidative stress, inflammation and cell death. *Nanomaterials*, *5*, 1163-1180. <https://doi.org/10.3390/nano5031163>
- Khosnamvand, M., Hanachi, P., Ashtiani, S. i Walker, T.R. (2021). Toxic effects of polystyrene nanoplastics on microalgae *Chlorella vulgaris*: changes in biomass, photosynthetic pigments and morphology. *Chemosphere*, *280*, 1307-1319. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130725>
- Kihara, S., Ghosh, S., McDougall, D.R., Whitten, A.E., Mata, J.P., Köper, I. i McGillivray, D.J. (2020). Structure of soft and hard protein corona around polystyrene nanoplastics-particle size and protein types. *Biointerphases*, *15*, 4565-4579. <https://doi.org/10.1116/6.0000404>

- Kihara, S., Ashenden, A., Kaur, M., Glasson, J., Ghosh, S., van der Heijden, N., Brooks, A.E.S., Mata, J.P., Holt, S., Domigan, L.J., Köper, I. i McGillivray, D.J. (2021). Cellular interactions with polystyrene nanoplastics-the role of particle size and protein corona. *Biointerphases*, 16, 1245-1257. <https://doi.org/10.1116/6.0001124>
- Kik, K., Bukowska, B. i Sicińska, P. (2020). Polystyrene nanoparticles: sources, occurrence in the environment, distribution in tissues, accumulation and toxicity to various organisms. *Environmental Pollution*, 262, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114297>
- Kilpin, K.J. i Dyson, P.J. (2013). Enzyme inhibition by metal complexes: concepts, strategies and applications. *Chemical Science*, 4, 1410-1420. <https://doi.org/10.1039/c3sc22349c>
- Kim, B.-E., Nevitt, T. i Thiele, D.J. (2008). Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nature Chemical Biology*, 4, 176-185. <https://doi.org/10.1038/nchembio.72>
- Kim, H. i Xue, X. (2020). Detection of total reactive oxygen species in adherent cells by 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate staining. *Journal of Visualized Experiments*, 160, 1-5. <https://doi.org/10.3791/60682>
- Kim, H.-D., Choi, H., Abekura, F., Park, J.-Y., Yang, W.-S., Yang, S.-H. i Kim, C.-H. (2023). Naturally-occurring tyrosinase inhibitors classified by enzyme kinetics and copper chelation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 226-239. <https://doi.org/10.3390/ijms24098226>
- Kleiven, M., Macken, A. i Oughton, D.H. (2019). Growth inhibition in *Raphidocelis subcapitata*-evidence of nanospecific toxicity of silver nanoparticles. *Chemosphere*, 221, 785-792. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.055>
- Kofoed, M. i Miller, S. (2023). *Introductory Chemistry*. Utah State University, SAD.
- Kokkinopoulou, M., Simon, J., Landfester, K., Mailänder, V. i Lieberwirth, I. (2017). Visualization of the protein corona: towards a biomolecular understanding of nanoparticle-cell-interactions. *Nanoscale*, 9, 8858-8870. <https://doi.org/10.1039/c7nr02977b>
- Komazec, B., Cvjetko, P., Balen, B., Letofsky-Papst, I., Lyons, D.M. i Peharec Štefanić, P. (2023). The occurrence of oxidative stress induced by silver nanoparticles in *Chlorella vulgaris* depends on the surface-stabilizing agent. *Nanomaterials*, 13, 1-22. <https://doi.org/10.3390/nano13131967>

- Kora, A.J., Manjusha, R. i Arunachalam, J. (2009). Superior bactericidal activity of SDS capped silver nanoparticles: synthesis and characterization. *Materials Science and Engineering: C*, 29, 2104-2109. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.04.010>
- Košpić, K., Biba, R., Peharec Štefanić, P., Cvjetko, P., Tkalec, M. i Balen, B. (2022). Silver nanoparticle effects on antioxidant response in tobacco are modulated by surface coating. *Plants*, 11, 1-25. <https://doi.org/10.3390/plants11182402>
- Kozeko, L. (2021). Different roles of inducible and constitutive HSP70 and HSP90 in tolerance of *Arabidopsis thaliana* to high temperature and water deficit. *Acta Physiologiae Plantarum*, 43, 1-13. <https://doi.org/10.1007/s11738-021-03229-x>
- Krishnan, S.K., Singh, E., Singh, P., Meyyappan, M. i Nalwa, H.S. (2019). A review on graphene-based nanocomposites for electrochemical and fluorescent biosensors. *RSC Advances*, 9, 8778-8881. <https://doi.org/10.1039/C8RA09577A>
- Kristiansen, E., Pedersen, S.A. i Zachariassen, K.E. (2008). Salt-induced enhancement of antifreeze protein activity: a salting-out effect. *Cryobiology*, 57, 122-129. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.07.001>
- Kristoffersen, A.S., Hamre, B., Frette, Ø. i Erga, S.R. (2016). Chlorophyll *a* fluorescence lifetime reveals reversible UV-induced photosynthetic activity in the green algae *Tetraselmis*. *European Biophysics Journal*, 45, 259-268. <https://doi.org/10.1007/s00249-015-1092-z>
- Kumar, R.R., Samykano, M., Pandey, A.K., Said, Z., Kadirgama, K. i Tyagi, V. V. (2022). Experimental investigations on thermal properties of copper (II) oxide nanoparticles enhanced inorganic phase change materials for solar thermal energy storage applications, u: *Advances in science and engineering technology international conferences*, IEEE, SAD, 1-6. <https://doi.org/10.1109/aset53988.2022.9734898>
- Kurbanova, R., Okudan, A., Mirzaoglu, R., Kurbanov, S., Karatas, I., Ersöz, M., Özcan, E., Ahmedova, G. i Pamuk, V. (1998). Effects of the functional groups of polystyrene on its adhesion improvement and corrosion resistance. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 12, 947-955. <https://doi.org/10.1163/156856198x00560>
- Kwon, Y., Soon, A., Han, H. i Lee, H. (2015). Shape effects of cuprous oxide particles on stability in water and photocatalytic water splitting. *Journal of Materials Chemistry A*, 3, 156-162. <https://doi.org/10.1039/c4ta04863f>

- Lal, A.M. (2018). Respiration, u: *Plant Physiology, Development and Metabolism*, Springer Singapore, Singapur, 253-314. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1_7
- Laporte, D., Rodríguez, F., González, A., Zúñiga, A., Castro-Nallar, E., Sáez, C.A. i Moenne, A. (2020). Copper-induced concomitant increases in photosynthesis, respiration, and C, N and S assimilation revealed by transcriptomic analyses in *Ulva compressa* (Chlorophyta). *BMC Plant Biology*, 20, 256-269. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2229-5>
- Larkum, A.W. (2016). Photosynthesis and light harvesting in algae, u: *The Physiology of Microalgae*, Springer International Publishing, SAD, 67-87. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_3
- Lavagna, E., Bochicchio, D., De Marco, A.L., Güven, Z.P., Stellacci, F. i Rossi, G. (2022). Ion-bridges and lipids drive aggregation of same-charge nanoparticles on lipid membranes. *Nanoscale*, 14, 6912-6921. <https://doi.org/10.1039/d1nr08543c>
- Le Juge, C., Grassl, B., Allan, I.J. i Gigault, J. (2023). Identification of polystyrene nanoplastics from natural organic matter in complex environmental matrices by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 415, 2999-3006. <https://doi.org/10.1007/s00216-023-04609-7>
- Lee, S., Jang, J.W. i Ryu, Y.B. (2022). Surface oxidation of Cu₂O nanoparticles by adsorbed ammonia. *Nanomaterials*, 12, 242-255. <https://doi.org/10.3390/nano12234242>
- Lekamge, S., Miranda, A.F., Trestrail, C., Pham, B., Ball, A.S., Shukla, R. i Nugegoda, D. (2019). The toxicity of nonaged and aged coated silver nanoparticles to freshwater alga *Raphidocelis subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38, 2371-2382. <https://doi.org/10.1002/etc.4549>
- Lekamge, S., Miranda, A.F., Abraham, A., Ball, A.S., Shukla, R. i Nugegoda, D. (2020). The toxicity of coated silver nanoparticles to the alga *Raphidocelis subcapitata*. *SN Applied Sciences*, 2, 596-614. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2430-z>
- Lesniewska, N., Duval, J.F.L., Caillet, C., Razafitianamaharavo, A., Pinheiro, J.P., Bihannic, I., Gley, R., Le Cordier, H., Vyas, V., Pagnout, C., Sohm, B. i Beaussart, A. (2024). Physicochemical surface properties of *Chlorella vulgaris* : a multiscale assessment, from electrokinetic and proton uptake descriptors to intermolecular adhesion forces. *Nanoscale*, 16, 5149-5163. <https://doi.org/10.1039/D3NR04740G>

- Levard, C., Hotze, E.M., Lowry, G. V. i Brown, G.E. (2012). Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environmental Science and Technology*, 46, 6900-6914. <https://doi.org/10.1021/es2037405>
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.P. i Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 233, 346-357. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9)
- Li, W., Sahu, D. i Tsen, F. (2012). Secreted heat shock protein-90 (Hsp90) in wound healing and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823, 730-741. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.09.009>
- Li, X., Schirmer, K., Bernard, L., Sigg, L., Pillai, S. i Behra, R. (2015). Silver nanoparticle toxicity and association with the alga *Euglena gracilis*. *Environmental Science: Nano*, 2, 594-602. <https://doi.org/10.1039/C5EN00093A>
- Li, G. i Campbell, D.A. (2017). Interactive effects of nitrogen and light on growth rates and Rubisco content of small and large centric diatoms. *Photosynthesis Research*, 131, 93-103. <https://doi.org/10.1007/s11120-016-0301-7>
- Li, M., Liu, W. i Slaveykova, V.I. (2020)(a). Effects of mixtures of engineered nanoparticles and metallic pollutants on aquatic organisms. *Environments*, 7, 27-41. <https://doi.org/10.3390/environments7040027>
- Li, S., Wang, P., Zhang, C., Zhou, X., Yin, Z., Hu, T., Hu, D., Liu, C. i Zhu, L. (2020)(b). Influence of polystyrene microplastics on the growth, photosynthetic efficiency and aggregation of freshwater microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Science of The Total Environment*, 714, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136767>
- Li, L., Bi, Z., Hu, Y., Sun, L., Song, Y., Chen, S., Mo, F., Yang, J., Wei, Y. i Wei, X. (2021)(a). Silver nanoparticles and silver ions cause inflammatory response through induction of cell necrosis and the release of mitochondria *in vivo* and *in vitro*. *Cell Biology and Toxicology*, 37, 177-191. <https://doi.org/10.1007/s10565-020-09526-4>
- Li, Y., Xin, M., Xie, D., Fan, S., Ma, J., Liu, K. i Yu, F. (2021)(b). Variation in extracellular polymeric substances from enterobacter sp. and their Pb²⁺ adsorption behaviors. *ACS Omega*, 6, 9617-9628. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00185>

- Li, B.B., Zhang, S.B., Lv, Y.Y., Wei, S. i Hu, Y.S. (2022)(a). Reactive oxygen species-induced protein carbonylation promotes deterioration of physiological activity of wheat seeds. *PLOS ONE*, 17, 2561-2574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263553>
- Li, X., Ji, S., He, E., Peijnenburg, W.J.G.M., Cao, X., Zhao, L., Xu, X., Zhang, P. i Qiu, H. (2022)(b). UV/ozone induced physicochemical transformations of polystyrene nanoparticles and their aggregation tendency and kinetics with natural organic matter in aqueous systems. *Journal of Hazardous Materials*, 433, 4589-4602. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128790>
- Li, R., Wang, B., Nan, F., Lv, J., Liu, X., Liu, Q., Feng, J. i Xie, S. (2023). Effects of polystyrene nanoplastics on the physiological and biochemical characteristics of microalga *Scenedesmus quadricauda*. *Environmental Pollution*, 319, 1209-1220. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120987>
- Lian, J., Liu, W., Meng, L., Wu, J., Chao, L., Zeb, A. i Sun, Y. (2021). Foliar-applied polystyrene nanoplastics (PSNPs) reduce the growth and nutritional quality of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Environmental Pollution*, 280, 209-224. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116978>
- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S.K. i Becker, D.F. (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants and Redox Signaling*, 19, 998-1011. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5074>
- Lieberwirth, I., Kokkinopoulou, M., Han, S., Simon, J., Landfester, K. i Mailänder, V. (2018). The role of the protein corona in the uptake process of nanoparticles. *Microscopy and Microanalysis*, 24, 1404-1405. <https://doi.org/10.1017/S143192761800750X>
- Lindgren, A.L. 2014. The effects of silver nitrate and silver nanoparticles on *Chlamydomonas reinhardtii*: a proteomic approach. Diplomski rad, Sveučilište u Gothenburgu, Gothenburg, Švedska.
- Liu, J., Legros, S., Ma, G., Veinot, J.G.C., von der Kammer, F. i Hofmann, T. (2012). Influence of surface functionalization and particle size on the aggregation kinetics of engineered nanoparticles. *Chemosphere*, 87, 918-924. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.01.045>
- Liu, Z., Wang, C., Hou, J., Wang, P., Miao, L., Lv, B., Yang, Y., You, G., Xu, Y., Zhang, M. i Ci, H. (2018). Aggregation, sedimentation, and dissolution of CuO and ZnO nanoparticles

- in five waters. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 31240-31249. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3123-7>
- Liu, W., Majumdar, S., Li, W., Keller, A.A. i Slaveykova, V.I. (2020)(a). Metabolomics for early detection of stress in freshwater alga *Poterioochromonas malhamensis* exposed to silver nanoparticles. *Scientific Reports*, 10, 205-214. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77521-0>
- Liu, W., Worms, I. i Slaveykova, V.I. (2020)(b). Interaction of silver nanoparticles with antioxidant enzymes. *Environmental Science: Nano*, 7, 1507-1517. <https://doi.org/10.1039/C9EN01284B>
- Liu, F., Gao, Z., Chu, W. i Wang, S. (2022). Polystyrene nanoplastics alleviate the toxicity of CuO nanoparticles to the marine algae *Platymonas helgolandica* var. *tsingtaoensis*. *Frontiers in Marine Science*, 9, 549-563. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1089282>
- Lokstein, H., Renger, G. i Götze, J. (2021). Photosynthetic light-harvesting (antenna) complexes-structures and functions. *Molecules*, 26, 3359-3378. <https://doi.org/10.3390/molecules26113378>
- Loos, C., Syrovets, T., Musyanovych, A., Mailänder, V., Landfester, K., Nienhaus, G.U. i Simmet, T. (2014). Functionalized polystyrene nanoparticles as a platform for studying bio-nano interactions. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 5, 2403-2412. <https://doi.org/10.3762/bjnano.5.250>
- Lopes, I.S., de O. Silva, F.R. i Courrol, L.C. (2023). Aminolevulinic acid coated-silver, copper, and silver-copper nanoparticles: synthesis, characterization, and application in seed nanopriming. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42, 5842-5854. <https://doi.org/10.1007/s00344-023-10969-2>
- Lopez, F.B. i Barclay, G.F. (2017). Plant anatomy and physiology, u: *Pharmacognosy*, Academic Press, SAD, 45-60. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802104-0.00004-4>
- Loseva, N.L., Alyabyev, A.Ju., Gordon, L.Kh., Andreyeva, I.N., Kolesnikov, O.P., Ponomareva, A.A. i Kemp, R.B. (2007). The effect of AgNO₃ on the bioenergetic processes and the ultrastructure of *Chlorella* and *Dunaliella* cells exposed to different saline conditions. *Thermochimica Acta*, 458, 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2007.02.015>

- Ma, W., Liu, L.N., Wang, Q., Duanmu, D. i Qiu, B.S. (2023). Editorial: algal photosynthesis. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 549-561. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1112301>
- Mahawar, L., Živčák, M., Barboricova, M., Kovár, M., Filaček, A., Ferencova, J., Vysoká, D.M. i Brestič, M. (2024). Effect of copper oxide and zinc oxide nanoparticles on photosynthesis and physiology of *Raphanus sativus* L. under salinity stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, *206*, 1082-1096. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108281>
- Makkad, S.K. (2020). Amine decorated polystyrene nanobeads incorporating π -conjugated OPV chromophore for picric acid sensing in water. *RSC Advances*, *10*, 6497-6502. <https://doi.org/10.1039/C9RA09852F>
- Makvandi, P., Wang, C., Zare, E.N., Borzacchiello, A., Niu, L. i Tay, F.R. (2020). Metal-based nanomaterials in biomedical applications: antimicrobial activity and cytotoxicity aspects. *Advanced Functional Materials*, *30*, 1-40. <https://doi.org/10.1002/adfm.201910021>
- Maliki, M., Ifijen, I.H., Ikhuoria, E.U., Jonathan, E.M., Onaiwu, G.E., Archibong, U.D. i Ighodaro, A. (2022). Copper nanoparticles and their oxides: optical, anticancer and antibacterial properties. *International Nano Letters*, *12*, 379-398. <https://doi.org/10.1007/s40089-022-00380-2>
- Mallik, M., Monia, S., Gupta, M., Ghosh, A., Toppo, M.P. i Roy, H. (2020). Synthesis and characterization of Cu₂O nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds*, *829*, 1546-1558. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2020.154623>
- Manke, A., Wang, L. i Rojanasakul, Y. (2013). Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed Research International*, *2013*, 1-15. <https://doi.org/10.1155/2013/942916>
- Mann, M. i Jensen, O.N. (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology*, *21*, 255-261. <https://doi.org/10.1038/nbt0303-255>
- Mansoor, S., Ali Wani, O., Lone, J.K., Manhas, S., Kour, N., Alam, P., Ahmad, A. i Ahmad, P. (2022). Reactive oxygen species in plants: from source to sink. *Antioxidants*, *11*, 225-237. <https://doi.org/10.3390/antiox11020225>
- Marnett, L.J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, *21*, 361-370. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.361>

- Mas-Bargues, C., Escrivá, C., Dromant, M., Borrás, C. i Viña, J. (2021). Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 709, 5089-5104. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108941>
- Mátai, A. i Hideg, É. (2017). A comparison of colorimetric assays detecting hydrogen peroxide in leaf extracts. *Analytical Methods*, 9, 2357-2360. <https://doi.org/10.1039/C7AY00126F>
- Maté, M.J., Zamocky, M., Nykyri, L.M., Herzog, C., Alzari, P.M., Betzel, C., Koller, F. i Fita, I. (1999). Structure of catalase-A from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology*, 286, 135-149. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2453>
- Mathur, P., Chakraborty, R., Aftab, T. i Roy, S. (2023). Engineered nanoparticles in plant growth: phytotoxicity concerns and the strategies for their attenuation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 199, 1078-1094. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107721>
- Matras, E., Gorczyca, A., Pocięcha, E., Przemieniecki, S.W. i Oćwieja, M. (2022). Phytotoxicity of silver nanoparticles with different surface properties on monocots and dicots model plants. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 22, 1647-1664. <https://doi.org/10.1007/s42729-022-00760-9>
- Mattsson, K., Hansson, L.-A. i Cedervall, T. (2015). Nano-plastics in the aquatic environment. *Environmental Science: Processes and Impacts*, 17, 1712-1721. <https://doi.org/10.1039/C5EM00227C>
- Matysiak, M., Kapka-Skrzypczak, L., Brzóska, K., Gutleb, A.C. i Kruszewski, M. (2016). Proteomic approach to nanotoxicity. *Journal of Proteomics*, 137, 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.10.025>
- Maxwell, K. i Johnson, G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51, 659-668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
- McKay, R.M.L., Gibbs, S.P. i Vaughn, K.C. (1991). RuBisCo activase is present in the pyrenoid of green algae. *Protoplasma*, 162, 38-45. <https://doi.org/10.1007/BF01403899>
- McKeel, E., Kim, H.-I., Jeon, S.-J., Giraldo, J.P. i Klaper, R. (2024). The effect of nanoparticle surface charge on freshwater algae growth, reproduction, and lipid production. *Environmental Science: Nano*, 11, 657-666. <https://doi.org/10.1039/D3EN00353A>

- Mekhamer, W.K. (2010). The colloidal stability of raw bentonite deformed mechanically by ultrasound. *Journal of Saudi Chemical Society*, 14, 301-306. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.04.013>
- Miao, A.-J., Schwehr, K.A., Xu, C., Zhang, S.-J., Luo, Z., Quigg, A. i Santschi, P.H. (2009). The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environmental Pollution*, 157, 3034-3041. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.047>
- Miao, L., Wang, C., Hou, J., Wang, P., Ao, Y., Li, Y., Lv, B., Yang, Y., You, G. i Xu, Y. (2015). Enhanced stability and dissolution of CuO nanoparticles by extracellular polymeric substances in aqueous environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 17, 4569-4576. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-3208-x>
- Miao, L., Wang, C., Hou, J., Wang, P., Ao, Y., Li, Y., Yao, Y., Lv, B., Yang, Y., You, G., Xu, Y. i Gu, Q. (2017). Response of wastewater biofilm to CuO nanoparticle exposure in terms of extracellular polymeric substances and microbial community structure. *Science of The Total Environment*, 579, 588-597. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.056>
- Michaud, T., Nobre, S.S., Baffie, T., Pelissier, N. i Simonato, J.-P. (2019). High-temperature stability of copper nanoparticles through Cu-Ag nanostructures. *Journal of Nanoparticle Research*, 21, 116-125. <https://doi.org/10.1007/s11051-019-4567-5>
- Mikami, K., Kido, Y., Akaishi, Y., Quitain, A. i Kida, T. (2019). Synthesis of Cu₂O/CuO Nanocrystals and their application to H₂S sensing. *Sensors*, 19, 211-220. <https://doi.org/10.3390/s19010211>
- Mikami, K., Takio, S., Hiwatashi, Y. i Kumar, M. (2021). Editorial: environmental stress-promoting responses in algae. *Frontiers in Marine Science*, 8, 1-3. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.797613>
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftcy-Yilmaz, S. i Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment*, 33, 453-467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x>
- Mir, A.R., Pichtel, J. i Hayat, S. (2021). Copper: uptake, toxicity and tolerance in plants and management of Cu-contaminated soil. *BioMetals*, 34, 737-759. <https://doi.org/10.1007/s10534-021-00306-z>

- Mišić Radić, T., Vukosav, P., Komazec, B., Formosa-Dague, C., Domazet Jurašin, D., Peharec Štefanić, P., Čačković, A., Juračić, K. i Ivošević DeNardis, N. (2022). Nanoplastic-induced nanostructural, nanomechanical, and antioxidant response of marine diatom *Cylindrotheca closterium*. *Water (Switzerland)*, *14*, 1-22. <https://doi.org/10.3390/w14142163>
- Mitra, S., Mobarak, S.H., Karmakar, A. i Barik, A. (2019). Activities of antioxidant enzymes in three species of Ludwigia weeds on feeding by *Altica cyanea*. *Journal of King Saud University-Science*, *31*, 1522-1527. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.04.008>
- Monjaraz-Rodríguez, A., Rodríguez-Bautista, M., Garza, J., Zubillaga, R.A. i Vargas, R. (2018). Coordination numbers in hydrated Cu(II) ions. *Journal of Molecular Modeling*, *24*, 187-201. <https://doi.org/10.1007/s00894-018-3725-5>
- Moon, J.-K. i Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 1655-1666. <https://doi.org/10.1021/jf803537k>
- Morales, M., Aflalo, C. i Bernard, O. (2021). Microalgal lipids: a review of lipids potential and quantification for 95 phytoplankton species. *Biomass and Bioenergy*, *150*, 1061-1073. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106108>
- Mukherjee, A., Sarkar, D. i Sasmal, S. (2021). A Review of green synthesis of metal nanoparticles using algae. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 5264-5287. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.693899>
- Mustafa, G. i Komatsu, S. (2022). Proteomics of plant-nanoparticle interaction mechanism, u: *Plant and Nanoparticles*, Springer Nature Singapore, Singapur, 67-84. https://doi.org/10.1007/978-981-19-2503-0_3
- Mydy, L.S., Chigumba, D.N. i Kersten, R.D. (2021). Plant copper metalloenzymes as prospects for new metabolism involving aromatic compounds. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 1545-1552. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.692108>
- Nair, P.M.G. i Chung, I.M. (2014). Assessment of silver nanoparticle-induced physiological and molecular changes in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Science and Pollution Research*, *21*, 8858-8869. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2822-y>
- Najar, M.A., Rex, D.A.B., Modi, P.K., Agarwal, N., Dagamajalu, S., Karthikkeyan, G., Vijayakumar, M., Chatterjee, A., Sankar, U. i Prasad, T.S.K. (2021). A complete map of the calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CAMKK2) signaling pathway.

- Journal of Cell Communication and Signaling*, 15, 283-290.
<https://doi.org/10.1007/s12079-020-00592-1>
- Nakano, Y. i Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22, 867-880.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- Nallanthighal, S., Chan, C., Bharali, D.J., Mousa, S.A., Vásquez, E. i Reliene, R. (2017). Particle coatings but not silver ions mediate genotoxicity of ingested silver nanoparticles in a mouse model. *NanoImpact*, 5, 92-100. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.01.003>
- Nam, S.-H., Il Kwak, J. i An, Y.-J. (2018). Quantification of silver nanoparticle toxicity to algae in soil via photosynthetic and flow-cytometric analyses. *Scientific Reports*, 8, 292-308.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-18680-5>
- Nasser, F. i Lynch, I. (2016). Secreted protein eco-corona mediates uptake and impacts of polystyrene nanoparticles on *Daphnia magna*. *Journal of Proteomics*, 137, 45-51.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.09.005>
- Natarajan, L., Soupam, D., Dey, S., Chandrasekaran, N., Kundu, R., Paul, S. i Mukherjee, A. (2022). Toxicity of polystyrene microplastics in freshwater algae *Scenedesmus obliquus*: effects of particle size and surface charge. *Toxicology Reports*, 9, 1953-1961.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.10.013>
- Nazarewicz, R.R., Bikineyeva, A. i Dikalov, S.I. (2013). Rapid and specific measurements of superoxide using fluorescence spectroscopy. *SLAS Discovery*, 18, 498-503.
<https://doi.org/10.1177/1087057112468765>
- Neupane, P., Bhujju, S., Thapa, N. i Bhattarai, H.K. (2019). ATP synthase: structure, function and inhibition. *Biomolecular Concepts*, 10, 1-10. <https://doi.org/10.1515/bmc-2019-0001>
- Ng, N., Cabral-da-Silva, M.C., Maksour, S., Berg, T., Engel, M., Silva, D.M., Do-Ha, D., Lum, J.S., Muñoz, S.S., Suarez-Bosche, N., Stevens, C.H. i Ooi, L. (2020). Identification of repurposable cytoprotective drugs in vanishing white matter disease patient-derived cells. *Translational Medicine Communications*, 5, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s41231-020-00071-0>

- Ng, N.S. i Ooi, L. (2021). A simple microplate assay for reactive oxygen species generation and rapid cellular protein normalization. *Bio-protocol*, *11*, 1-10. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3877>
- Nguyen, M.K., Moon, J.-Y. i Lee, Y.-C. (2020). Microalgal ecotoxicity of nanoparticles: an updated review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *201*, 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110781>
- Nguyen, N.P.U., Dang, N.T., Doan, L. i Nguyen, T.T.H. (2023). Synthesis of silver nanoparticles: from conventional to ‘modern’ methods-a review. *Processes*, *11*, 2617-2634. <https://doi.org/10.3390/pr11092617>
- Nimse, S.B. i Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, *5*, 27986-28006. <https://doi.org/10.1039/c4ra13315c>
- Nolte, T.M., Hartmann, N.B., Kleijn, J.M., Garnæs, J., van de Meent, D., Jan Hendriks, A. i Baun, A. (2017). The toxicity of plastic nanoparticles to green algae as influenced by surface modification, medium hardness and cellular adsorption. *Aquatic Toxicology*, *183*, 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.12.005>
- OECD (2022). Global Plastics Outlook: Policy Scenarios to 2060. *Organisation for Economic Co-Operation and Development*. OECD Publishing, Francuska 1-283. <https://doi.org/10.1787/aa1edf33-en>
- Oesterhelt, C., Vogelbein, S., Shrestha, R.P., Stanke, M. i Weber, A.P.M. (2007). The genome of the thermoacidophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* encodes a small family of secreted class III peroxidases that might be involved in cell wall modification. *Planta*, *227*, 353-362. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0622-z>
- Okunola, A., Kehinde I, O., Oluwaseun, A. i Olufiropo E, A. (2019). Public and environmental health effects of plastic wastes disposal: a review. *Journal of Toxicology and Risk Assessment*, *5*, 2589-2604. <https://doi.org/10.23937/2572-4061.1510021>
- Omran, B.A. (2020). Current trends in algae-mediated synthesis of metal and metal oxide nanoparticles (Phyconanotechnology), u: *Nanobiotechnology: A Multidisciplinary Field of Science*, Springer Nature, SAD, 111-143. https://doi.org/10.1007/978-3-030-46071-6_4

- Oparka, M., Walczak, J., Malinska, D., van Oppen, L.M.P.E., Szczepanowska, J., Koopman, W.J.H. i Wieckowski, M.R. (2016). Quantifying ROS levels using CM-H₂DCFDA and HyPer. *Methods*, *109*, 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.06.008>
- Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F. i Popovic, R. (2012)(a). Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *78*, 80-85. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.11.012>
- Oukarroum, A., Polchtchikov, S., Perreault, F. i Popovic, R. (2012)(b). Temperature influence on silver nanoparticles inhibitory effect on photosystem II photochemistry in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Environmental Science and Pollution Research*, *19*, 1755-1762. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0689-8>
- Pacioni, N.L., Filippenko, V., Presseau, N. i Scaiano, J.C. (2013). Oxidation of copper nanoparticles in water: mechanistic insights revealed by oxygen uptake and spectroscopic methods. *Dalton Transactions*, *42*, 5832-5841. <https://doi.org/10.1039/c3dt32836h>
- Palma, J.M., Gupta, D.K. i Corpas, F.J. (2019). Hydrogen peroxide and nitric oxide generation in plant cells: overview and queries, u: *Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide Signaling in Higher Plants*, Springer International Publishing, UK, 1-16. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11129-8_1
- Pamplona, R., Borrás, C., Jové, M., Pradas, I., Ferrer, I. i Viña, J. (2019). Redox lipidomics to better understand brain aging and function. *Free Radical Biology and Medicine*, *144*, 310-321. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.016>
- Panico, S., Capolla, S., Bozzer, S., Toffoli, G., Dal Bo, M. i Macor, P. (2022). Biological Features of nanoparticles: protein corona formation and interaction with the immune system. *Pharmaceutics*, *14*, 2605-2617. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122605>
- Parkinson, S.J., Tungsirirurp, S., Joshi, C., Richmond, B.L., Gifford, M.L., Sikder, A., Lynch, I., O'Reilly, R.K. i Napier, R.M. (2022). Polymer nanoparticles pass the plant interface. *Nature Communications*, *13*, 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35066-y>
- Parveen, S. i Patidar, S.K. (2022). Revisiting algal lipids and cellular stress-causing strategies for ameliorating the productivity of suitable lipids of microalgae for biofuel applications. *Sustainable Energy and Fuels*, *6*, 3907-3925. <https://doi.org/10.1039/D2SE00574C>

- Pavoković, D., Križnik, B. i Krsnik-Rasol, M. (2012). Evaluation of protein extraction methods for proteomic analysis of non-model recalcitrant plant tissues. *Croatica Chemica Acta*, 85, 177-183. <https://doi.org/10.5562/cca1804>
- Pe, P.P.W., Naing, A.H., Chung, M.Y., Park, K. Il i Kim, C.K. (2019). The role of antifreeze proteins in the regulation of genes involved in the response of *Hosta capitata* to cold. *3 Biotech*, 9, 335-344. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1859-5>
- Peng, C., Zhang, W., Gao, H., Li, Y., Tong, X., Li, K., Zhu, X., Wang, Y. i Chen, Y. (2017). Behavior and potential impacts of metal-based engineered nanoparticles in aquatic environments. *Nanomaterials*, 7, 1-21. <https://doi.org/10.3390/nano7010021>
- Peralta-Videa, J.R., Zhao, L., Lopez-Moreno, M.L., de la Rosa, G., Hong, J. i Gardea-Torresdey, J.L. (2011). Nanomaterials and the environment: a review for the biennium 2008-2010. *Journal of Hazardous Materials*, 186, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.11.020>
- Perde-Schrepler, M., Florea, A., Brie, I., Virag, P., Fischer-Fodor, E., Vâlcău, A., Gurzău, E., Lisencu, C. i Maniu, A. (2019). Size-dependent cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in cochlear cells *in vitro*. *Journal of Nanomaterials*, 2019, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2019/6090259>
- Perini, D.A., Parra-Ortiz, E., Varó, I., Queralt-Martín, M., Malmsten, M. i Alcaraz, A. (2022). Surface-functionalized polystyrene nanoparticles alter the transmembrane potential via ion-selective pores maintaining global bilayer integrity. *Langmuir*, 38, 14837-14849. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c02487>
- Pessoni, L., Veclin, C., El Hadri, H., Cugnet, C., Davranche, M., Pierson-Wickmann, A.-C., Gigault, J., Grassl, B. i Reynaud, S. (2019). Soap- and metal-free polystyrene latex particles as a nanoplastic model. *Environmental Science: Nano*, 6, 2253-2258. <https://doi.org/10.1039/C9EN00384C>
- Pham, T.-L.L. (2019). Effect of silver nanoparticles on tropical freshwater and marine microalgae. *Journal of Chemistry*, 2019, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2019/9658386>
- Pluciennik, K., Sicińska, P., Misztal, W. i Bukowska, B. (2024). Important factors affecting induction of cell death, oxidative stress and DNA Damage by nano- and microplastic particles *in vitro*. *Cells*, 13, 1-21. <https://doi.org/10.3390/cells13090768>

- Poddar, K., Sarkar, D. i Sarkar, A. (2020). Nanoparticles on photosynthesis of plants: effects and role, u: *Nanotechnology in the Life Sciences*, Springer International Publishing, UK, 273-287. https://doi.org/10.1007/978-3-030-39246-8_13
- Pohanka, M. (2020). D-Lactic acid as a metabolite: toxicology, diagnosis, and detection. *BioMed Research International*, 2020, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2020/3419034>
- Prabhu, N., Kanaga, M., Harshini, D. i Sneha, J. (2019). Review on manufacturing of cellular polymers and its applications. *IOSR Journal of Polmer and Textile Engineering*, 6, 9-22. <https://doi.org/10.9790/019X-06050922>
- Pradel, A., Ferreres, S., Veclin, C., El Hadri, H., Gautier, M., Grassl, B. i Gigault, J. (2021). Stabilization of fragmental polystyrene nanoplastic by natural organic matter: insight into mechanisms. *ACS ESiT Water*, 1, 1198-1208. <https://doi.org/10.1021/acsestwater.0c00283>
- Pulit-Prociak, J. i Banach, M. (2016). Silver nanoparticles-a material of the future...? *Open Chemistry*, 14, 76-91. <https://doi.org/10.1515/chem-2016-0005>
- Purdel, N. (2014). Current methods used in the protein carbonyl assay. *Annual Research and Review in Biology*, 4, 2015-2026. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2014/8763>
- Qian, H., Zhu, K., Lu, H., Lavoie, M., Chen, S., Zhou, Z., Deng, Z., Chen, J. i Fu, Z. (2016). Contrasting silver nanoparticle toxicity and detoxification strategies in *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris*: new insights from proteomic and physiological analyses. *Science of The Total Environment*, 572, 1213-1221. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.039>
- Qiao, Z., Guo, P., Yang, D., Pei, Z., Wang, M., Liu, J. i Wang, Q. (2022). Evaluation of acute toxicity response to the algae *Chlorella pyrenoidosa* of biosynthetic silver nanoparticles catalysts. *Environmental Science and Pollution Research*, 30, 10955-10968. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22879-z>
- Qiu, Y., Mu, Z., Wang, N., Wang, X., Xu, M. i Li, H. (2020). The aggregation and sedimentation of two different sized copper oxide nanoparticles in soil solutions: Dependence on pH and dissolved organic matter. *Science of The Total Environment*, 731, 1392-1404. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139215>

- Rahman, M., Asaeda, T., Fukahori, K., Imamura, F., Nohara, A. i Matsubayashi, M. (2023). Hydrogen peroxide measurement can be used to monitor plant oxidative stress rapidly using modified ferrous oxidation xylenol orange and titanium sulfate assay correlation. *International Journal of Plant Biology*, 14, 546-557. <https://doi.org/10.3390/ijpb14030043>
- Rakshit, A., Khatua, K., Shanbhag, V., Comba, P. i Datta, A. (2018). Cu²⁺ selective chelators relieve copper-induced oxidative stress *in vivo*. *Chemical Science*, 9, 7916-7930. <https://doi.org/10.1039/C8SC04041A>
- Ramagli, L.S. i Rodriguez, L. V. (1985). Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis*, 6, 559-563. <https://doi.org/10.1002/elps.1150061109>
- Rana, A. i Parmar, A.S. (2023). Re-exploring silver nanoparticles and its potential applications. *Nanotechnology for Environmental Engineering*, 8, 789-804. <https://doi.org/10.1007/s41204-022-00301-w>
- Ranjan, A., Rajput, V.D., Minkina, T., Bauer, T., Chauhan, A. i Jindal, T. (2021). Nanoparticles induced stress and toxicity in plants. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 15, 1004-1019. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100457>
- Reina, S. i Checchetto, V. (2022). Voltage-dependent anion selective channel 3: unraveling structural and functional features of the least known porin isoform. *Frontiers in Physiology*, 12, 5447-5459. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.784867>
- Rezayian, M., Niknam, V. i Ebrahimzadeh, H. (2019). Oxidative damage and antioxidative system in algae. *Toxicology Reports*, 6, 1309-1313. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.10.001>
- Richards, S.L., Wilkins, K.A., Swarbreck, S.M., Anderson, A.A., Habib, N., Smith, A.G., McAinsh, M. i Davies, J.M. (2015). The hydroxyl radical in plants: from seed to seed. *Journal of Experimental Botany*, 66, 37-46. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru398>
- Roduner, E. (2006). Size matters: why nanomaterials are different. *Chemical Society Reviews*, 35, 83-92. <https://doi.org/10.1039/b502142c>
- Rohde, M.M., Snyder, C.M., Sloop, J., Solst, S.R., Donati, G.L., Spitz, D.R., Furdui, C.M. i Singh, R. (2021). The mechanism of cell death induced by silver nanoparticles is distinct

- from silver cations. *Particle and Fibre Toxicology*, 18, 3774-3787. <https://doi.org/10.1186/s12989-021-00430-1>
- Roldán-Arjona, T. i Ariza, R.R. (2009). Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681, 169-179. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.07.003>
- Romero, N., Visentini, F.F., Márquez, V.E., Santiago, L.G., Castro, G.R. i Gagnetten, A.M. (2020). Physiological and morphological responses of green microalgae *Chlorella vulgaris* to silver nanoparticles. *Environmental Research*, 189, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109857>
- Rónavári, A., Béteky, P., Boka, E., Zakupszky, D., Igaz, N., Szerencsés, B., Pfeiffer, I., Kónya, Z. i Kiricsi, M. (2021). Polyvinyl-pyrrolidone-coated silver nanoparticles-the colloidal, chemical, and biological consequences of steric stabilization under biorelevant conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 8673-8685. <https://doi.org/10.3390/ijms22168673>
- Ross, D.D., Joneckis, C.C., Ordonez, J. V., Sisk, A.M., Wu, R.K., Hamburger, A.W. i Nora, R.E. (1989). Estimation of cell survival by flow cytometric quantification of fluorescein diacetate/propidium iodide viable cell number. *Cancer Research*, 49, 3776-3782
- Rostas, J.A.P. i Skelding, K.A. (2023). Calcium/calmodulin-stimulated protein kinase II (CAMKII): different functional outcomes from activation, depending on the cellular microenvironment. *Cells*, 12, 4015-4029. <https://doi.org/10.3390/cells12030401>
- Roy, U.K., Nielsen, B.V. i Milledge, J.J. (2021). Antioxidant production in *Dunaliella*. *Applied Sciences*, 11, 3959-3971. <https://doi.org/10.3390/app11093959>
- Ruan, Y., Zhong, Z., Liu, X., Li, Z., Li, J., Sun, L. i Sen, H. (2023). Correction: correlation between cellular uptake and cytotoxicity of polystyrene micro/nanoplastics in HeLa cells: a size-dependent matter. *Plos One*, 18, 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0293935>
- Rudolph, J., Völkl, M., Jérôme, V., Scheibel, T. i Freitag, R. (2021). Noxic effects of polystyrene microparticles on murine macrophages and epithelial cells. *Scientific Reports*, 11, 1570-1580. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95073-9>

- Sabourian, P., Yazdani, G., Ashraf, S.S., Frounchi, M., Mashayekhan, S., Kiani, S. i Kakkar, A. (2020). Effect of physico-chemical properties of nanoparticles on their intracellular uptake. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 8019-8031. <https://doi.org/10.3390/ijms21218019>
- Sachdev, S., Ansari, S.A. i Ansari, M.I. (2023). Generation and fate of ROS in mitochondria, u: *Reactive Oxygen Species in Plants*, Springer Nature Singapore, Singapur, 93-106. https://doi.org/10.1007/978-981-19-9884-3_6
- Sadovnikov, S.I. i Gusev, A.I. (2020). Synthesis of Ag₂S colloidal solutions in D₂O heavy water. *RSC Advances*, 10, 40171-40179. <https://doi.org/10.1039/D0RA07853K>
- Salbitani, G., Bottone, C. i Carfagna, S. (2017). Determination of reduced and total glutathione content in extremophilic microalga *Galdieria phlegrea*. *Bio-protocol*, 7, 2-6. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2372>
- Samberg, M.E., Orndorff, P.E. i Monteiro-Riviere, N.A. (2011). Antibacterial efficacy of silver nanoparticles of different sizes, surface conditions and synthesis methods. *Nanotoxicology*, 5, 244-253. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.525669>
- Sano, S., Ueda, M., Kitajima, S., Takeda, T., Shigeoka, S., Kurano, N., Miyachi, S., Miyake, C. i Yokota, A. (2001). Characterization of ascorbate peroxidases from unicellular red alga *Galdieria partita*. *Plant and Cell Physiology*, 42, 433-440. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce054>
- Saxena, I., Srikanth, S. i Chen, Z. (2016). Cross talk between H₂O₂ and interacting signal molecules under plant stress response. *Frontiers in Plant Science*, 7, 5689-5699. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00570>
- Saxena J. i Jyoti, A. (2021). Nanomaterials: novel preparation routes, characterizations, and applications, u: *Nanobiotechnology: concepts and applications in health, agriculture, and environment*, Apple Academic Press, SAD, 1-11. <https://doi.org/10.1201/9780429292750>
- Schiavo, S., Oliviero, M., Miglietta, M., Rametta, G. i Manzo, S. (2016). Genotoxic and cytotoxic effects of ZnO nanoparticles for *Dunaliella tertiolecta* and comparison with SiO₂ and TiO₂ effects at population growth inhibition levels. *Science of The Total Environment*, 550, 619-627. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.135>

- Schirinzi, G.F., Pérez-Pomeda, I., Sanchís, J., Rossini, C., Farré, M. i Barceló, D. (2017). Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells. *Environmental Research*, 159, 579-587. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.08.043>
- Schmidtman, J. i Peiffer, S. (2024). A rapid method to quantify sub-micrometer polystyrene particles in aqueous model systems by TOC analysis. *Microplastics and Nanoplastics*, 4, 3596-3608. <https://doi.org/10.1186/s43591-024-00080-y>
- Schumann, R., Häubner, N., Klausch, S. i Karsten, U. (2005). Chlorophyll extraction methods for the quantification of green microalgae colonizing building facades. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 55, 213-222. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.12.002>
- Seemann, J.R. (1989). Light adaptation/acclimation of photosynthesis and the regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in sun and shade plants. *Physiology*, 91, 379-386. <https://doi.org/10.1104/pp.91.1.379>
- Selvaraj, S.P. (2022). Enhanced surface morphology of copper oxide (CuO) nanoparticles and its antibacterial activities. *Materials Today: Proceedings*, 50, 2865-2868. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.09.574>
- Sendra, M., Staffieri, E., Yeste, M.P., Moreno-Garrido, I., Gatica, J.M., Corsi, I. i Blasco, J. (2019). Are the primary characteristics of polystyrene nanoplastics responsible for toxicity and ad/absorption in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*? *Environmental Pollution*, 249, 610-619. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.047>
- Senthilkumar, M., Amaresan, N. i Sankaranarayanan, A. (2021). Estimation of ascorbate peroxidase (APX), u: *Plant-microbe interactions*, Humana Press, Springer, SAD, 119-121. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1080-0_30
- Shabnam, N., Tripathi, I., Sharmila, P. i Pardha-Saradhi, P. (2016). A rapid, ideal, and eco-friendlier protocol for quantifying proline. *Protoplasma*, 253, 1577-1582. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0910-6>
- Shafi, A., Zahoor, I. i Mushtaq, U. (2019). Proline accumulation and oxidative stress: diverse roles and mechanism of tolerance and adaptation under salinity stress, u: *Salt Stress, Microbes, and Plant Interactions: Mechanisms and Molecular Approaches*, Springer Singapore, Singapur, 269-300. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8805-7_13

- Shah, J., Ranjan, M., Thareja, P. i Estellé, P. (2022). Tailoring stability and thermophysical properties of CuO nanofluid through ultrasonication. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *147*, 10319-10328. <https://doi.org/10.1007/s10973-022-11266-y>
- Shakya, M., Silvester, E., Rees, G., Rajapaksha, K.H., Faou, P. i Holland, A. (2022). Changes to the amino acid profile and proteome of the tropical freshwater microalga *Chlorella* sp. in response to copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *233*, 1133-1148. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113336>
- Shalaby, E. (2011). Algae as promising organisms for environment and health. *Plant Signaling & Behavior*, *6*, 1338-1350. <https://doi.org/10.4161/psb.6.9.16779>
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S. i Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, *2012*, 1-26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Sharma, V., Collins, L.B., Chen, T., Herr, N., Takeda, S., Sun, W., Swenberg, J.A. i Nakamura, J. (2016). Oxidative stress at low levels can induce clustered DNA lesions leading to NHEJ mediated mutations. *Oncotarget*, *7*, 25377-25390. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8298>
- Sheoran, I.S., Ross, A.R.S., Olson, D.J.H. i Sawhney, V.K. (2009). Compatibility of plant protein extraction methods with mass spectrometry for proteome analysis. *Plant Science*, *176*, 99-104. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.09.015>
- Shi, Y., Huang, J., Zeng, G., Gu, Y., Chen, Y., Hu, Y., Tang, B., Zhou, J., Yang, Y. i Shi, L. (2017). Exploiting extracellular polymeric substances (EPS) controlling strategies for performance enhancement of biological wastewater treatments: an overview. *Chemosphere*, *180*, 396-411. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.042>
- Shi, C., Lin, L., Yang, Y., Luo, W., Deng, M. i Wu, Y. (2020)(a). Synthesis of aminated polystyrene and its self-assembly with nanoparticles at oil/water interface. *e-Polymers*, *20*, 317-327. <https://doi.org/10.1515/epoly-2020-0038>
- Shi, T.-Q., Wang, L.-R., Zhang, Z.-X., Sun, X.-M. i Huang, H. (2020)(b). Stresses as first-line tools for enhancing lipid and carotenoid production in microalgae. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*, 1-9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00610>

- Shi, Q., Chen, C., Zhang, W., Wu, P., Sun, M., Wu, H., Wu, H., Fu, P. i Fan, J. (2021). Transgenic eukaryotic microalgae as green factories: providing new ideas for the production of biologically active substances. *Journal of Applied Phycology*, *33*, 705-728. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02350-7>
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y. i Yoshimura, K. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, *53*, 1305-1319. <https://doi.org/10.1093/jxb/53.372.1305>
- Shkilnyy, A., Soucé, M., Dubois, P., Warmont, F., Saboungi, M.-L. i Chourpa, I. (2009). Poly(ethylene glycol)-stabilized silver nanoparticles for bioanalytical applications of SERS spectroscopy. *The Analyst*, *134*, 1868-1877. <https://doi.org/10.1039/b905694g>
- Shoman, N., Solomonova, E., Akimov, A., Rylkova, O.A. i Meger, Y. (2022). Responses of *Prorocentrum cordatum* (ostenfeld) dodge, 1975 (dinoflagellata) to copper nanoparticles and copper ions effect. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *28*, 1625-1637. <https://doi.org/10.1007/s12298-022-01228-x>
- Sies, H. i Jones, D.P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*, 363-383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Singh, R.P., Handa, R. i Manchanda, G. (2021). Nanoparticles in sustainable agriculture: an emerging opportunity. *Journal of Controlled Release*, *329*, 1234-1248. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.10.051>
- Sjollema, S.B., Redondo-Hasselerharm, P., Leslie, H.A., Kraak, M.H.S. i Vethaak, A.D. (2016). Do plastic particles affect microalgal photosynthesis and growth? *Aquatic Toxicology*, *170*, 259-261. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.12.002>
- Smita, S., Gupta, S.K., Bartonova, A., Dusinska, M., Gutleb, A.C. i Rahman, Q. (2012). Nanoparticles in the environment: assessment using the causal diagram approach. *Environmental Health*, *11*, 1-11. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-11-S1-S13>
- Smith, I.K., Vierheller, T.L. i Thorne, C.A. (1988). Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry*, *175*, 408-413. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90564-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90564-7)

- Smith, M.C., Crist, R.M., Clogston, J.D. i McNeil, S.E. (2017). Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409, 5779-5787. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0527-z>
- Solomonova, E., Shoman, N., Akimov, A. i Rylkova, O. (2023). Impact of copper oxide nanoparticles on the physiology of different microalgal species. *Regional Studies in Marine Science*, 66, 5012-5026. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2023.103128>
- Song, G., Hou, W., Gao, Y., Wang, Y., Lin, L., Zhang, Z., Niu, Q., Ma, R., Mu, L. i Wang, H. (2016). Effects of CuO nanoparticles on *Lemna minor*. *Botanical Studies*, 57, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s40529-016-0118-x>
- Sousa, V.S. i Teixeira, M.R. (2013). Aggregation kinetics and surface charge of CuO nanoparticles: the influence of pH, ionic strength and humic acids. *Environmental Chemistry*, 10, 313-322. <https://doi.org/10.1071/EN13001>
- Spallarossa, A., Donahue, J.L., Larson, T.J., Bolognesi, M. i Bordo, D. (2001). *Escherichia coli* glpE is a prototype sulfurtransferase for the single-domain rhodanese homology superfamily. *Structure*, 9, 1117-1125. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00666-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00666-9)
- Srinivasan, R., Han, H.-S., Subramanian, P., Mageswari, A., Kim, S.-H., Tirumani, S., Maurya, V.K., Muthukaliannan, G.K. i Ramya, M. (2023). Lipid ros- and iron-dependent ferroptotic cell death in unicellular algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cells*, 12, 553-567. <https://doi.org/10.3390/cells12040553>
- Stadtman, E.R. i Levine, R.L. (2000). Protein Oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 191-208. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06187.x>
- Stadtman, E.R. i Levine, R.L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25, 207-218. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0011-2>
- Stampoulis, D., Sinha, S.K. i White, J.C. (2009). Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environmental Science and Technology*, 43, 9473-9479. <https://doi.org/10.1021/es901695c>
- Su, L.-J., Zhang, J.-H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F. i Peng, Z.-Y. (2019). Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and

- ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2019/5080843>
- Sui, Z.M., Chen, X., Wang, L.Y., Xu, L.M., Zhuang, W.C., Chai, Y.C. i Yang, C.J. (2006). Capping effect of CTAB on positively charged Ag nanoparticles. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 33, 308-314. <https://doi.org/10.1016/j.physe.2006.03.151>
- Szabados, L. i Savouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15, 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009>
- Štefanić, P.P., Cvjetko, P., Biba, R., Domijan, A.-M.M., Letofsky-Papst, I., Tkalec, M., Šikić, S., Cindrić, M. i Balen, B. (2018). Physiological, ultrastructural and proteomic responses of tobacco seedlings exposed to silver nanoparticles and silver nitrate. *Chemosphere*, 209, 640-653. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.128>
- Talleg, K., Blard, O., González-Fernández, C., Brotons, G., Berchel, M., Soudant, P., Huvet, A. i Paul-Pont, I. (2019). Surface functionalization determines behavior of nanoplastic solutions in model aquatic environments. *Chemosphere*, 225, 639-646. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.077>
- Tamayo-Belda, M., Vargas-Guerrero, J.J., Martín-Betancor, K., Pulido-Reyes, G., González-Pleiter, M., Leganés, F., Rosal, R. i Fernández-Piñas, F. (2021). Understanding nanoplastic toxicity and their interaction with engineered cationic nanopolymers in microalgae by physiological and proteomic approaches. *Environmental Science: Nano*, 8, 2277-2296. <https://doi.org/10.1039/D1EN00284H>
- Temizel-Sekeryan, S. i Hicks, A.L. (2020). Global environmental impacts of silver nanoparticle production methods supported by life cycle assessment. *Resources, Conservation and Recycling*, 156, 1046-1059. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2019.104676>
- Tenorio, A.T., de Jong, E.W.M., Nikiforidis, C. V., Boom, R.M. i van der Goot, A.J. (2017). Interfacial properties and emulsification performance of thylakoid membrane fragments. *Soft Matter*, 13, 608-618. <https://doi.org/10.1039/c6sm02195f>
- Terada, M., Watanabe, Y., Kunitomo, M. i Hayashi, E. (1978). Differential rapid analysis of ascorbic acid and ascorbic acid 2-sulfate by dinitrophenylhydrazine method. *Analytical Biochemistry*, 84, 604-608. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90083-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90083-0)

- Thwala, M., Musee, N., Sikhwivhilu, L. i Wepener, V. (2013). The oxidative toxicity of Ag and ZnO nanoparticles towards the aquatic plant *Spirodela punctata* and the role of testing media parameters. *Environmental Science: Processes and Impacts*, 15, 1830-1843. <https://doi.org/10.1039/c3em00235g>
- Tkalec, M., Peharec Štefanić, P. i Balen, B. (2019). Phytotoxicity of silver nanoparticles and defence mechanisms, u: *Analysis, fate, and toxicity of engineered nanomaterials in plants -Comprehensive analytical chemistry*, Elsevier, Nizozemska, 145-198. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2019.04.010>
- Todd, G., Wohlers, D. i Citra, M. (2003). Agency for toxic substances and disease registry, SAD.
- Tolaymat, T.M., El Badawy, A.M., Genaidy, A., Scheckel, K.G., Luxton, T.P. i Suidan, M. (2010). An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Science of The Total Environment*, 408, 999-1006. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.11.003>
- Tolstov, A.L. i Lebedev, E. V. (2012). Features of the stabilization of silver nanoparticles by carbonyl-containing polymers. *Theoretical and Experimental Chemistry*, 48, 213-226. <https://doi.org/10.1007/s11237-012-9264-8>
- Trinh, N.D., Nguyen, T.T.B. i Nguyen, T.H. (2015). Preparation and characterization of silver chloride nanoparticles as an antibacterial agent. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 6, 1-6. <https://doi.org/10.1088/2043-6262/6/4/045011>
- Tripathi, B.N., Mehta, S.K. i Gaur, J.P. (2004). Recovery of uptake and assimilation of nitrate in *Scenedesmus* sp. previously exposed to elevated levels of Cu²⁺ and Zn²⁺. *Journal of Plant Physiology*, 161, 543-549. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01238>
- Tripathi, D.K., Tripathi, A., Shweta, Singh, S., Singh, Y., Vishwakarma, K., Yadav, G., Sharma, S., Singh, V.K., Mishra, R.K., Upadhyay, R.G., Dubey, N.K., Lee, Y. i Chauhan, D.K. (2017). Uptake, accumulation and toxicity of silver nanoparticle in autotrophic plants, and heterotrophic microbes: a concentric review. *Frontiers in Microbiology*, 08, 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00007>
- Tripathy, B.C. i Oelmüller, R. (2012). Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 7, 1621-1633. <https://doi.org/10.4161/psb.22455>

- Turan, N.B., Erkan, H.S., Engin, G.O. i Bilgili, M.S. (2019). Nanoparticles in the aquatic environment: usage, properties, transformation and toxicity-a review. *Process Safety and Environmental Protection*, 130, 238-249. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.08.014>
- Ullah, R., Tsui, M.T.-K., Chow, A., Chen, H., Williams, C. i Ligaba-Osena, A. (2023). Micro(nano)plastic pollution in terrestrial ecosystem: emphasis on impacts of polystyrene on soil biota, plants, animals, and humans. *Environmental Monitoring and Assessment*, 195, 2525-2533. <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10769-3>
- Uribarri, J., del Castillo, M.D., de la Maza, M.P., Filip, R., Gugliucci, A., Luevano-Contreras, C., Macías-Cervantes, M.H., Markowicz Bastos, D.H., Medrano, A., Menini, T., Portero-Otin, M., Rojas, A., Sampaio, G.R., Wrobel, K., Wrobel, K. i Garay-Sevilla, M.E. (2015). Dietary advanced glycation end products and their role in health and disease. *Advances in Nutrition*, 6, 461-473. <https://doi.org/10.3945/an.115.008433>
- Uthicke, S., Llewellyn, L. i Eder, F. (2009). Fluorescent lectin assay to quantify particulate marine polysaccharides on 96-well filtration plates. *Limnology and Oceanography: Methods*, 7, 449-458. <https://doi.org/10.4319/lom.2009.7.449>
- Vavra, J., Ramona, G.P.L., Dattila, F., Kormányos, A., Priamushko, T., Albertini, P.P., Loiudice, A., Cherevko, S., Lopéz, N. i Buonsanti R. (2024). Solution-based Cu⁺ transient species mediate the reconstruction of copper electrocatalysts for CO₂ reduction. *Nature Catalysis* 7, 89-97. <https://doi.org/10.1038/s41929-023-01070-8>
- van Midwoud, P.M., Janse, A., Merema, M.T., Groothuis, G.M.M. i Verpoorte, E. (2012). Comparison of biocompatibility and adsorption properties of different plastics for advanced microfluidic cell and tissue culture models. *Analytical Chemistry*, 84, 3938-3944. <https://doi.org/10.1021/ac300771z>
- Van Nguyen, D., Nguyen, H.M., Le, N.T., Nguyen, K.H., Nguyen, H.T., Le, H.M., Nguyen, A.T., Dinh, N.T.T., Hoang, S.A. i Van Ha, C. (2022). Copper nanoparticle application enhances plant growth and grain yield in maize under drought stress conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41, 364-375. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10301-w>
- Vannini, C., Domingo, G., Onelli, E., De Mattia, F., Bruni, I., Marsoni, M. i Bracale, M. (2014). Phytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles exposure on germinating wheat seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 171, 1142-1148. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.05.002>

- Veith, A. i Moorthy, B. (2018). Role of cytochrome P450s in the generation and metabolism of reactive oxygen species. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.10.003>
- Velev, O.D. i Kaler, E.W. (1999). *In situ* assembly of colloidal particles into miniaturized biosensors. *Langmuir*, 15, 3693-3698. <https://doi.org/10.1021/la981729c>
- Verma, A., Sumi, S. i Seervi, M. (2021). Heat shock proteins-driven stress granule dynamics: yet another avenue for cell survival. *Apoptosis*, 26, 371-384. <https://doi.org/10.1007/s10495-021-01678-w>
- Vineeth Kumar, C.M., Karthick, V., Kumar, V.G., Inbakandan, D., Rene, E.R., Suganya, K.S.U., Embrandiri, A., Dhas, T.S., Ravi, M. i Sowmiya, P. (2022). The impact of engineered nanomaterials on the environment: release mechanism, toxicity, transformation, and remediation. *Environmental Research*, 212, 5225-5237. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113202>
- Vitale, E., Velikova, V., Tsonev, T., Costanzo, G., Paradiso, R. i Arena, C. (2022). Manipulation of light quality is an effective tool to regulate photosynthetic capacity and fruit antioxidant properties of *Solanum lycopersicum* L. cv. 'Microtom' in a controlled environment. *PeerJ*, 10, 2213-2225. <https://doi.org/10.7717/peerj.13677>
- Von Moos, N. i Slaveykova, V.I. (2014). Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bacteria and aquatic microalgae-state of the art and knowledge gaps. *Nanotoxicology*, 8, 605-630. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.809810>
- Waktole, G. (2023). Toxicity and molecular mechanisms of actions of silver nanoparticles. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 14, 53-70. <https://doi.org/10.4236/jbnt.2023.143005>
- Waleed, M., Gomaa, S., Khaled, S., Emara, R., Abdelhady, A. i Elwageeh, M. (2020). Investigating the effect of copper oxides and alumina nanoparticles on enhanced oil recovery in carbonate reservoirs. *International Journal of Petroleum and Petrochemical Engineering*, 6, 1-12. <https://doi.org/10.20431/2454-7980.0604001>
- Wan, J.-K., Chu, W.-L., Kok, Y.-Y. i Cheong, K.-W. (2018). Assessing the toxicity of copper oxide nanoparticles and copper sulfate in a tropical *Chlorella*. *Journal of Applied Phycology*, 30, 3153-3165. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1408-3>

- Wang, Z., Li, J., Zhao, J. i Xing, B. (2011)(a). Toxicity and internalization of CuO nanoparticles to prokaryotic alga *Microcystis aeruginosa* as affected by dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology*, 45, 6032-6040. <https://doi.org/10.1021/es2010573>
- Wang, D., Tejerina, B., Lagzi, I., Kowalczyk, B. i Grzybowski, B.A. (2011)(b). Bridging interactions and selective nanoparticle aggregation mediated by monovalent cations. *ACS Nano*, 5, 530-536. <https://doi.org/10.1021/nn1025252>
- Wang, J., Koo, Y., Alexander, A., Yang, Y., Westerhof, S., Zhang, Q., Schnoor, J.L., Colvin, V.L., Braam, J. i Alvarez, P.J.J.J. (2013). Phytostimulation of Poplars and Arabidopsis exposed to silver nanoparticles and Ag⁺ at sublethal concentrations. *Environmental Science and Technology*, 47, 5442-5449. <https://doi.org/10.1021/es4004334>
- Wang, J. i Wang, W. (2014). Significance of physicochemical and uptake kinetics in controlling the toxicity of metallic nanomaterials to aquatic organisms. *Journal of Zhejiang University Science A*, 15, 573-592. <https://doi.org/10.1631/jzus.A1400109>
- Wang, Z., Quik, J.T.K., Song, L., Van Den Brandhof, E.J., Wouterse, M. i Peijnenburg, W.J.G.M. (2015). Humic substances alleviate the aquatic toxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles to organisms of different trophic levels. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34, 1239-1245. <https://doi.org/10.1002/etc.2936>
- Wang, F., Liu, J., Chen, M., Zhou, L., Li, Z., Zhao, Q., Pan, G., Zaidi, S.-H.-R. i Cheng, F. (2016)(a). Involvement of abscisic acid in PSII photodamage and D1 protein turnover for light-induced premature senescence of rice flag leaves. *Plos One*, 11, 1-25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161203>
- Wang, Y., Zhu, X., Lao, Y., Lv, X., Tao, Y., Huang, B., Wang, J., Zhou, J. i Cai, Z. (2016)(b). TiO₂ nanoparticles in the marine environment: physical effects responsible for the toxicity on algae *Phaeodactylum tricorutum*. *Science of The Total Environment*, 565, 818-826. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.164>
- Wang, Q. i Zou, M.-H. (2018). Measurement of reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial ROS in AMPK knockout mice blood vessels. *Methods in Molecular Biology*, 1732, 507-517. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7598-3_32
- Wang, W.-Q., Jensen, O.N., Møller, I.M., Hebelstrup, K.H. i Rogowska-Wrzesinska, A. (2018). Evaluation of sample preparation methods for mass spectrometry-based proteomic

- analysis of barley leaves. *Plant Methods*, 14, 72-81. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0341-4>
- Wang, F., Guan, W., Xu, L., Ding, Z., Ma, H., Ma A. i Terry N. (2019). Effects of nanoparticles on algae: adsorption, distribution, ecotoxicity and fate. *Applied Sciences*, 9, 1-14. <https://doi.org/10.3390/app9081534>
- Wang, L., Sun, J., Lin, L., Fu, Y., Alenius, H., Lindsey, K. i Chen, C. (2020)(a). Silver nanoparticles regulate Arabidopsis root growth by concentration-dependent modification of reactive oxygen species accumulation and cell division. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 1100-1112. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110072>
- Wang, S., Liu, M., Wang, J., Huang, J. i Wang, J. (2020)(b). Polystyrene nanoplastics cause growth inhibition, morphological damage and physiological disturbance in the marine microalga *Platymonas helgolandica*. *Marine Pollution Bulletin*, 158, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111403>
- Wang, C. i Qi, C. (2022). Revealing the structural and chemical properties of copper-based nanoparticles released from copper treated wood. *RSC Advances*, 12, 11391-11401. <https://doi.org/10.1039/d2ra01196d>
- Wang, B., Wang, Y., Zhang, J., Hu, C., Jiang, J., Li, Y. i Peng, Z. (2023)(a). ROS-induced lipid peroxidation modulates cell death outcome: mechanisms behind apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Archives of Toxicology*, 97, 1439-1451. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03476-6>
- Wang, W., Liu, H., Liu, H., Chen, J., Xu, X., Xia, J. i Zhang, P. (2023)(b). Effects of polystyrene microparticles on growth and physiological metabolism of microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Sustainability*, 15, 11223. <https://doi.org/10.3390/su151411223>
- Waychunas, G.A., Kim, C.S. i Banfield, J.F. (2005). Nanoparticulate iron oxide minerals in soils and sediments: unique properties and contaminant scavenging mechanisms. *Journal of Nanoparticle Research*, 7, 409-433. <https://doi.org/10.1007/s11051-005-6931-x>
- Wen, J., Wang, W., Xu, K., Ji, D., Xu, Y., Chen, C. i Xie, C. (2020)(a). Comparative analysis of proteins involved in energy metabolism and protein processing in *Pyropia haitanensis* at different salinity levels. *Frontiers in Marine Science*, 7, 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00415>

- Wen, T., Liu, J., He, W. i Yang, A. (2020)(b). Nanomaterials and reactive oxygen species (ROS), u: *Nanotechnology in regenerative medicine and drug delivery therapy*, Springer Singapore, Singapur, 361-387. https://doi.org/10.1007/978-981-15-5386-8_8
- Wiechers, J.W. i Musee, N. (2010). engineered inorganic nanoparticles and cosmetics: facts, issues, knowledge gaps and challenges. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 6, 408-431. <https://doi.org/10.1166/jbn.2010.1143>
- Wijewardene, I., Shen, G. i Zhang, H. (2021). Enhancing crop yield by using Rubisco activase to improve photosynthesis under elevated temperatures. *Stress Biology*, 1, 1-20. <https://doi.org/10.1007/s44154-021-00002-5>
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P. i Descamps-Latscha, B. (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International*, 49, 1304-1313. <https://doi.org/10.1038/ki.1996.186>
- Woo, H., Kang, S.H., Kwon, Y., Choi, Y., Kim, J., Ha, D.-H., Tanaka, M., Okochi, M., Kim, J.S., Kim, H.K. i Choi, J. (2022). Sensitive and specific capture of polystyrene and polypropylene microplastics using engineered peptide biosensors. *RSC Advances*, 12, 7680-7688. <https://doi.org/10.1039/d1ra08701k>
- Woźniak-Budych, M.J., Maciejewska, B., Przysiecka, Ł., Wiczorek, D., Staszak, K., Jencyk, J., Jesionowski, T. i Jurga, S. (2020). Comprehensive study of stability of copper oxide nanoparticles in complex biological media. *Journal of Molecular Liquids*, 319, 2585-2598. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114086>
- Wu, L., Zhang, J. i Watanabe, W. (2011). Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 456-469. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.02.001>
- Wu, F., Harper, B.J., Crandon, L.E. i Harper, S.L. (2020). Assessment of Cu and CuO nanoparticle ecological responses using laboratory small-scale microcosms. *Environmental Science: Nano*, 7, 105-115. <https://doi.org/10.1039/c9en01026b>
- Wu, D., Wang, T., Wang, J., Jiang, L., Yin, Y. i Guo, H. (2021). Size-dependent toxic effects of polystyrene microplastic exposure on *Microcystis aeruginosa* growth and microcystin production. *Science of The Total Environment*, 761, 5564-5576. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143265>

- Xia, B., Chen, B., Sun, X., Qu, K., Ma, F. i Du, M. (2015). Interaction of TiO₂ nanoparticles with the marine microalga *Nitzschia closterium* : growth inhibition, oxidative stress and internalization. *Science of The Total Environment*, 508, 525-533. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.11.066>
- Xiang, Q., Zhou, Y. i Tan, C. (2023)(a). Toxicity effects of polystyrene nanoplastics with different sizes on freshwater microalgae *Chlorella vulgaris*. *Molecules*, 28, 6479-6491. <https://doi.org/10.3390/molecules28093958>
- Xiang, W., Lei, M., Wang, S., Zhang, W. i Dong, Y. (2023)(b). *In-situ* synthesis of ultrafine Cu₂O nanoparticles onto MnO₂ nanosheets for efficient non-enzymatic electrochemical sensing of hydrogen peroxide. *Journal of Applied Electrochemistry*, 53, 1777-1785. <https://doi.org/10.1007/s10800-023-01893-0>
- Xin, L., Wang, J., Wu, Y., Guo, S. i Tong, J. (2015). Increased oxidative stress and activated heat shock proteins in human cell lines by silver nanoparticles. *Human and Experimental Toxicology*, 34, 315-323. <https://doi.org/10.1177/0960327114538988>
- Xiong, T., Zhang, T., Xian, Y., Kang, Z., Zhang, S., Dumat, C., Shahid, M. i Li, S. (2021). Foliar uptake, biotransformation, and impact of CuO nanoparticles in *Lactuca sativa* L. var. *ramosa* Hort. *Environmental Geochemistry and Health*, 43, 423-439. <https://doi.org/10.1007/s10653-020-00734-9>
- Xiu, Z., Zhang, Q., Puppala, H.L., Colvin, V.L. i Alvarez, P.J.J. (2012). Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Letters*, 12, 4271-4275. <https://doi.org/10.1021/nl301934w>
- Xu, Q., Tu, J., Dou, C., Zhang, J., Yang, L., Liu, X., Lei, K., Liu, Z., Wang, Y., Li, L., Bao, H., Wang, J. i Tu, K. (2017). HSP90 promotes cell glycolysis, proliferation and inhibits apoptosis by regulating PKM2 abundance via Thr-328 phosphorylation in hepatocellular carcinoma. *Molecular Cancer*, 16, 854-863. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0748-y>
- Xu, L., Zhao, Z., Yan, Z., Zhou, G., Zhang, W., Wang, Y. i Li, X. (2022). Defense pathways of *Chlamydomonas reinhardtii* under silver nanoparticle stress: extracellular biosorption, internalization and antioxidant genes. *Chemosphere*, 291, 3225-3238. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132764>

- Xu, K., Zou, W., Peng, B., Guo, C. i Zou, X. (2023). Lipid droplets from plants and microalgae: characteristics, extractions, and applications. *Biology*, 12, 4577-4589. <https://doi.org/10.3390/biology12040594>
- Xu, M., Zhu, F., Yang, Y., Liu, M., Li, X., Jiang, Y., Feng, L., Duan, J., Wang, W., Yuan, X. i Zhang, X. (2024). Mechanism of transport and toxicity response of *Chlorella sorokiniana* to polystyrene nanoplastics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 270, 552-567. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115901>
- Yamamoto, M., Nozaki, H., Miyazawa, Y., Koide, T. i Kawano, S. (2003). Relationship between presence of a mother cell wall and speciation in the unicellular microalga *Nannochloris* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 39, 172-184. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2003.02052.x>
- Yan, A. i Chen, Z. (2019). Impacts of silver nanoparticles on plants: a focus on the phytotoxicity and underlying mechanism. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 1-21. <https://doi.org/10.3390/ijms20051003>
- Yan, Z., Xu, L., Zhang, W., Yang, G., Zhao, Z., Wang, Y. i Li, X. (2021). Comparative toxic effects of microplastics and nanoplastics on *Chlamydomonas reinhardtii*: growth inhibition, oxidative stress, and cell morphology. *Journal of Water Process Engineering*, 43, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102291>
- Yang, W.S., Kim, K.J., Gaschler, M.M., Patel, M., Shchepinov, M.S. i Stockwell, B.R. (2016). Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 1-10. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603244113>
- Yang, Q., Shan, W., Hu, L., Zhao, Y., Hou, Y., Yin, Y., Liang, Y., Wang, F., Cai, Y., Liu, J. i Jiang, G. (2019). Uptake and transformation of silver nanoparticles and ions by rice plants revealed by dual stable isotope tracing. *Environmental Science and Technology*, 53, 625-633. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02471>
- Yang, Q., Xu, W., Liu, G., Song, M., Tan, Z., Mao, Y., Yin, Y., Cai, Y., Liu, J. i Jiang, G. (2020). Transformation and uptake of silver nanoparticles and silver ions in rice plant (*Oryza sativa* L.): the effect of iron plaque and dissolved iron. *Environmental Science: Nano*, 7, 599-609. <https://doi.org/10.1039/c9en01297d>

- Yang, S. (2021). Characterization of silver nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 136, 83-107. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108305>
- Yang, C., Yin, L., Guo, Y., Han, T., Wang, Y., Liu, G., Maqbool, F., Xu, L. i Zhao, J. (2023). Insight into the absorption and migration of polystyrene nanoplastics in *Eichhornia crassipes* and related photosynthetic responses. *Science of The Total Environment*, 892, 742-750. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164518>
- Yasur, J. i Rani, P.U. (2013). Environmental effects of nanosilver: impact on castor seed germination, seedling growth, and plant physiology. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 8636-8648. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1798-3>
- Yin, L., Cheng, Y., Espinasse, B., Colman, B.P., Auffan, M., Wiesner, M., Rose, J., Liu, J. i Bernhardt, E.S. (2011). More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environmental Science and Technology*, 45, 2360-2367. <https://doi.org/10.1021/es103995x>
- Yin, J.-J., Fu, P.P., Lutterodt, H., Zhou, Y.-T., Antholine, W.E. i Wamer, W. (2012). Dual role of selected antioxidants found in dietary supplements: crossover between anti- and pro-oxidant activities in the presence of copper. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 2554-2561. <https://doi.org/10.1021/jf204724w>
- Yin, J., Lu, A., Che, T., He, L. i Shen, S. (2022). A preliminary study on the mechanisms of growth and physiological changes in response to different temperatures in *Neopyropia yezoensis* (rhodophyta). *Water*, 14, 1-15. <https://doi.org/10.3390/w14142175>
- Yu, S.J., Yin, Y.G. i Liu, J.F. (2013). Silver nanoparticles in the environment. *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, 15, 78-92. <https://doi.org/10.1039/c2em30595j>
- Yu, S., Shen, M., Li, S., Fu, Y., Zhang, D., Liu, H. i Liu, J. (2019). Aggregation kinetics of different surface-modified polystyrene nanoparticles in monovalent and divalent electrolytes. *Environmental Pollution*, 255, 554-563. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113302>
- Yu, Z., Li, Q., Wang, J., Yu, Y., Wang, Y., Zhou, Q. i Li, P. (2020). Reactive oxygen species-related nanoparticle toxicity in the biomedical field. *Nanoscale Research Letters*, 15, 298-308. <https://doi.org/10.1186/s11671-020-03344-7>

- Yue, Y., Li, X., Sigg, L., Suter, M.J.-F., Pillai, S., Behra, R. i Schirmer, K. (2017). Interaction of silver nanoparticles with algae and fish cells: a side by side comparison. *Journal of Nanobiotechnology*, 15, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0254-9>
- Zeb, A. i Ullah, F. (2016). A simple spectrophotometric method for the determination of thiobarbituric acid reactive substances in fried fast foods. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2016, 1-5. <https://doi.org/10.1155/2016/9412767>
- Zhang, W. i Elliott, D.W. (2006). Applications of iron nanoparticles for groundwater remediation. *Remediation Journal*, 16, 7-21. <https://doi.org/10.1002/rem.20078>
- Zhang, L. i Becker, D.F. (2015). Connecting proline metabolism and signaling pathways in plant senescence. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00552>
- Zhang, J.L., Zhou, Z.P., Pei, Y., Xiang, Q.Q., Chang, X.X., Ling, J., Shea, D. i Chen, L.Q. (2018). Metabolic profiling of silver nanoparticle toxicity in *Microcystis aeruginosa*. *Environmental Science: Nano*, 5, 2519-2530. <https://doi.org/10.1039/c8en00738a>
- Zhang, F., Wang, Z., Wang, S., Fang, H. i Wang, D. (2019). Aquatic behavior and toxicity of polystyrene nanoplastic particles with different functional groups: complex roles of pH, dissolved organic carbon and divalent cations. *Chemosphere*, 228, 195-203. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.115>
- Zhang, J., Shen, L., Xiang, Q., Ling, J., Zhou, C., Hu, J. i Chen, L. (2020)(a). Proteomics reveals surface electrical property-dependent toxic mechanisms of silver nanoparticles in *Chlorella vulgaris*. *Environmental Pollution*, 265, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114743>
- Zhang, J., Xiang, Q., Shen, L., Ling, J., Zhou, C., Hu, J. i Chen, L. (2020)(b). Surface charge-dependent bioaccumulation dynamics of silver nanoparticles in freshwater algae. *Chemosphere*, 247, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125936>
- Zhang, H., Cheng, H., Wang, Y., Duan, Z., Cui, W., Shi, Y. i Qin, L. (2022)(a). Influence of functional group modification on the toxicity of nanoplastics. *Frontiers in Marine Science*, 8, 452-459. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.800782>

- Zhang, N., Xiong, G. i Liu, Z. (2022)(b). Toxicity of metal-based nanoparticles: challenges in the nano era. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *10*, 74-80. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1001572>
- Zhao, J., Wang, Z., Liu, X., Xie, X., Zhang, K. i Xing, B. (2011). Distribution of CuO nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) and their potential toxicity. *Journal of Hazardous Materials*, *197*, 304-310. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.09.094>
- Zhao, J., Cao, X., Liu, X., Wang, Z., Zhang, C., White, J.C. i Xing, B. (2016). Interactions of CuO nanoparticles with the algae *Chlorella pyrenoidosa* : adhesion, uptake, and toxicity. *Nanotoxicology*, *10*, 1297-1305. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1206149>
- Zhao, R., Jiang, S., Zhang, L. i Yu, Z. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (review). *International Journal of Molecular Medicine*, *44*, 3-15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>
- Zhao, T., Tan, L., Zhu, X., Huang, W. i Wang, J. (2020). Size-dependent oxidative stress effect of nano/micro-scaled polystyrene on *Karenia mikimotoi*. *Marine Pollution Bulletin*, *154*, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111074>
- Zhao, Z., Xu, L., Wang, Y., Li, B., Zhang, W. i Li, X. (2021). Toxicity mechanism of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*: photosynthesis, oxidative stress, membrane permeability, and ultrastructure analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, *28*, 15032-15042. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11714-y>
- Zhao, H., Liu, D., Yan, Q., Bian, X., Yu, J., Wang, J., Cheng, X. i Xu, Z. (2022). Endoplasmic reticulum stress/Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase/signal transducer and activator of transcription 3 pathway plays a role in the regulation of cellular zinc deficiency in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Frontiers in Physiology*, *12*. 98-110. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.736920>
- Zheng, S., Zhou, Q., Chen, C., Yang, F., Cai, Z., Li, D., Geng, Q., Feng, Y. i Wang, H. (2019). Role of extracellular polymeric substances on the behavior and toxicity of silver nanoparticles and ions to green algae *Chlorella vulgaris*. *Science of The Total Environment*, *660*, 1182-1190. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.067>
- Zheng, X., Yuan, Y., Li, Y., Liu, X., Wang, X. i Fan, Z. (2021). Polystyrene nanoplastics affect growth and microcystin production of *Microcystis aeruginosa*. *Environmental Science and Pollution Research*, *28*, 13394-13403. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10388-w>

- Zhou, J.-Y., Dann, G.P., Shi, T., Wang, L., Gao, X., Su, D., Nicora, C.D., Shukla, A.K., Moore, R.J., Liu, T., Camp II, D.G., Smith, R.D. i Qian, W.-J. (2012). Simple sodium dodecyl sulfate-assisted sample preparation method for LC-MS-based proteomics applications. *Analytical Chemistry*, *84*, 2862-2867. <https://doi.org/10.1021/ac203394r>
- Zhou, K., Hu, Y., Zhang, L., Yang, K. i Lin, D. (2016). The role of exopolymeric substances in the bioaccumulation and toxicity of Ag nanoparticles to algae. *Scientific Reports*, *6*, 259-274. <https://doi.org/10.1038/srep32998>
- Zhou, G., Xu, L., Wang, H., Sun, A., Wang, Y., Li, X. i Jiang, R. (2023). Different responses of *Chlorella vulgaris* to silver nanoparticles and silver ions under modulation of nitric oxide. *Environmental Science and Pollution Research*, *30*, 64536-64546. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-26846-0>
- Zia, M., Zafar, H., Gul, F.Z., Abbasi, B.H., Rizvi, Z.F. i Mannan, A. (2021). Synergistic influence of CuO nanoparticles and spectral lights transforms biomass, antioxidative response, and antioxidants in *Brassica nigra*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *145*, 261-274. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-02006-x>
- Zook, J.M., Halter, M.D., Cleveland, D. i Long, S.E. (2012). Disentangling the effects of polymer coatings on silver nanoparticle agglomeration, dissolution, and toxicity to determine mechanisms of nanotoxicity. *Journal of Nanoparticle Research*, *14*, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1165-1>
- Zushi, K., Kajiwara, S. i Matsuzoe, N. (2012). Chlorophyll *a* fluorescence OJIP transient as a tool to characterize and evaluate response to heat and chilling stress in tomato leaf and fruit. *Scientia Horticulturae*, *148*, 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.09.022>

PRILOZI

8. PRILOZI

Prilog 1. Popis kratica i simbola

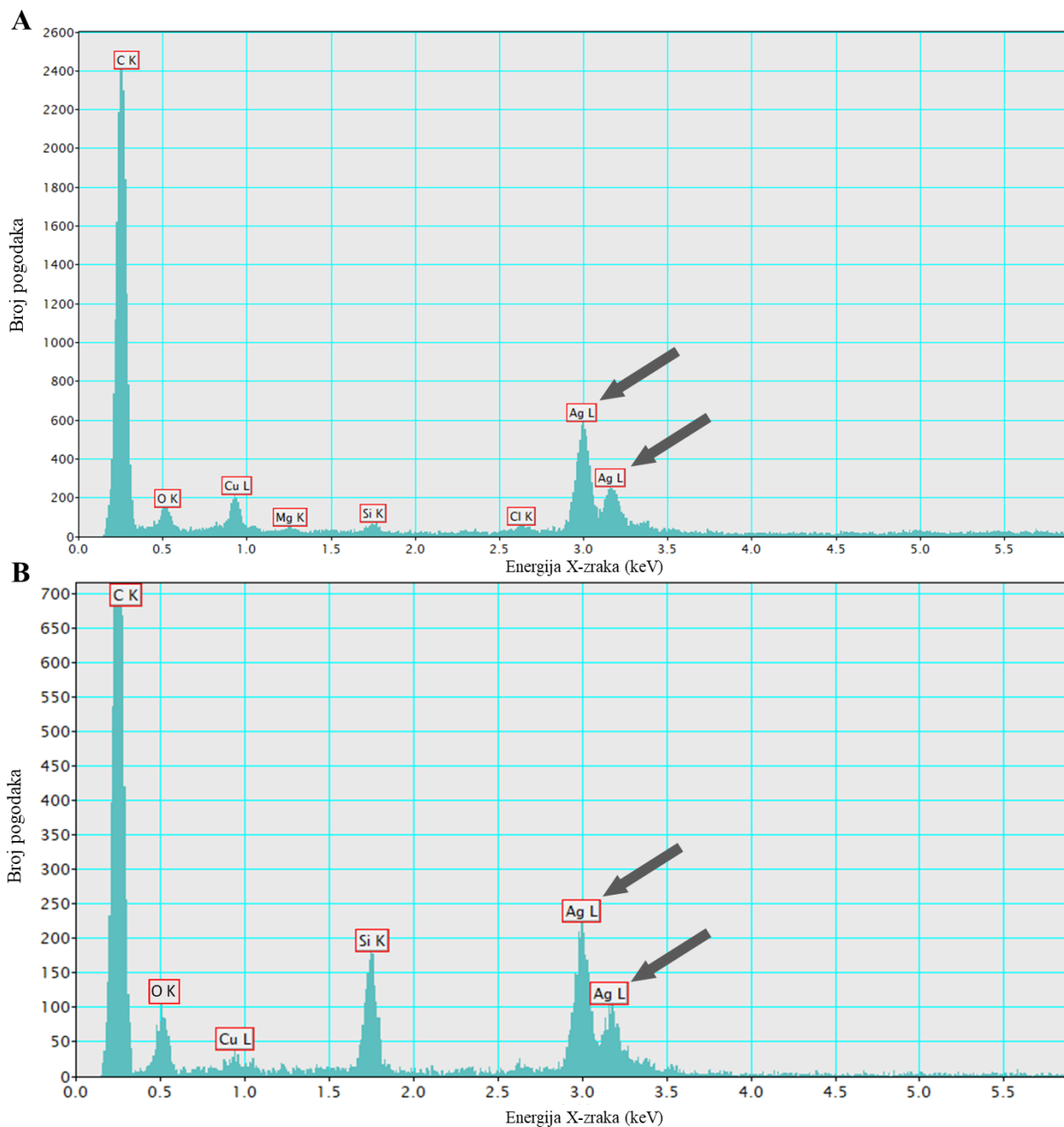
2-DE	Dvodimenzionalna elektroforeza
AA	Akrilamid
AAS	Atomska apsorpcijska spektroskopija
AgNO ₃	Srebrov nitrat
AgNP	Nanočestice srebra
APS	Amonijev persulfat
APX	Askorbat peroksidaza
ATP	Adenozin trifosfat
BFB	Bromfenol plavo
Bis	Bisakrilamid
BSA	Albumin goveđeg seruma
CAT	Katalaza
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>
CHAPS	3-[(3-kolamidopropil) dimetilamonijev]-2-hidroksi-1-propansulfonat
CTAB	Cetiltrimetilamonijev bromid
deH ₂ O	Destilirana voda
DHE	Dihidroetidij
DLS	Dinamičko raspršenje svjetlosti
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina
EDX	Detektor energetski disperzivne rendgenske spektroskopije
EPS	Izvanstanični matriks polimera
F_m/F_v	Maksimalni kvantni prinos
GAPDH	Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
GR	Glutation reduktaza
GSH	Reducirani glutacion
H ₂ DCF-DA	2',7'-diklorofluorescein-diacetat
H ₂ O ₂	Vodikov peroksid
HO•	Hidroksilni radikal
HRP	Peroksidaza iz hrena

Prilog 1. Nastavak

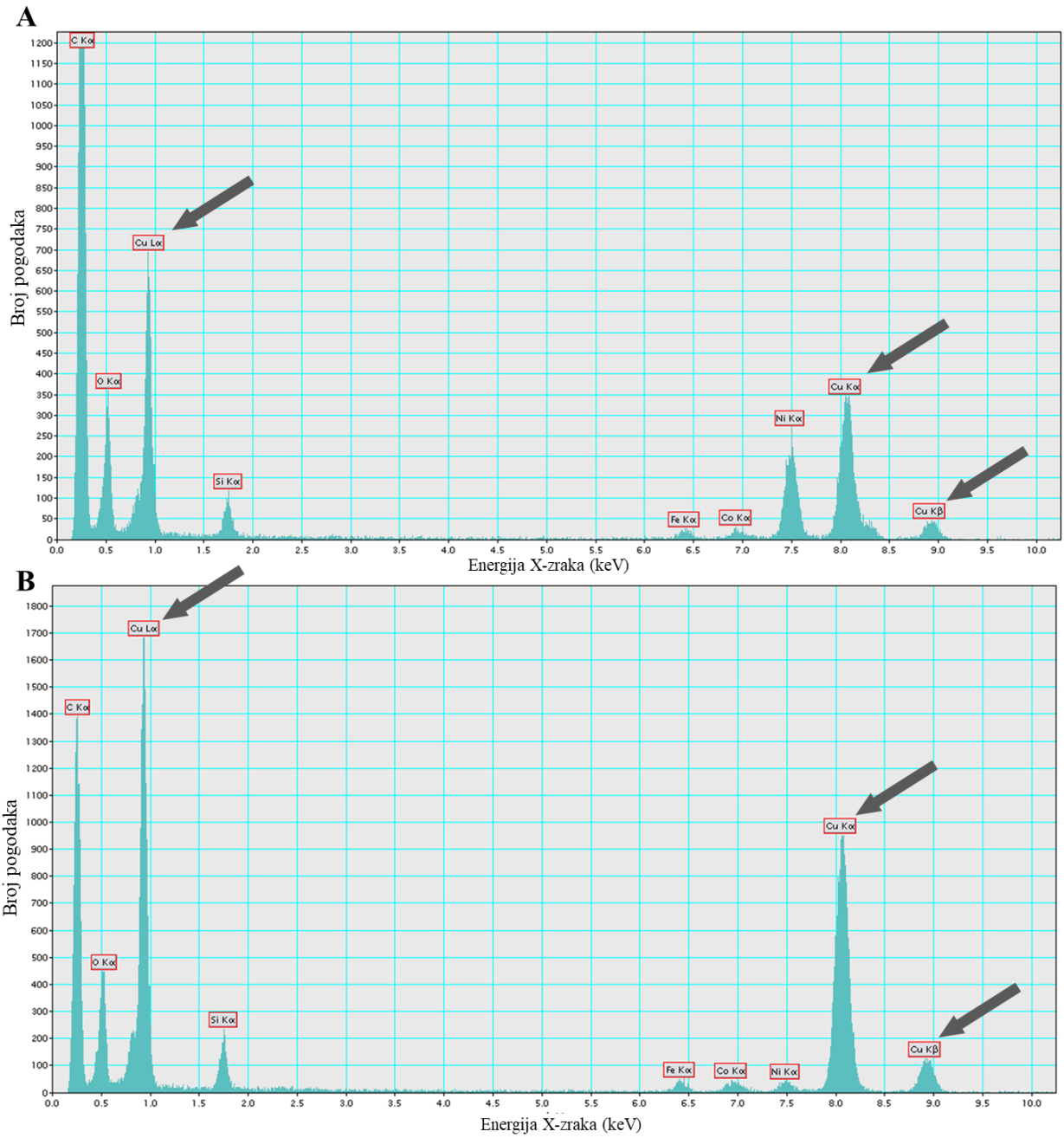
Hsp	Proteini toplinskog šoka
ICP-MS	Masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom
IEF	Izoelektrično fokusiranje
MDA	Malondialdehid
MS	Spektometrija masa
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NBT	Nitroblue tetrazolium (NBT)
$O_2^{\bullet -}$	Superoksidni radikal
1O_2	Singletni kisik
PAGE	Poliakrilamid gel elektroforeza
PBS	Otopina fosfatnih soli
PET	Polietilen tereftalat
PI	Propidij jodid
pI	Izoelektrična točka
PMMA	Poli(metil-metakrilat)
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluorid
PPX	Pirogalol peroksidaza
PS	Fotosustav
PS	Polistiren
PUFA	Polinezasićene masne kiseline
PVC	Polivinil klorid
PVP	Polivinilpirolidon
ROS	Reaktivni oblici kisika
RT	Sobna temperatura
RuBisCo	Ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza
SDS	Natrijev dodecil sulfat
SOD	Superoksid dismutaza
SPR	Rezonancija površinskih plazmona
TBA	Tiobarbituratna kiselina
TBS	Tris puffer
TCA	Trikloroctena kiselina
TEM	Transmisijska elektronska mikroskopija
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin

Prilog 1. Nastavak

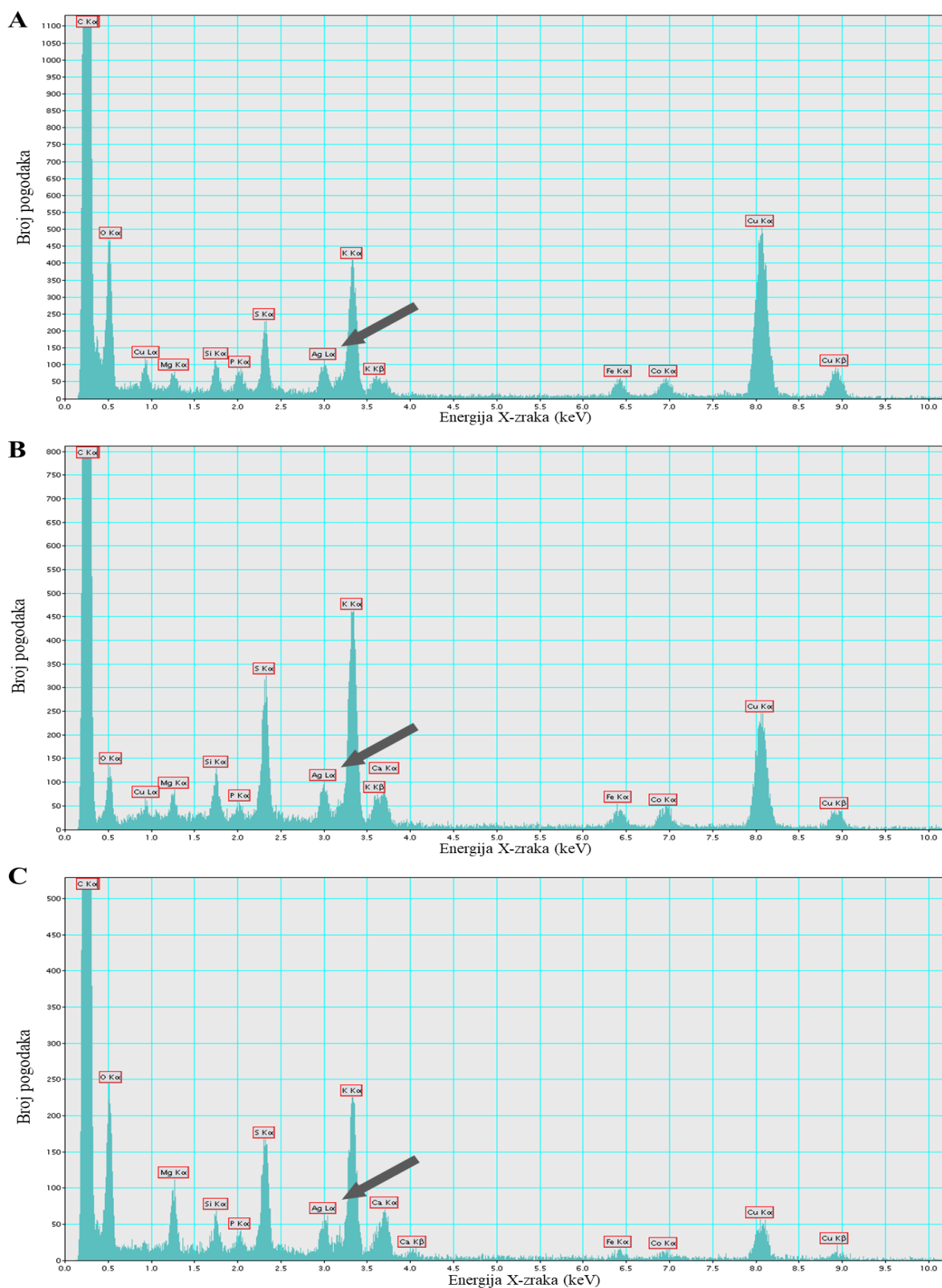
TFA	Trifluoroctena kiselina
TOF	Vrijeme leta
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
UV/Vis	Ultraljubičasto zračenje/vidljiva svjetlost



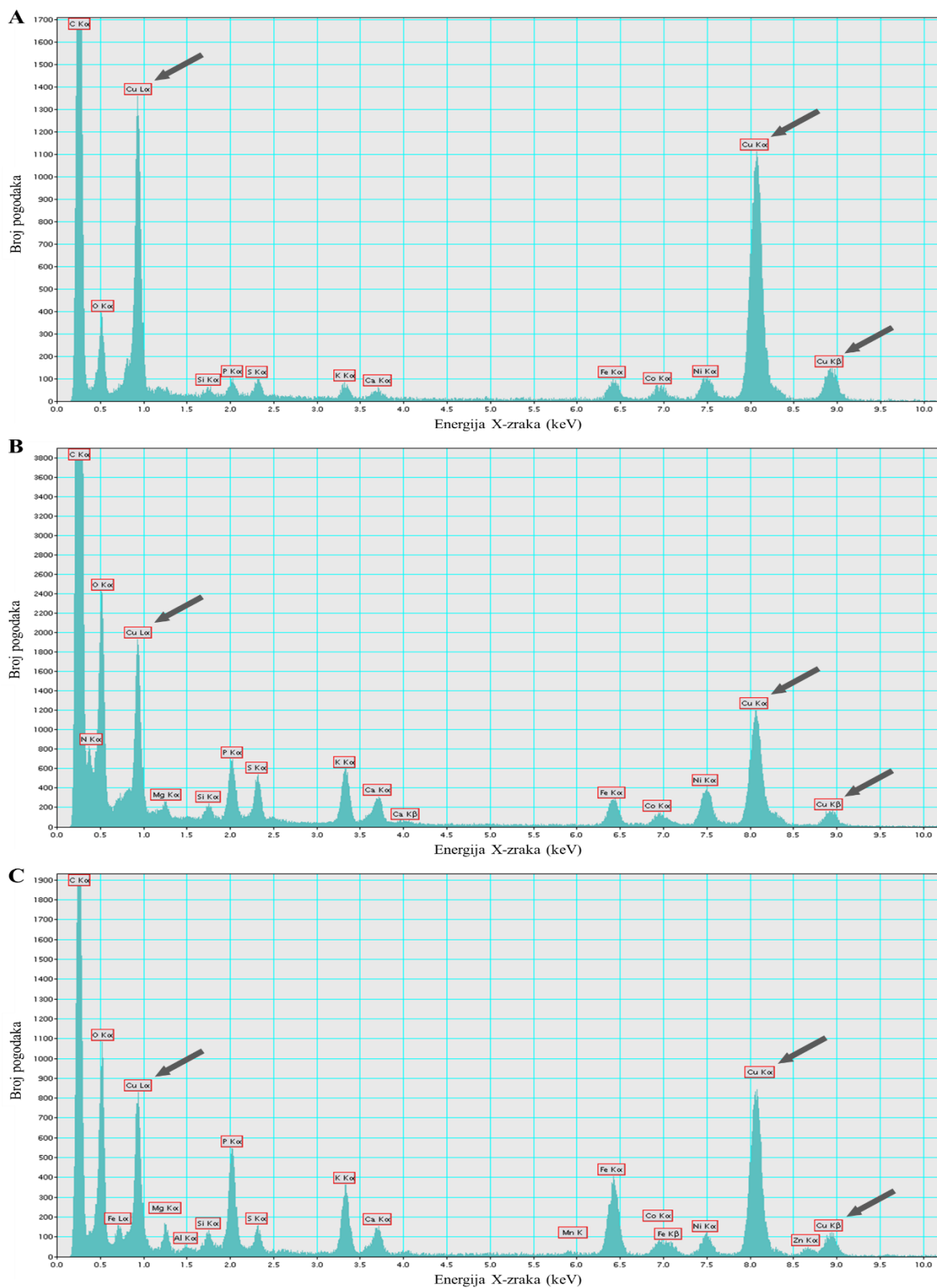
Prilog 2. Uvećani prikaz spektara energijski razlučujuće/disperzivne rendgenske spektroskopije (EDX) čestica AgNP-citrat (A) i AgNP-CTAB (B) prikazanih na Slici 16.



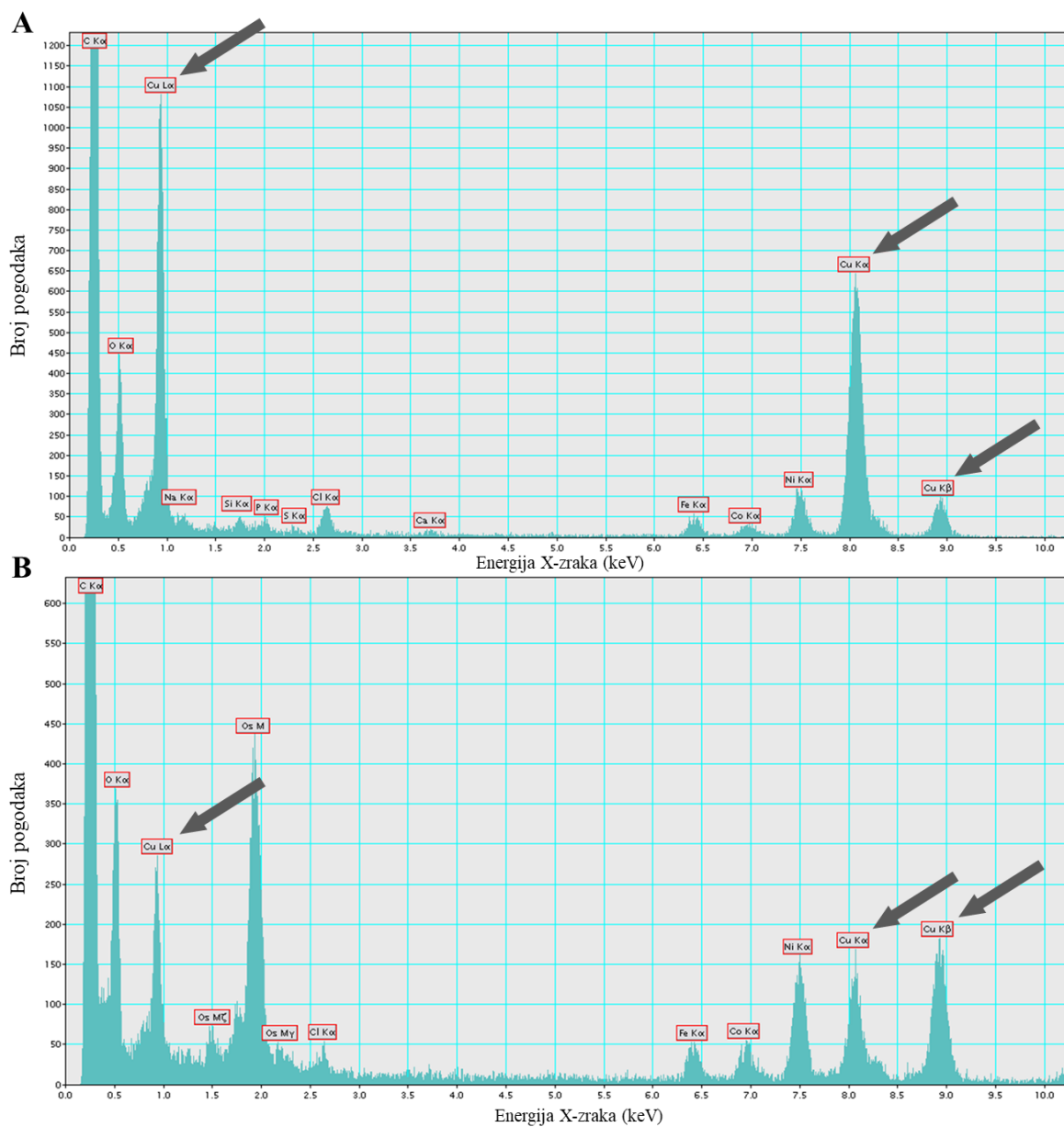
Prilog 3. Uvećani prikaz spektara energijski razlučujuće/disperzivne rendgenske spektroskopije (EDX) čestica CuONP (A) i Cu₂ONP (B) prikazanih na Slici 17.



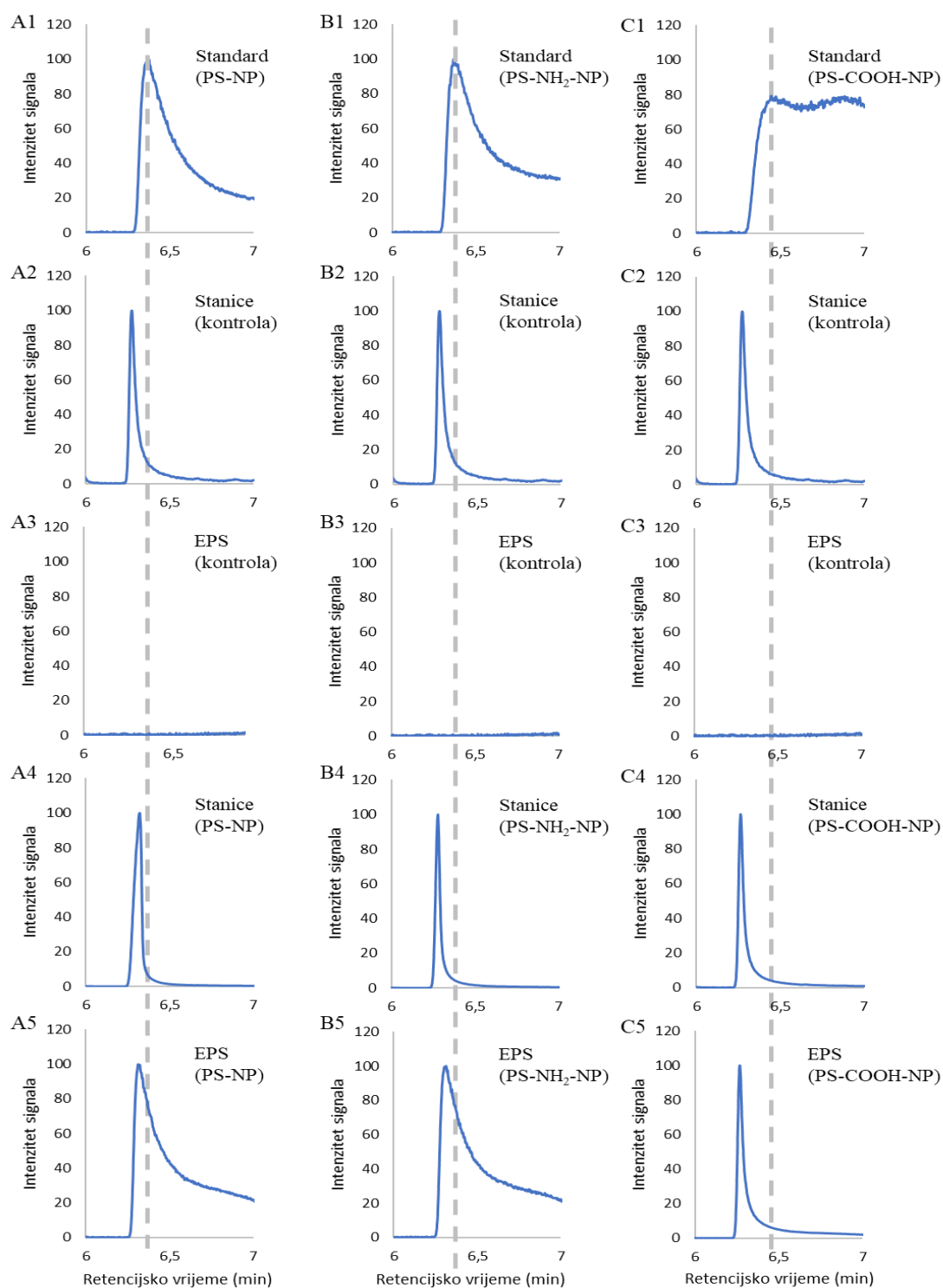
Prilog 4. Uvećani prikaz spektara energijski razlučujuće/disperzivne rendgenske spektroskopije (EDX) čestica AgNP vizualiziranih u sloju EPS stanica alge *C. vulgaris* nakon 72 sata izlaganja AgNP-citrat ($0,188 \text{ mg L}^{-1}$) (A), AgNP-CTAB ($0,895 \text{ mg L}^{-1}$) (B) i AgNO₃ ($0,130 \text{ mg L}^{-1}$) (C) prikazanih na Slici 24.



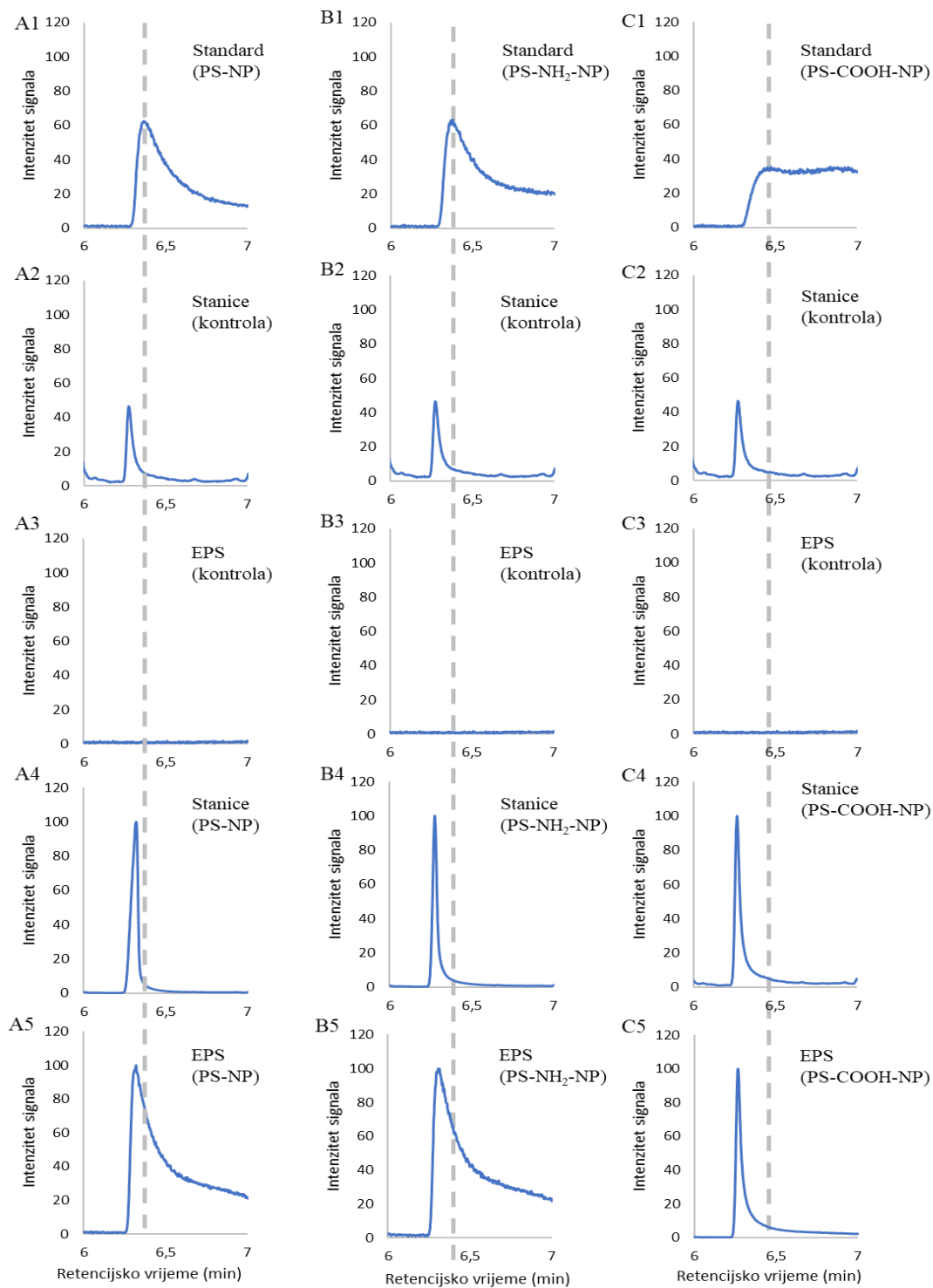
Prilog 5. Uvećani prikaz spektara energijski razlučujuće/disperzivne rendgenske spektroskopije (EDX) nanočestica bakra vizualiziranih u sloju EPS stanica alge *C. vulgaris* nakon 72 sata izlaganja CuONP (14,45 mg L⁻¹) (A), Cu₂ONP (11,89 mg L⁻¹) (B) i CuSO₄ (8,36 mg L⁻¹) (C) prikazanih na Slici 27.



Prilog 6. Uvećani prikaz spektara energijski razlučujuće/disperzivne rendgenske spektroskopije (EDX) nanočestica bakra vizualiziranih u stanicama alge *C. vulgaris* nakon 72 sata izlaganja CuONP ($14,45 \text{ mg L}^{-1}$) (A) i Cu₂ONP ($11,89 \text{ mg L}^{-1}$) (B) prikazanih na Slici 28.



Prilog 7. Ionski kromatogrami monomera stirena u kontrolnim stanicama (A2, B2, C2) i sloju EPS (A3, B3, C3) alge *C. vulgaris* te stanicama i sloju EPS alge nakon 72 sata izlaganja 40 mg L⁻¹ PS-NP (A4, A5), PS-NH₂-NP (B4, B5) i PS-COOH-NP (C4, C5), dobiveni pirolitičkom plinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa (Py-GC-MS). Za svaki primijenjeni tretman prikazan je produkt pirolize matičnih suspenzija pripadajućih nanočestica polistirena (A1, B1, C1).



Prilog 8. Ionski kromatogrami dimera stirena u kontrolnim stanicama (A2, B2, C2) i sloju EPS (A3, B3, C3) alge *C. vulgaris* te stanicama i sloju EPS alge nakon 72 sata izlaganja 40 mg L^{-1} PS-NP (A4, A5), PS-NH₂-NP (B4, B5) i PS-COOH-NP (C4, C5), dobiveni pirolitičkom plinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa (Py-GC-MS). Za svaki primijenjeni tretman prikazan je produkt pirolize matičnih suspenzija pripadajućih nanočestica polistirena (A1, B1, C1)

ŽIVOTOPIS

9. ŽIVOTOPIS

Bruno Komazec rođen je 03. travnja 1995. u Zagrebu, gdje je završio osnovnu i srednju školu. Godine 2014. je upisao preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu (PMF) u Zagrebu, a 2020. diplomirao na diplomskom studiju molekularne biologije na PMF-u u Zagrebu s temom *Utjecaj nanočestica i iona srebra na nakupljanje i transport auksina u korijenu uročnjaka Arabidopsis thaliana*. Od listopada 2020. zaposlen je kao asistent na Zavodu za molekularnu biologiju, PMF, Sveučilište u Zagrebu, gdje iste godine upisuje i doktorski studij Biologije.

Doktorsku disertaciju izradio je kao suradnik na HRZZ projektu *Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava i toksičnosti nanočestica srebra, bakra i plastike kao potencijalno štetnih novih materijala u obalnim vodama (NANO-EMC²)* pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Petre Peharec Štefanić. Znanstvenim radom sudjelovao je i u projektu *Impact of silver nanoparticles on model plants - Focus on AgNP localization and ultrastructural changes of cells and organelles (AgNANO-LUCCO)* financiranom od strane European Union's Horizon programa i programa ESTEEM3, dok je bio i voditelj projekta *Visualization and localization of silver, copper and plastic nanoparticles in extracellular polymeric substances secreted by the fresh water algae Chlorella vulgaris* financiranog od strane Czech BioImaging i FESPB društva. Sudjelovao je na 8 međunarodnih skupova s posterskim ili kratkim usmenim priopćenjem kao prvi autor, dok je na jednom međunarodnom kongresu održao pozvano predavanje. Sudjelovao je na 4 stručne radionice te se usavršavao na konfokalnom i multifotonskom mikroskopu na Institutu za fiziologiju u Pragu te na transmisijskom elektronskom mikroskopu s EDX detektorom na Institutu za elektronsku mikroskopiju i nanoanalizu u Grazu. Član je dvije znanstvene udruge te je u 2023 godini održao pozvano predavanje pred članovima Hrvatskog društva za mikroskopiju (HMD). Dobitnik je dvije HMD stipendije, stipendije Europskog društva za mikroskopiju te stipendije organizacijskog odbora 16. Multinacionalnog mikroskopijskog kongresa (16MCM) za sudjelovanje na 4. Hrvatskom mikroskopijskom kongresu te na kongresu 16MCM. Dodatno, sudjeluje u izvođenju praktikumske nastave u sklopu kolegija Stanična i molekularna biologija, Biologija stanice, Uvod u elektronsku mikroskopiju, Elektronska mikroskopija te Laboratorijske stručne prakse, dok je kao komentor sudjelovao u izradi jednog diplomskog rada. Aktivno sudjeluje u popularizaciji znanosti te je 2022. bio koordinator manifestacije „Noć biologije“ na Zavodu za molekularnu biologiju, dok je 2023. bio suvoditelj manifestacije „Dana i noći na PMF-u“.