



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ



Dimitrija (N) Savić Zdravković

**EKOTOKSIČNOST NANOČESTICA OKSIDA
METALA I POTENCIJALNE METODE ZA
NJIHOV BIOMONITORING U AKVATIČNIM
EKOSISTEMIMA
DOKTORSKA DISERTACIJA**

Текст ове докторске дисертације ставља се на увид јавности,
у складу са чланом 30., став 8. Закона о високом образовању
("Сл. гласник РС", бр. 76/2005, 100/2007 – аутентично тумачење, 97/2008, 44/2010,
93/2012, 89/2013 и 99/2014)

НАПОМЕНА О АУТОРСКИМ ПРАВИМА:

Овај текст сматра се рукописом и само се саопштава јавности (члан 7. Закона о ауторским
и сродним правима, "Сл. гласник РС", бр. 104/2009, 99/2011 и 119/2012).

**Ниједан део ове докторске дисертације не сме се користити ни у какве сврхе,
осим за упознавање са њеним садржајем пре одбране дисертације.**

Niš, 2020.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS



Dimitrija (N) Savić Zdravković

**ECOTOXICITY OF METAL OXIDE
NANOPARTICLES AND POTENTIAL
METHODS OF THEIR BIOMONITORING IN
AQUATIC ECOSYSTEMS**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2020.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор: Др Ђурађ Милошевић, ванредни професор на департману за Биологију и Екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу

Наслов: Екотоксичност наночестица оксида метала и потенцијалне методе за њихов биомониторинг у акватичним екосистемима

Резиме: Ово истраживање тиче се екотоксикологије нерастворљивих наночестица оксида метала, које се таложу на дну водених система и тиме утичу на заједнице хидробиоценоза: титанијум диоксида, нано- TiO_2 (користи се као боја у људској исхрани), церијум оксида, нано- CeO_2 (користи се у аутомобилској индустрији) и гвожђе оксида, нано- Fe_3O_4 (магнетне наночестице произведене за употребу у медицини).

Помоћу савремених метода извршена је детаљна карактеризација наночестица (за анализу специфичне површине-БЕТ; површинске хемије-ХПС; фазног састава и кристалне структуре-ХРД; за величине и агрегације наночестица, као и фотографисање узорака-ТЕМ, СЕМ и АФМ; квалитативно и квантитативно одређивање елемената-ЕДХ; хидродинамичког пречника, индекса полидисперзитета и ζ потенцијала-ДЛС, као и *in situ* карактеризацију у експерименталном седименту-ЕДХ и СЕМ). Спроведени су мултипараметарски биолошки тестови, на основу ОЕЦД протокола, на акватичним модел организмима, Chironomidae (Diptera): *Chironomus tentans* и *Chironomus riparius*. Анализиран је низ стандардних (морталитет, преживљавање, време, стопа и одлагање развића), као и нестандартних биомаркера (оксидативни стрес - липидна и протеинска оксидација, активност супероксид дисмутазе и каталазе, изражени преко укупне количине протеина; *in vivo* генотоксичност анализом оштећења ДНК; промена концентрације хемоглобина; промена морфолошке варијабилности). Први пут у досадашњој литератури употребљен је метод геометријске морфометрије за свеобухватна испитивања токсичности наночестица.

Доказана је биоакumulација свих наночестица од стране модел организама. Утврђена је сублетална токсичност наночестица оксида титанијума, церијума и гвожђа, док је у случају нано- TiO_2 утврђен и летални ефекат. Модификовани ОЕЦД протокол број 218 са употребом *C. riparius* модел организма, подлоге од финог кварцног песка, детаљне карактеризације наночестица, анализе биоакumulације, стандардних и комплементарних сублеталних биомаркера, омогућава ефикасну процену токсичности и мониторинг наночестица у акватичним екосистемима.

Научна област: Биологија
Научна дисциплина: Екотоксикологија

Кључне речи: Наночестице, хирономиде, *Chironomus*, биолошки тестови, биомаркери, ОЕЦД протокол, геометријска морфометрија, титанијум диоксид TiO_2 , церијум оксид CeO_2 , гвожђе оксид Fe_3O_4

УДК: 502/504:615.9+546.6:574.57

CERIF класификација: В 003; В 260

Тип лиценце Креативне заједнице: **CC BY-NC-ND**

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor: PhD Djuradj Milošević, associate professor, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš

Title: Ecotoxicity of metal oxide nanoparticles and potential methods of their biomonitoring in aquatic ecosystems

Abstract: This research deals with ecotoxicity of insoluble metal oxide nanoparticles, that deposit at the bottom of aquatic ecosystems and therefore influence the hydrobiocenosis community: titanium dioxide nano-TiO₂ (used as a food colour), cerium oxide nano-CeO₂ (used in the automotive industry) and iron oxide nano-Fe₃O₄ (magnetic particles manufactured for medicinal use).

Detailed characterisation of examined nanoparticles was conducted through contemporary analytical methods (for the analysis of specific surface-BET; surface chemistry-XPS; phase and crystal structure-XRD; size, aggregation and sample photographing-TEM, SEM and AFM; qualitative and quantitative element analysis-EDX; hydrodynamic diameter, polydispersity index and ζ-potential-DLS; *in situ* nanoparticle characterisation in the experimental sediment-EDX and SEM). Multiparametric bioassays were conducted, according to the OECD protocol, on aquatic model organisms: Chironomidae (Diptera): *Chironomus tentans* and *Chironomus riparius*. A series of standard (mortality, survival rate, developmental time and rate and emergence delay), as well as nonstandard biomarkers were analysed (oxidative stress-lipid and protein oxidation, SOD and CAT activity, expressed by total protein content; *in vivo* genotoxicity via DNA damage analysis; haemoglobin concentration; morphological variability change). For the first time in known literature geometric morphometric method was used for comprehensive nanoparticle toxicity analysis.

Bioaccumulation of all tested nanoparticles by model organisms has been proven. The sublethal toxicity of titanium, cerium and iron oxide nanoparticles was determined, while in the case of nano-TiO₂, a lethal effect was observed as well. Modified OECD protocol number 218 that implies using *C. riparius* as model organism, fine quartz sand substrate, detailed nanoparticle characterization, bioaccumulation analysis, analysis of standard and complementary sublethal biomarkers, enables efficient assessment of toxicity and monitoring of nanoparticles in aquatic ecosystems.

Scientific Field: Biology
Scientific Discipline: Ecotoxicology

Key Words: nanoparticles, aquatic midges, Chironomus, bioassays, biomarkers, OECD protocol, geometric morphometrics, titanium dioxide TiO₂, cerium oxide CeO₂, iron oxide Fe₃O₄

UDC: 502/504:615.9+546.6:574.57

CERIF Classification: B 003; B 260

Creative Commons License Type: CC BY-NC-ND

MENTORI:

dr Đurađ Milošević, vanredni profesor
Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za Biologiju i Ekologiju

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Milica Stojković-Piperac, docent
Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za Biologiju i Ekologiju

Dr Vladimir Cvetković, docent
Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za Biologiju i Ekologiju

Dr Aleksandra Zarubica, redovni profeor
Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za Hemiju

Dr Stoimir Kolarević, viši naučni saradnik
Institut Za Biološka Istraživanja “Siniša Stanković”, Beograd

Datum odbrane _____



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Димитрија Савић Здравковић
Ментор, МН:	Ђурађ Милошевић
Наслов рада, НР:	Екотоксичност наночестица оксида метала и потенцијалне методе за њихов биомониторинг у акватичним екосистемима
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2020.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО: (поглавља/страна/цитата/табела/слика/графика/прилога)	8 поглавља, 346 страна, 399 цитата, 81 табела, 74 слика, 0 графика, 9 прилога
Научна област, НО:	биологија
Научна дисциплина, НД:	екотоксикологије
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	Наночестице, хирономиде, <i>Chironomus</i> , биолошки тестови, биомаркери, ОЕЦД протокол, геометријска морфометрија, титанијум диоксид TiO_2 , церијум оксид SeO_2 , гвожђе оксид Fe_3O_4
УДК	502/504:615.9+546.6:574.57
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	

Извод, **ИЗ:**

Ово истраживање тиче се екотоксикологије нерастворљивих наночестица оксида метала, које се таложу на дну водених система и тиме утичу на заједнице хидробиоценоза: титанијум диоксида, нано-TiO₂ (користи се као боја у људској исхрани), церијум оксида, нано-СеО₂ (користи се у аутомобилској индустрији) и гвожђе оксида, нано-Fe₃O₄ (магнетне наночестице произведене за употребу у медицини).

Помоћу савремених метода извршена је детаљна карактеризација наночестица (за анализу специфичне површине-БЕТ; површинске хемије-ХПС; фазног састава и кристалне структуре-ХРД; за величине и агрегације наночестица, као и фотографисање узорака-ТЕМ, СЕМ и АФМ; квалитативно и квантитативно одређивање елемената-ЕДХ; хидродинамичког пречника, индекса полидисперзитета и ζ потенцијала-ДЛС, као и *in situ* карактеризацију у експерименталном седименту-ЕДХ и СЕМ). Спроведени су мултипараметарски биолошки тестови, на основу ОЕЦД протокола, на акватичним модел организмима, Chironomidae (Diptera): *Chironomus tentans* и *Chironomus riparius*. Анализиран је низ стандардних (морталитет, преживљавање, време, стопа и одлагање развића), као и нестандартних биомаркера (оксидативни стрес - липидна и протеинска оксидација, активност супероксид дисмутазе и каталазе, изражени преко укупне количине протеина; *in vivo* генотоксичност анализом оштећења ДНК; промена концентрације хемоглобина; промена морфолошке варијабилности). Први пут у досадашњој литератури употребљен је метод геометријске морфометрије за свеобухватна испитивања токсичности наночестица.

Доказана је биоаккумуляција свих наночестица од стране модел организама. Утврђена је сублетална токсичност наночестица оксида титанијума, церијума и гвожђа, док је у случају нано-TiO₂ утврђен и летални ефекат. Модификовани ОЕЦД протокол број 218 са употребом *C. riparius* модел организма, подлоге од финог кварцног песка, детаљне карактеризације наночестица, анализе биоаккумуляције, анализе стандардних и комплементарних сублеталних биомаркера, омогућава ефикасну процену токсичности и мониторинг наночестица у акватичним екосистемима.

Датум прихватања теме, **ДП:**

15.03.2019.

Датум одбране, **ДО:**

Чланови комисије, **КО:** Председник:

Члан:

Члан, ментор:

Образац Q4.09.13 - Издање 1



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Dimitrija Savić Zdravković
Mentor, MN :	Djuradj Milošević
Title, TI :	Ecotoxicity of metal oxide nanoparticles and potential methods of their biomonitoring in aquatic ecosystems
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2020.
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	8 chapters, 346 pages, 399 ref., 81 tables, 74 pictures, 9 appendixes
Scientific field, SF :	Biology
Scientific discipline, SD :	ecotoxicology
Subject/Key words, S/KW :	nanoparticles, aquatic midges, Chironomus, bioassays, biomarkers, OECD protocol, geometric morphometrics, titanium dioxide TiO ₂ , cerium oxide CeO ₂ , iron oxide Fe ₃ O ₄
UC	502/504:615.9+546.6:574.57
Holding data, HD :	library
Note, N :	/

Abstract, AB :	<p>This research deals with ecotoxicity of insoluble metal oxide nanoparticles, that deposit at the bottom of aquatic ecosystems and therefore influence the hydrobiocenosis community: titanium dioxide nano-TiO₂ (used as a food colour), cerium oxide nano-CeO₂ (used in the automotive industry) and iron oxide nano-Fe₃O₄ (magnetic particles manufactured for medicinal use). Detailed characterisation of examined nanoparticles was conducted through contemporary analytical methods (for the analysis of specific surface-BET; surface chemistry-XPS; phase and crystal structure-XRD; size, aggregation and sample photographing-TEM, SEM and AFM; qualitative and quantitative element analysis-EDX; hydrodynamic diameter, polydispersity index and ζ-potential-DLS; <i>in situ</i> nanoparticle characterisation in the experimental sediment-EDX and SEM). Multiparametric bioassays were conducted, according to the OECD protocol, on aquatic model organisms: Chironomidae (Diptera): <i>Chironomus tentans</i> and <i>Chironomus riparius</i>. A series of standard (mortality, survival rate, developmental time and rate and emergence delay), as well as nonstandard biomarkers were analysed (oxidative stress-lipid and protein oxidation, SOD and CAT activity, expressed by total protein content; <i>in vivo</i> genotoxicity via DNA damage analysis; haemoglobin concentration; morphological variability change). For the first time in known literature geometric morphometric method was used for comprehensive nanoparticle toxicity analysis.</p> <p>Bioaccumulation of all tested nanoparticles by model organisms has been proven. The sublethal toxicity of titanium, cerium and iron oxide nanoparticles was determined, while in the case of nano-TiO₂, a lethal effect was observed as well. Modified OECD protocol number 218 that implies using <i>C. riparius</i> as model organism, fine quartz sand substrate, detailed nanoparticle characterization, bioaccumulation analysis, analysis of standard and complementary sublethal biomarkers, enables efficient assessment of toxicity and monitoring of nanoparticles in aquatic ecosystems.</p>						
Accepted by the Scientific Board on, ASB :	15.03.2019.						
Defended on, DE :							
Defended Board, DB :	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="400 1041 611 1086">President:</td> <td data-bbox="611 1041 1455 1086"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="400 1086 611 1131">Member:</td> <td data-bbox="611 1086 1455 1131"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="400 1131 611 1180">Member, Mentor:</td> <td data-bbox="611 1131 1455 1180"></td> </tr> </table>	President:		Member:		Member, Mentor:	
President:							
Member:							
Member, Mentor:							

Образац Q4.09.13 - Издање 1

Veliku zahvalnost dugujem svojim mentorima, profesorima dr Đurađu Miloševiću i dr habil Borisu Jovanoviću. Hvala na otkrivanju lepota hidrobiologije i ekotoksikologije. Sled okolnosti je sprečio zvanično prisustvo dr Jovanovića na odbrani moje doktorske teze, što nikako ne umanjuje njegov doprinos realizaciji iste.

Hvala mojoj porodici i mojim divnim roditeljima Olgici i Nebojši. Bez vas ne bih bila tu gde jesam. Veliko hvala mom suprugu Marku na bezrezervnoj podršci i pomoći. Hvala mojim prijateljima na kreativnosti koju unose u svaki aspekt mog života i rada.

Zahvalnost dugujem i mojim dragim kolegama na neverovatnoj energiji, znanju i međusobnoj podršci tokom trajanja doktorskih studija. Hvala i biološkom društvu „Dr Sava Petrović“ koje je održalo moju pasiju prema proučavanju živog sveta Srbije.

Realizacija mojih istraživanja ne bi bila moguća bez saradnje sa nekoliko značajnih institucija, kolega i profesora. Pre svega hvala profesorima dr Vladimiru Žikiću i dr Ani Ivanović na otkrivanju metoda geometrijske morfometrije. Hvala Prof. dr Dušanu Paliću, upravniku Katedre za riblje bolesti i biologiju ribarstva Veterinarskog fakulteta, LMU univerziteta u Nemačkoj, na gostoprimstvu u svojoj laboratoriji u Minhenu. Hvala Odeljenju za nauku o materijalima i nanotehnološko inženjerstvo na TOBB Univerzitetu za ekonomiju i tehnologiju, u Ankari. Hvala Departmanu za Prirodne Nauke, Jozef Stefan Instituta i Internacionalnoj Postdiplomskoj Školi u Ljubljani. Hvala Departmanu za Animalnu Fiziologiju Fakulteta Nauke, Sveučilišta u Zagrebu. Hvala i Departmanu za Biohemiju Medicinskog Fakulteta, Univerziteta u Nišu.

I konačno, hvala mom bratu prof. Dr Aleksandru Milanoviću, upravniku Katedre za srpski jezik sa južnoslovenskim jezicima Filološkog fakulteta u Beogradu na savetima i lekturi teksta ove disertacije.

Ova doktorska disertacija je urađena u okviru projekta „Biosensing tehnologije i globalni sistem za kontinuirana istraživanja i integrisano upravljanje ekosistemima“ (Evidencioni broj: III43002) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, kao i ugovora 451-03-68/2020-14/200124 o finansiranju naučno istraživačkog rada Prirodno Matematičkog Fakulteta, Univerziteta u Nišu, u 2020. godini.

Autor

„Napredak i životna sredina nisu suprotnosti - oni se međusobno upotpunjuju. Bez adekvatne zaštite životne sredine, podriva se napredak; ali bez napretka zaštita životne sredine nije moguća“

- Lomborg, B., *the skeptical environmentalist*,
Cambridge University press, New York, 2001.

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	Nanotehnologija	5
1.1.1	Nanočestice u prirodi	8
1.1.2	Nanočestice oksida metala	12
1.1.2.1	Ekotoksičnost nanočestica oksida metala	13
1.1.2.2	nano-TiO ₂ titanijum dioksid nanočestice	16
1.1.2.3	nano-CeO ₂ cerijum oksid nanočestice	21
1.1.2.4	nano-Fe ₃ O ₄ gvožđe oksid nanočestice	28
1.2	Akvatična toksikologija	33
1.2.1	Ekotoksikološki testovi na slatkovodnim organizmima	35
1.2.1.1	Praćenje parametara (biomarkera) u ekotoksikološkim testovima	37
1.2.1.2	Ekotoksikološka ispitivanja akvatičnih sedimenata	42
1.2.1.3	Organizmi u ekotoksikološkim testovima (model-organizmi)	44
1.2.1.3.1	Hironomide kao model-organizmi	47
1.3	OECD - Organizacija za ekonomsku saradnju i razvoj	65
1.3.1	Smernice OECD za testiranje hemikalija	66
1.3.2	OECD i nanotehnologija	68
2	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	72
3	METODOLOGIJA	75
3.1	Karakterizacija nanočestica	76
3.1.1	nano-TiO ₂	79
3.1.2	nano-CeO ₂	80
3.1.3	nano-Fe ₃ O ₄	81
3.2	Postavka eksperimenata	83
3.2.1	Model-organizam (<i>Chironomus tentans</i> i <i>Chironomus riparius</i>)	88
3.2.2	Dizajn bioloških testova	92
3.2.2.1	Set eksperimenata za testiranje i odabir adekvatne podloge	92
3.2.2.2	Set eksperimenata za procenu toksičnosti nanočestica	95
3.3	Analiza biomarkera bioloških testova	103
3.3.1	Standardni parametri (stopa preživljavanja, mortalitet, vreme razvića, stopa razvića i mokra masa)	103
3.3.2	Bioakumulacija - procena količine unetih nanočestica (ICP-MS)	104
3.3.3	Tradicionalna morfometrija	108
3.3.3.1	Merenje dimenzija larvi	109
3.3.3.2	Merenje dimenzija mentuma	109
3.3.4	Geometrijska morfometrija	110
3.3.4.1	Priprema materijala za analize	111
3.3.4.2	Digitalizacija specifičnih tačaka	113
3.3.4.3	Procena variranja oblika i veličine	115
3.3.4.4	Metode obrade podataka i statističke analize	116
3.3.4.5	Metode eksploracije i vizuelizacije podataka	117
3.3.5	Oksidativni stres	119
3.3.5.1	Oksidativni stres izazvan CeO ₂ nanočesticama (ukupna količina proteina, MDA, SOD)	119

SADRŽAJ

3.3.5.2	Okisdativni stres izazvan Fe ₃ O ₄ nanočesticama (ukupna količina proteina, TBRAS, AOPP, SOD, CAT)	120
3.3.6	<i>In vivo</i> genotoksičnost	122
3.3.6.1	Kometa test	122
3.3.7	Analiza hemolimfe – procenat hemoglobina	123
3.4	Statističke analize podataka	124
4	REZULTATI	127
4.1	Rezultati karakterizacije nanočestica	128
4.1.1	nano-TiO ₂	128
4.1.2	nano-CeO ₂	128
4.1.3	nano-Fe ₃ O ₄	132
4.2	Rezultati analize biomarkera bioloških testova	140
4.2.1	Set eksperimenata za testiranje i odabir adekvatne podloge	140
4.2.1.1	Karakterizacija podloga od kvarcnog peska	140
4.2.1.2	Standardni parametri	141
4.2.1.3	Tradicionalna morfometrija	144
4.2.1.4	Geometrijska morfometrija	147
4.2.2	Set eksperimenata za procenu toksičnosti nanočestica	152
4.2.2.1	Ispitivanje toksičnosti TiO ₂ nanočestica	152
4.2.2.2	Ispitivanje toksičnosti CeO ₂ nanočestica	173
4.2.2.2.1	Set eksperimenata za ispitivanje toksičnosti CeO ₂ nanočestica na podlozi od krupnog peska	200
4.2.2.3	Ispitivanje toksičnosti Fe ₃ O ₄ nanočestica	212
5	DISKUSIJA	239
5.1	Odabir adekvatne podloge	240
5.2	Procena ekotoksičnosti nanočestica oksida metala	244
5.2.1	Ispitivanje toksičnosti nano-TiO ₂	247
5.2.2	Ispitivanje toksičnosti nano-CeO ₂	250
5.2.3	Ispitivanje toksičnosti nano-Fe ₃ O ₄	254
5.3	Odabir adekvatnih metoda za procenu ekotoksičnosti nanočestica oksida metala u akvatičnim ekosistemima	258
6	ZAKLJUČCI	269
7	LITERATURA	273
8	PRILOZI	328
	Izvod	337
	Summary	339
	Biografija i bibliografija autora	340
	Izjave autora	346

POGLAVLJE 1

Uvod

Stres je jedan od pokretača evolucije. Sposobnost reakcije na stresore je veoma značajna karakteristika svih živih sistema, i obratno, prirodan razvoj vrsta i ekosistema nije moguć bez postojanja prirodnih stresora koji su pokretači evolucije (Markert, 2012). Opseg variranja stresora u prirodi je uglavnom prilično konstantan i omogućava vrsti da se prilagodi promenama u okruženju. Odnedavno, međutim, promene u prirodi su intenzivne i drastične usled delovanja čoveka na životnu sredinu. Konstantni rast ljudske populacije doveo je do opšteg konzumerizma i prekomerne potrebe za potošnjom energije, što za posledicu ima poremećaj prirodnog balansa u životnoj sredini. Priroda se svakodnevno suočava sa antropogenim delovanjem, što podrazumeva i stres kroz konstantnu izloženost velikom broju novih, potencijalno štetnih, supstanci (ksenobiotika) u izuzetno visokim koncentracijama (Markert i sar., 2003). Dotok visokih koncentracija ksenobiotika i njihovo složeno dejstvo u prirodi umanjuju toleranciju organizama i mogućnost njihovog prilagođavanja na novonastale stresore. Još je Schneider, 1992, izneo vrlo alarmantne procene: tropske kišne šume nestaju brzinom od 1,5 hektara u sekundi; skoro 200 km² obradivog zemljišta pretvoreno je u pustinje, 10 do 100 vrsta nestane sa lica Zemlje svakoga dana, a preostali živi svet još uvek nije potpuno istražen. Schneider, 1992, je još tada predvideo da će se situacija pogoršati, te da će usled daljeg eksponencijalnog rasta ljudske populacije svakog dana 2700 tona hlorofluorokarbonskih i 51 milion tona ugljen-dioksida biti ispušteno u atmosferu, planeta će otopliti, zemljište se zakiseliti i velike količine UV zračenja će proći kroz atmosferu. Schneider, 1992, ističe da će velika količina pesticida biti korišćena, kako u razvijenim tako i u zemljama u razvoju, čija će analiza i kontrola biti nedovoljno sprovedena, zbog čega se neće znati njihov toksični uticaj na ljude i životnu sredinu. Današnji podaci ukazuju na to da je Schneider bio u pravu. Industrijski proizvedene hemijske supstance jedne su od najprisutnijih sredinskih stresora današnjice i predstavljaju najveći problem zagađenja životne sredine. Od 1981. vodi se inventar proizvedenih hemikalija koje su prisutne na evropskom tržištu, pod nazivom EINECS (eng. European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances), koji ukazuje na to da se 90% ukupne svetske godišnje proizvodnje sastoji iz oko 3000 supstanci (Markert i sar., 2003). Procenjuje se da se svakog dana proizvede oko 1200 novih supstanci, a jedan deo njih se proizvodi u koncentracijama koje mogu imati merljivi uticaj na životnu sredinu (Markert i sar., 2000).

Prirodne slatke podzemne i površinske vode su krajnji recipijenti najtoksičnijih supstanci kreiranih industrijskim, poljoprivrednim i generalno antropogenim aktivnostima (Anderson i

D'Apollonia, 1978). Kontrolisanje dotoka ovih ksenobiotika u prirodne vode je veoma zahtevan i težak proces, s obzirom na činjenicu da supstance uglavnom dospevaju u akvatične ekosisteme iz više izvora ili difuznim putevima (pogotovo kišnicom ili iz zemljišta). Akvatični ekosistemi poseduju fizičke, hemijske i biološke mehanizme za prilagođavanje na prisustvo ksenobiotika ili za njihovu asimilaciju. Međutim, ukoliko koncentracije zagađujućih supstanci premaše asimilativni kapacitet akvatične sredine, može doći do poremećaja ravnoteže u ekosistemu i velikih posledica po živi svet (Anderson i D'Apollonia, 1978).

Do nedavno, najveća pažnja posvećivana je zagađenju akvatičnih sredina putem komunalnih otpadnih voda ili preko fabrika za njihovu preradu i prečišćavanje. Glavni razlog ovome je velika fizička vidljivost ovih zagađivača, direktan uticaj na javno zdravlje, ali i česti pomori riba i narušavanje estetike recipijentnih voda. Smanjenje ekonomske, rekreacione i poljoprivredne koristi akvatičnih ekosistema usled prisustva toksičnih materija u njima predstavljalo je prvi razlog za pokretanje monitoring-programa za praćenje kvaliteta vode. Kasnije se fokus državnih vlada (kroz promene regulativa) preusmerio sa antropogenog na ekološki aspekt zagađenja voda, na zaštitu samih akvatičnih ekosistema i živog sveta u njima. Ova promena fokusa predstavlja važnu prekretnicu, pre svega zbog činjenice da akvatični organizmi imaju drugačije ekološke zahteve od ljudi i da kvalitet vode treba da zadovolji više standarde kako se ekološka ravnoteža ne bi narušila u akvatičnim ekosistemima. Štetne supstance u akvatičnim sredinama mogu direktno i jako brzo izazvati letalne efekte (akutni efekti u vidu povećanja smrtnosti organizama) ili pak mogu izazvati subletalne efekte na sposobnost organizama da se razvijaju, rastu i reprodukuju u datom ekosistemu tokom dužeg vremenskog perioda (hronični efekti) (Rand, 1995).

Radi jednostavnijeg razumevanja narednih pasusa, neophodno je definisati osnovne termine u ekotoksikologiji i procese koji su najznačajniji za razumevanje dizajna ekotoksikoloških ispitivanja akvatičnih ekosistema. Definicije navedene u daljem tekstu preuzete su iz knjige „Osnovi akvatične toksikologije“ (eng. „Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment“) (Rand, 1995).

U akvatičnoj sredini koncentracija, transformacija i dispozicija toksičnih agenasa, procesi koje se jednim imenom mogu nazvati „sredinska sudbina“ toksina (eng. environmental fate) zavise od sledećih faktora: fizičkih i hemijskih svojstava same supstance; fizičkih, hemijskih i bioloških osobina ekosistema i izvora i stepena unosa supstance u životnu sredinu.

Toksikološkim istraživanjima prikupljaju se podaci kojima se može predvideti sredinska koncentracija zagađujućih supstanci, pored čega se može odrediti i: mobilnost supstanci kroz specifične delove ekosistema; tip hemijskih i bioloških reakcija koje se događaju tokom transporta i nakon depozicije supstanci; hemijska forma (da li se nalazi u originalnom stanju ili u formi metabolita) i stabilnost svake hemijske forme date supstance.

U vodi, supstance se mogu naći u tri osnovna oblika (koji utiču na njihovu dostupnost organizmima – biodostupnost): a) rastvorene; b) vezane za biotičku ili abiotičku komponentu i suspendovane u vodenom stubu ili istaložene na dnu i c) inkorporirane i akumulirane u organizmima.

Sredinska dostupnost predstavlja proporciju ukupne količine supstance prisutne u svim ili nekim delovima sredine, koja može biti uključena u određene procese i podložna svim fizičkim, hemijskim i biološkim modifikacijama u toj sredini. Može se reći da je samo 30% neke supstance X sredinski dostupno za različite abiotičke hemijske reakcije jer je 70% ove supstance zarobljeno duboko u sedimentima i samim tim nedostupno. Ovaj termin zapravo određuje ukupnu količinu supstance potencijalno dostupnu organizmima.

Prosečno vreme koje supstanca provede u određenom delu ekosistema ili rezervoaru (voda, sediment, biotička komponenta) pre nego se ukloni nekim procesom naziva se rezidentno vreme ili vreme zadržavanja. Supstance koje dospeju u ekosistem mogu se, putem abiotičkih i biotičkih transformacija, konvertovati u druge hemijske forme. Biotransformacije koje nastaju usled uticaja biljaka, životinja i ostalih organizama utiču na sredinske koncentracije supstanci, a čak mogu dovesti do biodegradacije i potpunog uklanjanja supstance iz ekosistema.

Svi gore navedeni procesi u mnogome utiču na ekotoksikologiju štetnih supstanci u akvatičnim ekosistemima i osnova su za formiranje i dizajn ekotoksikoloških testova i studija.

U savremenoj zaštiti životne sredine teži se profilaktičkom pristupu, koji podrazumeva upotrebu velikog broja tehnika i disciplina za dobijanje pouzdanih informacija o nekadašnjem, trenutnom i budućem stanju životne sredine. U doba ekstenzivne ekspanzije hemijske i tehnološke industrije, neophodno je istim tempom usavršavati metode procene i monitoringa štetnog dejstva novonastalih supstanci i uspostaviti preventivne mere za kontrolu ovih stresora u akvatičnim ekosistemima.

1.1 Nanotehnologija

Richard Feynman je davne 1959. održao govor pod nazivom „ima dosta prostora na dnu“ (eng. “there is plenty of room at the bottom”), u kome je, ni ne znajući, izneo koncept nanotehnologije (Feynman, 1960). U ovom govoru Feynman nije konkretno pomenuo nanotehnologiju kao disciplinu tehnoloških nauka (koja će se definisati dvadesetak godina kasnije), već je sugerisao da će u budućnosti biti moguće precizno manipulirati atomima i molekulama. Izum skenirajućeg tunelskog mikroskopa¹ (eng. Scanning Tunneling Microscope) 1981. i otkriće fullerena² 1985. smatraju se prekretnicom eksperimentalnog napretka koja je dovela do pojave nanotehnologije 1980-ih (Hornýak i sar., 2008). Ne tako mnogo godina kasnije, nanotehnologija se smatra vodećom tehnologijom 21. veka, koja ima uticaj na sve aspekte društva na globalnom nivou.

Nanonauka i nanotehnologija danas podrazumevaju istraživanja i razvoj tehnologije na nivou atoma, molekula ili makromolekula (na skali veličine od 1 do 100 nanometara), koja omogućavaju osnovno razumevanje fenomena i materijala na nanoskali, kao i kreiranje i korišćenje struktura, uređaja i sistema koji ispoljavaju jedinstvene osobine i funkcije zbog svoje nanoveličine (Hornýak i sar., 2008). Razvoj nanotehnologije uključuje preciznu i kontrolisanu manipulaciju struktura nanoveličine i njihovu integraciju u veće komponente, sisteme i arhitekture (Hornýak i sar., 2018). Nove osobine i netipične funkcije se obično razvijaju kada se materijali smanje na skalu veličine ispod 100 nm (kritični prag veličine), tj. kada je minimum jedna njihova dimenzija manja od 1 mikrona, a veća od 1 nanometra. One se tada mogu smatrati nanočesticama ili nanomaterijalima (slika 1). Promena osobina nanomaterijala, u odnosu na iste materijale ”normalne” veličine (iznad 100 nm) ili njihove pojedinačne atome ili molekule, može se ispoljiti na fizičkom, hemijskom i biološkom nivou: neki materijali su čvršći i elastičniji (nano-rešetke od aerogela), ispoljavaju magnetna svojstva (nano-oksidi gvožđa), bolji su provodnici elektriciteta ili toplote (grafen), hemijski su reaktivniji ili bolje reflektuju svetlost (nano titanijum dioksid). U posebnim slučajevima, kritični prag veličine na kome se ispoljavaju specifične osobine materijala može biti ispod 1 nm (manipulacija atomima na oko 0,1 nm) ili

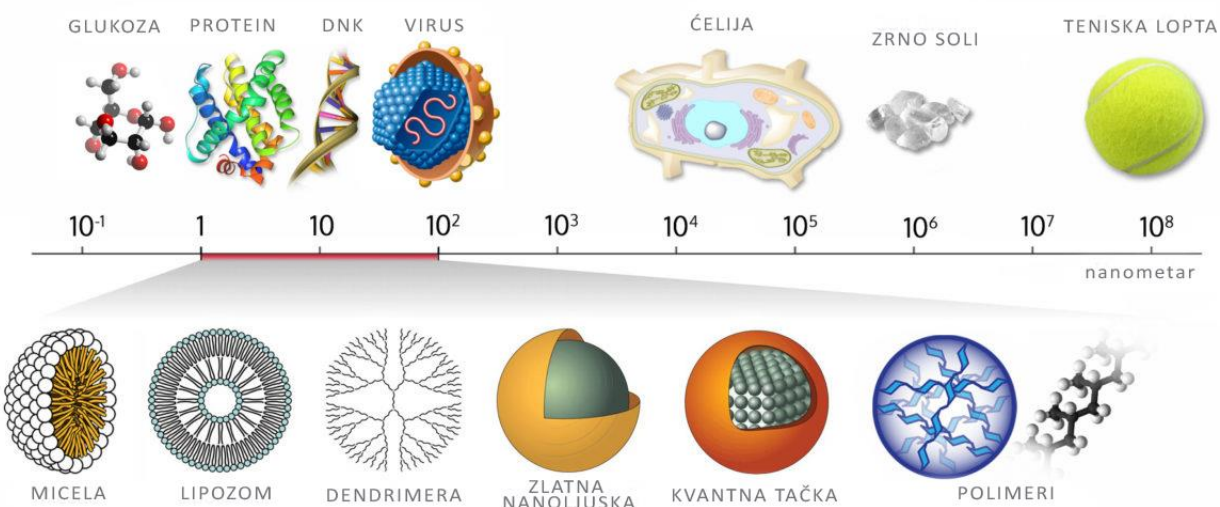
¹ Mikroskop kojim se vrši skeniranje i karakterizacija materijala sa visokom atomskom rezolucijom, zasnovan na principu tunelovanja elektrona.

² Alotropna modifikacija ugljenika. Molekul C₆₀ koji se sastoji iz 60 ugljenikovih atoma koji grade sfernu kristalnu rešetku. Jedan je od najupotrebljavanijih tipova nanočestica, poznatiji pod nazivom bakijeva lopta (eng. Buckyball).

iznad 100 nm (neki polimeri ojačani nanočesticama ispoljavaju specifične osobine već na oko 300 nm usled interakcije i formiranja veza sa nanočesticama) (Hornyak i sar., 2018). Proteklih godina radi se na tome da se nanotehnološka i biotehnološka otkrića ujedine kako bi se razvili novi nanomaterijali i nanosistemi koji će funkcionisati po biološkim principima, imitirajući rad bioloških sistema na nanoskali koji već funkcionišu kao nanomašine: ribozomi, membranski transporteri, receptori ili ćelijski signalni sistem (Moore, 2002; Perkel, 2003).

Radi stvaranja opšte slike o dimenzijama na kojima nanotehnologija funkcionise (slika 1), važno je naglasiti da je jedan nanometar milijarditi deo metra, te napraviti poređenje sa poznatim strukturama: tipična dužina veze dva atoma ugljika je od 0,12 do 0,15 nm, molekul vode je veliki oko 0,3 nm, prečnik dvostruke spirale DNK je oko 2 nm, a crvena krvna ćelija je široka oko 7000 nm (United Kingdom Royal Society, 2004).

Hornyak i sar., 2018., ističu da nanotehnologija može dovesti do nove industrijske revolucije zbog izuzetnih prednosti i pozitivnih aspekata koje sa sobom nosi. Broj kompanija koje se bave nanotehnologijom je sve veći, samo u Americi bilo ih je 35000 do 2018. godine; a sve je veći i broj nanotehnoloških patenata. Preko 500 institucija bavi se nanotehnologijom (uključujući nevladine organizacije, istraživačke laboratorije, ekonomske razvojne organizacije, univerzitete i obrazovne ustanove), što pruža mogućnost otvaranja novih radnih mesta i unapređenje mnogih grana nauke i industrije (Hornyak i sar., 2018). Naučna zajednica je u



Slika 1 – Poređenje veličina na nanoskali (nanomaterijali su veličine od 1 do 10^2 nm). Izvor (prevedeno na Srpski): <https://www.wichlab.com/nanometer-scale-comparison-nanoparticle-size-comparison-nanotechnology-chart-ruler-2>

potpunosti prepoznala potencijal nanotehnologije, pa postoji izuzetno veliki broj radova iz oblasti fizike, hemije, inženjstva, biologije i medicine koji se bave ovom tematikom. Koristi korišćenja nanotehnologije su ogromne, a još uvek se istražuje puni potencijal njihove primene. Nanomaterijali su našli primenu u optici, tekstilnoj industriji, medicini, kozmetici, prehrambenoj industriji, automobilske industriji, proizvodnji katalizatora i biosenzora, bioremedijaciji, preradi otpadnih voda i mnogim drugim sferama industrije (Roco, 2003; Freitas, 2005; Singh i sar., 1988).

Nanomaterijali se proizvode na dva osnovna načina: "bottom-up" pristupom, koji uključuje minijaturizaciju komponenti do nivoa atoma koji se procesom samoorganizovanja čestica (eng. self-assembly) kombinuju u veće jedinice (kristalizacijom, sol-gel sintezom, hemijskom depozicijom pare³ i sličnim procesima); ili "top-down" pristupom, koji započinje makroskopskim strukturama od kojih se kontrolisanim procesima stvaraju nanostrukture (mlevenjem u mlinovima, mehanohemijskim mlevenjem, kondenzacijom iz gasa, laserskom ablacijom⁴ i drugim procesima) (Chavali i Nikolova, 2019). Poslednjih godina razvio se i koncept "zelene sinteze" koji podrazumeva ekstrakciju nanočestica iz gljiva, algi, bakterija i biljaka u kojima različiti metaboliti deluju kao redukcionim agensima u sintezi nanočestica (Chavali i Nikolova, 2019). Proizvodnja nanomaterijala odvija se prema određenim pravilima koja propisuju svetske organizacije za postavljanje standarda, među kojima su vodeće: ISO tehnički komitet 229 za nanotehnologije, Švajcarska (eng. International Standardization Organization, ISO, Technical Committee 229 on Nanotechnologies); američki internacionalni komitet E56 za nanotehnologiju (eng. ASTM International Committee E56 on Nanotechnology); IEC – internacionalna elektrotehnička komisija, tehnički komitet 113, Engleska (eng. International Electrotechnical Commission Technical Committee 113) i IEEE savet za nanotehnologiju, Amerika (eng. The Institute of Electrical and Electronics Engineers, IEEE, Nanotechnology Council). Da bi se osigurala doslednost, ponovljivost i tačnost proizvodnje, moraju postojati standardi merenja (SI međunarodni sistem jedinica⁵), standardi dokumentovanja (procedure i

³ Hemijski metoda dobijanja nanočestica iz gasovite forme, taloženjem na određenom supstratu u vidu praha ili prevlaka.

⁴ Metoda dobijanja nanočestica putem uklanjanja materijala sa čvrste (ili povremeno tečne) površine ozračivanjem laserskim snopom.

⁵ Eng. The International System of Units, ima sedam osnovnih mera: dužina, masa, vreme, električna struja, termodinamička temperatura, količina materije i jačina svetlosti. Njihove merne jedinice su: metar, kilogram,

smernice za procese proizvodnje) i standardi za verifikaciju⁶ (referentni standardi za upoređivanje i verifikaciju kvantitativnih merenja).

Uprkos postojanju standardnih propisa i regulativa, a s obzirom na činjenicu da je nanotehnologija relativno nova i nedovoljno standardizovana tehnologija, može doći do nepreciznosti u pogledu proizvodnje i nemogućnosti kontrolisanja svih aspekata distribucije, emisije nanomaterijala, ali pre svega ponašanja u životnoj sredini i uticaja na biološke sisteme.

Iako rutinski monitoring prisutnih nanočestica u životnoj sredini još uvek nije uspostavljen, postoji potencijalna opasnost od hemijskih akcidenata i izlivanja nanočestica iz industrijskih proizvoda. Nanočestice mogu dospeti u životnu sredinu tokom njihovog korišćenja (putem raspadanja, namernog ispuštanja nanomaterijala u životnu sredinu tokom remedijacije kontaminiranih izvora, kao i drugih nekontrolisanih procesa) ili tokom gomilanja otpada (otpadne vode iz domaćinstava koje sadrže nanomaterijale poreklom iz korišćenih kućnih proizvoda, kao i čvrst otpad sačinjen od nanomaterijala), a još uvek ne postoje adekvatna postrojenja za prečišćavanje vode, zemljišta i vazduha od nanomaterijala. Iako već duži niz godina postoji zabrinutost od potencijalno štetnih posledica nanotehnologije, tek se proteklih godina počelo sa intenzivnim istraživanjem njihove ekotoksikologije i hemijskog ponašanja u životnoj sredini.

1.1.1 Nanočestice u prirodi

Nekada su jedine nanočestice u prirodi bile produkt prirodnih procesa: koloidi u vodi, čestice vulkanske prašine u vazduhu, raspršene morske soli, čestice nastale erozijom zemljišta i produkti prirodnog sagorevanja u šumskim požarima (Moore, 2006). Pored ovih prirodnih nanočestica, postoje indikacije da je čovek svojim aktivnostima doveo do ispuštanja nanozagađivača u životnu sredinu još pre razvoja nanotehnologije, iz postojećih industrijskih materijala, npr. kroz raspadanje guma automobila tokom vožnje (Handy i Shaw, 2007). Može se polemisati u vezi s činjenicom da nanomaterijali postoje u životnoj sredini već milionima godina i mogućnošću da su se organizmi na njih već prilagodili. Čak i da to jeste slučaj, nauka je tek

sekunda, amper, kelvin, mol i candela. Od osnovnih se izvode sekundarne mere, npr. snaga koja se meri u njutnima. Sve ove jedinice značajne su u nanotehnološkoj standardizaciji.

⁶ Standardni materijali sertifikovani od strane međunarodnih organizacija za standard, s poznatim karakteristikama koje su definisane SI jedinicama

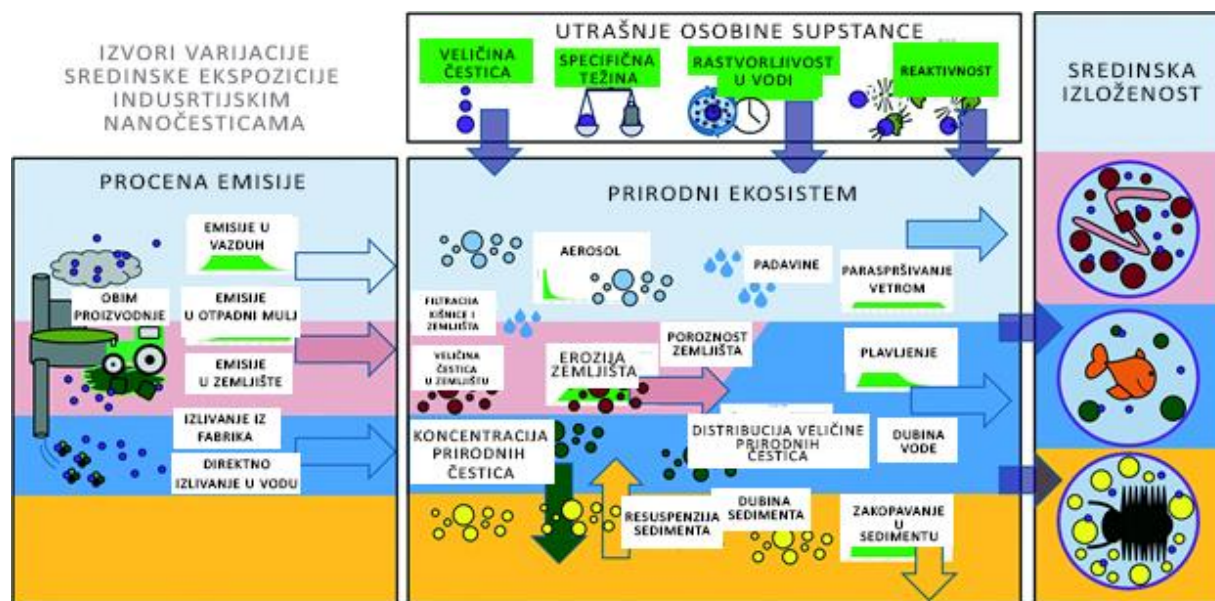
nedavno počela da obraća pažnju na nanosvet i još uvek je mnogo toga neotkriveno o ponašanju i interakciji nanočestica sa ostalim zagađivačima, kao i životnom ciklusu nanočestica u prirodi (Lead i Wilkinson, 2006). Treba uzeti u obzir i činjenicu da su fabrički nastale nanočestice veštačke tvorevine, dizajnirane da izvrše specifične funkcije, koje najverovatnije imaju potpuno drugačija fizička, hemijska i toksikološka svojstva u odnosu na prirodno nastale nanočestice.

Prisustvo fabrički proizvedenih nanomaterijala i nanočestica u životnoj sredini se u poslednje vreme čini neizbežnim, usled rastućeg broja nanoproduzoda (Roco, 2003; Aitken i sar., 2006; Boxall i sar., 2007), pa postoji opravdana zabrinutost oko ekoloških rizika koje nanotehnologija nosi. Ubrzana ekspanzija nanotehnologije dovela je do nedovoljne kontrole i neadekvatne procene rizika negativnog uticaja nanoproduzoda na ljude i životnu sredinu. Sve češća diskusija o regulaciji pravila proizvodnje u nanotehnološkom sektoru dovela je do pokretanja pitanja potencijalnih posledica upotrebe nanoproduzoda (Colvin, 2003; 2004; Warheit, 2004). U svom tekstu iz 2003, Perkel ističe da je u razvoj nanotehnologije u Americi uloženo preko 700 miliona dolara, od čega je samo 500.000 izdvojeno za procenu uticaja na životnu sredinu; Dowling u radu iz 2004. ističe da je budžet za period od 2005. do 2008. već premašio tri milijarde dolara u Americi, a u Evropi milijardu dolara. U Springerovom priručniku iz 2017. o nanotehnologiji navodi se da Amerika najviše ulaže u nanotehnologiju, preko 1,5 milijardi dolara godišnje (sa sledećom raspodelom budžeta: 35% za fundamentalna istraživanja, 24% za razvoj uređaja, sistema i aplikacija, 19% za razvoj kolaboracije, 16% za infrastrukturu i implementaciju, a samo 7% za procenu uticaja na javno i ekološko zdravlje i bezbednost), potom slede Evropa, sa 1,1 milijardom godišnje i ukupnim budžetom od 77 milijardi evra, za period od 2014. do 2020, i Japan, sa budžetom od 550 milijardi jena (2014–2020) (Bhushan, 2017). Fokus agencija za zaštitu životne sredine i zdravstvenih organizacija preusmerio se ka ispitivanju potencijalnih toksikoloških i patoloških posledica korišćenja proizvoda koji sadrže nanočestice po ljudsko zdravlje i zdravlje životne sredine, pre svega usled primene nanotehnologija u medicini i razvoja nanotehnoloških sistema za transport lekova kroz ljudski organizam (Elsaesser i sar., 2010; Sanvices i Marco, 2008; Dowling, 2004; Moore, 2002; Warheit, 2004).

Jedan od osnovnih koraka u kvantifikaciji rizika od novonastale supstance ili polutanta u životnoj sredini jeste određivanje izloženosti (ekspozicije) organizama, što podrazumeva procenu koncentracije te supstance u prirodi. Sa analitičke tačke gledišta, postoji još mnogo problema u detekciji fabrički proizvedenih nanomaterijala u uzorcima iz prirode, pogotovo ukoliko je

potrebno izdvojiti prirodne od veštački nastalih nanočestica (Coll i sar., 2016; Wagner i sar., 2014; Tsakovska i Worth, 2009). Podaci o analizi uzoraka iz prirode su uglavnom dobijeni TEM mikroskopijom (eng. Transmission Electron Microscopy – TEM) ili ICP-MS spektrofotometrijom (eng. Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry), pri čemu je vrlo često teško razlikovati fabričke od prirodnih nanočestica (Coll i sar., 2016).

Usled male količine podataka sa terena o koncentraciji nanočestica u životnoj sredini, procena predviđene sredinske koncentracije (eng. Predicted Environmental Concentrations – PEC) vrši se pomoću matematičkih modela protoka čestica u prirodi (*in silico* pristup), što može biti od velike koristi za procenu izloženosti prirodnih ekosistema ovim materijama (Berggren i sar., 2015). Modeli su godinama usavršavani, ali jedni od najpotpunijih PEC modela za nanočestice korišćeni su u radovima Gottschalk i sar., 2009; Piccinno i sar., 2012; Sun i sar., 2014 i Meesters i sar., 2014. U pomenutim studijama razvijeni su modeli za verovatnoću protoka nanočestica kroz prirodne sisteme (eng. probabilistic material flow modeling), a validnost modela potvrđena je na osnovu terenskih istraživanja prisustva nanočestica u životnoj sredini. Većina *in silico* studija rađena je na najčešće korišćenim nanočesticama (nano-TiO₂, nano-Ag, nano-ZnO, karbonske nanocevi i fulereni) pri čemu se pokazalo da se visoke koncentracije nanočestica mogu naći u zemljištu i u vodama, a pre svega sedimentima, kao krajnjim



Slika 2 - Ilustrativni pregled uzroka varijabilnosti u izlaganju životne sredine nanočesticama (ujedno i uzroka nesigurnosti procene njihovog prisustva u ekosistemima): nesigurnost procene emisija i samih unutrašnjih osobina industrijskih nanočestica, kao i prirodne varijabilnosti delova ekosistema (preuzeto iz rada Meesters i sar., 2016, prevedeno na Srpski).

recipijentima materija iz svih delova ekosistema (slika 2).

Procena prisustva nanočestica u životnoj sredini (bilo direktno ili putem modela) izuzetno je zahtevna, pre svega zbog reaktivnosti nanočestica, njihove aglomeracije⁷ i sedimentacije⁸, kao i promenljivosti godišnje produkcije i potrošnje nanomaterijala (Col li sar., 2016). Najsloženiji model za sredinsku procenu fabričkih nanočestica u životnoj sredini koji uzima u obzir procese agregacije, vezivanja i rastvaranja (slika 2) pokazao je sledeću distribuciju nanočestica (od najviše do najniže koncentracije): zemljište, akvatični sedimenti, površinske vode i vazduh. Pri tome je predviđeno da "slobodnih" nanočestica ima u vazduhu, dok u ostalim delovima one formiraju homoagregate ili heteroagregat, usled čega menjaju svojstva (Meesters i sar., 2016; 2014). Pomentuti model, pod nazivom "SimpleBox4Nano-SB4N", razvijen je prema regionalnom modulu distribucije Evropske unije za procenu supstanci (eng. European Union System for the Evaluation of Substances – EUSES), koji koristi REACH regulacije Evropske unije, tj. regulacije registracija, evaluacija, autorizacija i restrikcija hemikalija (eng. Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals – REACH) kao smernice u proceni izloženosti hemikalijama u životnoj sredini (Meesters i sar., 2016; 2014; ECHA, 2008). Detektovanje i kvantifikovanje nanočestica u kompleksnim prirodnim sistemima ostaje veliki izazov za današnje naučnike, međutim *in silico* modeli u mnogome pomažu predikciju, detekciju i monitoring stanja u prirodi (Coll i sar., 2015), te predstavljaju jednu od polaznih tačaka ekotoksikologije nanočestica. Evidentno je da je neophodno izvršiti procenu rizika za svaku formu nanočestice koja može postojati u prirodi, a samim tim povećati i broj podataka i preciznost kompjuterskih modela, čime bi se i ostali vidovi ekotoksikoloških ispitivanja nano-MO usavršili.

Evropski parlament naglašava neophodnost ekotoksikološkog testiranja bezbednosti novofabrikovanih nanomaterijala i stroge uslove proizvodnje. Postoji niz nerazrešenih pitanja u ekotoksikološkom ispitivanju nanočestica (pre svega u pogledu međunarodnog usklađivanja metodologije ispitivanja, a potom i same karakterizacije u prirodnim i laboratorijskim uslovima, procene uticaja na žive organizme i razumevanja mehanizama njihovog delovanja). Ovo isražavanje tiče se upravo tih značajnih nerazrešenih pitanja ekotoksikološkog ispitivanja nanočestica, pre svega u akvatičnim ekosistemima.

⁷ Međusobno spajanje čestica, usled čega se formiraju veće nakupine u suspenziji, a predstavlja mehanizam koji vodi ka funkcionalnoj destabilizaciji koloidnih sistema.

⁸ Taloženje čvrstih čestica iz tečne faze, uglavnom delovanjem gravitacije.

1.1.2 Nanočestice oksida metala

Nanočestice se mogu podeliti u nekoliko klasa: karbonski nanomaterijali (sastavljeni od ugljenika: fulereni, nanocevi i nanožice); oksidi metala; poluprovodnici (poluprovodni kristali, poznatiji kao kvantne tačke); multivalentni metali (nanosrebro, nanozlato, nanogvožđe) i nanopolimeri (dendromeri, kompleksni multifunkcionalni polimeri) (Bhatt i Tripathi, 2011). Među industrijskim nanomaterijalima oksidi metala spadaju u najšire primenjivane: cink oksid (ZnO), titanijum dioksid (TiO₂), cerijum dioksid (CeO₂), hrom dioksid (CrO₂), molibden trioksid (MoO₃), bizmut trioksid (Bi₂O₃), gvožđe oksid (FeO_x) i binarni oksidi, kao što su litijum kobalt dioksid (LiCoO₂) i indijum tinoksid (InSnO) (Bhatt i Tripathi, 2011). Piccinno i sar., 2012., procenili su da svetska produkcija nanočestica oksida metala i ugljeničnih nanovlakana dostiže između 100 and 1000 tona godišnje.

Nanočestice oksida metala (u daljem tekstu nano-OM) proizvode se putem nekoliko tehnoloških pristupa kojima se menjaju i kontrolišu njihove osobine. Stabilizovana precipitacija i piroliza⁹ su dve najčešće metode koje se koriste za njihovu sintezu (Chavali i Nikolova, 2019). Reakcioni mehanizmi, a samim tim i funkcionalnost nano-OM, zavise od njihovog sastava, kristalne strukture, morfologije, površinske geometrije i stehiometrije¹⁰, interakcije između faza i drugih fizičkih i hemijskih osobina (Chavali i Nikolova, 2019).

Svojstva nano-OM, koja ih čine neophodnim alatom u savremenoj nanotehnologiji, jesu njihova različita nelinearna optička svojstva, visoka elastičnost na povišenim temperaturama, mogućnost hladnog zavarivanja, superparamagnetno ponašanje, jedinstvena osetljivost i provodljivost, katalitička i selektivna aktivnost, neobična adsorptivna svojstva, brza difuzivnost, ali i potencijalna nestabilnost u određenim uslovima (Chavali i Nikolova, 2019). Ova svojstva dovela su do široke primene nano-OM u mnogim industrijama: medicini, prehrambenoj industriji, poljoprivredi, informacionim tehnologijama, biomedicini, elektroni, katalitici i energetici. Jedno od hemijskih svojstava nano-OM, koje je dovelo do njihove široke primene u zaštiti životne sredine, jeste neverovatna sposobnost da hemijski apsorbuju širok spektar molekula, posebno organskih čestica koje se smatraju štetnim za životnu sredinu (Mohan i Renjanadevi, 2016). Pored toga, pokazalo se da nano-OM mogu da deluju kao potencijalni

⁹ Metode precipitacije zasnivaju se na kreiranju nanočestica iz prekursora putem taloženja čestica iz rastvora, a metode pirolize na kreiranju nanočestica iz prekursora putem intenzivnog zagrevanja.

¹⁰ Odnos između relativnih količina supstanci koje učestvuju u formiranju nanosjedinjenja.

antioksidanti, zbog svojih katalitičkih osobina i velike površine, te se veliki napori poslednjih godina ulažu u razvoj nanomaterijala za medicinsku upotrebu, što je u velikoj meri povećalo njihovu proizvodnju.

S obzirom da su nano-OM prisutni u velikom broju proizvoda, došlo je do njihovog prekomernog ispuštanja u prirodu (Mahaye i sar., 2017) u različitim stadijumima njihovog “životnog ciklusa” (Klaine i sar., 2012), a u velikim količinama su detektovane u postrojenjima za prečišćavanje voda (Bäuerlein i sar., 2017; Sun i sar., 2014; Gottschalk i sar., 2009) i u rečnim sistemima (Markus i sar., 2016; Gottschalk i sar., 2013; Musee, 2011; Gottschalk i sar., 2009).

1.1.2.1 Ekotoksičnost nanočestica oksida metala

Uzimajući u obzir obim proizvodnje nano-OM, najrelevantniji nanomaterijali sa aspekta ekotoksikologije i zaštite životne sredine jesu, pre svega, TiO_2 i SiO_2 (mada je Si metaloid) (u svetu je proizvedeno preko 10.000 tona samo u 2010. godini), a njih prate CeO_2 , FeO_x , AlO i ZnO (Bundschuh i sar., 2018). Globalne procene emisija nano-OM ukazuju na to da deponije (od 63% do 91%) i zemljište (od 8% do 28%) primaju najveće količine nano-OM putem direktnog izlivanja, a potom slede akvatična sredina (7%) i vazduh (1,5%) (Bundschuh i sar., 2018). Kretanje i protok nanočestica dalje od mesta izlivanja kroz ekosisteme još uvek su nedovoljno proučeni, ali postoji velika opasnost po vodene ekosisteme kao krajnje recipijente svih zagađujućih materija u prirodi (Bundschuh i sar., 2018).

Prekomerno ispuštanje nano-OM uslovalo je zabrinutost naučne zajednice oko potencijalnih posledica po životnu sredinu (Oberdörster i sar., 2005), pre svega po akvatične organizme, uključujući bakterije (Kaweeteerawat i sar., 2015), makrobeskičmenjake (Galloway i sar., 2010; Park i Choi, 2010; Buffet i sar., 2013) i ribe (Chen i sar., 2011; Mohmood i sar., 2015; Rocco i sar., 2015; Kaya i sar., 2016). U životnoj sredini nanočestice mogu izazvati štetne posledice na tri načina: indirektnim efektima u spoljašnjoj sredini (stvaranje slobodnih jona i radikala kiseonika – ROS¹¹; modifikacija dostupnih nutrijenata; zasenčenje, tj. odbijanje svetlosti); direktnom interakcijom sa površinom organizama (fizičko oštećenje membrana;

¹¹ Eng. Reactive Oxygen Species, veoma nestabilni i reaktivni atomi, molekuli ili joni sa jednim ili više nesparenih elektrona.

ulazak preko površine endocitozom) i intracelularnim putem (nakon ulaska u organizam) (Zhao i sar., 2020).

Većina studija pokazuje da nanočestice u koncentracijama pronađenim u prirodi ne mogu da izazovu snažne toksične efekte, ali mogu imati uticaja na molekularnom nivou (Bayat i sar., 2015; Lee i sar., 2009). U radu Lee i sar., 2015., pokazalo se da nano-OM nisu imale uticaj na mortalitet, rast i reprodukciju hironomida i dafnija, ali da su efekti primećeni na genetskom nivou, dok se u radu Clemente i sar., 2013, pokazalo da nano-TiO₂ nije indukovao mortalitet kod riba *Piaractus masopotamicus*, ali je pokazao subletalne efekte. U većini dosadašnje literature, kako u ekperimentalnim (Schmid i sar., 2010; Piccinno i sar., 2012; Bäuerlein i sar., 2017) tako i u studijama modelovanja (Markus i sar., 2016; Sun i sar., 2014; Gottschalk i sar., 2013; Hendren i sar., 2013; Musee, 2011), ističe se da su trenutne koncentracije nano-OM veoma niske u životnoj sredini (uključujući otpadne vode, slatkovodne ekosisteme i poljoprivredna zemljišta) i da one mogu izazvati uglavnom subletalne efekte na molekularnom nivou pre nego na nivou organizama i populacija. Shodno tome, preporučljivo je pre svega ulagati napore u razvoj metoda za procenu uticaja nano-OM koje će se zasnivati na subletalnim parametrima, kao ranim pokazateljima zagađenja životne sredine.

Coll i sar., 2015., su izvršili metaanalizu dostupne literature koja se tiče ekotoksikologije nanočestica (konkretno tri nano-OM: nano-TiO₂, nano-Ag i nano-ZnO, kao i karbonskih nanocevi i fulerena) procenjene studijama na živim organizmima (uticaj na preživljavanje, rast, reprodukciju i promene u značajnim metaboličkim procesima kod test-organizama izloženih u okviru slatkih voda, zemljišta i sedimenta). Potom je, pomoću dobijenih podataka, izračunata verovatnoća distribucije osetljivosti vrsta (eng. Species Sensitivity Distributions – SSD) za svaku vrstu pronađenu u literaturi. Za procenu SSD modelovan je raspon osetljivosti vrsta u odnosu na određene nanočestice, čime je izvršena procena vrsta potencijalno pogođenih datom nanočesticom u prirodi, kao i procena koncentracija nanočestica koje, ukoliko se prekorače, upozoravaju na neophodnost preduzimanja mera sanacije. Na primer, ukoliko je SSD ispod 5%, to ukazuje da 95% vrsta nije pogođeno prisustvom nanočestica, dakle da su koncentracije u okvirima dozvoljenog opsega tolerancije (Garner i sar., 2015). Na osnovu ovih podataka određuje se i srazmera karakterizacije i rizika (eng. Risk Characterization Ratio – RCR), parametar koji poredi osetljivost vrste sa verovatnoćom izloženosti određenom nanočesticom, čime se dobija procena rizika od prisustva nanočestica u određenom delu ekosistema (Garner i

sar., 2015). Što više podataka je dostupno, to su predikcije validnije. Međutim, broj i kvalitet dostupnih literaturnih podataka je nezadovoljavajući. Iz literature je pronadjeno preko 600 podataka, od kojih je 431 uključen u analizu. Najveći broj studija se fokusira na slatkovodne ekosisteme, potom na zemljište i najmanji broj na sediment. Za slatkovodne sedimente Coll i sar., 2015, nisu pronašli ni jedan podatak (postoji i mali broj radova na otpadnom mulju, morskoj vodi i estuarima) iako se oni smatraju najvećim depoom zagađujućih supstanci u prirodi. Pokazalo se da su ispitivanja vršena na preko 20 različitih model-organizama, a da su najzastupljeniji *Daphnia magna* i *Danio rerio*. Primećen je širok opseg variranja osetljivosti vrsta među studijama, npr. za vrstu *Daphnia magna* odgovor na nano-TiO₂ bio je u rasponu od šest reda veličine između najviše i najniže koncentracije bez primetnih efekata – NOEC vrednosti (eng. No-Observed-Effect Concentration – NOEC); a pet reda veličine za *Daphnia magna* i *Danio rerio* što se tiče nano-Ag. Najčešći opseg za sve organizme je od tri do četiti reda veličine. Što se RCR vrednosti tiče, pokazalo se da postoji veći rizik od izloženosti nano-OM nego od ugljeničnih nanočestica (pri čemu su koncentracije reda veličine u µm po litru vode; µm po kg zemljišta i mg po kg sedimenta). Većina pomentih studija vršena je na pojedinačnim vrstama (uz praćenje letalnih parametara) i pojedinačnim stresorima, u koncentracijama mnogo većim od sredinski relevantnih, što ukazuje na nepouzdanost interpretacije dosadašnjih rezultata i neophodnost dizajniranja novih, složenijih multiparametarskih studija.

Skorašnje studije ukazuju na potencijal indirektnog uticaja nano-OM na organizme, pre svega makrobeskičmenjake, putem lanaca ishrane. Antisari i sar., 2016., pokazali su da nano-Co izaziva redukciju biomase i promenu strukture zajednice zemljišnih mikroorganizama, čime se delimično može objasniti promena u sastavu masnog tkiva kišnih glista koje se njima hrane u zemljištu. Unošenje nano-TiO₂ putem hrane (ingestijom) pokazalo se kao jedan od važnijih puteva unosa, kako za terestrične (Jemec i sar., 2016) tako i za akvatične beskičmenjake (Lüderwald i sar., 2019), pre svega jer nano-TiO₂ može biti vezan za mikroorganizme koje ove vrste koriste u ishrani. U akvatičnim ekosistemima primećene su strukturne (Bour i sar., 2016; Das i sar., 2012) i funkcionalne (Tlili i sar., 2017; Pradhan i sar., 2011) promene usled prisustva nano-OM kao što su poremećaji procesa fotosinteze ili dekompozicije, mada pri vrlo visokim koncentracijama. Ovi primeri ukazuju na to da nano-OM mogu uticati na same jedinice određenih vrsta, ali da pritom mogu izazvati i promene u interakcijama vrsta na različitim nivoima trofičke organizacije (Kalčíková i sar., 2014). Potrebno je posvetiti posebnu pažnju mehanizmima koji

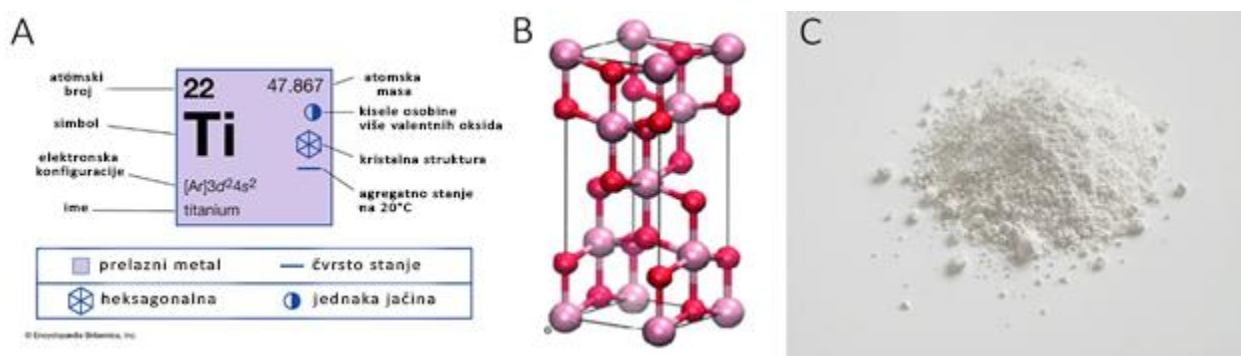
pokreću ove indirektno promene i posledicama tih promena po čitave mreže ishrane, koje još uvek nisu dovoljno proučene i razrešene.

S obzirom na navedene činjenice, neophodno je, pre svega, uskladiti metodologiju testiranja toksičnosti nanočestica, a potom i uspostaviti monitoring slatkovodnih ekosistema sa fokusom na procenu njihovog prisustva i uticaja na biotičku komponentu. U daljem tekstu će najviše pažnje biti posvećeno nanočestičnim oksidima titanijuma, cerijuma i gvožđa (nano-TiO₂, nano-CeO₂ i nano-Fe₃O₄), čija ekotoksičnost je i predmet ovog rada.

1.1.2.2 Nano-TiO₂ titanijum dioksid nanočestice

Titanijum je metal sa atomskim brojem 22, koji je široko rasprostranjen (sačinjava čak 0,44% zemljine kore). Ima ga u skoro svim stenama, pesku, glini i zemljištu, a prisutan je i u biljkama i životinjama, vodenim ekosistemima, dubinskim iskopinama, pa čak i na meteorima i zvezdama (Vevers i Jha, 2008).

Titanijum dioksid ili titanijum (IV) oksid je prirodni oksid titanijuma, čija je formula TiO₂ (slika 3). Prirodno pronađeni oksidi se kopaju u rudnicima, u pukotinama na tektitima, ili se mogu naći kao lamele u anatasu iz hidrotermalnih vrela. Prirodna forma TiO₂ ima relativno nisku gustinu te se proizvodi laboratorijski za industrijsku upotrebu. Najčešća metoda za proizvodnju titanijum dioksida, sa velikim značajem u nanotehnologiji, jeste hidrotermalna sinteza iz minerala anatasa.



Slika 3 - A – element titanijum i njegove hemijske osobine; B – TiO₂ anataska kristalna struktura; C – izgled nano-TiO₂ praha E171 bele boje za hranu. (Izvor: <https://www.britannica.com/science>; https://www.researchgate.net/figure/Crystal-structures-of-TiO-2-a-anatase-b-rutile-and-c-brookite-adapted-from_fig1_326011015; <https://www.foodnavigator.com/Article/2019/10/31/Anti-E171-campaigners-call-for-independent-and-clear-research>).

Iako je vekovima bio poznat iz minerala, titanijum dioksid je postao komercijalno značajan prošlog veka kada je postao zamena za belo olovo u bojama i kada je Akira Fujishima otkrio njegove fotokatalitičke¹² osobine (Fujishima i Honda, 1972). U njegovu čast, proces koji se odvija na površini kristala titanijum dioksida se naziva "Honda-Fudžišima efekt". Otkriveno je da nano-TiO₂ uz pomoć energije sunca razlaže vodu na vodonik i kiseonik, pri čemu se izbacuje vodonik, a nastali aktivni kiseonik može da oksiduje alkohole, organsku materiju i razne druge supstance, što je dovelo do njegove primene u purifikaciji i remedijaciji atmosforskog zagađenja (Fu i sar., 2005). Tokom daljeg istraživanja, uočen je i fenomen superhidrofilnosti, koji nastaje kao rezultat fotokatalitičkog efekta – svetlost uzrokuje gubitak kiseonika iz nano-TiO₂, koji potom reaguje sa vodom i formira hidroksilne grupe, povećavajući time hidrofilnost. Ovaj novootkriveni fenomen objavljen je u časopisu Nature (Wang i sar., 1997). Ova dva svojstva dovode do toga da se svaka organska materija koja dođe u kontakt sa površinom nano-TiO₂ potpuno razlaže, čak i na sobnoj temperaturi (Hashimoto i sar., 2005). Dodavanjem kokatalizatora u vidu jona gvožđa ili bakra postignuta je veća efikasnost fotokatalitičkih reakcija, čak i pri veštačkoj svetlosti, što je otvorilo mogućnost za mnogo novih primena u otklanjanju patogenih i alergenijskih supstanci, ali i na polju građevinskih materijala (Hashimoto i sar., 2005). Ova otkrića dovela su do široke upotrebe titanijum dioksida u industrijskoj proizvodnji.

Procenjeno je da je između 1916. i 2011. ukupno 165.050.000 tona titanijum dioksida proizvedeno širom sveta u nano-, mikro- i sirovoj, tj. makroformi (Jovanović, 2015). Već 2012. Piccinno i sar. su procenili da su nanočestice TiO₂ (nano-TiO₂) najšire korišćene od svih nanočestica u svetu i da njihova proizvodnja dostiže čak do 10.000 tona godišnje, pri čemu se preko 80% koristi u kozmetičkoj industriji. Nemoguće je potpuno odrediti količinu i tip titanijum dioksida u mnogim proizvodima, kakve su kreme za sunčanje, pogotovo što je svaka kompanija zaštićena pravima o trgovinskoj diskreciji pa ne mora da odaje tačan sastav proizvoda (Colvin, 2003).

Najčešće se nano-TiO₂ koristi zbog svojih fotokatalitičkih svojstava (od krema sa zaštitnim UV faktorom do cementa koji aktivno čisti vazduh od polutanata) (Vevers i Jha, 2008), ali i zbog svoje električne provodljivosti koja je dovela široke primene u proizvodnji senzora, optoelektronike i proizvodnje fotonaponskih solarnih ćelija (Sansonov, 2013). Ove nanočestice našle su primenu i u prehrambenoj industriji, gde su poznatije pod nazivom "bela prehrambena

¹² Fotokatalizator je svaka materija koja uz pomoć sunčeve svetlosti izaziva neku hemijsku reakciju

boja”, E171, CI77891 ili beli pigment 6 (Jovanović, 2015), zahvaljujući izrazito velikom indeksu prelamanja svetlosti, $n = 2,7$ (samo nekoliko drugih poznatih supstanci ima veći indeks prelamanja, a to su galijum, silicijum, germanijum, cinabar).

Ekotoskičnost nano-TiO₂

Bezbednost i posledice upotrebe nano-TiO₂ po zdravlje ljudi nedavno su dovedene u pitanje (Jovanović, 2015a), čak je i vlada Francuske donela dekret o zabrani proizvodnje hrane koja sadrži E171 od januara 2020, zbog velikog broja naučnih dokaza o njegovom štetnom delovanju (ANSES, 2019). Iz navedenih razloga, u ovom radu će biti obrađivana toksičnost nano-TiO₂ u obliku E171 boje za hranu, koja može naneti direkne štete ljudima, ali i životnoj sredini.

Kada se aktivira dovoljnom količinom sunčeve energije, nano-TiO₂ proizvodi ROS slobodne radikale koji mogu izazvati oksidativni stres u ćelijama organizama (Haynes i sar., 2017); pored toga, nano-TiO₂ može prići kroz ćelijske membrane i dospeti do organela, gde generisanjem ROS može oštetiti DNK, lipide i proteine (Dorier i sar., 2017; Moore, 2006). Pokazalo se da E171 ima veći potencijal kreiranja ROS i oštećenja DNK u poređenju sa standardnim nano- ili mikro-TiO₂, što ukazuje na visok potencijal pojave štetnih efekata povezanih sa konzumiranjem E171 (Proquin i sar., 2017). U slučaju krema za sunčanje, postojeća literatura isključuje mogućnost absorpcije mikročestičnog titanijuma (više od 40 nm u dijametru), ali nema dovoljno istraživanja na temu nanočestica. Smatra se, međutim, da je rizik od uticaja sunca na kožu daleko veći od uticaja samog nano-TiO₂, te da je njegovo korišćenje u kremama opravdano (Colvin, 2003). Citotoksičnost nano-TiO₂ je ispitivana u *in vitro* uslovima na kulturama ćelija i tkiva: oksidativne lezije na DNK su se javile u ljudskim epitelnim ćelijama bronhija i limfoblastima (Di Virgilio i sar., 2010; Jin i sar., 2008). Chang i sar., 2013, obradili su dosadašnje literaturne podatke iz 62 rada koji se bave toksičnošću nano-TiO₂ za tkiva i organe: u *in vitro* uslovima nano-TiO₂ je u većini slučajeva imao genotoksičan efekat i u čak 25% slučajeva inflamatorni efekat; citotoksičnost je u većini slučajeva ispitivana putem detekcije enzimatske metaboličke aktivnosti, a pozitivan rezultat pokazalo je preko 50% radova sa dozom već od 0,005 mg/ml.

Osim po zdravlje ljudi, nano-TiO₂ može biti štetan i po zdravlje životne sredine. Prekomerna upotreba u potrošačkim proizvodima povećava vjerojatnoću porasta koncentracije u akvatičnim ekosistemima, pre svega u vodama blizu urbanih sredina na kojima se nalaze ispusti otpadnih voda (Haynes i sar., 2017; Mahaye i sar., 2017). U prirodnim uslovima, nano-TiO₂ kao i ostale nanočestice, može interagovati sa ostalim elementima sredine i ispoljavati raznolika svojstva. Ove nanočestice mogu da se nađu u formi rutila, fotokatalitičkog anatasa ili brukita (kao što je ranije pomenuto), a pored toga mogu da budu obložene silicijumovim ili aluminijumovim oksidima koji mogu da izmene ili u potpunosti inhibiraju fotokatalitičku aktivnost (Coll i sar., 2016). U čistoj formi anatasa, nano-TiO₂ ispoljava jaku fotokatalitičku aktivnost kada se izloži UV svetlu (Kim i sar., 2014; Ma i sar., 2012). U slučaju prethodno pomenutog rada Coll i sar., 2015, većina podataka odnosi se na fotokatalitičku aktivnost nano-TiO₂ anatazne kristalne forme. Studije su rađene na velikom broju test organizama, od čega najviše podataka ima o vrstama *Daphnia magna*, *Danio rerio* i *Ceriodaphnia dubia*. Najosetljivija vrsta u radu Coll i sar., 2015, jeste amfipodni rak *Gammarus fossarum*, a podaci o njemu uzeti su iz rada Bundschuh i sar., 2011, koji je sproveden pod UV svetlom. Pod uticajem UV radijacije nano-TiO₂ pokazuje povećanu toksičnost za *Daphnia magna*, japansku vrstu ribe *Oryzias latipes*, kao i *E. coli*, (Ma i sar., 2012).

Pokazalo se da nano-TiO₂ dovodi do opadanja brojnosti zajednice bakterijskih sojeva u sedimentima (studija u mezokozmama¹³ u koje je dodato 1 mg/l nano-TiO₂), ali ne i do promene strukture zajednice, te da se zajednica nakon tri nedelje vraća u prvobitno stanje (Ozaki i sar., 2015). Dokazano je da je nano-TiO₂ delovao na sve vrste bakterija podjednako kroz denitrifikaciju enzima i povećanje stepena ćelijskog disanja. Ova studija ukazuje na to da čak i jednokratno ispuštanje čestica nano-TiO₂ u akvatične sisteme ima potencijal da značajno izmeni bentosne akvatične zajednice. Battin i sar., 2009, takođe su izučavali uticaj nano-TiO₂ na mikrobijalne zajednice u mikrokozmalnim imitacijama potoka i primetili da izazivaju oštećenja na membranama, bilo da su veličine manje od 100 nm ili sakupljene u aglomerate nastale u uslovima spoljašnje sredine u vodi. Veći uticaj nano-TiO₂ pokazao je na jednoćelijske organizme u odnosu na biofilm, što ukazuje na zaštitnu ulogu enkapsulacije protiv nano-TiO₂ (Battin i sar., 2009).

¹³ Eksperimentalne postavke velikog obima u prirodi koje su najbližnje prirodnim uslovima, a u kojima se kontrolišu svi relevantni parametri.

Okupnik i Pflugmacher, 2016, ispitivali su pojavu oksidativnog stresa kod vodene makrofite *Hydrilla verticillata* izložene sredinski relevantnim koncentracijama nano-TiO₂ (0,01 mg/l; 0,1 mg/l; 1 mg/l i 10 mg/l) tokom 24 časa. Rezultati su pokazali da nano-TiO₂ izaziva mnogo veću oksidativnu reakciju (povećanje nivoa H₂O₂), nego krupnije forme TiO₂, ali i da se u ćelijama *H. verticillata* nakon nekog vremena nivo H₂O₂ vraća u normalu.

Veliki broj radova pokazao je visoku osetljivost račića iz reda Cladocera na prisustvo nano-TiO₂: efektivna koncentracija, EC₅₀_{48h}, za adulte *Daphnia similis* izložene mešavini anatasa i rutila bila je 60,16 mg/l nano-TiO₂ pri izloženosti UV svetlu (Clemente i sar., 2014), letalna koncentracija, LC₅₀_{48h}, za adulte *D. magna* je 5,5 mg/l nano-TiO₂ (Braun i sar., 2008), a pokazalo se da *D. pulex* ingestijom unosi velike količine nano-TiO₂ u organizam što može dovesti do bioakumulacije i biomagnifikacije¹⁴.

Bourgeault i sar., 2015, ispitivali su mogućnost praćenja bioakumulacije nano-TiO₂ u školjkama *Dreissena polymorpha* putem praćenja stabilnih izotopa ⁴⁷TiO₂ u prisustvu i odsustvu njihove tipične hrane – cijanobakterije *Synechocystis* sp. Rezultati su pokazali da prilikom ingestije čestice nano-TiO₂ ulaze samo u crevo, ali se ne akumuliraju u ostalim organima. Iako *D. polymorpha* u sebi već normalno sadrži varijabilnu količinu TiO₂ (kao i većina drugih organizama), bilo je moguće razlikovati i pratiti unesene izotope, što ukazuje na veliki potencijal ove metode na polju istraživanja bioakumulacije i biomagnifikacije, ne samo nano-TiO₂ već i drugih čestica.

Procenu uticaja nano-TiO₂ na biološke parametre i morfološke promene larvi hironomida vršila je grupa autora Tomilina i sar., 2015., 2020. U oba rada ispitivan je uticaj dve polimorfne modifikacije nano-TiO₂ – anatasa i rutila, na vrstu *C. riparius* nakon 20 dana izlaganja, a u drugom radu testiran je i uticaj Au, Ag i ZnO nanočestica. U prvom radu je praćena promena sledećih parametara: mortalitet, promena u linearnoj veličini, pojava morfoloških abnormalnosti u strukturi usnog aparata, relativan broj larvi sa deformitetima, procenat određenih deformisanih struktura i indeks stepena deformacije antena. Larve su izlagane koncentracijama od 0,002 do 20 mg/l nano-TiO₂. Pokazalo se da stopa preživljavanja varira od 20 do 100% u svim tretmanima, pa i u kontroli. Pod uticajem nanočestica došlo je do smanjenja linearne veličine larvi i povećanja deformiteta na mentumu i antenama, a primećena je i retardacija metamorfoze kod larvi, pogotovo trećeg stupnja (anats – 65.8% ukupnog broja larvi, rutil – 37.9%). Primećene

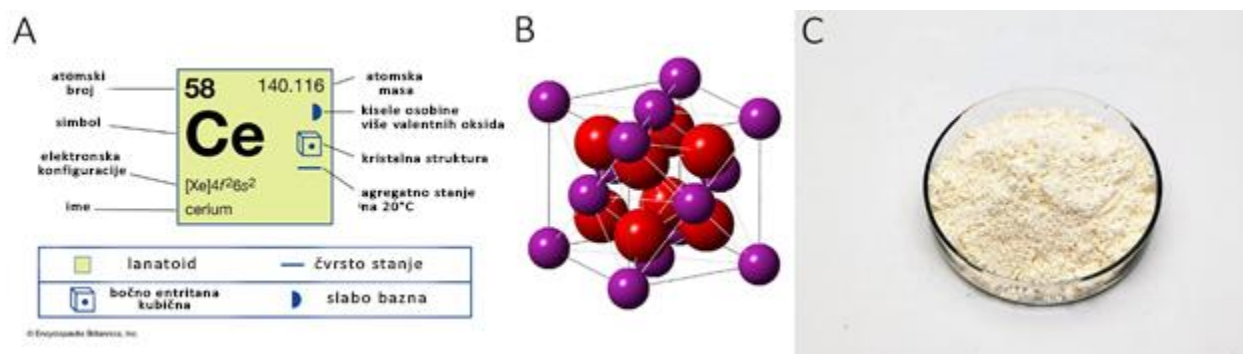
¹⁴ Nagomilavanja čestica u organizmima i povećanja njihove koncentracije u lancima ishrane.

devijacije na mentumu su najčešće na lateralnim zubima: bifurkacija srednjeg zuba, višak ili manjak lateralnih zuba; na mandibulama su primećene generalne devijacije, depigmentacija i malformacija na hetama; na antenama su najveće promene uočene na segmentima II i IV: savijanje ili iščezavanje segmenata, pojava novih struktura, pomeranje senzila (o ovim strukturama biće više reči u narednim poglavljima). Pri ekspoziciji najvećoj koncentraciji nano-TiO₂ sve su pomenute malformacije bile jako izražene. U drugom radu najviši mortalitet iznosio je 50% i to kod larvi izloženih nano-TiO₂ u formi anatasa. Najveći dizapazon malformacija primećen je na antenama, potom na mandibulama, a onda i na mentumima. Najveći procenat larvi sa deformitetima javio se kod larvi izloženih anatanskoj formi nano-TiO₂ u koncentraciji od 0,001 mg/l (čak 72,7%). Međutim, u oba rada nije definisano da li je u sistemu korišćen bilo kakav supstrat, tretmani su testirani u samo dva replikata i identifikacija deformacija je vrlo subjektivno izvršena, što mogu biti neki od razloga neusaglašenosti u rezultatima ovih dveju studija.

1.1.2.3 nano-CeO₂ cerijum oksid nanočestice

Cerijum (Ce) je najzastupljeniji od svih plemenitih zemljanih metala (lanatoida) - 68 ppm u zemljinoj kori i može se naći u mineralima bastnacitu, sinicitu, hidroksilbastancitu, salanitu, monacitu, rabdofanu i cirkonu (Azonano, 2013). Cerijum nema poznate uloge u biološkim sistemima, ali dosadašnja literatura pokazuje da nije previše toksičan za njih i ne akumulira se u lancima ishrane u prevelikoj meri (Emsley, 2011).

Cerijum oksid, poznat i kao cerijum dioksid ili cerijum (IV) oksid, jeste oksid cerijuma



Slika 4 - A – element cerijum i njegove hemijske osobine; B – CeO₂ fluoritna kristalna struktura; C – izgled nano-CeO₂ praša. (izvor <https://www.britannica.com/science>, <https://www.semanticscholar.org/paper/Room-temperature-magnetism-in-CeO2%E2%80%94A-review-Ackland-Coev/5e6ca1087d67465be43a8598c5a9868c91d2fb54/figure/2> il <https://www.xingluchemical.com/cerium-oxide-powder-ceo2-price-nano-ceria-nanopowder-nanoparticles-products/>).

hemijske formule CeO_2 i molarne mase 172.11 g mol/l (Zhang i sar., 2002; Reinhardt i Winkler, 2000) (slika 4). Značajan je komercijalni proizvod i može nastati kao intermedijerni produkt purifikacije zemljanih ruda, pri čemu izgleda kao belo-žuti prah.

Najkomercijalniji izvori cerijum oksida su heksagonalni bastancit, $\text{Ce}(\text{OH})\text{CO}_3$, koji sadrži anjone fluorida i monacit: CePO_4 , a čist oksid CeO_2 , ceranit, takođe je izuzetno značajan izvor (Reinhardt i Winkler, 2002). Cerijum takođe formira i cerijum (III) oksid, Ce_2O_3 , ali je ovaj oksid nestabilan i preazi u CeO_2 . Može se reći da u pravoj formi cerijum (IV) oksid zapravo i ne postoji (Goharshadi i sar., 2011; Zhou i sar., 2007). Zbog same cerijumove strukture u molekulu uvek postoje neke oktaedralne praznine gde bi trebalo da bude kiseonikov atom, pa bi pre trebalo da se govori o formi sa formulom CeO_{2-x} . Osim toga, svaki cerijumov atom ne odaje potpuno sva 4 valentna elektrona, već zadržava delimično poslednji, pa je uvek u oksidacionom stanju između +3 i +4. Način pripreme i izolovanja nano- CeO_2 utiče umnogome na njegova svojstva, a struktura čestica dosta zavisi od veličine – rešetkasta struktura jedinjenja se širi sa smanjenjem veličine čestica, pa se samim tim menjaju i njegove osobine (Zhang i sar., 2002).

Nano- CeO_2 ima jedinstvene osobine: apsorbuje UV zračenje, poseduje visoku termalnu stabilnost, laku električnu provodljivost, visoku čvrstoću, specifičnu hemijsku reaktivnost, mogućnost skladištenja i transporta velike količine kiseonika, visok refraktilni indeks i mogućnost ekstremno brze promene oksidativnog stanja (Zhou i sar., 2007). Cerijumove nanočestice su, stoga, našle mnogo različitih primena: kao katalizatori kod motora sa unutrašnjim sagorevanjem; za prečišćavanje finih čestica nastalih sagorevanjem dizel-goriva (kao što je ugljenik); otklanjanje slobodnog kiseonika i sumpora formiranjem stabilnih oksisulfida u proizvodnji čelika, kao i za vezivanje neželjenih čestica antimona i olova; u agensima za hemijsko i mehaničko poliranje stakla kod skupih optičkih uređaja; kao aditiv za premaze drveta; kao dodatak u gasnim sensorima i insulacionim slojevima na silicijumskim solarnim ćelijama, kao aditiv u kozmetičkim kremama, a trenutno se radi na antiinflamatornim svojstvima i medicinskoj upotrebi u borbi protiv malignih ćelija (Emsley, 2011; Mainer i sar., 2011; Zhang i sar., 2002). Najveća količina nano- CeO_2 koristi se u elektronici, optici, katalizi, izradi premaza i boja (Tella i sar., 2015).

Zbog svojih mnogobrojnih praktičnih primena, danas je jedan od najčešće korišćenih nanomaterijala. Piccinno i sar., 2012, procenili su da svetska produkcija nano- CeO_2 iznosi od 10 do 10.000 tona godišnje. Ove procene potvrdio je i rad Collin i sar., 2014., u kojem se ističe da je

do 2014. proizvodnja nano-CeO₂ dostigla 10.000 tona godišnje, od čega je čak 3.240 tona iskorišćeno u Evropi (Wang i Nowack, 2018).

Biološka i medicinska primena ovog retkog zemljinog oksida započela je ozbiljno oko 2006. godine, istraživanjima koja su pokazala da nano-CeO₂ pokazuje antioksidativna svojstva u ćelijskim kulturama pod strogo kontrolisanim uslovima (Celardo i sar., 2011; Niu i sar., 2007; Tarnuzzer i sar., 2005). Pokazalo se da nano-CeO₂ može da nađe primenu u borbi protiv mnogih patoloških stanja nastalih pod uticajem oksidativnog stresa (kao što je Alchajmerova bolest). Nanocerijum može da oponaša super-oksid dismutazu i katalazu i time ispoljava neuroprotektivna svojstva u *in vitro* modelima simulacije oksidativnog stresa (Alvin i sar., 2011). Međutim, problemi upotrebe u medicini još uvek se ispituju, a s obzirom na njegovu reaktivnost i promene kojima podleže po dospeću u organizme (interakcija sa proteinima, anjonima i lipidima), a kasnije i po ulasku u prirodne ekosisteme (Walkey i sar., 2015), postoji visok rizik od negativnih posledica po životnu sredinu. Rizik koji predstavlja emisija nanocerijuma za ljudsko zdravlje je još uvek nepoznanica i sve veći broj naučnih radova posvećen je ovom problemu.

Ekotoskičnost nano-CeO₂

Cerijumove nanočestice našle su se u prirodnim ekosistemima aktivnim dejstvom čoveka, najviše preko rafinerija i automobilske industrije (Hedrick, 1995). Pokazalo se da osobe izložene cerijumu i njegovim oksidima mogu da imaju posledice u vidu svraba, preosetljivosti na toplotu i čak lezija na koži, ali da ukoliko se unosi oralno, nije toksičan (Emsley, 2011). Pokazalo se da je inhalacija najbitniji vid unosa i da nano-CeO₂ može da penetrira u citoplazmu ćelija plućnog epitelnog tkiva, gde se nagomilava i izaziva povećanje ROS, indukuje transkripciju gena vezanih za oksidativni stres i dovodi do apoptoze (Park i sar., 2008b). Pod istim uslovima, nano-CeO₂ se pokazao kao netoksičan za ćelije ljudskog mozga i kardiomiocite pacova (Singh i sar., 2010; Xia i sar., 2008). Pretpostavlja se da postoje dva mehanizma ulaska nano-CeO₂ u ćelije: manje čestice, ili one prekrivene hidrofobnim omotačem (3 do 5 nm), mogu ući direktnim transportom kroz membrane, dok veće čestice ulaze putem endocitoze – ugibanjem membrane i unošenjem čestica u vakuole (Zhang i sar., 2017). Dalji protok kroz ćelije zavisi od osobina nano-CeO₂ čestica, ali i od samog tipa ćelija, npr. u ljudskim keratinocitnim ćelijama ispitivan je

fluorescentno obeležen nano-CeO₂ i pokazalo se da ulazi u ćelije endocitozom (Singh i sar., 2010). U samoj ćeliji je moguće da nano-CeO₂ reaguje sa odbrambenim antioksidantnim sistemima i izazove stvaranje ROS, inflamatorne reakcije, preturbacije i destrukciju mitohondrija, što može dovesti do apoptoze ili nekroze ćelije (Li i sar., 2003), a toksičnost se povećava vremenom i posledice nestaju veoma polako, verovatno zbog biopersistencije, tj. dugog zadržavanja u ćelijama i tkivima (Yokel i sar., 2014). Ovo je u suprotnosti sa prethodno navedenim osobinama nano-CeO₂ i radovima u kojima se ističe njegovo antiinflamatorno dejstvo i antioksidantna aktivnost, što se treba pripisati različitim eksperimentalnim uslovima i tipovima tkiva i ćelija na kojima su eksperimenti rađeni.

Trenutna merenja nano-CeO₂ u prirodi pokazuju manje od potencijalno štetnih koncentracija po ljudsko zdravlje pri hroničnoj izloženosti (Park i sar., 2008), pa je moguće da nano-CeO₂ ne predstavljaju opasnost ni po životnu sredinu. S druge strane, postoje indikacije da velika količina nano-CeO₂ prolazi kroz filtere i postrojenja za prečišćavanje i ostaje zarobljena u otpadnim vodama i mulju, pa se prave količine nano-CeO₂ u životnoj sredini ne mogu zaista sagledati (Limbach i sar., 2008). Prema predikcionim modelima Keller i sar., 2013, 300 tona nano-CeO₂ godišnje može biti ispušteno u životnu sredinu. Isti autori ističu glavne primene ovih nanomaterijala (prevlake, farbe, pigmenti, kozmetika, kao i automobilska industrija), koje najverovatnije doprinose 97% ukupnoj količini ispuštenih nano-CeO₂ u akvatične ekosisteme. Akumulaciji nano-CeO₂ u sedimentima najviše doprinosi depozicija iz vazduha, mulja i otpadnih voda (Wang i Nowack, 2018). Direktne procene količine u akvatičnim ekosistemima veoma su teške, te se koncentracije predviđaju na osnovu modelovanja. Procenjeno je da u sedimentima ima od 0,2 do 95 µm/kg (Wang i Nowack, 2018; Gottschalk i sar., 2015), a u mulju iz postrojenja za preradu voda oko 359 µm/kg (Gottschalk i sar., 2015; Gottschalk i Nowack 2011).

Proučavanjem uticaja u različitim akvatičnim sredinama pokazalo se da nano-CeO₂ teži da pravi agregate i da se taloži vrlo brzo, pa završava na površini ili u samom sedimentu (Keller i sar., 2010; Qik i sar., 2010). U Francuskoj je praćen transport i sudbina nano-CeO₂ u mekozokzama koje simuliraju jezerski ekosistem (Tella i sar., 2015). Rezultati su pokazali da su „gole“ nano-CeO₂ bile čestice hemijski stabilne, ali su pokazivale tendenciju homoagregacije i taloženja, dok su se nano-CeO₂ obložene citratima zadržale u vodenom stubu, nakon čega su se rastvarale i oslobađale Ce koji je postao dostupan bentosnim organizmima i organizmima koji se

hrane planktonom. Zbog osobina koje nano-CeO₂ ispoljava u vodenoj sredini u opasnosti su ne samo organizmi iz vodenog stuba već pre svega bentosni organizmi.

Metaanaliza rađena 2014. godine pokazuje da je veliki broj analiza nanocerijuma rađen na slatkovonim organizmima, međutim, skoro da potpuno odsustvuju analize na organizmima iz sedimenata (Collin i sar., 2014). Ova metaanaliza je pokazala sledeće rezultate: samo mali broj vrsta je testiran, u okviru nekoliko taksonomskih grupa, a velike taksonomske grupe (kao što su insekti i gastropode) slabo su zastupljene; od kičmenjaka, samo *Danio rerio* je korišćena kao model-organizam (pri čemu nije primećen nikakav toksičan efekat čak ni pri najvećim koncentracijama); samo jedna studija hronične izloženosti na vrsti *Caenorhabditis elegans*; samo jedna studija na vrsti *Chironomus riparius*; najosetljivija životinja na uticaj nano-CeO₂ je *C. elegans*, a najosetljiviji mikroorganizam *Anabaena* sp. Prikupljeni podaci ukazali su na koncentracije nano-CeO₂ u vodenom stubu u količinama od nekoliko mikrograma po litru, što se ne može smatrati alarmantnim. Javio se problem nejednakih uslova testiranja, praćenja različitih parametara i različitih test-koncentracija, te se već narednih godina krenulo sa opširnijim testiranjem ekotoksičnosti nano-CeO₂.

U dosadašnjoj literaturi zabeležene su različite koncentracije koje izazivaju negativne efekte po organizme: EC₅₀_{24h} za zelenu algu *Raphidocelis subcapitata* bila je 10,3 mg/l nano-CeO₂ veličine 10 do 20 nm (Rogers i sar., 2010); u drugom radu na istoj vrsti EC₅₀_{24h} koja inhibira značajne ćelijske funkcije bila je od 2,4 do 29,6 mg/l (Rodea-Palomares i sar., 2011); EC₅₀_{48h} za *Daphnia similis* bila je 0,26 mg/l, a za *D. pulex* 91,79 mg/l (Artells i sar., 2013); EC₅₀_{24h} rekombinantnog soja planktonske cijanobakterije *Anabaena CPB4337* bio je u rasponu od 0,27 do 6,3 mg/l, pri čemu je primećen i gubitak luminescencije (Rodea-Palomares i sar., 2011).

U mnogim studijama uočeno je da nano-CeO₂ pravi agregate na ćelijama organizama u vodi, kod *Raphidocelis subcapitata*, *Anabaena CPB4337* (Rodea-Palomares i sar., 2011), *E. coli* (Thill i sar., 2006); na algama *Chlorella pseudomonas* kojima se hrane *D. pulex*, pa čak i na peritrofičkoj membrani i kutikuli dafnija (Auffan i sar., 2013). Adsorpcijom nano-CeO₂ može dovesti do oštećenja na ćelijama, najverovatnije putem oksidativne reakcije ćelija usled redukcije Ce (IV) u Ce (III) (Rogers i sar., 2010; Thill i sar., 2006), a može dovesti i do fizičkih smetnji i uticaja na ekdizis, tj. presvlačenje beskičmenjaka (Auffan i sar., 2013; León Muez i sar., 2010) ili kretanje organizama (Artells, 2013). Pored adsorpcije za površinu tela, pokazalo se da dolazi

do bioakumulacije u organizmu oralnim putem (Garaud i sar., 2015; Bour i sar., 2015a; 2016; Auffan i sar., 2013).

U radu Auffan i sar., 2013, otkriven je uticaj nano-CeO₂ na presvlačenje vrste *Daphnia pulex*. Doza od 10 mg/l (96h) i 1000 mg/l (96h) nano-CeO₂ ispitivana je u prisustvu ili odsustvu hrane, jednoćelijske alge *Chlorella pseudomonas*. Pokazalo se da čak tri puta veću količinu nano-CeO₂ *D. pulex* unese u organizam u prisustvu *C. pseudomonas* jer se nano-CeO₂ nakuplja na površini ovih algi. Međutim, pokazalo se i prisustvo nakupina na peritrofičkoj membrani i kutikuli dafnija. Ispitivana je depurifikacija od nano-CeO₂ (izbacivanje sadržaja iz creva nakon naknadnog premeštanja u posude sa čistom vodom i hranom) – izbacivanje crevnog sadržaja se produžilo sa normalnih 60 minuta na dva sata, pri čemu čak 40% unešenog nano-CeO₂ ostaje u organizmu. Primećeno je da je zapravo presvlačenje glavni mehanizam izbacivanja nano-CeO₂ iz organizma: drastično smanjenje nano-CeO₂ pokazalo se posle svakog presvlačenja. Ovakvi rezultati ukazuju na veliki potencijal akumulacije nano-CeO₂, a kako su dafnije intermedijerni organizmi u lancu ishrane, mogu dovesti do biomagnifikacije nano-CeO₂ u akvatičnim ekosistemima. Ljuštore koje se odbacuju talože se na dnu vodenog sistema, gde predstavljaju izvor ugljenika i natrijuma za razlagače, ali i izvor nano-CeO₂ koji je zalepljen za ljuštore, pa se ponovo može uneti u lanac ishrane (Auffan i sar., 2013). Autori takođe ističu mogućnost uticaja nano-CeO₂ na epibionte (bakterije i protozoe) koji žive na samoj površini kutikule dafnija. Uzevši u obzir da nano-CeO₂ formira agregate i na drugim organizmima, taloženje nano-CeO₂ kroz ovakve procese i njegov efekat mogao bi da predstavlja izuzetan ekološki problem, što je potrebno detaljno ispitati.

Pokazalo se da nano-CeO₂ može izazvati negativne posledice kod slatkovodnih organizama: genotoksičan je za *Daphnia magna*, *C. riparius* (povećano oštećenje na DNK) (Lee i sar., 2009) i larve daždevnjaka *Pleurodeles waltl* (Bour i sar., 2015a); dovodi do smanjenja veličine lizozomalnog sistema, katalazne aktivnosti i lipoperoksidacije u digestivnim žlezdama školjke *Dreissena polymorpha*, što je verovatno posledica antioksidativnih svojstava, ali i negativnog uticaja na koncentraciju jona u hemolimfi (Garaud i sar., 2015).

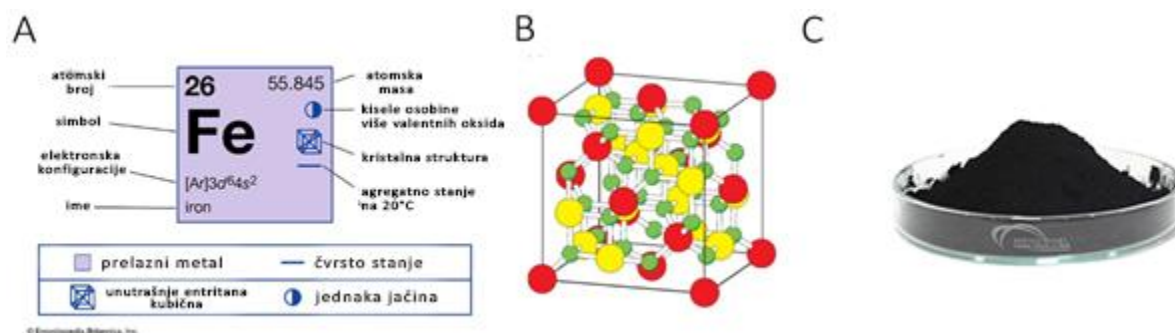
Bour i sar., 2015a, ispitivali su uticaj nano-CeO₂ (u "goloj" formi i formi sa citratnim omotačem) na trofički lanac u laboratorijskim uslovima, a potom je ista grupa autora ispitivala uticaj 1 mg/l „golog“ nano-CeO₂ (Bour i sar., 2016) pod sredinski relevantnim uslovima u mezokozmama tokom četiri nedelje (lanac je sadržao dijatomeje i *Nitzschia palea*, kao najnižu

lestivicu u lancu; larve *C. riparius* kao primarne konzumente i larve *Pleurodeles waltl* i *Xenopus laevis* kao sekundarne konzumente). Žaba *Xenopus laevis* se koristi kao test-organizam zbog visoke osetljivosti na zagađivače u vodi, a njene larve su filtratori i ponekad stružu biofilm sa površine sedimenata, te su izložene kontaminantima na više načina. *Pleurodeles waltl* je daždevnjak koji je prvi put korišćen kao test-organizam za ispitivanje uticaja nanočestica u ovom istraživanju (Bour i sar., 2015a). Primećena je visoka sedimentacija nano-CeO₂, a posle treće nedelje došlo je do promene u zajednici bakterija. Akutni test na dijatomejama s koncentracijom od 100 mg/l nije pokazao nikakvu inhibiciju u rastu, što je moguće objasniti na osnovu odbrambenih mehanizama dijatomeja: dijatomeje poseduju silikatnu ljušturu koja ima pore manjeg dijametra od agregata nanocerijuma; ekskretuju ekstracelularne polimere za koje se lepe štetne čestice; mogu da izlučuju fitohelatine koji inače služe za detoksikaciju od teških metala (Bour i sar., 2016). Nije primećen nikakav toksični efekat na larvama hironomida (iako su akumulirale visoke koncentracije nano-CeO₂ (265.8 ± 14.1 mg Ce/kg), a zabeleženo je povećanje mortaliteta *Pleurodeles* larvi (larve su prosečno sadržale samo 13.5 ± 3.9 mg Ce/kg). Pri izlaganju nano-CeO₂ obloženim citratima nije bilo agregacija u crevima, što može biti objašnjeno time da obloga sprečava njegovu agregaciju u veće aglomerate u vodi i time ga čini manje dostupnim za larve. Suprotne rezultate dala su istraživanja Lee i sar., 2009: izlaganje 1 mg/l nanocerijuma dovelo je do povećanja mortaliteta i oštećenja DNK kod hironomida (pri čemu manje čestice izazivaju više pucanja DNK lanca). Podaci o inhibiciji rasta i razvoja larvi hironomida u oba slučaja su isti – nema značajnog uticaja nano-CeO₂, a takođe nema ni uticaja na vreme i stopu izletanja imaga. Bour i sar., 2015a, objašnjavaju ovakve rezultate mogućim zaštitnim dejstvom ekskreta pljuvačnih žlezdi hironomida koji one luče pri unošenju hrane i formiranju cevčica u koje se zavlače.

Svi pomenuti rezultati ukazuju na visok ekotoksikološki potencijal nano-CeO₂, a neujednačenost i nepotpunost rezultata, pre svega za bentosne organizme, ukazuju na neophodnost detaljnijih i sveobuhvatnijih istraživanja.

1.1.2.4 nano-Fe₃O₄ gvožđe oksid nanočestice

Gvožđe (Fe) predstavlja hemijski element atomskog broja 26, koji je po svojoj masi najzastupljeniji metal na planeti (slika 5). Gvožđe može praviti nekoliko oksida: fero-oksidi vusit (FeO), koji je veoma redak; feri-oksidi hematit (α -Fe₂O₃), maghematit (γ -Fe₂O₃) i fero-fero-oksidi magnetit (Fe₃O₄), pri čemu svi ovi oksidi ispoljavaju feromagnetna svojstva i široko su rasprostranjeni u prirodi, ali se mogu sintetisati i u laboratoriji (Slika 5) (Yew i sar., 2020; Cornell, 2003).



Slika 5 - A – element gvoždje i njegove hemijske osobine; B – Fe₃O₄ magnetitna kristalna struktura; C – izgled nano- Fe₃O₄ praha (izvor <https://www.britannica.com/science>, https://www.researchgate.net/figure/a-Face-centred-cubic-spinel-structure-of-magnetite-b-Magnification-of-one_fig1_30048605 i <https://www.indiamart.com/proddetail/magnetite-iron-oxide-nanopowder-19851424630.html>).

Magnetit se drugačije naziva i gvožđe (II,III) oksid ili fero-feri oksid i predstavlja najjači prirodni magnetni mineral na zemlji (Yew i sar., 2020). Njegova formula je Fe₃O₄ ili Fe·Fe₂O₃, što ukazuje na to da gvožđe u njemu može da se nađe u različitim oksidacionim stanjima, Fe²⁺ i Fe³⁺ (Gao i sar., 2009; Cornell, 2003).

Nanočestice magnetita (nano-Fe₃O₄), koje se skraćeno nazivaju i SPION (eng. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles), mogu se dobiti u laboratoriji sol-gel metodom, solvometalnim, hidrotermalnim, elektrohemijskim, pa čak i "zelenim" procesima, pri čemu se kreiraju "gole" čestice ili čestice sa prevlakama (sastavljene iz magnetnog jezgra i nemagnetnog omotača), a sama sinteza i način formiranja utiču na osobine nano-Fe₃O₄ (Yew i sar., 2020; Chaki, 2015; Lu i sar., 2010; Laurent i sar., 2008).

Magnetna svojstva nanočestica gvožđa privukla su veliku pažnju industrije, pogotovo zbog činjenice da zavise od načina sinteze, specifične veličine i morfologije materijala i da se mogu precizno kontrolisati (Yew i sar., 2020; Liu, 2006). Eksternim magnetnim poljem se nano-

Fe₃O₄ mogu namagnetisati do potpune saturacije (pri čemu imaju superparamagnetna¹⁵ svojstva). Keđutim kada se magnetno polje eliminiše, čestice prestaju da pokazuju magnetne interakcije (Wahajuddin, 2012). Oksidi gvožđa u nanoformi pretežno se upotrebljavaju za proizvodnju boja (preko 50%), a potom i cementa, električnih i optičkih uređaja, u kozmetici, u katalizatorima, ali i u biomedicini (Wang i Nowack, 2018; Zou i sar., 2008). Ispitivanja nanočestica oksida gvožđa, posebno nano-Fe₃O₄, intenzivirana su poslednjih godina zbog upotrebe u magnetnim uređejima za skladištenje podataka (hard-diskovi) i u medicini, pre svega u transportu lekova, ali i MRI skenerima (magnetna rezonantna tomografija) (Lang i sar., 2007).

Istraživanja su pokazala da nano-Fe₃O₄ mogu biti biokompatibilne, biorazgradive i potencijalno netoksične za ljude, te se sve više upotrebljavaju u biomedicini (Yew i sar., 2020; Beloqui i sar., 2016). Nano-Fe₃O₄ sa odgovarajućom površinskom hemijom mogu se koristiti za brojne *in vivo* aplikacije: povećanje kontrasta u MRI skenerima; oporavak tkiva, imunoeseje, detoksifikaciju bioloških tečnosti; lečenje kancera hipertermijom, prenos lekova, separaciju ćelija, gensku terapiju, kao i kombinaciju ovih primena (Liu i sar., 2013; Laurent i sar., 2008). Sve ove biomedicinske primene zahtevaju da nano-Fe₃O₄ ima jaka magnetna svojstva, usku distribuciju veličina i dijametar manji od 100 nm, pri čemu se pokazalo da je za efikasnu endocitozu, bezbedno transportovanje i aplikaciju lekova najbolje koristiti čestice od 50 nm (Bamrungsap i sar., 2012; Laurent i sar., 2008). Ove primene takođe zahtevaju specifične površinske prevlake na nano-Fe₃O₄, koje moraju biti netoksične i biokompatibilne i moraju omogućavati ciljanu isporuku sa lokalizacijom čestica u određenom delu organizma (Laurent i sar., 2008). Ovakve čestice mogu da se vezuju za lekove, proteine, enzime, antitela ili nukleotide i da budu ciljano transportovane u određeni organ, tkivo ili tumore, pomoću eksternog magnetnog polja (Tartaj i sar., 2006).

Ove osobine dovele su do pokušaja njihove primene i u remedijaciji, posebno u prečišćavanju voda i zemljišta od teških metala i ostalih zagađivača: zbog njihove velike površine i snažne moći adsorpcije, neželjene čestice se lepe za njihovu površinu, takvi kompleksi se potom eksternim magnetnim poljem izvlače iz sistema, pa se potom mogu čak i reciklirati (Hurtado-Gallego i sar., 2020; Feng i sar., 2012; Recillas i sar., 2011; Chandra i sar., 2010; Zhang i sar., 2009; Yavuz i sar., 2006). Do sada je testiran njihov potencijal za uklanjanje

¹⁵ Superparamagnetizam je jedinstvena osobina fero- i ferimagnetnih nanomaterijala, koji se primećuje samo kada su veličina i broj čestica u magnetnom materijalu dovoljno mali, obično prečnika od 10 nm i 150 nm, pri čemu magnetizam može menjati pravac zavisno od temperature i drugih parametara (Clemons i sar., 2019).

arsenika (Yavuz i sar., 2006), policikličnih aromatičnih jedinjenja (Zhang i sar., 2010), olova i ostalih teških metala (Matei i sar., 2016; Feng i sar., 2012; Recillas i sar., 2011).

S obzirom na ovakve potencijalne benefite upotrebe nano-Fe₃O₄, razvijene su inovativne metode za njihovu sintezu. Međutim novi procesi proizvodnje pokreću brojna pitanja koja uključuju visoke troškove proizvodnje, upotrebu potencijalno otrovnih hemikalija u samoj proizvodnji i mogućnost nastanka štetnih nusproizvoda (Yew i sar., 2020), pri čemu njihova farmakokinetika i metabolizam u organizmima još uvek nisu dovoljno proučeni (Liu i sar., 2013). Budući da su tek nedavno ušle u široku primenu, o ovim nanočesticama ima veoma malo ekotoksikoloških podataka.

Ekotoksičnost nano-Fe₃O₄

Pokazalo se da, ukoliko površinska hemija nije potpuno kontrolisana, nano-Fe₃O₄ mogu biti i toksične za ćelije, pri čemu su manje nanočestice toksičnije (Mahmoudi i sar., 2009). Većina unutraćelijske i *in vivo* toksičnosti potiče od produkcije ROS, uključujući slobodne radikale kao što su superoksidni anjon, hidroksil radikale i neradikalni vodonik peroksid (Liu i sar., 2013; Sharifi i sar., 2012; Kim i sar., 2012). Visoke koncentracije nano-Fe₃O₄ mogu dovesti do oštećenja ćelija putem peroksidacije lipida, disrupcije DNK, modulacije transkripcije gena, modifikacije proteina, što dalje dovodi do poremećaja fizioloških funkcija i apoptoze ćelija (Liu i sar., 2013; Kim i sar., 2012). Prema literaturi, postoje četiri primarna razloga nastanka oksidativnog stresa usled izlaganja nano-Fe₃O₄: direktno generisanje ROS sa površine nanočestica; produkcija ROS putem oslobađanja molekula gvožđa; izmena funkcije mitohondrija i ostalih organela i indukcija signalnih ćelijskih molekula. Pretpostavlja se da oksidativni stres indukovano nano-Fe₃O₄ višestepeno utiče na ćelijsku signalizaciju: nizak nivo oksidativnog stresa pojačava transkripciju odbrambenih gena, što dovodi do povećane ekspresije antioksidativnih enzima za borbu protiv ROS-a. Ako se stres poveća, dolazi do oslobađanja proinflamatornih citokina, a u ekstremnim slučajevima dolazi do aktivacije apoptoze (Liu i sar., 2013; Kim i sar., 2012; Soenen i sar., 2011; Naqvi i sar., 2010). S obzirom na sve veću proizvodnju za medicinsku upotrebu, većina toksikoloških ispitivanja rađena je putem *in vitro* testova citotoksičnosti: esejji ćelijske vijabilnosti, proliferacije i diferencijacije (MTT esej mitohondrijalne funkcionalnosti, LDH esej stabilnosti ćelijskih membrana, imunohemijski markeri apoptoze i nekroze);

mikroskopska analiza intracelularne lokalizacije (putem elektronske i atomske mikroskopije); analiza hemolize; analiza geontoksičnosti i poremećaja ekspresije gena (Liu i sar., 2013; Shen i sar., 2012; Buyukhatipoglu i sar., 2010). *In vivo* ispitivanja, kojima se može ispitati farmakokinetika (biokompatibilnost, apsorpcija, distribucija, metabolizam i ekskrecija) još su uvek retka. Dosadašnja literatura je pokazala da se magnetne nanočestice mogu distribuirati do različitih organa, tkiva i ćelija. Manje nanočestice (ispod 10 nm) uglavnom se brzo mogu eliminisati preko bubrega, dok se veće čestice (preko 200 nm) obično zadržavaju u jetri i odstranjuju mehaničkom filtracijom (Liu i sar., 2013; Duguet i sar., 2006). Biodistribucija magnetnih nanočestica obično je 80–90% u jetri, 5–8% u slezini i 1–2% u koštanoj srži (gde se dalje metabolišu putem makrofaga), ali se čak mogu naći u plućima i u mozgu (mogu proći krvno-moždanu barijeru) (Liu i sar., 2013; Kwon i sar., 2008). Pored samih nanočestica, gvožđe koje se oslobađa razlaganjem u organizmu može takođe dovesti do negativnih posledica po ćelije i krv ukoliko se nagomila u prekomernim količinama.

Međutim, procena uticaja ovih nanočestica na organizme u životnoj sredini nije u potpunosti razmotrena, a s obzirom na obim proizvodnje i upotrebe, postoji ekološki rizik za koji je potrebna odgovarajuća procena (Hurtado-Gallego i sar., 2020; Wang i Nowack, 2018). Procenjuje se da je samo tokom 2014. u Evropi iskorišćeno preko 9.000 tona oksida gvožđa u nanoformi, od čega je najveća koncentracija dospela u otpadni mulj (prosečna koncentracija 75 mg/kg), potom u čestice pepela u vazduhu (32 mg/kg) i u istaložene čestice pepela (22 mg/kg), dok je u sedimentima prosečno prisutno od 1,6 mg do 4,4 mg ovih nanočestica po 1 kg sedimenta (Wang i Nowack, 2018). Oksidi gvožđa dospevaju u životnu sredinu pretežno iz otpadnih voda zbog korišćenja kozmetičkih, medicinskih i sredstava za čišćenje, ali postoji tendencija da se nađu u velikoj količini i u medicinskom otpadu (Laurent i sar., 2008). U kontekstu ekotoksikologije, samo nekoliko radova je proučavalo efekte magnetnih nanočestica, a pre svega nano-Fe₃O₄.

Postoji mali broj radova posvećenih potencijalnim štetnim efektima upotrebe u remedijaciji zagađenja životne sredine. U radu Michels i sar., 2017, pokazalo se da dolazi do smanjenja stope proizvodnje nitrita za 30% u prisustvu 200 mg magnetita (nano-Fe₃O₄) što je koncentracija koja se smatra relativno niskom za zemljište. Ovaj relativno niski prag prisutnosti nano-Fe₃O₄ koje ne izazivaju štetne efekte (imajući u vidu da se oksidi gvožđa uglavnom smatraju bezopasnim i korisnim) primećen je u još nekoliko studija, pri čemu se pokazalo da

nano-Fe₃O₄ izazivaju iznenađujuće snažne negativne efekte na mikroorganizmima (McKee i Filser, 2016; Filser, 2013; Cao i sar., 2017).

Wu i sar., 2012, ispitali su uticaj nano-Fe₂O₃ sa DMSA prevlakom (od dimerkaptosukcinske kiseline) na nematodu *Caenorhabditis elegans*, pri čemu je došlo do smanjenja rasta i povećanja produkcije ROS. Toksičnost nano-Fe₃O₄ i nano-Fe₂O₃ izučavana je na ribi *Danio rerio* (Zhu i sar., 2012), akvatičnoj biljci *Lemna gibba* (Barhoumi i sar., 2015), mikroalgi *Chlorella vulgaris* (Barhoumi i sar., 2013; Xiaoxiao i sar., 2012), *Pseudokirchneriella subcapitata*, račiću *Daphnia magna* (Llaneza i sar., 2016), infuzoriji slatkovodnih cilijata (Kosyan i sar., 2016), a najnoviji rad testirao je uticaj na jednoćelijsku biflagelatnu mikroalgu *Chlamydomonas reinhardtii* (Hurtado-Gallego i sar., 2020). U ovim radovima pokazalo se da nanočestice dovode do inhibicije rasta i reprodukcije, formacije ROS, smanjenja koncentracije hlorofila i deterioracije fotosintetičkih aktivnosti, a kod *Danio rerio* i do odlaganja izleganja, mortaliteta i malformacija. Rad Garcia i sar., 2011, pokazao je visoku osetljivost *D. magna* (LC₅₀=23×10⁻⁴ mg/ml) i *V. fischeri* (EC₅₀=0.24 mg/ml) na nano-Fe₃O₄. U radu Hurtado-Gallego i sar., 2020, pokazalo se da nanočestice (γ-Fe₂O₃ i Fe₃O₄ sa DMSA prevlakama, prosečne veličine 8 nm) ulaze u ćelije putem endocitoze i da njihova toksičnost zavisi od doze, pri čemu su izazvale smanjenje metaboličke aktivnosti, povećanje oksidativnog stresa i izmene u potencijalu mitohondrijalnih membrana. Pored toga dokazano je da nanočestice u vodenom stubu izazivaju "efekat senke", što znači da smanjuju dotok svetlosti do organizama.

Složenije studije procene ekotoksičnosti su veoma retke. Gambardella i sar., 2014, istraživali su ekotoksičnost i unos nekoliko nano-OM (SiO₂, SnO₂, CeO₂, Fe₃O₄) od strane morskog ježa *Paracentrotus lividus* kroz njegovu ishranu mikroalgama *Cricosphaera elongata*. Istraživanje je pokazalo da nano-OM mogu ući u lance ishrane, postati dostupne za marniske organizme i izazvati poremećaj njihovog razvoja.

Dosadašnji radovi, dakle, ukazuju na potencijalnu toksičnost nano-Fe₃O₄ u vodenim sredinama i negativne posledice po ekološki relevantne organizme, što dalje ukazuje na potrebu istraživanja uticaja na životnu sredinu, kao i bioloških efekata nano-Fe₃O₄.

1.2 Akvatična toksikologija

Kroz prethodna poglavlja navedeni su stresori sa kojima se životna sredina susreće usled sve prisutnijeg antropogenog faktora. Ističe se očigledna potreba za razvojem metoda za ispitivanje i praćenje efekta ovih stresora na slatkovodne zajednice kao jedne od najugroženijih biotičkih komponenti u prirodi. Ovim problemima bavi se akvatična toksikologija, o kojoj će dalje biti reči u ovom poglavlju.

Ekotoksikologija je definisana od strane Truhaut-a (Truhaut, 1975), a kasnije i Butler-a (Butler, 1978), kao grana toksikologije koja izučava toksičan uticaj prirodnih i veštačkih supstanci na žive organizme, bilo da su biljnog ili životinjskog porekla, terestrični ili akvatični, koji sačinjavaju biosferu. Definicija uključuje i interakcije potencijalno toksičnih supstanci s fizičkom sredinom u kojoj organizmi žive. Akvatična toksikologija, drugačije nazivana toksikologija voda, izdvojila se iz ekotoksikologije kao zasebna grana koja je multidisciplinarna u teoriji i interdisciplinarna u praksi.

Akvatična toksikologija predstavlja ispitivanje kombinacije ekoloških i toksikoloških uticaja proizvedenih hemikalija i ostalih antropogenih ili prirodnih supstanci i pojava (koji se jednim imenom mogu nazvati *toksični agensi* ili *toksične supstance*) na sve nivoe organizacije akvatičnih organizama, od subćelijskog, preko individua, do nivoa populacija, zajednica i ekosistema; kao i ponašanje toksičnih agenasa u prirodi, pre svega njihov protok, transformaciju i razlaganje (Rand, 1995). U osnovi ekotoksikologije jesu procena opasnosti po životnu sredinu (eng. hazard assessment) i procena rizika po organizme (eng. risk assessment) usled prisustva toksičnih agenasa, pri čemu je opasnost = sudbina toksina u prirodi + efekti toksina; a rizik = opasnost + ekspozicija, tj. izlaganje organizama. Neophodno je razumeti faktore koje utiču na sredinske koncentracije hemijskih agenasa: hemijske (hidroliza, oksidacija, fotoliza), fizičke (molekularna struktura, rastvorljivost, stabilnost i apsorpcija) i biološke (biotransformacija), da bi se moglo odrediti kako oni utiču na životnu sredinu i kako životna sredina reaguje na njih, kao i da bi se odredila ekspozicija organizama na uticaje tih toksičnih agenasa. Akvatična toksikologija je evoluirala kao polje istraživanja iz nekoliko drugih fundamentalnih nauka. Kako bi se dobro upoznala akvatična toksikologija i razumeli efekti toksičnih agenasa na žive organizme, neophodno je dobro poznavanje ekologije, fiziologije, biohemije, histologije, studija ponašanja i hemije životne sredine.

S obzirom na to da akvatični organizmi mogu biti izloženi toksičnim agensima preko vode, sedimenta i hrane u akvatičnoj sredini, poznavanje količine, koncentracije i biodostupnosti toksičnih agenasa u ovim medijumima je od vitalnog značaja. Stoga, proučavanje izvora, transporta, distribucije, neorganske i organske transformacije i konačne sudbine toksičnih agenasa u akvatičnoj sredini predstavlja vitalnu komponentu akvatične toksikologije.

Zbog čega je akvatična ekotoksikologija toliko kompleksna?

Akvatična sredina je veoma kompleksan sistem koji obiluje životom. Uključuje nekoliko jedinstvenih tipova ekosistema – slatkovodne potoke, jezera, bare i reke; eostuare; morske, priobalne i duboke vode okeana koji sadrže raznolike biotičke i abiotičke komponente i jedinstvene karakteristike. Biotička komponenta sačinjena je iz kombinacije biljaka, životinja i mikroorganizama koji naseljavaju specifične ekološke niše u svakom ekosistemu, a abiotička komponenta uključuje fizičku sredinu (voda, supstrat/sediment i rastvorene supstance). Svaki akvatični ekosistem je stoga dinamički proizvod kompleksnih interakcija živih i neživih komponenti, sa mnogim konstantnim karakteristikama, ali i mnogim karakteristikama koje se menjaju u vremenu i prostoru.

Fizička i hemijska svojstva akvatičnih ekosistema mogu imati neverovatan uticaj, kako na biološku aktivnost tako i na aktivnost hemijskih supstanci i ksenobiotika¹⁶. Ranjivost akvatičnih ekosistema na zagađenje hemijskim agensima zavisi od nekoliko faktora: fizičkih i hemijskih svojstava zagađujućih materija i njihovih produkata; koncentracije i ukupne količine materije koje ulaze u ekosistem; trajanja i tipa zagađenja, kao i uliva u ekosistem (akutno ili hronično, povremeno ili kontinualno ulivanje); osobina same vodene sredine koje omogućuju njenu rezistentnost na prisustvo zagađujućih supstanci (kapacitet regulacije pH, sadržaj rastvorene organske materije itd.) i njenu remedijaciju, tj. vraćanje u prvobitno stanje nakon ukljanjanja supstanci iz sistema (mehaničko prečišćavanje putem talasa i kretanja vode); pozicioniranja samog ekosistema u odnosu na tačku ispuštanja zagađujuće materije (Rand, 1995).

S obzirom na kompleksnost akvatičnih ekosistema, koji uključuju složene međudnose fizičkih, hemijskih i bioloških faktora, vrlo je zahtevno i teško razumeti njihov odgovor na prisustvo zagađujućih supstanci, osim ukoliko ovi odnosi nisu dobro proučeni i definisani.

¹⁶ Ksenobiotici su supstance koje organizmi sami ne proizvode, ali mogu dospeti u njihovo telo. Termin se može odnositi i na sve zagađivače i strane, tj. alohtone materije u prirodi.

Procenu uticaja dodatno komplikuje prilagodljivost biotičke komponente, diverzitet vrsta prisutnih u ekosistemu (koji se normalno menja tokom vremena) i promenljivost strukturnih i funkcionalnih odgovora u okviru biotičke komponente. Uz to, pokazalo se da slični akvatični ekosistemi nemaju nužno i sličan odgovor na prisustvo iste zagađujuće materije. Čak i minorne razlike u fizici i hemiji sredine, kao i u kompoziciji vrsta, mogu dovesti do razlika u ispoljenim efektima i sudbini zagađujućih materija u sistemu. Stoga se pri proceni opasnosti od zagađenja moraju uzeti u obzir konkretni uslovi u ekosistemu na mestu na kome potencijalno može doći do zagađenja.

U osnovi ekotoksikoloških procena rizika i opasnosti jesu testovi toksičnosti na model organizmima, čiji se rezultati mogu ekstrapolirati na više nivo organizacije. Paradigma sprovođenja ovakvih *in vivo*¹⁷ ispitivanja toksičnosti na životinjama i ekstrapoliranje podataka na ljude ili na životnu sredinu postepeno se zamenjuje *in silico*¹⁸ i *in vitro*¹⁹ studijama, s još većom potrebom oslanjanja na ekstrapolaciju (Hjorth, 2016). Međutim, *in vivo* testovi na čitavim organizmima ostaju u osnovi procene rizika za životnu sredinu, pri čemu se preporučuje upotreba složenijih i realističnijih *in vivo* sistema kao što su mezokozme²⁰ ili čak *in situ* ispitivanja sprovedenih u prirodnim ekosistemima. U nekim slučajevima *in situ* eksperimenti mogu biti toliko kompleksni da se čitava prirodna jezera pretvaraju u eksperimentalne postavke (Norman i sar., 2019). Za kompleksnija istraživanja koriste se mezokozme kapaciteta od preko 10.000 l, u kojima je moguće kontrolisati željene parametre (MESOAQUA, 2009). Jedna od trenutno najvećih mezokozmi na svetu postavljena je na jezeru Stechlin u Nemačkoj (Fisheries, 2012).

1.2.1 Ekotoksikološki testovi na slatkovodnim organizmima

S obzirom na rastući problem zagađenja akvatičnih ekosistema, tokom godina su razvijane metode za ispitivanje kvaliteta vode i sedimenata na osnovu hemijskih i fizičkih analiza, ali i metode za procenu uticaja na biotičku komponentu, pa su tako nastali ekotoksikološki testovi na organizmima, drugačije nazivani i biološki testovi ili bioeseji (Den

¹⁷ Eksperimenti koji koriste cele, žive organizme, kao što je to slučaj u bioesejima toksičnosti na model organizmima.

¹⁸ Eksperimenti koji se sprovode na kompjuteru, tj. preko kompjuterskih modela i simulacija.

¹⁹ Eksperimenti koji se sprovode na izolovanim delovima organizama, npr. ćelijskim kulturama i kulturama tkiva.

²⁰ Eksperimenti koji se sprovode u prirodi, pod kontrolisanim uslovima.

Besten i Munawar, 2016). Ovakvi testovi pružaju mogućnost ispitivanja štetnih supstanci u strogo kontrolisanim uslovima, isključujući sredinske promenljive čiji efekti mogu "zamaskirati" efekat stresora. Tridesetih godina prošlog veka započeto je akutnim testovima na ribama, a naredne dve decenije razvili su se takozvani biološki testovi u "teglama za zimnicu" (eng. pickle-jar experiments) (Doudoroff, 1976), koji su predstavljali prvi vid standardizacije i početka usklađivanja toksikološkog i ekotoksikološkog testiranja u različitim istraživačkim institucijama (Mitchell i sar., 2002; Rand i Petrocelli, 1985).

Danas se testovi sprovode u skladu sa standardima, propisima i smernicama kako bi se dobili direktni merljivi podaci i dokazi o biološkim posledicama zagađenja akvatičnih ekosistema (Taylor i Scroggins, 2013). Podaci dobijeni ovim testovima pomažu u identifikaciji i kontroli štetnog dejstava zagađujućih supstanci u akvatičnim ekosistemima. Međunarodne svetske institucije ulažu velike napore u harmonizaciju i sistematizaciju razmene podataka među različitim laboratorijama, među kojima su: Međunarodna organizacija za standardizaciju (eng. International Organization for Standardization – ISO), Organizacija za ekonomsku saradnju i razvoj (eng. Organisation for Economic Co-operation and Development – OECD), Evropski komitet za standardizaciju (eng. European Committee for Standardization, fr. Comité Europeen de Normalisation – CEN), međunarodno Američko udruženje za testiranje i materijale (American Society for Testing and Materials International – ASTM), Američka asocijacija za javno zdravlje (eng. American Public Health Association – APHA), Agencija za zaštitu životne sredine Sjedinjenih Američkih Država (eng. United States Environmental Protection Agency – US EPA) i Kanadski zavod za životnu sredinu i klimatske promene (eng. Environment and Climate Change Canada – ECCC) (Taylor i Scroggins, 2013). U Evropi, ekotoksikološki i toksikološki testovi se sprovode prema smernicama OECD-a (OECD, 2020).

Testovi se klasifikuju prema trajanju (na kratkoročne, srednje duge i dugoročne testove, eng. short-term, intermediate, long-term), prema metodologiji dodavanja rastvora testirane supstance i prema svrsi (prema željenim parametrima koji se analiziraju).

Bez obzira na specifične zahteve svakog testa toksičnosti, opšti princip svih testova zahteva da sledeći elementi budu tačno definisani:

- poreklo i starost test organizama,
- priprema rastvora testirane supstance i dizajn testa,
- eksperimentalni uslovi u laboratoriji,

- evidencija zapažanja tokom trajanja testa i pisanje izveštaja,
- analiziranje parametara i merenja na osnovu prikupljenih podataka.

Slatkovidni organizmi koji se najčešće koriste kao modeli u ekotoksikološkim ispitivanjima jesu: cijanobakterije (*Anabaena flos-aquae*, *Synechococcus leopoliensis*), zelene alge (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Desmodesmus subspicatus*); dijatomeje (*Navicula pelliculosa*); školjke (uglavnom *Mytilus spp*); biljni komarci – hironomide, koji su predstavnici reda dvokrilaca – Diptera (uglavnom *Chironomus sp*); račići (*Mysidopsis spp*, *Palaemonetes pugio*, iz reda Cladocera *Daphnia magna*, *D. pulex*, *D. pulicaria*, *Ceriodaphnia dubia*) i ribe, kao najstroženi model organizmi (*Pimephales promelas* – vrsta klena; *Oncorhynchus mykiss* – kalifornijska pastrmka, *Cyprinodon variegatus*) (Rand i Petrocelli, 1985). Pored riba, vodozemci se koriste kao predstavnici kičmenjaka u ekotoksikološkim ispitivanjima (žaba *Xenopus levis*) jer su reprezentivi vrsta sa složenom građom koje žive u vodenom stubu i mogu biti izloženi toksikantima preko kože i preko ingestije (Bour i sar., 2016). Vrste sa intermedijernim položajem u lancu ishrane, a samim tim i važnom ulogom u protoku materije i energije kroz ekosistem, jesu najčešće korišćeni slatkovodni test-organizmi, kao što su vrste familije hironomida (*Chironomus tentans*, *C. riparius*), podreda Anomopoda (*Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, *Ceriodaphnia dubia*, *Chydorus sphaericus*) i reda Anostraca (*Thamnocephalus platyurus*, *Streptocephalus*, *Artemia ssp.*) (Auffan i sar., 2013; León Muez i sar., 2010).

1.2.1.1 Praćenje parametara (biomarkera) u ekotoksikološkim testovima

Željeni parametri toksikoloških testova čije promene ukazuju na efekat toksičnosti testiranih supstanci nazivaju se biomarkeri (promene karakteristika populacije, organizma, tkiva i ostalih nivoa biološke organizacije) ili, u grubom prevodu se engleskog jezika, „krajnje tačke toksičnosti“ (eng. endpoints), a predstavljaju merljive kriterijume za procenu efekata agensa koji se ispituje (Rand, 1995). U osnovi, svaki biomarker može se korelisati sa koncentracijama supstance koja se testira, vremenom izloženosti i stadijumima razvića model organizama (organizama koji se izlažu test supstanci) u biološkim testovima (Rand, 1995). Spoljašnji agensi mogu izazvati promene na molekularnom nivou, koje mogu da se amplifikuju i ispoljavaju u fenotipu jedinki, što može dovesti do promena u biologiji i ekologiji vrsta, poremećaja strukture i funkcije populacija i imati posledice po čitav ekosistem. Svi nivoi poremećaja homeostaze

bioloških i ekoloških nivoa organizacije mogu se pratiti putem ekotoksikoloških testova. Rezultati ekotoksikoloških testova mogu se izraziti preko različitih kvantitativnih (broj uginulih organizama, broj položenih jaja, procenat izleglih jaja, broj neonatnih jedinki, promene u dužini i težini, stopa iskorišćenosti kiseonika ili drugih metaboličkih parametara) i kvalitativnih parametara (promene u ponašanju organizama kao što su promene strategije predatora i plena; frekventnost presvlačenja kod makroinvertebrata) (Auffan i sar., 2013).

Subletalne reakcije organizama (uglavnom na suborganizmalnom nivou) predstavljaju rano upozorenje prisustva stresora, pre nego uticaj dostigne dramatične razmere i dovede do letalnih posledica i uticaja na čitave populacije. U kontekstu monitoringa životne sredine i upravljanja prirodnim područjima, subletalni parametri omogućavaju ranu dijagnozu ekoloških problema, pre nego njihova sanacija postane preobimna i preskup poduhvat (Hellou, 2011).

Štetni efekti na suborganizmalnom nivou uključuju molekularne interakcije, indukciju ili inhibiciju enzima i enzimskih sistema i njihovih funkcija. Jedan od važnih pokazatelja reakcije organizama na suborganizmalnom nivou je oksidativni stres, koji predstavlja poremećaj homeostaze, tj. balansa između oksidanata i antioksidanata u ćelijama, što može potencijalno izazvati biohemijske, strukturne i funkcionalne poremećaje (Sies, 2000). Umeren oksidativni stres predstavlja normalnu pojavu u organizmu koja se reguliše postojanjem mehanizama antioksidativne zaštite. Oksidanti mogu biti slobodni radikali velike reaktivnosti i obično se nazivaju reaktivnim vrstama kiseonika, ROS, kao što je pomenuto u prethodnim poglavljima. Tu spadaju superoksidni anjon $O_2^{\cdot-}$, vodonik peroksid H_2O_2 , hidroksilni radikal $\cdot OH$ i mnogi drugi (Pizzino i sar., 2017). Od adekvatne produkcije ROS u ćelijama zavisi fosforilacija proteina, aktivacija transkripcionih faktora, apoptoza, imuni odgovor i mnogi drugi ćelijski procesi. Ukoliko, međutim, dođe do povećanja koncentracija ROS, može doći do razgradnje proteina, nukleinskih kiselina, lipida i drugih važnih makromolekula (Wu i sar., 2013). Antioksidativni mehanizmi uglavnom se sastoje iz enzima kao što je superoksid-dismutaza, SOD, katalaza, CAT, glutation-peroksidaza, GPx (Pizzino i sar., 2017), čija se aktivnost može pratiti u testovima toksičnosti (Park i sar., 2008b; Lee i Choi, 2007). Jedan od najvažnijih antioksidativnih enzima je metaloprotein SOD: on konvertuje dva molekula superoksidnog anjona, $O_2^{\cdot-}$, u kiseonik i vodonik peroksid, H_2O_2 , a potom enzim CAT redukuje H_2O_2 do vode i kiseonika (Datkhile i sar., 2009). Antioksidativni mehanizmi kod insekata (pretežno ispitivani na gusenicama leptira) predstavljaju kompleksne sisteme enzima male molekulske mase kao što su SOD, CAT, ali i

glutation transferazna peroksidaza, GSH-Px, askorbat peroksidaza, APx i glutacion reduktaza, GR (Barbehenn, 2002). Katlaze su uglavnom prisutne u mitohondrijama i peroksizomima, a peroksidaze u mitohondrijama i hemolimfi (Choi i sar., 1999; Felton i Summers, 1995). Ovi enzimi kod značajnih bioindikatorskih vrsta insekata pokazuju mnoge specifičnosti: aktivnost ovih enzima je visoka u peritrofičkoj membrani creva, što dovodi do velike otpornosti mnogih vrsta na ingestovane hemijske toksine (Barbehenn, 2002; Felton i Summers, 1995); kod jedne od najkompleksnijih anhidrobiotičkih organizama, hironomide *Polypedilum vanderplanki*, primećena je prekomerna ekspresija antioksidativnih gena, nepostojanje enzima za sintezu askorbina i druge neobične osobine (Nesmelov i sar., 2018); kod drugih hironomida studije su pokazale povećanu aktivnost enzima stresa, pre svega SOD, u prelasku iz trećeg u četvrti larvalni stupanj pred samo presvlačenje larvi (Choi i sar., 1990). Zbog svega navedenog, oksidativni stres nije standardni parametar prema međunarodnim protokolima, ali je jedan od često praćenih biomarkera (preko praćenja aktivnosti samih enzima, ali i produkata oksidacije makromolekula kao što su lipidi, proteini i DNK) u ekotoksikološkim testovima.

Pored oksidativnog stresa, vrlo česta nestandardna analiza jeste procena genotoksičnosti (najčešće kroz procenu oštećenja DNK), koja može pre svega biti posledica samog oksidativnog stresa, ali i drugih negativnih procesa pri izloženosti toksičnim agensima. Za analize genotoksičnosti vrlo često se upotrebljava kometa test, drugačije nazvan i gel elektroforeza pojedinačnih ćelija (eng. comet assay/single-cell gel electrophoresis assay), kojim se meri nivo cepanja DNK lanca u pojedinačnim ćelijama (Park i Choi, 2009). Ovaj test se koristi već duži niz godina u ekotoksikološkim testovima zbog brze pripreme i lake obrade podataka (Park i Choi, 2009), ali je samo nekoliko studija genotoksičnosti sprovedeno na akvatičnim organizmima, pretežno uključujući dafnije i hironomide (Park, 2010; Den Besten i Tuk, 2000).

Odgovor individua na prisustvo stresa dešava se pre odgovora na nivou populacija, te praćenje promena individua može omogućiti rano upozorenje od pojave stresa u sistemu (Warwick, 1985). Štetni efekti na nivou organizama uključuju kratkoročne i dugoročne letalne efekte (populacione parametre izražene preko mortaliteta ili preživljavanja) i subletalne efekte (parametre fitnesa izražene preko promena u ponašanju, rastu, razvoju, reprodukciji, unosu toksina i detoksikaciji, strukturi i aktivnosti tkiva, promena u fenotipu organizama). Na nivou iznad organizma, štetni efekti uključuju promene u genotipu ili fenotipu vrsta, kao i promene u

broju, relativnoj abundanci i fiziološkom stanju vrsta tipično prisutnih u datoj populaciji koja je pod stresom.

Obično se toksični efekti ispitivane supstance (ili bilo kog drugog stresora, recimo visoke temperature, anoksije i sličnih stresora) testiraju u nekoliko koncentracija (tretmana) sa određenim brojem ponovaka (replikata) koji omogućuju statističko poređenje srednje vrednosti tretmana sa kontrolom ili referentnim podacima iz literature. Za supstance koje nikada nisu testirane uglavnom se procenjuje letalna koncentracija koja izaziva smrtnost kod 50% ispitivane populacije (eng. Lethal Concentration 50 – LC50), najviša koncentracija bez primetnog efekta (eng. No Observed Effect Concentration – NOEC) ili najmanja koncentracija koja izaziva primetne efekte (eng. Lowest Observed Effect Concentration – LOEC), pri čemu efekti mogu biti promene bilo kog od praćenih biomarkera (OECD, 2004). Rezultati se potom prezentuju prema prosečnoj ili srednjoj koncentraciji testirane supstance u tretmanu. Statistička analiza i interpretacija rezultata mora biti u skladu sa dizajnom eksperimenta, a odabir adekvatnih statističkih testova trebalo bi da se zasniva na adekvatnosti metoda, pri čemu se moraju uzeti u obzir prednosti i mane datog metoda i sprovesti preliminarni statistički testovi.

Razvoj industrije doveo je i do razvoja same ekotoksikologije, što je uslovalo čestu modifikaciju ekotoksikoloških testova i uvođenje novih metoda praćenja štetnog efekta testiranih agenasa. Pored standardnih, intenzivno se radi na razvoju praćenja novih, komplementarnih biomarkera i adaptaciji propisanih ekotoksikoloških testova za ispitivanje novonastalih hemijskih agenasa (OECD, 2004).

Metod geometrijske morfometrije

Tokom razvića individua morfološke celine se menjaju da bi dostigle svoj finalni oblik i veličinu, najčešće u periodu polnog sazrevanja jedinke, a ove promene izučava jedna od najstarijih bioloških disciplina – morfologija (Ivanović i Kalezić, 2009). Analize morfologije organizama su osnova mnogih bioloških istraživanja na polju sistematike, taksonomije i evolucije. Oblik, prema formalnoj definiciji, jeste geometrija objekta kada mu se oduzmu pozicija, orijentacija i veličina (Kendall, 1977) i kao takav je idealan za kvantitativne analize. Morfološke analize su stoga tokom godina prešle sa deskriptivnog (opis izgleda fenotipskih promena) na kvantitativni način analize (Bookstein, 1998). Osnovni "alat" u analizi promena

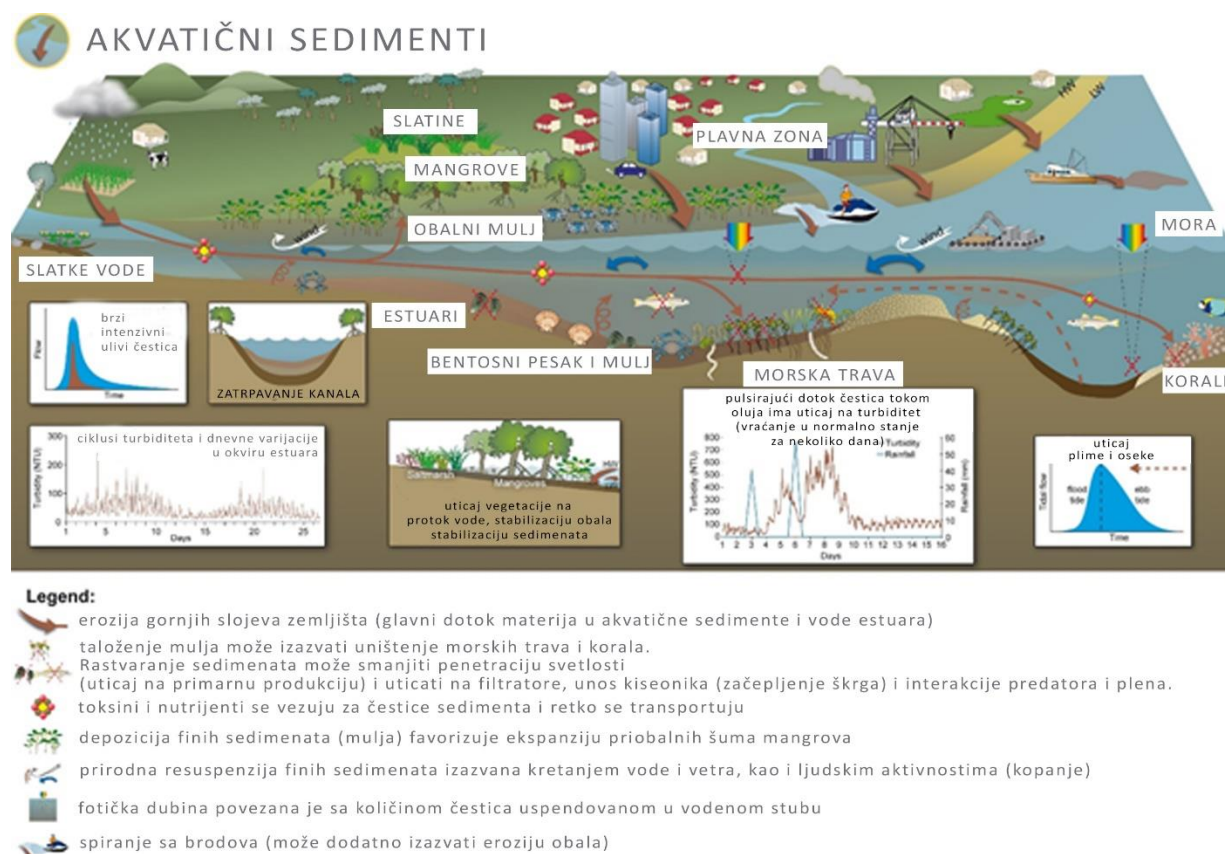
morfoloških celina jeste morfometrija – podaci dobijeni merenjima analiziraju se pomoću statističkih metoda radi istraživanja oblika i veličine morfoloških celina, kao i istraživanja veza između morfologije i spoljašnjih i unutrašnjih faktora (Rohlf, 1990; Ivanović i Kalezić, 2009). Ovim analizama može se utvrditi da li postoji neki uticaj spoljašnjeg stresora na fenotip (oblik i veličinu morfoloških struktura) i kvantifikovati taj uticaj. Dva osnovna principa u morfometriji (dve metode prikupljanja i analize podataka) jesu tradicionalna i geometrijska morfometrija. U tradicionalnoj morfometriji analizirane morfološke strukture (objekti analize) definišu se dužinskim rastojanjima (širina, dužina, visina) među definisanim tačkama i podaci se analiziraju multivarijantnim statističkim metodama. Podaci dobijeni na ovaj način sadrže veoma malo informacija o generalnom obliku analiziranih struktura. U geometrijskoj morfometriji analizirani objekti definišu se matematički preko rasporeda, tj. konfiguracije tačno definisanih specifičnih tačaka (eng. landmarks) koje opisuju njihovu geometriju, potom se statističkim metodama analizira njihov oblik i veličina i metodama direktnog grafičkog predstavljanja vizuelizuju se njegove promene.

Geometrijsko morfometrijski pristup nastao je krajem 1980-ih godina sa pronalaskom metode analize oblika zasnovane na koordinatama i predlogom "statističke teorije oblika" (Mitteroecker, 2009; Bookstein, 1998; Rohlf i Marcus, 1993). Od tada do danas, veliki broj istraživača bavio se ovim pristupom i njegovom primenom u biologiji, pre svega za rešavanje pitanja razlike vrsta i analize seksualnog dimorfizma (Lorenz i sar., 2017). Geometrijska morfometrija u analizi bioloških struktura korisna je jer može analizirati oblik u dve ili tri dimenzije (analiza 2D fotografija ili analiza čitavih 3D modela), omogućava primenu nekoliko statističkih analiza, kao i grafičko predstavljanje oblika i veličine struktura (Lorenz i sar., 2017).

Iako je metoda geometrijske morfometrije razvijena za potrebe taksonomskih istraživanja, s obzirom da je njome moguće pratiti fine i teško uočljive promene na strukturama primenom kompjuterskih softvera, ona pokazuje veliki potencijal za primenu u ekotoksikologiji.

1.2.1.2 Ekotoksikološka ispitivanja akvatičnih sedimenata

Sediment akvatičnih ekosistema predstavlja stanište za mnoge akvatične organizme koji čine bentosnu hidrobiocenozu, ali takođe predstavlja i glavno skladište toksičnih materija. Mnoge antropogene hemikalije i otpadne materije (uključujući toksične organske i neorganske supstance) koje dospeju u akvatične ekosisteme na kraju se talože u sedimentima (Slika 6).



Slika 6 - Potencijalni uzroci promene vodenih sedimenata i nastale reakcije kao rezultat ove promene. (Izvor: https://ozcoasts.org.au/conceptual-diagrams/stressors/aquatic_sediments_model/, prevedeno na Srpski).

U životnoj sredini sediment se definiše kao čestični materijal koji se obično nalazi ispod vode, dok se u ekotoksikološkim testovima sedimentom smatra supstrat, tj. podloga koja se koristi u eksperimentima, a koja se priprema tako da imitira prirodne sedimente (ASTM, 1994). Prirodni sediment ima heterogene fizičke, hemijske i biološke osobine i može sadržati organsku materiju u različitom stepenu raspadanja ili sinteze, mineralne čestice i neorgansku materiju biogenog porekla (Knezovich, 1987). Power i Chapman, 1992, opisuju četiri glavne komponente sedimenata: najzastupljenija komponenta je intersticijalna voda, koja okružuje čestice sedimenta i tipično zauzima 50% njegove ukupne zapremine; druga najzastupljenija komponenta se sastoji

od neorganskih faza, uključujući fragmente stena i minerale (neorganske faze kontrolišu nivo biodostupnosti mnogih divalentnih materija); treća po zastupljenosti je organska materija (značajna komponenta jer kontroliše sorpciju i biodostupnost mnogih nejonских organских zagađivača); četvrtu komponentu predstavljaju alohtone supstance antropogenog porekla, uključujući i zagađujuće materije (Di Toro i sar., 1990; 1991).

Raspodela i sorpcija²¹ supstanci između vode i sedimenta zavise od mnogo faktora, uključujući: rastvorljivost u vodi, pH, redoks potencijal, afinitet ka ugljeniku u sedimentu ili rastvorenom ugljeniku, veličine čestica sedimenta, mineralnog sastava sedimenta (koncentracije oksida gvožđa, mangana, aluminijuma) i količini kiselih isparljivih sulfida (eng. Acid-Volatile Sulfids – ASV) u sedimentima (Di Toro, 1991; Adams i sar., 1992).

Širok spektar zagađivača, uključujući teške metale, pesticide, industrijske hemikalije i hidrokarbonate, taloži se i akumulira u sedimentima (Lyman i sar., 1987). Ovako kontaminirani sedimenti²² mogu direktno negativno uticati na akvatični živi svet (Swartz i sar., 1985) ili mogu biti izvor zagađujućih materija koje bioakumulacijom, kroz nakupljanje u organizmima, ulaze u lance ishrane (Mac i sar., 1984).

Istorijski, procena kvaliteta sedimenata je bila ograničena na karakterizaciju hemijskih supstanci u njima, međutim sama procena koncentracija agenasa ne može dati dovoljno informacija za adekvatnu evaluaciju njihovih negativnih efekata, procenu interakcije među različitim supstancama ili dostupnosti za biološke sisteme (Griscom, 2000; Busacker i sar., 1990). Obzirom na nedovoljno poznavanje odnosa među zagađujućim materijama u sedimentu i njihove biodostupnosti, pristupa se proceni uticaja kontaminiranih sedimenata na akvatične organizme putem testova toksičnosti (Ingersoll i sar., 1995).

Testovi toksičnosti sedimenta omogućavaju prikupljanje podataka i brzu procenu potencijalne toksičnosti zagađujućih materija na bentosne organizme. Za efikasniju i precizniju evaluaciju toksičnosti određenih supstanci preporučuje se kombinacija ovih testova sa drugim metodama, kao što je procena strukture i sastava zajednice bentosnih organizama (Jovanović i sar., 2016a; Chapman, 1986; Barrick i sar., 1988; Canfield i sar., 1994; Swartz i sar., 1994). Rezultati ekotoksikoloških testova predstavljaju osnovu za monitoring, kroz praćenje prisustva

²¹ Sorpcija predstavlja procese vezivanja jedinjenja iz vodene faze za površinu čvrste faze (čestice sedimenata ili koloide u vodi).

²² Sedimenti koji sadrže hemijske supstance u koncentracijama koje predstavljaju opasnost po zdravlje ljudi ili životne sredine (Di Toro i sar., 1990).

zagađujućih materija u životnoj sredini i promena koje oni izazivaju u organizmima i čitavom ekosistemu.

U laboratorijskim testovima toksičnosti eksperimentalna podloga se priprema mešanjem kombinacije sastojaka tako da imitira referentni prirodni sediment koji odgovara datom model-organizmu. Nakon pripreme eksperimentalne podloge obično se pristupa mešanju testirane supstance ili mešavine supstanci, sa pripremljenom podlogom (eng. laboratory spiked sediment) (Lamberson i Swartz, 1992), u koncentraciji koja se realno može naći u prirodnim uslovima. Podaci dobijeni ovim testovima ukazuju na zavisnost (korelaciju) i odnos između izloženosti određenoj koncentraciji testirane supstance i biološkog odgovora izloženih organizama (praćenih biomarkera). Uticaj fiziko-hemije sedimenta na toksičnost testirane supstance može se takođe izučavati putem ovih testova toksičnosti (Adams i sar., 1985).

1.2.1.3 Organizmi u ekotoksikološkim testovima (model-organizmi)

Model-organizmi, kao i sami ekotoksikološki testovi, trebalo bi da budu izabrani na osnovu taksonomskih, ekoloških, toksikoloških i hemijskih kriterijuma, među kojima su posebno značajni osetljivost i način reakcije organizama na stresore. Akvatični beskičmenjaci, mekušci, artropode i kičmenjaci uglavnom su podložniji uticaju ksenobiotika u životnoj sredini nego većina terestričnih organizama. Visoka podložnost akvatičnih organizama uslovljena je različitim fiziološkim karakteristikama: epidermis je potpuno ili delimično (škrge) hidrofilan; uglavnom ne poseduju zaštitnu kutikulu ili mehanizme protiv isušivanja; disanje uglavnom obavljaju preko kože; parenteralni unos organskih i anorganskih supstanci je čest, pogotovo među beskičmenjacima (Markert i sar., 2003). Stanovnici sedimenta (bentosni organizmi) predstavljaju složenu hidrobiocenu sa važnom ulogom u kruženju materije i protoku energije, a pre svega u dekompoziciji organske materije. Predstavnici bentosne hidrobiocenoze čine odlične model-organizme jer pre svega mogu biti izloženi toksičnim agensima kroz tri primarna izvora: putem intersticijalne vode, putem samog sedimenta ili preko samog vodenog stuba. Hrana takođe može biti izvor toksičnih supstanci, a tip ishrane (koji uključuje tip i količinu prosečno korišćene hrane od strane organizma) u velikoj meri će kontrolisati dozu unete supstance iz sedimenta (Adams, 1884). Bentosni beskičmenjaci često selektivno konzumiraju čestice sa većom koncentracijom ugljenika, koje mogu na sebi sadržati višu koncentraciju toksičnih supstanci.

Organizmi koji se hrane detritusom najveću količinu supstance uneće u organizam direktnom konzumacijom sedimenata. Kod amfipodnih račića (Landrum, 1989) i školjki (Boes i sar., 1990) unos preko digestivnog sistema može biti veći od biokoncentracije preko respiratornog sistema i integumenta. Organizmi u direktnom kontaktu sa sedimentom mogu akumulirati kontaminante direktnom apsorpcijom preko telesnog zida ili preko integumenta (Knezovich i sar., 1987). Procene unosa toksičnih supstanci posebno su zahtevne kod epibentičnih organizama, koji naseljavaju i sedimente i vodeni stub. Treba uzeti u obzir da iako određene supstance imaju veliki potencijal vezivanja za sedimente, mogu i dalje biti dostupne za bentosne organizme.

Izbor adekvatnog model-organizma ima značajan uticaj na ekološku relevantnost, uspeh, isplativost i interpretaciju ekotoksikološkog testa. Mora se uzeti u obzir da jedna vrsta ne može biti dovoljan indikator za sve tipove sedimenata i ispitivanih agenasa. Izbor vrste treba da se zasniva na: osetljivosti vrste na prisustvo zagađujuće supstance koja se testira, njenom ponašanju u sedimentu, načinu ishrane, ekološkoj relevantnosti, geografskoj distribuciji, taksonomskoj bliskosti sa autohtonim vrstama, dostupnosti, toleranciji vrste na prirodne geohemijske karakteristike sedimenta (veličine čestica sedimenta) i postojanju standardizovanih metoda koje se tiču date vrste (US EPA, 1994). Vrsta, dakle, mora biti dobar bioindikator prisustva testirane čestice, kako u samoj životnoj sredini tako i u laboratorijskim testovima. Takođe, potrebno je i izvršiti adekvatan odabir biomarkera čiji će nivo ili promene najadekvatnije pokazati efekte koje posmatrani uticaj ima na organizme. Mnoge bentosne vrste, koje možda mogu biti prikladne za testiranje toksičnosti sedimenta, ne ispunjavaju sve kriterijume za selekciju jer je istorijski jako malo pažnje posvećeno razvijanju protokola za bentosne organizme, te postoji veoma malo adekvatnih literaturnih podataka. Značajan kriterijum za odabir vrste predstavlja i mogućnost jednostavne kultivacije u laboratoriji i ekonomičnost sprovođenja testova. U pogledu jednostavnosti održavanja laboratorijskih populacija uvek je pogodnija upotreba jednostavnijih organizama kakvi su beskičmenjaci, koji imaju jednostavnije zahteve od složenijih organizama kakvi su kičmenjaci. Odabrani model organizmi mogu biti poreklom iz laboratorijski uzgajanih populacija ili pak mogu biti prikupljeni iz prirodnih populacija (pri tome treba voditi računa da lokaliteti sa kojih se uzorkuju organizmi nisu blizu izvora zagađenja supstancom koja se ispituje u testu, kako ne bi posedovali neki vid prirodne prilagođenosti na tu supstancu).

Poslednji, ali podjednako važan, jeste i etički kriterijum za odabir vrsta. Poslednjih decenija svest o dobrobiti i konceptu prava laboratorijskih životinja doveli su do pooštavanja

mera i pravila za njihovo korišćenje u ekotoksikologiji. Upotreba nesisarskih i beskičmenjačkih vrsta, pre svega organizama sa nižim stepenom razvića (kao što su makrobeskičmenjaci), ne zahteva odobrenja etičkih komiteta koja mogu biti izuzetno opširna i skupocena, a daje veoma informativne rezultate koji se mogu ekstrapolirati na složenije sisteme (Moros i sar., 2019; Andersen i Winter, 2019).

S obzirom na sve navedene činjenice, treba biti vrlo obazriv pri izboru model organizama u ekotoksikološkim testovima, dobro poznavati njihovu biologiju i ekologiju i razmotriti mogućnost testiranja iste supstance putem nekoliko različitih biomarkera i pomoću nekoliko različitih model-organizama.

Kada se uzme u obzir dosadašnja literatura koja se tiče procene uticaja antropogenih stresora, od molekularnog pa sve do ekosistemskog nivoa, makroinvertebrate su zastupljene u velikom broju istraživanja (Laini i sar., 2018). Od svih invertebrata, endokrini sistem je najbolje proučen kod insekata, pa se efekti koji su potencijalno povezani sa endokrinim sistemom mogu proučavati na ovim organizmima. Specifični insekticidi treće generacije, antagonisti i agonisti juvenilnih hormona i ekdizona supstance su čije je dejstvo poznato i mogu se koristiti kao referentne supstance pri izučavanju potencijalnih endokrinih efekata. Efekti stresora u prirodnim kontaminiranim lokalitetima uglavnom su ispitivani na nivou populacija i zajednica, preko procene brojnosti populacija, bogatstva i ujednačenosti kombinacija vrsta makroinvertebrata; ali i preko osobina (mase, dužine, forme) i karakteristika životnih istorija, tj. adaptivnih vrednosti vrsta u smislu dužine života, reprodukcije, broja potomaka, disperzionog potencijala itd. (Statzner et al., 2005). Efekti stresora na nivou organizma ispitivani su preko promena u stopi rasta ili reprodukcije, ali i stopi prisustva morfoloških deformiteta larvi hironomida uzorkovanih iz prirodnih kontaminiranih staništa (Martinez i sar., 2002). Mnogi fiziološki odgovori (efekti na suborganizmalnom nivou), kao što je promena u respiraciji i metabolizmu, takođe su korišćeni kao indikatori stresa, npr. rad Buchwalter i Luoma, 2005, na proceni uticaja cinka i kadmijuma na nekoliko akvatičnih insekata iz reda Ephemeroptera, Trichoptera i Plecoptera.

Od svih makrobeskičmenjaka, Familija Chironomidae najšire je rasprostranjena, vrlo često i najbrojnija grupa insekata u slatkovonim ekosistemima (Milošević, 2013; Armitage i sar, 1995). Hironomide nastanjuju sve svetske kontinente izuzev Antarktika, a familija je podeljena u 11 potfamilija i 22 tribusa (Ferrington, 2007). Široka geografska distribucija je, možda, posledica starosti familije (smatra se da su nastale nekada u juri) (Armitage i sar, 1995; Brundin, 1966).

Vrste se mogu naći u širokom dijapazonu staništa, ali su ukupno 339 taksona i 4.147 vrsta potpuno akvatične u preadultnim stupnjevima (Ferrington, 2007). Činjenica da se mogu naći u skoro svakom tipu vodenog staništa i da imaju vrlo širok ekološki raspon i osetljivost čini ih izuzetno dobrim biondikatorima koji ukazuju na stanja životne sredine (Dickman i Rygiel, 1996).

Uzimajući u obzir navedene karakteristike, u ovoj doktorskoj disertaciji predstavnici hironomida korišćeni su kao model-organizmi, te će o njima dalje biti više reči.

1.2.1.3.1 Hironomide kao model-organizmi

Hironomide su idealni organizmi za ekotoksikološka ispitivanja akvatičnih sedimenata iz nekoliko osnovnih razloga:

- provode većinu svog života u površinskim sedimentima, gde su u stadijumu larve izložene raznim agensima (pre svega fizičkim kontaktom i ingestijom);
- imaju kratak životni ciklus koji se broji nedeljama (veoma dobro proučen) i visok fekunditet, a kod nekih vrsta moguće je uspostaviti 10 ili više generacija godišnje u laboratoriji;
- relativno su osetljive na polutante i koriste se u standardnim ekotoksikološkim testovima.

Pored navedenih osobina, treba uzeti u obzir da su hironomide holometabolni insekti, pa prolaze kroz potpunu metamorfozu tokom hroničnih testova, a nakon izletanja vrlo je lako razlikovati muške i ženske jedinke. Kompletan životni ciklus *Chironomus riparius* na 20° C u laboratoriji se završava za 20–28 dana, a *C. tentans* za 28–65 dana, što je dovoljan period za proučavanje hronične izloženosti (dovoljno da reprezentuje izloženost u prirodnim uslovima, a povoljno za laboratorijski rad) (Bruns i Weltje, 2009).

Među hironomidama, jedan od najrasprostranjenijih i najbogatijih vrstama je rod *Chironomus* (Salmelin i sar., 2015). Predstavnici *Chironomus spp.* su korišćeni u mnogim studijama, od kojih se *C. tentans*, *C. riparius* i *C. yoshimatsui* koriste kao standardni model-organizmi u testovima toksičnosti. Druge vrste su takođe korišćene: *Cryptochironomus* i *Procladius* (Warwick, 1988); *C. anthracinus* i *C. plumosus* (Salmelin i sar., 2015); *Chironomus sancticaroli* (Rebechi i sar., 2012); *C. plumosus*, *Cryptochironomus*, *Procladius* (Warwick i Tisdale, 1988), ali u manjoj meri.

S obzirom da su za potrebe ove doktorske disertacije kao model organizmi korišćene jedinke vrsta *Chironomus tentans*, FABRICIUS, 1805, i *Chironomus riparius*, MEIGEN, 1804, neophodno je predstaviti osnovne informacije o ovim vrstama, relevantne za razumevanja njihove upotrebe u ekotoksikološkim testovima, kao i kasniju interpretaciju rezultata

Biologija i ekologija hironomida (vrsta *Chironomus tentans* i *Chironomus riparius*)

Veliki broj radova bavi se biologijom hironomida, međutim detaljna ekologija i životni ciklusi mnogih vrsta još uvek su nepoznanca. Mnoge generalne faunističke studije izostavljaju hironomide ili se površno bave njima, a osnovni razlog za to je nedovoljno poznata taksonomija i filogenija, teška determinacija velikog broja vrsta, kao i mali broj stručnjaka iz ove oblasti (Armitage i sar., 2012; Pillot, 2009). Jedan od najbolje izučavanih tribusa je tribus Chironomini, čije populacije mogu biti izuzetno brojne u akvatičnim sredinama, ali prisutne i u jako zagađenim staništima. Larve tribusa Chironomini poznate su kao “krvavi crvi” (eng. bloodworms) zbog karakteristične izrazito crvene boje usled prisustva hemoglobina u hemolimfi. U ovom tribusu, rod *Chironomus* je jedan od najbrojnijih, a i najznačajnijih sa ekološkog, bioindikatorskog, ekotoksikološkog, medicinskog i mnogih drugih aspekata (Armitage i sar., 1995), kao što je već navedeno. Zbog svojih jedinstvenih karakteristika, vrste roda *Chironomus* koriste se u taksonomiji, citogenetici, molekularnoj filogeniji, fiziologiji, ekotoksikologiji, paleolimnologiji, studijama kontrole štetočina, a nedavno je predloženo ponovno korišćenje hironomida kao model-organizama u studijama evolucije razvića, poznatijim kao evo-devo (Thorat i Nath, 2013).

Vrste *Chironomus tentans* i *Chironomus riparius* u taksonomskom pogledu pripadaju rodu *Chironomus* i tribusu Chironomini (slika 7).



Slika 7 - A – sistematika roda *Chironomus*; B – Odrasli mužjak vrste *Chironomus tentans*; C - Odrasli mužjak vrste *Chironomus riparius*. Izvor slika: https://diptera.info/forum/viewthread.php?thread_id=86548&pid=360393 i <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/205195v2.full>

Obe vrste spadaju među najrasprostranjenije u okviru roda *Chironomus*, žive u umerenoj temperaturnoj zoni, mogu se naći u skoro svim evropskim zemljama, a najbrojnije su u holocenskim i pleistocenskim regionima (Pillot, 2009). Obe vrste su preporučene kao standardni model-organizmi u ekotoksikološkim testovima u Evropi (pretežno vrsta *C. riparius*) i Americi (pretežno vrsta *C. tentans*) (Hill, 1993; Ingersoll, 1995). Razlike u njihovoj biologiji i ekologiji, pa i u odgovoru na toksične agense izuzetno su male, uz neznatno veću osetljivost vrste *C. tentans* (Watts i Pascoe, 2000a; Watts i Pascoe, 2000b). Schmidt-Kloiber i Hering, 2015, objedinili su informacije o autekologiji, ekološkim preferencijama i biološkim osobinama slatkovodnih vrsta, koje se mogu naći na sajtu www.freshwaterecology.info²³, prema kojem većina osobina ovih dveju vrsta ima slične vrednosti (Brabec i sar., 2020; Schmidt-Kloiber i Hering, 2015). Trenutno, sinonimi pod kojima se može navoditi vrsta *C. tentans* jesu: *C. dilutus* i *Camptochironomus tentans*; a vrsta *C. riparis*: *C. albistria*, *C. serus*, *C. militaris* i retko *Tendipes riparius* (Pillot, 2009).

²³ Sajt sadrži bazu podataka iz više naučnih izvora i rezultat je rada velikog broja naučnika. Baza se svakodnevno obnavlja, te daje najnovije podatke o slatkovodnim vrstama i pruža mogućnost međusobnog upoređivanja taksona. Podaci o familiji Chironomidae rad su autora Brabec i sar., a najnovije informacije koje su o vrstama izložene u tekstu ove disertacije preuzete su 2020. godine.

Morfologija i identifikacija

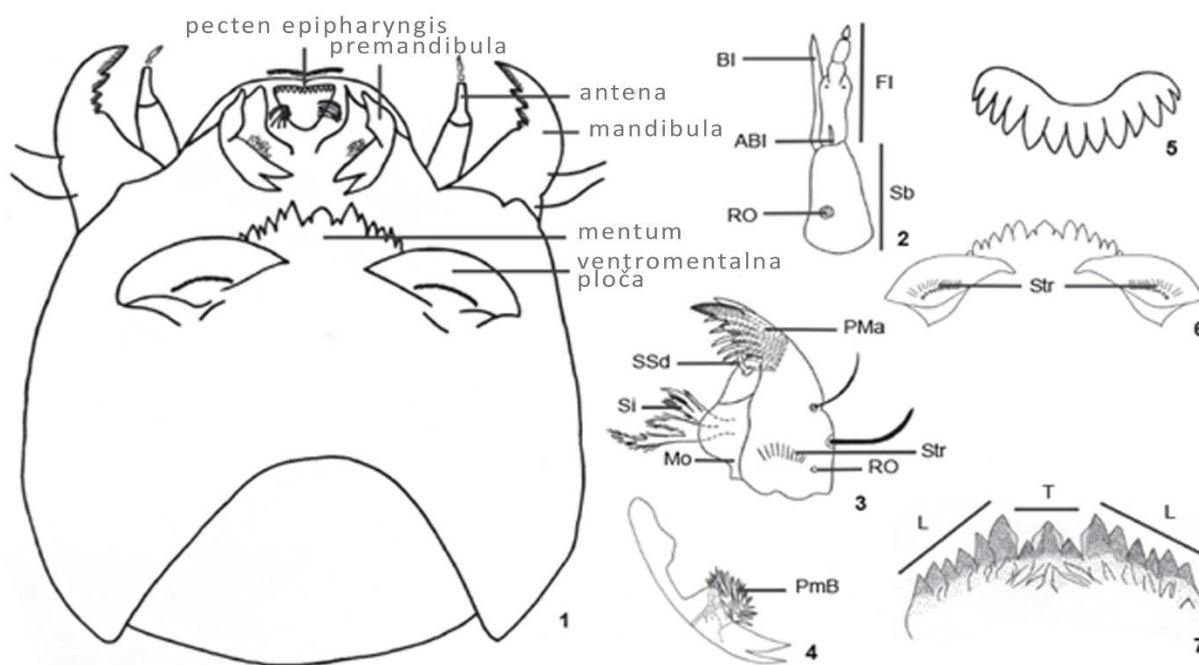
Sve vrste hironomida u fizičkom pogledu podsećaju na komarce u odraslom stadijumu, međutim, za razliku od komaraca, one ne poseduju izdužen usni aparat, niti krilne ljespe. Kao što je već napomenuto, *Chironomus sp.* karakteriše jarkocrvena boja u larvalnom stadijumu zbog prisustva hemoglobina. Ovaj respiratorni protein široko je rasprostranjen među kičmenjacima, ali se među insektima sreće kod vrlo malo predstavnika, što hironomide čini zaista jedinstvenim. Hemoglobin hironomida ima mnoge specifične karakteristike: visok polimorfizam, visok afinitet prema kiseoniku i ekstracelularnu lokalizaciju (Osmulski i Leyko, 1986). Hemoglobin se sintetise u masnom tkivu larvi, odakle se sekretuje u hemolimfu i, s obzirom na njegovu važnu ulogu u oksidativnim procesima u organizmu, ima veliki potencijal u bioindikaciji (Choi i sar., 1999). Smatra se da se hemoglobin razvio kod beskičmenjaka radi prilagođavanja nepovoljnim uslovima okruženja jer ovaj pigment pomaže u održavanju aerobnog metabolizma u uslovima niskog kiseonika (Lee i sar., 2006). Čini se da hemoglobin kod roda *Chironomus* ispunjava fiziološke uloge u transportu i skladištenju kiseonika u larvama koje se zakopavaju u hipoksičan sediment (Osmulski i Leyko, 1986), a vanćelijska lokalizacija poboljšavaju eksploataciju kiseonika u hipoksičnoj sredini (Weber, 1980).

U svakom delu životnog ciklusa postoje morfološke specifičnosti koje odvajaju vrste u okviru familije hironomida, a koje je moguće uočiti samo uz detaljno posmatranje struktura od strane obučениh stručnjaka (slika 8).



Slika 8 - Fotografija različitih razvojnih stadijuma *C. tentans* u laboratoriji A- paket jaja, B- larva četvrtog stupnja, C – Odrasla jedinka, imago (mužjak).

Larve hironomida vrlo su specifične po strukturi glavene čaure i usnog aparata, kao i nastavaka na kraju abdomena, a ove strukture najbolje su izražene kod larvi četvrtog stupnja, te se one najviše koriste u identifikaciji (Vallenduuk, 2017). Parapodije (lažne noge) nalaze se na prvom torakalnom i posljednjem abdominalnom segmentu, a na VIII abdominalnom segmentu se nalazi i ventralni par tubula. Strukture na glavenoj čauri (guli) predstavljaju taksonomski karakter (slika 9).



Slika 9 – Ventralni izgled glavene čaure vrste *Chironomus sancticaroli* na kome se uočavaju strukture izdvojene za morfološku analizu u radu Rebechi i Navarro-Silva, 2012, a koje se generalno nalaze na glavi roda *Chironomus* (2) desna antena; (3) desna mandibula; (4) premandibula; (5) pecten epipharyngis; (6) ventromentalna ploča; (7) mentum. T: trifidni centralni zub L: lateralni zubi, RO: kružni organ, Sb: bazalni segment, ABI: akcesorna oštrica, BI: oštrica, FI: antenalni bič, Mo: mola, PMA: pecten mandibularis, PmB: premandibularna četka, Si: seta internalis, SSd: seta subdentalis, Str: strije, (preuzeto iz rada Rebechi i Navarro-Silva, 2012)

Glava se sastoji iz potpuno sklerotizovanog kranijuma sastavljenog iz dorzalne apotome i para lateralnih gena (obraza) koji sačinjavaju nekoliko struktura koje poseduju sete, tj. dlačice: labrum – anteriorna ekstenzija frontalne apotome, na čijoj ventralnoj strani je labralna lamela (pektinozna struktura V oblika sa čekinjama koje verovatno imaju čulnu ulogu), potom epifarinks ili palatum (nazubljena struktura U oblika iza labralne margine, verovatno sa ulogom u manipulaciji hrane); sa donje strane labruma nalaze se parne premandibule (strukture savijene ka usnom otvoru sa obe strane labruma, sa dva apikalna zuba i premandibularnom četkom) i parne, pokretne, nazubljene mandibule; klipeus; mentum (nazubljena ploča) sa posterolateralnim proširenjima, koji se nazivaju ventromentalnim pločama (koje pomažu u ispredanju niti nastalih

u pljuvačnim žlezdama) i submentum (posteriorno od mentuma) (Armitage i sar., 2012). Većina navedenih struktura, kao i broj i raspored seta na njima koristi se u identifikaciji od nivoa potfamilije do nivoa vrsta. Oči, kao i kod ostalih jedinki subfamilije Chironominae, predstavljene su duplim očnim mrljama postavljenim vertikalno. Antene imaju čulnu ulogu i sastavljene su iz delova koji se ne menjaju tokom larvalnog razvitka: bazalnog segmenta, flageluma sa četiri članaka, antenalne oštrice i akcesorne oštrice i prstenastog organa (Rebecchi i sar., 2012). Pri identifikaciji se mogu koristiti i jedinke u odraslom ili u stadijumu pupe (Hein i Mahadeva, 1992). Kod odraslih jedinki izražen je polni dimorfizam: ženke imaju kratke nitaste antene i zdepast abdomen, a mužjaci imaju duge peraste antene i izdužen abdomen. Na kraju abdomena mužjaka nalazi se karakterističan par „kopči“ (polnih struktura sastavljenih iz gonokoksita i gonostilusa, koje pomažu pridržavanje ženki tokom parenja) (Armitage i sar., 2012). Krila odraslih mužjaka i ženki karakteristična su za vrste i pokazuju polni dimorfizam u obliku, koji još uvek nije dovoljno proučen, mada su kod većine vrsta krila ženki veća i šira. Membrana krila podeljena je u ćelije koje se imenuju prema anteriornoj veni koja ih razdvaja (Armitage i sar., 2012). Pored krila, izgled i proporcija elemenata ekstremiteta (nogu) mogu biti značajan taksonomski karakter.

Iako se karakteristike eksterne anatomije hironomida, kao izuzetno konzervativne strukture, najčešće koriste u njihovoj identifikaciji, moguće je identifikovati ih i putem hromozoma, takozvanim citotaksonomskim pristupom. Kao i ostali predstavnici reda Diptera, hironomide su diploidi koji imaju relativno mali broj hromozoma ($2n$, od 4 do 8), a često formiraju i politene hromozome putem endomitoze (Armitage i sar., 2012). Endomitoza, bez prateće nukleusne ili ćelijske divizije, dovodi do stvaranja čak i 3.000 do 4.000 hromatida koje ostaju spojene zajedno, a po nekad dolazi i do povećanja količine DNK i do 2^{13} puta (Edström i Daneholt, 1967). Ovo dovodi do pojave gigantskih interfaznih hromozoma (do 800 μm dužine), čak 100 puta većih od prosečnih, a koji su najčešće prisutni u pljuvačnim žlezdama, mada se mogu naći i u epitelu creva i malpigijevim tubulama (uglavnom u ekskretornim tkivima, kao i kod vinske mušice, *Drosophila melanogaster*) (Edström i Daneholt, 1967). Zapravo, ovakvi hromozomi prvi put su i otkriveni na rodu Chironomus (Balbiani, 1881). Kod vrste *C. tentans* prvi put su uočene i velike nakupine hromozomske DNK na mestima najintenzivnije transkripcije, koje su idealne za proučavanje aktivnih gena. Ove strukture nazvane su „Balbianijevi prstenovi“ (eng. puffs/ Balbiani rings). Pokazalo se da svaka vrsta ima jedinstven

izgled politenih hromozoma: specifičnu šemu traka,²⁴ položaj i oblik centromera²⁵, broj i položaj balbijanijevih prstenova, broj i položaj nukleolusa i organizaciju čitavih hromozoma koji se mogu koristiti u identifikaciji.

Pored citotaksonomije, poslednjih godina se sve više koristi tehnika DNK barkodiranja: kao jedinstven identifikator vrsta koristi se varijacija sekvenci kratkih fragmenata DNK. U najširoj upotrebi je analiza DNK fragmenta od 648 baznih parova mitohondrijskog gena za citohrom c oksidazu, subjedinicu 1 gena (COI), koji su predložili i Hebert i sar., 2003. Ova tehnika predstavlja dodatni pomak od gotovo isključivog oslanjanja na morfološke karaktere u identifikaciji vrsta ka sofisticiranijoj analizi molekularnih karaktera (Ekrem i sar., 2010). Velika prednost korišćenja DNK barkodiranja je u mogućnosti analize jedinki bilo kog stadijuma ili stupnja razvika, kao i jedinki koje su oštećene i koje je nemoguće identifikovati vizuelnim putem. Naravno, za najprecizniju identifikaciju vrsta koristi se kombinacija sve tri tehnike.

Životni ciklus

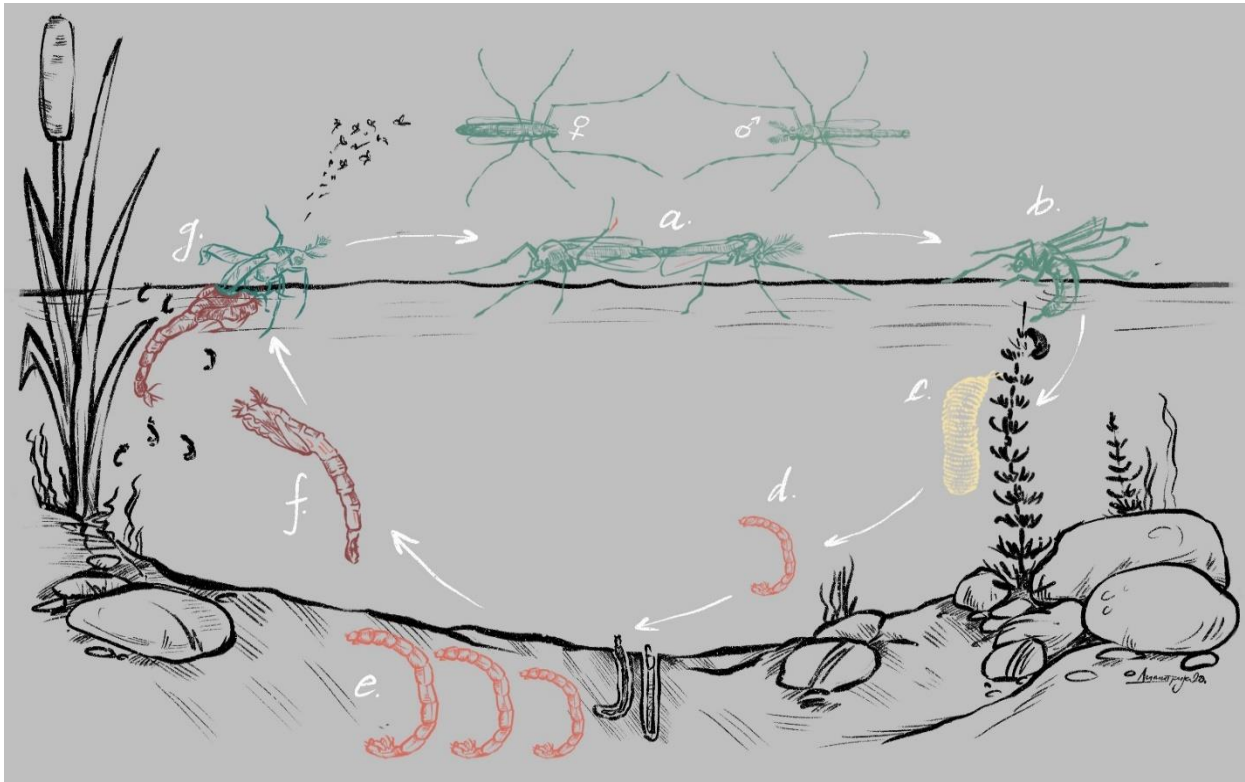
Hironomide su holometabolni insekti i prolaze kroz četiri životna stadijuma: jaje, larva, pupa (prepupa) i odrasla jedinka-imago (slika 9).

Ženke *Chironomus spp* polažu jaja uronjena helikalno u želatinozni matriks. Ovipozicija se dešava u rano jutro ili kasno popodne, a ženka polaže jedan paket jaja na površinu vode ili ga kači na biljke i plutajuće objekte. U jednom paketu može biti od 30 do 600, a u nekim slučajevima čak i do 2.100 jaja (Moler Pillot, 2009). Najveći broj jaja po jednom paketu zabeležen kod hironomida je baš kod vrste *C. tentans* i iznosio je 3.300 (Moler Pillot, 2009). Iz jaja se za dva do četiri dana izlegu mlade larve prvog stupnja koje su veoma aktivne i fototaksične, planktonske su, kreću se ka svetlosti i disperguju. Temperatura utiče na brzinu izleganja larvi iz jaja, pa je tako za vrstu *C. tentans* za izleganje potrebno 17,5 dana pri temperaturi od 8,8° C, a samo tri dana na temperaturi od 22,1° C (Armitage i sar., 1995). Za vrstu *C. riparius* na temperaturi od 18° C larve se izležu veoma sporo, tj. za 6 dana, a na temperaturi od 22 ° C do 26 ° C se izležu za 2 dana (Sahragard i Rafatifard, 2010). Larve prvog stupnja prvo se hrane želatinoznom masom koja je obavijala jaja, kako bi sakupile snagu pre disperzije (Armitage i sar., 1995). Prilikom prelaska u drugi stupanj, larve razvijaju hemoglobin i

²⁴ Tamne trake, tj. kondenzovani aktivni heterohromatinski region i svetle trake, tj. euhromatinski region.

²⁵ Primarno suženje koje spaha hromatide.

ukopavaju se u sediment, gde prolaze kroz četiri larvalna stupnja (svaki u trajanju oko četiri dana). Larve potom ulaze u međustadijum prepupe, potom u stadijum pupe (lutke), nakon čega eklozijom putem cepanja egzuvije i izletanjem, prelaze u imago – odraslu jedinku (*C. riparius* za 15 do 28 dana; *C. tentans* za 23 do 65 dana, zavisno od temperature). Ženke izleću nakon mužjaka, zajedno formiraju rojeve i pare se u vazduhu ili povremeno na nekom supstratu (u prirodi uglavnom od aprila do septembra ili novembra).



Slika 9 – Ilustracija životnog ciklusa hironomida: a – parenje odraslih jedinki se odvija na površini vode ili u vazduhu (rojenje), b – ženka polaže jaja na čvrst predmet u vodi, c – paket jaja (helikalno postavljena jaja u želatinoznom matriksu), d – larva prvog stupnja je slobodno plivajuća i fototaksična, e – larve od drugog do četvrtog stupnja žive ukopane u sedimentu u cevčicama koje same prave, f – larve se ulutkavaju i kreću se ka površini vode u vidu lutke, tj. pupe, g – eklozijom, odrasle jedinke izleću iz vode i za sobom ostavljaju košuljice, tj. egzuvije.

U prirodi obe vrste mogu imati dve ili tri generacija godišnje, pri čemu prezimljavaju u stadijumu larve u različitim razvojnim stupnjevima, a razvoj larvi prestaje kada se smanji dužina obdanice (Pillot, 2009). U laboratorijskim uslovima obe vrste mogu imati veliki broj generacija.

Gustina populacije

Marier, 1951, je zabeležio gustinu od 22.000 larvi po metru kvadratnom u zagađenom vodenom basenu, dok je Shilova, 1976, zabeležila maksimalnu brojnost od 7.000 larvi po metru kvadratnom. Zbog izuzetne brojnosti u bentosu vodenih ekosistema, još od Tinemann-a, 1964, vrste roda *Chironomus* proučavane su kao važan sastavni deo ciklusa kruženja materije i protoka energije kroz ekosistem. Velika gustina populacije, osim što očigledno utiče na sam produktivitet sistema, utiče i na trofičke veze u sistemu, kao i na fizičke i hemiske karakteristike ekosistema (Armitage i sar., 1995).

Ishrana

Ishrana hironomida još uvek nije dovoljno istražena, jedino se sa sigurnošću može reći da su omnivorne vrste čija je ishrana neselektivna i zavisi od dostupne hrane u ekosistemu i njene nutritivne vrednosti (Armitage i sar., 1995). Prema funkcionalnoj grupi ishrane (eng. Functional Feeding Group – FFG) svrstavaju se u sledeće grupe: *C. tentans* – 60% sakupljači/kolektori, 30% aktivni filtratori, 10% sekači; *C. riparius* – 70% sakupljači/kolektori, 30% aktivni filtratori (Brabec i sar., 2020; Schmidt-Kloiber i Hering, 2015). Obe vrste pretežno su sakupljači kolektori, što znači da se hrane sakupljanjem sitnih čestica organske materije poreklom iz sedimenta (eng. Fine Particulate Organic Matter – FPOM, 0.5 μm – 1000 μm), a manji deo hrane usvajaju aktivnim filtriranjem čestica rastvorenih u vodenom stubu, koje mogu biti i fine i krupnije čestice (eng. Coarse Particulate Organic Matter – CPOM, >1000 μm), pri čemu *C. tentans* može usvajati čak i opalo lišće i biljna tkiva putem seckanja (Moog, 1995). FFG sistem se koristi u ekološkim analizama slatkovodnih ekosistema jer klasifikuje organizme prema mehanizmu unosa i dobavljanja hrane, kao i tipu hranidbenih resursa, te daje informacije o njihovoj morfologiji, ponašanju, preferenciji mikrostaništa i trofičkim odnosima (Cummins, 1973; Moog, 1995). Zabeleženo je da larve prvog stupnja pretežno unose čestice veličine do 20 μm , a da larve četvrtog stupnja uglavnom unose čestice od 60 μm do 200 μm , dok se odrasle jedinke ne hrane, mada je zabeleženo hranjenje biljnim sokovima (Moler Pillot, 2009; Armitage i sar., 1995). Larve žive ukopane u sedimentu u cevčicama koje su izgrađene od algi i delova sedimenta, a koje grade pomoću ekskreta pljuvačnih žlezdi (Armitage i sar., 1995). Larve uglavnom unose čestice detritusa, bakterije, filamentozne i jednoćelijske alge (vrlo retko i životinjski materijal), a kao dodatak prikupljaju hranu sa dna u blizini svojih cevčica (Pillot, 2009). Tokom straživanja sadržaja crevnog sistema larvi u nekima su pronađeni ostaci vrste

Typha sp. u raspadanju bez algi, dok je kod drugih sadržaj bio sastavljan uglavnom od algi (Armitage i sar., 1995), što potvrđuje nepotpunu selektivnost u ishrani. Ukoliko ne mogu da pronađu nikakvu hranu, izlaze iz cevčica ili ih nadograđuju do 10 cm, ili čak do 30 cm. S obzirom na način života i ishrane, larve ovih dveju vrsta predstavljaju jednu od najnižih karika u lancu razlaganja materije, a svojim aktivnostima pomažu bioturbaciju (mešanje čestica) u sedimentu i odgovorne su za promet velikih količina organske materije u akvatičnim ekosistemima.

Stanište

Larve su, uglavnom, prisutne u malim stajaćim vodama, a mogu se naći i u barama koje presušuju (efemerne bare), preživljavajući jako dug period na suvom dnu (Moler Pillot, 2009). Postoji i par podataka o prisustvu u tekućim vodama, ali uglavnom u mirnim delovima vodotokova. Larve su karakteristične za eutrofna jezera i moguće ih je naći u izuzetno zagađenim vodama, pri čemu se *C. tentans* obično nalazi u alfa mezosaprobim, a *C. riparius* u polisaprobim vodama (Brabec i sar., 2020; Schmidt-Kloiber i Hering, 2015; Janecek i sar., 2002; 1995). Larve i egzuvije su najviše izučavane u Holandiji, gde su pronađene i u mezotrofnim vodama (Moler Pillot, 2009), pri čemu preferiraju alkalnije sredine (Moler Pillot, 2009). U Holandiji su rađena istraživanja na 143 lokaiteta i retko su pronađene jedinke u vodi sa pH ispod 7,5. Međutim, postoji nekoliko podataka o prisustvu larvi i egzuvija u kiselim vodama sa pH između 4,5 i 6. Može se reći i da su obe vrste eurihaline, ali su retko nalažene u brakičnim vodama, najčešće su prisutne u oligohalinim, a vrlo retko mezohalinim vodama.

Zbog svog ukopavajućeg načina života imaju veliki uticaj na samo stanište: dokazano je da se ukopavaju samo nekoliko centimetara ispod površine, ali da njihova aktivnost utiče znatno na bioturbaciju, a samim tim i na hemiju sedimenta i vode. Istraživanja na jezeru Mendota (Viskonisn, SAD) pokazala su da se sa povećanjem aktivnosti *C. tentans* i *C. riparius*, povećavalo oslobađanje fosfora iz podloge, pri čemu je stepen oslobađanja zavisio od temperature, gustine i biomase hironomida (Armitage i sar., 1995).

Mikrostanište

Obe vrste žive u staništima bogatim detritusom, mogu se naći na mnogim staništima, ali im je neophodno prisustvo vodenog bilja (Moler Pillot, 2009). U većini slučajeva larve su prikupljane sa stabljika *Typha sp.*, sa dna pokrivenog grubim biljnim materijalom, kao što je *Fucus sp.* u raspadanju, retko na dnu sa finim muljem bez kupnijih čestica. Moguće ih je naći i

na organskom i neorganskom mulju koji je veoma zagađen. Kao što je već navedeno, žive u cevčicama koje same grade, a formiranje cevčica traje od sat vremena do tri sata (Armitage i sar., 1995).

Predatori

Akvatični insekti sadrže u proseku od 55% do 56% proteina (suva masa), pa predstavljaju veliki izvor aminokiselina za druge insekte, ribe i ostale kičmenjake koji su vezani za akvatične ekosisteme (Armitage i sar., 1995). Velika količina biomase hironomida u ekosistemu omogućava značajan izvor hrane za većinu predatora. Veliki broj kičmenjaka u vodenim ekosistemima koristi hironomide u ishrani, pre svega larve, a u manjoj meri i lutke i odrasle jedinke (Armitage i sar., 1995). Kod nekih vrsta vodozemaca, kao što su mrmoljci, *Triturus sp.*, larve *C. tentans* i *C. riparius* mogu predstavljati glavni izvor hrane, a odraslim jedinkama se hrane i mnoge žabe. Njima se hrane i mnoge vrste ptica, pogotovo pataka (familija Anatidae), i to uglavnom lutkama koje su najlakše uočljive dok se migolje pri površini vode, retko kada adultnim jedinkama, čak izbegavaju velike rojeve. Glavni izvor hrane predstavljaju ribama, kao što su pastrmka, *Salmo trutta*; peš, *Cottus gobio*; pijor, *Phoxinus phoxinus* i druge, a njima se mogu hraniti i neke vrste rakova, planarija, insekata (Carabida), mušica (Asilida) i paukova (Armitage i sar., 1995). Zbog toga što su omiljena hrana ribama, veštačke imitacije hironomida se uspešno koriste kao mamac u ribolovu.

***Chironomus spp* sa antropogenog aspekta**

Iako nisu pravi komarci, hironomide ipak mogu izazvati neke probleme ljudima. Zbog izuzetne gustine populacije, može se desiti da veliki broj jedinki napravi ogromne rojeve pri ekloziji, koji mogu smetati prolaznicima, smanjiti vidljivost pri vožnji, izazvati štete na filterima ili čak u rezervoarima za vodu (Armitage i sar., 1995). Imunološka reakcija na neke od proteina adultnih hironomida može se javiti kod osetljivih osoba ukoliko su u kontaktu sa velikim brojem jedinki (konjuktivitis, dermatitis, rinitis i astma) (Armitage i sar., 1995). Ove dve vrste nemaju tendenciju da prave prevelike rojeve, pa zato ne predstavljaju veliku pretnju za čoveka. Sa dugim vrstama je, međutim, pokušana biološka kontrola putem parazita, čemu se pridaje velika pažnja u poslednjim decenijama.

Hironomide u testovima toksičnosti

Standardni parametri koji se propisuju za procenu uticaja stresora na hironomide u najnovijoj literaturi su mortalitet, imobilizacija (uticaj na kretanje), izletanje (od stadijuma pupe do imaga) i rast. Ovi parametri se uobičajeno koriste u primenjenim i naučnim studijama, ali se veliki naponi ulažu u određivanje novih, subletalnih odgovora na stresore, kao što su bihevioralne promene – promene u ponašanju (De Bisthoven i sar., 2004), promene u genskoj ekspresiji (Park i Choi, 2017), biohemijski i metabolički efekti (Long i sar., 2015) i morfološke promene (Tomilina i sar., 2020). Razlog ovome je potreba za razvinjanjem smislenih bioeseja, koji mogu dati pouzdane informacije o uticaju kontaminanata (posebno pri sredinski relevantnim koncentracijama), pružiti smislenu indikaciju organskog stresa i koji su dovoljno specifični da razlikuju efekte različitih vrsta kontaminanata u scenarijima mešovite izloženosti (Hines i sar., 2010; Jeppe i sar., 2014).

Larve hironomida su se dugo vremena činile relativno otpornim na hemijske agense u testovima toksičnosti. Ovaj zaključak bio je zasnovan na velikom broju kratkoročnih testova sa lavrama četvrtog stupnja i njihovom ekspozicijom testiranim agensima kroz vodeni stub. Ovi testovi su potcenjivali osetljivost hironomida na prisustvo stresora. Larve hironomida prvog i drugog stupnja osetljivije su na prisustvo stresora u odnosu na larve trećeg i četvrtog stupnja. Istraživanja su pokazala da su *C. tentans* larve prvog stupnja bile 6x do 27x osetljivije u odnosu na larve četvrtog stupnja na akutno izlaganje bakru (Nebeker i sar., 1984; Gaus i sar., 1985), a larve prvog stupnja vrste *C. riparius* su bile 127x osetljivije u odnosu na larve drugog stupnja na akutno izlaganje kadmijumu (Williams i sar., 1986). Tokom vremena, pokazalo se da dugoročnim izlaganjem hironomida u hroničnim testovima toksičnosti, koji započinju larvama prvog stupnja, raste osetljivost na prisustvo neorganskih i organiskih supstanci (Watts i Pascoe, 1996). Relativna osetljivost različitih životnih stupnjeva na specifične polutante još uvek nije dovoljno proučena, što je neophodno detaljnije proučiti u budućim studijama toksičnosti.

Sediment bioeseji sa *C. tentans* obično su počinjali larvama drugog ili trećeg stupnja (10 do 14 dana starosti), nastavljali do četvrtog larvalnog stupnja (do 10 ili 17 dana) i procenjivali efekte na preživljavanje i rast larvi (ASTM, 1995; US EPA, 1994). Kasnije se krenulo sa testovima na *C. tentans* larvama prvog stupnja u kojima se procenjivala stopa preživljavanja jedinki (Nebeker i sar., 1984; 1988), a potom i sa testovima na *C. riparius* larvama od jedan do

tri dana starosti koji su trajali do izletanja odraslih jedinki (ASTM, 1995). Pokazalo se da se larve *C. riparius* razvijaju do četvrtog stupnja za 14 dana na 20° C i da se rast i preživljavanje larvi mogu koristiti kao biomarkeri za procenu uticaja toksičnih agenasa. Pojavio se i veliki broj radova koji izučavaju biologiju i ekologiju hironomida, kao i njihov uzgoj u laboratoriji. Takav je i rad Sahragard i Rafatirafd, 2010, koji proučava uticaj promene temperature na biologiju *C. riparius* jedinki u laboratoriji, kroz praćenje njihovog rasta i razvoja, kao i preferencije ženki za polaganje jaja. Kasnija istraživanja sprovedena su na laboratorijskim populacijama hironomida izlaganim različitim agensima, kako bi se izučavao njihov letalni ili subletalni efekat, međutim dobijani su kontradiktorni rezultati, u zavisnosti od testirane supstance ili praćenih biomarkera. Efekti agenasa u laboratorijskim testovima na molekularnom nivou ispitivani su preko nekoliko parametara: promene nivoa acetilholinesteraze kod vrste *C. riparius* (Buchwalter i sar., 2004); promene nivoa oksidaza i metalotioneina ili povećanja oštećenja DNK kod vrste *C. tentans* (Belden i Lydy, 2000). Primećeno je da larve *C. tentans* ingestuju i ekskretuju herbicid terbutrin i fluoridon izuzetno brzo, dok se pod uticajem herbicida atrazina u koncentraciji od 1,33 ppm zaustavlja razvoj larvi na drugom stupnju, što se takođe događa pod dejstvom lindana u koncentraciji od 7,3 ppb (Pillot, 2009). Osim ovakvih istraživanja, molekularna i razvojna genetička istraživanja, biohemijska i fiziološka ispitivanja se već duži niz godina vrše nad hironomidama, međutim u manjem obimu (Armitage i sar., 1995). Pokazalo se, takođe, da predstavnici *Chironomus spp* ispoljavaju specifične fenotipe kao odgovor na prisustvo različitih stresora (Wiederholm, 1984) i da se ova osobina može primeniti na standardne protokole za procenu zagađenosti akvatičnih ekosistema (Servia i sar., 2000; Warwick, 1985).

Širok spektar odgovora na različite stresore zahteva detaljnija i sveobuhvatnija istraživanja osetljivosti i odgovora vrsta roda *Chironomus* u toksikološkim testovima, kroz multiparametarsko ispitivanje potencijalno osetljivih biomarkera.

Deformiteti morfoloških struktura larvi hironomida kao indikatori zagađenja

Kao što je prethodno navedeno, mnoge hironomide ispoljavaju morfološke promene usled prisustva sredinskog stresa, a većina ovakvih fenotipskih promena primećena je u stadijumu larve (Martinez i sar., 2002, Di Veroli i sar., 2008). Jedinke hironomida deformisanih fenotipa pronađene su u sedimentima kontaminiranim organskim i neorganskim supstancama, a

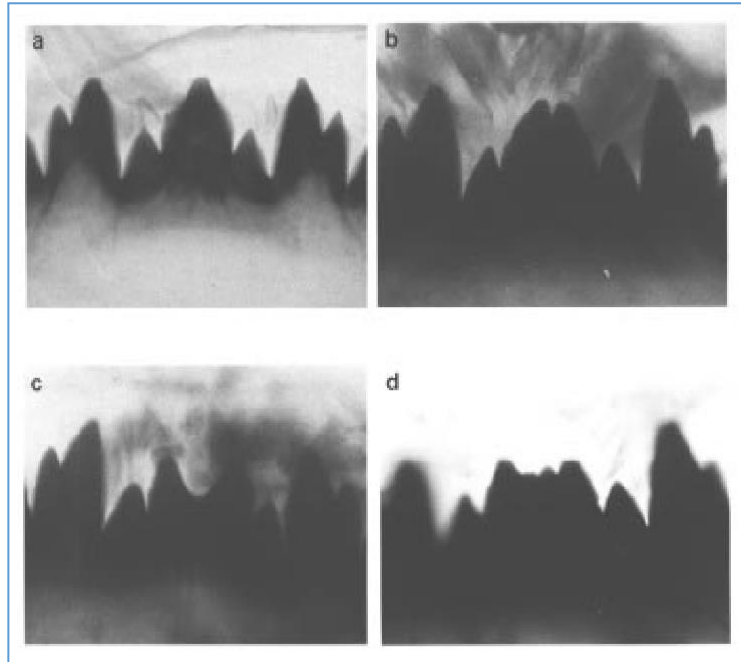
pogotovo teškim metalima (Al-Shami i sar., 2011; Servia i sar., 2004; Martinez i sar., 2002; de Bisthoven i sar., 1998). Skorašnja metaanaliza autora Gagliardi i sar., 2016, pokazala je postojanje 41 studije koje izučavaju efekat hemijskih agenasa na deformitete hironomida u laboratorijskim uslovima. U određenom broju studija nije primećeno značajno povećanje incidence deformiteta, npr. pri izlaganju nonilfenolu, olovu (Arambourou i sar., 2012) ili stabilnom olovu (Bird i sar., 1995). S druge strane, određen broj studija pokazao je značajno povećanje stope deformacija, pogotovo pri izlaganju jedinki teškim metalima (Di Veroli i sar., 2014), ali i nanočesticama (Tomilina i sar., 2015). Međutim, pokazalo se da postoji mnogo neujednačenosti među različitim studijama i da su neophodna dodatna ispitivanja osetljivosti ovog parametra (pojave deformiteta) preciznijim i sofisticiranijim metodama. Godinu dana kasnije, Gagliardi, 2017, u svojoj doktorskoj disertaciji navodi ukupno 142 studije (objavljene u vidu naučnih radova, poglavlja i knjiga) koje koriste deformitete hironomida u interpretaciji ekotoksičnosti (laboratorijske, terenske i ostale analize), među kojima se takođe pokazuje velika neujednačenost rezultata. Za razumevanje pojave deformiteta neophodno je dobro poznavanje „osnovnog“ izgleda morfoloških struktura kao i najčešće prisutnih vidova deformiteta (Rebechi i Navarro-Silva, 2012).

Deformiteti se mogu javiti na različitim morfološkim strukturama kod larvi, uključujući mentum, antene, mandibule, premandibule, epifarinks i labralne lamele, a najčešće su uočavane kod larvi četvrtog stupnja, verovatno zbog najdužeg vremena izloženosti sredinskim stresorima (Salmelin i sar., 2015; Dias i sar., 2008).

Hamilton i Saether, 1971, prvi su predložili upotrebu deformiteta hironomida za indikaciju kvaliteta vode, a Warwick i Tisdale, 1988, su prvi detaljnije ispitivali larve (roda *Chironomus*, *Cryptochironomus* i *Procladius*) i ilustrovali tipične deformitete na svim strukturama glavene čaure. Njihova kategorizacija deformiteta, u osnovnoj ili manje izmenjenoj formi, još uvek se koristi u procenama teratogenog efekta zagađujućih materija (Dias i sar., 2008). Iako analiza deformiteta može biti vrlo subjektivna i davati kontradiktorne rezultate, još uvek se primenjuje u ekotoksikologiji, a najnoviji rad na tu temu publikovali su autori Tomilina i Grebenyuk, 2020, i to za procenu uticaja nanočestica koje sadrže metale (Ag, TiO₂, SiO₂ i ZnO).

Deformiteti mentuma

Mentum predstavlja izuzetno hitinizovanu strukturu koja se nalazi sa ventralne strane glave, a posteriorno u odnosu na ostale delove usnog aparata. Mentum kod *Chironomus spp* sastoji se iz duplozidne labijalne ploče sa 13 sklerotizovanih zuba (Warwick, 1988). Tipične aberacije na mentumu uključuju: nedostajanje, višak, cepanje ili asimetriju zuba, specifična udubljena glatkih zidova (koja se nazivaju Kohove pukotine) i potpune devijacije od normalne konfiguracije mentuma (Langer-Jaesrich i sar., 2010).



Slika 10 – Tipični deformiteti medijalnog, tj. centralnog zuba na mentumu jedinki *Chironomus tentans* u laboratorijskoj populaciji. (a) normalni, (b) rascepan, (c) račvast, i (d) multipni procesi. (Preuzeto iz rada Bird, 1995).

Warwick i Tisdale, 1988, razvrstavaju deformitete mentuma u pet kategorija:

1. deformiteti medijalnog, tj. centralnog zuba,
2. deformiteti dva velika unutrašnja lateralna zuba,
3. deformiteti četiri manja spoljašnja lateralna zuba,
4. asimetrija ili potpuna reorganizacija osnovne konfiguracije mentuma.

U radu Bird-a iz 1995. na vrsti *C. tentans*, većina deformiteta javila se na centralnom zubu (slika 10). Rad Tomilina i Grebenyuk, 2020, ukazuje na veliki broj blago izraženih deformiteta, sa dominacijom dva osnovna tipa deformacija: deformacije centralnog (blago cepanje, potpuno račvanje ili pojava viška zuba) i deformacije lateralnih zuba (višak ili gubitak zuba).

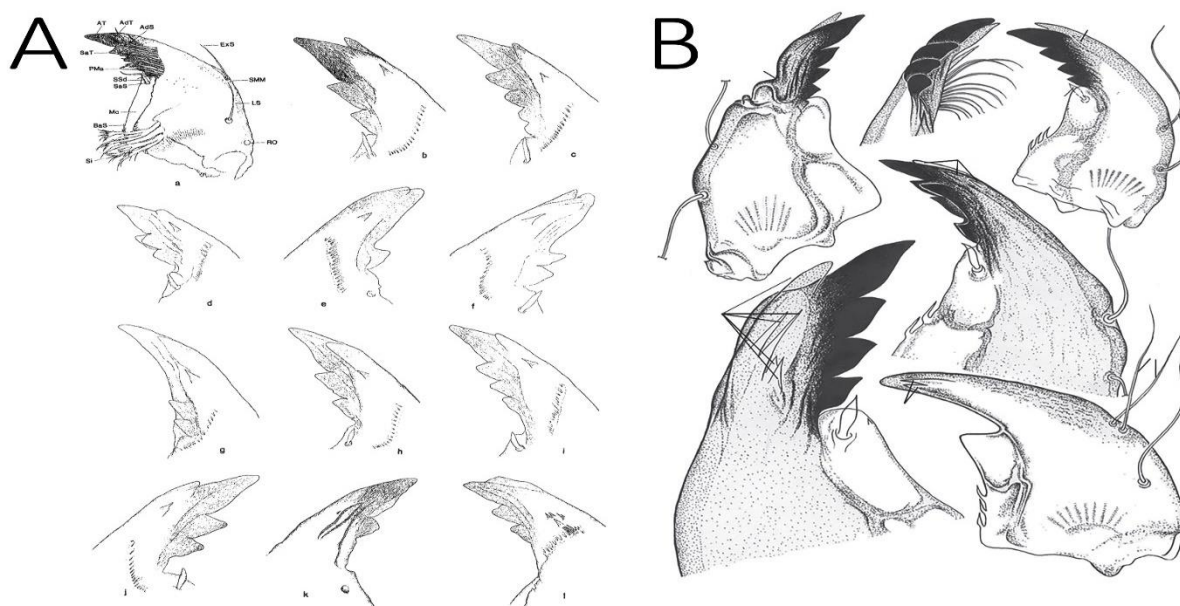
Deformiteti mandibula

Mandibule su, pored mentuma, najsklerotizovanije strukture na glavenoj čauri, koje se nalaze sa obe strane usnog otvora i sastoje se iz zuba, čekinja, strija, prstenastog organa, mole, unutrašnje sete, sete subdentalis i mandibularnog pektena (Rebechi i sar., 2012). Kod

Chironomus spp. prisutni su sledeći zubi: apikalni zub, tri subapikalna (unutrašnji zubi raspoređena linearno duž unutrašnje margine mandibule) i jedan dorzalni, tj. spoljašnji zub na spoljašnjoj margini mandibule (Warwick i Tisdale, 1988). Tipične aberacije na mandibulama uključuju višak ili nedostatak apikalnog zuba (potpuni nestanak, fuziju ili zakržljaloost zuba), a ponekad i ostalih zuba ili drugih struktura na mandibulama (Langer-Jaesrich i sar., 2010; Warwick, 1985). Rad Tomilina i Grebenyuk, 2020, ukazuje na velike promene na mandibulama: pojava dodatnog pigmentisanog zuba abnormalne morfologije, manjak ili višak zuba, fleksija apikalnog dela mandibule, pojava struktura nepoznate homologije, gubitak i deformacija seta i čekinja (slika 11).

Warwick i Tisdale, 1988, razvrstavaju deformitete mandibula u četiri kategorije:

1. promene broja subapikalnih ili apikalnog zuba,
2. promene u prisustvu dorzalnog zuba,
3. postojanje, forma i šablon ostalih struktura (seta, strija, pektena),
4. generalne promene osnovne konfiguracije mandibula.



Slika 11 – Tipični deformiteti mandibula: A – Mandibule *C. plumosus* (a) normalnog oblika (b-l) deformisanog oblika. (preuzeto iz rada Warwick and Tisdale, 1988). B – Mandibule *C. riparius* larvi deformisanog oblika (Tomilina i Grebenyuk, 2020)

Pri proceni deformiteta larvalnih struktura mora se voditi računa o više parametara koji mogu da utiču na interpretaciju rezultata: odabir adekvatne laboratorijske podloge u testovima,

izbor adekvatnog model-organizma, adekvatnog larvalnog stupnja, određivanje procenta prihvatljivog procenta deformiteta, kao i uticaj inbridinga (ukrštanja u srodstvu u laboratorijskim populacijama). U prethodno pomenutoj metaanalizi (Gagliardi i sar., 2016) radova objavljenih do 1. januara 2016. koji prate deformitete na hironomidama, uočava se nedoslednost studija u praćenju parametara koji bi mogli da utiču na interpretaciju rezultata:

- kao model-organizam korišćene su jedinke roda *Chironomus*, a samo jedna studija se bavi čitavom familijom *Chironomidae* (Dickman i Rygiel, 1996);

- najčešće testirane supstance su bakar, olovo, kadmijum i cink;

- u većini analiza „pozadinski stresori“ nisu uzimani u obzir (letalni efekat supstance, pojava inbridinga, uticaj sastava podloge);

- u 70 od ukupno 285 analiza (24,56%) nije pomenut procenat deformiteta u kontrolnim tretmanima, a ukoliko jeste pomenut, iznosio je preko 10%;

- u 263 od 285 analiza (92,28%) nije statistički poređena stopa mortaliteta između tretmana i kontrole, a ukoliko jeste, primećene su značajne razlike ($p < 0,05$);

- u 272 analize (95,41%) stopa mortaliteta je iznosila preko 20% i u kontrolama i u tretmanima, ili uopšte nije zabeležena stopa mortaliteta;

- u četiri analize (1,40%) u kojima su prikazani svi pouzdani podaci nije primećena značajna povezanost između supstanci (sitosterol, živa i olovo) i stope deformiteta;

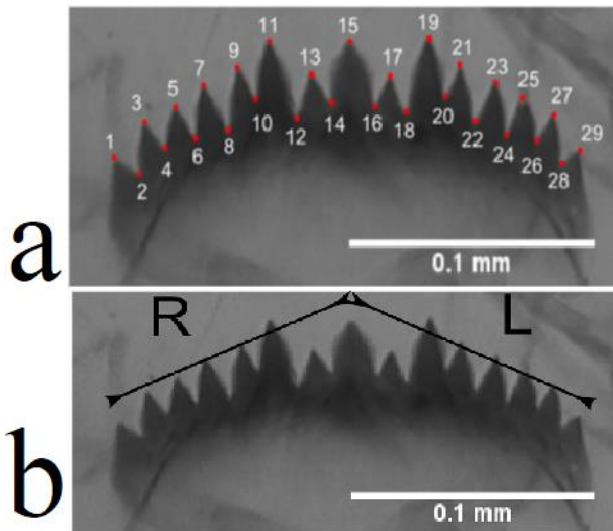
- nije bilo razlika, tj. subjektivnosti, u odnosu na veličinu uzorka (u svim studijama je korišćen sličan broj larvi).

Ova metaanaliza uzima u obzir samo laboratorijska ispitivanja, ali podaci sa terena takođe mogu biti slično nekonzistentni. De Bisthoven i sar., 1996, sproveli su ekstenzivnu studiju prikupljajući hironomide sa 37 kontaminiranih lokaliteta, od čega su 24 bile pozitivne (povećan broj deformiteta u populacijama), a 13 je bilo negativno (bez povezanosti pojave deformiteta i zagađenja).

U poslednje vreme se pribegava sofisticiranijim tehnikama za procenu deformacija i generalne fenotipske varijabilnosti. Već pomenuti metod geometrijske morfometrije pokazao se izuzetno osetljivim i vrlo objektivnim pristupom za analizu morfoloških struktura (Arambourou i sar., 2012). Ukoliko različiti istraživači koriste različite kriterijume i definicije deformisanosti struktura, rezultati njihovih istraživanja ne mogu biti uporedivi. To nije slučaj sa geometrijskom morfometrijom: analizu struktura vrši kompjuterski softver na osnovu položaja digitalizovanih

specifičnih tačaka, što smanjuje objektivnost i grešku merenja na minimum. Ovaj pristup u proceni uticaja hemijskih agenasa na hironomide prvi put je korišćen u radu Arambourou i sar., 2012., u kome je analizirana varijabilnost oblika i fluktuirajuća asimetrija mentuma jedinki *C. riparius* (slika XXX), pomoću softvera MorphoJ (Klingenberg, 2011).

Termin „fluktuirajuća asimetrija“ odnosi se na pojavu malih odstupanja od bilateralne simetrije, kroz pojave asimetričnosti na nivou populacija (Servia i sar., 2004; Clarke, 1993). S



Slika 12 – Analiza mentuma *C. riparius* primenom metode geometrijske morfometrije u radu Arambourou i sar., 2012., A – digitalizovane specifične tačke, b – dužine odabrane za procenu fluktuirajuće asimetrije (Preuzeto iz rada Arambourou i sar., 2012)

obzirom da se fluktuirajuća asimetrija javlja kao odgovor na sredinski stres, korišćena je i primenom metode tradicionalne morfometrije na hironomidama (rad Servia i sar., 2004, na poređenju larvi *C. riparius* uzorkovanih u prirodnim i antropogeno izmenjenim staništima). Primenom geometrijske morfometrije moguća je precizna analiza fluktuirajuće asimetrije na velikom broju struktura (delova usnog aparata, antena, krila ili čak celih jedinki), čime se može utvrditi osetljivost ovog parametra na prisustvo sredinskog stresa.

Mehanizam nastanka deformiteta i generalnih morfoloških promena kod larvi hironomida nije najjasniji, ali pretpostavlja se da deformiteti nastaju usled poremećaja velikog broja faktora (Gagliardi, 2017). Tomilina i sar., 2015, u svojoj studiji ističu da do poremećaja morfološke varijabilnosti dolazi usled nastanka slobodnih radikala pod uticajem nanočestica, čime stradaju ćelijske membrane i DNK materijal, što može imati potencijalan genotoksični, karcinogeni i mutageni efekat koji se ispoljava u fenotipu.

Postojanje velikog broja pitanja bez odgovora u analizi pojave deformiteta kod hironomida ukazuje na potrebu razvoja preciznijih i sveobuhvatnijih metoda u budućim studijama.

1.3 OECD - Organizacija za ekonomsku kooperaciju i razvoj

Organizacija za ekonomsku saradnju i razvoj (OECD) međunarodna je organizacija Evropske unije, sačinjena od 25 ekonomski razvijenih zemalja članica. Organizacija je osnovana 1960. godine sa sedištem u Francuskoj. Osnovni ciljevi ove organizacije su: postizanje najvišeg mogućeg ekonomskog rasta i zapošljavanja; promovisanje ekonomskog i socijalnog blagostanja širom regiona OECD putem koordinacije politika zemalja članica, kao i stimulisanje i harmonizacija rada članova OECD u korist zemalja u razvoju.

OECD nije regulatorno telo, ali može preduzimati formalne aktivnosti u formi odluka i preporuka Veća OECD (najvišeg tela organizacije OECD), koje su pravno obavezujuće za sve zemlje članice. OECD je najpoznatiji po svom radu u oblasti svetske ekonomije i predviđanju monetarnih trendova. Međutim, članice OECD obuhvataju 70% svetskog bruto domaćeg proizvoda, 70% svetske trgovine i većinu svetske proizvodnje hemijskih agenasa. Stoga zemlje članice imaju posebnu odgovornost prema zaštiti životne sredine, zbog čega je OECD razvio poseban komitet za zaštitu životne sredine 1970. godine.

Komitet za životnu sredinu, koji se trenutno zove Odbor za politiku životne sredine (eng. The Environment Policy Committee), kreiran je kako bi okupio vlade zemalja članica oko zajedničkih ciljeva zaštite životne sredine i uskladio kooperaciju među njima. Uloga komiteta je da promoviše održivi razvoj (nezavisnost između ekonomskog razvoja i održivosti resursa životne sredine), kao i visok standard života u svim zemljama članicama.

OECD je počeo da radi na hemijskoj bezbednosti 70-ih godina prošlog veka zbog povećane zabrinosti zbog prekomernog zagađenja životne sredine i potencijalnih posledica narušavanja ljudskog zdravlja. Hemijski agensi koji su tada bili u fokusu su perzistentni organski polulanti, pesticidi, polihlorni bifenili (PCB) i teški metali (kao što su živa, kadmijum i olovo). Inicijalni fokus bio je na pojedinačnim hemikalijama, ali je kasnije proširen na aktivnu ulogu u inicijaciji razvoja harmonizovanih politika i praktičnih alata za zaštitu zdravlja ljudi i životne sredine, a pre svega na kontrolu proizvodnje i distribucije. Ovaj rad organizovan je pod pokroviteljstvom hemijskog programa OECD, čije glavne aktivnosti su: kreiranje smernica za testove, kreiranje dobrih laboratorijskih praksi, procena opasnosti i rizika od zagađenja, harmonizacija klasifikacionih i sistema oznaka, kao i kooperativne aktivnosti na smanjenju rizika od upotrebe postojećih hemijskih agenasa i pesticida.

1.3.1 Smernice OECD za testiranje hemikalija

Vlade, industrije i mnogi drugi sektori ulažu velike napore oko razvijanja internacionalno harmonizovanih protokola za procenu rizika i evaluaciju uticaja hemijskih agenasa na životnu sredinu i čoveka.

OECD obezbeđuje upustva u vidu međunarodno priznatih metoda za biološke testove putem kojih se ispituju hemijske supstance. Metode OECD-a prvi put su objavljene 1981. i pokrivale su testiranje fiziko-hemijskih svojstava, efekata na biotičke sisteme (ekotoksikologija), procenu ekološke sudbine (degradacije i akumulacije) i uticaja na ljudsko zdravlje (toksikologija).

Kako bi se formalizovala međunarodna prihvatljivost prikupljenih podataka, OECD je doneo odluku o međusobnom prihvatanju podataka (princip MAD, eng. Mutual Acceptance of Data), koja je prilagođena 1981. i pravno je obavezujuća za sve zemlje članice. U odluci MAD navodi se da podaci prikupljeni putem testiranja hemikalija, u zemljama koje su članice OECD, prema testovima koji su u skladu sa smernicama OECD za testiranje hemikalija i principima OECD dobre laboratorijske prakse, moraju biti prihvaćeni u ostalim zemljama u svrhu procene rizika i ostalih potreba vezanih za zaštitu ljudi i životne sredine. Ovo znači da podaci dobijeni o nekoj hemikaliji u laboratoriji u Evropi treba da budu prihvaćeni (kroz lokalne i nacionalne akte o kontroli toksičnih supstanci, eng. Toxic Substances Control) od strane laboratorija širom sveta, dokle god poštuju propisane mere i protokole OECD. U početku je bilo preko 70 test-smernica OECD, napisanih na engleskom i francuskom jeziku, a danas ih ima preko 500 i podeljene su u pet sekcija: 1 – fiziko-hemijska svojstva; 2 – efekti na biotičke sisteme; 3 – sredinska sudbina i ponašanje; 4 – uticaj na zdravlje i 5 – ostale smernice.

Sve smernice OECD imaju sličnu strukturu i sadrže sledeće elemente:

- uvod (omogućava uvid u pozadinu nastanka testa i dosadašnja dostignuća);
- princip testa;
- informacije o testiranoj supstanci;
- opis metode (instrukcije i smernice za sprovođenje samog testa);
- izveštaj (instrukcije o načinu analize podataka i formi pisanja izveštaja);
- reference;

- validacija testa – dodatna sekcija vezana konkretno za akvatičnu toksikologiju i još neke tipove testiranja (propisuje uslove koje test mora da ispunjava kako bi bio validan).

Na osnovu rezultata dobijenih testovima pristupa se proceni uticaja testirane supstance na standardne parametre. Podaci se analiziraju korišćenjem regresionih modela kako bi se odredila koncentracija koja bi izazvala x% redukcije rasta odraslih jedinki, preživljavanja ili rasta larvi (efektivna koncentracija koja izaziva redukciju kod određenog procenta jedinki u populaciji, EC15, EC50), ili korišćenjem statističkih analiza za određivanje vrednosti NOEC i LOEC (poređenjem vrednosti tretmana i kontrolnih vrednosti).

Sekcija dva smernica OECD, koja se tiče uticaja na biotičke sisteme, sastoji se iz ukupno 49 testova, od kojih se sledeći odnose na hironomide: 218 – test toksičnosti u sistemu sediment-voda, sa supstancom u sedimentu (eng. Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment) (OECD, 2004); 219 – test toksičnosti u sistemu sediment-voda, sa supstancom u vodi (eng. Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water) (OECD, 2004a); 235 – akutni imobilizacioni test (eng. Chironomus sp., Acute Immobilisation Test) (OECD, 2011); 233 – test životnog ciklusa (eng. Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment) (OECD, 2010). Svi testovi zasnivaju se na izlaganju larvi prvog stupnja određenoj test supstanci, s tim što se u slučaju testa 218 i 219 sistem sastoji iz sedimenta i medijuma (vode) i predstavlja dugoročnu hroničnu izloženost; dok se u slučaju testa 235 sistem sastoji samo iz medijuma i predstavlja kratkoročnu akutnu izloženost jedinki. Poslednji u nizu, test broj 233, punog životnog ciklusa – prsten test, predstavlja proširenje prethodnih testova: larve se izlažu koncentracijama testirane supstance, nakon izletanja odrasle jedinke se prebacuju u akvarijum za razmnožavanje, gde polažu jaja u sistem sa test-supstancom, prati se izleganje larvi (F1 generacija), koje se potom (tokom prvog larvalnog stupnja) prebacuju ponovo u posude sa supstancom i prate do izletanja. S obzirom na to da se mogu pratiti dve ili više generacija (P, F1 i ostale), može se pratiti uticaj na reprodukciju, fekunditet i fertilitet, akumulaciju, nasledne faktore i slične parametre (OECD, 2010; Bruns i Weltje, 2009).

Važno je napomenuti da smernice OECD nisu rigidni protokli. One su kreirane tako da dozvoljavaju fleksibilnost uz moguću procenu i izmenu od strane stručnjaka, kao i prilagođavanje novim dostignućima. Razvoj novih i validacija postojećih testova OECD sprovodi se kroz dve faze: 1 – definisanje potrebe za razvojem novih smernica i 2 – kreiranje i

publikacija novih test smernica OECD. Definisanje potrebe za novim testom započinje na inicijativu zemalja članica ili naučne zajednice, čiji predlozi se izlažu putem nacionalnih koordinatora OECD. Kada se odobri predlog, kreiranje novih smernica OECD započinje ili kroz objavljivanje detaljnog revijalnog rada ili kroz pisanje predloga, u vidu draft verzije novih smernica OECD. Kada se donese odluka o postojanju potrebe za razvojem novog ili izmenom postojećeg testa, predlog se prosleđuje svim zemljama članicama. Odobrenje, izmena i implementacija predloga vrši se od strane veća OECD, a potom se pristupa publikaciji novih ili izmenjenih smernica.

Postoji kontinuirani proces revizije postojećih i razvijanja novih smernica i protokola, kada god se ukaže potreba i postoji opravdana zabrinutost od upotrebe određenih hemijskih agenasa. Pored toga, svaki novi industrijski proizvod (novosintetisana supstanca) mora se testirati nizom testova pre njegovog izlaska na tržište. Ovaj niz testova određuje se od strane regulativne ustanove, na osnovu predviđene namene supstance, mesta proizvodnje i predviđenog tržišta, kao i procenjene količine susptance koja će se naći na tržištu, a nakon toga i u životnoj sredini.

Ekonomski razvoj podrazumeva i tehnološki razvoj, pa se povremeno ukaže potreba i za razvojem čitavog seta eksperimenata koji će se prilagoditi potrebama procene proizvoda čitave nove tehnologije. Tako je poslednjih godina došlo do ekstenzivnog razvoja nanotehnologije, kao što je prethodno elaborisano, a samim tim i ekotoksikoloških testova za procenu uticaja proizvoda ove tehnologije.

1.3.2 OECD i nanotehnologija

Organizacija OECD oformila je radno telo za „biotehnologiju, nanotehnologiju i konvergentne tehnologije“ (eng. Biotechnology, Nanotechnology and Converging Technologies – BNCT), za rad na usklađivanju politika zemalja u novim tehnološkim oblastima vezanim za bio-, nano- i konvergirajuće tehnologije. Cilj ovog tela je da doprinese originalnoj analizi politika i prenese poruke globalnoj zajednici, da sazove ključne zainteresovane strane na terenu i da donese revolucionarne predloge kreatorima politika. Međutim, razvoj novih tehnologija zahteva i razvoj pratećih ekotoksikoloških testova, kako bi se osiguralo bezbedno i kontrolisano korišćenje njihovih proizvoda i na vreme procenio uticaj na zdravlje ljudi i životne sredine.

Na zajedničkom sastanku Odbora OECD za hemikalije i Radne grupe za hemikalije, pesticide i biotehnologiju, 2005. održano je posebno zasedanje o potencijalnim posledicama industrijski proizvedenih nanomaterijala za zdravlje ljudi i bezbednost životne sredine. Ovo je bila prva prilika da zemlje članice OECD-a, zajedno sa pozvanim ekspertima i predstavnicima zemalja u razvoju, započnu rad na identifikaciji aspekata koji se odnose na uticaj nanomaterijala na zdravlje ljudi i životnu sredinu. U septembru 2006. godine osnovana je Radna grupa OECD za proizvedene nanomateriale (eng. Working Party on Manufactured Nanomaterials – WPMN) kao pomoćno telo Komiteta za hemikalije. Program radne grupe koncentriše se na posledice proizvedenih nanomaterijala (koje su uglavnom ograničene na hemijski sektor) po zdravlje ljudi i životnu sredinu i ima za cilj da osigura naučno zasnovane i međunarodno usklađene standarde za procenu opasnosti, izlaganja i rizika od upotrebe proizvoda nanotehnologije. WPMN takođe promoviše međunarodnu saradnju, a prva je takva radna grupa koja sakuplja predstavnike vlada, industrije i akademske zajednice u kreiranju smernica za testiranje i informisanje o budućoj upotrebi i pitanjima sigurnosti proizvedenih nanomaterijala. Došlo se do zaključka da postojeći standardni protokoli ne mogu u potpunosti biti adekvatni za testiranje ovako specifičnih materijala i da se moraju razviti nove smernice i protokoli za testiranje nanočestica. Da bi se osiguralo da protokoli za procenu bezbednosti proizvedenih nanomaterijala budu dosledni i odabrani, radna grupa WPMN pokrenula je sponzorski program za ispitivanje proizvedenih nanomateriala u novembru 2007. Ovaj program omogućio je uslove za verifikaciju metoda, udruživanje ekspertize zemalja članica OECD-a, ostalih država i nezavisnih eksperata. Dogovorena je lista prioriteta od 11 industrijskih nanomaterijala za testiranje (na osnovu komercijalne upotrebe, obima i tržišta proizvodnje): nano-cink oksid (ZnO), nano-cerijum (IV) oksid (CeO₂), nano-silicijum dioksid (SiO₂), nano-srebro (Ag), nano-gvožđe (Au), jednozidne karbonske nanocevi (SWCNT), višezidne karbonske nanocevi (MWCNT), nano-titanijum dioksid (TiO₂), nano-gvožđe (III) oksid (Fe₂O₃) i nano-glina (OECD, 2015), a lista sada sadrži i dendrimere, fullerene (C₆₀) i nano-zlato. Rad je bio ograničen uglavnom na hemijski sektor i procenu direktnog uticaja na ljudsko zdravlje (sa testovima pretežno izvođenim na pacovima i miševima) (OECD, 2015). Od 2011. godine OECD je počeo sa analizom problema prisustva nanomaterijala u otpadu, prečišćavanja i upravljanja takvim otpadom, pa je 2016. godine publikovan izveštaj „Nanomaterijali u kruženju otpada – trenutno znanje, rizici i uticaji“ (OECD, 2016). U izveštaju se navodi da su nanočestice prisutne u komunalnom i reciklažnom otpadu, u

komunalnim i drugim otpadnim vodama, otpadnom mulju, kao i na velikim deponijama. Ističe se da je moguće samo delimično prečišćavanje otpada najsavremenijim postrojenjima za preradu, pri čemu postoji opasnost od negativnog uticaja nanočestica na sam proces prečišćavanja „regularnih“ polutanata (može doći do inhibicije anaerobnih denitrifikacionih i drugih procesa), te da je neophodno sprovesti ekstenzivna ispitivanja zarad rešavanja ovih problema. Ističe se da savremena postrojenja mogu da prečiste skoro 80% pojedinih tipova nanočestica iz otpadnih voda (TiO_2 , Ag, CeO_3 , Cu), dok će ostale biti ispuštene u akvatične ekosisteme (OECD, 2016), a dalja sudbina i uticaj ovih ispuštenih nanočestica još je uvek velika nepoznanica za nauku. Zbog sve veće zabrinutosti zbog nekontrolisane proizvodnje i konzumacije nanoproduka, 2011. je pokrenut FP7 projekat MARINA (eng. MAnaging the RIsks of Nanomaterials) za razvoj referentnih protokola za procenu uticaja nanočestica, a 2015. je pokrenut i projekat „ProSafe“ EU H2020 za koordinaciju i jačanje inicijativa u oblasti nanobezbednosti (eng. nanosafety). U međuvremenu je oformljena interkontinentalna zajednica istraživača EU i Amerike kao platforma za formiranje zajedničkih protokola i metoda kako bi se prevazišli nedostaci i barijere u savremenom istraživanju uticaja nanotehnologije (Selck i sar., 2016).

Januara 2013. u Berlinu održan je sastanak eksperata za proizvedene nanomaterijale, na kome je radna grupa WPMN iznela potrebu za kreiranjem vodiča OECD, tj. dokumenta sa smernicama za ispitivanje akvatične ekotoksičnosti nanočestica (eng. Guidance Document, GD, for aquatic ecotoxicity testing). Odluka o prihvatanju predloga doneta je 2014, a dve godine kasnije održana je finalna diskusija u sedištu OECD-a u Parizu, na kojoj je izvršena integracija izmena i dopuna ovog dokumenta. U predlogu vodiča WPMN ističe se da je moguće pratiti formu dokumenta broj 23, čija je finalna verzija publikovana 2019. pod nazivom „Vodič za akvatično toksikološko ispitivanje komplikovanih supstanci i njihovih mešavina“ (eng. “Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures”, OECD, 2019). On je kreiran radi olakšanja procene uticaja određenih nespecifičnih polutanata, bez osvrta na procenu uticaja nanočestica. Takođe, WPMN se poziva na rad evropske hemijske agencije na polju nanotehnologije (ECHA, 2017; Hansen i sar., 2017; Gottardo i sar., 2017) i evropskog centra za ekotoksikologiju i toksikologiju hemikalija (ECETOC, 1996) i ističe da je neophodno uvesti nove metode i upotrebu raznolikih inovativnih pristupa u proceni uticaja nanomaterijala. WPMN dalje ističe i da posebnu pažnju treba posvetiti toksičnosti sedimenata jer mnoge nanočestice imaju tendenciju brzog taloženja, kao i da je za testiranje na jedinkama roda

Chironomus spp. moguće koristiti postojeće testove broj 235, 218, 219 i 233, uz poseban osvrt na parametre koji bi mogli da utiču na toksičnost testiranih nanočestica: na karakterizaciju ispitivanih nanočestica, na praćenje ekspozicije (eng. exposure monitoring) kroz odabir načina rastvaranja i mešanja supstance sa sedimentom, kao i na interakciju nanočestica sa hranom (eng. feeding consideration) (OECD, 2019). Najnoviji rad koji predlaže konkretne izmene standardnih protokola OECD u svrhu ispitivanja nanočestica na akvatičnim organizmima objavljen je 2016. (Hund-Rinke i sar., 2016) i u njemu se predlaže modifikacija testova 201 – test inhibicije rasta slatkovodnih algi i cijanobakterija; 202 – *Daphnia magna* akutni imobilizacioni test; 210 – test toksičnosti sa ranim razvojnim stupnjevima riba zebrica (*Danio rerio*); 216 – test transformacije azota; 217 – test transformacije ugljenika; 22 – test reprodukcije Enchytraeidae; 222 – test reprodukcije kišnih glista i 225 – Lumbriculus test toksičnosti u sistemu sediment-voda, sa supstancom u sedimentu.

Vodič OECD za ispitivanje akvatične ekotoksičnosti nanočestica još uvek nije finalizovan i ne postoji nijedan zvaničan standardizovan protokol za procenu uticaja nanočestica na akvatične organizme, a već postoje kritike i neslaganja u vezi sa postojećim predlogom (Hjorth i sar., 2017; Hund-Rinke i sar., 2016; Petersen i sar., 2015; Handy i sar., 2012).

POGLAVLJE 2

Ciljevi istraživanja

Ovo istraživanje tiče se ekotoksikologije nerastvorljivih čestica antropogenog porekla (tri oksida metala u nanoformi) koje se talože na dnu vodenih sistema i time utiču na bentosne hidrobiocenoze:

1. titanijum dioksid nanočestice – nano-TiO₂ (proizvedene za upotrebu u ljudskoj ishrani),
2. cerijum oksid nanočestice – nano-CeO₂ (proizvedene za upotrebu u automobilske industriji) i
3. gvožđe oksid magnetne nanočestice – nano-Fe₃O₄ (proizvedene za upotrebu u medicini).

U laboratorijskim uslovima su sprovedeni ekotoksikološki biološki testovi na predstavnicima porodice Chironomidae (Diptera) – *Chironomus tentans* i *C. riparius*, koji simuliraju scenario dugoročne izloženosti model-organizama polutantima u sedimentu (prema smernicama OECD za ispitivanje hemikalija, Odeljak 2, test pod rednim brojem 218 i nazivom “Test toksičnosti na hironomidama u sistemu sediment-voda, sa supstancom u sedimentu”) uz primenu standardnih, ali i novih i savremenih metoda za procenu uticaja kontaminanata.

Opšti cilj ovog istraživanja jeste utvrđivanje ekotoksikologije nanočestica oksida titanijuma, cerijuma i gvožđa pomoću akvatičnih model-organizama u multiparametarskim laboratorijskim testovima, kao i modifikovanje postojećih i uvođenje novih metoda za njihovu analizu u laboratorijskim testovima.

Specifični ciljevi istraživanja su postavljeni u skladu sa opštim ciljem:

1. ispitivanje karakteristika nanočestica savremenim analitičkim metodama (uključujući analize specifične površine; površinske hemije materijala; faznog sastava i kristalne strukture; analize veličine i agregacije nanočestica; kvalitativno i kvantitativno određivanje elemenata; hidrodinamičkog prečnika i indeksa polidisperziteta; ζ potencijala, kao i *in situ* karakterizacije nanočestica u samom eksperimentalnom sedimentu);
2. odabir adekvatne laboratorijske podloge za biološke testove koja bi obezbedila efikasnu detekciju uticaja nanočestica na model-organizme;
3. utvrđivanje bioakumulacije nanočestica oksida metala od strane model-organizma;
4. multiparametarska procena uticaja nano-TiO₂ na: standardne populacione parametre, parametre fitnesa i morfološke promene model-organizama;

5. multiparametarska procena uticaja nano-CeO₂ na: standardne populacione parametre, parametre fitnesa, morfološke promene, oksidativni stres i integritet DNK model organizama;
6. multiparametarska procena uticaja nano-Fe₃O₄ na: standardne populacione parametre, parametre fitnesa, morfološke promene, oksidativni stres; integritet DNK i koncentraciju hemoglobina model organizama;
7. odabir adekvanih model-organizama, biomarkera i metoda za procenu uticaja nanočestica oksida metala u laboratorijskim biološkim testovima;
8. predlog prilagođavanja testa 218 OECD-a za procenu uticaja nanočestica oksida metala i metoda za njihov biomonitoring u akvatičnim ekosistemima.

POGLAVLJE 3

Metodologija

3.1 Karakterizacija nanočestica

S obzirom na specifična fizička i hemijska svojstva nanočestica, koja variraju zavisno od njihovog sastava i strukture, neophodno je izvršiti njihovu detaljnu karakterizaciju pre bilo kakvih ekotoksikoloških ispitivanja i procene uticaja na biotičke sisteme (Montes-Burgos i sar., 2010). Za ispitivanje karakteristika nanočestica usavršavane su postojeće i razvijane nove analitičke metode tokom proteklih decenija (Mowat i sar., 2007). U ovom istraživanju izvršena je precizna karakterizacija nanočestica putem sledećih metoda: BET za analizu specifične površine; XPS spektroskopija za analizu površinske hemije materijala; XRD kristalografija za određivanje faznog sastava i kristalne strukture; TEM, SEM i AFM mikroskopija za dobijanje informacija o distribuciji veličine i agregaciji nanočestica, kao i fotografisanje uzoraka; EDX spektroskopija za kvalitativno i kvantitativno određivanje elemenata u ispitivanom uzorku; DLS spektroskopija za određivanje hidrodinamičkog prečnika, indeksa polidisperziteteta i ζ potencijala, kao i *in situ* karakterizacija nanočestica u samom eksperimentalnom sedimentu (EDX i SEM analizom). Sve navedene metode detaljno će biti opisane u ovom poglavlju.

Mnoge jedinstvene osobine svojstvene samo nanočesticama potiču od njihove veličine, a samim tim velike površine u odnosu na zapreminu. Svojstva površine mogu biti povezana sa reaktivnošću nanočestica i opasnostima po životnu sredinu, stoga je tačno merenje površine izuzetno važno u karakterizaciji nanomaterijala, za šta je u ovom radu korišćena Brauner-Emmet-Teller metoda (eng. Brunauer-Emmett-Teller - BET) (Brame i Griggs, 2016). Brunauer, Emmet i Teller, 1938., su razvili teoriju koja objašnjava adsorpciju molekula gasa na čvrstim površinama i koja predstavlja bazu za ovu veoma značajnu analitičku metodu. Analiza se temelji na promeni pritiska usled adsorpcije gasa (najčešće azota, N_2) pri konstantnom pritisku i niskoj temperaturi (od 77K, tj. $-196.15^\circ C$), potom se broj adsorbovanih molekula množi s površinom koju zauzima pojedini molekul čime se dobija specifična površina ispitivanog nanomaterijala, izražena kao ukupna površina po jedinici mase ili zapremine (Brame i Griggs, 2016).

Atomi i molekuli bilo kog kristala imaju sebi svojstvene spektre, koji daju informacije o sastavu i strukturi¹, a samim tim i energetsom stanju molekula (Thompson i sar., 2009). Za dobijanje podataka o kristalnoj i molekulskoj strukturi čvrstih materijala se koriste difrakcione

¹ Broju, masi i naelektrisanju jezgra, broju i položaju elektrona u K, L, M, N orbitalama, tj. ljuskama i energiji vezivanja.

metode, pre svega molekularna spektroskopija (Goodman, 1994). Ove nedestruktivne² metode uključuju izlaganje datog materijala rendgenskom elektromagnetnom zračenju (čija je talasna dužina od 0,01 do 0,5 nm i uporediva je sa međuatomskim rastojanjima) da bi se dobili difrakcioni spektri iz kojih se, na osnovu apsorpcionih maksimuma, mogu proceniti strukturne ili kompozicione informacije o materijalu (Goodman, 1994). Rendgenska fotoelektronska spektroskopija (eng. X-ray Photoelectron Spectroscopy - XPS), korišćena u ovom radu, je nedestruktivna tehnika koja se ekstenzivno primenjuje za karakterizaciju površinske hemije materijala u bioinžinjeringu, a sve više se koristi i u biologiji i ekotoksikologiji. Ovo je kvantitativna spektroskopska tehnika koja služi za određivanje atomskog sastava, empirijske formule, hemijskog i elektronskog stanja elemenata koji se nalaze na površini datog materijala (McArthur, Mishra i Easton, 2014). Dubina uzorka koja može da se analizira XPS tehnikom je oko 2 nm (10 atomskih slojeva) i zavisi od srednje slobodne putanje emitovanih elektrona (λ) i ugla pod kojim se emituje rendgensko zračenje (θ) u odnosu na uzorak (McArthur, Mishra i Easton, 2014). Prilikom XPS analize uzorak materijala se postavlja u komoru sa visokim vakuumom (eng. ultrahigh-vacuum - UHV) i pomoću rendgenske cevi ozračava snopom rendgenskog, tj. X zračenja (meko rendgensko, 200 - 1500 eV), određene talasne dužine, usled čega dolazi do emitovanja fotoelektrona³ sa njegove površine (Günzler i Williams, 2001). Broj i kinetička energija emitovanih elektrona (karakteristična za svaki hemijski element) se detektuje putem odgovarajućeg analizatora energije elektrona čime se dobijaju XPS fotoelektronski spektri, tj. fotospektrogrami⁴ (McArthur, Mishra i Easton, 2014). Na fotospektrogramu X osa je osa energije (sadrži podatke o energiji upadnih elektrona), dok je Y osa intenziteta (sadrži podatke o struji koju beleži detektor, tj. brojnim vrednostima elektrona u jedinici vremena).

Uzorci su ispitani i rendgenskom kristalografijom, tj. rendgenskom difrakcionom strukturnom analizom (eng. X-ray Diffraction - XRD). Rasejavanjem rendgenskog zračenja na ispitivanom materijalu moguće je utvrditi raspodelu elektronske gustine, $f(\rho)$, koja je određena

² Nakon ove analize uzorak nanočestica je u potpunosti sačuvan i može se upotrebiti za dalje analize.

³ Valentni i elektroni sa orbitala bliskih valentnim izbijaju se putem rendgenskih zraka sa svojih elektronskih orbitala i emituju se u vidu fotoelektrona. Energija ovih fotoelektrona je kinetička energija koja je određena vezujućom energijom.

⁴ Na osnovu položaja pikova, tj. maksimuma intenziteta fotoelektrona na fotospektrogramima moguća je kvalitativna i kvantitativna analiza uzorka (pikovi odgovaraju elektronskoj konfiguraciji elektrona unutar atoma, tj. 1s, 2s, 2p, 3s). Svaki element ima karakterističnu energiju veze valentnih elektrona, što omogućava identifikaciju i kvantifikaciju elementa, kao i evidenciju njegovog hemijskog stanja u uzorku, poređenjem dobijenih i tabličnih vrednosti spektra.

atomskom strukturom kristala (Mohan i Renjanadevi, 2016). Kao rezultat analize dobija se difraktogram zavisnosti relativnog intenziteta difraktovanog zračenja (uglavnom izražen kao broj fotona) od dvostrukog ugla rasejanja, $2\theta/^\circ$, na osnovu koga se vrši kvalitativna analiza uzorka tj. određuje fazni sastav i struktura⁵ (Glišić, 2018; Thompson i sar., 2009).

Radi dobijanja informacija o distribuciji veličine i agregaciji nanočestica, kao i opšte slike i fotografisanja uzoraka korišćeni su mikroskopi visoke rezolucije, pre svega transmisiona i skenirajuća elektronska, kao i atomska mikroskopija (eng. Transmission Electron Microscopy – TEM; Field Emission Scanning Electron Microscopy – SEM; Atomic Force Microscopy – AFM). U sklopu SEM mikroskopije može se primeniti i energetska disperzivna spektroskopija rendgenskih zraka (eng. Energy Dispersive X-rays Spectroscopy – EDX). EDX spektroskop detektuje rendgenske zrake emitovane iz samog uzorka, za vreme bombardovanja elektronskim snopom SEM mikroskopa, pri čemu se dobijaju spektrogrami koji pokazuju odnos energije (X osa) i broja X zraka primljenih i obrađenih od strane detektora (Y osa), čime se određuje kvalitativno i kvantitativno prisustvo elemenata u ispitivanom uzorku (Glišić, 2018).

U ekotoksikološkim testovima koriste se određene koncentracije rastvora nanočestica, pri čemu se nanočestice rastvaraju u određenom medijumu (uglavnom dejonizovanoj i destilovanoj vodi) čineći koloidni rastvor⁶. Kada se rastvorene nanočestice oksida metala kreću kroz tečni medijum, tanki, električni dipolni sloj (engl. Electrostatic Interfacial Layer - EIL) prijanja na njihovu površinu na granici između čvrste površine nanočestica i tečne faze medijuma (Hackley i Clogston, 2011; Kallay i sar., 2010) i on je analiziran u ovom radu. Kod čestica oksida ili hidrokksida metala u vodenoj sredini uglavnom se za površinu adsorbuju H^+ i OH^- joni iz rastvora (Gulicovski, 2016). Pošto ovaj sloj utiče na kretanje čestice i zavisi od više faktora (kao što je elektroprovodljivost rastvora), meri se takozvani hidrodinamički prečnik (d_H) čestica koji je uglavnom veći od prečnika same čestice (Mowat i sar., 2007; Rawle, 2003). Hidrodinamički prečnik se meri uređajima sa dinamičkim rasipanjem svetlosti (eng. Dynamic Light Scattering - DLS), tj. fotonsko korelacionom spektroskopijom, tehnikom je koja se koristi za određivanje veličine malih čestica u suspenziji ili polimera u rastvoru (Rawle, 2003). Izračunat je i

⁵ Svaki difraktogram sastoji se od pikova koji imaju svoj intenzitet (brojne vrednosti na ordinati) i širinu na poluisini (određen uglom 2θ na apscisi). Poređenjem položaja i intenziteta detektovanih difrakcionih maksimuma, tj. pikova, sa odgovarajućim referentnim difraktogramima vrši se identifikacija i zastupljenost faza.

⁶ Sistemi u kojima se veličina čestica rastvorene, tj. čvrste, faze kreće u granicama 1-100 nm se nazivaju koloidnim sistemima ili rastvorima.

polidisperzitet (eng. Polydispersity Index – PDI) koji predstavlja meru homogenosti raspodele molekularne težine u rastvoru, pri čemu viša vrednost PDI⁷ ukazuje na heterogeniji sistem (ISO, 1996; Hackley i Clogston, 2011).

Jonske interakcije na čvrsto/tečnoj dodirnoj površini (u električnom dipolnom sloju koji okružuje nanočestice u rastvoru) dovode do stvaranja elektrostatičkog potencijala, koji se naziva Zeta potencijal (ζ potencijal) (Kallay i sar., 2010). Zeta potencijal je ključni pokazatelj stabilnosti čestica u rastvoru, ali i pokazatelj njihove potencijalne toksičnosti za biološke sisteme (Clogston i Patri, 2011). Nanočestice sa niskim zeta potencijalom, između -10 i $+10$ mV, smatraju se približno neutralnim, dok nanočestice sa visokim zeta potencijalom, (pozitivnim) većim od $+30$ mV ili (negativnim) manjim od -30 mV, smatraju se snažno katjonskim i snažno anjonskim (Clogston i Patri, 2011). Koloidni rastvori nanočestica sa visokim zeta potencijalom (negativnim ili pozitivnim) su elektrostabilni (čestice se međusobno odbijaju), dok oni sa niskim imaju tendenciju zgrušavanja tj, agregacije i sedimentacije (ovi rastvori teže stanju sa manjim odnosom površina/zapremina, što dovodi do aglomeracije čestica). Pošto je većina ćelijskih membrana negativno naelektrisana, zeta potencijal može uticati na prodornost nanočestica kroz biološke membrane, pri čemu pozitivno naelektrisane katjonske čestice (potencijal veći od $+30$ mV) uglavnom pokazuju više toksičnosti povezane sa poremećajem ćelijskog zida (Clogston i Patri, 2011).

3.1.1 nano-TiO₂

TiO₂ nanočestice korišćene u eksperimentu dobavljene su od proizvođača “Fiorio Colori Spa” iz Italije preko distributera “Pharmorgana GmbH” iz Nemačke u vidu polikristalnog uzorka (praha) TiO₂ komercijalne bele boje za hranu, E171, sa 99% čistoće. Opsežna karakterizacija ove dobavljene količine nanočestica, koja će se kasnije koristiti u eksperimentu, izvršena je od strane autora Jovanović i sar., 2016a i detaljno je opisana u radu ovih autora. Ove nanočestice su korišćene i u *in-situ* eksperimentu za procenu uticaja TiO₂ nanočestica na strukturu zajednice slatkovodnih bentosnih makroinvertebrata (Jovanović i sar., 2016b).

⁷ Raspon vrednosti polidisperziteta kreću se od 0 do 1: 0 do 0,08 - uska distribucija veličina čestica, tj. gotovo monodisperzni uzorak; 0,08 do 0,7 - Vrednost srednjeg opsega; 0,7 do 1 - polidisperzni uzorak, tj. široka distribucija veličina čestica.

S obzirom da detaljna karakterizacija ovih nanočestica nije izvršena u okviru ove doktorske disertacije, već u okviru prethodnih istraživanja Jovanović i sar., 2016a, a kako je izuzetno značajna za interpretaciju rezultata, metode karakterizacije opisane su u prilogu 1.

Ukratko, za karakterizaciju ovih nanočestica korišćene su sledeće metode: TEM, AFM, XPS, XRD, BET, DLS i procena zeta potencijala.

3.1.2 nano-CeO₂

Komercijalno dostupan prah CeO₂ nanočestica (polikristalni uzorak) je dobavljen od proizvođača „Sigma Aldrich“, sa prečnikom čestica <25 nm, po specifikaciji proizvođača. Opsežna karakterizacija ove dobavljene količine CeO₂ nanočestica, koja će se kasnije koristiti u eksperimentu, je izvršena na Odeljenju za nauku o materijalima i nanotehnološko inženjerstvo na TOBB Univerzitetu za ekonomiju i tehnologiju, u Ankari, Turska.

TEM

TEM fotomikrografije uzorka CeO₂ nanočestica dobijene su pomoću „FEI Tecnai G2 F30“ mikroskopa. Uzorci su pripremljeni odlivanjem 1 do 2 kapi disperzije nanočestica u etanolu na bakarnu mrežu obloženu ugljenikom.

XPS

Rendgenska fotoelektronska spektroskopija, XPS, izvršena je pomoću “Thermo Scientific K-Alpha” uređaja. Korišćen je snop magnezijumskog rendgenskog zračenja K α linije (Mg K α , energije fotona 1.253,6 eV) sa izvorom snage 300 W. Za snimanje preglednih spektara je korišćena energija prolaza elektrona u analizatoru od 117,40 eV. Spektri su snimljeni koristeći početni ugao od 60 ° u odnosu na normalnu površinu.

XRD

Rendgenska difrakciona strukturalna merenja izvršena su pomoću „Pananalytical X’pert Pro“ višenamenskog rendgenskog difraktometra u refleksionoj geometriji. Korišćen je snop Cu zračenja K α linije (talasne dužine $\lambda = 0,154$ nm) energije 40 kV i jačine 40 mA. Merenja su izvršena u intervalu uglova 2θ od 1° do 80° u koracima od 0.05°.

BET

BET analiza specifične površine CeO₂ nanočestica je izvršena pomoću “Autosorb iQ Station 1” uređaja u azotnoj (N₂) atmosferi. BET specifične površine dobijene su pomoću N₂

adsorpcionih i desorpcionih testova na temperaturi od 77 K (-196.15°C). Uzorci su degasifikovani na 120°C u trajanju od 15 sati, pre početka merenja.

DLS i zeta potencijal

Hidrodinamički radijus i zeta potencijal CeO₂ nanočestica izmereni su na temperaturi od 25 °C pomoću „Malvern ZetaNano ZS“ uređaja za analizu čestica, koristeći He-Ne laserski izvor, snage 5 mW i talasne dužine 633 nm. Suspenzija CeO₂ nanočestica u dejonizovanoj vodi je pripremljena u koncentraciji od 0,1 mg/ml. Prosečan hidrodinamički radijus meren je na svaka 5 minuta, prvih sat vremena nakon pripreme suspenzije, uz još jedno dodatno merenje nakon 24 časa. Zeta potencijal je izmeren 15 minuta nakon pripreme suspenzije. Ova merenja su obavljena da bi se sagledala nestabilnost suspenzije tokom vremena, jer se očekivalo veliko taloženje.

In situ karakterizacija nano-CeO₂ u sedimentu

Morfologija, stopa agregacije i distribucija veličina CeO₂ nanočestica u samom sedimentu (u koncentraciji od 250 i 2500 mg nano-CeO₂ po kg sedimenta) analizirani su „FEI Nova Nano SEM 430“ SEM mikroskopom, sa srednjom energijom elektronskog mlaza (10-20 kV). Zarad ispitivanja čestica u vakuumu u visokoj rezoluciji, uzorci su prskanjem prekriveni tankim slojem zlata od 10 nm. Da bi se preciznije identifikovale CeO₂ nanočestice na česticama peska u samom sedimentu, paralelno sa SEM mikroskopijom, izvršena je i EDX spektralna analiza površinske morfologije uzorka. Uz pomoć EDX spektroskopije, nanočestice CeO₂ su identifikovane u sedimentu i njihova lokacija na površini peska je mapirana sa visokom preciznošću. Uzorci za ovu analizu su pripremljeni u koncentracijama od 250 i 2500 mg/kg nano-CeO₂ na sledeći način:

- 250 i 2500 mg CeO₂ nanočestica je pomešano sa 100g krupnog i sitnog peska u volumetrijskim bocama da bi se dobile gore navedene koncentracije,
- Zatim su volumetrijske boce napunjene česmenskom i dejonizovanom vodom (50:50),
- Rastvori su mešani četiri sata, a zatim je voda evaporisana.

3.1.3 nano-Fe₃O₄

Sinteza i opsežna karakterizacija Fe₃O₄ nanočestica, koje će se kasnije koristiti u eksperimentu, je izvršena na Odeljenju za nauku o materijalima i nanotehnološko inženjerstvo na TOBB Univerzitetu za ekonomiju i tehnologiju, u Ankari, Turska. Nanočestice su sintetisane u okviru

izrade doktorske disertacije Gözde Yüce na ovom Univerzitetu sa ciljem dalje potencijalne upotrebe u nanomedicini, pre svega zbog njihovih magnetnih svojstava.

Sinteza nanočestica

Materijal potreban za sintezu sferičnih Fe_3O_4 nanočestica, Gvožđe (III) oksid (hidratizovan), 1-oktadecen (90%), oleinska kiselina (90%) i bezvodni hloroform ($\geq 99\%$, sadrži 0,5-1,0% etanola), dobavljen je od proizvođača „Sigma-Aldrich“ u Turskoj. Pored ovih materijala, u eksperimentu su korišćeni i tečni azot i argonski gas (eng. linde gas). Fe_3O_4 nanočestice su sintetisane koristeći metodu koju su prethodno opisali Sharma i sar., 2015. Pre započinjanja sinteze, gas je dopreman iz grla volumetrijske bočice 20-30 minuta. $\text{FeO}(\text{OH})$ je samleven i filtriran 125 mm filterom. Nakon što je oleinska kiselina dovedena do sobne temperature, $\text{FeO}(\text{OH})$, oleinska kiselina i 1-oktadecen su dodati u bočicu respektivno i mešani na 500 rpm (obrtaja u minutu). Pomoću regulatora temperatura je povećana sa sobne na 320°C , brzinom od $10^\circ\text{C}/\text{min}$, i rastvor je refluksovan jedan sat na 320°C , a potom ohlađen uklanjanjem sa grejača. Rastvor je jednom ispran heksan-acetonom (u razmeri 1:2) tokom 20 minuta i pri 6000 obrtaja u minuti u centrifugi, a zatim je dodatno ispran tri puta heksan-acetonom (u razmeri 1:2). Ovime je dobijen polikristalni uzorak, tj. prah, nano- Fe_3O_4 čestica koji je korišćen za dalje analize.

TEM

TEM fotomikrografije uzorka Fe_3O_4 nanočestica dobijene su pomoću „FEI Tecnai G2 F30“ mikroskopa. Uzorci su pripremljeni odlivanjem 1 do 2 kapi disperzije nanočestica u etanolu na bakarnu mrežu obloženu ugljenikom.

XPS

Rendgenska fotoelektronska spektroskopija, XPS, izvršena je pomoću „Thermo Scientific K-Alpha“ uređaja. Korišćen je snop monohromatskog rendgenskog zračenja $K\alpha$ Al linije ($K\alpha$ Al, energije 1.486,6 eV) sa izvorom snage 300 W. Za snimanje i ispitivanje preglednih spektara je korišćena energija prolaza elektrona u analizatoru od 117,40 eV. Spektri su snimljeni koristeći početni ugao od 60° u odnosu na normalnu površinu.

XRD

Rendgenska difrakciona strukturalna merenja izvršena su pomoću „Pananalytical X'pert Pro“ višenamenskog rendgenskog difraktometra u refleksionoj geometriji. Korišćen je snop Cu zračenja $K\alpha$ linije (talasne dužine $\lambda = 0,154$ nm) energije 40 kV i jačine 40 mA. Merenja su izvršena u intervalu uglova 2θ od 1° do 80° u koracima od $0,05^\circ$.

Magnetna svojstva

„Physical Property Measurement System,, uređaj za merenje fizičkih svojstva nanočestica (kriogeni, 12 T magnet) korišćen je za merenje magnetnih svojstava Fe₃O₄ nanočestica.

In situ karakterizacija nano-Fe₃O₄ u sedimentu

Morfologija, stanje agregacije i distribucija veličina Fe₃O₄ nanočestica u samom sedimentu (u koncentraciji od 50, 100 i 1000 mg nano-Fe₃O₄ po kg sedimenta) analizirani su „FEI Nova Nano SEM 430“ SEM mikroskopom, sa srednjom energijom elektronskog mlaza 10-20 kV. Zarad ispitivanja čestica u vakuumu u visokoj rezoluciji, uzorci su prskanjem prekriveni tankim slojem zlata od 10 nm. Da bi se preciznije identifikovale Fe₃O₄ nanočestice, paralelno sa SEM mikroskopijem, izvršena je i EDX spektralna analiza površinske morfologije uzorka. Kombinacijom ovih dveju analiza omogućeno je praćenje i analiziranje interakcije između peska i Fe₃O₄ nanočestica u sedimentima. Uzorci za ovu analizu su pripremljeni u koncentracijama od 50, 100 i 1000 mg/kg na sledeći način:

- 5, 10 i 100 mg Fe₃O₄ nanočestica je pomešano sa 100g peska (nezavisno je rađena analiza na krupnom i sitnom pesku) u volumetrijskim bocama da bi se dobile gore navedene koncentracije,
- Zatim su volumetrijska boce napunjene česmenskom i dejonizovanom vodom (50:50),
- Rastvori su mešani 4 sata, a zatim je voda evaporisana.

3.2. Postavka eksperimenata

Za potrebe ove doktorske disertacije dizajnirana su dva seta eksperimenata (svaki set sastojao se od nekoliko bioloških testova):

1. Set eksperimenata za testiranje i odabir adekvatne podloge:
 - a. Testiranje uticaja mešavine komponenti supstrata,
 - b. Testiranje uticaja pojedinačnih komponenti supstrata;
2. Set eksperimenata za procenu toksičnog uticaja nanočestica:
 - a. Ispitivanje toksičnosti TiO₂ nanočestica,
 - b. Ispitivanje toksičnosti CeO₂ nanočestica,
 - c. Ispitivanje toksičnosti Fe₃O₄ nanočestica.

Svi eksperimenti izvedeni su prema OECD smernicama za ispitivanje hemikalija, Odeljak 2, po testu pod rednim brojem 218 - "Test toksičnosti na hironomidama u sistemu sediment-voda, sa supstancom u sedimentu", u daljem tekstu "OECD Test 218" (OECD, 2004). Ovaj test usvojen je 13. aprila 2004. od strane OECD zajednice, a poslednja verzija ažurirana je 23. novembra 2004.

Detaljni dizajn pojedinačnih eksperimenata opisan je opširnije u narednim poglavljima, međutim osnovni princip postavke svih eksperimenata u ovom istraživanju je isti:

Hironomide (od larvi prvog stupnja, starih od 2 do 4 dana, pa do četvrtog stupnja ili do izletanja) su izlagane rasponu koncentracija ispitivanog agensa (u ovom slučaju nanočestice) u sistemu sediment-voda. Svaka koncentracija ispitivana je u nekoliko replikata, a u svakom eksperimentu su postavljeni i kontrolni replikati (bez testirane nanočestice u sedimentu). Test posude i drugi uređaji koji dolaze u kontakt sa sistemom bile su u potpunosti od stakla ili drugog hemijski inertnog materijala (teflona).

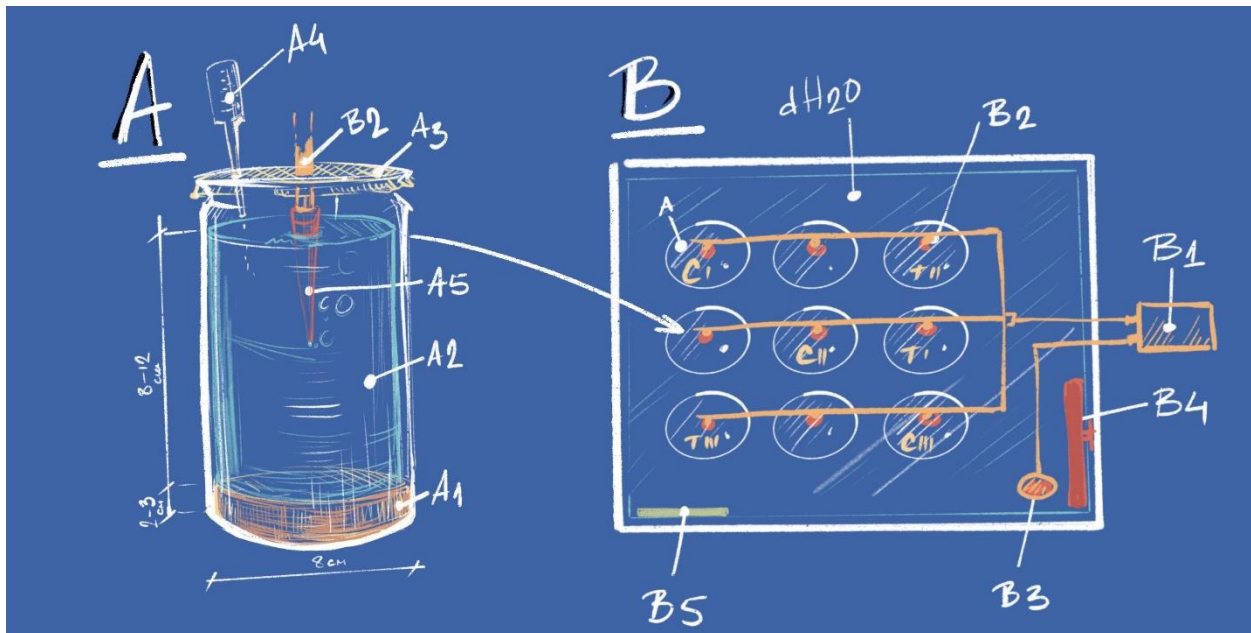
Ispitivane nanočestice mešane su sa supstratom: u slučaju prvog seta eksperimenata ispitivan je uticaj sastava podloge na larve hironomida, te su testirane različite kombinacije sastojaka supstrata; u slučaju naredna tri seta eksperimenta ispitivan je toksični efekat nanočestica oksida metala na jedinke hironomida, te je adekvatna količina nanočestica mešana sa supstratom. Mešanje agensa sa supstratom vršeno je ručno u trajanju od 10 minuta (ponavljano 3 dana) radi postizanja što ravnomernije distribucije čestica. U poglavlju „Testiranje i odabir adekvatne podloge“ detaljnije je opisan sastav i priprema supstrata.

Ispitivanja su izvodjena u staklenim test posudama, teglama od 600 ml, prečnika 8 cm (pri čemu svaka test posuda predstavlja jedan replikat). Pre upotrebe u eksperimentu test posude sterilisane su u suvom toplotnom sterilizatoru (VimS elektrik SSW 120, Srbija) na 180°C u trajanju od 60 minuta. Na dno test posude je dodat sloj supstrata dubine od 2 do 3 cm, a obzirom na dimenzije tegle površina supstrata iznosila je 50,26 cm² (dovoljna da obezbedi 2 do 3 cm² po larvi, kao što je preporučeno protokolom).

Preko supstrata je potom dolivan medijum u vidu mešavine dehlorizovane česemske i destilovane vode u odnosu 1:1; odnos dubine sloja supstrata i dubine vode iznad njega bio je 1:4. Kada je sistem stabilizovan i sve materije istaložene na dnu, a voda izbistrena (do 3 dana) sistem je aerisan u trajanju od 24h. Nakon isključivanja aeracije u svaku test posudu ubačen je odgovarajući broj larvi (od 20 do 25 po replikatu, odnosno minimum 60 po tretmanu). Test posude su potom prekrivene sterilnom medicinskom gazom, a lagana aeracija (nekoliko mehurića u

sekundi) je ponovo puštena nakon 24h. Sistem za aeraciju sastojao se iz nastavka za pipetiranje, pričvršćenog 2 do 3 cm iznad sloja podloge, navučenog na aeraciono crevo koje je povezano sa aeracionom pumpom.

Test posude su postavljene u izotermalnu komoru: veliki akvarijum sa poklopcem u kome je uz pomoć grejača temperatura održavana konstantnom na $21\pm 1^\circ\text{C}$ za *C. riparius* i $23\pm 1^\circ\text{C}$ za *C. tentans*, u kojoj su vršeni eksperimenti. Uspostavljen je svetlosni režim od 16 sati svetlosti (neonskim lampama intenziteta 1000 lux) i 8 sati mraka. Šema pojedinačne test posude i čitave eksperimentalne postavke prikazan je na slici 13, a izgled postavke u laboratoriji na slici 14.



Slika 13 – Šema eksperimentalne postavke prema OECD Testu 218. A – šema test posude (A1 – supstrat, A2 – medijum, dechlorizovana i destilovana voda 1:1, A3 – pokrovna mrežica, A4 – pipeta za dodavanje hrane, A5 – nastavak za dovod aeracije); B – izotermalna komora (B1 – aeraciona pumpa, B2 – sistem za sprovedenje aeracije, B3 – raspršivač vazduha, B4 – grejač, B5 – termometar).



Slika 14 - Izgled eksperimentalne postavke u laboratoriji na PMFu u Nišu, za bioesej sa hironomidama, po OECD smernicama za Test 218.

Larve su hranjene, svakog dana ili minimum tri puta nedeljno, preporučenom TetraMin® suvom hranom za akvariumske ribice (sastav hrane, po specifikaciji na pakovanju: biljni sastojci, riba i riblji proizvodi, belančevine, žitarice, alge, ulja, masti, školjke, minerali, šećeri, rakovi, kvasac, lecitin; analitički sastav hrane opisan je u tabeli 1). Hrana je davana u količini 0,25 do 0,5 mg po larvi prvih 10 dana eksperimenta, potom u količini od 0,5 do 1 mg po larvi do kraja eksperimenta. Količina hrane su korigovane u odnosu na zamućenje vode i uočavanje ostataka hrane na površini podloge.

Tabela 1 – Analitički sastav Tetra Min hrane za ribice (dobavljač "Fido Pet Shop" Niš, proizvođač "Min")

Min. Sirovih proteina 47.0%	Min. vit. D3 1,400 IU/kg	Min. Niacin 700 mg/kg
Min. Sirovih masti 10.0%	Min. vit. E 140 IU/kg	Min. Inozitol 1,400 mg/kg
Max. Sirovih vlakana 3.0%	Min. vit. A 15,000 IU/kg	Min. Holin 2,100 mg/kg
Max. vlage 6.0%	Min. vit. B12 110 mg/kg	Min. Biotin 1 mg/kg
Min. fosfora 1.0%	Min. Askorbinke kiseline (Vit C) 390 mg/kg	Omega-3 masne kiseline 8,000 mg/kg

Fizko-hemijski parametri vode (temperature vode, pH, tvrdoća i konduktivitet) mereni su na početku i na kraju eksperimenta, a eksperimentalna postavka je svakodnevno praćena i beležene su uočene promene: vizuelna procena bilo kakvog neuobičajenog ponašanja larvi u poređenju sa kontrolom (izlazak iz sedimenta, neobično plivanje); zamućenje i kontaminacija; sazrevanje larvi; eklozija odraslih mužjaka i ženki; broj pupa i broj položenih jaja (ukoliko ih ima).

Na kraju eksperimenta mereni su i izračunavani standardni parametri preporučeni OECD protokolom (mokra masa, stopa preživljavanja, mortalitet, vreme razvića i stopa razvića) ali i dodatni biomarkeri, zavisno od ispitivane supstance, o čemu će više detalja biti u narednim poglavljima.

Da bi eksperiment bio validan, neophodno je zadovoljiti sledeće kriterijume:

- Preživljavanje jedinki u kontroli mora da bude minimum 70% na kraju testa;
- Eklozija odraslih jedinki mora se odviti za 12 do 23 dana, za *C. riparius*, ili maksimalno 65 dana za *C. tentans* (nakon ubacivanja larvi u test posude);
- Na kraju testa mora se izmeriti pH i saturacija kiseonikom, pri čemu bi pH trebalo da bude u rasponu od 6 do 9, a saturacija najmanje 60% od 100% vrednosti za datu temperaturu (eng. Air Saturation Value - ASV);
- Temperatura vode ne bi trebalo da varira više od 1,0 °C tokom eksperimenta.

3.2.1. Model-organizam (*Chironomus tentans* i *Chironomus riparius*)

Kao model-organizam u eksperimentima korišćene su jedinke hironomida, vrsta *C. tentans* i *C. riparius*, potekle iz uzgojne laboratorijske populacije (eng. stock culture) Departmana za Biologiju i Ekologiju, Prirodno-Matematičkog Fakulteta, Univerziteta u Nišu.

Za formiranje uzgojne populacije uzorak je uzet iz prirodnog staništa nadomak Niša (staro korito reke Nišave, 43°19'01.73" N; 21°51'21.79" E; 187 metara nadmorske visine, slika 15). Uzorkovane larve iz prirodne populacije sa preciznošću su identifikovane do nivoa vrste, od strane dr Đurađa Miloševića i mast. biol. Ace Đurđevića. Identifikacija vrsta potvrđena je molekularnom analizom COI gena (mitohondrijalni gen za citohrom c oksidazu, subjedinicu I), tehnikom DNK bar-kodiranja, u okviru izrade doktorske disertacije Mast. biol. Ace Đurđevića.

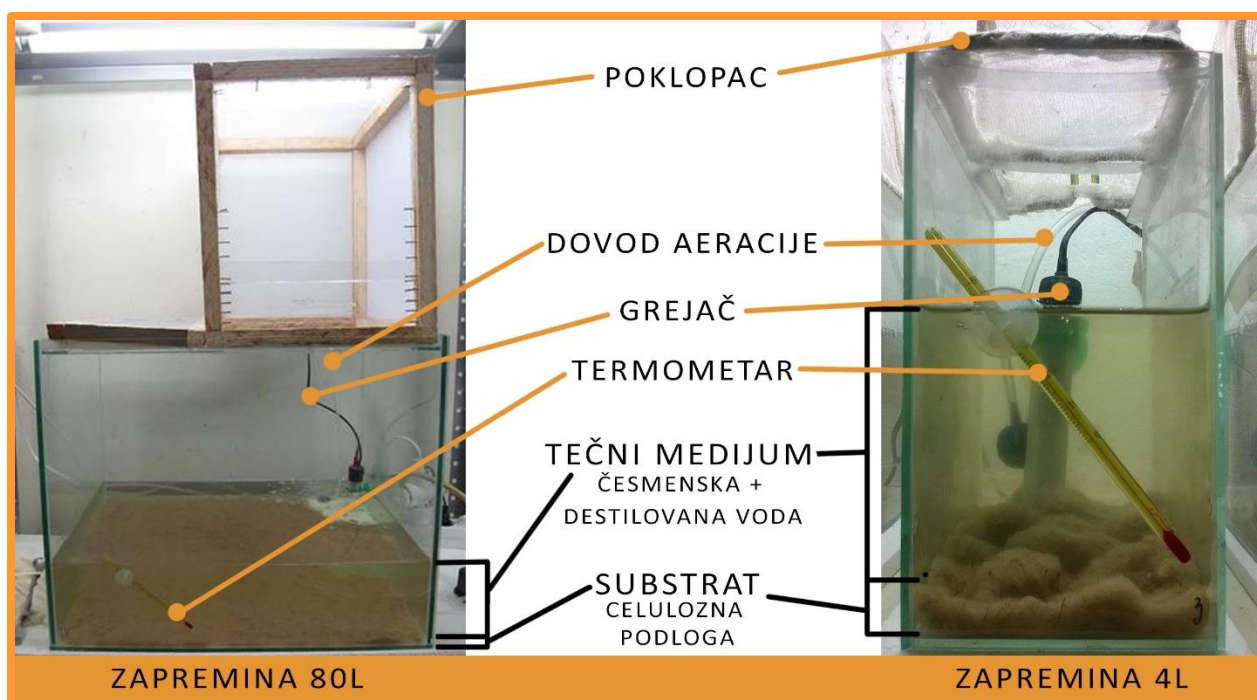


Slika 15 - Lokalitet na kome je prirodno stanište larvi hironomida koje su uzorkovane za formiranje i održavanje laboratorijske populacije Departmana za Biologiju i Ekologiju, Prirodno-Matematičkog Fakulteta, Univerziteta u Nišu (Izvor: Google earth).

Laboratorijska populacija uzgaja se i održava u skladu sa OECD smernicama opisanim u Aneksu II, OECD Testa 218 (OECD; 2004) i prema radu Bataccatalan i White, 1982., koji su dali osnovna pravila i uputstva za uspostavljanje populacije *C. tentans* u laboratorijskim uslovima.

Akvarijumi

Za uzgoj larvi koriste se stakleni akvarijumi, dimenzija 10*20*20 cm i zapremine 4 l, prekriveni mrežicom koja zadržava odrasle jedinke od izletanja. Sve odrasle jedinke prebacuju se u veći akvarijum, dimenzija 50*40*40 cm i zapremine 80 l, prekriven poklopcem od drvenog rama sa mrežicom, dimenzija 25*40*25 cm, namenjen rojenju i daljem razmnožavanju jedinki (slika 16).



Slika 16 - Izgled akvarijuma i opreme za uzgoj larvi hironomida na Departmana za Biologiju i Ekologiju, Prirodno-Matematičkog Fakulteta, Univerziteta u Nišu.

Supstrat

Prema OECD smernicama za podlogu se preporučuje korišćenje kvarcnog peska fine granulacije ili dijatomejske zemlje u sloju dubine 5 do 10 mm. Međutim, u radu Bataccatalan i White, 1982., ističe se da hironomide, a pre svega *C. tentans*, preferiraju mek, rastresit supstrat i preporučuje se podloga napravljena od celuloznog papira. Poređenjem lakoće i uspešnosti uzgoja hironomida na obe podloge rešeno je da se za laboratorijsku populaciju koristi supstrat od celuloznog papira dubine 2,5 do 4 cm. Podloga se priprema na sledeći način: oko 50 g čistog celuloznog papira (smeđi "Lambino ubrus 2/1", proizvođača D.O.O. "Lambino Plus" iz Stare Pazove) usitni se i prelije 100% acetonom (kako bi se izvukle sve nečistoće) i ostavi u digestoru 30 minuta, potom ocedi i prelije novom količinom acetona; postupak se ponavlja 3 puta; papir se

potom prebacuje u sito i ispira česmenskom vodom dok se potpuno ne izgubi miris acetona; potom se nekoliko puta ispere i destilovanom vodom; a potom kuva u destilovanoj vodi (od trenutnka ključanja 1 sat); nakon kuvanja se smesa blenderom homogenizuje; kada se ohladi smesa se iscedi pomoću sita, podeli u loptice veličine pola šake i odloži u zamrzivač za dalje korišćenje. U akvarijum prethodno napunjen vodom uroni se ovako pripremljena podloga (1 loptica je dovoljna za akvarijum zapremine 4l) i rasporedi ravnomerno po akvarijumu.

Medijum

Koristi se mešavina dehlorisane česmenske i destilovane vode u razmeri 1:1, koja se preliva preko podloge tako da visina vodenog stuba iznosi oko 15 cm. Obezbeđena je i konstantna aeracija putem akvarijumskih pumpi sa raspršivačima (postavljenih na visini koja ne dozvoljava uzburkavanje podloge). Temperatura vode održava se akvarijumskim grejačima na $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Parametri vode mere se jednom mesečno i kreću se u sledećem rasponu: pH $6,52 \pm 0,4$; tvrdoća vode $7,3 \pm 0,25$ °dH; konduktivitet $325 \mu\text{S}/\text{cm}^3$.

Kontrolisani sredinski uslovi

Temperatura laboratorije u kojoj su smešteni akvarijumi iznosi $20 \pm 2^\circ\text{C}$; a obezbeđen je fotoperiod od 16 sati svetlosti (neonskim lampama intenziteta 1000 lux) i 8 sati mraka.

Ishrana

TetraMin® suva hrana za akvariumske ribice se upotrebljava za prehranu hironomida, 1-3 g hrane dodaje se u 20 ml destilovane vode i homogenizuje pomoću magnetne mešalice, po 5 ml ovakvog rastvora dodaje se u akvarijume svakodnevno. Količine se menjaju u odnosu na broj larvi i zamućenje vode u akvarijumima.

Početne kulture

U prve akvarijume dodato je po 20 do 30 larvi iz prirodnih populacija. Ukoliko se temperatura vode održava konstantnom, larve se izležu dva do tri dana nakon poleganja, a nove odrasle jedinke izleću za 13 do 15 dana. U ovakvim uslovima dnevno dolazi do eklozije oko 20 odraslih jedinki u populaciji. Odrasle jedinke se potom pare u rojilici i polažu jaja, a ta jaja se dalje koriste za obnavljanje populacije (u novoformirane akvarijume dodaje se 2 do 3 paketa jaja) ili za eksperimente.

Održavanje laboratorijske populacije

Voda se menja na svakih četiri do sedam dana. Po OECD preporukama, celokupna laboratorijska populacija bi trebalo da bude vijabilna makar 6 meseci, međutim, radi sprečavanja inbridinga, populacija na PMF-u u Nišu se osvežava svakih tri do šest meseci (zavisno od

godišnjeg doba) novim jedinkama iz prirodnog staništa. Svakodnevna evidencija o populaciji se vodi putem laboratorijskog dnevnika koji sadrži sledeću tabelu:

datum	broj akvarijuma	praćenje populacije				praćenje parametara			dodatna zapažanja i potpis	
		Broj jaja	Broj imaga			hrana	T (°C)	zamena vode		aeracija
			ženke	mužjaci	ukupno					

Tabela 2 – Evidenciona tabela u laboratorijskom dnevniku za svakodnevno praćenje laboratorijske uzgojne populacije hironomida Departmana za Biologiju i Ekologiju, Prirodno-Matematičkog Fakulteta, Univerziteta u Nišu.

Jedinke vrste *C. tentans* korišćene su u prva dva eksperimenta, dok su jedinke vrste *C. riparius* korišćene u naredna dva eksperimenta. Razlog za prelazak sa jedne na drugu vrstu je opadanje brojnosti prirodne populacije *C. tentans* i nemogućnost održavanja kontinualne populacije tokom dužeg vremenskog perioda. Pored toga, OECD preporučuje da vrsta koja će se koristiti u eksperimentima bude *C. riparius* i ističe da je *C. tentans* takođe pogodan, ali teži za gajenje i zahteva duži period trajanja eksperimenata.

Nedelju dana pre početka svakog od postavljenih eksperimenata, sveže položeni paketi jaja pažljivo su izolovani i prebačeni u petrijeve posude napunjene vodom iz matičnog akvarijuma. Larve prvog stupnja su prebacivane u test posude (4 dana za *C. tentans* ili 2 do 4 dana za *C. riparius* nakon izleganja, zavisno od temperature) pomoću tupe teflonske pipete. Na ovaj način vođena je evidencija o poreklu i starosti larvi koje su korišćene u eksperimentima. Za jedan eksperiment korišćene su larve poreklom iz jednog ili maksimalno dva paketa jaja, kako bi se postigla genetička uniformnost.

3.2.2. Dizajn bioloških testova

Svi eksperimenti postavljeni su po prethodno opisanom protokolu. Po završetku eksperimenta analizirani su određeni parametri, a metode analize detaljnije su opisane u poglavlju “Analiza parametara bioloških testova”. U narednim poglavljima detaljnije je opisan dizajn svakog eksperimenta i eventualne izmene i dopune protokola, koje zavise od postavljene i testirane hipoteze.

3.2.2.1. Set eksperimenata za testiranje i odabir adekvatne podloge

Prema OECD Testu 218 preporučuje se korišćenje standardnog veštačkog supstrata kao eksperimentalne podloge (OECD, 2004) sledećeg sastava:

- 4-5% (suve mase) treseta: poželjno je da pH bude od 5,5 do 6,0, pri čemu je bitno da se koristi fino usitnjen treset (veličina čestica manja od 1 mm) koji je prirodno osušen na vazduhu;
- 20% (suve mase) kaolinske gline (poželjno je da procenat kaolinita bude 30%);
- 75-76% (suve mase) kvarcnog peska. Sitan, fino granulisan, pesak bi trebalo da bude dominantan, sa više od 50% čestica veličine između 50 i 200 μm (0,05 do 0,2 mm).

Dejonizovana ili destilovana voda dodaje se mešavini da bi se obezbedila konačna vlažnost podloge od 30 do 50%. Hemijski čist kalcijum karbonat (CaCO_3) dodaje se u mešavinu ukoliko je neophodno, kako bi se pH podesila na $7,0 \pm 0,5$. Preporučuje se da procenat organskog ugljenika u podlozi bude $2 \pm 0,5$ %, što se može podesiti korišćenjem odgovarajuće količine treseta i peska prema predloženim proporcijama.

Set eksperimenata za testiranje i odabir adekvatne podloge sastojao se od dva identično struktuirana bioeseja sa različitim modifikacijama preporučenog standardnog OECD supstrata. Modifikacije su se sastojale od isključivanja jedne ili više preporučenih komponenti iz supstrata. U prvom bioeseju testirana je kombinacija dve ili više komponenti, dok je u drugom testirana svaka komponenta nezavisno (slika 17).



Slika 17 – Set eksperimenata za testiranje i odabir adekvatne podloge – testirane komponente podloge A – krupan kvarcni pesak (grubo granulisan), B – Sitan kvarcni pesak (fino granulisan), C – treset (prosejan), D – kaolinska glina.

Radi sterilizacije, svaka od komponenti podloge detaljno je ispirana vodom, potom inkubirana u suvom toplotnom sterilizatoru (VimS elektrik SSW 120, Srbija) na 180°C u trajanju od 180 minuta, osim treseta koji je ostavljen da se prirodno osuši na vazduhu, kako je predloženo OECD protokolom. U svaku test posudu dodato je po 311 g supstrata sa odnosom količine komponenti prema predloženim OECD proporcijama. U slučaju izuzetka neke od komponenti, njen procentualni udeo podeljen je 50:50 na preostale, pri tome vodeći računa o održavanju parametara pH i tvrdoće vode u granicama predviđenim protokolom.

Prvi biološki test, namenjen proceni uticaja mešavine komponenti supstrata, sastojao se iz sledećih pet tretmana:

1. Standardni OECD supstrat, 75% peska (233,25 g) + 20% gline (62,2 g) + 5% treseta (15,55 g), u daljem tekstu STANDARD;
2. Standardni supstrat sa medicinskom glinom, 75% peska (233,25 g) + 20% medicinske gline (62,2 g) + 5% treseta (15,55 g), u daljem tekstu P+T+MG;
3. Standardni supstrat bez peska, 42,5% treseta (132 g) + 57,5% gline (178 g), u daljem tekstu T+G;
4. Standardni supstrat bez gline, 15% treseta (46,65 g) + 85% peska (264,35 g), u daljem tekstu T+P;
5. Standardni supstrat bez treseta, 64,7% gline (201,2 g) + 77,5% peska (109,78 g), u daljem tekstu G+P.

Drugi biološki test, namenjen proceni uticaja pojedinačnih komponenti supstrata, sastojao se iz sledećih pet tretmana:

1. Krupan pesak, 311g peska grube granulacije sa preko 50% čestica veličine u rasponu od 0,4 do 1 mm, u daljem tekstu KP;
2. Sitan pesak, 311g peska fine granulacije sa preko 50% čestica veličine u rasponu od 0,05 do 0,2 mm, u daljem tekstu SP;
3. Treset, 311g fino prosejanog treseta, u daljem tekstu T;
4. Glina, 311g fine kaolinske gline, u daljem tekstu G;
5. Bez supstrata, test posude samo sa vodom bez ikakve podloge, u daljem tekstu 0.

Dvadeset larvi vrste *C. tentans* prvog stupnja, 2 dana nakon izleganja (poreklom iz jednog paketa jaja), prebačeno je u svaku test posudu. Svaki od tretmana testiran je u tri replikata (tabela 3).

Tabela 3 - Set eksperimenata za testiranje i odabir adekvatne podloge – prikaz broja tretmana i replikata, sa brojem larvi *C. tentans* iskorišćenim u eksperimentu.

Eksperiment za testiranje podloge	tretman (tip podloge)	broj replikata po tretmanu	broj larvi u replikatu	Σ larvi u tretmanu
biološki test za procenu uticaja mešavine komponenti	STANDARD			
	P+T+MG			
	T+G	3	20	60
	T+P			
	G+P			
Σ larvi u prvom eksperimentu				300
biološki test za procenu uticaja pojedinačnih komponenti	KP			
	SP			
	T	3	20	60
	G			
	0			
Σ larvi u drugom eksperimentu				300
Σ larvi u setu eksperimenata za testiranje i odabir adekvatne podloge				600

Kada je primećeno da su larve dostigle četvrti larvalni stupanj (12 dana nakon početka eksperimenta u oba slučaja), preživjele larve su sakupljene i konzervirane u 95% etanolu za dalje analize.

Po završetku eksperimenta analizirani su sledeći biomarkeri: preživljavanje, mortalitet, mokra masa, morfološki parametri (ukupna dužina tela, dužina i širina glavene kapsule) i vidljive promene na mentumu larvi (istrošenost ili deformacije mentuma). Pored toga, supstrati sastavljeni od peska fine i grube granulacije ispitivani su SEM mikroskopijom kako bi se utvrdila tačna veličina čestica (detalji metode SEM analize opisani su u prethodnim poglavljima). U slučaju prvog biološkog testa, namenjenog proceni uticaja mešavine komponenti supstrata, primenjena je i metoda geometrijske morfometrije kako bi se utvrdio uticaj tipa supstrata na morfološku varijabilnost struktura usnog aparata i na samu osetljivost metode.

3.2.2.2 Set eksperimenata za procenu toksičnosti nanočestica

Jedinke hironomida izlagane su rastućim koncentracijama nanočestica u supstratu, u eksperimentima koji su postavljeni po prethodno opisanom protokolu. Pored tretmana, u svakom eksperimentu postavljene su i kontrolne test posude sa odgovarajućim brojem replikata (pripremljene na isti način kao tretmani, ali sa netretiranim supstratom bez dodatnih nanočestica).

Supstrat korišćen u svim eksperimentima sastojao se isključivo iz kvarcnog peska fine granulacije (čestica veličine između 0,05 do 0,2 mm), koji je pre upotrebe detaljno ispran vodom, a potom inkubiran u suvom toplotnom sterilizatoru (VimS elektrik SSW 120, Srbija) na 180°C u trajanju od 180 minuta radi sterilizacije. Da bi se nanočestice dodale u supstrat u svim eksperimentima pristupljeno je sledećem postupku: pripremljen je rastvor odgovarajuće koncentracije nanočestica u destilovanoj vodi, potom je rastvor dodat direktno u supstrat i detaljno ručno mešan (u trajanju od 10 minuta dnevno, sa ponavljanjem tokom tri dana) kako bi se nanočestice što ravnomernije rasporedile. Ovako pripremljen supstrat dodavan je u test posude, prelišen medijumom i pristupljeno je daljoj postavci eksperimenta.

Ispitivanje toksičnosti TiO₂ nanočestica

Set eksperimenata za **ispitivanje toksičnosti TiO₂ nanočestica** sastojao se od dva identično strukturirana bioeseja na jedinkama vrste *C. tentans*. U prvom bioeseju testirane su visoke koncentracije TiO₂ nanočestica (koje bi se mogle naći u prirodi u budućnosti ukoliko se nastavi ekstenzivna upotreba nano-TiO₂) sa ciljem da se proceni letalni efekat i ispita njihov uticaj na prametre populacionog fitnesa; dok su u drugom bioeseju testirane niže koncentracije TiO₂ nanočestica (koje se realno mogu naći u prirodi, a koje su ujedno niže od najviše koncentracije koja ne izaziva značajan mortalitet u prvom eksperimentu) sa ciljem da se proceni subletalni efekat i ispita njihov uticaj na morfološke promene larvi (tabela 4). Koncentracije su određene u skladu sa procenjenim godišnjim porastom nano-TiO₂ u slatkovodnim sedimentima u Evropi, prema švajcarskom modelu (približno 2,5 mg/kg; Gottschalk i sar., 2009), a koje su prethodno testirane *in situ* eksperimentom od strane Jovanović i sar., 2016b.

Tabela 4 - Set eksperimenata za ispitivanje TiO₂ nanočestica – prikaz broja tretmana i replikata, sa brojem larvi *C.tentans* iskorišćenim u eksperimentu (koncentracije ispitivanih nanočestica u supstratu predstavljene su u miligramima nano-TiO₂ po kilogramu sedimenta)

Eksperimenti za ispitivanje TiO ₂ nanočestica	tretman (koncentracija nano-TiO ₂ mg/kg)	broj replikata po tretmanu	broj larvi u replikatu	∑ larvi u tretmanu
biološki test za procenu letalnih efekata nano-TiO ₂	25	4	20	80
	250			
	500			
	1000			
	2000			
	4000			
	kontrola			
∑ larvi u prvom eksperimentu				560
biološki test za procenu subletalnih efekata nano-TiO ₂	2,5	3	20	60
	25			
	250			
	kontrola			
∑ larvi u drugom eksperimentu				240
∑ larvi u setu eksperimenata za procenu uticaja TiO ₂ nanočestica				800

Napravljene suspenzije odgovarajuće koncentracije TiO₂ nanočestica u destilovanoj vodi inkubirane su jedan dan na prirodnoj sunčevoj svetlosti (na krovu zgrade PMF-a u Nišu) pre mešanja sa eksperimentalnim supstratom. Ovaj postupak je primenjen zbog fototoksičnih svojstava nano-TiO₂ i preporuke da se eksperimenti sa ovim nanočesticama izvode ili na prirodnoj svetlosti ili da se omogući interakcija nanočestica sa sunčevom svetlosti pre izlaganja organizama (Jovanović, 2015b). Tokom inkubacije, suspenzije nanočestica primile su oko 90,17 W/m² solarne radijacije u prvom i 477,81 W/m² solarne radijacije u drugom biološkom testu (sunčevo zračenje mereno je pomoću meteorološke stanice “Davis Vantage Pro2TM” proizvođača “Davis Instruments Corp., USA”, postavljene na krovu PMFa u Nšu). Pripremljene test posude (po proceduri opisanoj u prethodnim poglavljima) ostavljene su 3 dana da se sve čestice istalože, pre početka eksperimenta.

Prvi bioesej za procenu letalnih efekata (uticaja odrasle jedinke) sastojao se iz sedam tretmana, a jedinke hironomida izlagane su TiO₂ nanočesticama od prvog larvalnog stupnja do izletanja. Larvama je bilo potrebno četiri dana da se izlegu iz jaja. Po dvadeset larvi (poreklom iz jednog paketa jaja) prebačeno je u svaku test posudu, četiri dana nakon izleganja. Eksperiment je završen pet dana nakon što je zabeleženo izletanje poslednje odrasle jedinke (nakon 29 dana). Izletanje imaga, broj mužjaka i ženki, pupa i mrtvih larvi beležen je svakog dana. Sve zabeležene jedinke odmah su sakupljane i konzervirane u 95% alkoholu za dalje analize.

Po završetku eksperimenta analizirani su sledeći biomarkeri: preživljavanje/mortalitet, vreme i stopa razvića jedinki. Pored ovih osnovnih parametara, analizirana je i morfološka varijabilnost desnih krila odraslih jedinki (primenom metode geometrijske morfometrije).

Drugi bioesej za procenu subletalnih efekata (uticaja na morfološke promene larvi) sastojao se iz četiri tretmana, a jedinke hironomida izlagane su TiO₂ nanočesticama od prvog do četvrtog larvalnog stupnja. Larvama je bilo potrebno 3 dana da se izlegu iz jaja. Po dvadeset larvi (poreklom iz jednog paketa jaja) prebačeno je u svaku test posudu četiri dana nakon izleganja. Eksperiment je završen tri dana nakon što su primećene prve larve četvrtog stupnja (nakon 11 dana). Zabeležen je broj preživelih larvi, a sve zabeležene jedinke odmah su sakupljane, isprane detaljno destilovanom vodom i konzervirane u 95% etanolu za dalje analize.

Po završetku eksperimenta analizirani su sledeći parametri: preživljavanje/mortalitet, mokra masa larvi, morfološka varijabilnost struktura usnog aparata (primenom metode

geometrijske morfometrije). Morfološke promene na mentumu larvi praćene su i metodom klasične morfometrije kako bi se uporedila efikasnost analize ovih dveju morfometrijskih tehnika u proceni uticaja TiO₂ nanočestica. Zabeležene su i vidljive promene na strukturama usnog aparata larvi (oštećena ili deformacije). Kako bi se potvrdilo da larve unose nanočestice u organizam, procenjena je količina Ti i TiO₂ u telima larvi putem ICP-MS analize.

Ispitivanje toksičnosti CeO₂ nanočestica

Set eksperimenata za **ispitivanje toksičnosti CeO₂ nanočestica** sastojao se od dva identično struktuirana biološka testa na jedinkama vrste *C. riparius* sa istim koncentracijama nanočestica (sa po pet tretmana). Prvi bioesej postavljen je sa ciljem procene letalnog efekta (uticaja na odrasle jedinke); dok je u drugom bioeseju ispitivan subletalni efekat na larvama kroz analizu serije parametara (tabela 5). Koncentracije su određene u skladu sa procenjenim sredinskim koncentracijama nano-CeO₂ u EU: prema danskom modelu u slatkovodnim sedimentima može biti od 0,2 do 95 µm/kg (Gottschalk i sar., 2015; Wang i Nowack, 2018) a u otpadnom mulju oko 359 µm/kg (Gottschalk i Nowack, 2011; Gottschalk i sar., 2015). Testirane koncentracije, stoga, predstavljaju najgori ekološki scenario ukoliko se nastavi sa ekstenzivnom upotrebom nano-CeO₂.

Tabela 5 - Set eksperimenata procenu uticaja CeO₂ nanočestica – prikaz broja tretmana i replikata, sa brojem larvi *C. riparius* iskorišćenim u eksperimentu (koncentracije ispitivanih nanočestica u supstratu predstavljene su u miligramima nano-CeO₂ po kilogramu sedimenta)

Ekspirimenti za ispitivanje CeO ₂ nanočestica	tretman (koncentracija nano-CeO ₂ mg/kg)	broj replikata po tretmanu	broj larvi u replikatu	∑ larvi u tretmanu
biološki test za procenu letalnih efekata nano-CeO ₂	2,5	4	25	100
	25			
	250			
	2500			
	kontrola			
∑ larvi u prvom eksperimentu				500
biološki test za procenu subletalnih efekata nano-CeO ₂	2,5	4	25	100
	25			
	250			
	2500			
	kontrola			

Σ larvi u drugom eksperimentu	500
Σ larvi u setu eksperimenata za procenu uticaja CeO ₂ nanočestica	1000

Pripremljene test posude (po proceduri opisanoj u prethodnim poglavljima) ostavljene su tri dana da se sve čestice istalože pre početka eksperimenta. Larvama je bilo potrebno dva dana da se izlegu iz jaja. Za oba bioeseja po 25 larvi (poreklom iz jednog paketa jaja) prebačeno je u svaku test posudu četiri dana nakon izleganja.

U prvom biološkom testu za procenu letalnih efekata nano-CeO₂ (uticaja na odrasle jedinke) jedinke hironomida izlagane su CeO₂ nanočesticama od prvog larvalnog stupnja do izletanja. Eksperiment je završen pet dana nakon što je zabeleženo izletanje poslednje odrasle jedinke (nakon 27 dana). Izletanje imaga, broj mužjaka i ženki, pupa i mrtvih larvi beležen je svakog dana. Sve zabeležene jedinke odmah su sakupljane i konzervirane u 95% alkoholu za dalje analize.

Po završetku eksperimenta analizirani su sledeći biomarkeri: preživljavanje/mortalitet, vreme i stopa razvića jedinki. Pored ovih osnovnih parametara, analizirana je i morfološka varijabilnost desnih krila odraslih jedinki (primenom metode geometrijske morfometrije).

U drugom biološkom testu za procenu subletalnih efekata nano-CeO₂ jedinke hironomida izlagane su CeO₂ nanočesticama od prvog do četvrtog larvalnog stupnja. Eksperiment je završen tri dana nakon što su primećene prve larve četvrtog stupnja (nakon 10 dana). Zabeležen je broj preživelih larvi, a sve zabeležene jedinke odmah su sakupljene, isprane detaljno destilovanom vodom i konzervirane u 95% etanolu za dalje analize.

Po završetku eksperimenta analizirani su sledeći biomarkeri: preživljavanje/mortalitet i mokra masa larvi; morfološka varijabilnost struktura usnog aparata larvi (primenom metode geometrijske morfometrije), vidljive promene na strukturama (oštećenja ili deformacije). Radi procene uticaja nano-CeO₂ na molekularnom nivou analizirani su parametri *in vivo* genotoksičnosti (oštećenja DNK somatskih ćelija) i oksidativnog stresa (preko tri biomarkera: koncentracija ukupnih proteina; lipidna peroksidacija procenom količine malonil aldehida i aktivnost superoksid dismutaze). Kako bi se potvrdilo da larve unose nanočestice u organizam, procenjena je količina Ce i CeO₂ u telima larvi putem ICP-MS analize.

Set eksperimenata za ispitivanje toksičnosti CeO₂ nanočestica na podlozi od krupnog peska

Paralelno sa osnovnim setom eksperimenata, izvršen je **set eksperimenata za ispitivanje toksičnosti CeO₂ nanočestica na podlozi od krupnog, grubo granulisanog peska** (čestica veličine u rasponu od 0,4 do 1 mm). Ovaj set eksperimenata izvršen je pre svega radi provere uticaja tipa podloge na rezultate analize morfološke varijabilnosti putem geometrijske morfometrije, ali i uticaja na osnovne životne parametre. Dodatni cilj postavke ovog seta eksperimenata bio je potvrditi opravdanost korišćenja fino granulisanog peska kao podloge u eksperimentima za procenu uticaja nanočestica u odnosu na grubo granulisani pesak.

Dizajn ovog seta eksperimenata bio je identičan prethodnom, sa istim koncentracijama nano-CeO₂ po kilogramu sedimenta, s time što je u ovom setu za supstrat korišćen grubo granulisan pesak.

Larvama je bilo potrebno dva dana da se izlegu iz jaja. Za oba bioeseja po 25 larvi (poreklom iz jednog paketa jaja) prebačeno je u svaku test posudu tri dana nakon izleganja.

Po završetku prvog biološkog testa **za procenu letalnih efekata nano-CeO₂** analizirani su sledeći biomarkeri: preživljavanje/mortalitet, vreme i stopa razvića jedinki.

Po završetku drugog biološkog testa **za procenu subletalnih efekata nano-CeO₂** analizirani su sledeći biomarkeri: preživljavanje/mortalitet i mokra masa larvi; morfološka varijabilnost struktura usnog aparata larvi (primenom metode geometrijske morfometrije), vidljive promene na strukturama (oštećenja ili deformacije). Kako bi se potvrdilo da larve unose nanočestice u organizam, procenjena je količina Ce i CeO₂ u telima larvi putem ICP-MS analize.

Ispitivanje toksičnosti Fe₃O₄ nanočestica

Set eksperimenata za **ispitivanje toksičnosti Fe₃O₄ nanočestica** sastojao se od dva identično struktuirana biološka testa na jedinkama vrste *C. riparius* sa istim koncentracijama nanočestica (sa po šest tretmana). Prvi biološki test postavljen je sa ciljem procene letalnog efekta i ispitivanja uticaja nano-Fe₃O₄ na odrasle jedinke; dok je u drugom bioeseju ispitivan subletalni efekat na larvama kroz analizu serije parametara. U oba eksperimenta svaka nano-Fe₃O₄ koncentracija testirana je u tri replikata (tabela 6). Koncentracije su određene u skladu sa

dosadašnjim *in vitro* ispitivanjima i procenjenim sredinskim koncentracijama oksida gvožđa u nanoformi u EU: procenjuje se da je u slatkovodnim sedimentima prisutno prosečno od 1,6 do 4,4 mg nanočestica oksida gvožđa (među kojima su čestice nano-Fe₃O₄) po 1 kg sedimenta (Wang i Nowack, 2018).

Tabela 6 - Set eksperimenata procenu uticaja Fe₃O₄ nanočestica – prikaz broja tretmana i replikata, sa brojem larvi *C. riarius* iskorišćenim u eksperimentu (koncentracije ispitivanih nanočestica u supstratu predstavljene su u miligramima nano- Fe₃O₄ po kilogramu sedimenta).

Eksperimenti za ispitivanje Fe ₃ O ₄ nanočestica	tretman (koncentracija nano- Fe ₃ O ₄ mg/kg)	broj replikata po tretmanu	broj larvi u replikatu	∑ larvi u tretmanu
biološki test za procenu letalnih efekata nano-Fe ₃ O ₄	1	3	20	60
	5			
	10			
	50			
	100			
	kontrola			
∑ larvi u prvom eksperimentu				360
biološki test za procenu subletalnih efekata nano-Fe ₃ O ₄	1	4	25	75
	5			
	10			
	50			
	100			
	kontrola			
∑ larvi u drugom eksperimentu				450
∑ larvi u setu eksperimenata za procenu uticaja Fe ₃ O ₄ nanočestica				810

Pripremljene test posude (po proceduri opisanoj u prethodnim poglavljima) ostavljene su dva dana da se sve čestice istalože, pre početka eksperimenta. Larvama je bilo potrebno dva dana da se izlegu iz jaja. Prvom bioeseju po 20, a u drugom po 25 larvi (poreklom iz jednog paketa jaja) prebačeno je u svaku test posudu tri dana nakon izleganja.

U prvom biološkom testu za procenu letalnih efekata nano-Fe₃O₄ (uticaja na odrasle jedinke) jedinke hironomida izlagane su Fe₃O₄ nanočesticama od prvog larvalnog stupnja do izletanja. Eksperiment je završen pet dana nakon što je zabeleženo izletanje poslednje odrasle jedinke, tj. nakon 22 dana. Izletanje imaga, broj mužjaka i ženki, pupa i mrtvih larvi beležen je

svakog dana. Sve zabeležene jedinke odmah su sakupljane i konzervirane u 95% alkoholu za dalje analize.

Po završetku eksperimenta analizirani su sledeći parametri: preživljavanje/mortalitet, vreme i stopa razvića jedinki. Pored ovih osnovnih parametara, analizirana je i morfološka varijabilnost desnih krila odraslih jedinki (primenom metode geometrijske morfometrije).

U drugom biološkom testu za procenu subletalnih efekata nano-Fe₃O₄ jedinke hironomida izlagane su Fe₃O₄ nanočesticama od prvog do četvrtog larvalnog stupnja. Eksperiment je završen tri dana nakon što su primećene prve larve četvrtog stupnja, tj. nakon 13 dana. Zabeležen je broj preživelih larvi, a sve zabeležene jedinke odmah su sakupljene, isprane detaljno destilovanom vodom i konzervirane u 95% etanolu za dalje analize.

Po završetku eksperimenta analizirani su sledeći biomarkeri: preživljavanje/mortalitet i mokra masa larvi; morfološka varijabilnost struktura usnog aparata larvi (primenom metode geometrijske morfometrije), vidljive promene na strukturama (oštećenja ili deformacije). Radi procene uticaja nano-Fe₃O₄ na molekularnom nivou analizirani su parametri *in vivo* genotoksičnosti (oštećenja DNK somatskih ćelija) i oksidativnog stresa (preko pet biomarkera: koncentracija ukupnih proteina; lipidna peroksidacija preko procene količine TBARS; količina proteinskih produkata oksidacije - AOPP; aktivnost superoksid dismutaze - SOD i aktivnost katalaze - CAT), pored čega je analizirana i hemolimfa larvi radi procene količine hemoglobina. Kako bi se potvrdilo da larve unose nanočestice u organizam, procenjena je količina Fe i Fe₃O₄ u telima larvi putem ICP-MS analize.

3.3 Analiza biomarkera bioloških testova

3.3.1. Standardni parametri (stopa preživljavanja, mortalitet, vreme razvića, stopa razvića i mokra masa)

Svrha analize standardnih parametara je utvrđivanje uticaja ispitivane materije na biološko stanje populacije, tj. razvoj hironomida, njihovo preživljavanje i rast. Prema smernicama OECD testa 218, a na osnovu rezultata eksperimenata, mereni su sledeći standardni životni parametri populacionog fitnesa (OECD, 2004):

Stopa preživljavanja ili, u slučaju imaga, **stopa eklozije** (eng. the emergence ratio – **ER**, u slučaju odraslih jedinki; eng. survival – **S**, u slučaju larvi), predstavlja preživljavanje jedinki u tretmanima na kraju eksperimenta u procentima, a izračunata je na osnovu formule:

$$ER = ne/na,$$

Pri čemu “ne” predstavlja sumu preživelih jedinki u replikatu na kraju eksperimenta (preživelih larvi ili izletelih odraslih jedinki), a “na” predstavlja broj larvi ubačenih u replikat na početku eksperimenta.

Mortalitet (eng. the mortality - **M**) je obrnuto proporcionalan stopi preživljavanja i izračunat je na osnovu formule:

$$M = 1-ER$$

Vreme razvića (eng. the developmental time - **DT**) predstavlja srednji vremenski raspon od ubacivanja larvi (koji predstavlja nulti dan eksperimenta) do izletanja odraslih jedinki u određenom tretmanu (izražava se u danima), a izračunato je na osnovu formule

$$DT = \sum Nd * d/Nt,$$

Pri čemu “Nd” predstavlja broj izletelih odraslih jedinki po replikatu u danu “d”; “Nt” predstavlja ukupan broj izletelih odraslih jedinki po replikatu na kraju eksperimenta; a “d” je broj dana od početka eksperimenta (tj. od dana ubacivanja larvi u replikate).

Stopa razvića (eng. the developmental rate - **DR**) recipročna je vremenu razvića (jedinica 1/dan) i predstavlja udeo razvića po danu, tj. procenat izletanja jedinki u toku dana, a preračunata je na osnovu formule:

$$DR = \sum Nd * D/Nt, \text{ where}$$

$$D = 1/(d - 0.5)$$

Rezultati DR lakši su i precizniji za interpretaciju toksičnosti od DT jer imaju manju varijansu i blizu su normalne raspodele, te se mogu analizirati snažnijim parametarskim testovima. Ukoliko nisu postojale indikacije za statistički različite osetljivosti pola, rezultati za mušjake i ženke objedinjeni su u statističkim analizama.

Mokra masa larvi predstavlja meru rasta i merena je odmah po završetku eksperimenta. Sve larve iz jednog replikata stavljene su na filter papir da se osuše (tri minuta) i potom je, pomoću analitičke vage, izmerena masa svake larve pojedinačno (u setu eksperimenata za testiranje i odabir adekvatne podloge) ili ukupna masa po replikatu (u setu eksperimenata za ispitivanje toksičnosti nanočestica). U drugom slučaju ukupna masa larvi u jednom replikatu podeljena je brojem izmerenih larvi kako bi se dobila prosečna masa jedne jedinke u replikatu. Rezultati su predstavljeni kao srednja ili prosečna masa jedne jedinke po tretmanu (u miligramima).

3.3.2. Bioakumulacija - procena količine unetih nanočestica (ICP-MS)

Radi utvrđivanja prisustva i procene količine nanočestica u telima larvi hironomida pristupljeno je analizi putem masene spektrometrije sa indukovano spregnutom plazmom (eng. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry - ICP-MS). Ova analiza izvršena je na Departmanu za Prirodne Nauke, Jozef Stefan Instituta i u Internacionalnoj Postdiplomskoj Školi, u Ljubljani, Slovenija, u saradnji sa Dr Janjom Vidmar i Prof Dr Janez Ščančarom.

Masena spektrometrija je široko primenjivana analitička tehnika za detekciju elemenata u tragovima, na osnovu procene njihove mase i naelektrisanja (De Hoffmann, 2000). U principu maseni spektrometar se sastoji iz jonskog izvora (koji služi za pobuđivanje uzorka i stvaranje jona gasovite faze); jednog ili više masenih separatora (koji razdvajaju jone na osnovu odnosa mase i naelektrisanja, m/z) i detektora (De Hoffmann, 2000). Prednost ICP masene spektrometrije je u brzini analize, mogućnosti detektovanja više elemenata i njihovih izotopa istovremeno i visokoj osetljivosti za veliki broj elemenata (od ppt do ppm) (Thomas, 2013). Generalni princip ICP-MS tehnike je sledeći: uzorak u tečnom stanju se unosi u komoru za raspršivanje; pobuđuje se u plazmi argona, usled čega se emituje zračenje karakteristično za elemente u uzorku; emitovano zračenje se preko interfejsa usmerava sočivima do separatora; elementi plazme mogu da stvore smetnje, tj. interferencije (na primer u vidu poliatomskih molekulskih ili dvostruko naelektrisanih jona), pa separator razdvaja jone na osnovu m/z odnosa i uklanja interferencije iz analitičkog signala; joni

se potom prevode u električni signal na osnovu koga se elementi detektuju u spektrometru (Thomas, 2013). Konkretna procedura ICP-MS analize uzoraka u ovom radu opisana je u daljem tekstu

Procedura digestije uzorka larvi izlaganih TiO₂ nanočesticama

Pre digestije oko 0,1 g mokre mase uzorka larvi hironomida (iz svake koncentracije) konzerviranih u etanolu ostavljeno je da se osuši tokom jedne noći na 60°C u pećnici (Binder GmbH, Tuttlingen, Nemačka) radi dobijanja konstantne mase uzorka. Ovaj uzorak je potom pripremljen za dalje ICP-MS analize dvostepenom mikrotalasnom kiselinskom digestijom u peći “UltraWAVE” (peć sa jednom reakcionom komorom, proizvođača Milestone, Shelton, CT, USA). 0,5 ml hidrogen peroksida (30% H₂O₂, suprapure), 1 ml azotne kiseline (65% HNO₃, suprapure), 1 ml fluorovodonične kiseline (40% HF, suprapure) i 0,5 ml hlorovodonične kiseline (30% HCl, suprapure) dodato je u sud sa uzorcima larvi. Uzorci su potom podvrgnuti mikrotalasnoj digestiji u zatvorenom sudu na 100 bara. U prvom stepenu digestije sproveden je sledeći program: zagrevanje 20 min do 200°C, održavanje 30 min na 200°C, potom hlađenje do sobne temperature. 3 ml borne kiseline (4% vodeni rastvor H₃BO₃, suprapure) je potom dodato u sud kako bi se razložili fluoridi i kompleksovala zaostala HF kiselina. U drugom stepenu digestije sproveden je sledeći program: zagrevanje 15 minuta do 200°C, održavanje 10 minuta na 200°C, potom hlađenje do sobne temperature. Nakon digestije dobijeni su bistri rastvori. Digestovani rastvori kvantitativno su preneseni u posude od 30 ml i prelivevi Milli-Q vodom do konačne zapremine od 15 ml. Ista procedura, ali bez uzorka je sprovedena u kontrolnoj posudi.

Za pripremu svih rastvora korišćena je Milli-Q voda (provodljivosti 18,2 MΩ cm; dobavljača “Direct-Q 5 Ultrapure water system” i proizvođača Merck Millipore, Milford, MA, USA). HNO₃, HCl, HF, H₂O₂ i H₃BO₃ dobavljeni su od “Merck Millipore”, proizvođača Milford, MA, USA.

Determinacija Ti koncentracije putem ICP-MS-a

Pre kvantifikacije Ti putem ICP-MS analize nasuprot spoljnoj kalibracionoj krivi koristeći itrijum (⁸⁹Y) kao interni standard⁸, digestovani uzorci su razblaženi pet puta Mili-Q vodom. Standardni rastvori Ti za kalibraciju (u koncentraciji od 0 do 500 mg/l Ti) su dobijeni

⁸ interni standard dodaje se u rastvore i pokriva ceo raspon masa i treba da ima sličan jonizacioni potencijal kao ispitivani uzorak, a da ne izaziva dodatne smetnje smetnje analitičkom signalu. Najčešće se koriste ⁹Be, ⁴⁵Sc, ⁸⁹Y, ¹⁰³Rh, ¹¹⁵In ili ²⁰⁹Bi.

razblaživanjem osnovnih Ti rastvora (eng. stock solutions), proizvođača “Merck”, Darmstadt, Nemačka (1000 μ g Ti/ml razblaženo je sa 2% - 3% HNO₃).

Najzastupljeniji Ti izotop sa m/z 48 u matriksu digestovanih uzoraka trpi poliatomske interferencije koje sadrže S, Si i P (npr. ³²S¹⁶O⁺, ¹²C⁴⁺, ²⁹Si¹⁹F⁺, ³⁰Si¹⁸O⁺, ³¹P¹⁷O⁺) i izobarne interferencije sa ⁴⁸Ca. Stoga je ⁴⁸Ti izotop meren u MS/MS režimu masenog pomaka sa reakcionim gasovima O₂ i H₂ korišćenjem trostrukog kvadrupola (separatora) ICP-MS (ICPQQQ), pri čemu je prvi i drugi kvadrupol postavljen na m/z 48 i 64, redom. Korišćen je “Agilent 8800 ICP-QQQ” ICP-MS uređaj (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) koji je optimizovan za roubsnu plazmu i odgovarajuću osetljivost.

Za proveru tačnosti analitičke metode (procedure digestije i procedure ICP-MS determinacije Ti) korišćen je standardni referentni materijal – uzorak tkiva ostrige (SRM 1566b, NIST, Gaithersburg, Maryland, ZDA): 100 mg ovog standardnog uzorka koji sadrži 12,24 \pm 0,39 mg/kg Ti digestovano je na identičan način kao i eksperimentalni uzorci. Putem iste metodologije determinisano je da je koncentracija Ti u referentnom SRM 1566b uzorku 12,25 \pm 0,44 mg/kg (N=3). Povrh toga, u 100 mg standardnog SRM 1566b uzorka dodat je 1 mg TiO₂ nanočestica i ponovljen je postupak. Detektovano je 94,7 \pm 1,1% (N=3) supstance u ovom uorku, čime je potvrđena visoka preciznost metode.

Uneta količina E171 TiO₂ nanočestica od strane tretiranih larvi izračunata je na osnovu procenjene količine Ti u telima larvi pomoću naredne jednačine:

Konc. TiO₂ = (Ti konc. u uzorku – pozadinska konc. Ti u kontroli) * maseni odnos TiO₂/Ti.

Pri čemu je maseni odnos TiO₂/Ti=1.6684.

Procedura digestije uzorka larvi izlaganih CeO₂ nanočesticama

Pre digestije oko 0,1 g mokre mase uzorka larvi hironomida (iz svake koncentracije) konzerviranih u etanolu ostavljeno je da se osuši tokom jedne noći na 75°C u pećnici (Binder GmbH, Tuttlingen, Nemačka) radi dobijanja konstantne mase uzorka. Ovaj uzorak je potom pripremljen za dalje ICP-MS analize mikrotalasnom kiselinskom digestijom u peći (“CEM MARS 6 Microwave Digestion System“, Matthews). Oko 0,01 g ovako osušenog uzorka dodato je u mikrotalasni sud, u koji je potom dodato 1,0 ml hidrogen peroksida (30% H₂O₂, suprapure, Merck Millipore), 3 ml azotne kiseline (67% - 69% HNO₃, suprapure, Carlo Erba). Uzorci su potom podvrgnuti mikrotalasnoj digestiji sprovođenjem sledećeg programa: zagrevanje 30 min do 200°C,

održavanje 60 min na 200°C, potom hlađenje do sobne temperature. Nakon digestije dobijeni su bistri rastvori. Digestovani rastvori kvantitativno su preneseni u polietilenske posude od 30 ml i rastvoreni Milli-Q vodom do konačne zapremine od 30 ml. Ista procedura, ali bez uzorka je sprovedena u kontrolnoj posudi. Za pripremu svih rastvora korišćena je Milli-Q voda (provodljivosti 18.2 MΩ cm; dobavljača “Direct-Q 5 Ultrapure water system” i proizvođača “Merck Millipore”, Milford, MA, USA). HNO₃, HCl, HF, H₂O₂ i H₃BO₃ dobavljeni su od “Merck Millipore”, proizvođača Milford, MA, USA.

Determinacija Ce koncentracije putem ICP-MS-a

Kvantifikacija Ce putem ICP-MS analize je izvedena nasuprot spoljnoj kalibracionoj krivi koristeći rodijum (¹⁰³Rh) kao interni standard. Merenjem Ce standarda za kalibraciju (u koncentraciji od 0,1 do 1000 µg/l Ce) sa onlajn internom standardizacijom (25 µg/l rastvor rodijuma). Matrično-podudarajući standardni kalibracioni rastvori su dobijeni razblaživanjem osnovnih Ce rastvora, proizvođača “Merck”, Darmstadt, Nemačka (1000 µg Ce/ml razblaženo je sa 5% HNO₃).

Za analizu je korišćen “Agilent 7900” ICP-MS uređaj (Agilent Technologies, Tokyo, Japan), opremljen autosemplerom (SPS4, Agilent). Optimizacija instrumentalnih parametara (suiranih u tabeli 7) je vršena na dnevnoj bazi kako bi se postigla zadovoljavajuća osetljivost i smanjio nivo oksida i dvostruko naelektrisanih jona u sistemu.

Tabela 7 - ICP-MS operativni parametri za determinaciju Ce koncentracija (“Agilent 7900” ICP-MS uređaj, Agilent Technologies, Tokyo, Japan).

Parametar	Tip/Vrednost
Unašenje uzorka / eng. Sample introduction	
Raspršivač / Nebulizer	Miramist
Komora za raspršivanje/ Spray chamber	Scott
Konus za pregled i uzorkovanje / Skimmer and sampler cone	Ni
Parametri plazme / eng. Plasma parameters	
Prah / Forward power	1480 W
Protog gasa plazme / Plasma gas flow	15.0 L min ⁻¹
Protok gasa u nosaču / Carrier gas flow	1.05 L min ⁻¹
Dubina uzorka / Sample depth	7.0 mm
Protok gasa u rastvaraču / Dilution gas flow	0.1 L min ⁻¹
Parametri ćelije / eng. Cell parameters	
Protok gasa / Gas flow	/
Oktopolne smetnje / Octopole bias	-10.0 V
Diskriminacija energije / Energy discrimination	5.0 V
Parametri dobavljanja podataka / eng. Data acquisition parameters	
Ispitivani izotopi / Isotopes monitored	¹⁴⁰ Ce
Izotopi internog standarda / Isotopes of internal standards	¹⁰³ Rh

Za proveru tačnosti analitičke metode (procedure digestije i procedure ICP-MS determinacije Ce) korišćene su standardne CeO₂ nanočestice (20 wt% suspenzija nano-CeO₂, US Research Nanomaterials); standardni referentni materijal – uzorak tkiva ostrige, SRM 2976 (US National Institute of Standards and Technology) koji sadrži 0.109±0.008 mg/kg Ce; kao i standardni referentni material, SRM 2976, u koji je dodata suspenzija CeO₂ nanočestica. Ovi kontrolni uzorci digestovani su na identičan način kao i eksperimentalni uzorci. Suspenzije CeO₂ nanočestica su prvo mešane u vorteksu (10 s) i ultrasoničnom kupatilu (20 min) i rastvorene kako bi se dobile suspenzije sa finalnom koncentracijom od 10 µg/l. Potom je 100 µl ove suspenzije nanočestica prebačeno u mikrotalasne posude i podvrgnuto digestiji. 121±4% (n=3) supstance je detektovano, čime je potvrđena visoka preciznost metode.

Putem iste metodologije determinisano je da je koncentracija Ce u 0,1±0,005 g referentnog SRM 2976 uzorka 0,097±0,013 mg/l (n=3). Povrh toga, u 0,1 g standardnog SRM 2976 uzorka dodato je 100 µL rastvora 10 µg/l CeO₂ nanočestica i ponovljen je postupak. 93±1% (n=3) supstance je detektovano, čime je dodatno potvrđena visoka preciznost metode.

Uneta količina CeO₂ nanočestica od strane tretiranih larvi izračunata je na osnovu procenjene količine Ce u telima larvi pomoću naredne jednačine:

Konc. CeO₂ = (Ce konc. u uzorku – pozadinska koncentracija Ce u kontroli) * maseni odnos CeO₂/Ce. Pri čemu je maseni odnos CeO₂/Ce=1,2286

3.3.3. Tradicionalna morfometrija

U tradicionalnoj morfometriji morfološke strukture se opisuju dužinskim rastojanjima medju tačkama koje se na strukturama definišu, kao što je navedeno u uvodnom poglavlju. Ovime se dobijaju podaci o dimenzijama analiziranih struktura (o njihovoj širini, dužini, visini). Nakon završetka eksperimenata, za potrebe analiza metodom tradicionalne morfometrije, larve hironomida su konzervirane u alkoholu (95% etanol), a tradicionalna morfometrija u ovom radu primenjena je u dva slučajaja:

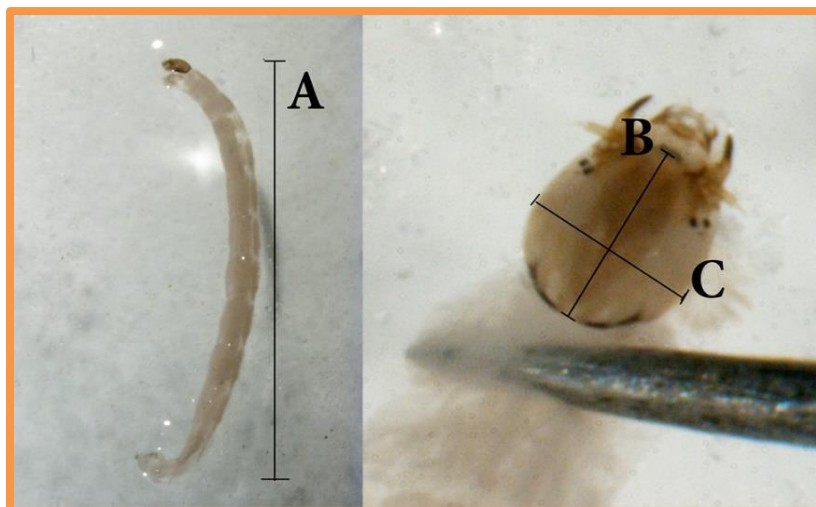
- na telima larvi iz seta eksperimenata za testiranje i odabir adekvatne podloge,
- na mentumima larvi iz seta eksperimenata za procenu uticaja TiO₂.

Sve dimenzije merene su pomoću javno dostupnog „ImageJ“ Java softvera za obradu slika, verzije 1.51 (Rasband, 2011; Schneider i sar., 2012).

3.3.3.1 Merenje dimenzija larvi

Svrha analize dimenzija larvi je utvrđivanje pogodnosti ispitivanog tipa podloge na rast i razvoj hironomida. Larve su analizirane pomoću Nikon SMZ 745T stereomikroskopa sa objektivom C-W 10xB/22 i 1x okularnim uvećanjem i fotografisane pomoću Leica DFC320 Digital Camera system kamere. Tela larvi fotografisana su u lateralnom položaju na uvećanju 7,11x, dok su glave larvi fotografisane u dorzalnom položaju na uvećanju 25x. Fotografije su potom prebačene u ImageJ softver u kome su izvršena merenja na svakoj jedinki pojedinačno.

Definisana su i merena ukupno tri rastojanja koje opisuju dimenzije tela i glave larvi hironomida (slika 18):



Slika 18 - Tradicionalna morfometrija- definisana rastojanja koja opisuju dimenzije tela i glave larvi *C. tentans*: A - dužina tela, B - dužina glave, C - širina glave (larva na uvećanju 7,11x, glava na uvećanju 25x, Nikon SMZ 745T, Leica DFC320 Digital Camera

1. Dužina tela (rastojanje od vrha glave do kraja zadnjeg telesnog segmenta),
2. Dužina glave (rastojanje od središnje tačke između mandibula do epikranijalnog ureza),
3. Širina glave (rastojanje između najdaljih lateralnih tačaka na glavenoj čauri).

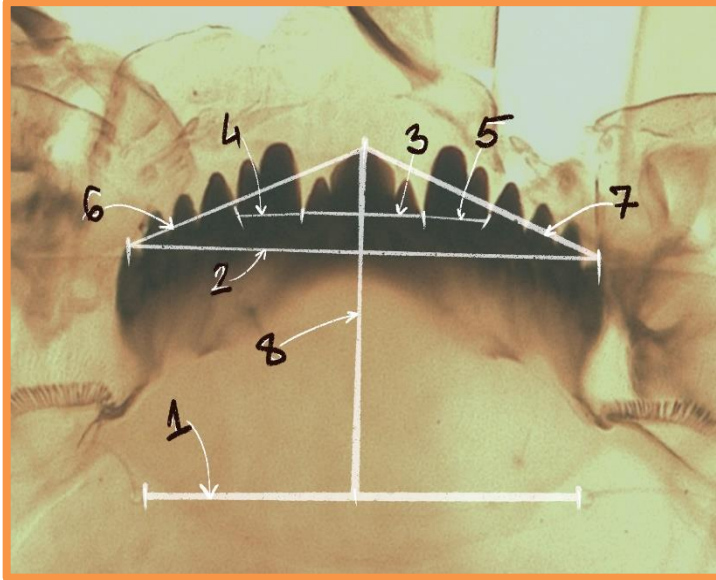
3.3.3.2 Merenje dimenzija mentuma

Svrha analize dimenzija mentuma je, pre svega, procena uticaja TiO₂ nanočestica na morfometriju ove strukture, ali i upoređivanje lakoće izvedbe i reprezentativnosti rezultata dveju primenjenih morfometrijskih tehnika (geometrijske i tradicionalne).

Mikroskopski preparati mentuma analizirani su pomoću Leica MZ16A stereomikroskopa sa objektivom 10x/21B i 10x okularnim uvećanjem i fotografisani pomoću Leica DFC320 Digital Camera system kamere na ukupnom uvećanju 100x (priprema preparata detaljnije će biti opisana

u poglavlju “Geometrijska morfometrija”). Fotografije su potom prebačene u ImageJ softver u kome su izvršena merenja na svakoj jedinki pojedinačno.

Definisano je i mereno ukupno osam rastojanja koja opisuju dimenzije mentuma larvi, a koje inače predstavljaju taksonomski karakter za vrstu *C. tentans* (slika 19):



Slika 19 - Tradicionalna morfometrija- definisana rastojanja koja opisuju dimenzije mentuma larvi *C. tentans* (mentum na uvećanju 100x, Leica MZ16A, Leica DFC320 Digital Camera system)

1. rastojanje između *Setae* submenti;
2. rastojanje između vrhova poslednjih lateralnih zuba;
3. širina baze centralnog, tj. medijalnog zuba;
4. širina baze unutrašnjeg, tj. prvog lateralnog zuba (levo);
5. širina baze unutrašnjeg, tj. prvog lateralnog zuba (desno);
6. rastojanje između vrha centralnog i vrha poslednjeg lateralnog zuba (levo);

7. rastojanje između vrha centralnog i vrha poslednjeg lateralnog zuba (desno);

8. visina mentuma (rastojanje između vrha centralnog zuba i linije koja spaja *Setae* submenti);

3.3.4. Geometrijska morfometrija

U geometrijskoj morfometriji analizirani objekti se definišu matematički preko konfiguracije tačno definisanih specifičnih tačaka koje opisuju njihovu geometriju, potom se statističkim metodama analizira njihov oblik i metodama direktonog grafičkog predstavljanja se vizuelizuju njegove promene (Rohlf, 1990; Ivanović i Kalezić, 2009).

Pri analizama putem geometrijske morfometrije neophodno je uzeti u obzir simetriju objekta istraživanja, koja može biti poklapajuća (eng. *matching symmetry*), u slučaju kada postoji leva i desna kopija objekta i osa simetrije prolazi između njih (leva i desna mandibula ili levo i desno krilo), ili može biti simetrija objekta (eng. *object symmetry*), kada postoje leva i desna strana

objekta i osa simetrije prolazi kroz centar samog bilateralno simetričnog objekta (leva i desna strana mentuma) (Mardia i sar., 2005). Uz to, ukoliko postoji polni dimorfizam, razlike u analiziranim morfološkim strukturama između polova, potrebno je analizirati strukture kod mužjaka i ženki odvojeno, što je u ovom slučaju i urađeno.

3.3.4.1. Priprema materijala za analize

Nakon završetka eksperimenta, za potrebe analiza metodom geometrijske morfometrije, larve i odrasle jedinke hironomida su konzervirane u alkoholu (95% etanol). Pomoću metode geometrijske morfometrije analizirane su telesne strukture larvi (mentumi i desne mandibule) i imaga mužjaka i ženki (desna krila) (tabela 8)

Tabela 8 – Broj uslikanih preparata (fotomikrografija) odabranih struktura za analize metodom geometrijske morfometrije, za svaki eksperiment i broj fotomikrografija iskorišćenih u analizi za svaku od koncentracija.

Eksperiment (testirane nanočestice)	Tretman (Količina nanočestica u mg/kg)	Larve		Odrasle jedinke	
		Mandibule (desne)	Mentumi	Krila mužjaka (desna)	Krila ženki (desna)
nano-TiO ₂ sa izletanjem	125	/	/	10	10
	250	/	/	10	12
	500	/	/	10	12
	1000	/	/	10	11
	2000	/	/	10	12
	4000	/	/	10	12
	Kontrola	/	/	10	11
Ukupno u analizi (od ukupno fotografisanih)				70 (od 70)	80 (od 83)
nano-TiO ₂	2.5	38	38	/	/
	25	40	41	/	/
	250	37	38	/	/
	Kontrola	43	44	/	/
Ukupno u analizi (od ukupno fotografisanih)		158 (od 160)	161 (od 164)		
nano-CeO ₂ sitan pesak	2.5	54	49	15	12
	25	56	55	15	15
	250	39	37	15	15
	2500	55	44	15	13
	Kontrola	54	47	15	15
Ukupno u analizi (od ukupno fotografisanih)		258 (od 260)	232 (od 261)	75 (od 75)	70 (od 75)
nano-CeO ₂ krupan pesak	2.5	55	52	/	/
	25	51	49	/	/
	250	55	53	/	//
	2500	56	52	/	/
	Kontrola	49	52	/	/

Ukupno u analizi (od ukupno fotografisanih)	266 (od 276)	258 (od 278)			
nano-Fe₃O₄	1	30	31	12	12
	5	34	22	11	12
	10	42	32	12	11
	50	24	32	11	12
	100	35	42	12	12
	Kontrola	26	27	12	11
Ukupno u analizi (od ukupno fotografisanih)	191 (od 198)	186 (od 198)	70(od 72)	70 (od 72)	

Larve – mandibule i mentum

Glave larvi su uklonjene sa tela i kuvane u 15% kalijum-hidroksidu (KOH) 15 minuta na oko 100 °C. Kuvanje u ovako jakoj bazi dovodi do omekšavanja struktura usnog aparata i smanjuje mogućnost pucanja i oštećivanja struktura prilikom disekovanja i kasnije pripreme mikroskopskih preparata.

Napravljeni su polu-trajni mikroskopski preparati svake analizirane strukture fiksiranjem pomoću vodotopivog Berlezovog medijuma (200 g hloral hidrata, 20 g glicerola, 30 g gum arabike i 50 g destilovane vode mešani su na magnetnoj mešalici do 24 h da bi se dobio ovaj medijum). Obe mandibule su odstranjene pomoću entomoloških igli i potom fiksirane u bočnom položaju. Ostatak glave sa mentumom je fiksiran na zasebnim mikroskopskim pločicama u ventralnom položaju, u kome su zubi mentuma najvidljiviji, prekriven dodatnim slojem Berlezovog medijuma i pokriven pokrovnim staklom. Preparati su ostavljeni da se osuše 20 dana pre fotografisanja.

Mikroskopski preparati mandibula i mentuma su potom analizirani pomoću Leica MZ16A stereomikroskopa sa objektivom 10x/21B i 10x i 20x okularnim uvećanjem i fotografisani pomoću Leica DFC320 Digital Camera system kamere na ukupnom uvećanju 200x za mandibule i 100x za mentume. Broj fotomikrografija usnog aparata za svaki eksperiment prikazan je u tabeli 8.

Vizuelnom analizom morfoloških struktura zabeležene su i izbačene sve jedinke sa vidljivim deformacijama i ekstremnim oštećenjem struktura, pre upotrebe metode geometrijske morfometrije. Fotomikrografije reprezentativnih deformiteta i oštećenja izdvojene su u prilogu.

Odrasle jedinke – krila

Leva i desna krila odraslih mužjaka i ženki uklonjena su pomoću entomoloških pinceta. Po 10 do 15 odraslih jedinki proizvoljno je izabrano iz svakog tretmana.

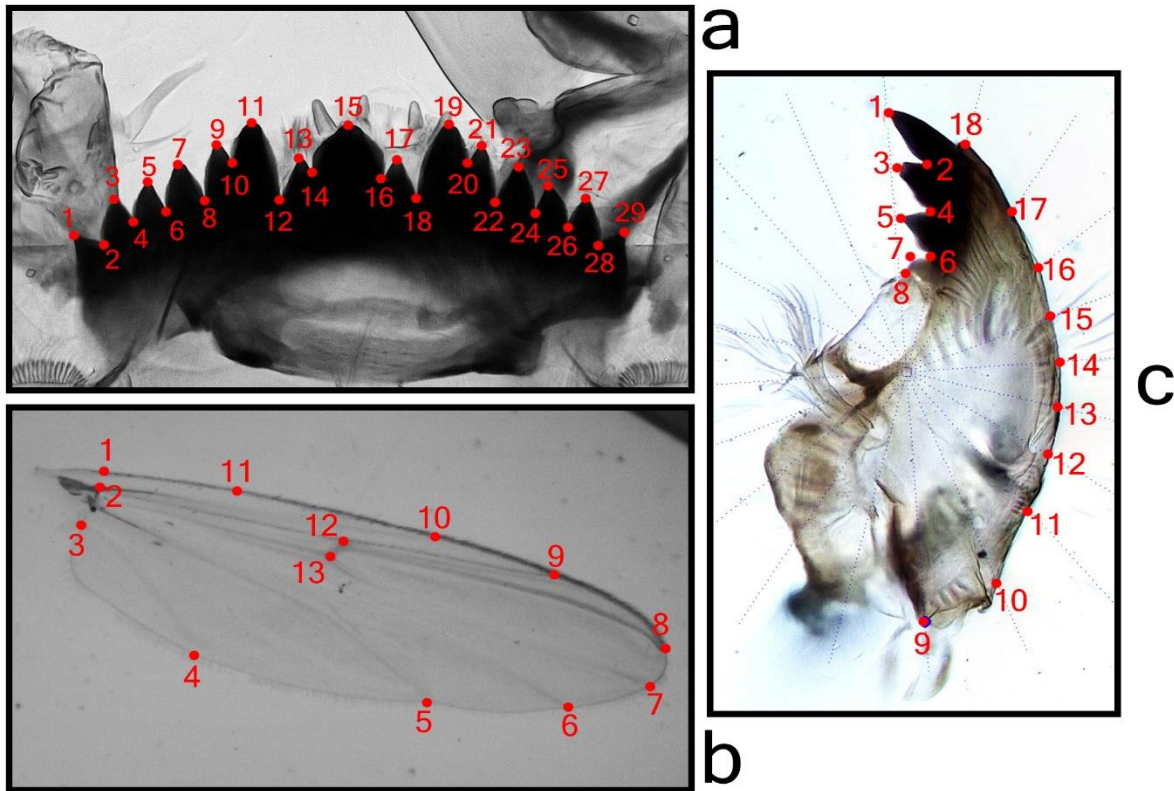
Napravljeni su polu-trajni mikroskopski preparati krila fiksiranjem pomoću vodotopivog Berlezovog medijuma. Krila su fiksirana tako da dorzalna strana sa nervaturom bude vidljiva, ostavljena 10 dana da se osuše, potom su prekrivena dodatnim slojem Berlezovog medijuma i pokrivena pokrovnim staklom. Preparati su ostavljeni da se osuše još 10 dana pre fotografisanja.

Mikroskopski preparati krila su potom analizirani pomoću Nikon SMZ 745T stereomikroskopa sa objektivom C-W 10xB/22 i 1x okularnim uvećanjem i fotografisani pomoću Leica DFC320 Digital Camera system kamere na ukupnom uvećanju 10x. Broj fotomikrografija krila za svaki eksperiment prikazan je u tabeli 8.

3.3.4.2 Digitalizacija specifičnih tačaka

U geometrijskoj morfometriji specifične tačke predstavljaju tačno definisane anatomske tačke (Zelditch i sar., 2012) koje mogu jasno da se prepoznaju na svakom analiziranom objektu u okviru uzorka. Za definisanje specifičnih tačaka neophodno je dobro poznavanje objekta istraživanja, kao i definisanje precizne hipoteze i razloga ispitivanja promena u obliku objekata. Tačke treba da budu rasporodjene tako da što detaljnije opisuju analizirani objekat, kako bi se detektovale moguće promene u svim analiziranim delovima (Ivanović i Kalezić, 2009).

Digitalizacija specifičnih tačaka i dalje analize radjene su po protokolu koji je detaljno opisan u radu Viscosi i Cardini, 2011., kao i u udžbeniku Ivanović i Kalezić, 2009. Prvo je kreiran *.TPS fajl od mikrografija u programu TPSUtil, verzije 1.4, uz pomoć opcije “build TPS file from images” (Rohlf, 2009). Broj fotomikrografija iskorišćenih u analizi za svaki eksperiment prikazan je u tabeli 8. Specifične tačke digitalizovane su pomoću MakeFun6, verzije 6th Beta (Sheets, 2003) i tpsDig2, verzije 2.14 (Rohlf, 2009) softvera (slika 20).



Slika 20 – Konfiguracija specifičnih tačaka (eng. landmarks) koje opisuju analizirane objekte: a – mentum (uvećan 100x), b - desno krilo ženke (uvećano 10x), c - desna mandibula (uvećana 200x). Fotomikrografije: Leica MZ16A stereomikroskop i Leica DFC320 Digital Camera system kamera.

Specifične tačke opisuju sledeće morfološke strukture u okviru analiziranih objekata (nomenklatura preuzeta iz rada McAlpine, 1981):

Mentum (objekat sa bilateralnom simetrijom) je opisan sa 29 specifičnih tačaka:

- 1 do 8 - četiri spoljašnja lateralna zuba na levoj polovini mentuma,
- 8 do 12 - dva unutrašnja lateralna zuba na levoj polovini mentuma,
- 12 do 18 – centralni ili medijalni tročlani zub,
- 18 do 22 - dva unutrašnja lateralna zuba na desnoj polovini mentuma,
- 22 do 29 – četiri spoljašnja lateralna zuba na desnoj polovini mentuma.

Desna mandibula (objekat sa poklapajućom simetrijom) je opisana sa 18 specifičnih tačaka:

- 1 do 2 – apikalni ili vršni zub,
- 2 do 8 – tri unutrašnja zuba,
- 9 – vrh zgloba mandibule,

- 10 do 18 – obod mandibule (distalno).

Desno krilo mužjaka i ženki (objekat sa poklapajućom simetrijom) je opisano sa 13 specifičnih tačaka:

- 1 i 2 – humeralni poprečni nerv,
- 3 i 4 – analni nerv,
- 5 i 6 – distalni krajevi kubitalnih nerava,
- 7 – distalni kraj medijalnog nerva,
- 8 i 9 – distalni krajevi radijalnih nerava,
- 10 – distalni kraj subkostalnog nerva,
- 11 – centralna tačka kostalnog nerva (projekcija tačke 4 na kostalni nerv),
- 12 i 13 – radio-medijalni poprečni nerv.

3.3.4.3 Procena variranja oblika i veličine

Analize metodom geometrijske morfometrije dalje su vršene prema uputstvu Klingenbergu u programu MorphoJ, verzije 1.07a, koji kombinuje nekoliko pristupa i metoda za analizu oblika objekata definisanih pomoću specifičnih tačaka (Klingenberg, 2011).

Variranje oblika

U geometrijskoj morfometriji oblik je definisan kao „sva informacija o geometriji objekta koja ostane nakon što se otklone efekti položaja, veličine i rotacije“ (Kendall, 1977). Kako bi se dobila informacija samo o obliku analiziranih objekata, promenjena je Generalizovana Prokrustova Analiza, drugačije nazivana Prokrustova superimpozicija (eng. General Procrustes Analysis) pomoću „Procrustes fit“ opcije u MorphoJ programu. Skaliranjem, translacijom i rotacijom konfiguracije specifičnih tačaka odstranjene su sve razlike u položaju, veličini i rotaciji objekata a zadržane su sve razlike u njihovom obliku i dobijene su nove varijable oblika u vidu koordinati tačaka koje opisuju analiziranu strukturu. U slučaju krila i mandibula ovime su dobijene Prokrustove koordinate koje će se koristiti u daljim analizama. U slučaju mentuma, koji je bilateralno simetričan objekat, dobijene su simetrične i asimetrične komponente. Simetrična komponenta predstavlja usrednjenu vrednost leve i desne strane u okviru jedinice i ona se koristi u daljim analizama kao mera oblika (detaljni opis problematike analize objekata sa simetrijom i sugestije za njihovu analizu mogu se naći u radovima Mardia i sar., 2000; Klingenberg i sar., 2002

i Klingenberg, 2015). Suma kvadratnih rastojanja od srednjih vrednosti konstelacije tačaka (Prokrustovih koordinata) je Prokrustova distanca i ona je glavna mera koja opisuje razlike među analiziranim strukturama u metodi geometrijske morfometrije (Ivanović i Kalezić, 2009).

Variranje veličine

Prilikom opisivanja struktura putem specifičnih tačaka, iako se otklone efekti položaja, veličine i rotacije, zadržava se informacija o njihovoj geometrijskoj veličini u samoj veličini centroida (eng. centroid size). Veličina centroida predstavlja kvadratni koren iz sume kvadrata rastojanja svake specifične tačke od centra konstelacije svih specifičnih tačaka u objektu (Zeldich i sar., 2012). Ova veličina je dalje korišćena kao mera veličine analiziranih objekata koji su opisani istim brojem i rasporedom specifičnih tačaka (kao što je medjusobno upoređivanje veličine krila u različitim tretmanima u jednom eksperimentu).

3.3.4.4 Metode obrade podataka i statističke analize

Oblik analiziranog objekta je odlika čitave konfiguracije specifičnih tačaka koje predstavljaju varijable oblika (prokrustovih koordinata ili simetričnih i asimetričnih komponenti). Podaci analize konfiguracije specifičnih tačaka su multivarijantni, tj. višedimenzionalni (Zeldich i sar., 2012), te je od njih generisana matrica kovarijansi, opcijom „Generate Covariance matrix“ u MorphoJ softveru radi daljih analiza. Potom su definisani tretmani kao faktori (grupe) koji utiču na varijabilnost i izvršeno je dodeljivanje pripadnosti jedinki tim grupama (eng. classifiers).

Kako bi se utvrdilo postojanje statistički značajnih razlika u varijabilnosti veličine i oblika između definisanih grupa, set podataka je eksportovan iz MorphoJ softvera i analiziran u softveru Statistica, verzije 7.0 (Stat Soft, 2004). Postojanje značajne varijabilnosti u veličini centroida analiziranih objekata između tretmana testirano je analizom varijanse (ANOVA), nakon čega je izvršen post-hoc test za medjusobno poredjenje grupa. Postojanje značajne varijabilnosti u obliku analiziranih objekata između tretmana testirano je multivarijantnom analizom varijanse (MANOVA) na varijablablama oblika (u slučaju krila i mandibula na Prokrustovim koordinatama; u slučaju mentuma na simetričnim komponentama).

Izvršena je provera prisustva alometrije primenom multivarijantne regresije varijabli oblika na varijable veličine centroida (opcija „Regression“ u MorphoJ softveru). Na osnovu ove analize je utvrđeno koliko varijabilnosti u obliku je uslovljeno veličinom objekata i odvojene su

alometrijske od nealometrijskih komponenti. U slučaju utvrđivanja statistički značajne alometrije, dalje analize su izvršene na regresionim rezidualima, tj. nealometrijskoj komponenti varijabilnosti oblika.

3.3.4.5 Metode eksploracije i vizuelizacije podataka

Jedna od velikih prednosti metode geometrijske morfometrije jeste mogućnost da se specifične promene u obliku vizuelizuju i grafički predstave. Ovakvo predstavljanje podataka omogućava dalju eksploraciju obrazaca variranja, kao i uočavanje specifičnih promena na ispitivanim morfološkim strukturama. Kao rezultati se dobijaju tačkasti dijagrami u „morfološkom prostoru“ koji oslikavaju obrasce varijacija u uzorku i prateći grafici dimenzija oblika koje najviše variraju unutar jedinki i između testiranih grupa (tretmana).

„Morfološki prostor“ (eng. morphospace) predstavlja apstraktni prostor definisan sa dve ili više promenljivih (svaka promenljiva opisuje neku od morfoloških osobina) u kome je svaka analizirana jedinka predstavljena tačkom, tj. aritmetičkom sredinom konstelacije specifičnih tačaka.

Kao prva, preliminarna analiza varijabilnosti, izvršena je analiza glavnih komponenti (eng. Principal Component Analysis, PCA), kako bi se stekao utisak o ukupnoj varijabilnosti u uzorku i analizirala varijabilnost između grupa jedinki. PCA analizom može se grafički prikazati položaj jedinki u morfološkom prostoru u odnosu na „glavne komponente“ (en. Principal Components - PC), ose koje nose informaciju o varijabilnosti u uzorku. Položaj jedinki u ovom prostoru određen je „sopstvenim vrednostima“ (eng. PC scores) i sopstvenim vektorima (eng. eigenvalues), koje objašnjavaju koliko procenata varijabilnosti određena osa, tj. komponenta nosi. Prokrustova distanca opisuje razlike među konstelacijama tačaka (grupama) u morfološkom prostoru opisanom PC osama.

Kao druga analiza varijabilnosti izvršena je kanonijska diskriminantna analiza (eng. Canonical Variate Analysis - CVA), sa integrisanim validacionim testom, kako bi se izdvojile osobine koje najviše doprinose razlikovanju unapred definisanih grupa i optimizovale razlike između njih. CVA analizom može se grafički prikazati položaj jedinki u morfološkom prostoru u odnosu na „kanonijske varijable“ (en. Canonical Variables - CV), ose koje nose informaciju o

varijabilnosti u uzorku. Položaj jedinki u ovom prostoru određen je „vrednostima kanonijskih varijabli“ (eng. CV scores) i sopstvenim vektorima (eng. eigenvalues), koje takodje objašnjavaju koliko procenata varijabilnosti određena osa nosi. Uz to, dobijene su i vrednosti Mahalanobisovih distanci, distanci jedinki u odnosu na srednje vrednosti uzorka, na osnovu kojih je procenjena efikasnost kanonijskih varijabli u diskriminaciji grupa. Mahalanobisove distance, dakle, ukazuju na različitost između unapred definisanih grupa, pri čemu veća distanca znači i veću različitost grupa.

Obrasci promene oblika struktura, duž PCA i CVA osa, vizuelizovani su pomoću nekoliko grafika koji se mogu kreirati u samom morphoJ i tpsDig2 softveru: „transformacionih mrežica“ (eng. transformation grid); „žičanih okvira“ (eng. wireframe) i „kontura“ (eng. outline). Ovi grafici pokazuju na kojim delovima struktura su promene nastale kao i to koji je pravac i intenzitet tih promena. Na „transformation grid“ graficima struktura je predstavljena specifičnim tačkama pozicioniranim na beskonačno tankoj savitljivoj ploči sa mrežom, a izmene oblika, njihov pravac i intenzitet prikazane su deformacijama te ploče. „wireframe“ i „outline“ grafici prikazuju razlike između prosečnog oblika strukture (eng. starting shape) i izmenjenog oblika strukture (eng. target shape) koji je rezultat deformacija jedinki koje su pozicionirane u određenom delu morfološkog prostora. Faktorom skaliranja (eng. scale factor) promene prikazane na njima se skaliraju, tj. uveličavaju kako bi se bolje vizuelizovale i uočile (mogu se interpretirati kao Prokrustove distance u slučaju PCA analize; ili Mahalanobisove distance u slučaju CVA analize) (Klingenberg i Monteiro, 2005).

Iz svake analize je izbačen određeni broj jedinki na osnovu sledećih kriterijuma:

- Prevelika oštećenja ili vidljivi deformiteti (fotografije deformisanih struktura nalaze se u prilogu na kraju rukopisa);
- Ekstremno različit oblik u odnosu na srednju vrednost oblika (identifikovan pomoću „find outlier“ opcije u MorphoJ softveru);
- Prevelika udaljenost od celokupne konstelacije tačaka u morfološkom prostoru u PCA analizi.

3.3.5. Oksidativni stres

Analiza biomarkera koji pokazuju stanje oksidativnog stresa kod jedinki hironomida izvršena je u svrhu utvrđivanja poremećaja homeostaze usled izlaganja nanočesticama, a primenjena je u dva slučaja:

- Na larvama iz biološkog testa za procenu subletalnih efekata CeO₂ nanočestica (preko tri biomarkera: koncentracije ukupnih proteina; stepena lipidne peroksidacije određenog putem količine malonil aldehida - MDA i aktivnosti superoksid dismutase - SOD),
- Na larvama iz biološkog testa za procenu subletalnih efekata Fe₃O₄ nanočestica (preko pet biomarkera: koncentracija ukupnih proteina; stepen lipidne peroksidacije određen putem količine TBARS; količina proteinskih produkata oksidacije - AOPP; aktivnost superoksid dismutase - SOD i aktivnost katalaze - CAT).

Za potrebe ovih analiza po pet larvi iz svakog replikata, odmah po završetku eksperimenta, je izdvojeno u flakone (bez ikakvog medijuma) i čuvano na suvom ledu na -79°C do početka analize.

3.3.5.1 Oksidativni stress izazvan CeO₂ nanočesticama (ukupna količina proteina, MDA, SOD)

Ova analiza izvršena je na Departmanu za Animalnu Fiziologiju, Fakulteta Nauke, Sveučilišta u Zagrebu u Hrvatskoj u saradnji sa Prof Dr Domagojem Dikić i Prof Dr Markom Miliša.

Ukupno pet larvi iz svakog replikata je ručno homogenizovano i ovaj homogenat iskorišćen je za merenje parametara oksidativnog stresa indukovanog CeO₂ nanočesticama.

Ukupna koncentracija proteina određena je metodom opisanom u radu Lowry i sar., 1951., sa albuminom goveđeg seruma (eng. bovine serum albumin) kao standardom.

Lipidna peroksidacija određena je merenjem koncentracije malonil aldehida (eng. malondialdehyde - MDA) metodom opisanom u radu Ohkawa i sar., 1979. 200 µl uzorka homogenizovanog tkiva hironomida pomešano je sa 200 µl 8,1% natrijum dodecil sulfata, 1,5 ml 20% sirćetne kiseline (CH₂O, pH 3,5) i 1,5 ml 0,81% tiobarbiturinske kiseline (TBA), a potom inkubirano 60 minuta na 95°C. Uzorak je potom ohlađen na ledu i centrifugiran, nakon čega je

određena apsorbancu u supernatantu na 532 i 600 nm pomoću “Libro S22” spektrofotometra (proizvođača Biochrom). Ukupna apsorbancu određena je putem formule:

$$A_{\text{total}} = A_{532 \text{ nm}} - A_{600 \text{ nm}}$$

Koncentracija MDA je određena pomoću molarnog apsorpcionog koeficijenta za MDA–TBA kompleks, koji iznosi $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Aktivnost superoksid dismutaze (eng. superoxide dismutase – SOD) određena je pomoću modifikovanog SOD eseja opisanog u radu Flohé, 1984. Aktivnost je izračunata preko procenta inhibicije oksidacije ksantina ($\Delta A / \text{min} \approx 0,025$), reakcije koja stvara superoksidne anjone⁹ koji su dalje supstrat SOD enzimu u uzorku. Superoksidni anjoni koji ostanu neiskorišćeni od strane enzima oksiduju citochrome povezane sa unutrašnjom membranom mitohondrija. Nerastvoreni uzorak (25 μL) pomešan je sa 1,45 ml reakcionog rastvora (citohrom C, 0,05 mM; ksantin, 1 mM pomešani u proporciji 10:1 sa Elmanovim reagensom, tj. 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoičnom kiselinom). 20 μl ksantin oksidaze (0,4 Uml^{-1}) je dodato radi započinjanja reakcije. Reakcija nastajanja žutog jedinjenja TNB je praćena merenjem tri minuta na talasnoj dužini od 550 nm pomoću “Libro S22” spektrofotometra (Biochrom). Jedna jedinica SOD aktivnosti definisana je kao količina enzima neophodna da se postigne 50% inhibicije na tipičnoj kalibracionoj krivi dobijenoj SOD standardom. U analizi su korišćeni citohrom C tip IV (iz konjskog srca); SOD iz uzorka humane krvi (tip I, liofoliziran prah, 2400 U/mg proteina), ksantin i ksantin oksidaza (200 U/ml) dobavljača Sigma-Aldrich.

3.3.5.2 Okisdativni stress izazvan Fe_3O_4 nanočesticama (ukupna količina proteina, TBRAS, AOPP, SOD, CAT)

Ova analiza izvršena je na Departmanu za Biohemiju, Medicinskog Fakulteta, Univerziteta u Nišu u saradnji sa Dr Jelenom Bašić.

Larve su ručno homogenizovane i ovaj homogenat iskorišćen je za merenje parametara oksidativnog stresa indukovanog CeO_2 nanočesticama. Ukupno 5 larvi iz svakog replikata homogenizovano u 2,5 ml etilen diamin tetra sirćetno kiselinskom (EDTA) puferu (40 mM, pH

⁹ Superoksidni anjon predstavlja reaktivnu vrstu kiseonika, ROS, koji nastaje u mitohondrijama redukcijom kiseonika dodavanjem jednog elektrona, a SOD ga transformiše u manje aktivan vodonik peroksid i njegova koncentracija nije viša od 10^{-8} M. Ukoliko je aktivnost SOD ometena može dovesti do povećanja koncentracija vodonik peroksida, oštećenja ćelijske membrane i lipidne peroksidacije.

7,8; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Sirovi homogenat centrifugiran je 15 minuta na 500 G (4°C), a potom je supernatant centrifugiran 30 minuta 12.000 G (4°C). Ovako dobijen supernatant (postmitohondrijalna frakcija) je upotrebljen za merenje nivoa produkata oksidativne modifikacije i merenje aktivnosti enzima.

Ukupna koncentracija proteina određena je metodom opisanom u radu Lowry i sar., 1951., sa albuminom goveđeg seruma (eng. bovine serum albumin) kao standardom.

Lipidna peroksidacija određena je merenjem koncentracije supstanci koje reaguju sa tiobarbiturinskom kiselinom (eng. thiobarbituric acid reactive substances - TBARS) metodom opisanom u radu Andreeva i sar., 1988. Reakcija nastajanja ružičastog hromogenog produkta reakcije TBA (tiobarbiturata) i MDA (malonilaldehida) merena je na talasnoj dužini od 532 nm pomoću spektrofotometra (Multiscan Ascent 96/384 čitač, proizvođača Thermo Labsystems). Koncentracija TBARS je određena pomoću molarnog ekstinkcionog koeficijenta, koji iznosi $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a rezultati su izraženi u $\mu\text{mol/l}$, a potom konvertovani u mg ukupnih proteina ($\mu\text{mol TBARS po mg ukupnih proteina}$).

Količina proteinskih produkata oksidacije (eng. Advanced Oxidation Protein Products – AOPP) određena je pomoću spektrofotometrijske metode opisane u radu Witko-Sarsat i sar., 1996. Kalibracija je izvršena pomoću hloramin-T rastvora, koji apsorbuje svetlost na talasnoj dužini $\lambda = 340 \text{ nm}$ i u prisustvu kalijum jodida, KI. Rezultati su izračunati i izraženi u $\mu\text{mol/l}$ hloramin-T ekvivalenata, a potom korelisani sa ukupnim nivoom proteina (konvertovana u jedinice $\mu\text{mol AOPP po mg ukupnih proteina}$).

Aktivnost katalaze (eng. catalase activity - CAT) određena je pomoću spektrofotometrijske metode opisane u radu Goth, 1991., zasnovane na svojstvu CAT enzima da rastvara spstrat (vodonik peroksid H_2O_2). Enzimatska reakcija je zaustavljena dodavanjem amonijum molibdata, usled čega je nastao žuti kompleks H_2O_2 i molibdata, koji je meren na 405 nm nasuprot kontrole. Enzimatska aktivnost izražena je u U/l a potom konvertovana u mg proteina.

Aktivnost superoksid dismutaze – SOD, određena je pomoću metode opisane u radu Masayasu i Hiroshi, 1979., koja se bazira na nastanku obojenog produkta - formazana. U reakciji sa NBT (nitro plavo tetrazolijum hlorid), supraoksidni anjon, nastao kao produkt autooksidacije pirogalola, formira obojeni produkt formazan. SOD enzim, kao čistač supraoksidnih anjona, dovodi do inhibicije ove reakcije. Enzimatska aktivnost izražena je u I/l, a potom konvertovana u

mg proteina. Jedna jedinica SOD aktivnosti definisana je kao količina enzima neophodna da se postigne 50% inhibicije stope NBT fotoredukcije.

3.3.6. *In vivo* genotoksičnost

Da bi se utvrdio potencijal nanočestica da izazovu oštećenja na DNK u somatskim ćelijama, analiza je sprovedena u dva slučaja:

- Na larvama iz bioeseja za procenu subletalnih efekata CeO₂ nanočestica,
- Na larvama iz bioeseja za procenu subletalnih efekata Fe₃O₄ nanočestica.

Do danas je razvijen veliki broj tehnika za procenu oštećenja DNK, ali je u ovom radu primenjena alkalna verzija Kometa testa, koja spada u ekonomičnije, osetljive i brze tehnike. Ova analiza se drugačije naziva i gel elektroforeza pojedinačnih ćelija, pomoću koje se određuje nivo oštećenosti DNK u ćelijama preko detektovanja pucanja DNK lanaca, što predstavlja jedno od glavnih vidova oštećenja DNK usled oksidativnog stresa (Lacaze i sar., 2010; Valverde i Rojas, 2009; Cotelle i Ferard, 1999).

U oba slučaja analize su sprovedene identičnom metodologijom na Departmanu za Biologiju i Ekologiju, Prirodno-Matematičkog Fakulteta, Univerziteta u Kragujevcu u saradnji sa Dr Sanjom Matić i Snežanom Stanić.

Za potrebe ovih analiza od pet do deset larvi iz svakog replikata, odmah po završetku eksperimenta je podvrgnuto analizi.

3.3.6.1. Kometa test

Kometa test je sproveden na osnovu metode opisane u radu Singh i sar., 1988., sa manjim modifikacijama opisanim u radu Bernabò i sar., 2017. Pored negativne kontrole iz samog eksperimenta (grupe koja nije tretirana nanočesticama), uvedena je i pozitivna kontrola (grupa koja je tretirana vodonik peroksidom, H₂O₂, 20 mM, po preporuci Bernabò i sar., 2017.

Hemikalije

Fosfatni pufer sa dodatkom soli (eng. Phosphate-Buffered Saline - PBS) kalcijuma i magnezijuma, agarozna za DNK elektroforezu i agarozna niske tačke topljenja (eng. Low-Melting

point Agarose - LMA) dobavljeni su od “Alfatrade Enterprise D.O.O.” (proizviđača Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany).

Priprema uzoraka

Da bi se dobile suspenzije dezintegriranih somatskih ćelija, po pet do deset larvi iz svakog tretmana je homogenizovano, filtrirano i potom resuspendovano u 3 ml suspenzionog pufera (1X PBS, 20 mM EDTA, 10% DMSO, pH 7,4), centrifugirano 15 min na 1500 rpm na 4°C (Eppendorf centrifuge 5415 R), a potom dodatno resuspendovan u 150 µL suspenzionog pufera. 10 µL ovako pripremljene ćelijske suspenzije je pomešano sa 75 ml 1% LMA, nakon čega je 75 µL ove mešavine izliveno na mikroskopske pločice. Da bi se odredio nivo DNK oštećenja, preparati su bojeni etidijum bromidom u trajanju od 10 minuta u potpunom mraku

Procena nivoa oštećenja DNK

Mikroskopski preparati su posmatrani pod fluorescentnim mikroskopom Nikon (Ti-Eclipse) povezanim sa CCD lamerom. Nivo oštećenja DNK je određen vizuelno, metodom opisanom u radu Collins, 2004., razvrstavanjem kometa u pet kategorija (o do 4) na osnovu dužine migracije DNK, prema relativnoj količini oštećene DNK u “repu” komete u odnosu na “glavu” koja predstavlja neoštećeni deo DNK.

Ukupan skor je izračunat prema radu Miyaji i sar., 2004:

$(\% \text{ ćelija klase } 0 \times 0) + (\% \text{ ćelija klase } 1 \times 1) + (\% \text{ ćelija klase } 2 \times 2) + (\% \text{ ćelija klase } 3 \times 3) + (\% \text{ ćelija klase } 4 \times 4)$

Ukupan skor se kreće u rasponu od 0 (ni jedna ćelija nije oštećena) do 400 (sve ćelije su maksimalno oštećene).

3.3.7. Analiza hemolimfe – procenat hemoglobina

Jedna od karakteristika larvi roda *Chironomus* jeste posedovanje respiratornog pigmenta hemoglobina, kao što je već navedeno u uvodnom poglavlju.

Koncentracija hemoglobina u hemolimfi larvi determinisana je fotometrijskom metodom pomoću automatizovanog hematološkog analizatora (Medonic M16M/M20M, Švedska) po metodi opisanoj u radu Yang i sar., 2013.

Analiza je izvršena na “svežim larvama” na sledeći način: odmah nakon završetka eksperimenta larvama su odstranjene glave i hemolimfa iz tela je sakupljena pomoću kapilarnih

cevčica. Ovako pripremljene cjevčice su ubačene u automatski analizator koji odmah određuje nivo hemoglobina u uzorku i izražava ga u g po l hemolimfe.

3.4 Statističke analize podataka

Pre početka utvrđivanja statistički značajnih razlika u ispitivanim parametrima po grupama, testirana je normalnost i homogenost varijanse dobijenih skupova podataka pomoću nekog od testova normalnosti (Kolmogorov-Smirnov¹⁰ sa Lilliefors korekcijom značajnosti, Shapiro-Wilk ili Levene, $p < 0,05$). Ako se pokazalo da je p vrednost testa normalnosti veća od 0,05 (podaci sa normalnom raspodelom) pristupljeno je parametarskim analizama varijansi (kao što je jednofaktorska analiza varijanse, eng. One-Way ANOVA¹¹); a ako je p vrednost ispod 0,05 (podaci značajno odstupaju od normalne distribucije) pristupljeno je neparametarskim alternativama parametarskih analiza (kao što je Kruskal-Wallis-ov test). Ukoliko su ovi testovi pokazali opštu razliku između grupa, dalje su izvođeni *post hoc* testovi, kako bi se potvrdilo između konkretno kojih grupa postoje značajne razlike. Za *post hoc* poređenje korišćen je Tukey HSD, Dunnett T¹², LSD ili Mann-Whitney test, pri čemu je nivo značajnosti postavljen na $p < 0,05$ (Karadžić i Marinković, 2009) uz Bonferoni korekciju (pri čemu se nivo značajnosti postavlja deljenjem regularne vrednosti 0,05 brojem tretmana). Korelaciona analiza izvršena je pomoću parametarskog Pearson korelacionog testa ili njegovog neparametarskog ekvivalenta - Spearman rho (eng. Spearman Rank Order Correlation Test).

Svi statistički testovi su primenjeni pomoću dva statistička paketa: "IBM SPSS", verzije 19.0.0 za Windows operativni sistem (IBM, 2010) ili "Statistica", verzije 7.0 za Windows operativni sistem (Stat Soft, 2004).

Rezultati **analize parametara populacionog fitnesa iz seta eksperimenata za odabir adekvatne podloge** analizirani su na sledeći način: nakon što je analizirana normalnost merenih parametara razlike u preživljavanju larvi su analizirane parametarskim testovima (ANOVA). Podaci oba eksperimenata su testirani nezavisno, potom su pulirani u jedan set podataka. Za *post*

¹⁰ Kolmogorov-Smirnov test je neparametarski test koji se primenjuje za podatke sa neprekidnom raspodelom. On ispituje da li je funkcija raspodele posmatranog obeležja jednaka nekoj unapred zadatoj raspodeli.

¹¹ Jednofaktorska analiza varijansi ispituje uticaj jedne nezavisne kategorijske promenljive (jednog faktora, u ovom slučaju količine nanočestica), koji ima tri ili više grupa, na zavisno promenljivu sa neprekidnim vrednostima.

¹² Tretira jednu grupu kao kontrolnu i poredi sve ostale sa njom.

hoc pojedinančna poređenja tretmana korišćen je Tukey HSD test. Razlike u **težini larvi, dužini tela, dužini i širini glave** larvi hironomida, na različitim podlogama, testirane su neparametrijskom analizom varijansi (Kruskal-Wallis-ov test). Za *post hoc* pojedinančna poređenja tretmana korišćen je Mann-Whitney test uz Bonferonijevu korekciju praga značajnosti.

Rezultati **analize parametara populacionog fitnesa iz seta eksperimenata za procenu uticaja nanočestica** analizirani su na sledeći način: nakon što je analizirana normalnost merenih parametara varijabilnost mortaliteta je testirana neparametarskom analizom varijanse, tj. Kruskal-Wallis-ovim testom, a za *post hoc* poređenje tretmana upotrebljen je Mann-Whitney test. Varijabilnost DT i DR je testirana parametarskom ANOVA analizom, a za *post hoc post hoc* poređene tretmana upotrebljen je Dunnett-ov test. Razlike u **težini larvi** hironomida testirane su neparametrijskom analizom varijansi (Kruskal-Wallis-ov test). Za *post hoc* pojedinančna poređenja tretmana korišćen je Mann-Whitney test uz Bonferonijevu korekciju praga značajnosti.

Rezultati **analize mentuma larvi metodom tradicionalne morfometrije** (testiranje varijabilnosti osam morfometrijskih parametara) nakon što je analizirana normalnost merenih parametara testirani su ANOVA i *Post Hoc* LSD procedurom.

Statistička obrada rezultata analize **metodom geometrijske morfometrije** opisana je detaljnije u prethodnim poglavljima, ukratko: eksportovani podaci iz MorphoJ softvera analizirani su pomoću statističkog paketa Statistica. Postojanje značajne varijabilnosti u veličini analiziranih objekata putem veličine centroida, između tretmana testirano je analizom varijanse (ANOVA), nakon čega je izvršen Tukey HSD *post hoc* test za međusobno poredjenje grupa. Postojanje značajne varijabilnosti u obliku analiziranih objekata između tretmana testirano je multivarijantnom analizom varijanse (MANOVA), dok je za vizuelnu eksploraciju podataka korišćena PCA i CVA analiza.

Rezultati **ICP-MS analize**, nakon što je analizirana normalnost merenih parametara, su statistički testirani jednofaktorskom analizom varijanse, ANOVA, kako bi se poredila koncentracija unetih nanočestica između tretmana, nakon čega je izvršen *post hoc* Tukey HSD test za međusobno poredjenje grupa. Da bi se utvrdio nivo povezanosti između koncentracije nanočestica u sedimentu i njihove koncentracije u telima larvi, primenjena je neparametarska korelaciona analiza, Spearman rho korelacioni test.

Rezultati **analize parametara oksidativnog stresa**, prvo su analizirana na normalnost merenih parametara, a potom statistički testirani ANOVA analizom praćenom *post hoc* Dunnett testom. Značajnost je podešena na $p < 0,05$.

Rezultati **kometa testa**, nakon analize normalnosti parametara, testirani su one-way ANOVA analizom, praćenom LSD *post hoc* testom. Značajnost je podešena na $p < 0,05$.

Rezultati **analize hemolimfe** (procene koncentracije hemoglobina), nakon što je analizirana normalnost merenih parametara, testirani su ANOVA analizom i *post hoc* Tukey HSD procedurom ($p < 0,05$). Da bi se utvrdio nivo povezanosti između koncentracije nanočestica u sedimentu i koncentracije hemoglobina u telima larvi, primenjena je parametarska korelaciona analiza, tj. Pearson korelacioni test.

POGLAVLJE 4

Rezultati

4.1. Rezultati karakterizacije nanočestica

Opsežna karakterizacija tri tipa ispitivanih industrijski značajnih nanočestica oksida metala: nano-TiO₂, nano-CeO₂ i nano-Fe₃O₄ ukazala je na njihove značajne fizičke i hemijske osobine, a uporedni pregled osnovnih parametara prikazan je u sledećoj tabeli:

Tabela 9 – Uporedna tabela osnovnih podataka dobijenih ekstenzivnom karakterizacijom testiranih nanočestica oksida metala

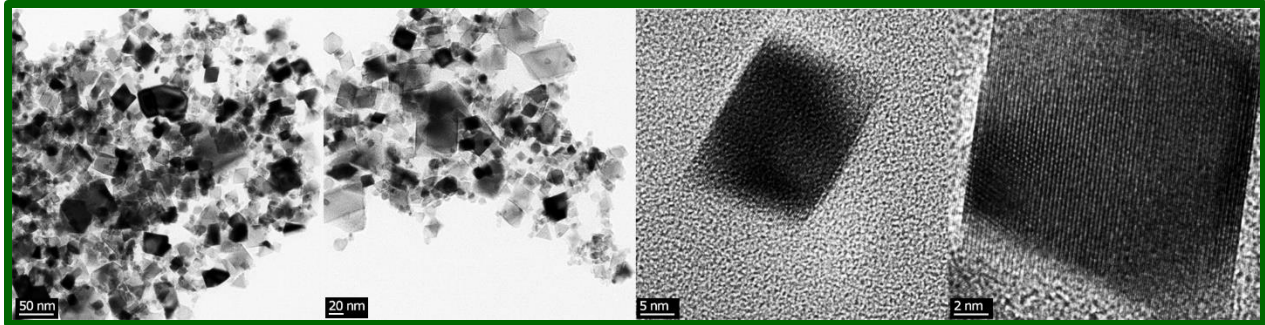
Tip nanočestica	Raspon ispitivanih koncentracija (mg nanočestica / kg sedimenta)	kristalna forma	distribucija veličine (u nm)	srednja veličina ± SD (nm)	specifična površina (m ² /g)	ζ-potencijal (mV)	prosečan hidrodinamički i dijametar ± SD (nm)	agregacija i taloženje
nano-TiO ₂	2,5 - 4000	anatas	50 - 300	167 ± 50	6,137	od -12,2 do -20,2	671±112	visoka
nano-CeO ₂	2,5 - 2500	fluorit	23 - 29	25 ± 1,8	42,602	28	1421±460	umerena
nano-Fe ₃ O ₄	1 - 100	magnetit	4,4 - 10,1	7,5 ± 0,78	/	/	/	/

4.1.1 nano-TiO₂

Kao što je u prethodnom poglavlju navedeno, obzirom da detaljna karakterizacija ovih nanočestica nije izvršena u okviru ove doktorske disertacije, već u okviru prethodnih istraživanja Jovanović i sar., 2016a, a kako je izuzetno značajna za interpretaciju rezultata, rezultati karakterizacije opisani su u prilogu 2 na kraju ove doktorske disertacije.

4.1.1 nano-CeO₂

TEM mikroskopijom je otkriveno da nano-CeO₂ ima široku distribuciju veličina; čestice su kubnog, tj. ugaonog, oblika sa veličinama u opsegu od 23 do 29 nm. Prema TEM slikama, srednja veličina čestica ± standardna greška je 25±1,8 nm (slika 21). Pored toga, u suspenziji etanola primećene su nakupine, tj. agregacije čestica.

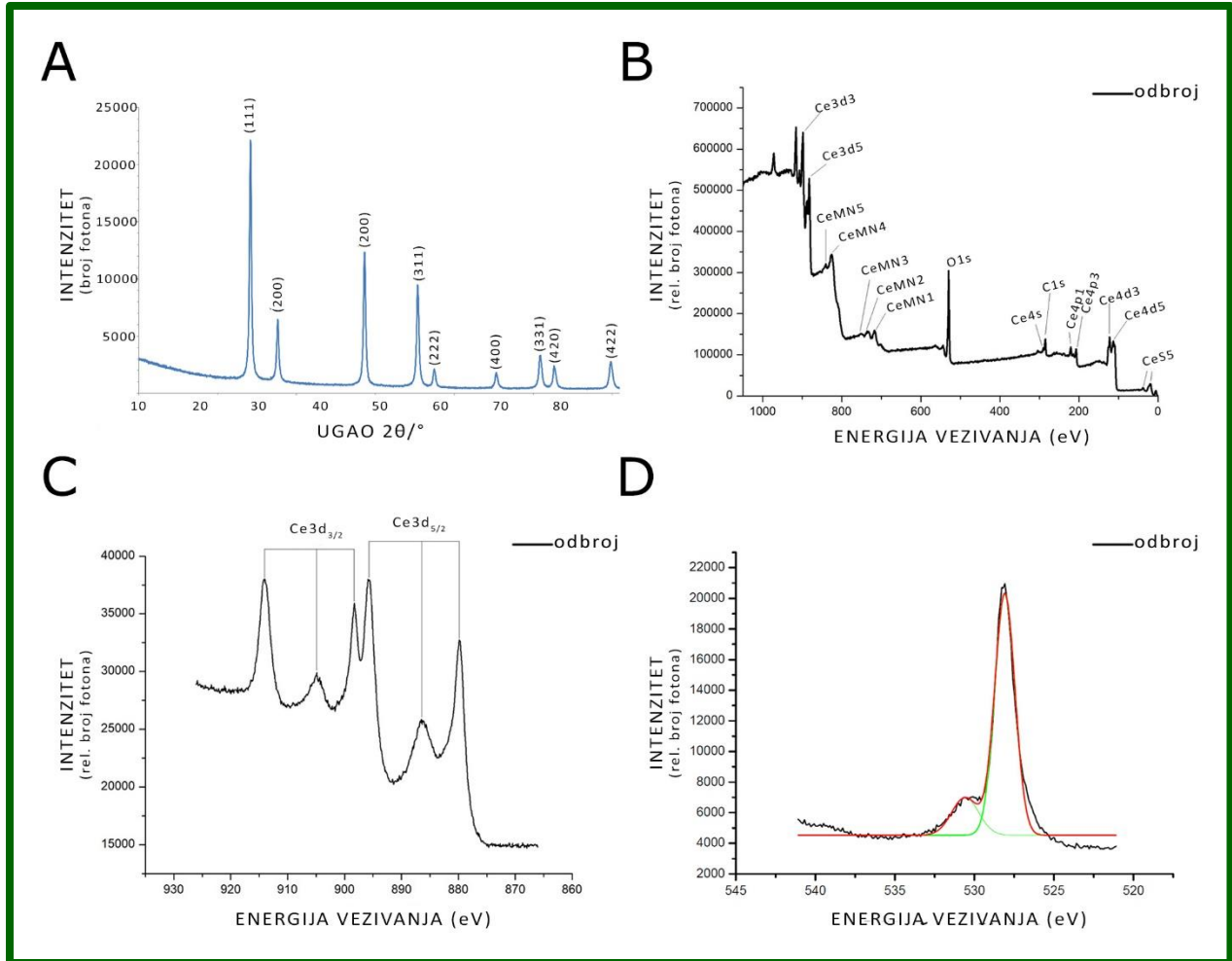


Slika 21 – Transmisioa Elektronska Mikrografija – TEM slike CeO₂ nanočestica na četiri različita uvećanja dobijene “FEI Tecnai G2 F30” uređajem.

XRD difraktogram (zavisnosti relativnog intenziteta difraktovanog zračenja, izražen kao broj fotona, od dvostrukog ugla rasejanja, $2\theta/^\circ$) pokazuje jasne oštre pikove koji se mogu pripisati fluoritnoj kristalnoj strukturi (površinski centrirana rešetka¹) (slika 22). Oštri pikovi (111), (200), (311), (200), (220), (311), (222), (400), (311), (420) i (422) odgovaraju kristalnim ravnima CeO₂ nanočestica. Nisu otkriveni karakteristični pikovi koji se odnose na druge kristalne forme (slika 22 A).

Pregledni XPS spektrogram nano-CeO₂ uzorkaa pokazuje spektar Ce 3d fotoelektronske linije sa Ce 3d_{3/2} pikovima između 915 i 900 eV i Ce 3d_{5/2} pikovima između 895 i 875 eV, što je karakteristično za CeO₂ (slika 22 C). Spektar O 1s fotoelektronske linije pokazuje glavni pik na 529,2 eV, koji se pripisuje kiseoniku vezanom za tetravalentne Ce jone i prevoj na ~532,5 eV, što ukazuje na to da je površina delimečno pokrivena hidroksidnim OH grupama (slika 22 D). Odnos cerijuma i kiseonika takođe ukazuje na to da CeO₂ ima fluoritnu kristalnu strukturu.

¹ (eng. Face-centered cubic) kubični, tj. izometrični kristalni sistem u kome su atomski centri smešteni u prostoru na takav način da se jedan atom nalazi u svakom od uglova kocke, a jedan u središtu svake strane, tj. površine.



Slika 22 - nano-CeO₂ karakterizacija: 2A - XRD šablon nano-CeO₂ kristalne strukture; 2B - XPS spektralna analiza CeO₂ nanočestica; 2C - XPS spektar Ce 3d pika; 2D - XPS spektar O 1s pika.

Prema BET analizi, specifična površina nano-CeO₂ praha iznosi 42,602 m²/g, dok je zapremina pora 1.172 cm³/g a prečnik 1075,761 Å (107.5761 nm).

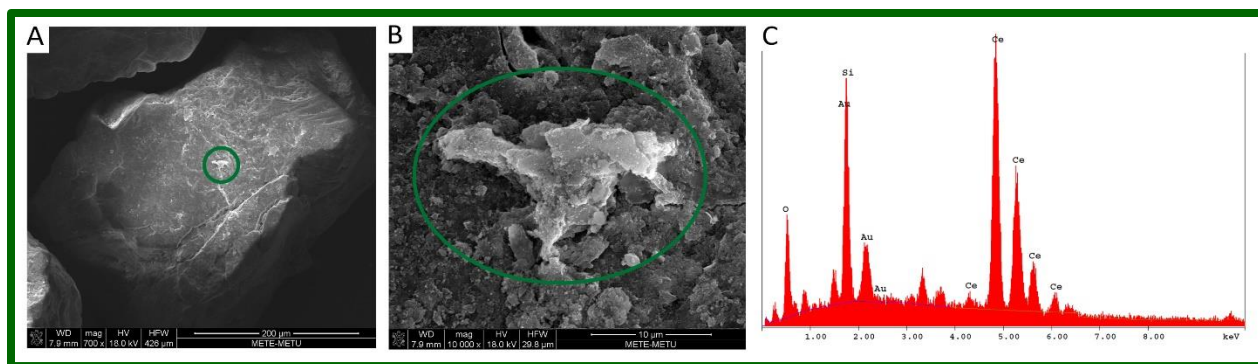
Prosečan hidrodinamički prečnik nano-CeO₂ u dejonizovanoj vodi tokom vremena, izmeren DLS tehnikom, iznosi 671±112 nm (tabela 10). Polidisperzitet uzorka je u rasponu od 0,879 do 0,655. Pored toga, vrednost ζ-potencijala izmerena nakon pripreme suspenzije u dejonizovanoj vodi bila je 28 mV.

Tabela 10 - Procenjeni prosečni hidrodinamički prečnik (d_H) i polisperzitet (PDI) nano-CeO₂ čestica tokom vremena.

Vreme (min)	d_H (nm)	PDI
5	1068	0,879
10	803,2	0,784
15	687,7	0,68
20	716,1	0,71
25	552,3	0,571
30	513,3	0,525
35	477,2	0,61
40	558,2	0,818
45	580,9	0,594
50	817,9	0,795
55	642,8	0,652
60	639,9	0,655

***In situ* karakterizacija nano-CeO₂ u sedimentu** pokazala je sledeće rezultate:

Agregati nano-CeO₂ su uglavnom prilepljeni za SiO₂ čestice peska u sedimentu (slika 23 A i B). Jasno je uočeno da su CeO₂ nanočestice rasute po sedimentu u vidu velikih klastera, tj. agregata. Agregati nano-CeO₂ imaju široku distribuciju veličine u rasponu između 2 i 25 μm za ispitivanu koncentraciju od 2500 mg/kg nano-CeO₂; a u rasponu od 5 do 10 μm za ispitivanu koncentraciju od 250 mg/kg nano-CeO₂. Iz SEM slika se zaključuje da, ne samo da nano-CeO₂ formiraju agregate, već da se ti agregati vezuju za SiO₂ čestice peska, jer nije uočen ni jedan nezavisan nano-CeO₂ agregat.

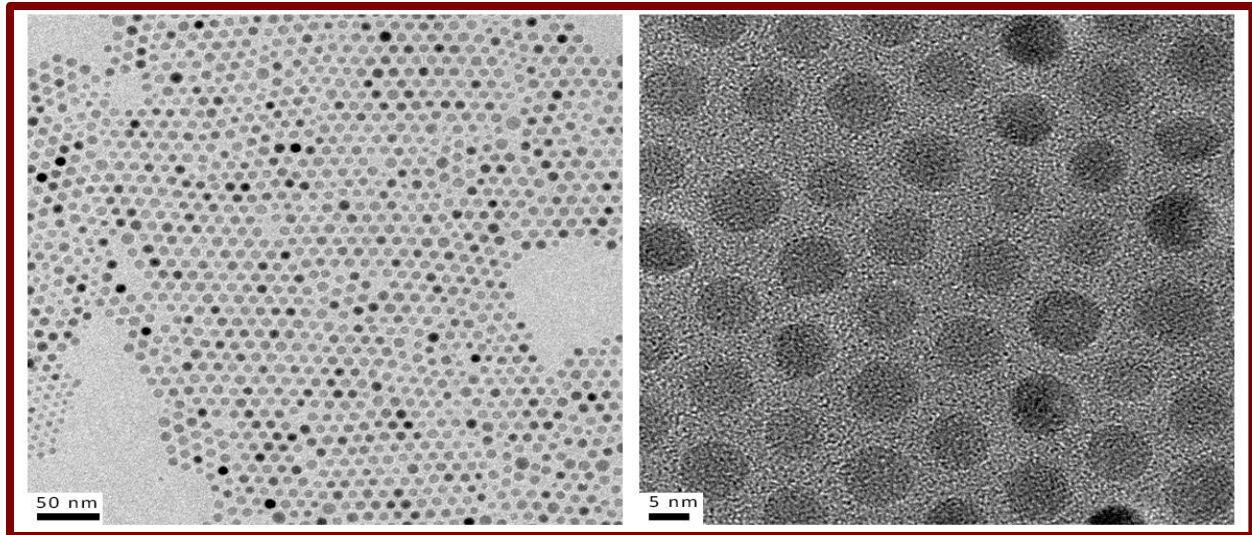


Slika 23 – *In situ* karakterizacija nano-CeO₂ u sedimentu (koncentracija 2500 mg/kg): SEM slike i EDX analiza. A - SEM slika nano-CeO₂ agregata (zelena elipsa) lociranog na jednom jedinom zrnu peska; B – Uveličana SEM slika istog nano-CeO₂ agregata; C – rezultati EDX analize mesta u uzorku prikazanog na A i B.

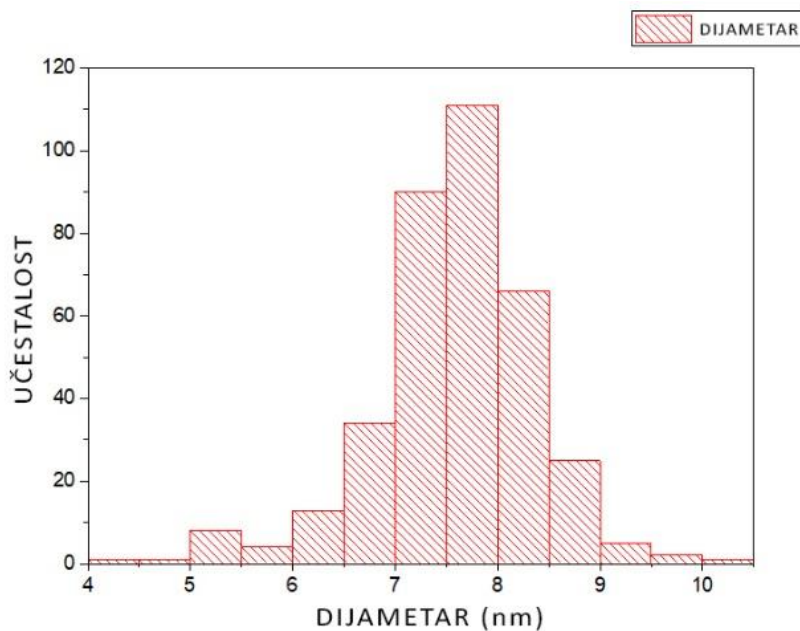
Prisustvo CeO₂ nanočestica u uzorku je takođe potvrđeno EDX spektralnom analizom koja je pokazala da wt% (procentualni težinski udeo elementa, tj. relativna koncentracija elementa u masi) Si i Ce iznosi 17,32 i 82,68, respektivno (slika 23 C).

4.1.3 nano-Fe₃O₄

TEM mikroskopija korišćena je za izračunavanje veličine, distribucije veličine i površinske morfologije golih Fe₃O₄ nanočestica (slika 24). Otkriveno je da nano-Fe₃O₄ ima mali opseg veličina; čestice su sferičnog oblika sa veličinama u opsegu od 4,4 do 10,1 nm, a prosečna veličina iznosi 7,5 nm (slika 25). Primećeno je da se postiže uniformna raspodela veličine nano-Fe₃O₄ kada je njihov prečnik od 7,5±0,78 nm.



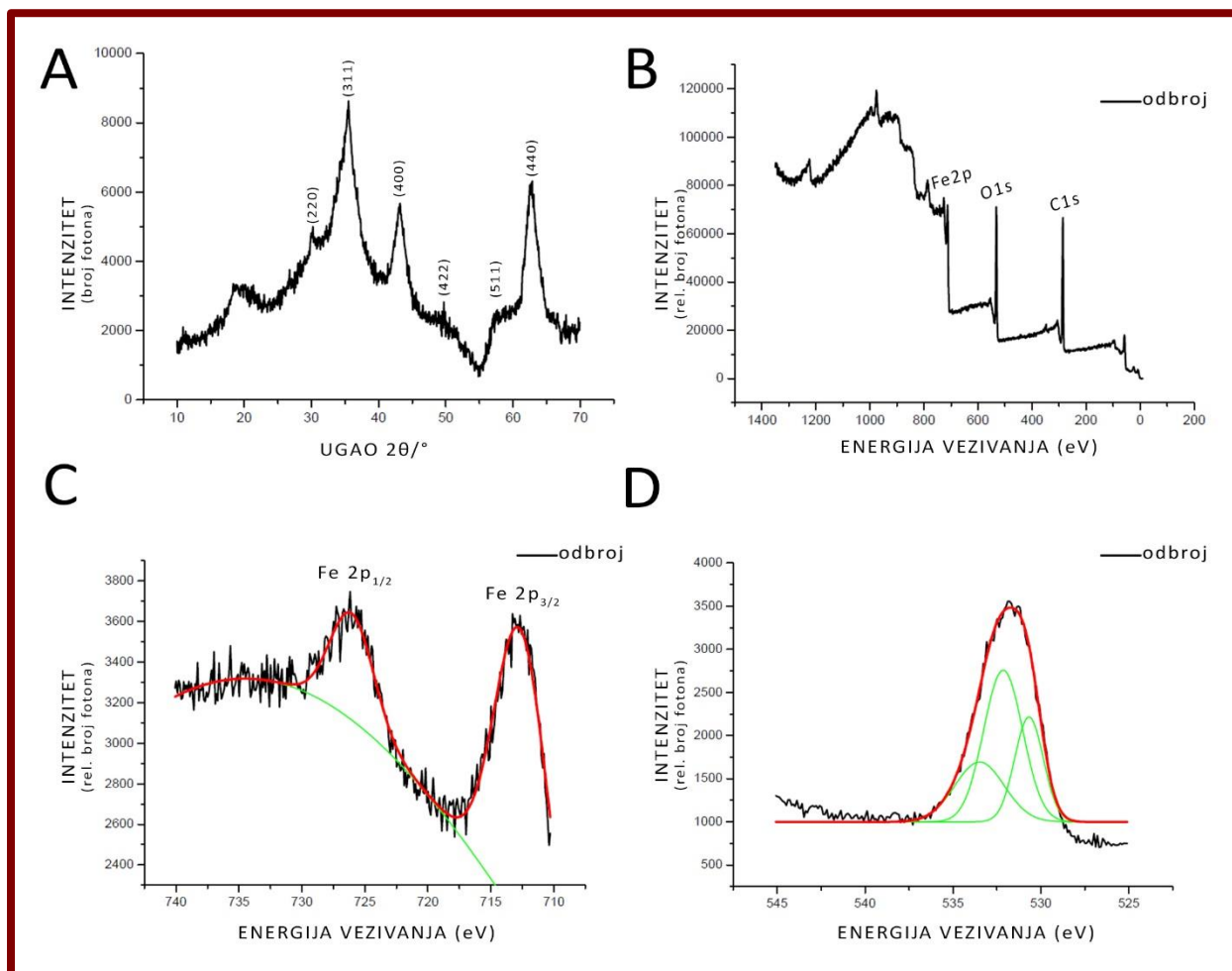
Slika 24 – Transmisioa Elektronska Mikrografija – TEM slike Fe_3O_4 nanočestica na dva različita uvećanja dobijene “FEI Tecnai G2 F30” uređajem.



Slika 25 – Distribucija veličine golih nano- Fe_3O_4

XRD difraktogram pokazuje da kod nano- Fe_3O_4 amorfna i kristalna faza koegzistirju., jasno definisani oštri pikovi odgovaraju (220), (311), (400), (422), (511) i (440) kristalnim ravnima Fe_3O_4 nanočestica (slika 26 A - D). Nisu otkriveni karakteristični pikovi koji se odnose na druge kristalne forme (slika 26 A).

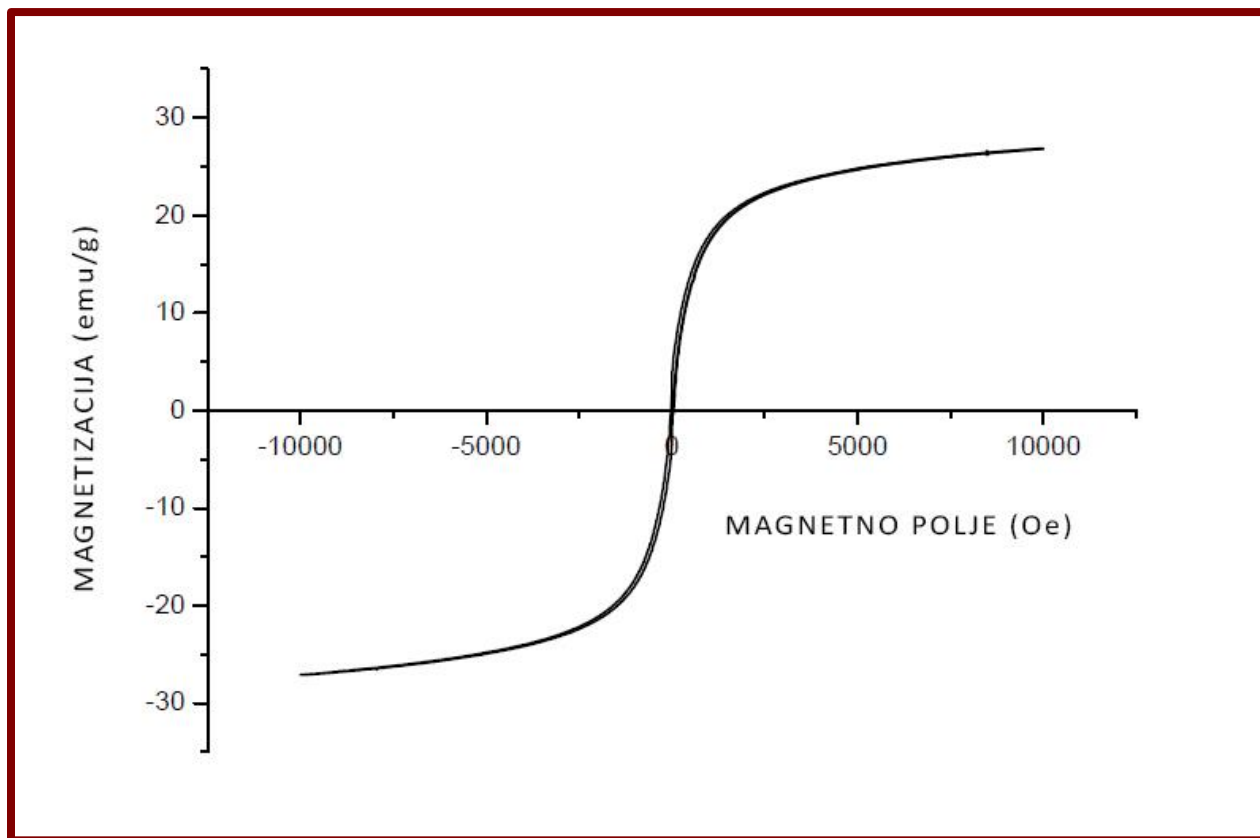
Pregledni XPS spektrogram nano-Fe₃O₄ uzorka ukazuje na to da pektar Fe 2p fotoelektronske linije pokazuje Fe 2p_{1/2} pik na 726,28 eV i Fe 2p_{3/2} pik na 712,92 eV, što je karakteristično za Fe₃O₄, a ne za Fe₂O₃ (slika 26 C).



Slika 26 – nano-Fe₃O₄ karakterizacija: 2A- XRD šablon nano-Fe₃O₄ kristalne strukture; 2B - XPS spektralna analiza Fe₃O₄ nanočestica; 2C - XPS spektar Fe 2p pika; 2D - XPS spektar O 1s pika.

Magnetna svojstva nano-Fe₃O₄ ispitivana su sistemom za merenje fizičkih svojstava (PPMS). Zavisnost magnetizacije (izražene u elektro-magnetnim jedinicama po gramu) od jačine magnetnog polja (izraženo u Erstedovim jedinicama), M-H kriva, nanočestica je merena na

sobnoj temperaturi (298K, tj. 24,85°C) (slika 27). Prema krivi magnetizacije, histerezis² se ne primećuje, a uzorak pokazuje supermagnetna svojstva tipična za nanočestice.



Slika 27 – Magnetizacione krive za nano-Fe₃O₄ merene na sobnoj temperaturi „Physical Property Measurement System„ uređajem

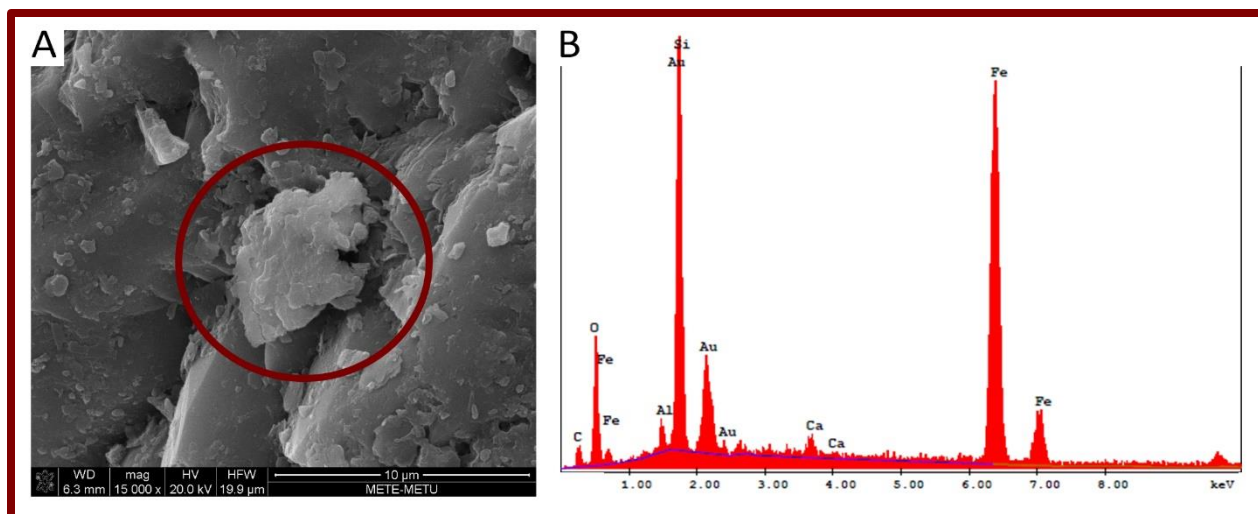
In situ karakterizacija nano-Fe₃O₄ u sedimentu sa krupnim peskom pokazala je sledeće rezultate:

50 mg/kg nano-Fe₃O₄ u krupnom pesku

Pri ovoj koncentraciji jako je teško uočiti i identifikovati Fe₃O₄ nanočestice u sedimentu. Međutim, uspeali smo da lociramo njihove agregate uz pomoć EDX analize (slika 28). Prosečna veličina nano-Fe₃O₄ agregata u različitim regionima sedimenta je 4,968±1,922 μm, sa minimalnom veličinom oko 3,711 μm i maksimalnom veličinom oko 7,804 μm.

Pored toga, primećeno je da se Fe₃O₄ nanočestice u ovoj koncentraciji lepe za Ca soli, što ograničava njihovu identifikaciju u sedimentu.

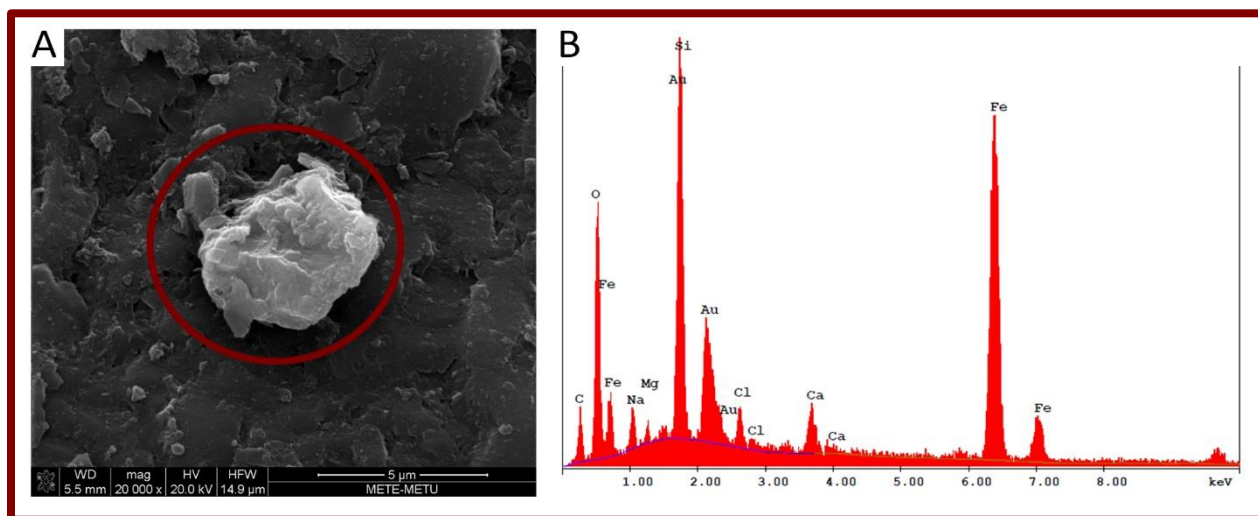
² Histerezis kod analize magnetnog polja je pojava pri kojoj namagnetisanost feromagnetnog tela ne zavisi samo od aktuelne vrednosti magnetnog polja, već i od prethodnih magnetnih stanja.



Slika 28 – *In situ* karakterizacija nano-Fe₃O₄ u sedimentu sa krupnim peskom (koncentracija 50 mg/kg), SEM slike i EDX analiza. A - SEM slika nano-Fe₃O₄ agregata (crvena elipsa); B - rezultati EDX analize uzorka.

100 mg/kg nano-Fe₃O₄ u krupnom pesku

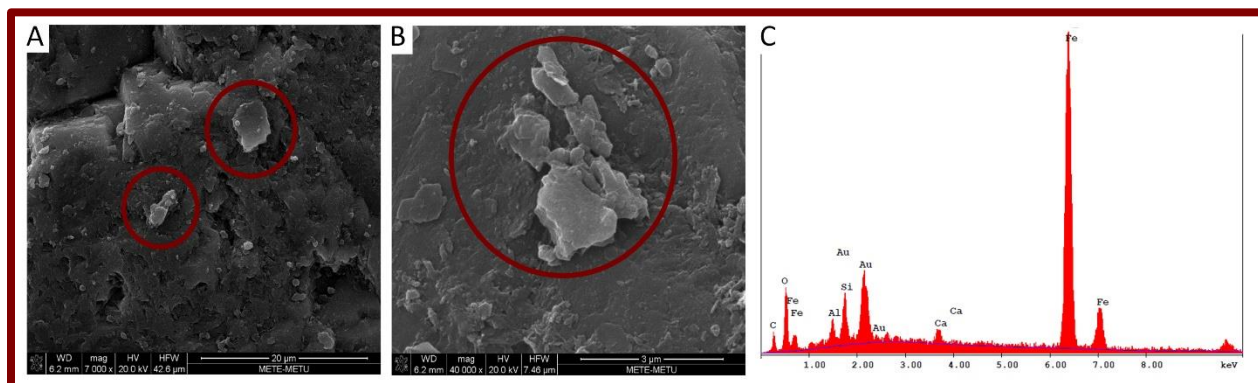
Pri ovoj koncentraciji je jednostavnije uočiti i identifikovati Fe₃O₄ nanočestice u sedimentu jer se javljaju u vidu agregata različite veličine: u nekim regionima sedimenta uočeni su veliki, a u drugim relativno mali agregati (slika 29 A). Prosečna veličina nano-Fe₃O₄ agregata u različitim regionima sedimenta je $10,515 \pm 9,831 \mu\text{m}$, sa minimalnom veličinom oko $4,344 \mu\text{m}$ i maksimalnom veličinom oko $25,175 \mu\text{m}$. Prisustvo nano-Fe₃O₄ je potvrđeno i EDX analizom (slika 29 B).



Slika 29 – *In situ* karakterizacija nano-Fe₃O₄ u sedimentu sa krupnim peskom (koncentracija 100 mg/kg), SEM slike i EDX analiza. A - SEM slika nano-Fe₃O₄ agregata (crvena elipsa); B - rezultati EDX analize uzorka.

1000 mg/kg nano-Fe₃O₄ u krupnom pesku

Pri ovoj koncentraciji bilo je najjednostavnije uočiti i identifikovati Fe₃O₄ nanočestice u sedimentu u vidu agregata sa veoma širokom distribucijom veličine (slika 30 A). Prosečna veličina nano-Fe₃O₄ agregata u različitim regionima sedimenta je 3,712±4,364 μm, sa minimalnom veličinom oko 0,649 μm i maksimalnom veličinom oko 13,491 μm. Prisustvo nano-Fe₃O₄ je potvrđeno i EDX analizom (slika 30 B). Sa povećanjem koncentracije nano-Fe₃O₄ agregati imaju veću tendenciju interakcije sa česticama samog peska nego česticama soli.

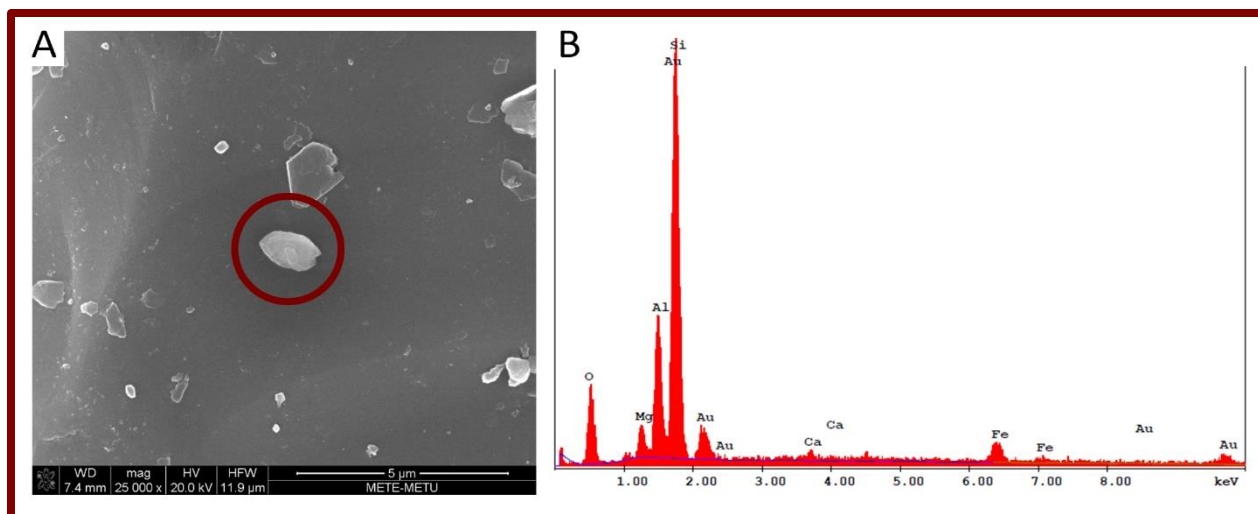


Slika 30 – *In situ* karakterizacija nano-Fe₃O₄ u sedimentu sa krupnim peskom (koncentracija 1000 mg/kg), SEM slike i EDX analiza. A - SEM slika nano-Fe₃O₄ agregata (crvene elipse); B - SEM slika nano-Fe₃O₄ agregata (crvena elipsa) na većem uvećanju; C - rezultati EDX analize uzorka.

In situ karakterizacija nano-Fe₃O₄ u sedimentu sa sitnim peskom pokazala je sledeće rezultate:

50 mg/kg nano-Fe₃O₄ u sitnom pesku

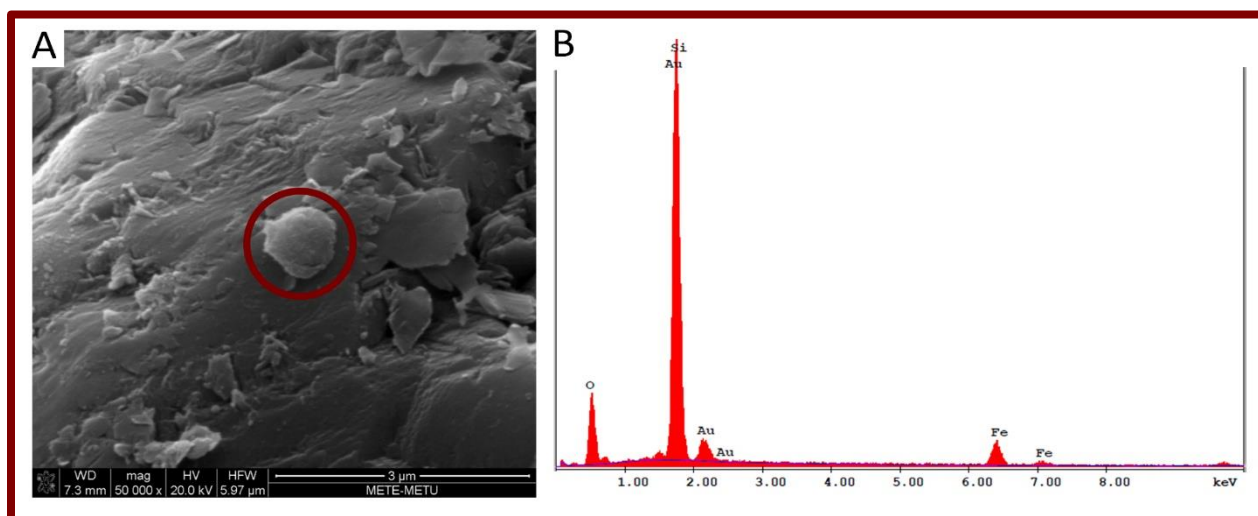
Pri ovoj koncentraciji, slično kao i u sedimentu sa krupnim peskom, Fe₃O₄ nanočestice su vrlo teško uočljive, međutim retki nano-Fe₃O₄ agregati su uočeni uz pomoć EDX analize (slika 31 A). Prosečna veličina nano-Fe₃O₄ agregata u različitim regionima sedimenta je 1,36±0,295 μm, sa minimalnom veličinom oko 0,851 μm i maksimalnom veličinom oko 1,44 μm. U ovom slučaju takođe je primećeno da se Fe₃O₄ nanočestice u ovoj koncentraciji nalaze na česticama Ca soli, što potvrđuje i EDX analiza (slika 31 B).



Slika 31 – *In situ* karakterizacija nano-Fe₃O₄ u sedimentu sa sitnim peskom (koncentracija 50 mg/kg), SEM slike i EDX analiza. A - SEM slika nano-Fe₃O₄ agregata (crvena elipsa); B - rezultati EDX analize uzorka.

100 mg/kg nano-Fe₃O₄ u sitnom pesku

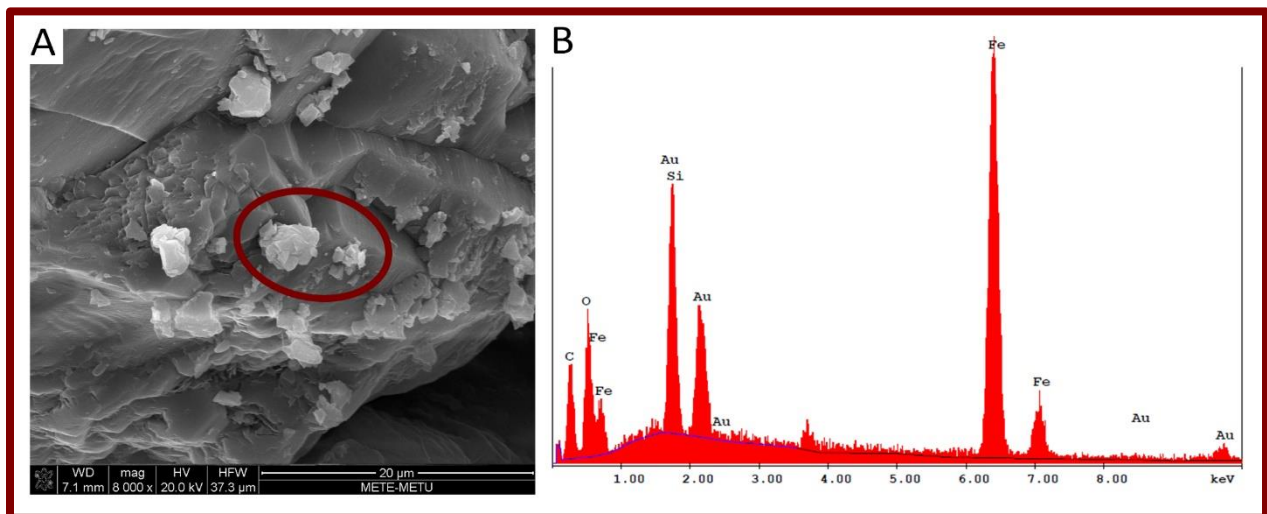
Pri ovoj koncentraciji Fe₃O₄ nanočestice takođe interaguju sa česticama soli, međutim dominantna je interakcija između nanočestica i čestica peska (slika 32 A) Prosečna veličina uočenih nano-Fe₃O₄ agregata u različitim regionima sedimenta je $0,835 \pm 0,016 \mu\text{m}$, sa minimalnom veličinom oko $0,855 \mu\text{m}$ i maksimalnom veličinom oko $0,822 \mu\text{m}$. Prisustvo nano-Fe₃O₄ je potvrđeno i EDX analizom (slika 32 B).



Slika 32 - *In situ* karakterizacija nano-Fe₃O₄ u sedimentu sa sitnim peskom (koncentracija 100 mg/kg), SEM slike i EDX analiza. A - SEM slika nano-Fe₃O₄ agregata (crvena elipsa); B - rezultati EDX analize uzorka.

1000 mg/kg nano-Fe₃O₄ u sitnom pesku

Pri ovoj koncentraciji bilo je vrlo jednostavno uočiti i identifikovati Fe₃O₄ nanočestice u sedimentu u poređenju sa ostalim koncentracijama (slika 33 A). Prosečna veličina nano-Fe₃O₄ agregata u različitim regionima sedimenta je 3,052±1,058 μm, sa minimalnom veličinom oko 1,1610 μm i maksimalnom veličinom oko 4,463 μm. Prisustvo nano-Fe₃O₄ je potvrđeno i EDX analizom (slika 33 B). Može se zaključiti da sa povećanjem koncentracije nano-Fe₃O₄ agregati imaju veću tendenciju interakcije sa česticama samog peska nego česticama soli, kao što je primećeno i u sedimentu sa sitnim peskom.



Slika 33 – *In situ* karakterizacija nano-Fe₃O₄ u sedimentu sa sitnim peskom (koncentracija 1000 mg/kg), SEM slike i EDX analiza.

A - SEM slika nano-Fe₃O₄ agregata (crvena elipsa); B - rezultati EDX analize uzorka.

4.2. Rezultati analize biomarkera bioloških testova

4.2.1 Set eksperimenata za testiranje i odabir adekvatne podloge

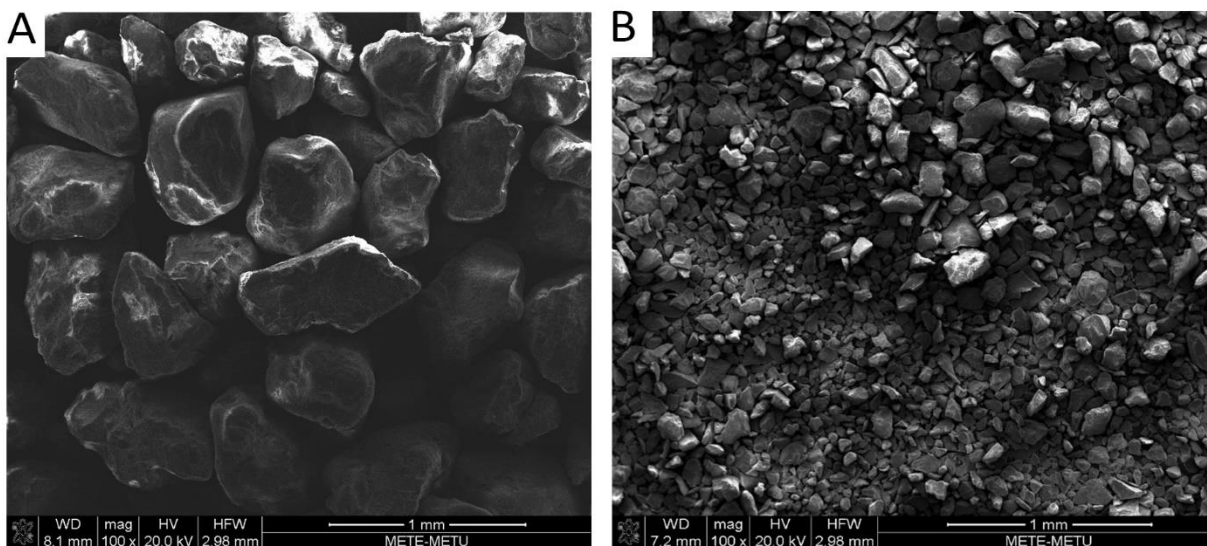
Oba biološka testa završena su nakon 12 dana (tri dana nakon što je primećeno da su larve dostigle četvrti stupanj razvića).

4.2.1.1. Karakterizacija podloga od kvarcnog peska

Čestice kvarcnog peska analizirane su i fotografisane SEM mikroskopijom (slika 34).

Prosečna veličina čestica podloge od krupnog peska (grube granulacije) u različitim regionima sedimenta je $0,573 \pm 0,175$ mm, sa minimalnom veličinom oko 1,044 mm i maksimalnom veličinom oo 0,332 mm (slika 34 A).

Prosečna veličina čestica podloge od sitnog peska (fine granulacije) u različitim regionima sedimenta je $0,152 \pm 0,046$ mm, sa minimalnom veličinom oko 0,243 mm i maksimalnom veličinom oo 0,065 mm (slika 34 B).



Slika 34 – *In situ* karakterizacija sedimenta od kvarcnog peska uz skalu od 1mm za poređenje veličine. A - SEM slika podloge od krupnog kvarcnog peska; B - SEM slika podloge od sitnog kvarcnog peska.

4.2.1.2 Standardni parametri

U prvom biološkom testu, namenjenom proceni uticaja mešavine komponenti supstrata, osnovni kriterijum za validnost testa (prosečno preživljavanje od minimum 70%) ispunjen je u dva tretmana: STANDARD i T+P (tabela 11).

ANOVA je pokazala statistički značajne razlike u preživljavanju larvi između tretmana, (testiranih supstrata, $p=0,49$; $F=3,518$). *Post hoc* test je pokazao da je preživljavanje larvi u supstratu T+G bilo najniže i značajno manje od preživljavanja larvi u supstratu T+P (u kome je zabeleženo najviše preživelih larvi; Tukey HSD, $p<0,05$). Kruskal-Wallis-ov test je pokazao značajno variranje mokre mase tela između različitih tipova podloge ($p<0,0001$). *Post hoc* Mann-Whitney test je pokazao da hironomide gajene na STANDARD i T+G podlozi imaju značajno veću masu od jedinki gajenih na ostalim podlogama ($p<0,05$). Jedinke iz P+T+MG tretmana imale su najniže vrednosti mase tela.

Tabela 11 - Preživljavanje i mokra masa *C. tentans* larvi na različitim tipovima supstrata sastavljenim iz mešavine komponenti (srednje vrednosti \pm SD u %). Kolona "preživljavanje" - tretman a je statistički značajno različit od tretmana b (Tukey HSD $p<0,05$); Kolona "mokra masa" tretman a je statistički značajno viši od tretmana b (Kruskal-Wallis $p<0,05$).

Skraćenica	Treatman (tip podloge)	Preživljavanje (mean \pm SD) %	Mokra masa (mean \pm SD) mg
STANDARD	Standardni OECD supstrat (pesak + treset + glina)	76,7 \pm 7,6	8,86 \pm 3,1 ^a
P+T+MG	Standardni supstrat sa medicinskom glinom (pesak + treset + medicinska glina)	61,7 \pm 15,3	5,94 \pm 3,1 ^b
T+G	Standardni supstrat bez peska (treset + glina)	53,3 \pm 12,6 ^b	9,73 \pm 3,9 ^a
T+P	Standardni supstrat bez gline (treset + pesak)	85 \pm 1,5 ^a	6,74 \pm 2,4 ^b
G+P	Standardni supstrat bez treseta (glina + pesak)	63,3 \pm 2,9	7,2 \pm 4,3 ^b

U drugom biološkom testu, namenjenom proceni uticaja pojedinačnih komponenti supstrata, osnovni kriterijum za validnost testa (prosečno preživljavanje od minimum 70%) ispunjen je u dva tretmana: KP i SP (tabela 12).

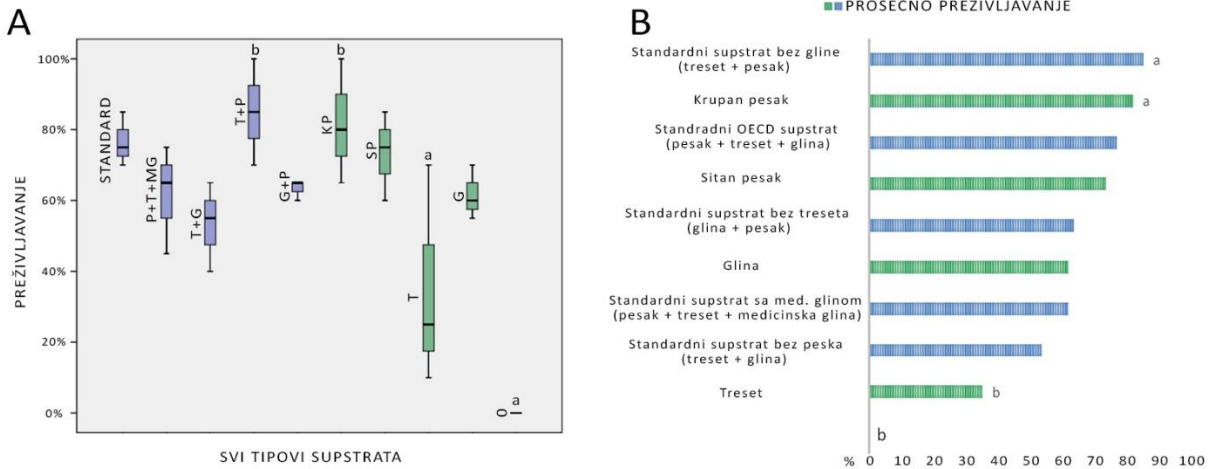
ANOVA je pokazala statistički značajne razlike u preživljavanju larvi između tretmana ($p=0,001$; $F=11,019$). *Post hoc* test je pokazao razlike u preživljavanju larvi između sledećih tretmana (Tukey HSD, $p<0,05$): ni jedna larva nije preživela u supstratu 0 (značajno niže

preživljavanje u odnosu na sve ostale supstrate, osim na supstrat T), gde je preživljavanje značajno niže nego u supstratu KP (u kome je zabeleženo najviše preživelih larvi) (Tabela 12). Kruskal-Wallis-ov test je pokazao značajno variranje mokre mase tela između različitih tipova podloge ($p < 0,001$). *Post hoc* Mann-Whitney test je pokazao da hironomide gajene na SP podlozi imaju značajno veću masu od jedinki gajenih na svim ostalim podlogama ($p < 0,05$).

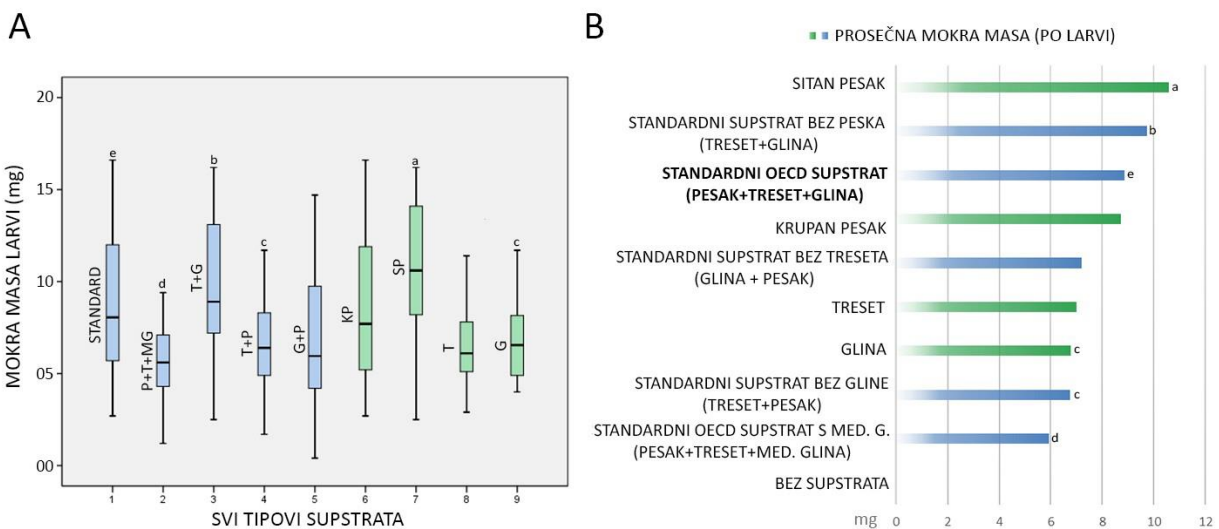
Tabela 12 - Preživljavanje i mokra masa *C. tentans* larvi na različitim tipovima supstrata sastavljenim iz pojedinačnih sastojaka supstrata (srednje vrednosti \pm SD u %). Kolona "Preživljavanje" - Tretman a je statistički značajno različit od tretmana b i c; tretman c je statistički značajno različit od svih ostalih tretmana, osim b (Tukey HSD $p < 0,05$); Kolona "mokra masa" tretman a je statistički značajno viši od tretmana b (Kruskal-Wallis $p < 0,05$);

Skraćenica	Tretman (tip podloge)	preživljavanje (mean \pm SD) %	Mokra masa (mean \pm SD) mg
KP	Krupan pesak	81,67 \pm 17,55 ^a	8,71 \pm 3,7 ^b
SP	Sitan pesak	73,3 \pm 12,5	10,58 \pm 3,1 ^a
T	Treset	35 \pm 31,2 ^b	6,99 \pm 3,31 ^b
G	Glina	61,6 \pm 7,6	6,77 \pm 2,12 ^b
0	Bez supstrata	0,0 \pm 0,0 ^c	0,0 \pm 0,0 ^b

Kada se sumiraju podaci iz čitavog **seta eksperimenata za testiranje i odabir adekvatne podloge** i iz analize izbacili tretman 0 (sa 0 preživelih larvi), ANOVA pokazuje statistički značajne razlike među tretmanima ($p = 0,025$, $F = 2,2998$). Najviše preživelih larvi zabeleženo je u KP i T+P supstratima, što predstavlja značajno više preživljavanje jedino od onog u supstratu P (gde je zabeleženo najmanje preživelih larvi), kako je pokazao Tukey HSD *post hoc* test ($p < 0,05$) (slika 35). Masa značajno varira među tretmanima (Kruskal-Wallis $p < 0,05$). Redosled tretmana prema rezultatima merenja rasta (od najvišeg ka najnižem) je sledeći: SP > T+G > STANDARD > KP > G+P > T > G > T+P > P+T+MG; pri čemu je *post hoc* test pokazao da jedinke tretmana SP imaju značajno veću masu od svih ostalih (osim tretmana T+G); jedinke tretmana T+G imaju značajno veću masu od onih iz P+T+MG, T+P i G; dok jedinke tretmana P+T+MG imaju značajno manju masu i od tretmana STANDARD (Kruskal-Wallis $p < 0,005$) (slika 36).



Slika 35 1- Procenat preživljavanja *C. tentans* larvi na svim testiranim tipovima supstrata predstavljenim zajedno, tretmani prvog biološkog testa obojeni su plavo, tretmani drugog zeleno. A – boxplot dijagrami stope preživljavanja sa SD vrednostima; B – prosečne stope preživljavanja sortirane u opadajućem nizu. * Tretmani a su statistički značajno različiti od tretmana b (Tukey HSD $p < 0,05$)



Slika 362 - Mokra masa *C. tentans* larvi (na svim testiranim tipovima supstrata predstavljenim zajedno, tretmani prvog biološkog testa obojeni su plavo, tretmani drugog zeleno. A – boxplot dijagrami mokre mase larvi sa SD vrednostima; B – prosečne mokre mase larvi sortirane u opadajućem nizu. * Tretmani a su statistički značajno različiti od svih ostalih osim b; tretman b razlikuje se od tretmana c i d; tretman e razlikuje se od tretmana e (Man Whitney $p < 0,005$)

4.2.1.3 Tradicionalna morfometrija

U prvom biološkom testu, namenjenom proceni uticaja mešavine komponenti supstrata, od ukupno 178 vizuelno analiziranih mentuma primećeno je samo dva mentuma sa vidljivim deformacijama, tj. odsustvom zuba, jedan G+P i jedan na T+P podlozi. Na ovim istim podlogama uočen je i najveći broj mentuma sa istrošenim zubima. Procenat deformisanih i istrošenih mentuma bio je izuzetno mali u odnosu na ukupan uzorak (manje od 4% i 18%, respektivno), te nije bilo moguće statistički obraditi rezultate.

U drugom biološkom testu, namenjenom proceni uticaja pojedinačnih komponenti supstrata, od ukupno 152 vizuelno analizirana mentuma, nije uočen ni jedan deformitet, dok je najveći broj mentuma sa istrošenim zubima primećen na podlogama KP i G. Procenat istrošenih mentuma bio je izuzetno mali u odnosu na ukupan uzorak (manje od 15%), te nije bilo moguće statistički obraditi rezultate.

Statistička analiza pokazala je značajno variranje svih testiranih parametara merenja metodom tradicionalne morfometrije (Man Whitney, $p < 0,05$) iz čitavog seta eksperimenata za testiranje i odabir adekvatne podloge (bez tretmana 0, na kome nije bilo preživelih larvi) (tabela 13).

Tabela 13 – Tradicionalna morfometrija - Dimenzije *C. tentans* larvi na različitim tipovima supstrata (srednje vrednosti \pm SD u mm).

Skraćenica	Tretman (tip podloge)	Dužina tela (mean \pm SD) mm	Dužina glave (mean \pm SD) mm	Širina glave (mean \pm SD) mm
STANDARD	Standardni OECD supstrat (pesak + treset + glina)	14,68 \pm 2,18	0,88 \pm 0,064 ^b	0,69 \pm 0,045 ^b
P+T+MG	Standardni supstrat sa medicinskom glinom (pesak + treset + medicinska glina)	13,62 \pm 2,52 ^b	0,86 \pm 0,12 ^b	0,7 \pm 0,09
T+G	Standardni supstrat bez peska (treset + glina)	15,3 \pm 2,54	0,89 \pm 0,065 ^b	0,72 \pm 0,058
T+P	Standardni supstrat bez gline (treset + pesak)	14,0 \pm 1,99	0,83 \pm 0,11	0,68 \pm 0,066 ^b
G+P	Standardni supstrat bez treseta (glina + pesak)	13,2 \pm 3,48 ^b	0,85 \pm 0,14 ^b	0,69 \pm 0,13 ^b
KP	Krupan pesak	14,55 \pm 2,09	0,89 \pm 0,065 ^b	0,70 \pm 0,044
SP	Sitan pesak	15,63 \pm 2,38 ^a	0,89 \pm 0,65 ^b	0,71 \pm 0,064
T	Treset	13,51 \pm 2,05 ^b	0,88 \pm 0,065 ^b	0,75 \pm 0,054 ^a
G	Glina	14,28 \pm 1,57	0,83 \pm 0,10 ^a	0,69 \pm 0,042

*vrednost a su statistički značajno različite od vrednosti b u istoj koloni ($p < 0,005$)

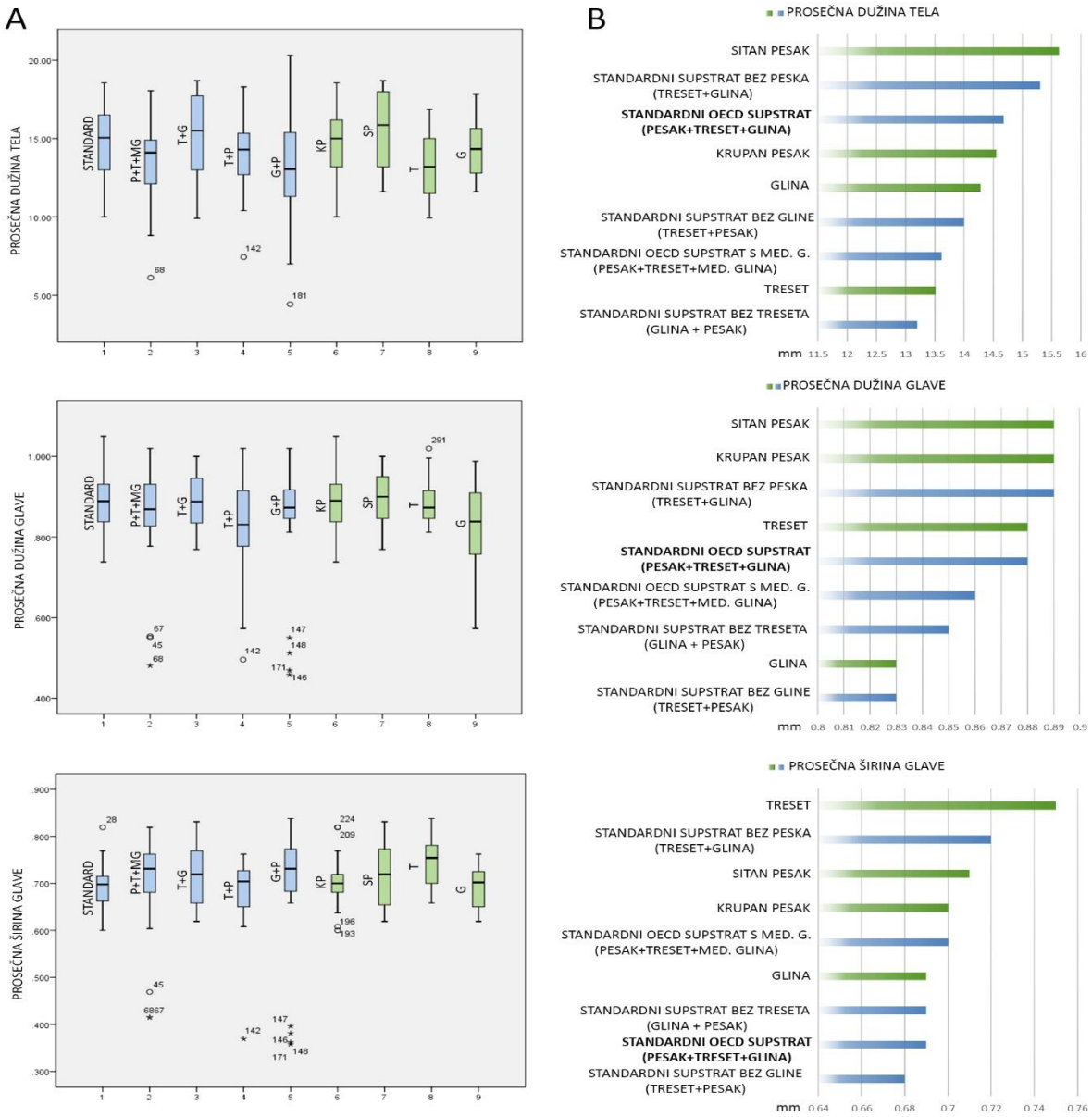
Redosled tretmana prema rezultatima merenja dimenzija tela (od najvećih ka najmanjim) je sledeći (slika 37):

Dužina tela: SP > T+G > **STANDARD** > KP > G > T+P > P+T+MG > T > G+P

Dužina glave: SP > KP > T+G > T > **STANDARD** > P+T+MG > G+P > T+P > G

Širina glave: T > T+G > SP > KP > P+T+MG > G > G+P > **STANDARD** > T+P

Post hoc test je pokazao značajnu razliku između sledećih tretmana (Man Whitney $p < 0,005$), jedinke tretmana SP su značajno dužeg tela od jedinki tretmana P+T+MG, T i G+P; jedinke tretmana G imaju statistički značajno kraće glave od svih ostalih jedinki, osim onih iz tretmana T+P; jedinke iz tretmana T imaju značajno šire glave od jedinki tretmana T+P, **STANDARD** i G+P.



Slika 37 - Dimenzije tela *C. tentans* larvi na svim testiranim tipovima supstrata predstavljenim zajedno, tretmani prvog biološki testa obojeni su plavo, tretmani drugog zeleno A – boxplot dijagrami dimenzija tela larvi sa SD vrednostima; B – prosečne dimenzije tela larvi sortirane u opadajućem nizu.

4.2.1.3. Geometrijska morfometrija

Iz seta eksperimenata za testiranje i odabir adekvatne podloge metodom geometrijske morfometrije analizirani su mentumi *C. tentans* larvi **iz prvog biološkog testa, namenjenog proceni uticaja mešavine komponenti supstrata.**

Fotografisani su mentumi ukupno 178 jedinki i na svakom je digitalizovano 29 specifičnih tačaka. Od ukupnog broja fotomikrografija, 159 je uključeno u dalje analize. U startu su isključena dva mentuma sa vidljivim deformacijama (jedan G+P i jedan na T+P podlozi), a potom je, putem programa, izbačeno još 17 jedinki iz analize, najviše iz G+P supstrata (tabela 14). Jedinke su grupisane u pet grupa, na osnovu testiranog tipa podloge: Standardni OECD supstrat (STANDARD); Standardni supstrat sa medicinskom glinom (P+T+MG); Standardni supstrat bez peska (T+G); Standardni supstrat bez gline (T+P) i Standardni supstrat bez treseta (G+P).

Tabela 14 - Set eksperimenata za testiranje i odabir adekvatne podloge - Biološki test namenjenog proceni uticaja mešavine komponenti supstrata. Broj uslikanih preparata (fotomikrografija) mentuma za analize metodom geometrijske morfometrije, za svaki tip podloge i broj fotomikrografija iskorišćenih u analizi.

Tretman (tip podloge)	Broj fotomikrografija mentuma	Boj fotomikrografija u analizi	Broj jedinki izbačenih iz analize
Standardni OECD supstrat (STANDARD)	34	30	-4
Standardni supstrat sa medicinskom glinom (P+T+MG)	36	33	-3
Standardni supstrat bez peska (T+G)	32	29	-3
Standardni supstrat bez gline (T+P)	46	43	-4
Standardni supstrat bez treseta (G+P)	30	24	-5
Ukupno	178	159	-19

ANOVA je pokazala značajne razlike u veličini centroida mentuma ($F=2,53$; $p=0,042$). *Post hoc* Tukey test je pokazao da se jedino dve grupe međusobno statistički značajno razlikuju po veličini centroida: standardni supstrat bez treseta (G+P), najveća veličina centroida i standardni supstrat sa medicinskom glinom (P+T+MG), najmanja veličina centroida u uzorku. MANOVA je pokazala je da postoje značajne razlike u obliku mentuma (Willks' $\lambda=0,144$; $F=3$; $P=0$), te je pristupljeno daljim analizama.

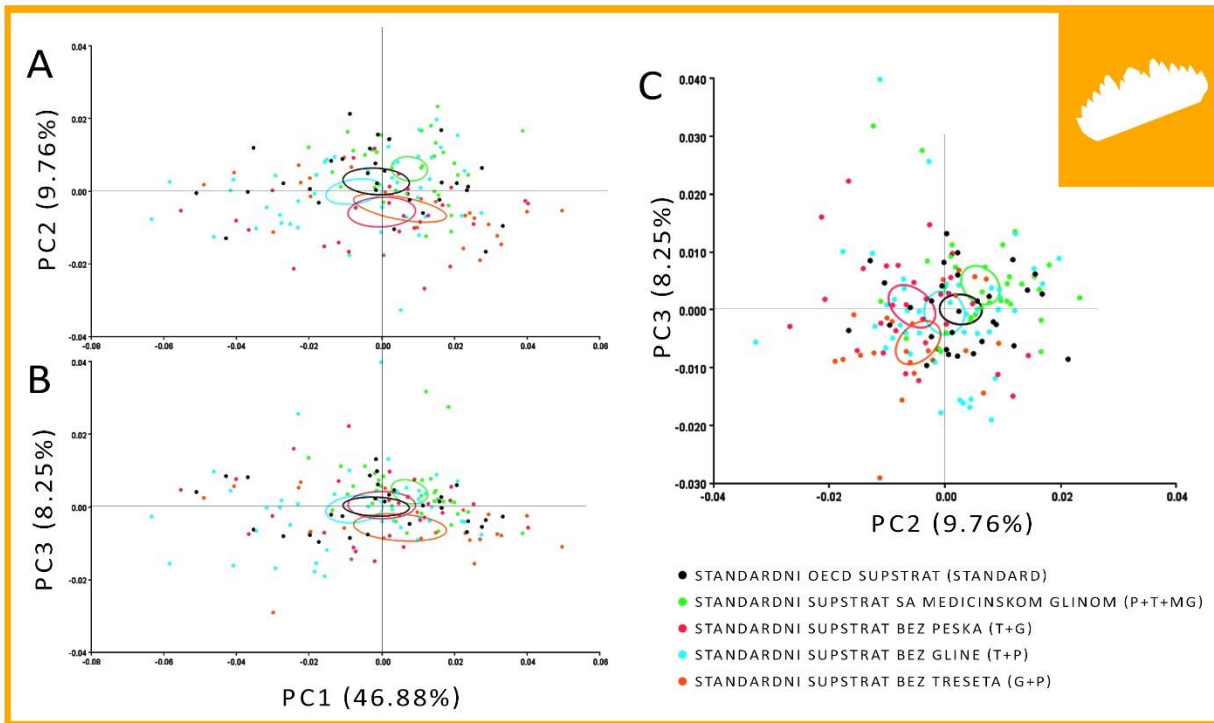
Regresiona analiza pokazala je da je ukupno 2,397% promena u obliku izazvano razlikama u veličini i da je ovaj procenat alometrije, iako veoma mali, stistički značajan, $P=0.0053$, te je dalja analiza izvršena na regresionim rezidualima.

PCA analiza i distribucija jedinki u okviru tretmana u morfološkom prostoru definisanom prvim trima PC osama ukazuje na razdvajanje grupa na osnovu morfologije mentuma (tabela 15, slika 38). Primećuje se grupisanje tretmana u centru morfološkog prostora, sa velikim procentom preklapanja između grupa, pri čemu se STANDARD i T+P uglavnom nalaze u centru (jedinke ovih grupa imaju mentume najpribližnije “prosečnom” obliku). Prema PC1 osi (koja opisuje skoro polovinu varijabilnosti u uzorku, oko 47%) primećuje se neznatno veća varijabilnost G+P uzorka u odnosu na ostale. Prema svim osama, primećuje se izdvajanje P+T+MG tretmana od ostalih.

Ukupna varijabilnost uzorka iznosi 0,00103681, a unutar svake grupe pojedinačno u tretmanu STANDARD iznosi 0,00094950, u tretmanu P+T+MG iznosi 0,00057009, u tretmanu T+G iznosi 0,00097427, u tretmanu T+P iznosi 0,00123888, a u tretmanu G+P iznosi 0,00113108.

Tabela 15 – Prvih 11 PC osa (od ukupno 27), koje opisuju preko 90% ukupne varijabilnosti u uzorku na osnovu PCA analize konstelacije 29 tačaka koje opisuju oblik i veličinu mentuma larvi hironomida. Set eksperimenata za testiranje i odabir adekvatne podloge - Biološki test namenjenog proceni uticaja mešavine komponenti supstrata.

PC osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1.	0,00048614	46,888	46,888
2.	0,00010120	9,761	56,649
3.	0,00008551	8,248	64,897
4.	0,00006847	6,604	71,501
5.	0,00005639	5,439	76,939
6.	0,00003571	3,444	80,384
7.	0,00002690	2,594	82,978
8.	0,00002611	2,519	85,497
9.	0,00002444	2,357	87,854
10.	0.00001999	1.928	89.782
11.	0.00001777	1.714	91.496



Slika 383 – PCA analiza mentuma larvi hironomida iz seta eksperimenata za testiranje i odabir adekvatne podloge - Biološki test namenjenog proceni uticaja mešavine komponenti supstrata - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom A - prvom i drugom PC osom; B - prvom i trećom PC osom; C – drugom i trećom PC osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe, tj. tretmana sa 90% intervalom pouzdanosti.

CVA analiza i distribucija jedinki, u okviru tretmana, u morfološkom prostoru definisanom CV osama pokazuje jasna razdvajanja na osnovu morfologije mentuma (tabela 16, slika 39). CV1 osa objašnjava najveći deo varijabilnosti u uzorku (45,61%) i duž njenog centra se grupišu tri tretmana: STANDARD, T+G i T+P, dok se od ove grupe odvajaju P+T+MG tretman (u negativnom delu) i G+P tretman (u pozitivnom delu). Po CV2 osi (koja objašnjava skoro duplo manje varijabilnosti, 25,24%) T+G i STANDARD se grupišu zajedno u negativnom delu, dok se P+T+MG, T+P i G+P grupišu u pozitivnom delu, ali sa znatno manjim međusobnim preklapanjem. Uočavaju se najveće promene duž CV1 ose: jedinke P+T+MG tretmana (negativni deo CV 1 ose) imaju izdužene mentume, sa najvećim promenama na specifičnim tačkama 11, 15 i 19 (izduživanje vrhova centralnog i unutrašnjih lateralnih zuba); jedinke G+P tretmana (pozitivni deo CV1 ose) imaju kraće zube (sa velikim promenama na specifičnim tačkama 3, 4, 6 i 11 sa leve i 19, 24 i 26 sa desne strane mentuma). Po PC2 osi promene na

mentumima su neznatne. Jedinke pozicionirane centralno (pre svega tretmana T+P i T+G) imaju mentume najpribližnije “centralnom” neizmenjenom obliku. Mahalanobisove distance pokazuju statistički značajnu razliku između svih grupa, pri čemu je najveća distanca između P+T+MG i G+P, a najmanja između T+P i T+G tretmana (tabela 17).

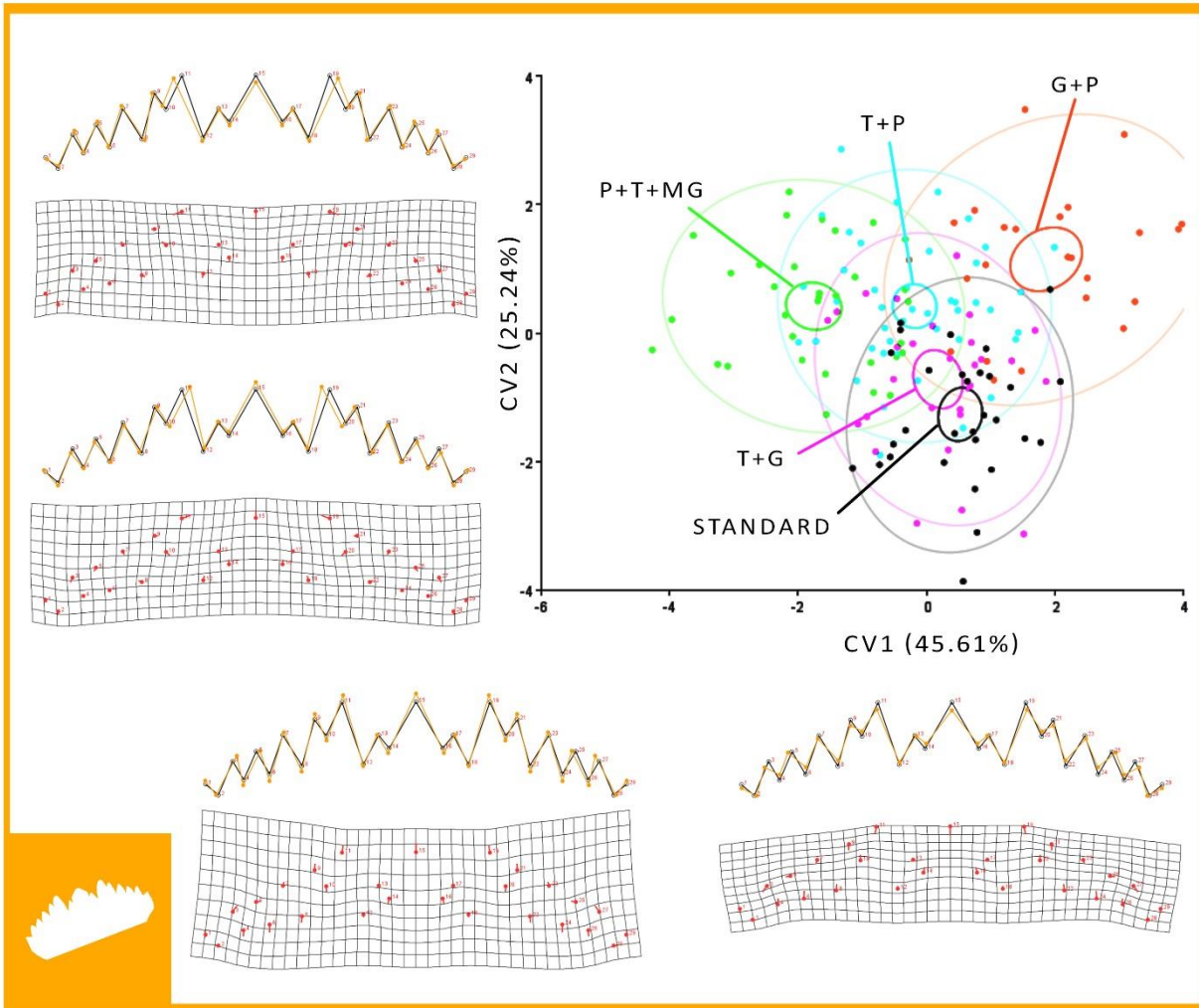
Tabela 16 – Sopstvene vrednosti i procenti varijabilnosti koje objašnjavaju CV ose na osnovu CVA analize konstelacije 29 tačaka koje opisuju oblik i veličinu mentuma larvi hironomida. Set eksperimenata za testiranje i odabir adekvatne podloge – Biološki test namenjen proceni uticaja mešavine komponenti supstrata.

CV osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1.	1,27146800	45,610	45,610
2.	0,70376153	25,245	70,855
3.	0,43395970	15,567	86,422
4.	0,37852967	13,578	100,000

Tabela 17 – Mahalanobisove distance između grupa i p vrednosti dobijene permutacionim testom (10000 permutacija) mahalanobisovih distanci. Razlike su statistički značajne između svih grupa.

		Mahalanobisove distance					
		Tretmani (mentumi)	STANDARD	P+T+MG	T+G	T+P	G+P
p vrednosti permutacionih testova	STANDARD			2,9597	2,1162	2,2308	2,905
	P+T+MG	<,0001*			2,6581	2,2337	3,6945
	T+G	<,0001*	<,0001*			2,1084	2,8467
	T+P	<,0001*	<,0001*	<,0001*			2,6708
	G+P	<,0001*	<,0001*	<,0001*	<,0001*	<,0001*	

*statistički značajne razlike između grupa, $p < 0,05$



Slika 394 - CVA analiza mentuma larvi hironomida iz seta eksperimenata za testiranje i odabir adekvatne podloge – Biološki test namenjen proceni uticaja mešavine komponenti supstrata - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugom CV osom. Tamnije elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe, tj. tretmana sa 90% intervalom pouzdanosti, dok svetlije elipse opisuju ceo skupove. “Transformation grid” i “Wireframe” graficima predstavljene su pecifčne promene u obliku mentuma asocirane sa svakom osom (faktor skaliranja 8): prosečni oblik mentuma obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen narandžasto.

4.2.2. Set eksperimenata za procenu toksičnosti nanočestica

4.2.2.1. Ispitivanje toksičnosti TiO₂ nanočestica

Prvi biološki test za procenu letalnih efekata (uticaja na odrasle jedinke), koji se sastojao iz sedam tretmana sa po četiri relikata (125 mg/kg TiO₂; 250 mg/kg TiO₂; 500 mg/kg TiO₂; 1000 mg/kg TiO₂; 2000 mg/kg TiO₂; 4000 mg/kg TiO₂ i kontrolni tretman) završen je pet dana nakon što je zabeleženo izletanje poslednje odrasle jedinke, nakon 29 dana.

Drugi biološki test za procenu subletalnih efekata (uticaja na morfološke promene usnog aparata larvi), koji se sastojao iz četiri tretmana sa po tri replikata (2,5 mg/kg TiO₂; 25 mg/kg TiO₂; 250 mg/kg TiO₂ i kontrolni tretman) završen je tri dana nakon što su primećene prve larve četvrtog stupnja, nakon 11 dana.

Standardni parametri

Prvi biološki test za procenu letalnih efekata nano-TiO₂ (uticaja na odrasle jedinke)

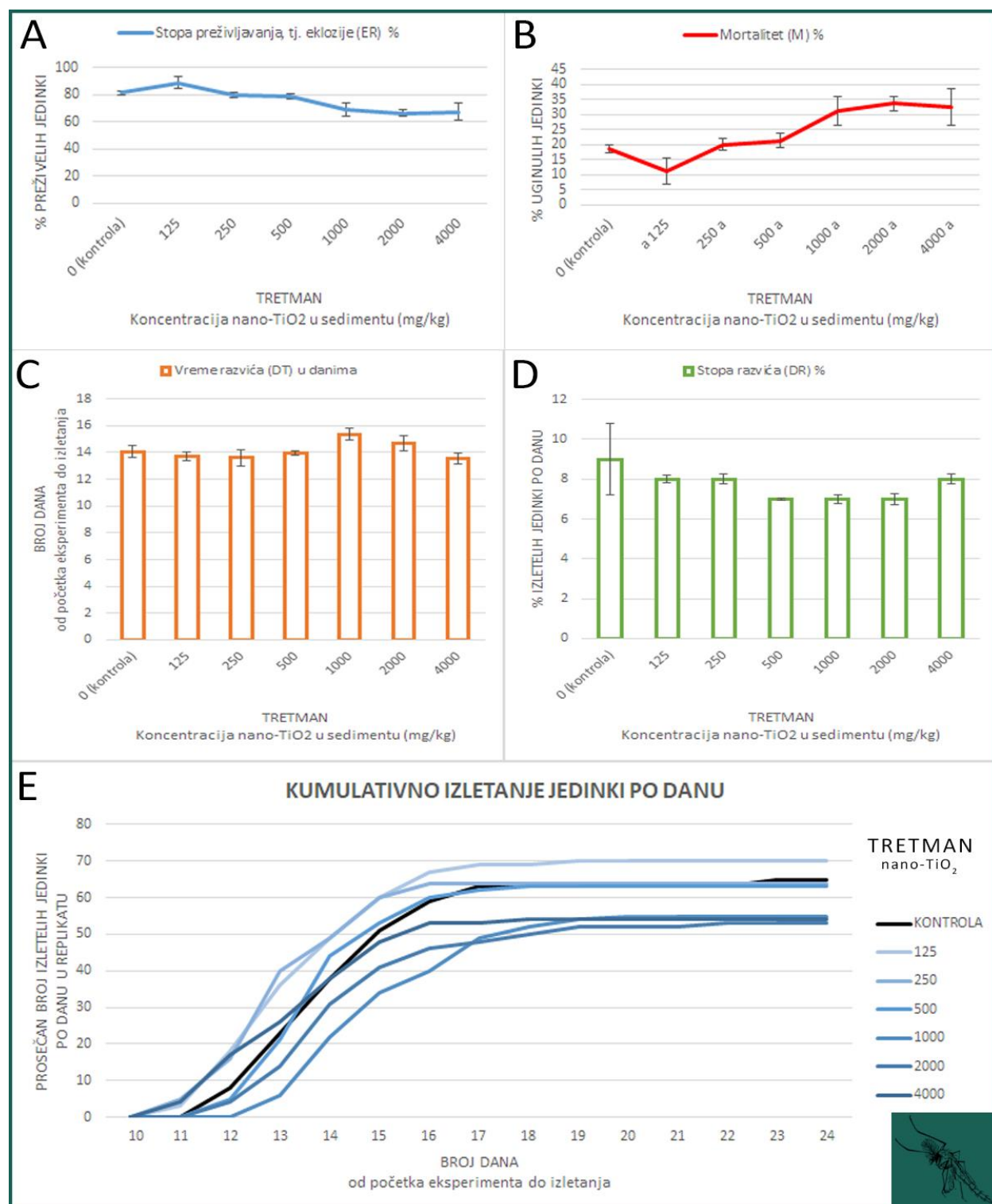
Odrasle jedinke su počele sa izletanjem 11 dana od početka eksperimenta (od ubacivanja larvi u test posude), a poslednja jedinka izletela je nakon 24 dana. Nije bilo statistički značajne razlike u analiziranim parametrima između polova (T test) te su rezultati za mužjake i ženke pulirani u statističkoj analizi. Rezultati analize pokazali su značajno variranje između grupa za ukupno dva od četiri standardnih parametara (tabela 18, slika 40).

Tabela 18 – Drugi biološki test za procenu uticaja nano-TiO₂ - standardni parametri *C. tentans*. Stopa preživljavanja (ER) - % izletelih jedinki na kraju eksperimenta; stopa mortaliteta (M) - % uginulih jedinki na kraju eksperimenta; vreme razvića (DT) – broj dana od početka eksperimenta do izletanja; stopa razvića (DR) – prosečan % izletelih jedinki po danu *statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu (p<0,05)

Koncentracija nano-TiO ₂ u sedimentu (mg/kg)	0 (kontrola)	125	250	500	1000	2000	4000
ER ± SD (%)	81 ± 3	89 ± 9	80 ± 4	79 ± 5	69 ± 9*	66 ± 5*	68 ± 12*
M ± SD (%)	19 ± 3	11 ± 9	20 ± 4	21 ± 5	31 ± 9*	34 ± 5*	32 ± 12*
DT ± SD (dan)	14,05 ± 0,9	13,71 ± 0,69	13,59 ± 1,17	13,95 ± 0,28	15,37 ± 0,94	14,69 ± 1,13	13,55 ± 0,83
DR ± SD (% izletelih jedinki/dan)	9 ± 4	8 ± 0	8 ± 0	7 ± 0	7 ± 0	7 ± 1	8 ± 0

ER i **M** su značajno varirali između grupa (ANOVA: $p < 0,01$, $F = 5,425$; Kruskale-Wallis test: $p < 0,05$, respektivno). Efekat nano-TiO₂ bio je zavisao od doze, povećavao se sa koncentracijom nanočestica u sedimentu, i bio statistički značajan za tri najviše koncentracije u poređenju sa kontrolom. *Post hoc* Dunnett t-test i Manne Whitney pokazali su da postoje značajne razlike između kontrolnog i tretmana sa visokim koncentracijama (1000, 2000, 4000 mg/kg TiO₂), ali da ne postoje razlike između kontrolnog i tretmana sa niskim koncentracijama (125, 250, 500 mg/kg TiO₂) u preživljavanju jedinki. Prosečan broj izletelih jedinki po replikatu je varirao od 16, u kontrolnom tretmanu, do 13, u tretmanu sa 4000 mg/kg TiO₂. Mortalitet u kontroli je prosečno iznosio 19%, dok prosečno 33% jedinki nije preživelo u tretmanu sa najvišom koncentracijom (4000 mg/kg TiO₂) na kraju eksperimenta.

Vreme razvića, **DT**, nije variralo značajno među grupama (ANOVA: $p > 0,05$), a prosečno vreme razvića za sve grupe iznosilo je oko 14 dana. Shodno tome, ni stopa razvića, **DR**, nije pokazala značajnu varijabilnost, a prosečna stopa razvića u svim grupama iznosila je 0,077 (dakle $\approx 8\%$ jedinki je izletalo u toku jednog dana).



Slika 40 – Biološki test za procenu uticaja nano-TiO₂ na standardne parametre. Uticaj na: A – stopu preživljavanja, eklozije (ER); B - mortalitet (M); C – vreme razvića (DT); D – stopu razvića (DR); E – odlaganje razvića larvi u odrasle jedinke. Prikazane su rosečne vrednosti za sve repikate u jednom tretmanu.

Drugi biološki test za procenu subletalnih efekata nano-TiO₂ (uticaja na morfološke promene larvi)

Ispunjen je osnovni kriterijum za validnost testa (prosečno preživljavanje od minimum 70% u kontroli). Prve larve četvrtog stupnja primećene su nakon osam dana. Iako je primetno opadanje preživljavanja sa povećanjem koncentracije nano-TiO₂, rezultati ne pokazuju statistički značajno variranje između grupa ni za jedan parametar (tabela 19).

Tabela 19 - Drugi biološki test za procenu uticaja nano-TiO₂ - preživljavanje i mokra masa *C. tentans* larvi (srednje vrednosti ± SD u %).

redni broj tretmana	tretman (koncentracija nano-TiO ₂ mg/kg)	preživljavanje (mean ± SD) %	Mokra masa (mean ± SD) mg
1	2,5	70 ± 21,8	8,74 ± 1,6
2	25	70 ± 8,6	10,41 ± 1,8
3	250	65 ± 5	8,67 ± 1,36
4	kontrola	83,3 ± 10,4	9 ± 1,1

Procena količine unetih nanočestica (ICP-MS)

Analiza je pokazala da netretirane larve *C. tentans* u svojim telima sadrže prosečno 55,13 mg nano-TiO₂ po kg mokre mase (ova “pozadinska” koncentracija iz kontrolnog uzorka oduzeta je od detektovanih vrednosti u tretmanima, kako bi se dobile konkretne vrednosti unetih nanočestica tokom eksperimenta) (tabela 20).

Tabela 20 - ICP-MS analiza koncentracije nano-TiO₂ u telima *C. tentans* larvi *Tretmani a i b su statistički značajno različiti od tretmana c (p<0,05)

Tretman (mg nano-TiO ₂ /kg sedimenta)	2.5	25	250
Nano-TiO ₂ koncentracija u telima larvi average ± SD (mg TiO ₂ /kg mokre mase)	67,30 ± 38,45 ^a	493,63 ± 173,20 ^b	6850,77 ± 4244,60 ^c

Razlike među tretmanima bile su statistički značane (ANOVA: $p < 0,05$; $F = 7,198$). *Post hoc* Tukey HSD test je pokazao da larve tretirane sa 2,5 mg/kg i 25 mg/kg nano-TiO₂ imaju značajno niže koncentracije nanočestica u telima, od larvi tretiranih sa 250 mg/kg nano-TiO₂. Nivo nano-TiO₂ u telima larvi se povećavao sa povećanjem koncentracije nano-TiO₂ u sedimentu: kada se koncentracija nanočestica u sedimentu povećavala 100x (od 2,5 do 250 mg/kg nano-TiO₂) koncentracija u telima larvi se povećavala za 101,75x (od 67,33 mg/kg do 6851 mg/kg nano-TiO₂ u proseku). Spearman rho test je pokazao visoku pozitivnu korelaciju između koncentracije nanočestica u sedimentu i njihove koncentracije u telima larvi, $\rho = 0,923$, $p < 0,0001$.

Tradicionalna morfometrija – mentumi

Analizirano je ukupno 164 mentuma larvi *C. tentans* i na svakom je definisano i mereno ukupno osam rastojanja koja opisuju dimenzije ove strukture usnog aparata (tabela 21, slika 41).

Tabela 21 - Biološki test za procenu uticaja nano-TiO₂ – Dimenzije mentuma *C.tentans* larvi merene metodom tradicionalne morfometrije (srednje vrednosti \pm SD u %): 1. rastojanje između Setae submenti; 2. rastojanje između vrhova poslednjih lateralnih zuba; 3. širina baze centralnog zuba; 4. širina baze unutrašnjeg lateralnog zuba (levo); 5. širina baze unutrašnjeg lateralnog zuba (desno); 6. rastojanje između vrha centralnog i vrha poslednjeg lateralnog zuba (levo); 7. rastojanje između vrha centralnog i vrha poslednjeg lateralnog zuba (desno); 8. visina mentuma (rastojanje između vrha centralnog zuba i linije koja spaja Setae submenti); *Tretmani a imaju statistički značajno manjnije vrednosti od tretmana b ($p < 0,05$)

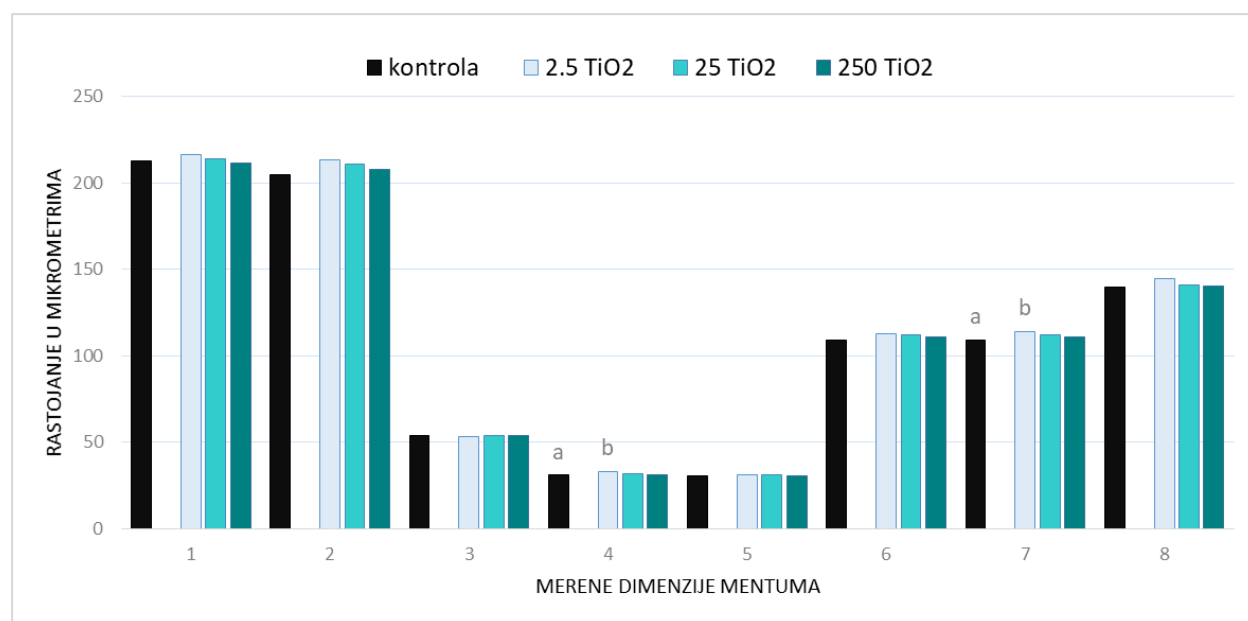
redni broj tretmana	Tretman (koncentracija nano-TiO ₂ mg/kg)	Merene dimenzije mentuma rastojanja (mean \pm SD) μ							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1	2,5	216,18 \pm 6,18	213,43 \pm 9,84	53,58 \pm 0,69	32,93 \pm 1,93 ^b	31,34 \pm 0,99	112,83 \pm 6,48	114,19 \pm 6,27 ^b	144,59 \pm 6,47
2	25	214,16 \pm 8,18	210,76 \pm 4,65	53,96 \pm 0,48	31,78 \pm 1,92	31,07 \pm 1,28	112,19 \pm 1,23	112,42 \pm 2,73	141,08 \pm 1,27
3	250	211,47 \pm 1,79	207,82 \pm 2,32	53,89 \pm 1,02	31,38 \pm 0,84	30,82 \pm 0,39	110,72 \pm 1,29	111,19 \pm 1,23	140,46 \pm 1,35
4	kontrola	212,84 \pm 7,49	205,01 \pm 7,21	53,73 \pm 2,52	30,95 \pm 1,71 ^a	30,71 \pm 1,31	109,01 \pm 3,22	109,19 \pm 3,15 ^a	139,9 \pm 4,42

ANOVA je pokazala da samo dva od osam parametara, statistički značajno variraju ($p=0,039$ i $F=2,853$; $p=0,043$ i $F=2,778$, respektivno) između tretmana (slika 42):

- Parametar 4 - širina baze unutrašnjeg lateralnog zuba (na levoj strani mentuma);
- Parametar 7 - rastojanje između vrha centralnog i vrha poslednjeg lateralnog zuba (na desnoj strani mentuma).

Parametar 2, rastojanje između vrhova poslednjih lateralnih zuba (koji predstavlja širinu mentuma), je na granici statističke značajnosti (ANOVA $p=0,052$)

Post hoc LSD test je pokazao sledeće rezultate: širina baze unutrašnjeg lateralnog zuba (na levoj strani mentuma); je značajno manja kod larvi u kontroli nego kod larvi tretiranih sa 2,5 mg/kg nano-TiO₂; identičan obrazac variranja se pokazuje kod distance između vrha centralnog i poslednjeg lateralnog zuba sa desne strane (slika 42).



Slika 42 - Prvi biološki test za procenu uticaja nano-TiO₂ – Usporedni prikaz dimenzija mentuma *C. tentans* larvi u različitim tretmanima merenih metodom tradicionalne morfometrije. *Tretmani a su statistički značajno manji od tretmana b ($p<0,05$)

Geometrijska morfometrija

Vizuelnom analizom morfoloških struktura, od ukupno 173 jedinki izbačeno je 13 mandibula i 9 mentuma (Prilog 3 i 4). Među mandibulama uočeno je 11 (6,36% od ukupno analiziranih) vidljivo deformisanih (dve u tretmanu sa 2,5 mg/kg; dve u tretmanu sa 25 mg/kg; tri

u tretmanu sa 250 mg/kg i četiti u kontroli, u vidu nedostatka apikalnog ili viška unutrašnjeg zuba) i dve potpuno oštećene; među mentumima uočeno je pet (2,89%) deformisanih (jedan u tretmanu sa 25 mg/kg - dodatni zub na centralnom zubu; četiri u kontroli - gubitak jednog ili više lateralnih zuba ili potpuni gubitak centralnog zuba) i četiri potpuno oštećena. Procenat deformisanih i istrošenih struktura bio je izuzetno mali u odnosu na ukupan uzorak, te nije bilo moguće statistički obraditi rezultate. Jedinke sa ovakvim strukturama su izbačene iz daljih analiza metodom geometrijske morofometrije.

Mandibule

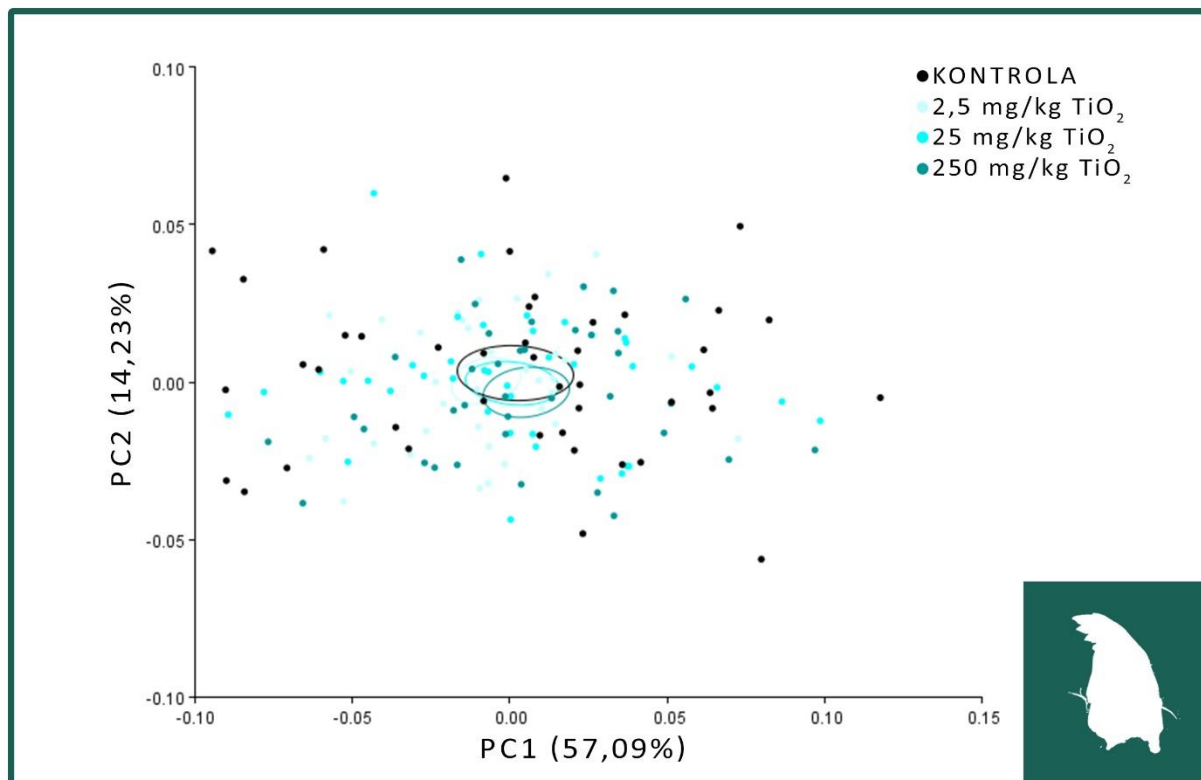
Fotografisane su desne mandibule ukupno 160 jedinki i na svakoj je digitalizovano 18 specifičnih tačaka. Pomoću samog programa uočeno je još 6 (3,75% od ukupnog uzorka) jedinki sa “ekstreminim” vrednostima morfoloških parametara, koje su izbačene iz dalje analize. Jedinke su grupisane u četiri grupe, na osnovu tretmana TiO₂ nanočesticama: 2,5 mg/kg TiO₂; 25 mg/kg TiO₂; 250 mg/kg TiO₂ i kontrolna grupa.

ANOVA je pokazala da ne postoje značajne razlike u veličini mandibula ($F=2$; $p = 0,115$), dok je MANOVA pokazala značajne razlike u obliku mandibula (Willks' $\lambda=0,288$; $F=2$; $p<0,001$), te je pristupljeno daljim analizama.

Regresiona analiza pokazala je da je ukupno 2,98% promena u obliku izazvano razlikama u veličini i da je ovaj procenat alometrije, iako veoma mali, stistički značajan, $p=0,005$, te je dalja analiza izvršena na regresionim rezidualima. PCA analiza i distribucija jedinki u okviru tretmana na osnovu morfologije mandibula u morfoprostoru definisanom PC osama ne ukazuje na značajno razdvajanje medju analiziranim grupama (tabela 22, slika 43). Ukupna varijabilnost uzorka iznosi 0,00306689, a unutar svake grupe pojedinačno u tretmanu 2,5 mg/kg TiO₂ iznosi 0,00209004, u tretmanu 25 mg/kg TiO₂ iznosi 0,00285656, u tretmanu 250 mg/kg TiO₂ iznosi 0,00263830, a u kontroli iznosi 0,00449011.

Tabela 22 – Prvih 7 PC osa (od ukupno 32), koje opisuju preko 90% ukupne varijabilnosti u uzorku na osnovu PCA analize konstelacije 18 tačaka koje opisuju oblik i veličinu mandibula larvi hironomida. Biološki test sa TiO₂ nanočesticama.

PC osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1	0,00175	57,086	57,086
2	0,00044	14,227	71,313
3	0,00024	7,671	78,984
4	0,00015	4,885	83,87
5	9,5E-05	3,092	86,962
6	6,2E-05	2,032	88,994
7	4,5E-05	1,481	90,475



Slika 43 – PCA analiza mandibula larvi hironomida izlaganih TiO₂ nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugom PC osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svakog tretmana sa 90% intervalom pouzdanosti.

CVA analiza i distribucija jedinki u okviru tretmana u morfološkom prostoru definisanom CV osama pokazuju razdvajanje grupa na osnovu morfologije mandibula, međutim sa dosta preklapanja (tabela 23, slika 44). CV1 osa objašnjava 55,24% ukupne varijabilnosti i

duž nje se primećuje gradacija tretiranih grupa od najmanje koncentracije u pozitivnom delu ose do najveće koncentracije u negativnom delu. CV2 osa objašnjava 31,4% varijabilnosti i pokazuje razdvajanje kontrolne grupe od tretiranih, sa najvećim preklapanjem između kontrole i grupe tretirane najnižom koncentracijom od 2,5 mg/kg TiO₂. Jedinke kontrolne i grupe tretirane najnižom koncentracijom TiO₂ (u negativnom delu obe ose) imaju uže mandibule, sa izduženijim unutrašnjim zubima; dok jedinke tretirane višom koncentracijom TiO₂ (u pozitivnom delu obe ose) imaju šire mandibule sa skraćenim zubima i skoro potpuno ravnim prvim unutrašnjim zubom. Analiza pokazuje najveće promene u prvom unutrašnjem zubu i tendenciju njegovog skraćivanja sa povećanjem koncentracije TiO₂. Razdvajanje grupa potvrđuju i vrednosti Mahalanobisovih distanci koje pokazuju značajnu razliku između svih grupa (tabela 24).

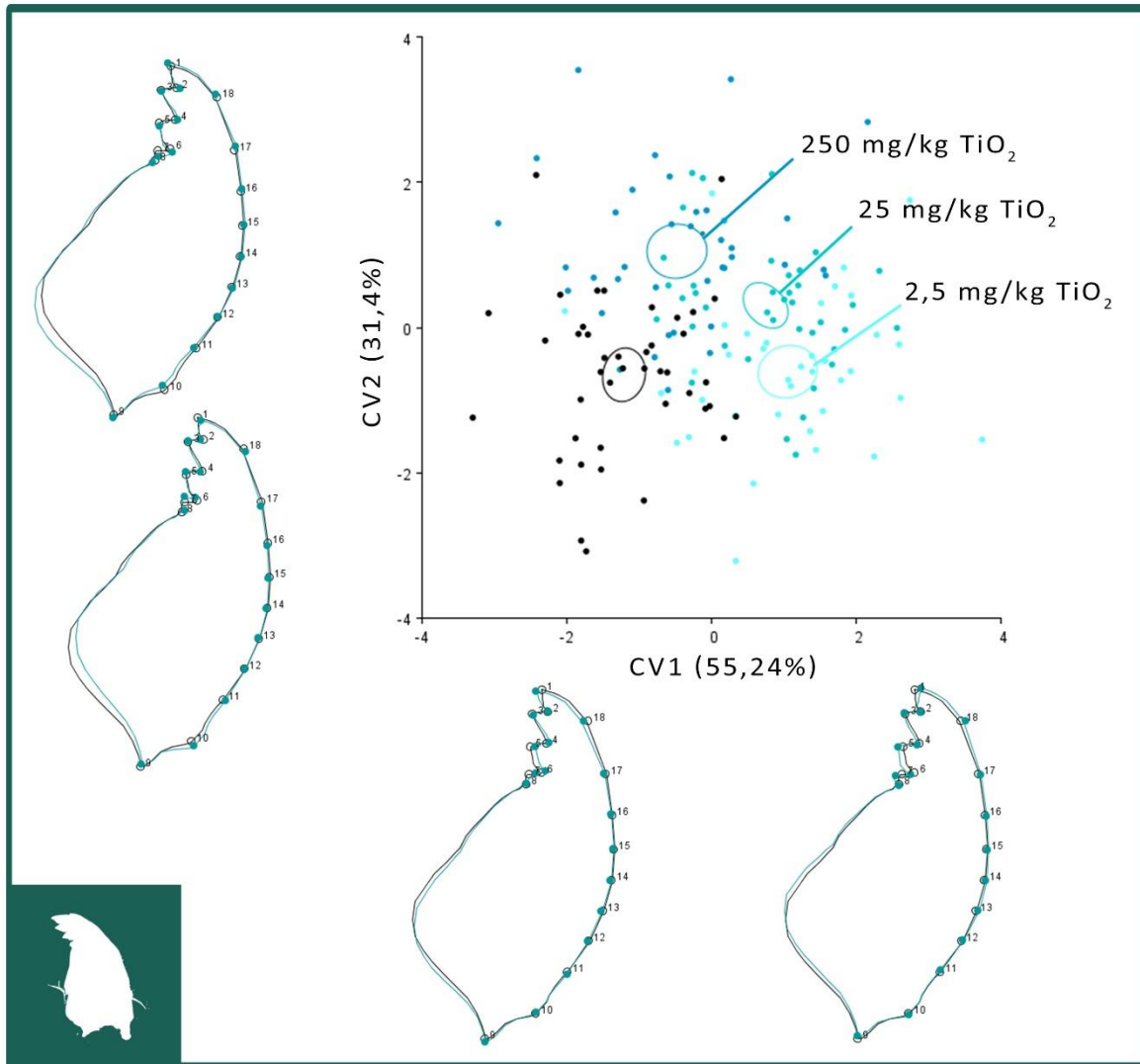
Tabela 23 – Sopstvene vrednosti i procenti varijabilnosti koje objašnjavaju CV ose na osnovu CVA analize konstelacije 18 tačaka koje opisuju oblik i veličinu mandibula larvi hironomida. Biološki test sa TiO₂ nanočesticama.

CV osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1	0,88148542	55,239	55,239
2	0,50102051	31,397	86,635
3	0,2132728	13,365	100

Tabela 24 – Mahalanobisove distance između grupa i p vrednosti dobijene permutacionim testom (10000 permutacija) mahalanobisovih distanci. Razlike su statistički značajne između svih grupa.

	Tretmani (mandibule)	Mahalanobisove distance			
		2,5 mg/kg TiO ₂	25 mg/kg TiO ₂	250 mg/kg TiO ₂	Kontrola
p vrednosti permutacionih testova	2,5 mg/kg TiO ₂		1,4973	2,262	2,3467
	25 mg/kg TiO ₂	0,012*		1,7787	2,2393
	250 mg/kg TiO ₂	<,0001*	0,0003*		1,9292
	Kontrola	<,0001*	<,0001*	<,0001*	

*statistički značajne razlike između grupa, p<0,05



Slika 445 – CVA analiza mandibula larvi hironomida izlaganih TiO_2 nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugom CV osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svakog tretmana sa 90% intervalom pouzdanosti. "Outline" graficima predstavljene su pecifične promene u obliku mandibula asocirane sa svakom osom (Faktor skaliranja 4): prosečni oblik mandibula obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen plavo.

Mentumi

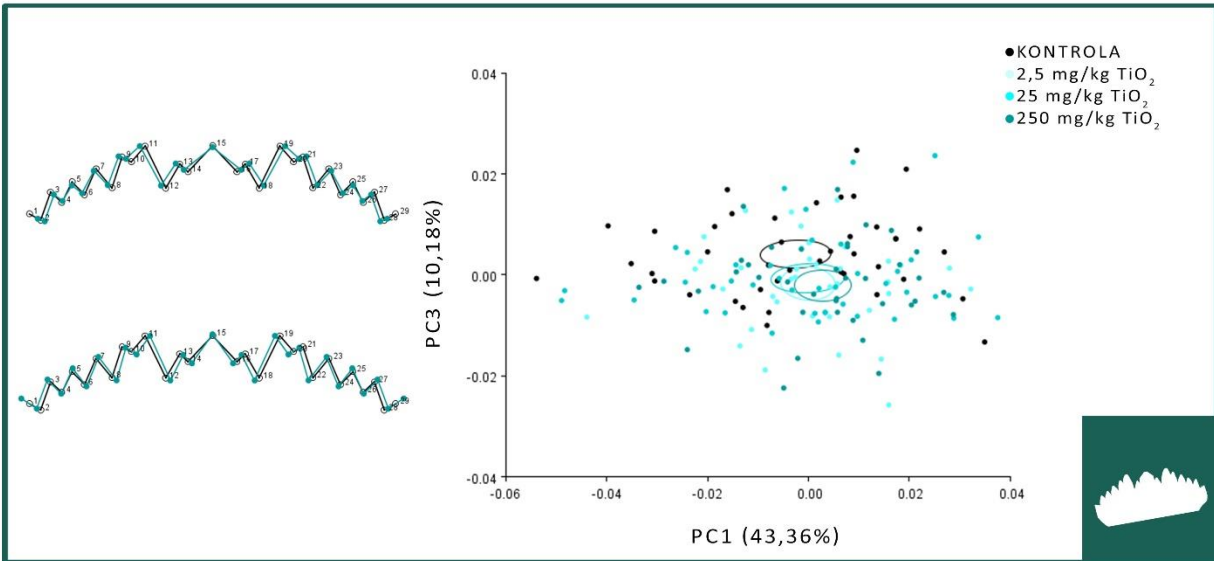
Fotografisani su mentumi ukupno 164 jedinke i na svakom je digitalizovano 29 specifičnih tačaka. Pomoću samog programa uočeno je još 10 (6,1% od ukupnog uzorka) jedinki sa “ekstremnim” vrednostima morfoloških parametara, koje su izbačene iz dalje analize. Jedinke su grupisane u četiri grupe, na osnovu tretmana TiO₂ nanočesticama: 2,5 mg/kg TiO₂; 25 mg/kg TiO₂; 250 mg/kg TiO₂ i kontrolna grupa.

Nije bilo značajne razlike u veličini mentuma među tretmanima (ANOVA $F=1,07$; $p = 0,362$), međutim MANOVA je pokazala da postoje značajne razlike u obliku mentuma (Willks’ $\lambda=0,428$; $F=2$; $p<0,001$), te je pristupljeno daljim analizama.

Regresiona analiza pokazala je da je ukupno 4,59% promena u obliku izazvano razlikama u veličini i da je ovaj procenat alometrije, iako veoma mali, stistički značajan, $p=0,0001$, te je dalja analiza izvršena na regresionim rezidualima. PCA analiza i distribucija jedinki u okviru tretmana u morfološkom prostoru definisanom PC osama ukazuju na postojanje razdvajanja između kontrole i tretiranih grupa, na osnovu morfologije mentuma (tabela 25, slika 45). Najbolje uočljivo razdvajanje kontrole od ostalih tretmana je duž PC3 ose (10,18% varijabilnosti), pri čemu jedinke kontrolne grupe (pozitivni deo ose) karakterišu širi centralni zubi i skraćeni lateralni zubi, dok je kod jedinki tretiranih grupa (negativni deo ose) situacija obrnuta. Ukupna varijansa uzorka iznosi 0,00074759, a unutar svake grupe pojedinačno: u tretmanu 2,5 mg/kg TiO₂ iznosi 0,00073474, u tretmanu 25 mg/kg TiO₂ iznosi 0,00083286, u tretmanu 250 mg/kg TiO₂ iznosi 0,00064011, a u kontroli iznosi 0,00087241.

Tabela 25 – Prvih 12 PC osa (od ukupno 27), koje opisuju preko 90% ukupne varijabilnosti u uzorku na osnovu PCA analize konstelacije 29 tačaka koje opisuju oblik i veličinu mentuma larvi hironomida. Biološki test sa TiO₂ nanočesticama.

PC osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1	0,000324	43,357	43,357
2	8,86E-05	11,856	55,214
3	7,61E-05	10,18	65,394
4	4,38E-05	5,852	71,245
5	3,03E-05	4,059	75,304
6	2,62E-05	3,508	78,812
7	2,16E-05	2,894	81,706
8	1,81E-05	2,419	84,125
9	1,58E-05	2,117	86,242
10	1,45E-05	1,945	88,187
11	1,2E-05	1,606	89,793
12	1,04E-05	1,391	91,185



Slika 45 – PCA analiza mentuma larvi hironomida izlaganih TiO_2 nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i trećom PC osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svakog tretmana sa 90% intervalom pouzdanosti. “Wireframe” graficima predstavljene su pecifične promene u obliku mentuma asociirane sa PC3 osom (faktor skaliranja 0,04): prosečni oblik mentuma obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen plavo

CVA analiza i distribucija jedinki u okviru tretmana u morfološkom prostoru definisanom CV osama ukazuje na jasno razdvajanje grupa na osnovu morfologije mentuma (tabela 26, slika 46). CV1 osa objašnjava najveći deo varijabilnosti u uzorku (60,79%) i jasno razdvaja kontrolnu grupu od tretiranih, dok se po CV2 osi (25,95% varijabilnosti) odvaja grupa tretirana najnižom koncentracijom TiO_2 od ostalih dveju tretiranih grupa. Uočava se da jedinke kontrolne grupe (negativni ceo CV1 ose) imaju kraće zube sa širim bazama (pre svega centralni zub), dok jedinke tretiranih grupa (pozitivni deo CV1 ose) imaju duže zube sa užim bazama. Analiza pokazuje najveće promene u centralnom zubu (specifične tačke 12 do 18) i spoljašnjim lateralnim zubima (specifične tačke 2, 4, 26 i 28) i tendenciju sužavanja celokupne baze mentuma, izduživanje zuba i izvijanje lateralnih zuba ka bočnim stranama sa povećanjem koncentracije TiO_2 . Mahalanobisove distance pokazuju statistički značajnu razliku između kontrolne grupe i svih tretiranih grupa (tabela 27).

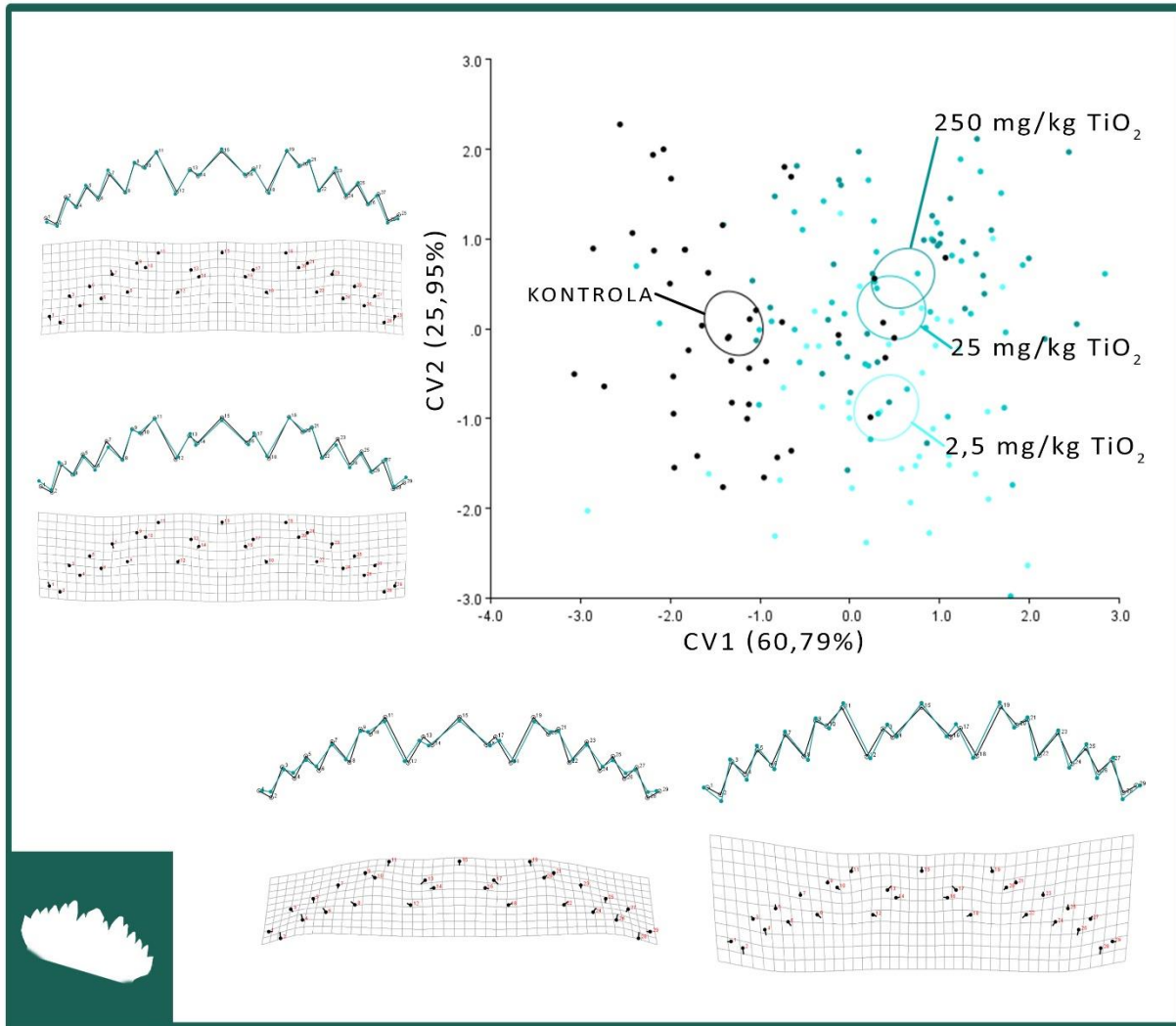
Tabela 26 – Sopstvene vrednosti i procenti varijabilnosti koje objašnjavaju CV ose na osnovu CVA analize konstelacije 29 tačaka koje opisuju oblik i veličinu mentuma larvi hironomida. Biološki test sa TiO₂ nanočesticama.

CV osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1	0,65055	60,789	60,789
2	0,277678	25,947	86,736
3	0,141947	13,264	100

Tabela 27 – Mahalanobisove distance izmedju grupa i p vrednosti dobijene permutacionim testom (10000 permutacija) mahalanobisovih distanci.

		Mahalanobisove distance				
		Tretmani (mentumi)	2,5 mg/kg TiO ₂	25 mg/kg TiO ₂	250 mg/kg TiO ₂	Kontrola
p vrednosti permutacionih testova	2,5 mg/kg TiO ₂			1,3167	1,4868	1,9478
	25 mg/kg TiO ₂		0,1206		1,0938	1,864
	250 mg/kg TiO ₂		0,0184	0,6845		1,9992
	Kontrola		<,0001*	<,0001*	<,0001*	

*statistički značajne razlike izmedju grupa, p<0,05

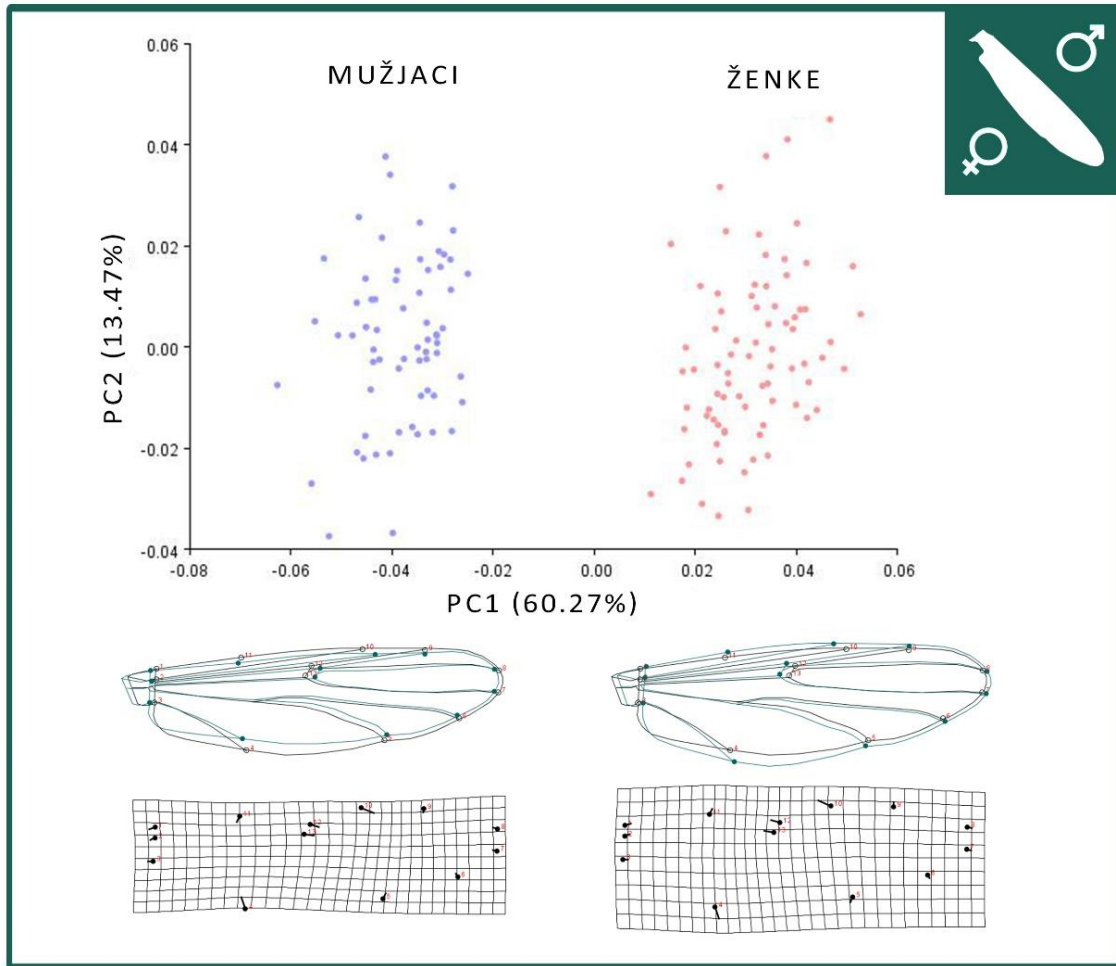


Slika 46 - CVA analiza mentuma larvi hironomida izlaganih TiO₂ nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugom CV osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe sa 90% intervalom pouzdanosti. "Transformation grid" i "Wireframe" graficima predstavljene su pecifične promene u obliku mandibula asocirane sa svakom osom (faktor skaliranja 6): prosečni oblik mentuma obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen plavo.

Krila

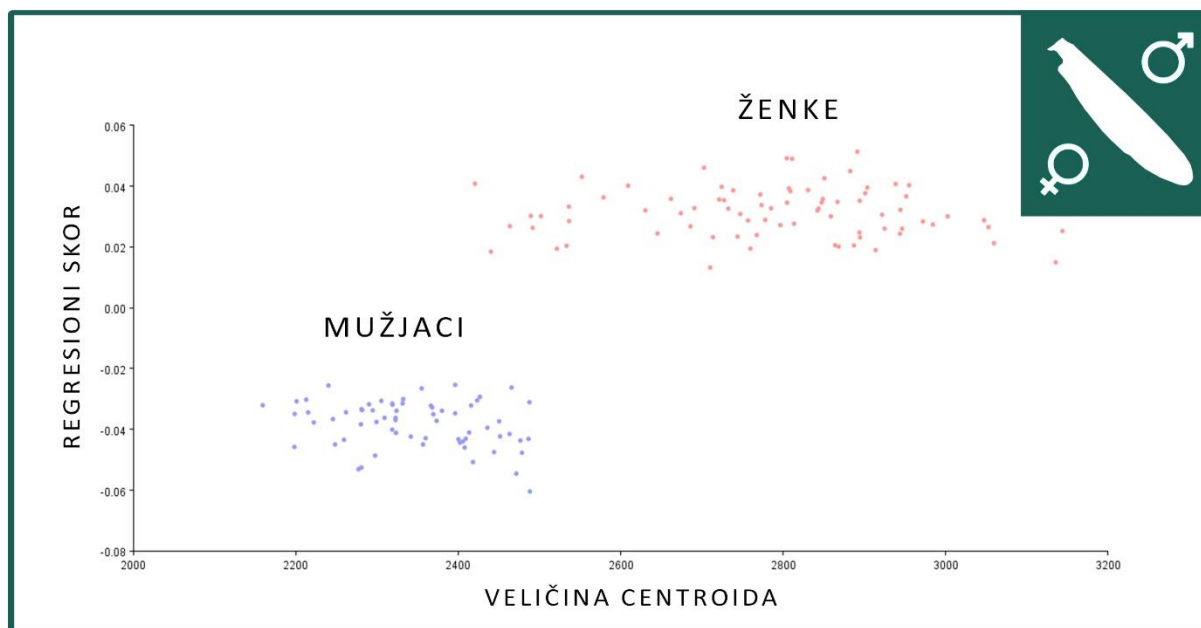
Fotografisana su desna krila ukupno 83 ženske i ukupno 70 muških odraslih jedinki hironomida i na svakom je digitalizovano 13 specifičnih tačaka. Od ukupnog broja fotomikrografija, krila 80 ženskih i 70 muških jedinki je uključeno u dalje analize. Jedinke su grupisane u sedam grupa, na osnovu tretmana TiO₂ nanočesticama: 125 mg/kg TiO₂; 250 mg/kg TiO₂; 500 mg/kg TiO₂; 1000 mg/kg TiO₂; 2000 mg/kg TiO₂; 4000 mg/kg TiO₂ i kontrolna grupa.

ANOVA je pokazala statistički značajne razlike u veličini krila ($F=376,73$, $p=0,00$), *Post Hoc* Tukey test je pokazao značajne razlike u veličini centroida između svih grupa mužjaka i ženki ($p<0,005$), a MANOVA statistički značajne razlike u varijabilnosti oblika krila između mužjaka i ženki (Willks' $\lambda=0,0293$; $F=1,834$; $p=0,00$), čime je potvrđeno postojanje polnog dimorfizma. PCA analiza je pokazala ukupnu varijabilnost uzorka od 0,00213752 i apsolutno razdvajanje ženki i mužjaka po PC1 osi (60,27% varijabilnosti). Grafici pokazuju da ženke imaju šira krila (specifične tačke od 4 do 11 pomeraju se ka obodu krila) sa skraćenim proksimalnim delom (specifične tačke 1, 2 i 3 se pomeraju ka unutrašnjosti krila); dok je kod mužjaka situacija obrnuta, krila su uža, pre svega u centralnom delu, sa izduženom bazom krila (slika 47).



Slika 47 – Usporedna PCA analiza desnih krila odraslih mužjaka i ženki hironomida izlaganih TiO_2 nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugom PC osom. “Transformation grid” i “Outline” graphicima predstavljene su pecifične promene u obliku krila asociirane sa svakom osom (faktor skaliranja 0,06): prosečni oblik krila obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen plavo.

Regresiona analiza dokazala je prisustvo alometrije, 39,95% ukupne varijabilnosti oblika uslovljava razlika u veličini krila, sa velikom značajnošću $p < 0,0001$. Krila ženki su zanačajnije veća od krila mužjaka, pri čemu veličina više varira kod ženki nego kod mužjaka (slika 48).



Slika 48 – Multivarijantna regresija varijabli oblika na veličinu centroida desnih krila mužjaka i ženki odraslih jedinki hironomida. Biološki test sa TiO₂ nanočesticama.

Usled postojanja statistički značajnih razlika između mužjaka i ženki u veličini i obliku krila, koje nisu umanjene tretmanom TiO₂ nanočesticama, dalje analize vršene su za svaki pol nezavisno.

Krila ženki

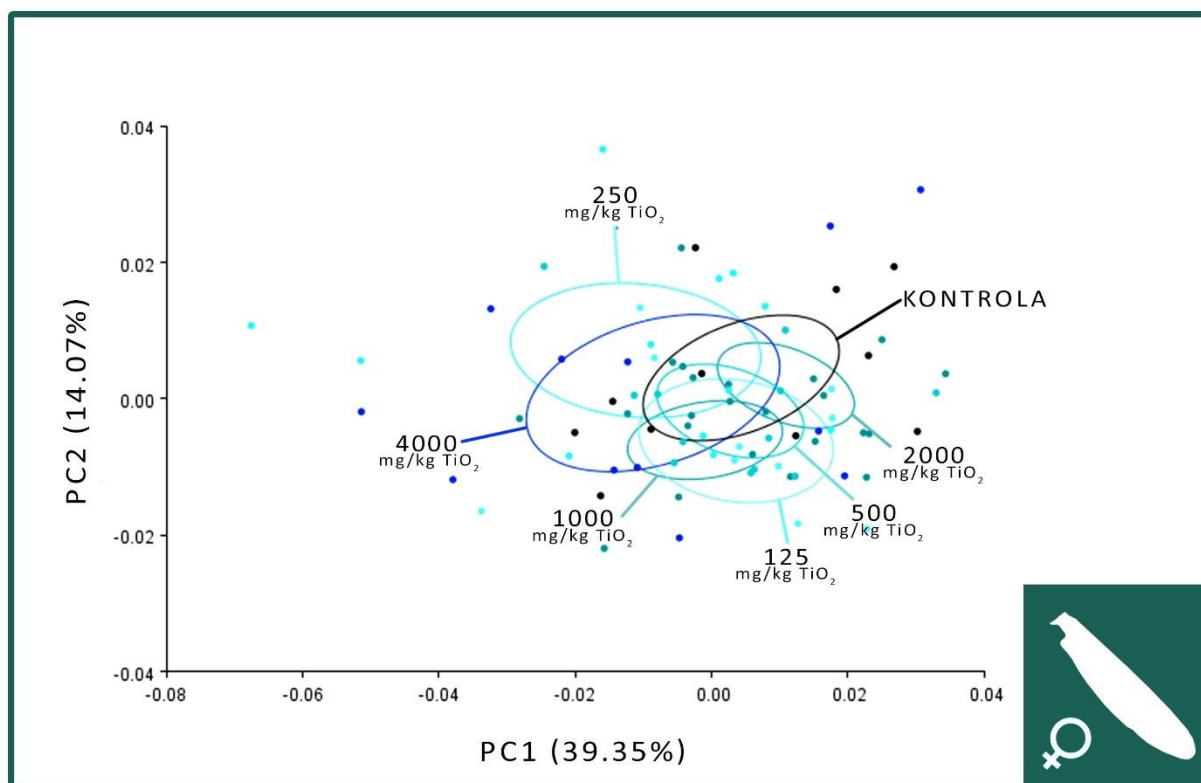
Utvrđeno je postojanje značajne razlike u varijabilnosti veličine krila ženki (ANOVA $F=4,98$; $p=0,0002$). *Post Hoc* Tukey test za poredjenje grupa je pokazao da značajne razlike u veličini centroida postoje samo između grupe tretirane sa 125 mg/kg TiO₂ i grupa tretiranih sa 500, 1000 i 2000 mg/kg TiO₂ (sa vrednostima $p=0,0016$; $0,0012$ i $0,0004$ respektivno). Utvrđeno je i postojanje značajne razlike u obliku krila ženki (MANOVA Willks' $\lambda=0,0527$; $F=1,63$; $p<0,001$), te je pristupljeno daljim analizama.

Regresiona analiza pokazala je da je ukupno 1,66% promena u obliku izazvano razlikama u veličini i da je ovaj procenat alometrije stistički neznačajan, $p=0,2021$, te je dalja analiza izvršena na Prokrustovim koordinatama.

PCA analiza i distribucija jedinki u okviru tretmana u morfološkom prostoru definisanom PC osama prikazuje jasna razdvajanja na osnovu morfologije desnih krila ženki, pri čemu varijansa celokupnog uzorka iznosi 0,00099133 (tabela 28, slika 49).

Tabela 28 – Prvih 9 PC osa (od ukupno 22), koje opisuju preko 90% ukupne varijabilnosti u uzorku na osnovu PCA analize konstelacije 13 tačaka koje opisuju oblik i veličinu desnih krila odraslih ženki hironomida. Biološki test sa TiO₂ nanočesticama.

PC osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1	0,00039005	39,346	39,346
2	0,00013947	14,069	53,415
3	0,0001102	11,116	64,531
4	0,00006682	6,74	71,271
5	0,00005632	5,681	76,952
6	0,0000486	4,902	81,854
7	0,0000451	4,549	86,404
8	0,00002984	3,01	89,414
9	0,00002731	2,755	92,168



Slika 49 - PCA analiza desnih krila odraslih ženki hironomida izlaganih TiO₂ nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvim i trećom PC osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe sa 90% intervalom pouzdanosti.

CVA analiza ukazuje jasno razdvajanje grupa (tabela 29, slika 50) međutim, ukoliko se posmatraju CV1 (32,86%) i CV2 (26,67%) ose, raspored grupa je bez očigledne povezanosti sa tretmanima. Razdvajanje tretmana je najbolje uočljivo po CV3 osi (20,69% varijabilnosti), duž

koje odvajaju kontrola i tretmani sa nižim koncentracijama u pozitivnom delu od tretmana sa višom koncentracijom u negativnom delu ose (slka 51). Uočavaju se naveće promene u bazi krila, i tendencija sužavanja baze krila kod jedinki tretiranih višim koncentracijama TiO₂. Mahalanobisove distance pokazuju statistički značajnu razliku izmedju skoro svih grupa, medjtım bez vidljivih pravilnosti u odnosu na tretmane (tabela 30).

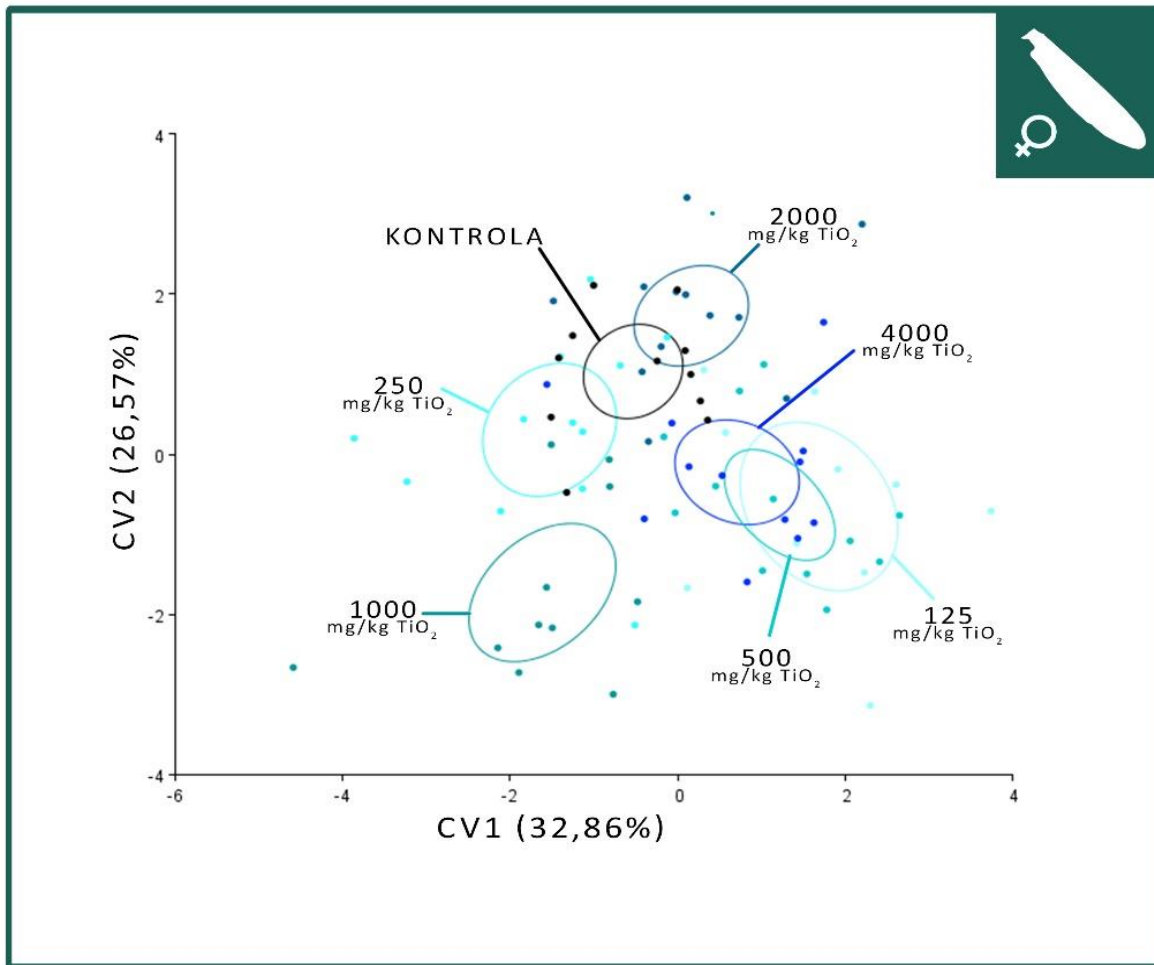
Tabela 29 – Sopstvene vrednosti i procenti varijabilnosti koje objašnjavaju CV ose na osnovu CVA analize konstelacije 13 tačaka koje opisuju oblik i veličinu desnih krila odraslih ženki hironomida. Biološki test sa TiO₂ nanočesticama.

CV osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1	1,54254953	32,863	32,863
2	1,25184695	26,669	59,532
3	0,97102745	20,687	80,219
4	0,52888321	11,267	91,486
5	0,26064288	5,553	97,039
6	0,13898447	2,961	100

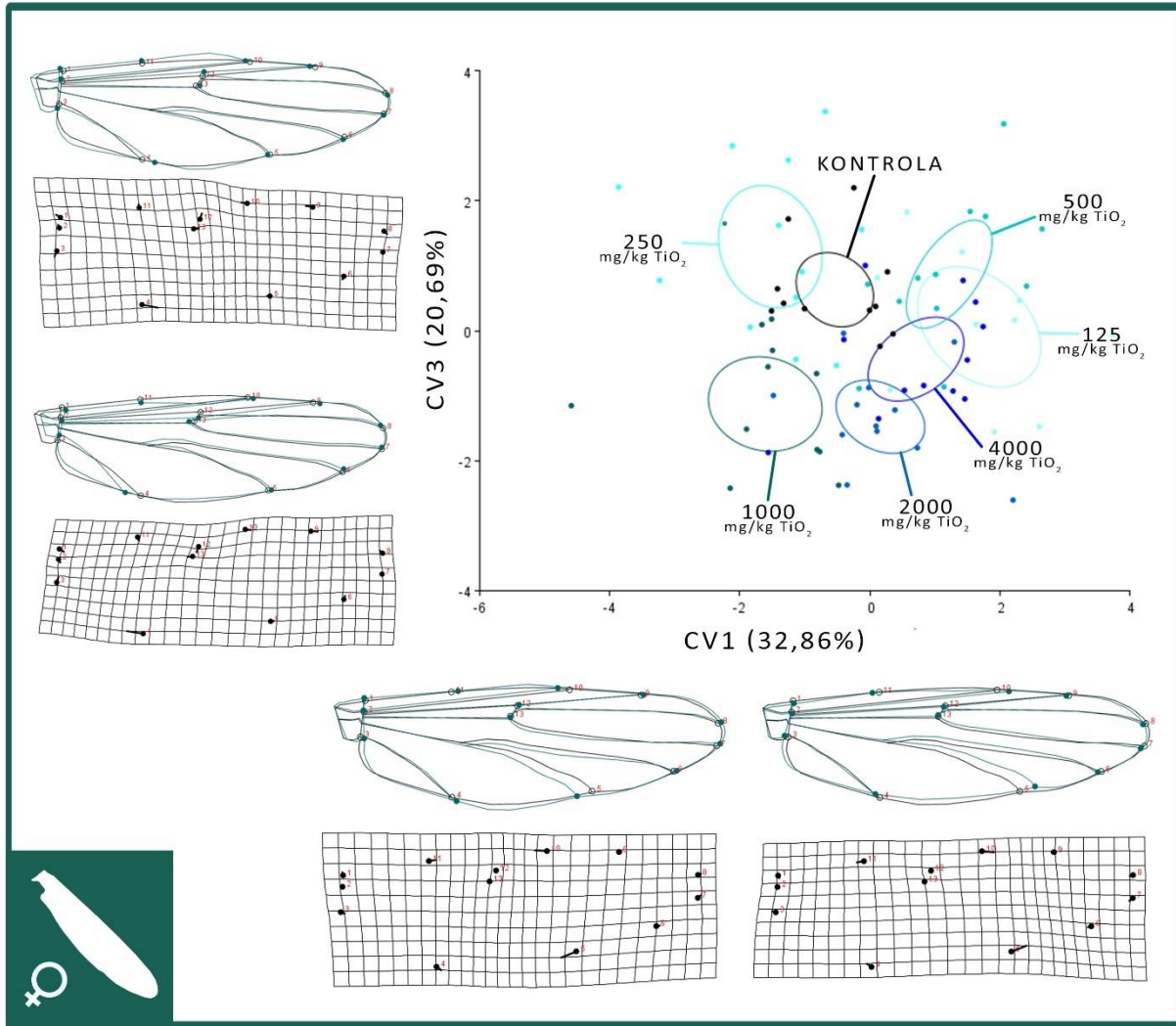
Tabela 30 – Mahalanobisove distance izmedju grupa i p vrednosti dobijene permutacionim testom (10000 permutacija) mahalanobisovih distanci.

		Mahalanobisove distance						
Tretmani (krila ženki)		125 mg/kg TiO ₂	250 mg/kg TiO ₂	500 mg/kg TiO ₂	1000 mg/kg TiO ₂	2000 mg/kg TiO ₂	4000 mg/kg TiO ₂	Kontrola
p vrednosti permutacionih testova	125 mg/kg TiO ₂		3,3073	1,858	3,8133	3,3006	2,2656	3,2934
	250 mg/kg TiO ₂	<,0001*		3,3073	3,4181	3,5284	3,1026	2,5658
	500 mg/kg TiO ₂	0,599	0,001*		3,6903	3,4828	2,27	2,7292
	1000 mg/kg TiO ₂	<,0001*	0,0002*	<,0001*		3,9328	3,2911	3,571
	2000 mg/kg TiO ₂	<,0001*	<,0001*	<,0001*	<,0001*		2,6697	2,6553
	4000 mg/kg TiO ₂	0,2312	0,0002*	0,1012	0,0002*	0,0009*		2,9912
	Kontrola	0,0005*	0,0182	0,0023*	<0,0001*	0,0035*	0,0004*	

*statistički značajne razlike izmedju grupa, p<0,05



Slika 506 - CVA analiza desnih krila odraslih ženki hironomida izlaganih TiO₂ nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugim CV osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe sa 90% intervalom pouzdanosti.



Slika 51 - CVA analiza desnih krila odraslih ženki hironomida izlaganih TiO₂ nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i trećom CV osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe sa 90% intervalom pouzdanosti. "Transformation grid" i "Outline" graphicima predstavljene su pecifične promene u obliku krila asociirane sa svakom osom (faktor skaliranja 10): prosečni oblik krila obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen plavo

Krila mužjaka

Primećeno je postojanje značajne razlike u varijabilnosti veličine krila mužjaka (ANOVA $F=4,87$; $p=0.0004$), a *post Hoc* Tukey test za poredjenje grupa je pokazao da značajne razlike u veličini centroida postoje samo između grupe tretirane sa 125 mg/kg TiO_2 i grupa: kontrola, 500, 1000, 2000 i 4000 mg/kg TiO_2 (sa vrednostima p 0,003058; 0,003393; 0,006381 i 0,002857 respektivno). Nije potvrđeno postojanje značajne razlike u obliku krila mužjaka (MANOVA Willks' $\lambda=0,055$; $F=1,23$; $p=0,079$), te nije pristupljeno daljim PCA i CVA analizama.

Regresiona analiza pokazala je da je ukupno 4,17% promena u obliku izazvano razlikama u veličini i da je ovaj procenat alometrije stistički neznan, $p=0,014$.

4.2.2.2 Ispitivanje toksičnosti CeO_2 nanočestica

Prvi biološki test **za procenu letalnih efekata (uticaja na odrasle jedinke)**, koji se sastojao iz pet tretmana sa po četiri replikata (2,5 mg/kg; 25 mg/kg; 250 mg/kg i 2500 mg/kg nano- CeO_2 i kontrolni tretman) završen je pet dana nakon što je zabeleženo izletanje poslednje odrasle jedinke, nakon 27 dana.

Drugi biološki test **za procenu subletalnih efekata**, koji se sastojao iz istih pet tretmana sa po četiri replikata, završen je tri dana nakon što su primećene prve larve četvrtog stupnja, nakon 10 dana.

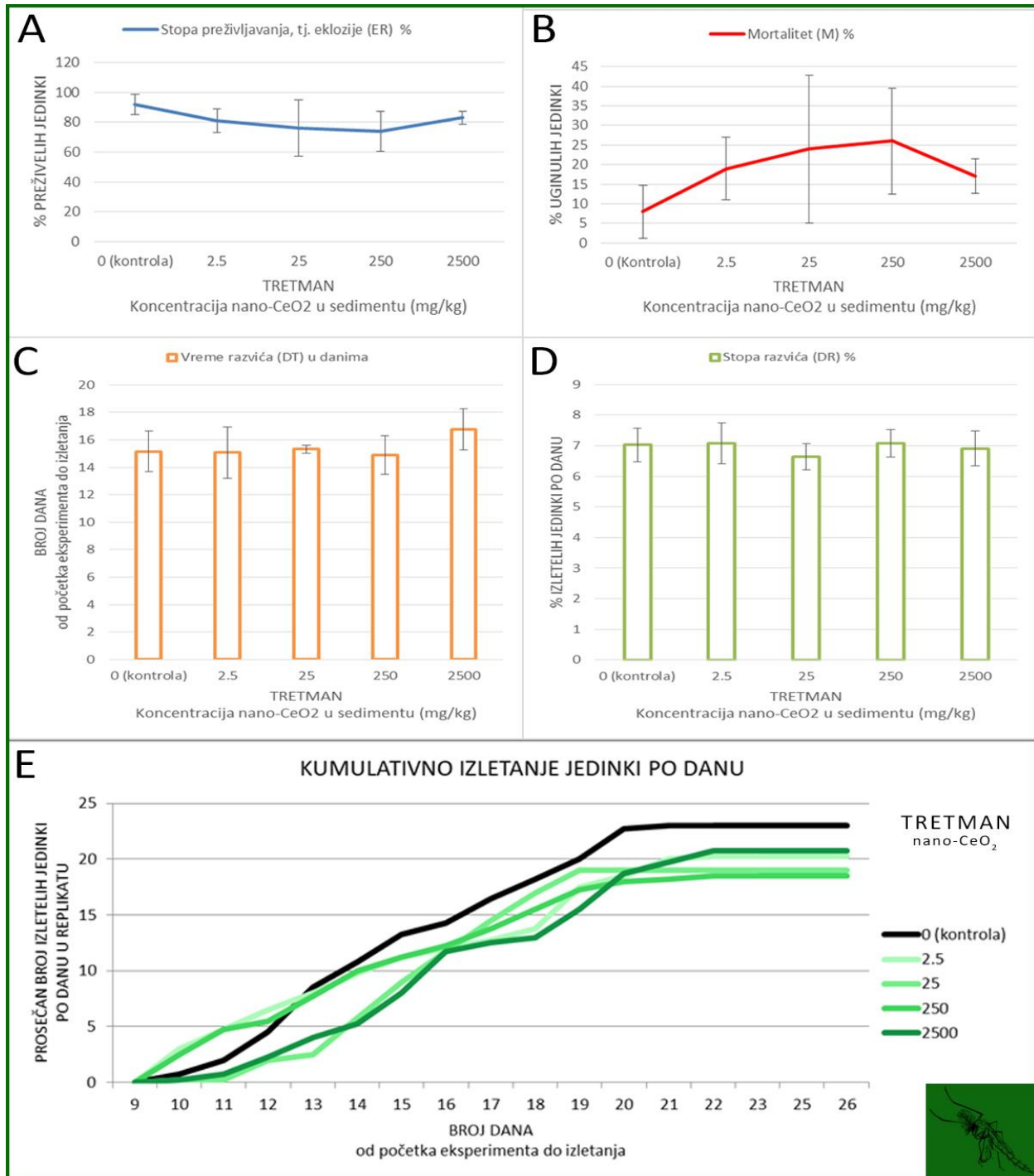
Prvi biološki test za procenu letalnih efekata nano- CeO_2 (uticaja na odrasle jedinke)

Odrasle jedinke su počele sa izletanjem 10 dana od početka eksperimenta, a poslednja jedinka izletela je nakon 22 dana. Nije bilo statistički značajne razlike u analiziranim parametrima između polova (T test), te su rezultati za mužjake i ženke pulirani u statističkoj analizi. ANOVA je pokazala da nema statistički značajnih razlika u standardnim životnim parametrima između tretmana, kao ni između tretmana i kontrole (tabela 31, slika 52).

Tabela 31 – Prvi biološki test za procenu uticana nano-CeO₂ - standardni životni parametri. Stopa preživljavanja (ER) - % izletelih jedinki na kraju eksperimenta; stopa mortaliteta (M) - % mrtvih jedinki na kraju eksperimenta; vreme razvića (DT) – broj dana od početka eksperimenta do izletanja; stopa razvića (DR) – prosečan % izletelih jedinki po danu.

Koncentracija nano-CeO ₂ u sedimentu (mg/kg)	0 (kontrola)	2,5	25	250	2500
ER ± SD (%)	92 ± 13,47	81 ± 16,12	76 ± 37,66	74 ± 27,03	83 ± 8,87
M ± SD (%)	8 ± 13,46	19 ± 16,12	24 ± 37,66	26 ± 27,03	17 ± 8,87
DT ± SD (dan)	15,15 ± 2,97	15,08 ± 3,74	15,32 ± 0,57	14,90 ± 2,79	16,77 ± 2,99
DR ± SD (% izletelih jedinki/dan)	7,17 ± 1,62	9,77 ± 6,68	11,2 ± 9,2	7,67 ± 1,2	5,96 ± 0,85

Najveći broj jedinki izleto je u kontrolnom tretmanu (prosečno 23 jedinki) u roku od prosečno 15 dana od početka eksperimenta. Uspeh u izletanju (ER) je varirao od prosečno 74% do 92%, sa stopom razvića u rasponu od 5,96% do 11,2% po danu u proseku.



Slika 7 – Biološki test za procenu uticaja nano-CeO₂ na standardne parametre. Uticaj na: A – stopu preživljavanja, eklozije (ER); B - mortalitet (M); C – vreme razvića (DT); D – stopu razvića (DR); E – odlaganje razvića larvi u odrasle jedinke. Prikazane su rosečne vrednosti za sve repilicate u jednom tretmanu.

Drugi biološki test za procenu subletalnih efekata nano-CeO₂

Ispunjen je osnovni kriterijum za validnost testa (prosečno preživljavanje od minimum 70% u kontroli). Prve larve četvrtog stupnja primećene su nakon sedam dana. Rezultati ne pokazuju statistički značajno variranje između grupa ni za jedan parametar (tabela 32).

Tabela 32 – Biološki test za procenu subletalnih efekata nano-CeO₂ - preživljavanje i mokra masa *C. riparius* larvi (srednje vrednosti ± SD u %).

redni broj tretmana	tretman (koncentracija nano-CeO ₂ mg/kg)	Preživljavanje (mean ± SD) %	Mokra masa (mean ± SD) mg
1	2,5	93 ± 6,83	8,79 ± 1,19
2	25	80 ± 11,78	9,22 ± 1,39
3	250	80 ± 24,83	8,57 ± 0,98
4	2500	93 ± 8,24	8,92 ± 1,35
5	kontrola	89 ± 19,42	8,89 ± 1,4

Procena količine unetih nanočestica (ICP-MS)

ICP-MS analiza je pokazala da netretirane larve *C. riparius* u svojim telima sadrže prosečno 12±5 mg nano-CeO₂ po kg mokre mase. Ova “pozadinska” koncentracija iz kontrolnog uzorka oduzeta je od detektovanih vrednosti u tretmanima, kako bi se dobile konkretne vrednosti unetih nanočestica tokom eksperimenta (tabela 33).

Tabela 33 - ICP-MS analiza koncentracije nano-CeO₂ u telima *C. riparius* larvi

Tretman (mg nano-CeO ₂ /kg sedimenta)	2.5	25	250	2500
Nano- CeO ₂ koncentracija u telima larvi average ± SD (mg CeO ₂ /kg mokre mase)	66 ± 1	309 ± 66	2340 ± 370	29100 ± 6500

Razlike među tretmanima bile su statistički značane (ANOVA $p < 0,05$; $F = 69,331$). Nivo nano-CeO₂ u telima larvi je varirao od oko 12 mg/kg u kontrolama do oko 29000 mg/kg u larvama tretiranim najvišim koncentracijama i povećavao se sa povećanjem koncentracije nano-CeO₂ u sedimentu: kada se koncentracija nanočestica u sedimentu povećavala 1000x (od 2,5 do 2500 mg/kg nano-CeO₂) koncentracija u telima larvi se povećavala za 440,9x (od 66 mg/kg do 29100 mg/kg nano-CeO₂ u proseku). Spearman rho test je pokazao visoku pozitivnu korelaciju između koncentracije nanočestica u sedimentu i njihove koncentracije u telima larvi, $\rho = 0,732$, $p = 0,002$.

Geometrijska morfometrija

Vizuelnom analizom morfoloških struktura, od ukupno 275 jedinki izbačeno je 15 mandibula i 14 mentuma (prilozi 5 i 6). Među mandibulama uočeno je samo 10 (3,64% od ukupnog uzorka) vidljivo deformisanih (četiri u tretmanu sa 2,5 mg/kg; jedna u tretmanu sa 25 mg/kg; dve u tretmanu sa 2500 mg/kg i tri u kontroli, i to u vidu nedostatka apikalnog zuba, potpunog iskrivljenja mandibule ili dodatnog unutrašnjeg zuba, u kontroli) i 5 potpuno istrošenih. Među mentumima uočeno 4 (1,45%) deformisana (dva u tretmanu sa 2,5 mg/kg - deformacije centralnog zuba, i po jedan u tretmanu sa 25 mg/kg - dodatni zub na centralnom zubu, i kontroli - procep između centralnog i lateralnih zuba) i 10 vidljivo izlomljenih ili nerazvijenih. Procenat deformisanih i istrošenih struktura bio je izuzetno mali u odnosu na ukupan uzorak, te nije bilo moguće statistički obraditi rezultate. Jedinke sa ovakvim strukturama su izbačene iz daljih analiza metodom geometrijske morfometrije.

Mandibule

Ukupno je fotografisano 260 desnih mandibula i na svakoj je digitalizovano 18 specifičnih tačaka. Pomoću samog programa uočene su 2 (0,8% od ukupnog uzorka) jedinke sa “ekstremnim” vrednostima morfoloških parametara, koje su izbačene iz dalje analize. Jedinke su grupisane u pet grupa, na osnovu tretmana CeO₂ nanočesticama: 2,5 mg/kg; 25 mg/kg; 250 mg/kg i 2500mg/kg nano-CeO₂ i kontrolna grupa.

Uočene su značajne razlike u veličini mandibula (ANOVA $F = 134,7$; $p = 0,00$). *Post hoc* Tukey test je pokazao da se sledeće grupe statistički značajno razlikuju po veličini centroida: kontrola od svih ostalih tretmana i grupa tretirana najvišom koncentracijom od svih ostalih

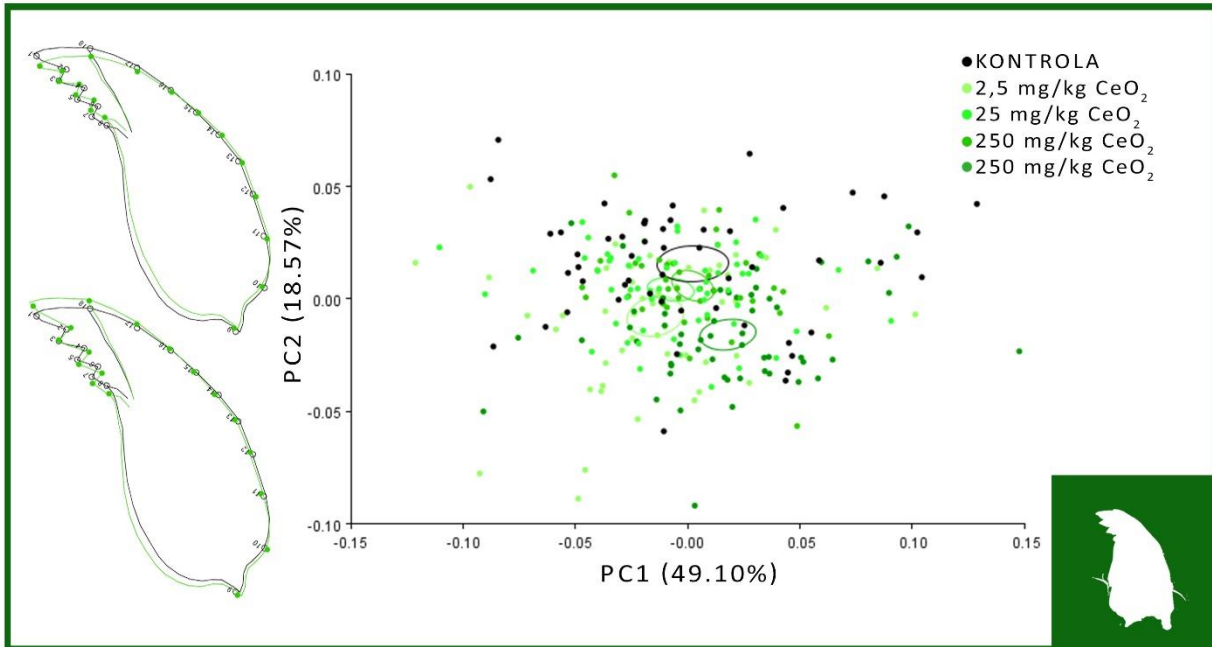
tretmana. Utvrđeno je i postojanje značajne razlike u obliku mandibula (MANOVA Willks' λ =0,23; F=3; p=0,00), te je pristupljeno daljim analizama.

Regresiona analiza pokazala je da je ukupno 3,05% promena u obliku izazvano razlikama u veličini i da je ovaj procenat alometrije, iako veoma mali, stistički značajan, p=0,0002, te je dalja analiza izvršena na regresionim rezidualima.

PCA analiza ukazuje na razdvajanje grupe tretirane najvišom koncentracijom od 2500 mg/kg CeO₂ na osnovu morfologije mandibula u morfoprostoru definisanom PC osama (tabela 34, slika 53). Duž PC2 ose (13,47% ukupne varijabilnosti) kontrola i grupe tretirane nižim koncentracijama CeO₂ se grupišu u pozitivnom delu, dok se grupa tretirana najvišom koncentracijom od 2500 mg/kg CeO₂ izdvaja u negativnom delu ose i karakteriše je proširenje baze mandibula uz povlačenje prvog i drugog unutrašnjeg zuba ka bazi, a izduženje vršnog zuba ka vrhu mandibule. Ukupna varijabilnost uzorka iznosi 0,00363285, a unutar svake grupe pojedinačno u tretmanu 2,5 mg/kg CeO₂ iznosi 0,00402132, u tretmanu 25 mg/kg CeO₂ iznosi 0,00234732, u tretmanu 250 mg/kg CeO₂ iznosi 0,0000000216914, 2500mg/kg CeO₂ iznosi 0,00307995, a u kontroli iznosi 0,00500426.

Tabela 34 – Prvih 8 PC osa (od ukupno 32), koje opisuju preko 90% ukupne varijabilnosti u uzorku na osnovu PCA analize konstelacije 18 tačaka koje opisuju oblik i veličinu mandibula larvi hironomida. Biološki test sa CeO₂ nanočesticama.

PC osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1.	0,00178400	49,108	49,108
2.	0,00067474	18,573	67,681
3.	0,00039447	10,858	78,539
4.	0,00019684	5,418	83,958
5.	0,00009702	2,671	86,628
6.	0,00006707	1,846	88,474
7.	0,00005516	1,518	89,993
8.	0,00005205	1,433	91,425



Slika 53 – PCA analiza mandibula larvi hironomida izlaganih CeO₂ nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugom PC osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe sa 90% intervalom pouzdanosti. "Outline" graficima predstavljene su pecifične promene u obliku mandibula asociirane sa svakom osom (sa faktorom skaliranja 0,01) prosečni oblik mandibula obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen zeleno.

CVA analiza i distribucija jedinki u okviru tretmana u morfološkom prostoru definisanom CV osama ukazuje na razdvajanje grupa na osnovu morfologije mandibula, ali sa velikim preklapanjima (tabela 35, slika 54). CV1 osa objašnjava 55,28% ukupne varijabilnosti i duž nje se primećuje grupisanje kontrolne i grupa tretiranih sa 25 i 250 mg/kg CeO₂ u negativnom delu ose i razdvajanje od grupa tretiranih sa 2,5 i 2500 mg/kg CeO₂ u pozitivnom delu ose. CV2 (27,64%) pokazuje razdvajanje kontrolne grupe i grupe tretirane najmanjom koncentracijom od ostalih tretiranih grupa, sa najvećim preklapanjem između kontrole i grupe tretirane najnižom koncentracijom od 2,5 mg/kg CeO₂. Vizuelizacijom promena na strukturama potvrđuje se trend primećen PCA analizom – kod tretiranih jedinki baza mandibula se širi, sa skraćivanjem zgloba mandibule, zbijanjem unutrašnjih zuba i izduživanjem apikalnog zuba. Analiza pokazuje najveće promene u apikalnom zubu (specifične tačke 1 i 2) i tendenciju njegovog izduživanja sa povećanjem koncentracije CeO₂. Jasne promene pokazuju prvi i drugi unutrašnji zub (specifične tačke 4, 6 i 8 koje opisuju baze zuba). Razdvajanje grupa potvrđuju i vrednosti Mahalanobisovih distanci koje pokazuju značajnu razliku između svih grupa, osim između kontrolne i grupe tretirane sa 25 i 250 mg/kg CeO₂ (tabela 36).

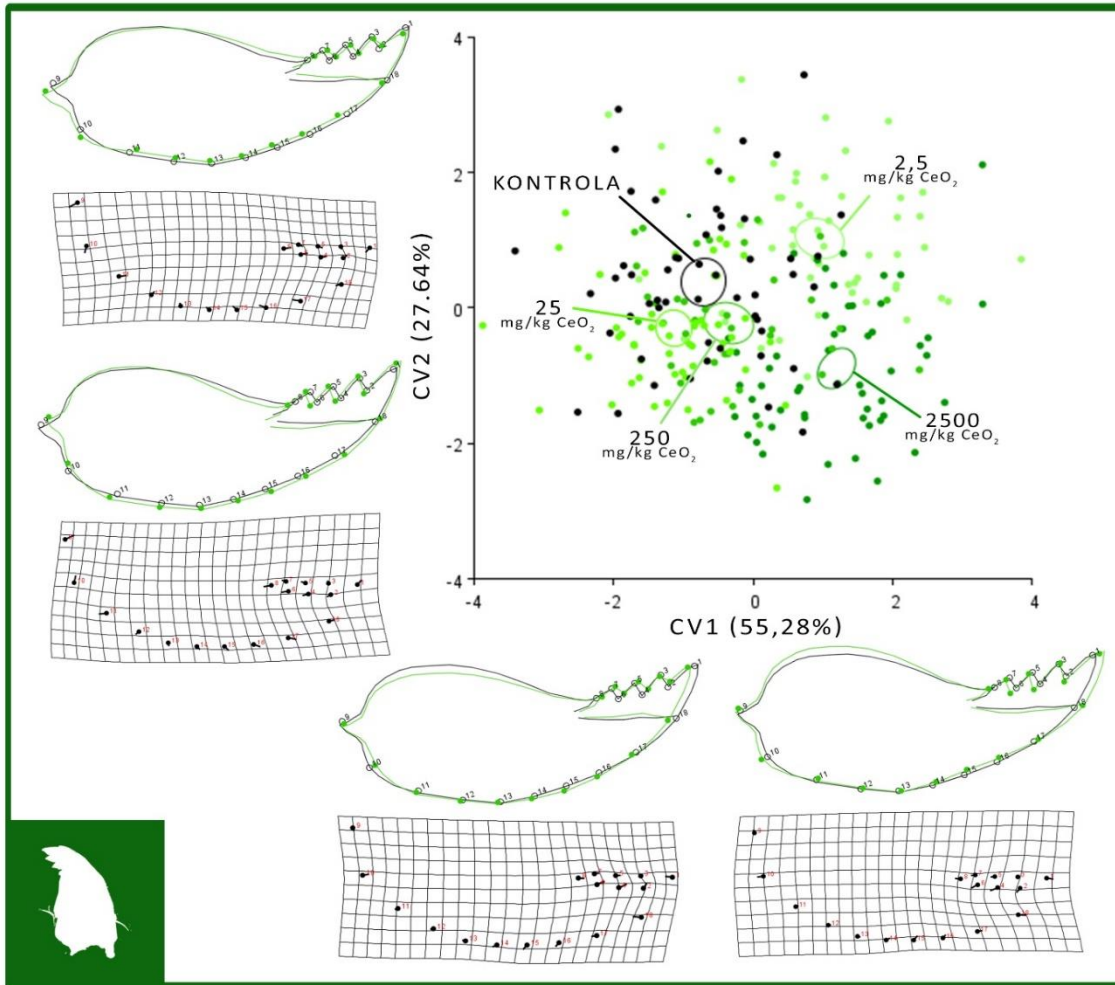
Tabela 35 – Sopstvene vrednosti i procenti varijabilnosti koje objašnjavaju CV ose na osnovu CVA analize konstelacije 18 tačaka koje opisuju oblik i veličinu mandibula larvi hironomida. Biološki test sa CeO₂ nanočesticama.

CV osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1.	0,91231701	55,282	55,282
2.	0,45607234	27,636	82,918
3.	0,21085402	12,777	95,695
4.	0,07104424	4,305	100,000

Tabela 36 – Mahalanobisove distance izmedju grupa i p vrednosti dobijene permutacionim testom (10000 permutacija) mahalanobisovih distanci.

		Mahalanobisove distance				
		Tretmani (mandibule)	2,5 mg/kg CeO ₂	25 mg/kg CeO ₂	250 mg/kg CeO ₂	2500 mg/kg CeO ₂
p vrednosti permutacionih testova	2,5 mg/kg CeO ₂		2,4943	2,1203	1,9576	1,8814
	25 mg/kg CeO ₂	<,0001*		1,6654	2,4511	1,1566
	250 mg/kg CeO ₂	<,0001*	<,0001*		2,0605	1,3964
	2500 mg/kg CeO ₂	<,0001*	<,0001*	<,0001*		2,321
	Kontrola	<,0001*	0,2434	0,0888	<,0001*	

*statistički značajne razlike izmedju grupa, p<0,05



Slika 54 – CVA analiza mandibula larvi hironomida izlaganih CeO_2 nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugim CV osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe sa 90% intervalom pouzdanosti. "Outline" i "Transformation grid" graphicima predstavljene su pecifične promene u obliku mandibula asocirane sa svakom osom (aktor skaliranja 4): prosečni oblik mandibula obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen zeleno.

Mentumi

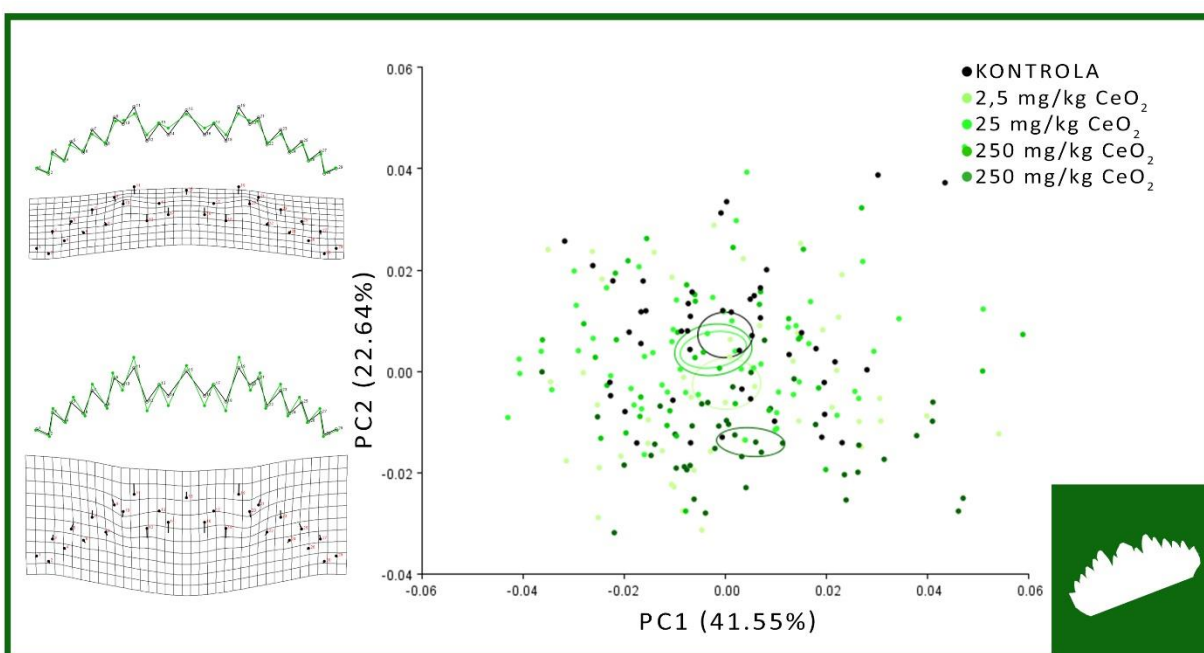
Fotografisani su mentumi ukupno 261 jedinke i na svakom je digitalizovano 29 specifičnih tačaka. Pomoću samog programa uočeno je 29 (11,1% od ukupnog uzorka) jedinki sa “ekstreminim” vrednostima morfoloških parametara, koje su izbačene iz dalje analize. Jedinke su grupisane u pet grupa, na osnovu tretmana CeO₂ nanočesticama: 2,5 mg/kg; 25 mg/kg; 250 mg/kg i 2500 mg/kg nano-CeO₂ i kontrolna grupa.

Potvrđene su značajne razlike u veličini mentuma (ANOVA F=3,92; p=0,004). *Post hoc* Tukey test je pokazao jedinu značajnu razliku između grupe tretirane sa 250 mg/kg CeO₂ (veća veličina centroida) i grupa tretiranih sa 2,5 mg/kg CeO₂ i 25 mg/kg CeO₂ (manja veličina centroida). Utvrđeno je postojanje značajnih razlika i u obliku mentuma (MANOVA Willks'λ= 0,34; F=2; p=0,00), te je pristupljeno daljim analizama.

Regresiona analiza pokazala je da je ukupno 3,93% promena u obliku izazvano razlikama u veličini i da je ovaj procenat alometrije, iako veoma mali, stistički značajan, p<0.0001, te je dalja analiza izvršena na regresionim rezidualima. PCA analiza ukazuje na razdvajanje grupa na osnovu morfologije mentuma (tabela 37, slika 55). Uočljivo je grupisanje kontrolne i grupa tretiranih manjim koncentracijama (2,5 mg/kg CeO₂; 25 mg/kg CeO₂; 250 mg/kg CeO₂) u pozitivnom delu CV2 ose (22,64% varijabilnosti), koje karakterišu kraći zubi sa širim bazama. U negativnom delu ose se izdvaja grupa tretirana najvećom koncentracijom (2500 mg/kg nano-CeO₂) koju karakteriše mentum sa izduženim zubima i suženom bazom centralnog tročlanog zuba. Ukupna varijabilnost uzorka iznosi 0,00097356, a unutar svake grupe pojedinačno u tretmanu 2,5 mg/kg CeO₂ iznosi 0,00108425, u tretmanu 25 mg/kg CeO₂ iznosi 0,00100147, u tretmanu 250 mg/kg CeO₂ iznosi 0,00100123, u tretmanu 2500mg/kg CeO₂ iznosi 0,00081167, a u kontroli iznosi 0,00085961.

Tabela 37 – Prvih 10 PC osa (od ukupno 27), koje opisuju preko 90% ukupne varijabilnosti u uzorku na osnovu PCA analize konstelacije 29 specifičnih tačaka koje opisuju oblik i veličinu mentuma larvi hironomida. Biološki test sa CeO₂ nanočesticama.

PC osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1.	0,00040451	41,550	41,550
2.	0,00022038	22,637	64,186
3.	0,00009232	9,483	73,669
4.	0,00005586	5,738	79,407
5.	0,00002683	2,755	82,163
6.	0,00002116	2,173	84,336
7.	0,00001809	1,858	86,194
8.	0,00001555	1,597	87,791
9.	0,00001458	1,497	89,288
10.	0,00001384	1,422	90,710



Slika 55 – PCA analiza mentuma larvi hironomida izlaganih CeO₂ nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugom PC osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe sa 90% intervalom pouzdanosti. "Wireframe" i "Transformation grid" graficima predstavljene su pecifične promene u obliku mentuma asociirane sa svakom osom (sa faktorom skaliranja 0,06) prosečni oblik mandibula obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen zeleno.

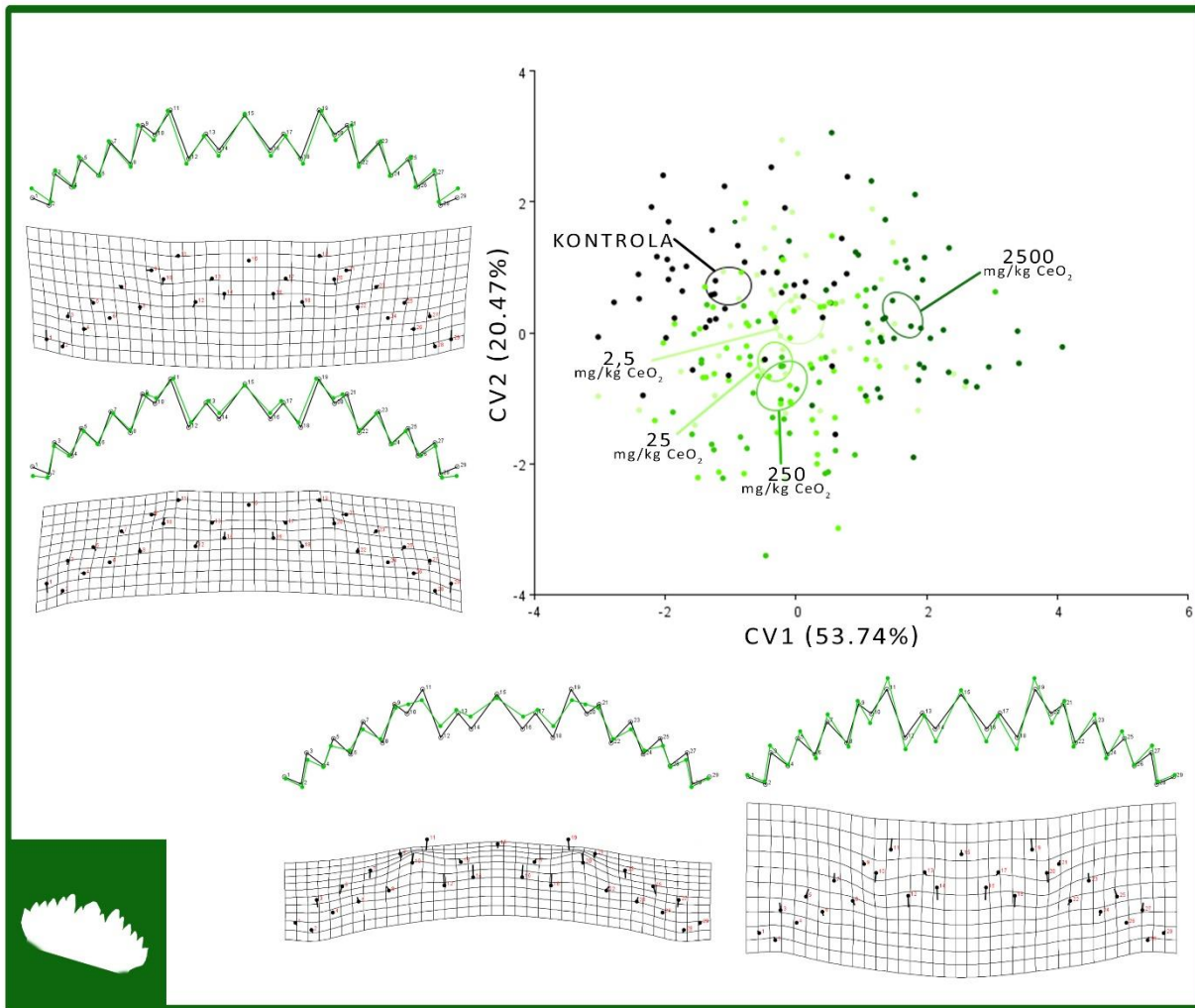
CVA analiza ukazuje na razdvajanje grupa u morfološkom prostoru definisanom CV osama na osnovu morfologije mandibula (tabela 39, slika 56). Po CV1 osi (53,74% varijabilnosti) se grupa tretirana najvišom koncentracijom od 2500 mg/kg nano-CeO₂ jasno izdvaja u pozitivnom delu od kontrole i ostalih grupa koje se grupišu u negativnom delu ose, dok je po CV2 osi (20,47%) izdvajanje slabije, ali se primećuje gradacija od kontrole, preko nižih do viših koncentracija. Primećuje se da sa povećanjem koncentracije dolazi do vrlo slabog širenja baze mentuma (sa veliki variranjem specifičnih tačaka 1 i 29) i širenja baze dva unutrašnja lateralna zuba, međutim sa ekstremno velikim koncentracijama dolazi do velikog izduživanja svih zuba, uz veliko povlačenje baze centralnog zuba (specifične tačke 12, 14, 16 i 18) i izduživanje vrha unutrašnjeg lateralnog zuba (specifične tačke 11 i 19). CVA analiza potvrđuje tendencije izduživanja centralnog zuba i skupljanja sredine čitavog mentuma sa povećanjem koncentracije nano-CeO₂ prikazane PCA analizom. Mahalanobisove distance pokazuju značajnu razliku između svih grupa, osim između grupe tretirane sa 25 i grupe tretirane sa 250 mg/kg nano-CeO₂ (tabela 39).

Tabela 38 – Sopstvene vrednosti i procenti varijabilnosti koje objašnjavaju CV ose na osnovu CVA analize konstelacije 29 tačaka koje opisuju oblik i veličinu mentuma larvi hironomida. Biološki test sa CeO₂ nanočesticama.

CV osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1.	0,73277806	53,739	53,739
2.	0,27910002	20,468	74,207
3.	0,22373310	16,408	90,615
4.	0,12797292	9,385	100,000

Tabela 39 – Mahalanobisove distance između grupa i p vrednosti dobijene permutacionim testom (10000 permutacija) mahalanobisovih distanci. Biološki test sa CeO₂ nanočesticama. *statistički značajne razlike između grupa, $p < 0,05$.

		Mahalanobisove distance				
Tretmani (mentumi)		2,5 mg/kg CeO ₂	25 mg/kg CeO ₂	250 mg/kg CeO ₂	2500 mg/kg CeO ₂	Kontrola
p vrednosti permutacionih testova	2,5 mg/kg CeO ₂		1,4177	1,542	1,9556	1,7056
	25 mg/kg CeO ₂	0,0029*		1,1902	2,1727	1,4558
	250 mg/kg CeO ₂	0,003*	0,1823		2,208	1,7775
	2500 mg/kg CeO ₂	<,0001*	<,0001*	<,0001*		2,6182
	Kontrola	<,0001*	0,0006*	<,0001*	<,0001*	



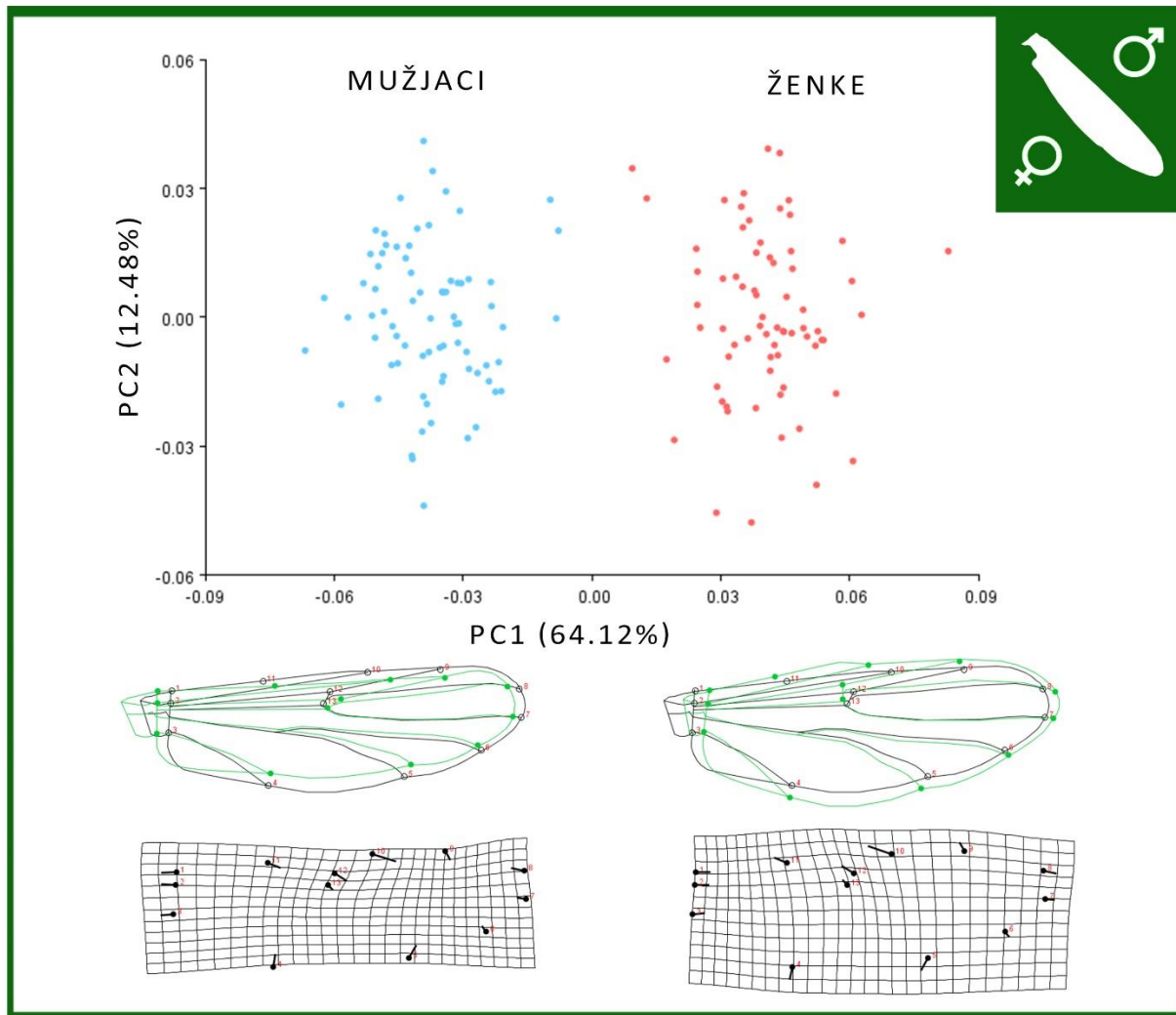
Slika 56 – CVA analiza mentuma larvi hironomida izlaganih CeO_2 nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugom CV osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe sa 90% intervalom pouzdanosti. "Transformation grid" i "Wireframe" graficima predstavljene su pecifične promene u obliku mentuma asociirane sa svakom osom (faktor skaliranja 6): prosečni oblik mentuma obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen zeleno.

Krila

Fotografisana su desna krila ukupno 75 ženske i ukupno 75 muških odraslih jedinki hironomida i na svakom je digitalizovano 13 specifičnih tačaka. Od ukupnog broja fotomikrografija, krila 71 ženskih i 71 muških jedinki je uključeno u dalje analize. Jedinke su grupisane u sedam grupa, na osnovu tretmana CeO_2 nanočesticama: 2,5 mg/kg; 25 mg/kg; 250 mg/kg i 2500 mg/kg nano- CeO_2 i kontrolna grupa.

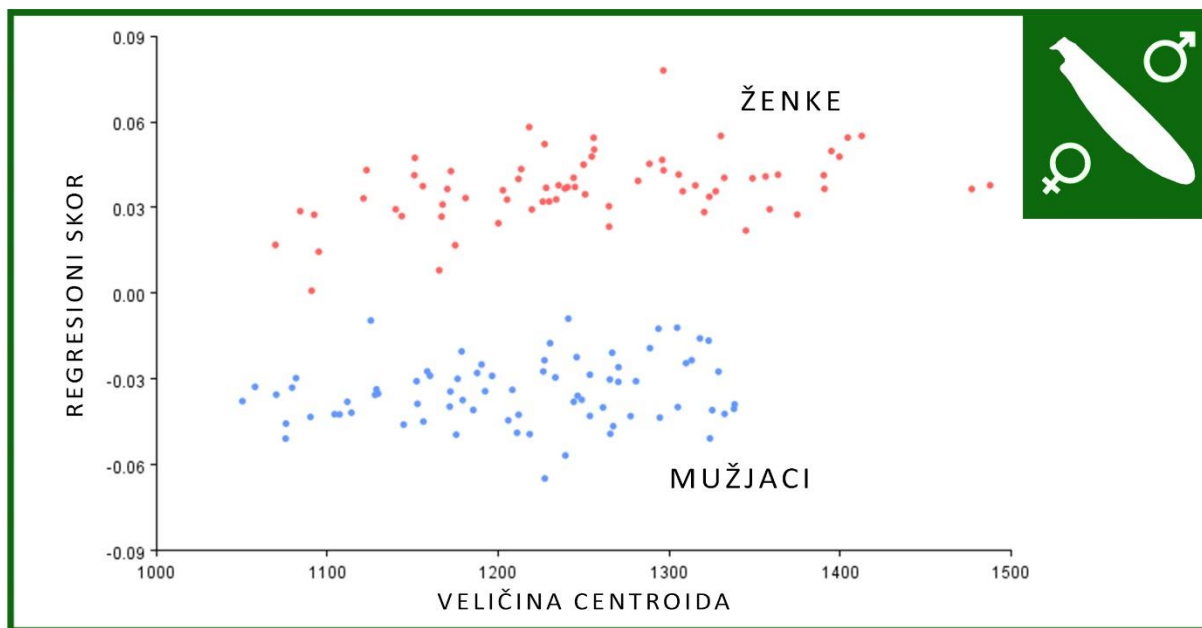
Uočena je statistički značajna razlika u veličini krila (ANOVA $F=8,74$, $p=0,003$), i to između sledećih grupa mužjaka i ženki: kontrolna grupa ženki (veća veličina centroida) se razlikuje od kontrolne grupe mužjaka i grupa mužjaka tretiranih sa 2500 i 250 mg/kg CeO_2 (manja veličina centroida); grupa mužjaka tretirana sa 2500 mg/kg CeO_2 (manja veličina centroida) se razlikuje od grupa ženki tretiranih sa 25 i 250 mg/kg CeO_2 (veća veličina centroida) (*post hoc* Tukey $p<0,005$). Potvrđena je i statistički značajna zlika u varijabilnosti oblika krila između mužjaka i ženki (MANOVA Willks' $\lambda=0,003$; $F=4,925$; $p=0,00$), čime je potvrđeno postojanje polnog dimorfizma.

PCA analiza je pokazala ukupnu varijabilnost uzorka od 0,00260410 i razdvajanje ženki i mužjaka po PC1 osi (64,12% varijabilnosti). Ženke imaju šira krila (specifične tačke od 4 do 11 pomeraju se ka obodu krila) sa skraćenim proksimalnim delom (specifične tačke 1, 2 i 3 se pomeraju ka unutrašnjosti krila); dok je kod mužjaka situacija obrnuta, krila su uža, pre svega u centralnom delu, sa izduženim proksimalnim delom i pomerenim radio-medijalnim nervom ka distalnom delu krila (specifične tačke 12 i 13) (slika 57).



Slika 57 – Usporedna PCA analiza desnih krila odraslih mužjaka i ženki hironomida izlaganih CeO₂ nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugom PC osom. “Transformation grid” i “Outline” graficima predstavljene su pecifične promene u obliku krila asocirane sa svakom osom (faktor skaliranja 0,09): prosečni oblik krila obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen zeleno.

Regresiona analiza dokazala je prisustvo alometrije u jako malom procentu, 5,54%, sa velikom značajnošću $p=0,0008$. Grafik regresione analize (slika 58) pokazuje da veličina značajno varira u ukupnom uzorku u oba slučaja i da ženke imaju veća krila od mužjaka.



Slika 58 – Multivarijantna regresija varijabli oblika na veličinu centroida desnih krila mužjaka i ženki odraslih jedinki hironomida. Biološki test sa CeO₂ nanočesticama.

Usled postojanja statistički značajnih razlika između mužjaka i ženki u veličini i obliku krila, koje nisu umanjene tretmanom CeO₂ nanočesticama, dalje analize vršene su za svaki pol nezavisno.

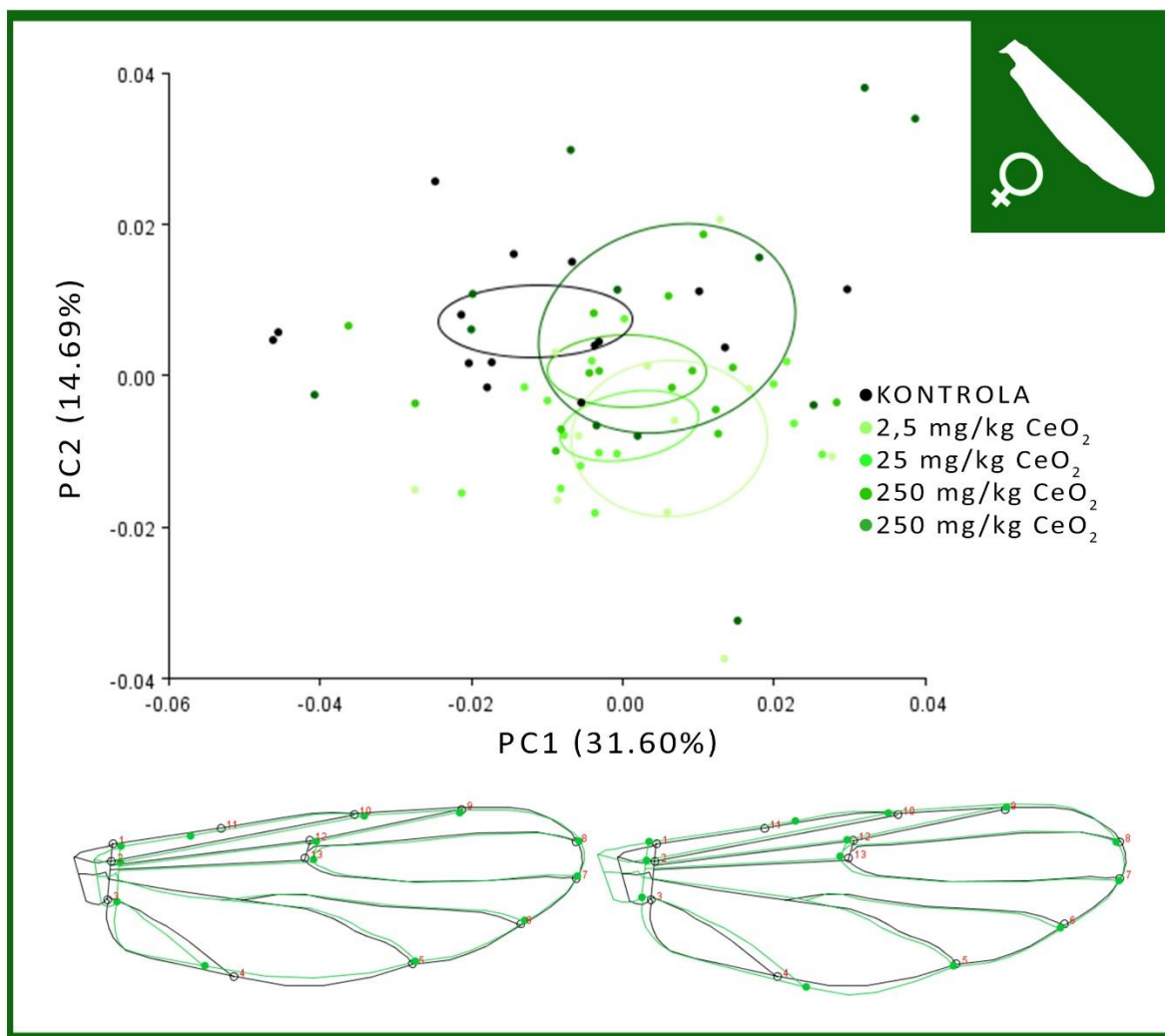
Krila ženki

Utvrđeno je postojanje značajne razlike u varijabilnosti veličine krila ženki (ANOVA $F=4,01$; $p=0,006$) i to između kontrolne grupe (veća veličina centroida) i grupa tretiranih sa 2,5 mg/kg nano-CeO₂ i 2500 mg/kg nano-CeO₂ (manja veličina centroida) (Tukey $p<0,05$). Utvrđeno je i postojanje značajnih razlika u obliku krila ženki (MANOVA Willks' $\lambda=0,056$; $F=2,19$; $p<0,001$), te je pristupljeno daljim analizama.

Značajna alometrija nije uočena (2,86%; $p=0,0558$), te je dalja analiza izvršena na Prokrustovim koordinatama. PCA analiza i distribucija jedinki u okviru tretmana u morfološkom prostoru definisanom PC osama, ukazuje na velika preklapanja između grupa na osnovu morfologije desnih krila ženki (tabela 40, slika 59), pri čemu ukupna varijansa celokupnog uzorka iznosi 0,00119908. Jedinke tretiranih grupa se pretežno nalaze u pozitivnom delu PC1 ose (31,60% varijabilnosti) i karakterišu ih izdužene baze krila sa izduženim analnim nervom i radio-medijalnim nervom pomerenim ka bazi krila; dok se jedinke kontrolne grupe nalaze pretežno u negativnom delu ose i imaju obrnute karakteristike.

Tabela 40 – Prvih 9 PC osa (od ukupno 22), koje opisuju preko 90% ukupne varijabilnosti u uzorku na osnovu PCA analize konstelacije 13 tačaka koje opisuju oblik i veličinu desnih krila odraslih ženki hiroomida. Biološki test sa CeO₂ nanočesticama.

PC osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1.	0,00037896	31,604	31,604
2.	0,00017621	14,695	46,299
3.	0,00017334	14,456	60,756
4.	0,00011030	9,199	69,955
5.	0,00007957	6,636	76,590
6.	0,00006955	5,800	82,390
7.	0,00005083	4,239	86,629
8.	0,00003408	2,842	89,471
9.	0,00002943	2,455	91,926



Slika 59 - PCA analiza desnih krila odraslih ženki hironomida izlaganih CeO_2 nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i trećom PC osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe sa 90% intervalom pouzdanosti. "Outline" graficima predstavljene su pecifične promene u obliku krila asocirane sa svakom osom (faktor skaliranja 0,08): prosečni oblik krila obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen zeleno.

CVA analiza ukazuje na jasno razdvajanje grupa na osnovu morfologije desnih krila odraslih ženki (tabela 41, slika 60). Grupe tretirane sa 25 i 250 mg/kg nano- CeO_2 se grupišu zajedno u pozitivnom delu CV1 ose (62,03% ukuone varijabilnosti) i karakterišu ih blago suženje baze krila uz blago izduživanje distalnog oboda krila i izduživanje analnog nerva i subkostalnog nerva (promene u specifičnim tačkama 4, 6 i 9). Ostale grupe se nalaze u negativnom delu CV1 ose i karakterišu ih deformacije krila u obrnutom smeru. Prema drugoj CV osi (17,67% varijabilnosti) grupe tretirane sa najmanjom i najvećom koncentracijom, od 2,5 i

2500 mg/kg nano-CeO₂, se grupišu zajedno u njenom pozitivnom delu i karakterišu ih izduživanje baze krila (specifične tačke 1, 2 i 3), povlačenje radio-medijalnog nerva ka bazi (specifične tačke 12 i 13), izduživanje analnog nerva (specifična tačka 4), smanjenje razmaka između vrhova kubitalnih i medijalnog nerva (specifične tačke 5, 6 i 7) i povlačenje vrhova subkostalnog i prvog radijalnog nerva ka bazi krila (specifične tačke 9 i 10). Kontrolna grupa se izdvaja od ostalih u negativnom delu prve dve ose. Mahalanobisove distance pokazuju statistički značajnu razliku između svih grupa, osim između grupa tretiranih sa 25 i 250 mg/kg nano-CeO₂ (tabela 42).

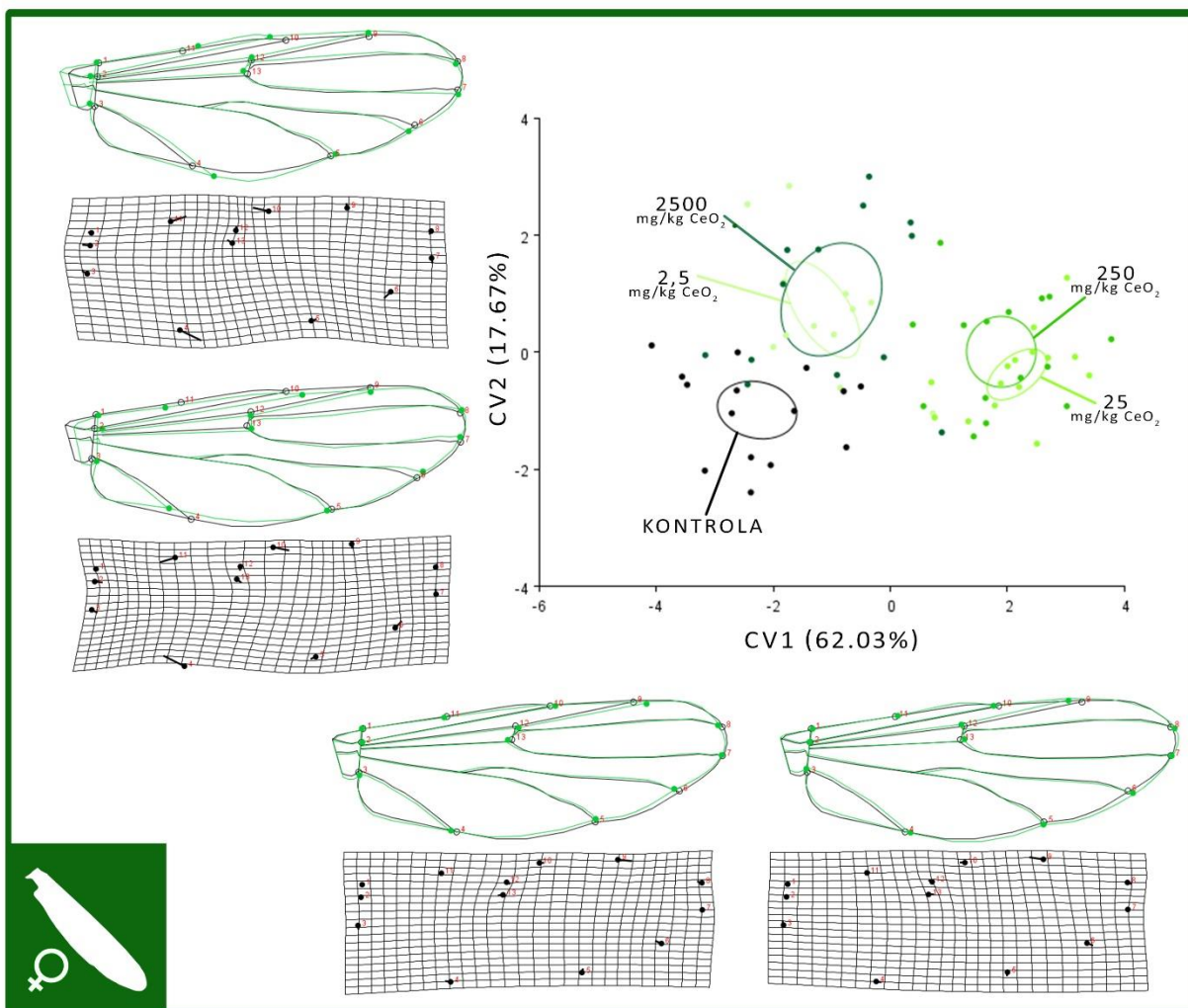
Tabela 41 – Sopstvene vrednosti i procenti varijabilnosti koje objašnjavaju CV ose na osnovu CVA analize konstelacije 13 tačaka koje opisuju oblik i veličinu desnih krila odraslih ženki hironomida. Biološki test sa CeO₂ nanočesticama.

CV osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1.	3,10659454	6,2028	6,2028
2.	0,88479167	17,666	79,694
3.	0,76747322	15,324	95,017
4.	0,24955100	4,983	100,000

Tabela 42 – Mahalanobisove distance između grupa i p vrednosti dobijene permutacionim testom (10000 permutacija) mahalanobisovih distanci. Biološki test sa CeO₂ nanočesticama.

		Mahalanobisove distance				
Tretmani (krila ženki)		2,5 mg/kg CeO ₂	25 mg/kg CeO ₂	250 mg/kg CeO ₂	2500 mg/kg CeO ₂	Kontrola
p vrednosti permutacionih testova	2,5 mg/kg CeO ₂		38226	3,7998	2696	2,8802
	25 mg/kg CeO ₂	<,0001*		1,699	3,8785	4,186
	250 mg/kg CeO ₂	<,0001*	0,333		3,3956	3,9855
	2500 mg/kg CeO ₂	0,0049*	<,0001*	<,0001*		2,8503
	Kontrola	<,0001*	<,0001*	<,0001*	0,0002*	

*statistički značajne razlike između grupa, p<0,05



Slika 60 - CVA analiza desnih krila odraslih ženki hironomida izlaganih CeO_2 nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i trećom CV osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe sa 90% intervalom pouzdanosti. "Transformation grid" i "Outline" graphicima predstavljene su pecifične promene u obliku krila asocirane sa svakom osom (faktor skaliranja 4): prosečni oblik krila obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen zeleno

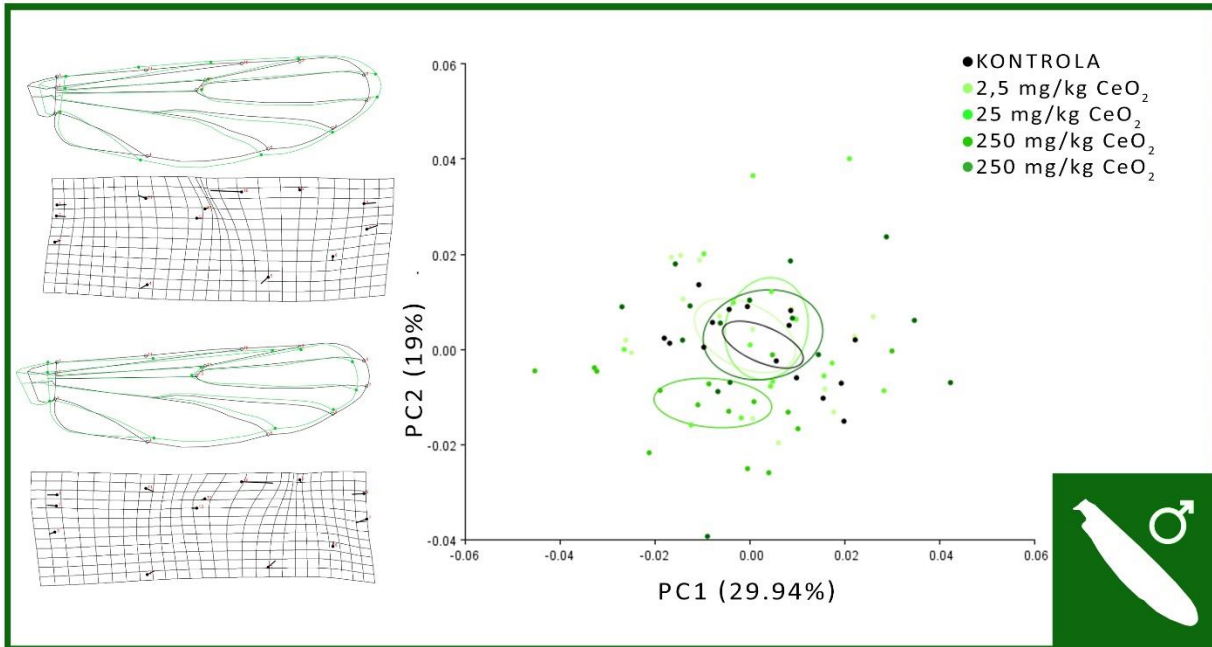
Krila mužjaka

Utvrđeno je postojanje značajne razlike u varijabilnosti veličine krila mužjaka (ANOVA $F=4,47$; $p=0,003$), pri čemu značajne razlike u veličini centroida postoje samo između grupe tretirane sa 2500 mg/kg nano- CeO_2 (manja veličina centroida) i grupa tretiranih sa 2,5 i 25 mg/kg nano- CeO_2 (veća veličina centroida) (Tukey $p<0,05$). Utvrđeno je i postojanje značajne razlike u variranju oblika krila mužjaka (MANOVA Willks' $\lambda=0,055$; $F= 1,87$; $p=0,0001$), te je pristupljeno daljim analizama.

Regresiona analiza pokazala je da je ukupno 2,35% promena u obliku izazvano razlikama u veličini i da je ovaj procenat alometrije stistički neznan, $p=0,092$, stoga je dalja analiza vršena na Prokrustovim koordinatama. PCA analiza ukazuje za veliko preklapanje između grupa (tabela 43, slika 61), pri čemu varijansa celokupnog uzorka iznosi 0,00097073. Jedinke tretirane sa 250 mg/kg CeO₂ se izdvajaju od ostalih u negativnom delu PC2 ose (19% varijabilnosti) i karakteriše ih izdužena baza krila, sužavanje distalnog oboda (specifične tačke 7 i 8) i zbijanje specifičnih tačaka 9 i 10 koje opisuju distalne krajeve drugog distalnog i subkostalnog nerva.

Tabela 43 – Prvih 10 PC osa (od ukupno 22), koje opisuju preko 90% ukupne varijabilnosti u uzorku na osnovu PCA analize konstelacije 13 tačaka koje opisuju oblik i veličinu desnih krila odraslih mužjaka hironomida. Biološki test sa CeO₂ nanočesticama.

PC osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1.	000029063	29,940	29,940
2.	0.00018442	18,998	48,938
3.	0.,00010098	10,403	59,341
4.	0,00008144	8,390	67,731
5.	0,00004879	5,027	72,757
6.	0,00004520	4,657	77,414
7.	0,00004116	4,241	81,655
8.	0,00003012	3,103	84,758
9.	0,00002732	2,815	87,573
10.	0,00002584	2,662	90,235



Slika 61 - PCA analiza desnih krila odraslih mužjaka hironomida izlaganih CeO_2 nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i trećom PC osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe, tj. tretmana sa 90% intervalom pouzdanosti. "Outline" i "Wireframe" graphicima predstavljene su pecifične promene u obliku krila asociirane sa svakom osom (faktor skaliranja 0,06): prosečni oblik krila obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen zeleno.

CVA analiza i distribucija jedinki, u okviru tretmana, u morfološkom prostoru definisanom prvom i trećom CV osom ukazuje na veliko preklapanje grupa na osnovu morfologije desnih krila odraslih mužjaka (tabela 44, slika 62). Na osnovu CV1 ose (47,84% varijabilnosti) primećuje se veliko preklapanje grupa, sa grupom tretiranom najvećom koncentracijom, od 2500 mg/kg nano- CeO_2 , pozicioniranom u centru i kontrolom grupom pretežno u negativnom delu (šira krila u srednjem delu opisanim specifičnim tačkama 4, 5, 10 i 11). Na osnovu CV3 ose (16,71 % varijabilnosti) grupa tretirana sa najvećom koncentracijom izdvaja se od stalih grupa u negativnom delu i karakterišu je proširenje baze krila (specifične tačke 1, 2 i 3), izduženje analnog nerva (specifične tačke 3 i 4), izduženje medijalnog nerva (specifična tačka 6) i skraćenje subkostalnog nerva (specifična tačka 10). Specifičan obrazac variranja oblika krila u odnosu na količinu nanočestica ne može se uočiti iako mahalabisove distance pokazuju statistički značajnu razliku između svih grupa (tabela 45).

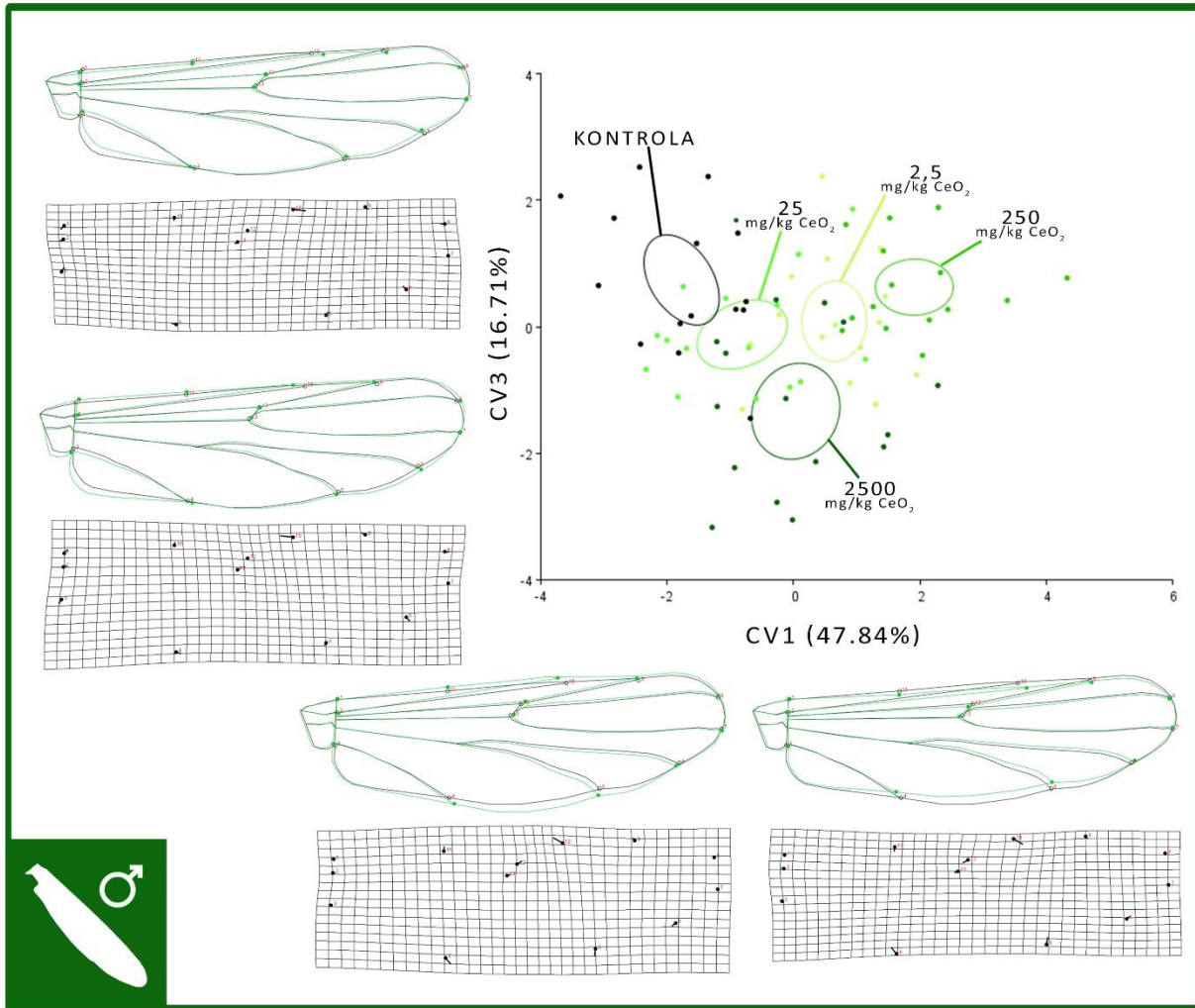
Tabela 44 – Sopstvene vrednosti i procenti varijabilnosti koje objašnjavaju CV ose na osnovu CVA analize konstelacije 13 tačaka koje opisuju oblik i veličinu desnih krila odraslih ženki hironomida. Biološki test sa CeO₂ nanočesticama.

CV osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1.	1,69495363	47,836	47,836
2.	0,86126327	24,307	72,142
3.	0,59228845	16,716	88,858
4.	0,39478389	11,142	100,000

Tabela 45 – Mahalanobisove distance izmedju grupa i p vrednosti dobijene permutacionim testom (10000 permutacija) mahalanobisovih distanci. Biološki test sa CeO₂ nanočesticama.

		Mahalanobisove distance				
Tretmani (krila mužjaka)		2,5 mg/kg CeO ₂	25 mg/kg CeO ₂	250 mg/kg CeO ₂	2500 mg/kg CeO ₂	Kontrola
p vrednosti permutacionih testova	2,5 mg/kg CeO ₂		2,4848	2,2816	2,3004	3,0276
	25 mg/kg CeO ₂	0,0004*		3,3791	2,7637	2,8195
	250 mg/kg CeO ₂	0,0064*	<,0001*		2,7981	3,7893
	2500 mg/kg CeO ₂	0,0078*	<,0001*	<,0001*		2,7649
	Kontrola	<,0001*	<,0001*	<,0001*	0,0001*	

*statistički značajne razlike izmedju grupa, p<0,05



Slika 62 - CVA analiza desnih krila odraslih mužjaka hironomida izlaganih CeO₂ nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i trećom CV osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe sa 90% intervalom pouzdanosti. "Transformation grid" i "Outline" graficima predstavljene su pecifične promene u obliku krila asociirane sa svakom osom (faktor skaliranja 6): prosečni oblik krila obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen zeleno

Oksidativni stres

Saržaj ukupnih proteina u larvama varirao je od prosečno 0,81 do 1,20 mg po ml testiranog uzorka. Vrednosti koncentracije MDA varirale su od prosečno 14,07 nmol (u najvišem tretmanu) do 23,16 nmol po mg proteina (u jedinkama tretiranim drugom najvišom koncentracijom); dok je SOD aktivnost varirala od 38,68 do 54,41 (najviša koncentracija) po mg proteina u uzorku (tabela 46). ANOVA, praćena *post hoc* Dunett testom, pokazala je da nema statistički značajnih razlika ni u jednom od parametara oksidativnog stresa između tretmana, kao ni između tretmana i kontrole.

Tabela 46 - Biološki test za procenu subletalnih efekata nano-CeO₂ – Vrednosti parametara oksidativnog stresa u *C. riparius* larvama izlaganim nano-CeO₂.

Tretman (mg nano-CeO ₂ /kg sedimenta)	0 (Kontrola)	2.5	25	250	2500
Ukupni proteini (mg proteina / mL uzorka)	1,063 ± 0,05	1,17 ± 0,20	1,20 ± 0,14	1,16 ± 0,17	0,81 ± 0,24
Kondencracija MDA (nmol /mg proteina)	16,08 ± 2,19	16,08 ± 5,32	20,62 ± 8,43	23,16 ± 7,61	14,07 ± 2,60
SOD (aktivnost / mg proteina)	49,90 ± 4,68	38,68 ± 13,20	40,39 ± 11,41	40,02 ± 12,58	54,41 ± 13,71

Oštećenja na DNK

Procena *in vivo* genotoksičnosti nano-CeO₂ ukazala je na korelaciju između količine nanočestica u sedimentu i ukupnog oštećenja DNK u tretmanima (tabela 47).

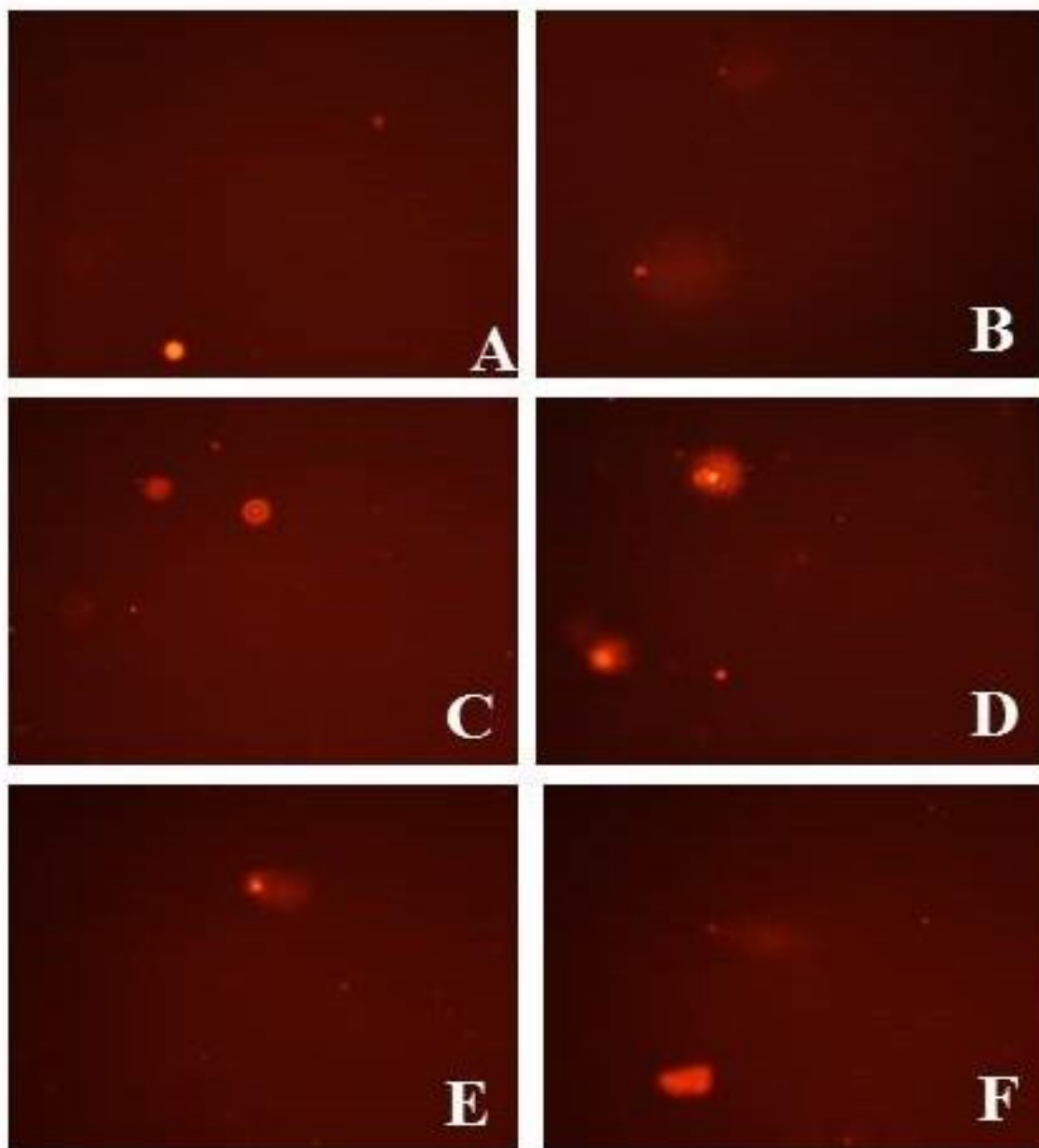
U tretmanima 25, 250 i 2500 mg/kg nano-CeO₂ se pokazalo značajno povećanje ukupnog kometa skora zavisno od doze nano-CeO₂ (32,1; 65,3 i 146,1, respektivno) u poređenju sa kontrolom (13,9). Tretman sa najnižom koncentracijom od 2,5 mg/kg nano-CeO₂ je pokazao značajno niži ukupan skor kometa u odnosu na pozitivnu kontrolu i tretmane sa visokim koncentracijama. Srednje oštećenje DNK u pozitivnoj kontroli (tretiranoj sa 100 mM H₂O₂) je bilo statistički značajno veće nego u netretiranoj kontroli. Treba napomenuti da je u najvišem tretmanu sa 2500 mg/kg nano-CeO₂ oštećenje DNK statistički značajno više od svih ostalih

tretmana, pa čak i od pozitivne kontrole. Podaci pokazuju da su komete klase 0 (ćelije bez oštećenja) najprisutnije u netretiranoj kontroli i tretmanima 2,5 i 25; dok su komete klase 4 (najveća oštećenja) prisutne jedino u pozitivnoj kontroli i najvišem tretmanu 25000 mg/kg nano-CeO₂ (slika 63).

Tabela 47 - Biološki test za procenu subletalnih efekata nano-CeO₂ – Rezultati kometa testa za procenu *in vivo* genotoksičnosti nano-CeO₂, na osnovu oštećenja DNK *C. riparius* larvi.

Tretman	Klase kometa ^a					Ukupan skor kometa ^a
	0	1	2	3	4	
NC^b	86,1 ± 0,34	13,9 ± 0,20	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	13,9 ± 0,61 [†]
PC^c	46,4 ± 1,02	23,3 ± 0,35	16,4 ± 0,95	8,2 ± 0,42	5,7 ± 1,2	103,5 ± 0,8 [*]
2,5	82,4 ± 0,60	17,6 ± 0,12	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	17,6 ± 0,47 [†]
25	83,9 ± 0,30	6,5 ± 1,20	3,2 ± 0,32	6,4 ± 0,80	0,00 ± 0,00	32,1 ± 0,64 ^{*†}
250	47,8 ± 0,43	39,1 ± 0,17	13,1 ± 0,24	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	65,3 ± 0,40 ^{*†}
2500	38,5 ± 0,60	15,4 ± 0,82	15,3 ± 0,42	23,1 ± 0,70	7,7 ± 0,41	146,1 ± 1,02 ^{*†}

^aSrednje vrednosti ± SEM tri nezavisna replikata
^bNC: netretirana kontrola
^cPC: pozitivna kontrola, tretirana sa 100 mM H₂O₂
^{*}p<0,05 u poređenju sa kontrolnom grupom



Slika 63 - Reprezentativne fotomikrografije kometa testa koje pokazuju migraciju DNK larvi *C. riparius* četvrtog stupnja nakon tretmana nano-CeO₂. A - netretirana kontrola, B - pozitivna kontrola, tretirana sa 100 mM H₂O₂, C – tretman 2,5 mg nano-CeO₂/kg sedimenta, D – tretman 25 mg nano-CeO₂/kg sedimenta, E – tretman 250 mg nano-CeO₂/kg sedimenta, F – tretman 2500 mg nano-CeO₂/kg sedimenta.

4.2.2.2.1 Set eksperimenata za ispitivanje toksičnosti CeO₂ nanočestica na podlozi od krupnog peska

Prvi biološki test za procenu letalnih efekata (uticaja na odrasle jedinke), koji se sastojao iz istih pet tretmana kao i prethodni eksperiment, sa po četiri replikata završen je pet dana nakon što je zabeleženo izletanje poslednje odrasle jedinke, nakon 27 dana.

Drugi biološki test za procenu subletalnih efekata, koji se sastojao iz istih pet tretmana sa po četiri replikata, završen je tri dana nakon što su primećene prve larve četvrtog stupnja, nakon 11 dana.

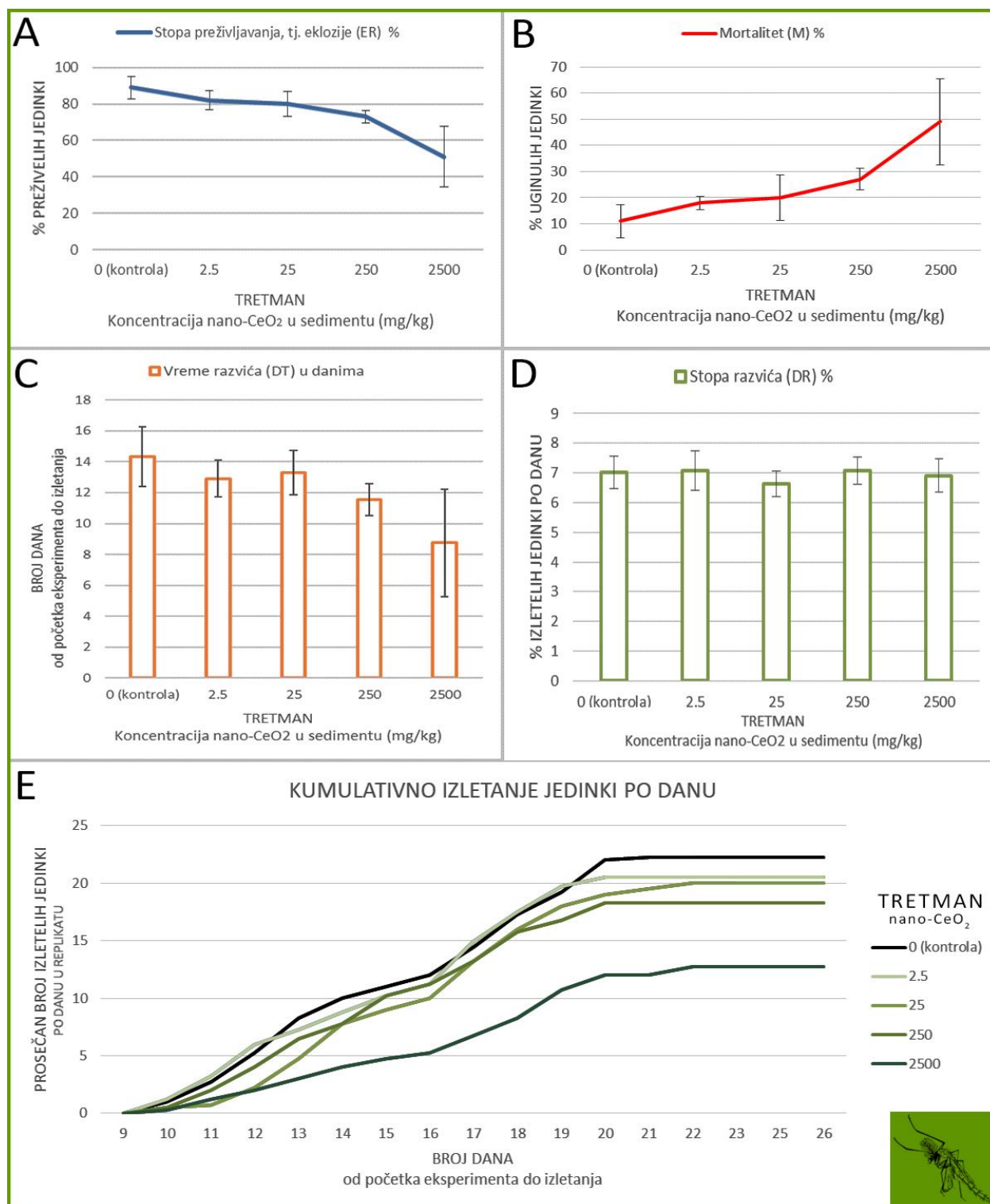
Standardni životni parametri

Prvi biološki test za procenu letalnih efekata nano-CeO₂ (uticaja na odrasle jedinke)

Odrasle jedinke su počele sa izletanjem 10 dana od početka eksperimenta, a poslednja jedinka izletela je nakon 22 dana. Nije bilo statistički značajne razlike u analiziranim parametrima između polova (T test, $p > 0,05$) te su rezultati za mužjake i ženke pulirani u statističkoj analizi. ANOVA je pokazala da nema statistički značajnih razlika u standardnim parametrima između tretmana iako se primećuje povećanje mortaliteta pri visokim koncentracijama (tabela 49, slika 64).

Tabela 48 – Biološki test za procenu subletalnih efekata nano-CeO₂ na podlozi od krupnog peska. Stopa preživljavanja (ER) - % izletelih jedinki na kraju eksperimenta; stopa mortaliteta (M) - % mrtvih jedinki na kraju eksperimenta; vreme razvića (DT) – broj dana od početka eksperimenta do izletanja; stopa razvića razvića (DR) – prosečan % izletelih jedinki po danu

Koncentracija nano-CeO ₂ u sedimentu (mg/kg)	0 (kontrola)	2,5	25	250	2500
ER ± SD (%)	89 ± 12,38	82 ± 10,58	80 ± 13,86	73 ± 6,83	51 ± 33,21
M ± SD (%)	12,8 ± 12,38	18 ± 10,58	20 ± 13,86	27 ± 6,83	49 ± 33,21
DT ± SD (dan)	14,33 ± 3,82	12,91 ± 2,37	13,30 ± 2,86	11,54 ± 2,07	8,76 ± 6,96
DR ± SD (% izletelih jedinki/dan)	7,02 ± 1,10	7,08 ± 1,33	6,34 ± 0,84	7,07 ± 0,91	5,96 ± 0,85



Slika 64 – Set eksperimenata za ispitivanje toksičnosti CeO₂ nanočestica na podlozi od krupnog peska. Uticaj na standardne parametre: A – stopu preživljavanja (ER); B - mortalitet (M); C – vreme razvića (DT); D – stopu razvića (DR); E – odlaganje razvića larvi u odrasle jedinke. Prikazane su prosečne vrednosti za sve replikate u jednom tretmanu.

Drugi biološki test za procenu subletalnih efekata nano-CeO₂

Ispunjen je osnovni kriterijum za validnost testa (prosečno preživljavanje od minimum 70% u kontroli). Prve larve četvrtog stupnja primećene su nakon 8 dana. Rezultati ne pokazuju statistički značajno variranje između grupa ni za jedan parametar, međutim stepen preživljavanja je niži nego u istom esperimentu na sitnom pesku (tabela 49).

Tabela 49 - Biološki test za procenu subletalnih efekata nano-CeO₂ na podlozi od krupnog peska (preživljavanje i moku masu *C. riparius* larvi). Prikazane su srednje vrednosti \pm SD u %

redni broj tretmana	tretman (koncentracija nano-CeO ₂ mg/kg)	Preživljavanje (mean \pm SD) %	Mokra masa (mean \pm SD) mg
1	2,5	70 \pm 30,89	8,22 \pm 1,40
2	25	76 \pm 1032	9,21 \pm 1,29
3	250	74 \pm 25,82	7,88 \pm 0,85
4	2500	87 \pm 8,25	7,92 \pm 1,34
5	kontrola	85 \pm 14,34	8,6 \pm 1,47

Procena količine unetih nanočestica (ICP-MS)

ICP-MS analiza je pokazala da netretirane larve *C. tentans* u svojim telima sadrže prosečno 32,23 \pm 4 mg nano-CeO₂ po kg mokre mase (ova “pozadinska” koncentracija iz kontrolnog uzorka oduzeta je od detektovanih vrednosti u tretmanima, kako bi se dobile konkretne vrednosti unetih nanočestica tokom eksperimenta). Kruskal-Wallis-ov test je pokazao značajne razlike između svih tretmana (tabela 50).

Tabela 50 - Dopunski eksperiment za procenu uticaja nano-CeO₂ na podlozi od krupnog peska. ICP-MS analiza koncentracije nano-CeO₂ u telima *C. riparius* larvi

Tretman (mg nano-CeO ₂ /kg sedimenta)	2.5	25	250	2500
Nano- CeO ₂ koncentracija u telima larvi average \pm SD (mg CeO ₂ /kg mokre mase)	390 \pm 88	4014 \pm 561	21520 \pm 938	139136 \pm 5909

Koncentracije nano-CeO₂ u telima tretiranih larvi pokazale su visoku korelaciju sa koncentracijom nanočestica u sedimentu (Spearman rho=0,997, p<0,0001). Nivo nano-CeO₂ u telima larvi je varirao od oko 32,23 mg/kg u kontrolama do oko 139,136 mg/kg u larvama tretiranim najvišim koncentracijama. Kada se koncentracija nanočestica u sedimentu povećavala 1000x (od 2,5 do 2500 mg/kg nano-CeO₂) koncentracija u telima larvi se povećavala za 356,76x (od 390 mg/kg do 139,136 mg/kg nano-CeO₂ u proseku).

Geometrijska morfometrija

Vizuelnom analizom morfoloških struktura, od ukupno 300 jedinki izbačeno je 24 mandibula i 22 mentuma (prilozi 7 i 8). Među mandibulama uočeno je 16 (5,3%) vidljivo deformisanih (tri u tretmanu sa 2,5 mg/kg; šest u tretmanu sa 25 mg/kg; jedna u tretmanu sa 250 mg/kg; tri u tretmanu sa 2500 mg/kg i tri u kontroli, u vidu nedostatka apikalnog zuba, potpunog iskrivljenja mandibule ili dodatnog unutrašnjeg zuba - u kontroli) i 8 potpuno oštećenih. Među mentumima uočeno je i 12 (4%) vidljivo deformisanih (četiri u tretmanu sa 2,5 mg/kg - proširenje razmaka između lateralnih zuba, deformacije centralnog zuba, nedostatak lateralnog zuba; četiri u tretmanu sa 25 mg/kg - deformacije centralnog i nedostatak lateralnog zuba, jedan u tretmanu sa 250 mg/kg - nedostatak lateralnog zuba, dva u tretmanu sa 2500 mg/kg - deformacije centralnog i nedostatak lateralnog zuba i jedan u kontroli - nedostatak lateralnih zuba) i 10 vidljivo izlomljenih ili nerazvijenih. Procenat deformisanih i istrošenih struktura bio je izuzetno mali u odnosu na ukupan uzorak, te nije bilo moguće statistički obraditi rezultate. Jedinke sa ovakvim strukturama su izbačene iz daljih analiza metodom geometrijske morfometrije.

Mandibule

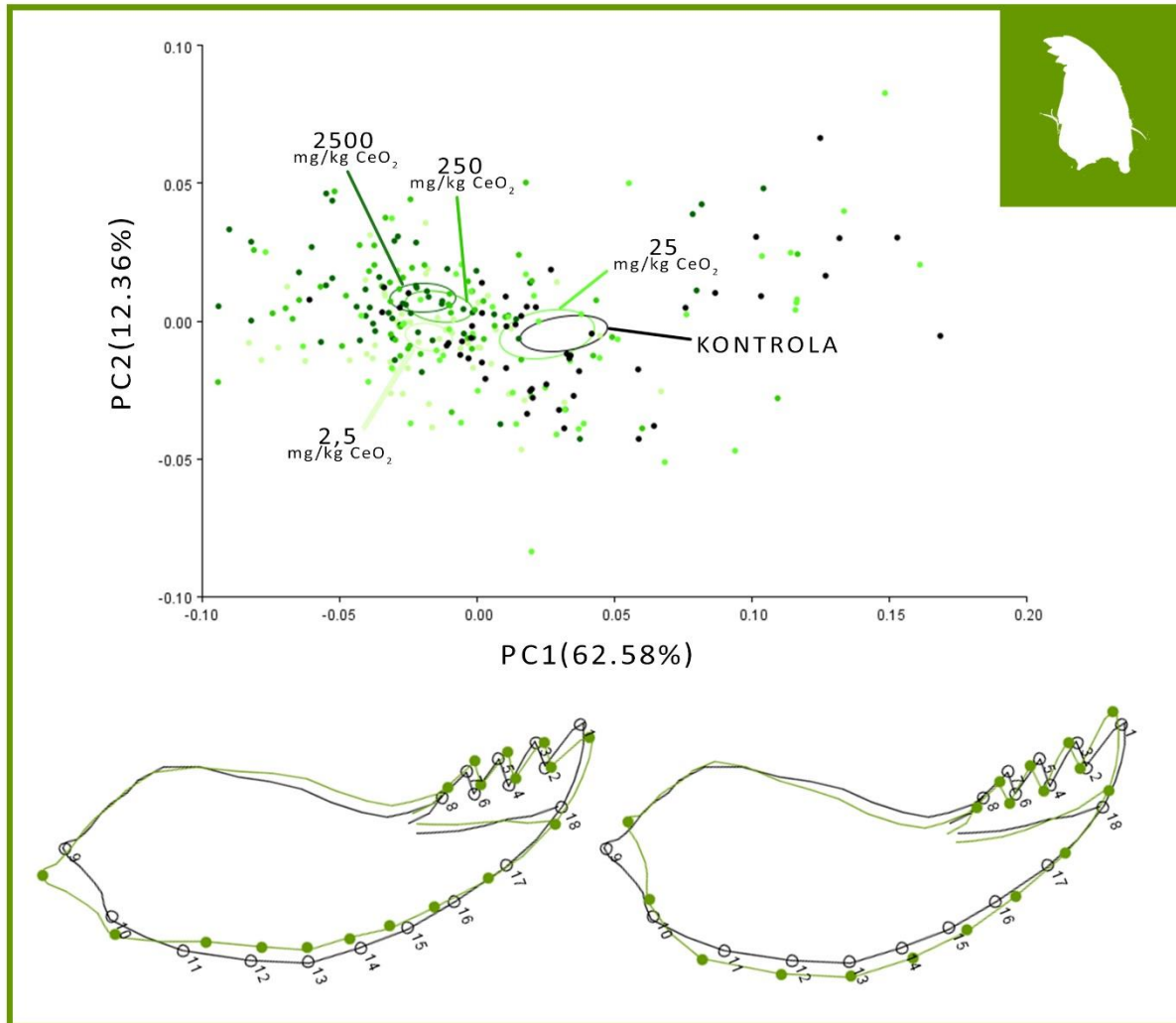
Fotografisane su desne mandibule ukupno 276 jedinki i na svakoj je digitalizovano 18 specifičnih tačaka. Pomoću samog programa uočeno je 10 (3,67% od ukupnog uzorka) jedinki sa "ekstreminim" vrednostima morfoloških parametara, koje su izbačene iz dalje analize. Jedinke su grupisane u pet grupa, na osnovu tretmana CeO₂ nanočesticama: 2,5 mg/kg; 25 mg/kg; 250 mg/kg i 2500 mg/kg nano-CeO₂ i kontrolna grupa.

Nije uočeno postojanje značajne razlike u veličini mandibula (ANOVA $F=0,58$; $p=0,68$), međutim potvrđeno je da postoje značajne razlike u obliku mandibula (MANOVA Willks' $\lambda=0,25$; $F=3$; $p=0,00$), te je pristupljeno daljim analizama.

PCA anaiza ukazala je na razdvajanje grupa na osnovu morfologije mandibula, ali sa velikim stepenom preklapanja (tabela 51, slika 65). Duž PC1 ose (62,58% ukupne varijabilnosti) kontrolna i grupa tretirana koncentracijom od 25 mg/kg nano-CeO₂ se grupišu u pozitivnom delu, dok se ostale grupe izdvajaju u negativnom delu ose (pri čemu se grupe tretirane dvema najvišim koncentracijama u najvećoj meri preklapaju, a grupa tretirana najmanjom koncentracijom se blago izdvaja). Uočava se da jedinke u pozitivnom delu CV1 ose imaju kraći zglob mandibule, sa uvučenim unutrašnjim i ispupčenim spoljašnjim delom mandibule (specifične tačke 11 do 17) i izduženim apikalnim zubom (specifična tačka 1), dok je kod jedinki u negativnom delu CV1 ose situacija obrnuta. Ukupna varijabilnost uzorka iznosi 0,00378211, a u tretmanu 2,5 mg/kg CeO₂ iznosi 0,00195533, u tretmanu 25 mg/kg CeO₂ iznosi 0,00536588, u tretmanu 250 mg/kg CeO₂ iznosi 0,00271128, 2500mg/kg CeO₂ iznosi 0,00270197, a u kontroli iznosi 0,00379313.

Tabela 51 – Prvih 6 PC osa (od ukupno 32), koje opisuju preko 90% ukupne varijabilnosti u uzorku na osnovu PCA analize konstelacije 18 tačaka koje opisuju oblik i veličinu mandibula larvi hironomida. Biološki test sa CeO₂ nanočesticama - krupan pesak.

PC osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1.	0,00236688	62,581	62,581
2.	0,00046768	12,365	74,946
3.	0,00032896	8,698	83,644
4.	0,00015404	4,073	87,717
5.	0,00008330	2,203	89,920
6.	0,00004587	1,213	91,133



Slika 65 – PCA analiza mandibula larvi hironomida izlaganih CeO₂ nanočesticama na krupnom pesku - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugim PC osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe sa 90% intervalom pouzdanosti. "Outline" graficima predstavljene su pecifične promene u obliku mandibula asociirane sa svakom osom (sa faktorom skaliranja 0,1) prosečni oblik mandibula obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen zeleno.

CVA analiza pokazala je razdvajane grupa na osnovu morfologije mandibula u morfološkom prostoru definisanom CV osama (tabela 52, slika 66). Uočava se razdvajanje grupa, jedinke kontrolne grupe se nalaze pretežno u pozitivnom delu CV1 ose (50,85% ukupne varijabilnosti) i negativnom delu CV2 ose (objašnjava 24,33% varijabilnosti) i jasno se odvajaju od tretiranih grupa. Grupa tretirana sa 25 mg/kg nano-CeO₂ se u najvećoj meri preklapa sa kontrolnom, dok se grupe tretirane sa 2,5 i 250 i 2500 mg/kg nano-CeO₂ u najvećoj meri

medjusobno preklapaju. Kod tretiranih jedinki celokupni unutrašnji deo mandibule se širi, zubi zbijaju i skraćuje apikalni zub, što je u suprotnosti sa rezultatima dobijenim na sitnom pesku. Razdvajanje grupa potvrđuju i vrednosti Mahalanobisovih distanci koje pokazuju značajnu razliku između svih grupa (tabela 53).

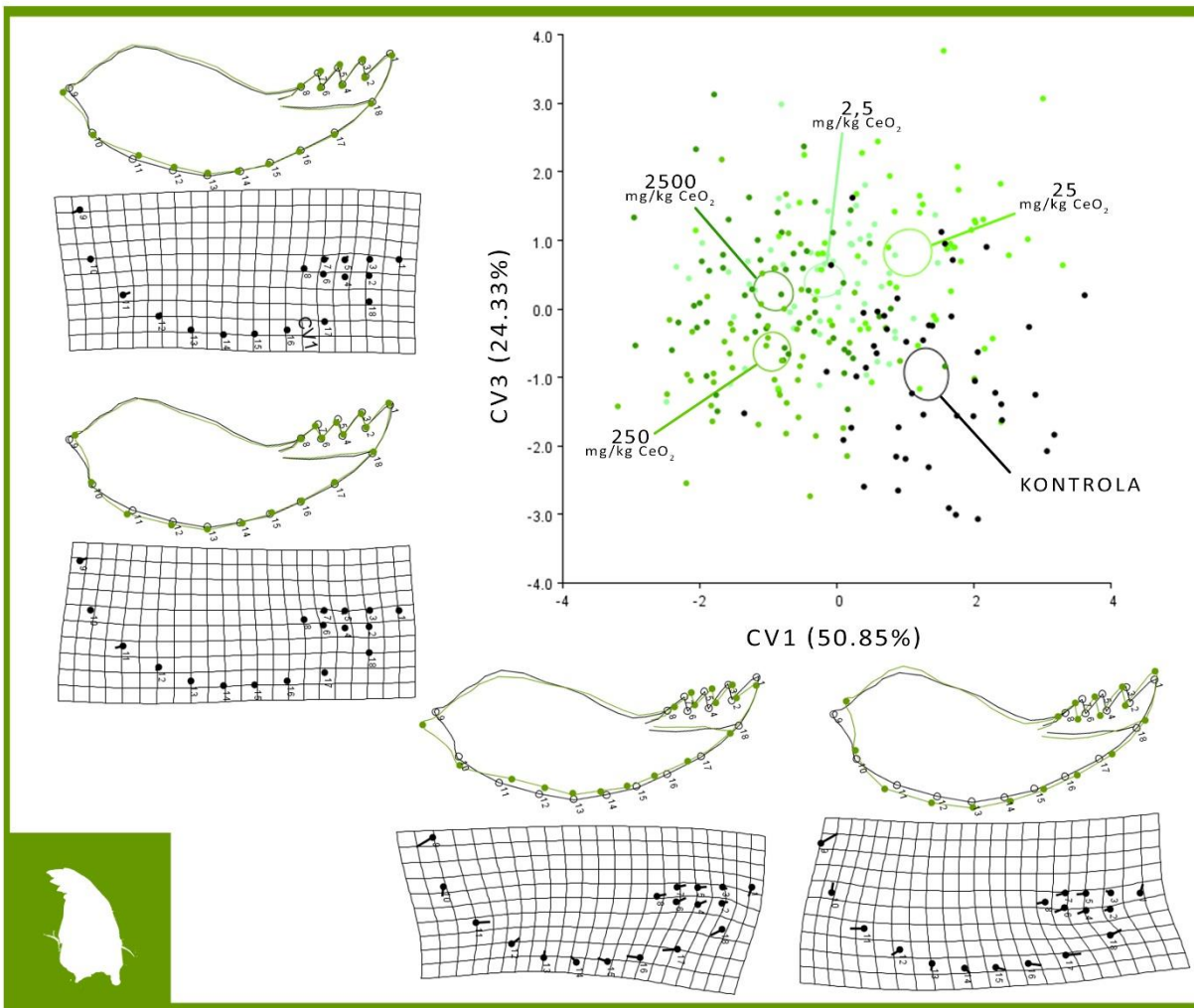
Tabela 52 – Sopstvene vrednosti i procenti varijabilnosti koje objašnjavaju CV ose na osnovu CVA analize konstelacije 18 tačaka koje opisuju oblik i veličinu mandibula larvi hironomida. Biološki test sa CeO₂ nanočesticama - krupan pesak.

CV osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1.	0,90253059	50,854	50,854
2.	0,43184957	24,333	75,187
3.	0,26472400	14,916	90,103
4.	0,17563806	9,897	100,000

Tabela 53 – Mahalanobisove distance između grupa i p vrednosti dobijene permutacionim testom (10000 permutacija) mahalanobisovih distanci. Eksperiment na krupnom pesku

	Tretmani (mandibule)	Mahalanobisove distance				Kontrola
		2,5 mg/kg CeO ₂	25 mg/kg CeO ₂	250 mg/kg CeO ₂	2500 mg/kg CeO ₂	
p vrednosti permutacionih testova	2,5 mg/kg CeO ₂		1,8747	1,8159	1,4711	2,1718
	25 mg/kg CeO ₂	<,0001*		2,4731	2,2859	2,0155
	250 mg/kg CeO ₂	<,0001*	<,0001*		1,5297	2,4941
	2500 mg/kg CeO ₂	0,0003*	<,0001*	<,0001*		2,5825
	Kontrola	<,0001*	<,0001*	<,0001*	0,0001*	

*statistički značajne razlike između grupa, $p < 0,05$



Slika 66 – CVA analiza mandibula larvi hironomida izlaganih CeO_2 nanočesticama na krupnom pesku - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugom CV osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe sa 90% intervalom pouzdanosti. "Outline" i "Transformation grid" graficima predstavljene su pecifične promene u obliku mandibula asociirane sa svakom osom (aktor skaliranja 4): prosečni oblik mandibula obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen zeleno.

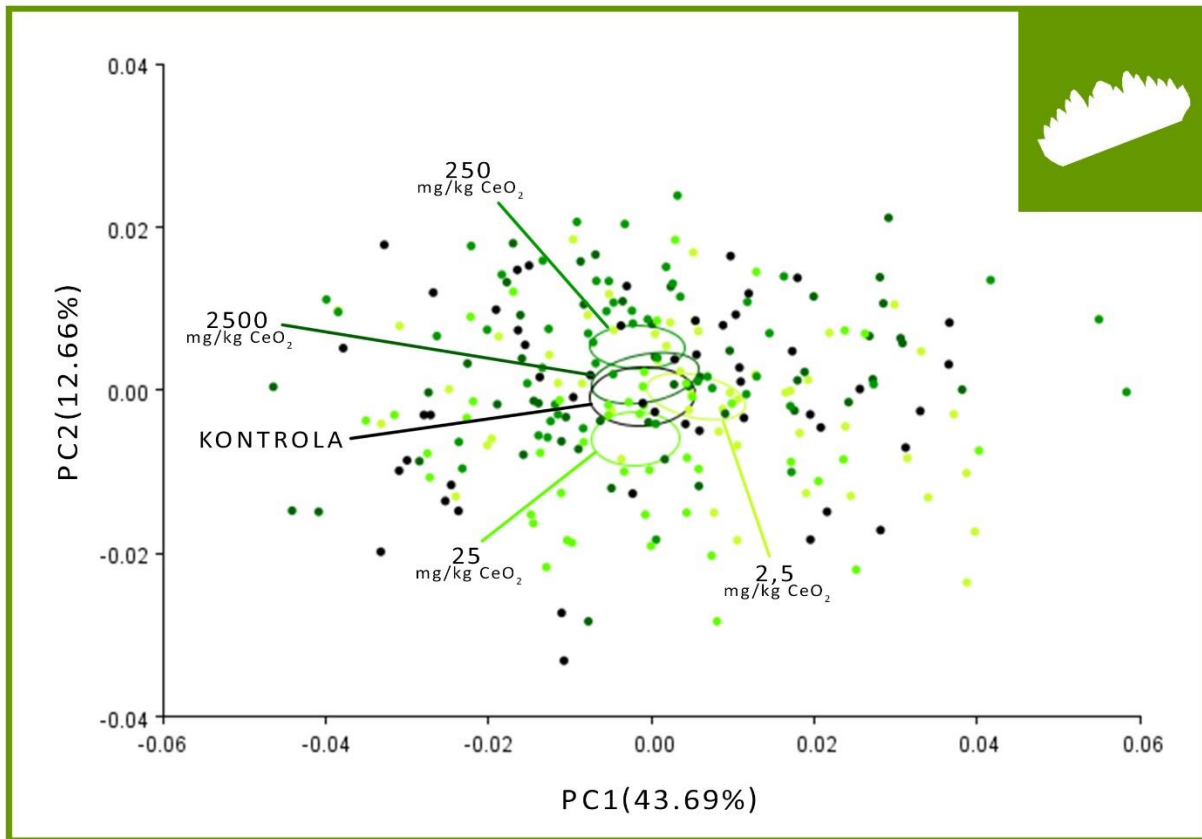
Mentumi

Fotografisani su mentumi ukupno 278 jedinke i na svakom je digitalizovano 29 specifičnih tačaka. Pomoću samog programa uočeno je 20 (7,19% od ukupnog uzorka) jedinki sa “ekstreminim” vrednostima morfoloških parametara, koje su izbačene iz dalje analize. Jedinke su grupisane u pet grupa, na osnovu tretmana CeO₂ nanočesticama: 2,5 mg/kg; 25 mg/kg; 250 mg/kg i 2500 mg/kg nano-CeO₂ i kontrolna grupa.

Uočene su značajne razlike u veličini mentuma (ANOVA $F=3,55$; $p=0,007$). *Post hoc* Tukey test je pokazao jedinu značajnu razliku ($p<0,05$) između grupe tretirane sa 2500 mg/kg nano-CeO₂ (manja veličina centroida) i grupa tretiranih sa 2,5 mg/kg i 25 mg/kg nano-CeO₂ i kontrolne grupe (veća veličina centroida). Uočene su i značajne razlike u obliku mentuma (MANOVA Willks’ $\lambda=0,42$; $F=2$; $p=0,00$), te je pristupljeno daljim analizama. Regresiona analiza pokazala je da je ukupno 1,31 % promena u obliku izazvano razlikama u veličini i da je ovaj procenat alometrije, iako veoma mali, stistički značajan, $p=0,014$, te je dalja analiza izvršena na regresionim rezidualima. Na osnovu PCA analize uočljivo je pozicioniranje svig grupa u centru morfološkog prostora uz veliko međusobno preklapanje i blago izdvajanje grupe tretirane sa 2,5 mg/kg CeO₂ (tabela 54, slika 67). Ukupna varijabilnost iznosi 0,00086174, a u tretmanu 2,5 mg/kg CeO₂ 0,00089718, 25 mg/kg CeO₂ 0,00072753, 250 mg/kg CeO₂ 0,00080180, 2500mg/kg CeO₂ 0,00087609, a u kontroli 0,00088633.

Tabela 54 – Prvih 11 PC osa (od ukupno 27), koje opisuju preko 90% ukupne varijabilnosti u uzorku na osnovu PCA analize konstelacije 29 specifičnih tačaka koje opisuju oblik i veličinu mentuma larvi hironomida. Biološki test sa CeO₂ nanočesticama – krupni pesak.

PC osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1.	0,00037648	43,688	43,688
2.	0,00010908	12,658	56,347
3.	0,00009525	11,053	67,400
4.	0,00005350	6,208	73,608
5.	0,00003384	3,927	77,535
6.	0,00002967	3,443	80,978
7.	0,00002339	2,714	83,692
8.	0,00001848	2,144	85,836
9.	0,00001442	1,674	87,510
10.	0,00001343	1,559	89,069
11.	0,00001008	1,170	90,238



Slika 67 – PCA analiza mentuma larvi hironomida izlaganih CeO₂ nanočesticama na krupnom pesku - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugim PC osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe sa 90% intervalom pouzdanosti.

CVA analiza i distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom CV1 i CV3 osama ukazuje na razdvajanje grupa na osnovu morfologije mandibula (tabela 55, slika 68). Po CV1 osi (47,14% varijabilnosti) se grupa tretirana najvišom koncentracijom od 2500 mg/kg nano-CeO₂, kontrolna i grupa tretirana sa 25 mg/kg nano-CeO₂ izdvajaju u pozitivnom delu od grupa tretiranih sa 2,5 i 250 mg/kg nano-CeO₂ koje se grupišu u negativnom delu ose, dok je po CV3 osi (16,48% varijabilnosti) uočljivo izdvajanje kontrolne i grupa tretiranih nižim koncentracijama od 2,5 i 25 mg/kg nano-CeO₂ u negativnom, u odnosu na grupe tretirane najvišim koncentracijama u pozitivnom delu ose. Sa povećanjem koncentracije dolazi do

izduživanja centralnog zuba (specifične tačke 13, 15 i 17 se kreću distalno) i izduživanja vrha unutrašnjeg lateralnog zuba (specifične tačke 11 i 19), uz to dolazi i do skraćivanja bočnih lateralnih zuba (specifične tačke 3, 5, 7, 23, 25 i 27). Mahalanobisove distance pokazuju značajnu razliku između svih grupa (tabela 56).

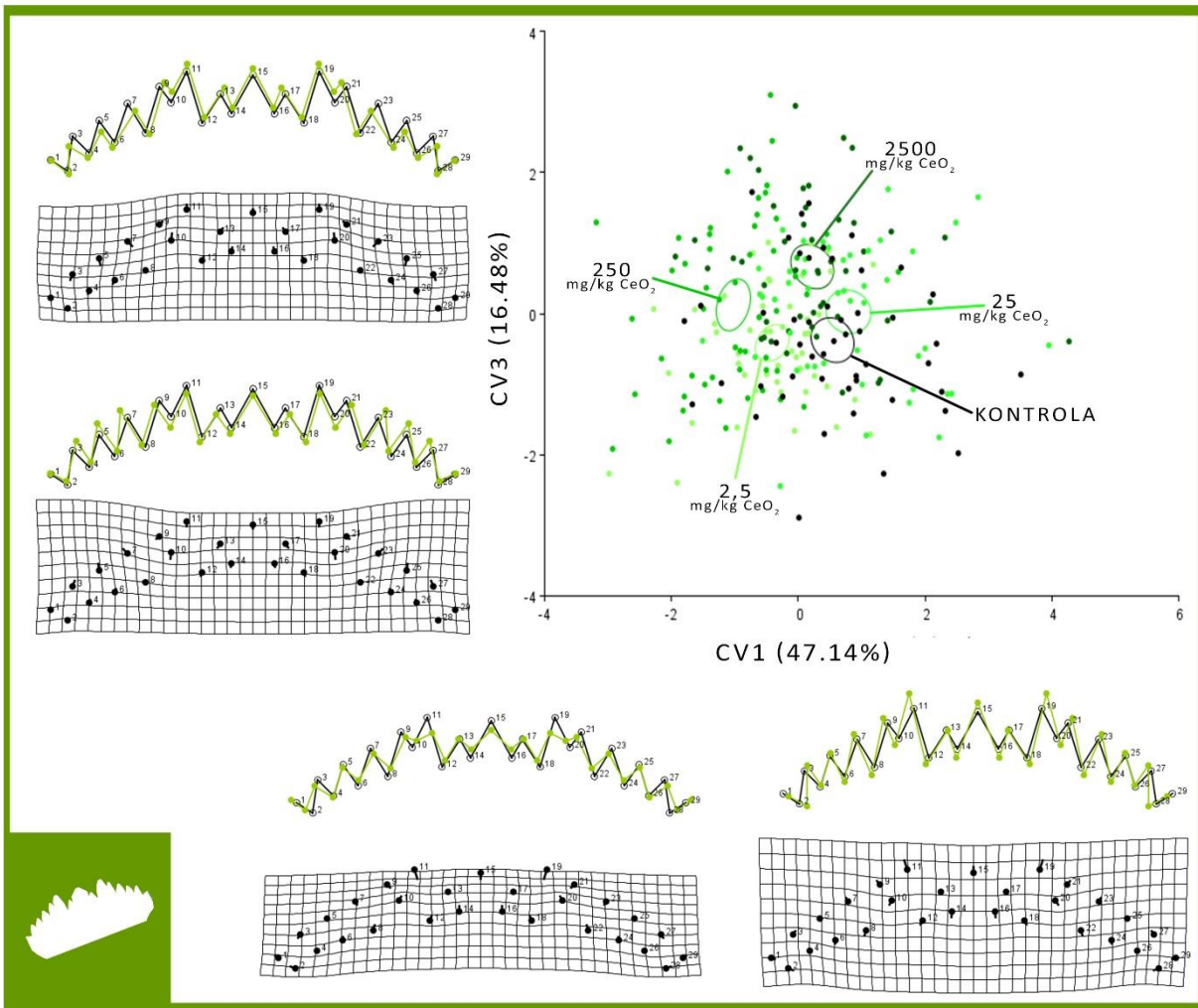
Tabela 55 – Sopstvene vrednosti i procenti varijabilnosti koje objašnjavaju CV ose na osnovu CVA analize konstelacije 29 tačaka koje opisuju oblik i veličinu mentuma larvi hironomida. Biološki test sa CeO₂ nanočesticama - krupni pesak.

CV osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1.	0,44724069	47,140	47,140
2.	0,21923781	23,108	70,248
3.	0,15636365	16,481	86,729
4.	0,12590765	13,271	100,000

Tabela 56 – Mahalanobisove distance između grupa i p vrednosti dobijene permutacionim testom (10000 permutacija) mahalanobisovih distanci. Biološki test sa CeO₂ nanočesticama - krupni pesak.

	Tretmani (mentumi)	Mahalanobisove distance				
		2,5 mg/kg CeO ₂	25 mg/kg CeO ₂	250 mg/kg CeO ₂	2500 mg/kg CeO ₂	Kontrola
p vrednosti permutacionih testova	2,5 mg/kg CeO ₂		1,5311	1,2869	1,3717	1,5556
	25 mg/kg CeO ₂	0,0003*		1,9587	1,3492	1,4382
	250 mg/kg CeO ₂	0,0272*	<,0001*		1,5449	1,7662
	2500 mg/kg CeO ₂	0,0134*	0,0292*	<,0001*		1,2943
	Kontrola	0,0001*	0,0021*	<,0001*	0,0225*	

*statistički značajne razlike između grupa, $p < 0.05$



Slika 68 – CVA analiza mentuma larvi hironomida izlaganih CeO_2 nanočesticama na krupnom pesku - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugim CV osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe sa 90% intervalom pouzdanosti. "Transformation grid" i "Wireframe" graficima predstavljene su pecifične promene u obliku mentuma asocirane sa svakom osom (faktor skaliranja 6); prosečni oblik mentuma obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen zeleno.

4.2.2.3. Ispitivanje toksičnosti Fe₃O₄ nanočestica

Prvi biološki test za procenu letalnih efekata (uticaja na odrasle jedinke), koji se sastojao iz šest tretmana sa po četiri replikata (1 mg/kg; 5 mg/kg; 10 mg/kg; 50 mg/kg i 100 mg/kg nano-Fe₃O₄ i kontrolni tretman) završen je pet dana nakon što je zabeleženo izletanje poslednje odrasle jedinke, nakon 22 dana.

Drugi biološki test za procenu subletalnih efekata, koji se sastojao iz istih šest tretmana sa po tri replikata, završen je tri dana nakon što su primećene prve larve četvrtog stupnja, nakon 13 dana.

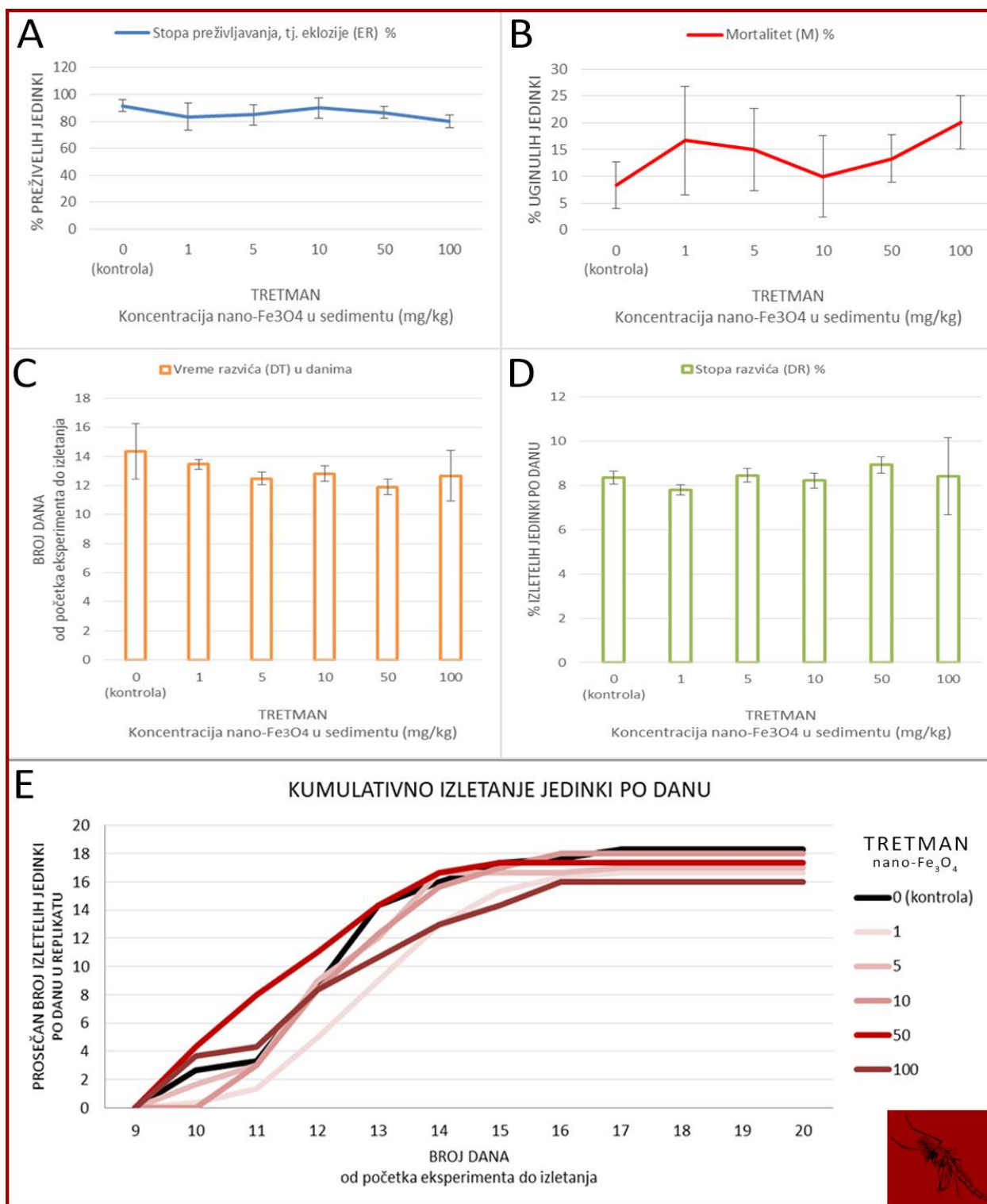
Standardni životni parametri

Prvi biološki test za procenu letalnih efekata nano-Fe₃O₄ (uticaja na odrasle jedinke)

Odrasle jedinke su počele sa izletanjem 10 dana od početka eksperimenta, a poslednja jedinka izletela je nakon 17 dana. Nije bilo statistički značajne razlike u analiziranim parametrima između polova (T test, $p > 0,05$), te su rezultati za mužjake i ženke pulirani u statističkoj analizi. ANOVA je pokazala da nema statistički značajnih razlika u standardnim parametrima između tretmana, kao ni između tretmana i kontrole (tabela 57, slika 69).

Tabela 57 – Biološki test za procenu uticaja nano-Fe₃O₄ na standardne parametre - Stopa preživljavanja (ER) - % izletelih jedinki na kraju eksperimenta; stopa mortaliteta (M) - % mrtvih jedinki na kraju eksperimenta; vreme razvića (DT) – broj dana od početka eksperimenta do izletanja; stopa razvića (DR) – prosečan % izletelih jedinki po danu

Koncentracija nano-Fe ₃ O ₄ u sedimentu (mg/kg)	0 (kontrola)	1	5	10	50	100
ER ± SD (%)	91,6 ± 7,64	83,3 ± 17,5	85 ± 13,2	90 ± 13,2	86,6 ± 7,64	80 ± 8,7
M ± SD (%)	8,3 ± 7,64	16,6 ± 17,5	15 ± 13,2	10 ± 13,2	13,3 ± 7,64	20 ± 8,7
DT ± SD (dan)	12,68 ± 0,87	13,46 ± 0,66	12,48 ± 0,86	12,81 ± 1,07	11,89 ± 1,04	12,67 ± 1,72
DR ± SD (% izletelih jedinki/dan)	8,35 ± 10,6	7,8 ± 0,46	8,45 ± 0,60	8,21 ± 0,69	8,92 ± 0,76	8,41 ± 1,14



Slika 69 - Biološki test za procenu uticaja nano-Fe₃O₄ na standardne parametre A – stopu preživljavanja (ER); B - mortalitet (M); C – vreme razvića (DT); D – stopu razvića (DR); E – odlaganje razvića larvi u odrasle jedinke. Prikazane su rosečne vrednosti za sve replikate u jednom tretmanu.

Biološki test za procenu subletalnih efekata nano-Fe₃O₄

Ispunjen je osnovni kriterijum za validnost testa (prosečno preživljavanje od minimum 70% u kontroli). Prve larve četvrtog stupnja primećene su nakon 10 dana. Rezultati ne pokazuju statistički značajno variranje između grupa ni za jedan parametar (tabela 58).

Tabela 58 - Biološki test za procenu subletalnih efekata nano-Fe₃O₄ - preživljavanje i mokra masa *C. riparius* larvi (srednje vrednosti ± SD u %).

redni broj tretmana	tretman (koncentracija nano-Fe ₃ O ₄ mg/kg)	Preživljavanje (mean ± SD) %	Mokra masa (mean ± SD) mg
1	1	87 ± 16,12	8,32 ± 0,60
2	5	84 ± 14,97	8,89 ± 0,93
3	10	90 ± 9,52	8,84 ± 1,08
4	50	85 ± 15,45	8,36 ± 1,26
5	100	85 ± 14,34	8,6 ± 1,47
6	0 (kontrola)	85 ± 6	8,97 ± 1,41

Geometrijska morfometrija

Vizuelnom analizom morfoloških struktura, od ukupno 208 jedinki izbačeno je 10 mandibula i 10 mentuma (prilog 9). Među mandibulama uočeno je samo 7 (3,4% od ukupnog uzorka) vidljivo deformisanih (tri u tretmanu sa 1 mg/kg; dva u tretmanu sa 5 mg/kg; jedna u tretmanu sa 10 mg/kg i jedna u kontroli, u vidu nedostatka apikalnog zuba, izduženja mandibule i u jednom slučaju nedostatka unutrašnjeg zuba - u tretmanu sa 10 mg/kg) i tri potpuno istrošene. Među mentumima nije uočen ni jedan vidljivo deformisan mentum, ali je uočeno ukupno 10 potpuno istrošenih. Procenat deformisanih i istrošenih struktura bio je izuzetno mali u odnosu na ukupan uzorak, te nije bilo moguće statistički obraditi rezultate. Jedinke sa ovakvim strukturama su izbačene iz daljih analiza metodom geometrijske morfometrije.

Mandibule

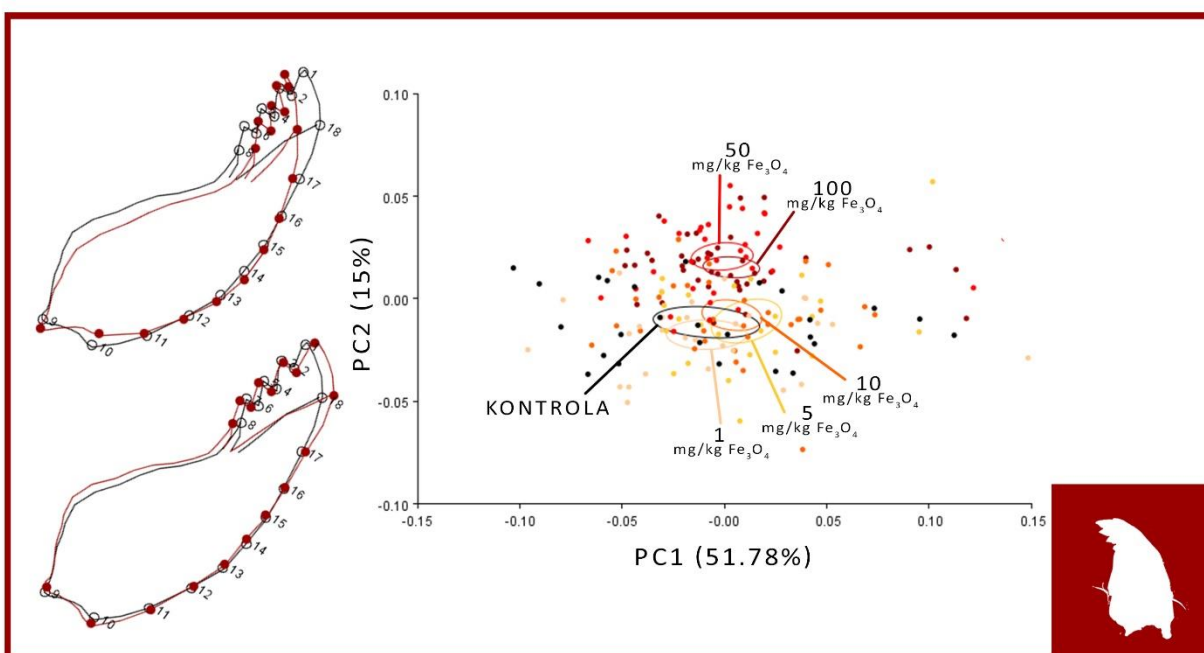
Fotografisane su desne mandibule ukupno 198 jedinki i na svakoj je digitalizovano 18 specifičnih tačaka. Pomoću samog programa, uočeno je 7 (3,53% od ukupnog uzorka) jedinki sa “ekstremnim” vrednostima morfoloških parametara, koje su izbačene iz dalje analize. Jedinke su grupisane u šest grupa, na osnovu tretmana CeO₂ nanočesticama: 1 mg/kg; 5 mg/kg; 10 mg/kg; 50 mg/kg i 100 mg/kg nano-Fe₃O₄ i kontrolna grupa.

Uotvrđeno je da postoje značajne razlike u veličini mandibula (ANOVA $F=2,46$; $p=0,034$), *Post hoc* Tukey test je pokazao da se značajno razlikuju samo grupa tretirana sa 1 mg/kg nano-Fe₃O₄ (manja veličina centroida) i sa 50 mg/kg Fe₃O₄ (veća veličina centroida). Potvrđeno je i postojanje značajnih razlika u obliku mandibula (MANOVA Willks' $\lambda=0,07$; $F=4$; $p=0,00$), te je pristupljeno daljim analizama.

Regresiona analiza pokazala je da je ukupno 4,9 % promena u obliku izazvano razlikama u veličini i da je ovaj procenat alometrije, iako veoma mali, stistički značajan, $p<0,0001$, te je dalja analiza izvršena na regresionim rezidualima. PCA analiza i distribucija jedinki u okviru tretmana u morfoprostoru ukazuje na razdvajanje jedinki u dve grupe na osnovu morfologije mandibula (tabela 59, slika 70). Duž PC2 ose (15% ukupne varijabilnosti) dolazi do razdvajanja: kontrola i grupe tretirane nižim koncentracijama CeO₂ se grupišu u negativnom delu, dok se dve grupe tretirane najvišim koncentracijama od 50 i 100 mg/kg nano-Fe₃O₄ grupišu u pozitivnom delu ose. Sa povećanjem koncentracije nano-Fe₃O₄ nanočestica dolazi do velikih promena u svim zubima koji se zbijaju (specifične tačke 1 do 8) uz savijanje apikalnog dela mandibule ka unutra unutrašnjosti (specifične tačke 17 i 18). Ukupna varijabilnost uzorka iznosi 0,00357345, a u tretmanu 1 mg/kg Fe₃O₄ iznosi 0,00348867, u tretmanu 5 mg/kg Fe₃O₄ iznosi 0,00332506, u tretmanu 10 mg/kg Fe₃O₄ iznosi 0,00280878, u tretmanu 50 mg/kg Fe₃O₄ iznosi 0,00293948, u tretmanu 100 mg/kg Fe₃O₄ iznosi 0,00298564 a u kontroli iznosi 0,00469393.

Tabela 59 – prikazano je prvih 7 PC osa (od ukupno 32), koje opisuju preko 90% ukupne varijabilnosti u uzorku na osnovu PCA analize konstelacije 18 tačaka koje opisuju oblik i veličinu mandibula larvi hironomida. Biološki test sa Fe_3O_4 nanočesticama.

PC osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1.	0,00185049	51,784	51,784
2.	0,00053634	15,009	66,794
3.	0,00039196	10,969	77,762
4.	0,00018434	5,159	82,921
5.	0,00014974	4,190	87,111
6.	0,00008155	2,282	89,393
7.	0,00006015	1,683	91,076



Slika 70 – PCA analiza mandibula larvi hironomida izlaganih Fe_3O_4 nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugom PC osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe sa 90% intervalom pouzdanosti. "Outline" graficima predstavljene su pecifične promene u obliku mandibula asocirane sa svakom osom (sa faktorom skaliranja 0,1) prosečni oblik mandibula obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen crveno.

CVA analiza ukazuje na jasno razdvajanje grupa u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugom CV osom na osnovu morfologije mandibula (tabela 60, slika 71). Najveće razdvajanje primećuje se po CV1 osi (66,22% varijabilnosti): kontrolna i grupe tretirane manjim koncentracijama nanočestica grupišu se u pozitivnom delu ose i karakterišu ih kraći zubi sa širim bazama (specifične tačke 4, 6 i 8), distalno pomeren vrh apikalnog zuba (specifična tačka 1) i

samim tim izdužen apikalni deo mandibule (specifične tačke 17 i 18); grupe tretirane dvema najvišim koncentracijama nalaze se u negativnom delu ose i karakterišu ih mandibule obrnutih karakteristika - suženi i zbijeni zubi povučeni baza sa skraćanjem apikalnog dela mandibule. Prema CV2 osi (18.05% varijabilnosti) medjusobno se razdvajaju dve grupe tretirane najvećim koncentracijama nanočestica: jedinke tretirane najvišom koncentracijom nanočestica, 100 mg/kg nano-Fe₃O₄, imaju šire mandibule u središnjem delu (specifične tačke 10 do 16) sa skraćenim zglobovom (specifična tačka 9) i smanjenim prvim unutrašnjim zubom (specifične tačke 6, 7 i 8) i nalaze se u negativnom delu ose, dok se jedinke tretirane nanočesticama nalaze u pozitivnom delu ose i imaju suprotne karakteristike. Distribucija jedinki u okviru tretmana u morfološkom prostoru definisanom prvom i trećom CV osom (slika 72) je slična i potvrđuje razdvajanje grupa, međutim primećuje se potpuno odvajanje kontrolne grupe u pozitivnom delu CV3 ose (9,36% varijabilnosti) i približavanje grupa tretiranih najvišim koncentracijama u negativnom delu obeju osa. Uočava se slično variranje oblika mandibula sa приметно manjim prvim unutrašnjim zubom i povučenim vrhom apikalnog zuba kod tretiranih jedinki. Celokupna CVA analiza ukazuje na tendenciju zbivanja i povlačenja baza zuba, smanjenja prvog unutrašnjeg zuba i skraćanja apikalnog dela mandibula sa povećanjem koncentracije Fe₃O₄ nanočestica. Razdvajanje grupa potvrđuju i vrednosti Mahalanobisovih distanci koje pokazuju značajnu razliku između svih grupa, osim između grupa tretiranih sa 1 mg/kg; 5 mg/kg i 10 mg/kg nano-Fe₃O₄ medjusobno, dok je razlika između kontrolne i grupe tretirane najnižom koncentracijom na granici značajnosti (tabela 61).

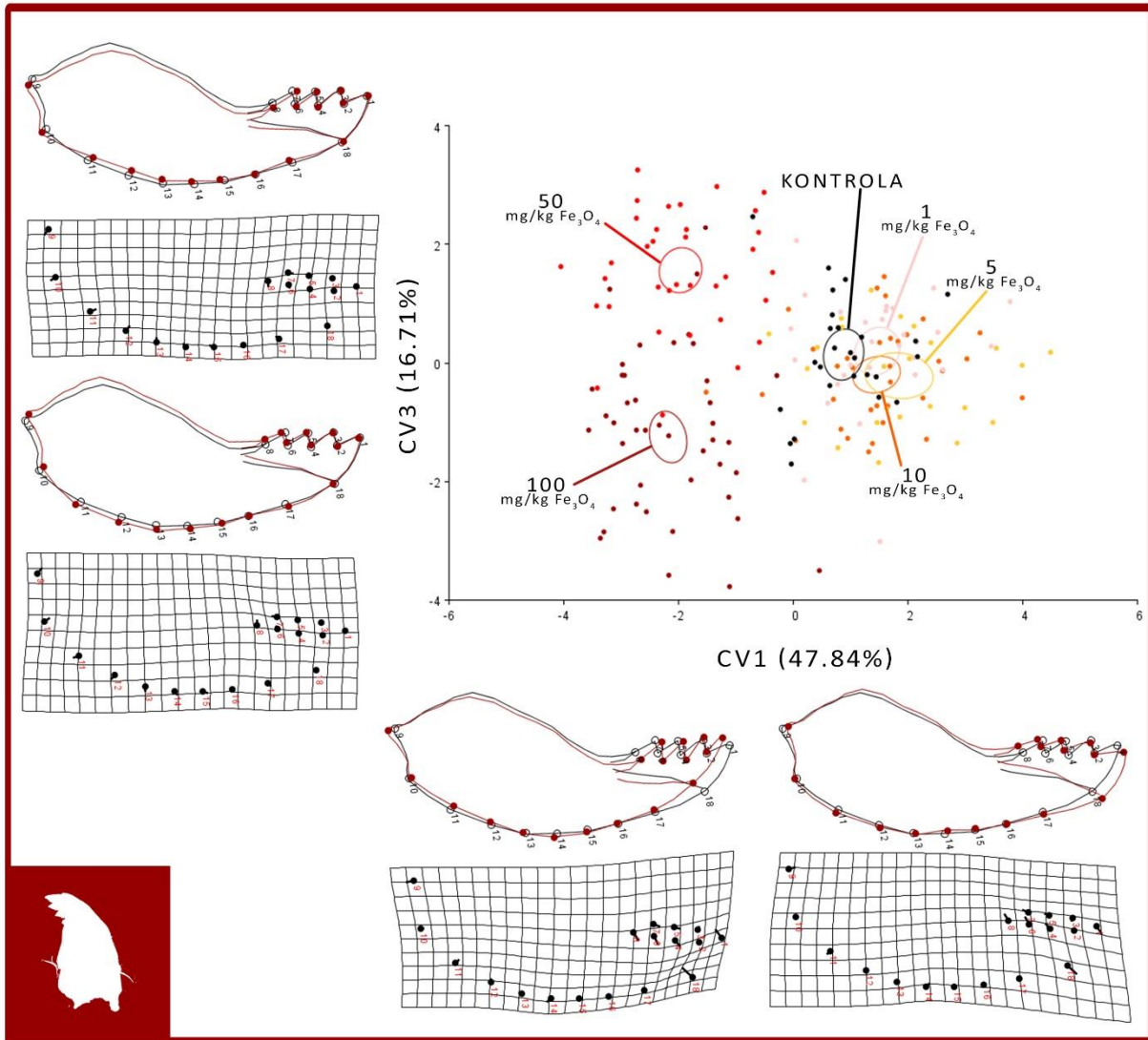
Tabela 60 – Sopstvene vrednosti i procenti varijabilnosti koje objašnjavaju CV ose na osnovu CVA analize konstelacije 18 tačaka koje opisuju oblik i veličinu mandibula larvi hironomida. Biološki test sa Fe₃O₄ nanočesticama.

CV osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1.	3,08912428	66,216	66,216
2.	0,84223771	18,054	84,270
3.	0,43653044	9,357	93,627
4.	0,16199527	3,472	97,099
5.	0,13532716	2,901	100,000

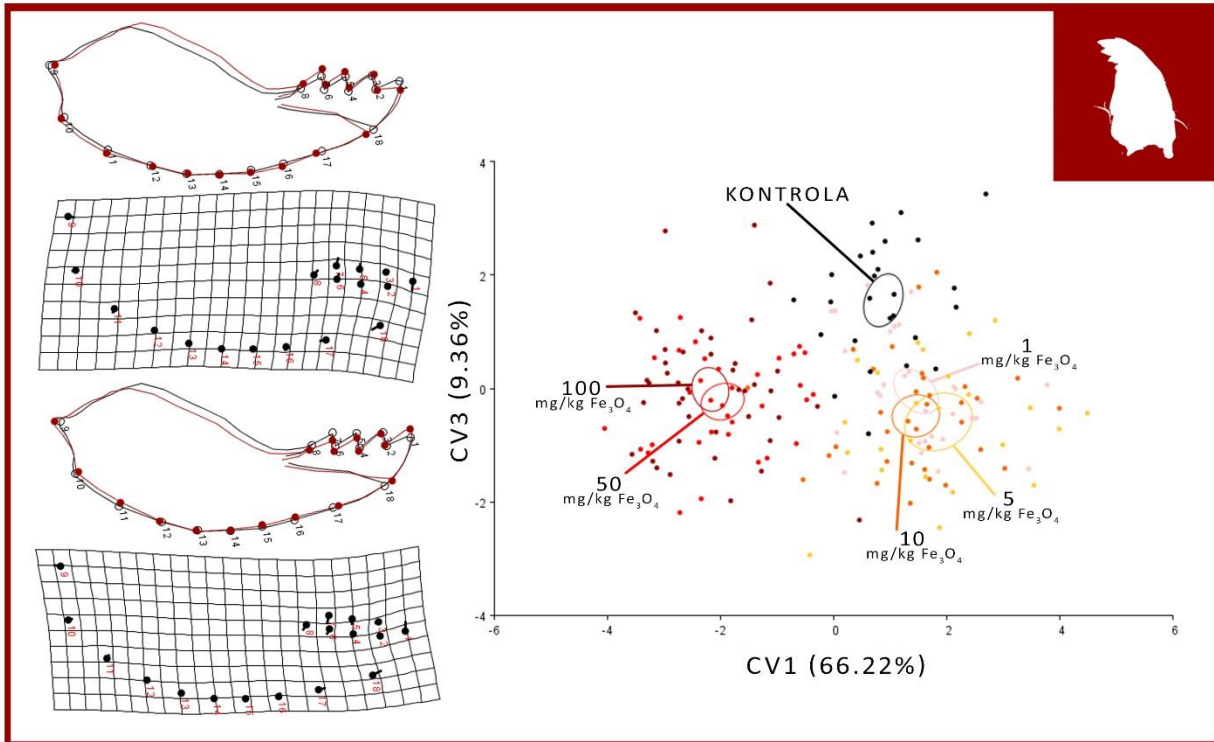
Tabela 61 – Mahalanobisove distance između grupa i p vrednosti dobijene permutacionim testom (10000 permutacija) mahalanobisovih distanci.

	Tretmani (mandibule)	Mahalanobisove distance					Kontrola
		1 mg/kg Fe ₃ O ₄	5 mg/kg Fe ₃ O ₄	10 mg/kg Fe ₃ O ₄	50 mg/kg Fe ₃ O ₄	100 mg/kg Fe ₃ O ₄	
p vrednosti permutacionih testova	1 mg/kg Fe ₃ O ₄		1,5547	1,4014	3,7834	3,9788	1,9728
	5 mg/kg Fe ₃ O ₄	0,3932		1,5041	4,2993	4,2826	2,5046
	10 mg/kg Fe ₃ O ₄	0,3795	0,4619		3,9151	3,8903	2,2449
	50 mg/kg Fe ₃ O ₄	<,0001*	<,0001*	<,0001*		2,8379	3,6425
	100 mg/kg Fe ₃ O ₄	<,0001*	<,0001*	<,0001*	<,0001*		3,718
	Kontrola	0,0049*	<,0001*	<,0001*	<,0001*	<,0001*	

*statistički značajne razlike između grupa, p<0,05



Slika 71 – CVA analiza mandibula larvi hironomida izlaganih Fe_3O_4 nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugim CV osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe sa 90% intervalom pouzdanosti. "Outline" i "Transformation grid" graphicima predstavljene su pecifčne promene u obliku mandibula asociirane sa svakom osom (aktor skaliranja 6): prosečni oblik mandibula obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen crveno.



Slika 72 - CVA analiza mandibula larvi hironomida izlaganih Fe_3O_4 nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i trećom CV osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe sa 90% intervalom pouzdanosti. "Outline" i "Transformation grid" graphicima predstavljene su pecifične promene u obliku mandibula asociirane sa svakom osom (faktor skaliranja 4): prosečni oblik mandibula obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen crveno.

Mentumi

Fotografisani su mentumi ukupno 198 jedinki i na svakom je digitalizovano 29 specifičnih tačaka. Pomoću samog programa uočeno je 12 (6,1% od ukupnog uzorka) jedinki sa "ekstreminim" vrednostima morfoloških parametara, koje su izbačene iz dalje analize. Jedinke su grupisane u šest grupa, na osnovu tretmana Fe_3O_4 nanočesticama: 1 mg/kg; 5 mg/kg; 10 mg/kg; 50 mg/kg, 100 mg/kg nano- Fe_3O_4 i kontrolna grupa.

Nije uočeno postojanje značajne razlike u veličini mentuma (ANOVA $F=30,6$; $p=0,68$), ali je potvrđeno postojanje značajnih razlika u njihovom obliku (MANOVA Willks' $\lambda=0,055$; $F=4,53$; $p=0,00$), te je pristupljeno daljim analizama.

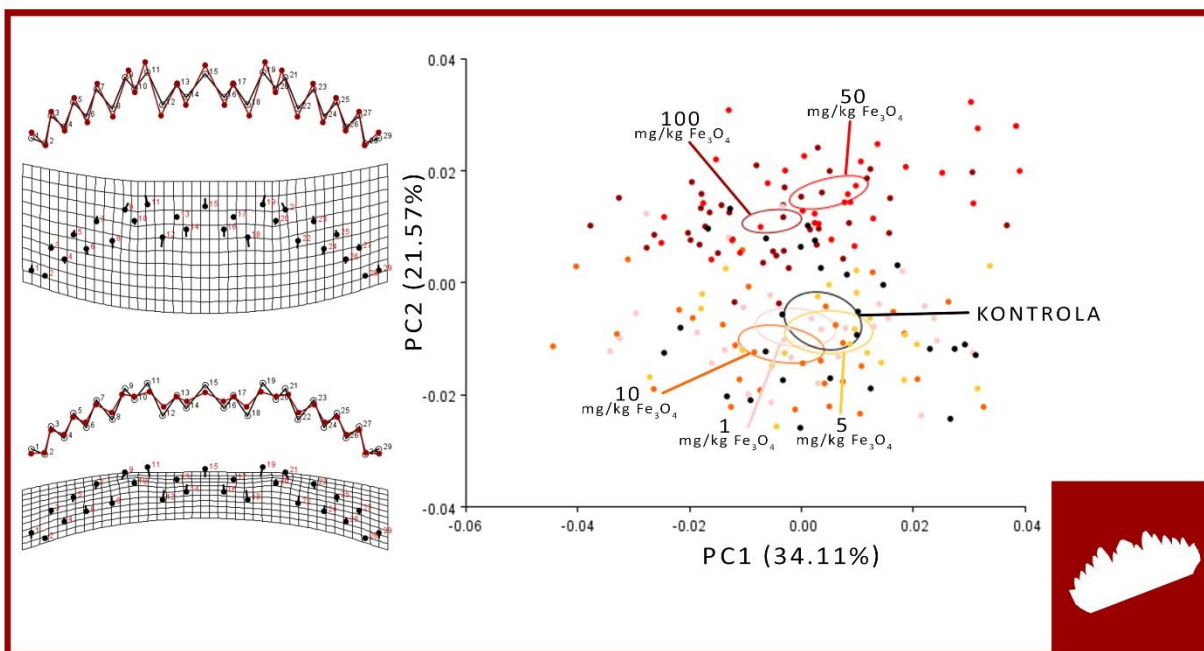
Nije uočeno značajno dejstvo alometrije (0,787%, $p=0,17$), te je dalja analiza izvršena na simetričnim komponentama.

PCA analiza i distribucija jedinki u okviru tretmana u morfološkom prostoru definisanom PC osama ukazuje na razdvajanja među tretmanima na osnovu morfologije mentuma (tabela 62,

slika 73). Uočljivo je grupisanje kontrolne i grupa tretiranih manjim koncentracijama (1; 5 i 10 mg/kg nano-Fe₃O₄) u negativnom delu CV2 ose (21,57 % varijabilnosti), koje karakterišu kraći zubi sa širim bazama. U pozitivnom delu ose se izdvajaju dve grupe tretirane visokim koncentracijama (50 i 100 mg/kg nano-Fe₃O₄) koje karakteriše mentum sa izduženim zubima i povučenom bazom centralnog tročlanog zuba. Uočava se da sa povećanjem koncentracije nano-Fe₃O₄ dolazi do najvećih promena u specifičnim tačkama 12, 14, 16 i 18 (baza centralnog zuba); 15 (vrh centralnog zuba); 9 i 11 (vrhovi dva unutrašnja lateralna zuba sa leve strane) i specifičnim tačkama 19 i 21 (vrhovi dva unutrašnja lateralna zuba sa desne strane). Ukupna varijabilnost iznosi 000086839, dok u tretmanu 1 mg/kg Fe₃O₄ iznosi 0,00075822; 5 mg/kg Fe₃O₄ iznosi 0,00075451; u tretmanu 10 mg/kg Fe₃O₄ iznosi 0,00082549; u tretmanu 50 mg/kg Fe₃O₄ iznosi 0,00066212, u tretmanu 100 mg/kg Fe₃O₄ 0,00059776 i u kontrolnoj grupi iznosi 0,00083732.

Tabela 62 – prvih 11 PC osa (od ukupno 27), koje opisuju preko 90% ukupne varijabilnosti u uzorku na osnovu PCA analize konstelacije 29 specifičnih tačaka koje opisuju oblik i veličinu mentuma larvi hironomida. Biološki test Biološki test sa Fe₃O₄ nanočesticama.

PC osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1.	0,00029618	34,107	34,107
2.	0,00018732	21,571	55,679
3.	0,00009028	10,397	66,075
4.	0,00005836	6,721	72,797
5.	0,00003195	3,679	76,475
6.	0,00002724	3,137	79,612
7.	0,00002494	2,871	82,484
8.	0,00002169	2,497	84,981
9.	0,00001663	1,914	86,896
10.	0,00001523	1,754	88,649
11.	0,00001254	1,444	90,093



Slika 73 – PCA analiza mentuma larvi hironomida izlaganih Fe_3O_4 nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugom PC osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe sa 90% intervalom pouzdanosti. "Wireframe" i "Transformation grid" graficima predstavljene su pecificne promene u obliku mentuma asociirane sa svakom osom (faktor skaliranja 0,04) prosečni oblik mandibula obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen crveno.

CVA analiza ukazuje na jasno razdvajanje tretmana na osnovu morfologije mandibula (tabela 63, slika 74). Po CV1 osi (65,99% varijabilnosti) se primećuje jasno razdvajanje uzorka na dva dela; u pozitivnom delu ose se nalaze kontrolna i grupe tretirane nižim koncentracijama nanočestica, dok se u negativnom delu grupišu dve grupe tretirane najvišim koncentracijama (50 i 100 mg/kg nano- Fe_3O_4). Duž CV2 ose (15,37% varijabilnosti) primećuje se gradacija od kontrolne grupe (u negativnom delu ose), preko grupa tretiranih sa 1 i 5 mg/kg nano- Fe_3O_4 do grupe tretirane sa 10 mg/kg nano- Fe_3O_4 . Potvrđuje se trend primećen PCA analizom: sa malim povećanjem koncentracije nano- Fe_3O_4 dolazi do vrlo blagog sužavanja baze mentuma (variranje specifičnih tačaka 1 i 29) i manjih promena u centralnom zubu, međutim sa ekstremno velikim povećanjem koncentracije nanočestica dolazi do velikog izduživanja svih zuba, a najveće promene se uočavaju na bazi centralnog zuba (povlačenje specifičnih tačaka 12, 14, 16 i 18) i vrhovima unutrašnjih lateralnih zuba (izduživanje specifičnih tačaka 9, 11, 19 i 21). Mahalanobisove distance potvrđuju razdvajanje i značajnu razliku izmedju svih grupa (tabela 64).

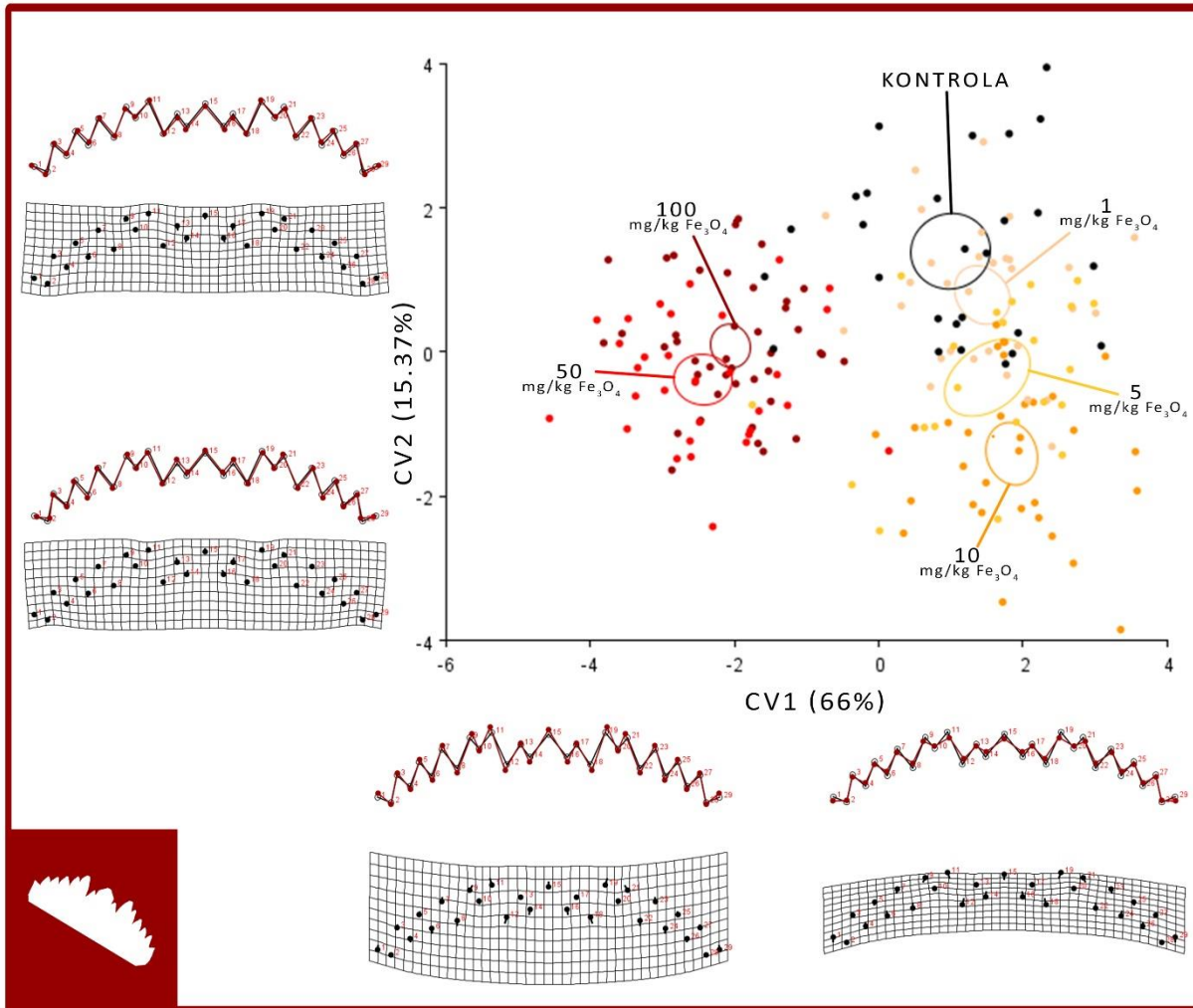
Tabela 63 – Sopstvene vrednosti i procenti varijabilnosti koje objašnjavaju CV ose na osnovu CVA analize konstelacije 29 tačaka koje opisuju oblik i veličinu mentuma larvi hironomida. Biološki test sa Fe₃O₄ nanočesticama.

CV osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1.	3,42934061	65,997	65,997
2.	0,79864967	15,370	81,367
3.	0,48910326	9,413	90,780
4.	0,26721271	5,142	95,923
5.	0,21186322	4,077	100,000

Tabela 64 – Mahalanobisove distance izmedju grupa i p vrednosti dobijene permutacionim testom (10000 permutacija) mahalanobisovih distanci.

	Tretmani (mentumi)	Mahalanobisove distance					Kontrola
		1 mg/kg Fe ₃ O ₄	5 mg/kg Fe ₃ O ₄	10 mg/kg Fe ₃ O ₄	50 mg/kg Fe ₃ O ₄	100 mg/kg Fe ₃ O ₄	
p vrednosti permutacionih testova	1 mg/kg Fe ₃ O ₄		2,1792	2,7519	4,2607	3,8946	2,493
	5 mg/kg Fe ₃ O ₄	0,0001*		1,997	4,2263	3,8432	2,553
	10 mg/kg Fe ₃ O ₄	<,0001*	0,0066*		4,5506	4,2639	3,0686
	50 mg/kg Fe ₃ O ₄	<,0001*	<,0001*	<,0001*		1,7314	4,1379
	100 mg/kg Fe ₃ O ₄	<,0001*	<,0001*	<,0001*	<,0001*		3,6075
	Kontrola	<,0001*	<,0001*	<,0001*	<,0001*	<,0001*	

*statistički značajne razlike izmedju grupa, p<0,05



Slika 74 – CVA analiza mentuma larvi hironomida izlaganih Fe_3O_4 nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugom CV osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe sa 90% intervalom pouzdanosti. "Transformation grid" i "Wireframe" graphicima predstavljene su pecifične promene u obliku mentuma asociirane sa svakom osom (faktor skaliranja 4): prosečni oblik mentuma obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen crveno.

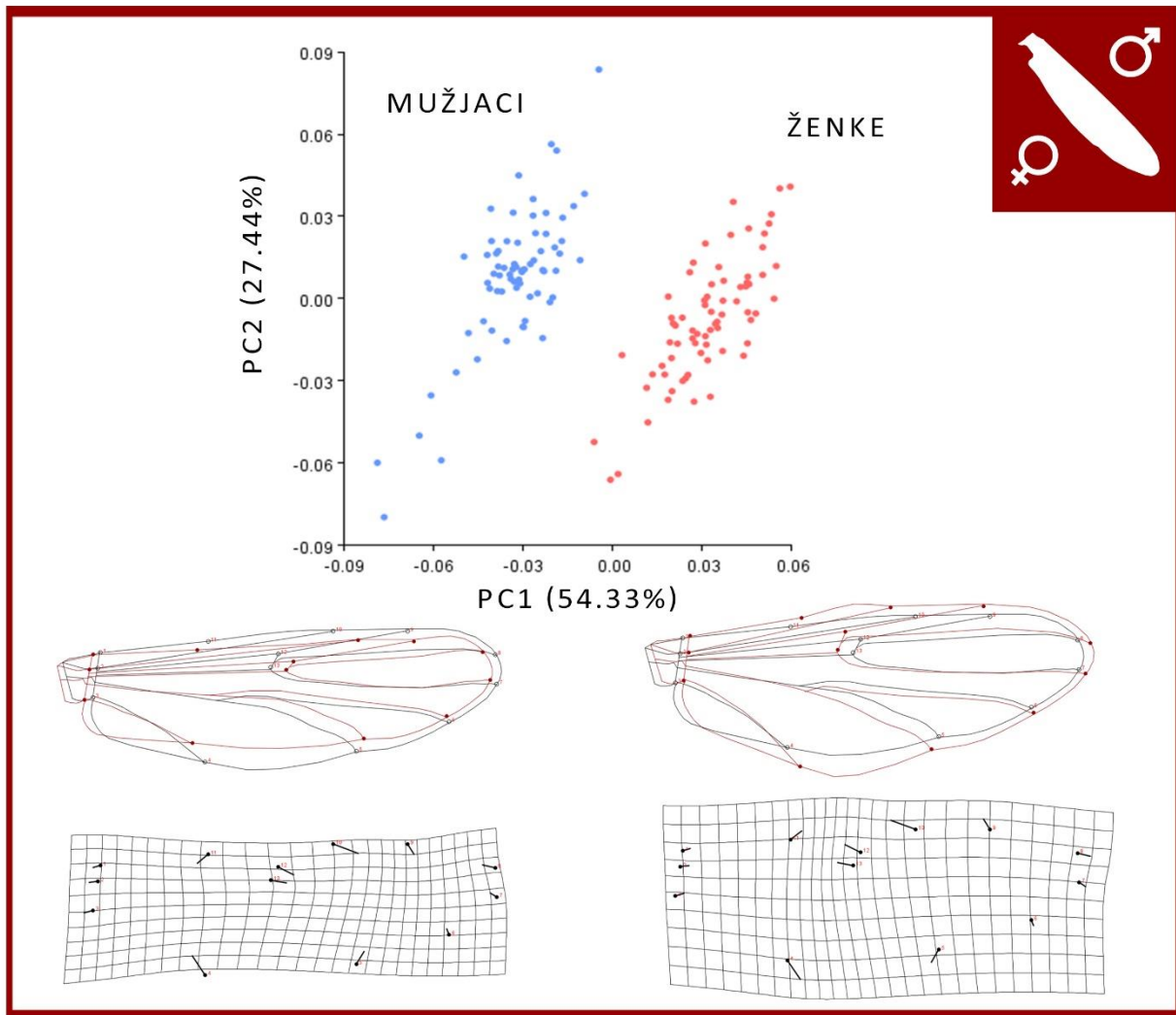
Krila

Fotografisana su desna krila ukupno 72 ženske i ukupno 72 muške odrasle jedinke hironomida i na svakom je digitalizovano 13 specifičnih tačaka. Od ukupnog broja fotomikrografija, krila 70 ženskih i 70 muških jedinki je uključeno u dalje analize. Jedinke su grupisane šest grupa, na osnovu tretmana Fe₃O₄ nanočesticama: 1 mg/kg; 5 mg/kg; 10 mg/kg; 50 mg/kg; 100 mg/kg nano-Fe₃O₄ i kontrolna grupa.

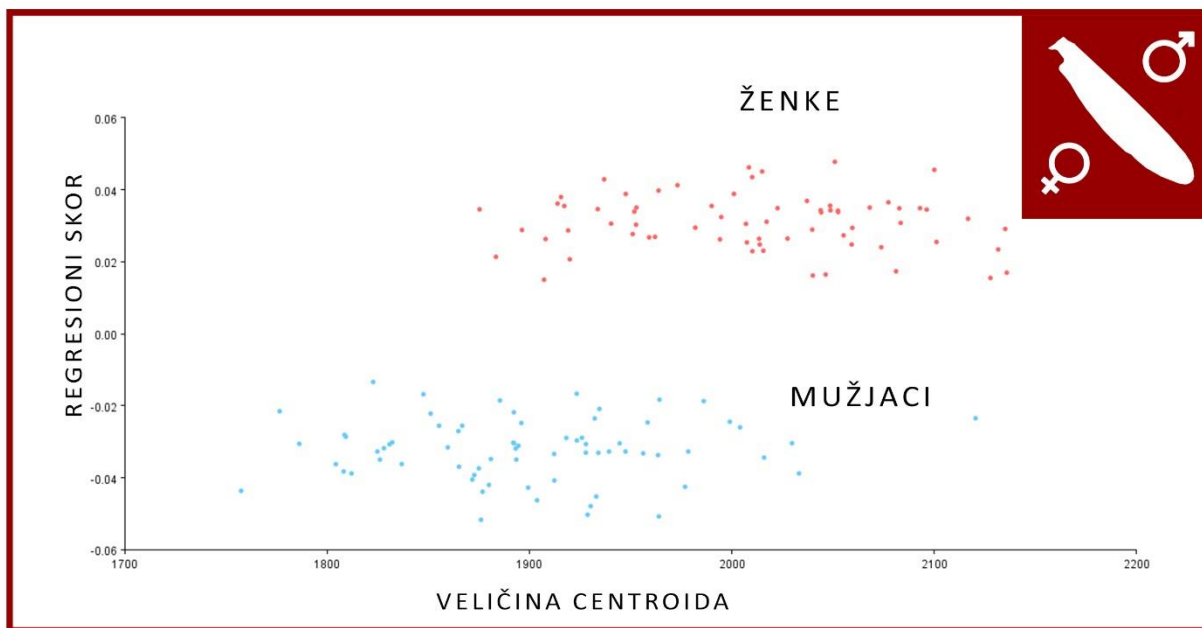
Potvrđene su statistički značajne razlike u veličini krila (ANOVA F=18,4, p=0,00), sa značajnom razlikom u veličini centroida (Tukey p<0,005) između skoro svih grupa mužjaka i ženki (72,2%, između 26 od ukupno 36 parova grupa), pri čemu je veličina centroida mužjaka manja nego veličina centroida ženki. Potvrđeno je i postojanje razlika u varijabilnosti oblika krila između mužjaka i ženki (MANOVA Willks'λ= 0,002; F=4,016; p=0,00), čime je potvrđeno i postojanje polnog dimorfizma.

PCA analiza je pokazala ukupnu varijabilnost uzorka od 0,00232157 i razdvajanje ženki i mužjaka po PC1 osi (54,33% varijabilnosti). Potvrđene su iste razlike između mužjaka i ženski kao i u prethodnim eksperimentima: ženke imaju šira krila (specifične tačke od 4 do 11 pomeraju se ka obodu krila i šire se) sa skraćenim proksimalnim delom (specifične tačke 1, 2 i 3 se pomeraju ka unutrašnjosti krila); dok je kod mužjaka situacija obrnuta, krila su uža, pre svega u centralnom delu, sa izduženim proksimalnim regionom i pomerenim radio-medijalnim nervom ka distalnom delu krila (specifične tačke 12 i 13) (slika 75).

Regresiona analiza dokazala je prisustvo alometrije, međutim u jako malom procentu (18,63% ukupne varijabilnosti oblika uslovljava razlika u veličini krila) ali sa velikom značajnošću p<0,0001. Veličina značajno varira u ukupnom uzorku u oba slučaja a ženke imaju veća krila od mužjaka (manje izražene razlike nego u prethodnim eksperimentima) (slika 76).



Slika 75 – Usporedna PCA analiza desnih krila odraslih mužjaka i ženki hironomida izlaganih Fe_3O_4 nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugom PC osom. "Transformation grid" i "Outline" graphicima predstavljene su pecifične promene u obliku krila asociirane sa svakom osom (faktor skaliranja 0,06): prosečni oblik krila obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen crveno.



Slika 76 – Multivarijantna regresija varijabli oblika na veličinu centroida desnih krila mužjaka i ženki odraslih jedinki hironomida. Biološki test sa Fe_3O_4 nanočesticama.

Usled postojanja statistički značajnih razlika između mužjaka i ženki u veličini i obliku krila, koje nisu umanjene tretmanom Fe_3O_4 nanočesticama, dalje analize vršene su za svaki pol nezavisno.

Krila ženki

Potvrđeno je postojanje razlika u varijabilnosti veličine krila ženki među tretmanima (ANOVA $F=5,74$; $p<0,001$), pri čemu značajne razlike (Tukey $p<0,05$) postoje između grupe tretirane sa 1 mg/kg nano- Fe_3O_4 (manja veličina centroida) i grupe tretirane sa 5 mg/kg nano- Fe_3O_4 (veća veličina centroida); kao i između grupe tretirane sa 50 mg/kg nano- Fe_3O_4 (veća veličina centroida) i grupa tretiranih sa 1, 10 i 100 mg/kg nano- Fe_3O_4 (manja veličina centroida). Potvrđeno je i postojanje značajne razlike u obliku krila ženki (MANOVA Willks' $\lambda=0,069$; $F=1,48$; $p=0,007$), te je pristupljeno daljim analizama.

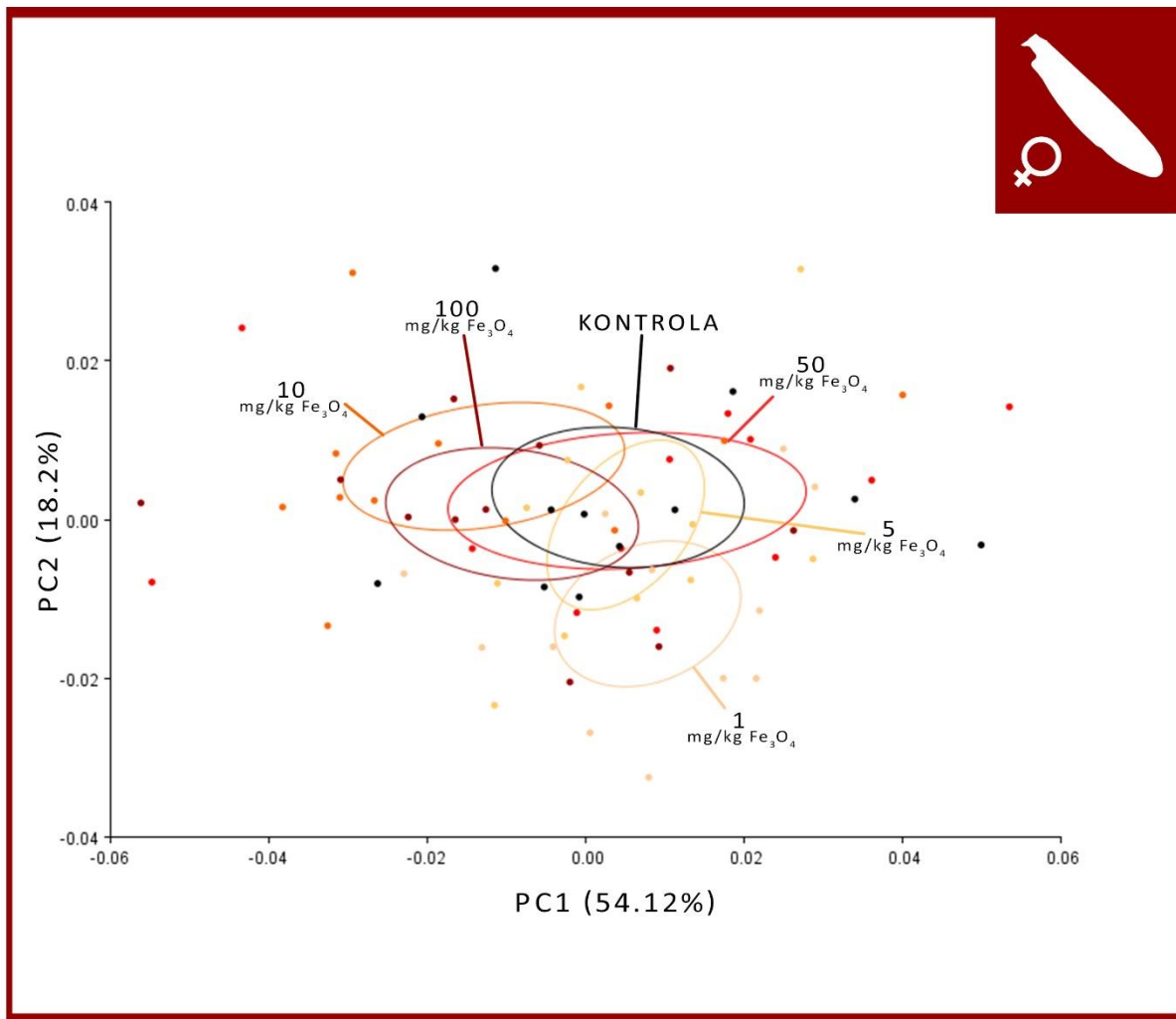
Regresiona analiza pokazala je prisustvo alometrije (11,84%, $p=0,0001$) te je dalja analiza izvršena na regresionim rezidualima.

PCA analiza ukazuje na velika preklapanja između grupa na osnovu morfologije desnih krila ženki (tabela 66, slika 77), pri čemu varijansa uzorka iznosi 0,00119908. Uočava se pozicioniranje svih grupa u centru morfološkog prostora, jedino se grupa tretirana najmanjom

koncentracijom od 1 mg/kg nano-Fe₃O₄ nanočestica blago izdvaja u negativnom delu PC2 ose (18,2 % varijabilnosti).

Tabela 66 – Prvih 6 PC osa (od ukupno 22), koje opisuju preko 90% ukupne varijabilnosti u uzorku na osnovu PCA analize konstelacije 13 tačaka koje opisuju oblik i veličinu desnih krila odraslih ženki hironomida. Biološki test sa Fe₃O₄ nanočesticama.

PC osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1.	0,00051804	54,117	54,117
2.	0,00017422	18,200	72,317
3.	0,00006030	6,300	78,617
4.	0,00005210	5,442	84,059
5.	0,00003074	3,211	87,270
6.	0,00002826	2,953	90,223



Slika 77 - PCA analiza desnih krila odraslih ženki hironomida izlaganih Fe_3O_4 nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i trećom PC osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe 90% intervalom pouzdanosti.

CVA analiza pokazuje preklapanja razdvajanje među tretmanima na osnovu morfologije desnih krila odraslih ženki (tabela 67, slika 78). Iako postoji odvajanje između grupa, ne uočava se pravilnost u rasporedu u morfološkom prostoru u odnosu na tretman nanočesticama, osim što se jedinke kontrolne grupe pretežno nalaze u negativnom delu obe CV ose. Uočava se veoma malo promena u obliku krila, sa najvećim variranjem specifičnih tačaka 10 i 11 (kostalni i subkostalni nerv). Mahalanobisove distance pokazuju statistički značajnu razliku između određenih grupa: kontrolne i ostalih grupa; grupe tretirane sa 100 mg/kg nano- Fe_3O_4 i svih ostalih, osim grupe tretirane sa 50 mg/kg nano- Fe_3O_4 ; između grupe tretirane koncentracijom od 1 i grupa tretiranih koncentracijama od 5 i 10 mg/kg nano- Fe_3O_4 (tabela 68).

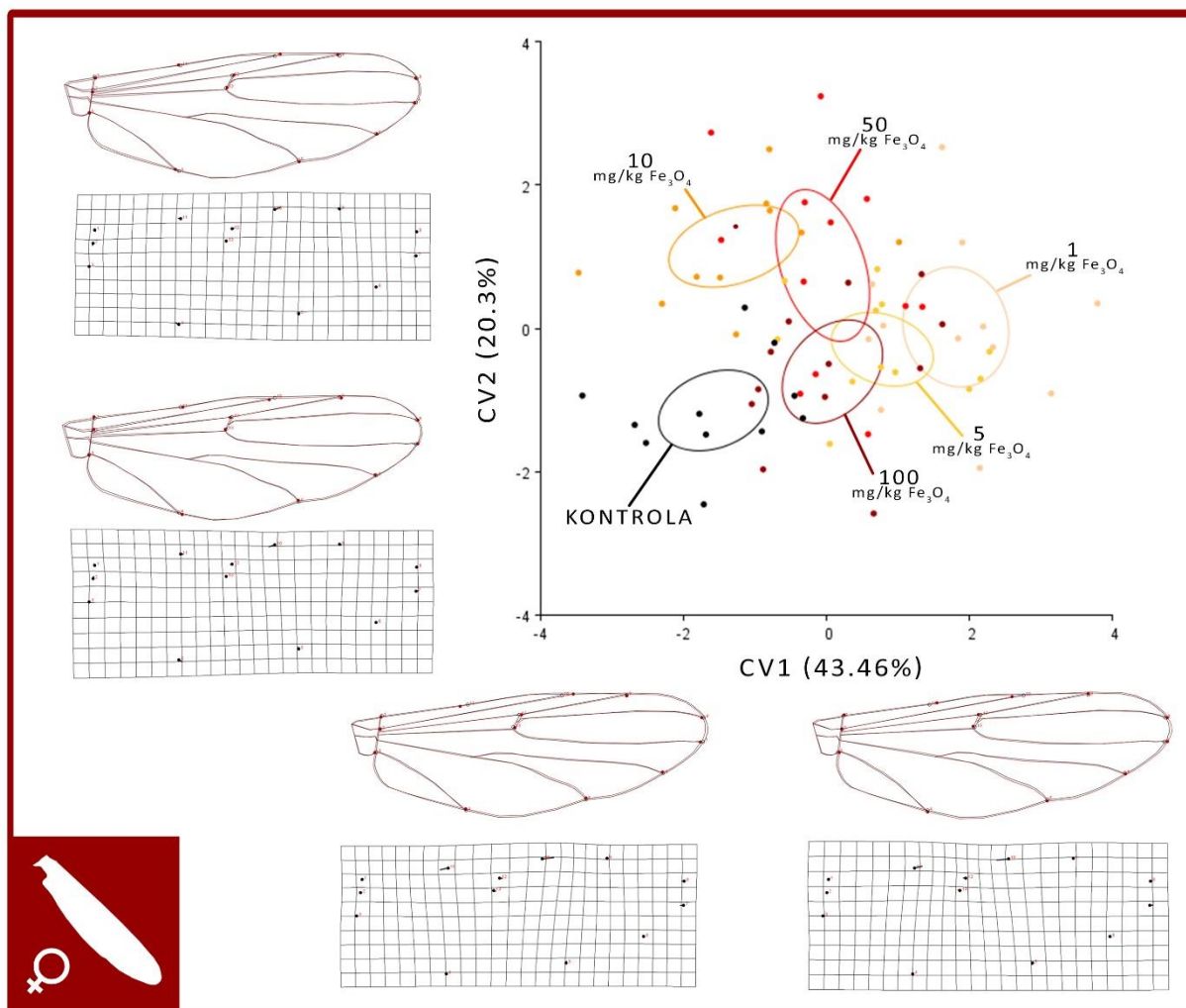
Tabela 67 – Sopstvene vrednosti i procenti varijabilnosti koje objašnjavaju CV ose na osnovu CVA analize konstelacije 13 tačaka koje opisuju oblik i veličinu desnih krila odraslih ženki hironomida. Biološki test sa Fe₃O₄ nanočesticama.

CV osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1.	1,44829496	43,464	43,464
2.	0,67657589	20,304	63,769
3.	0,51337638	15,407	79,175
4.	0,38740962	11,626	90,802
5.	0,30650413	9,198	100,000

Tabela 68 – Mahalanobisove distance izmedju grupa i p vrednosti dobijene permutacionim testom (10000 permutacija) mahalanobisovih distanci.

	Tretmani (krila ženki)	Mahalanobisove distance					Kontrola
		1 mg/kg Fe ₃ O ₄	5 mg/kg Fe ₃ O ₄	10 mg/kg Fe ₃ O ₄	50 mg/kg Fe ₃ O ₄	100 mg/kg Fe ₃ O ₄	
p vrednosti permutacionih testova	1 mg/kg Fe ₃ O ₄		2,2649	3,4275	2,6234	2,5921	3,6525
	5 mg/kg Fe ₃ O ₄	0,0003*		2,936	2,2528	2,4077	2,9363
	10 mg/kg Fe ₃ O ₄	<,0001*	0,0911		2,2154	2,7174	2,5574
	50 mg/kg Fe ₃ O ₄	0,0057	0,0937	0,145		2,2409	2,786
	100 mg/kg Fe ₃ O ₄	0,0033*	0,0343*	0,0015*	0,1255		2,6342
	Kontrola	<,0001*	0,0007*	0,0041*	0,001*	0,0022*	

*statistički značajne razlike izmedju grupa, p<0,05



Slika 78 - CVA analiza desnih krila odraslih ženki hironomida izlaganih Fe_3O_4 nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i trećom CV osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grup sa 90% intervalom pouzdanosti. "Transformation grid" i "Outline" graficima predstavljene su pecifične promene u obliku krila asocirane sa svakom osom (faktor skaliranja 6): prosečni oblik krila obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen crveno.

Krila mužjaka

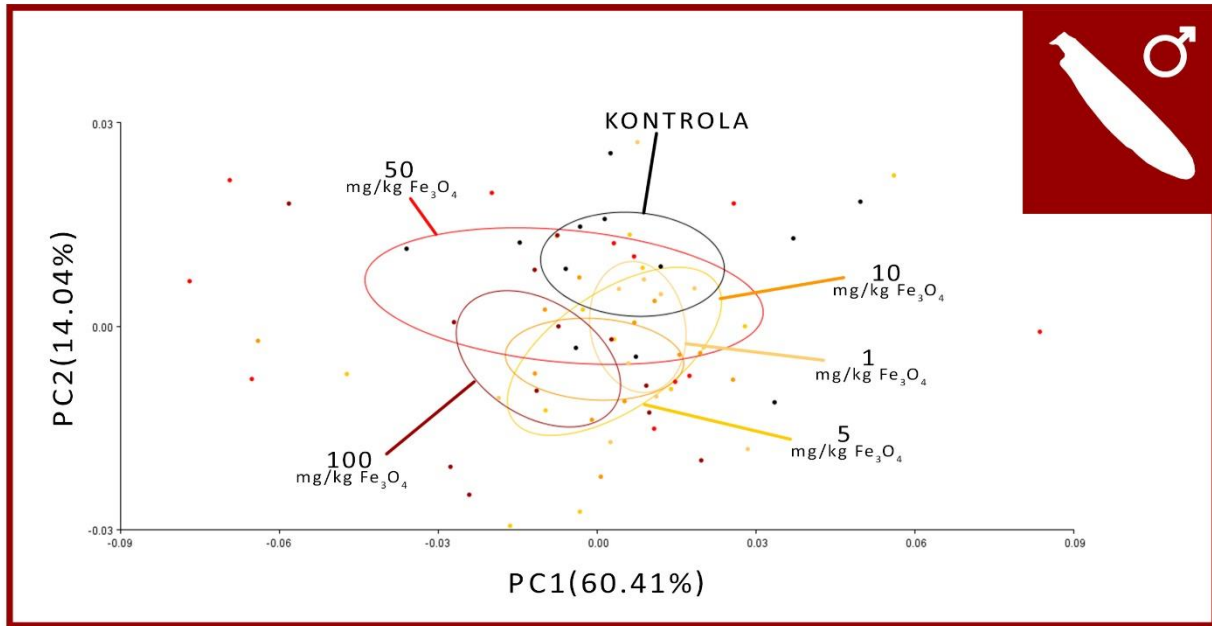
Utvrđeno je da postoje značajne razlike u varijabilnosti veličine krila mužjaka (ANOVA $F=7,17$; $p < 0,001$), i to između 4 od ukupno 15 parova grupa: grupe tretirane sa 50 mg/kg nano- Fe_3O_4 (veća veličina centroida) i grupa tretiranih sa 1, 100 mg/kg nano- Fe_3O_4 i kontrolne grupe (manja veličina centroida); kao i između grupe tretirane sa 100 mg/kg nano- Fe_3O_4 (manja veličina centroida) i grupe tretirane sa 10 mg/kg nano- Fe_3O_4 (veća veličina centroida) (Tukey $p < 0,05$). Utvrđeno je i postojanje značajne razlike variranja oblika krila mužjaka (MANOVA, Willks' $\lambda=0,064$; $F=1,47$; $p=0,008$), te je pristupljeno daljim analizama.

Regresiona analiza pokazala je da je ukupno 5,46 % promena u obliku izazvano razlikama u veličini i da je ovaj procenat alometrije, iako mali, stistički značajan $p=0,018$, stoga je dalja analiza vršena na regresionim rezidualima.

PCA analiza ukazuje na veoma malo razdvajanja među grupama na osnovu morfologije desnih krila mužjaka (tabela 69, slika 79), uz varijansu celokupnog uzorka od 0,00124608. Uočavaju se velika preklapanja između grupa i njihovo pozicioniranje u centru morfološkog prostora bez povezanosti sa količinom nanočestica. Uočava se veliko variranje u uzorku po PC1 osi (60,41% varijabilnosti), posebno u grupi tretiranoj sa 50 mg/kg Fe_3O_4 nanočestica.

Tabela 69 – Prvih 6 PC osa (od ukupno 22), koje opisuju preko 90% ukupne varijabilnosti u uzorku na osnovu PCA analize konstelacije 13 tačaka koje opisuju oblik i veličinu desnih krila odraslih mužjaka hironomida. Biološki test sa Fe_3O_4 nanočesticama.

PC osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1.	0,00075274	60,409	60,409
2.	0,00017491	14,036	74,445
3.	0,00009338	7,494	81,939
4.	0,00004604	3,695	85,634
5.	0,00004168	3,345	88,979
6.	0,00003155	2,532	91,511



Slika 79 - PCA analiza desnih krila odraslih mužjaka hironomida izlaganih Fe₃O₄ nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugim PC osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe sa 90% intervalom pouzdanosti.

CVA analiza ne ukazuje na specifičan obrazac variranja oblika krila u odnosu na količinu nanočestica na osnovu morfologije desnih krila odraslih mužjaka (tabela 70, slika 80). Primećuju se velika preklapanja između grupa, međutim grupe tretirane nižim koncentracijama (1, 5 i 10 mg/kg nano-Fe₃O₄) su bliske jedna drugoj i pozicionirane su u pozitivnom delu obeju osa, kontrolna grupa se u najvećem delu preklapa sa grupom tretiranom sa 50 mg/kg nano-Fe₃O₄ nanočestica, dok se grupa tretirana najvišom koncentracijom izdvaja od ostalih i nalazi se pretežno u negativnom delu CV1 ose. Najveće variranje primećuje se u specifičnim tačkama 1, 2, 3, 4 i 11 po CV1 osi (50,99% varijabilnosti) i specifičnim tačkama 7, 8 i 10 po CV2 osi (16,8% varijabilnosti). Mahalanobisove distance pokazuju statistički značajnu razliku između 11 od ukupno 15 parova grupa, međutim bez pravilnosti u odnosu na tretman nanočesticama (tabela 71).

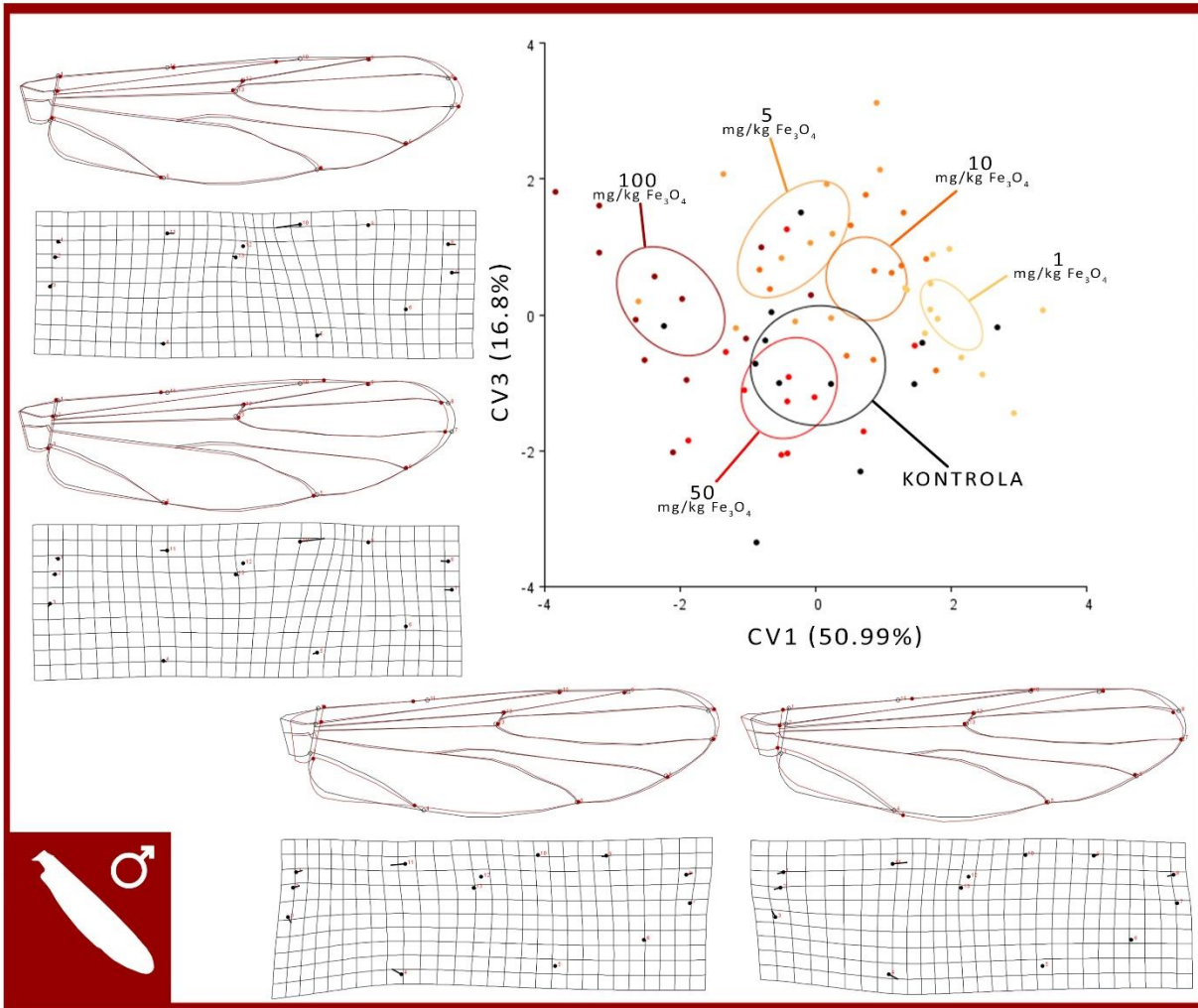
Tabela 70 – Sopstvene vrednosti i procenti varijabilnosti koje objašnjavaju CV ose na osnovu CVA analize konstelacije 13 tačaka koje opisuju oblik i veličinu desnih krila odraslih mužjaka hironomida. Biološki test sa Fe₃O₄ nanočesticama.

CV osa	Sopstvene vrednosti	Varijabilnost u %	Kumulativna varijabilnost u %
1.	1,75945523	50,995	50,995
2.	0,57981240	16,805	67,800
3.	0,54193102	15,707	83,507
4.	0,32842329	9,519	93,026
5.	0,24063570	6,974	100,000

Tabela 71 – Mahalanobisove distance izmedju grupa i p vrednosti dobijene permutacionim testom (10000 permutacija) mahalanobisovih distanci.

	Tretmani (krila mužjaka)	Mahalanobisove distance					Kontrola
		1 mg/kg Fe ₃ O ₄	5 mg/kg Fe ₃ O ₄	10 mg/kg Fe ₃ O ₄	50 mg/kg Fe ₃ O ₄	100 mg/kg Fe ₃ O ₄	
p vrednosti permutacionih testova	1 mg/kg Fe ₃ O ₄		3,0324	2,287	2,9658	4,1931	2,5473
	5 mg/kg Fe ₃ O ₄	<,0001*		2,5783	2,4633	2,8255	2,2903
	10 mg/kg Fe ₃ O ₄	0,0135*	0,0034*		2,5149	3,2245	2,2574
	50 mg/kg Fe ₃ O ₄	<,0001*	0,0522	0,0093*		2,6557	1,7189
	100 mg/kg Fe ₃ O ₄	<,0001*	0,001*	<,0001*	0,0088*		2,7865
	Kontrola	0,0013*	0,1442	0,0517	0,8686	0,0014*	

*statistički značajne razlike izmedju grupa, p<0,05



Slika 80 - CVA analiza desnih krila odraslih mužjaka hironomida izlaganih Fe_3O_4 nanočesticama - distribucija jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvom i trećom CV osom. Elipse opisuju srednje vrednosti svake grupe sa 90% intervalom pouzdanosti. "Transformation grid" i "Outline" graficima predstavljene su pecifične promene u obliku krila asociirane sa svakom osom (faktor skaliranja 8): prosečni oblik krila obojen je crno, dok je izmenjeni oblik (jedinke sa najvećim CV skorovima) obojen crveno

Oksidativni stres

Statističke analize pokazale su značajno variranje kod svih parametara, osim aktivnosti katalaze (ANOVA, $p < 0,05$) (tabela 72). *Post hoc* analize (Tukey HSD, $P < 0,05$) ukazuju na sledeće rezlike: sadržaj ukupnih proteina u kontroli značajno je viši od tretmana sa 1, 5 i 10 mg/kg nano-Fe₃O₄. Vrednosti koncentracije TBARS (pokazatelj lipidne peroksidacije) značajno su niže u kontroli nego tretmanima 5, 10 i 50, pri čemu su najviše u tretmanu 5 mg/kg nano-Fe₃O₄. Koncentracija AOPP (pokazatelj proteinske oksidacije) je značajno viša u tretmanu 5 mg/kg nano-Fe₃O₄ od tretmana 50 i kontrole (gde je najniža). Aktivnost CAT je značajno niža u kontroli nego kod larvi 5 mg/kg nano-Fe₃O₄ tretmana (gde je najviša). Korelaciona analiza pokazala je da ostoji pozitivna korelacija između vrednosti TBARS, AOPP i CAT, a i negativna korelacija ovih vrednosti sa količinom ukupnih proteina u larvama (Pearson, $p < 0,01$).

Table 72 - Biološki test za procenu subletalnih efekata nano-Fe₃O₄ – Vrednosti parametara oksidativnog stresa u *C. riparius* larvama izlaganim nano-Fe₃O₄. Koncentracija ukupnih proteina (izražena u mg% - milligram procenat, tj. masa proteina, u miligramima, u 100 ml rastvora uzorka); lipidna peroksidacija, tj. količina TBARS; količina proteinskih produkata oksidacije-AOPP; aktivnost superoksid dismutase-SOD i aktivnost katalaze-CAT.

Koncentracija nano-Fe ₃ O ₄ u sedimentu (mg/kg)	0 (kontrola)	1	5	10	50	100
Ukupni proteini (mg%)	136,4 ± 0 ^a	87 ± 18,15 ^b	67,65 ± 0,21 ^b	76,40 ± 17,86 ^b	97,700 ± 18,8	92,7 ± 3,82
Koncentracija TBARS (μmol/mg proteina)	0,015 ± 0 ^a	0,025 ± 0,005	0,041 ± 0,001 ^b	0,038 ± 0,008 ^b	0,023 ± 0,01	0,035 ± 0 ^b
Koncentracija AOPP (μmol/mg proteina)	0,123 ± 0 ^b	0,156 ± 0,027	0,213 ± 0,017 ^a	0,195 ± 0,049	0,13 ± 0,028 ^b	0,155 ± 0,035
SOD (U jedinica/mg proteina)	2,55 ± 0	4,39 ± 3,55	2,19 ± 0,44	2,03 ± 1,58	2,59 ± 1,15	0,87 ± 0,32
CAT (U jedinica/mg proteina)	0,044 ± 0 ^a	0,073 ± 0,16	0,092 ± 0 ^b	0,079 ± 0,021	0,063 ± 0,014	0,064 ± 0

*Tretmani a statistički značajno su različiti od tretmana b u okviru jednog reda.

Oštećenja na DNK

In vivo genotoksičnost nano-Fe₃O₄, prema stopi oštećenja DNK larvi *C. riparius* nakon izlaganja nano-Fe₃O₄ značajno se razlikovala među tretmanima (tabela 73).

Tabela 73 - Biološki test za procenu subletalnih efekata nano-Fe₃O₄ – Rezultati kometa testa za procenu *in vivo* genotoksičnosti nano-Fe₃O₄ na osnovu oštećenja DNK *C. riparius* larvi

Tretman	Klase kometa					Ukupan skor kometa ^a
	0	1	2	3	4	
NC^b	87,9 ± 0,42	12,1 ± 0,5	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	12,1 ± 0,54 [†]
PC^c	62,2 ± 0,24	22,3 ± 0,81	7,1 ± 0,24	5,1 ± 0,8	3,3 ± 1,2	65,0 ± 0,5*
1 Fe₃O₄	86,8 ± 0,34	13,2 ± 0,22	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	13,2 ± 0,30 [†]
5 Fe₃O₄	85,7 ± 0,72	14,3 ± 0,91	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	14,3 ± 0,8 [†]
10 Fe₃O₄	85,2 ± 0,8	11,1 ± 0,20	3,7 ± 0,64	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	18,5 ± 0,82 [†]
50 Fe₃O₄	64,4 ± 0,74	21,4 ± 0,23	7,1 ± 0,81	7,1 ± 0,51	0,00 ± 0,00	56,9 ± 0,94*
100 Fe₃O₄	68,8 ± 0,26	12,5 ± 0,84	12,5 ± 0,93	6,3 ± 0,80	6,3 ± 0,13	81,6 ± 0,24**

^aSrednje vrednosti ± SEM tri nezavisna replikata
^bNC: netretirana kontrola
^cPC: pozitivna kontrola, tretirana sa 100 mM H₂O₂
* p < 0,05 u poređenju sa kontrolnom grupom
[†]p < 0,05 u poređenju sa pozitivnom kontrolnom grupom

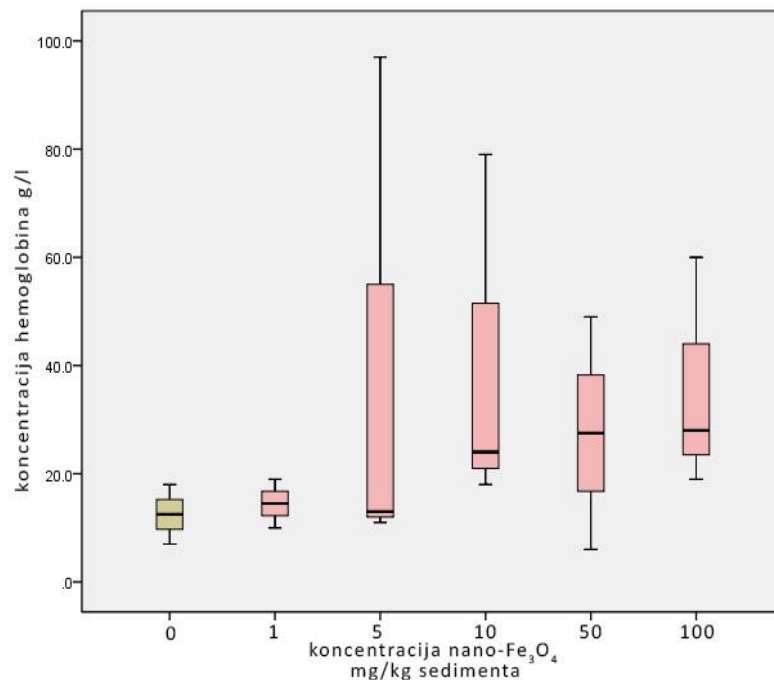
U tretmanima 50 i 100 mg/kg nano-Fe₃O₄ se pokazalo značajno povećanje ukupnog skora zavisno od doze nano-Fe₃O₄ (56,69 i 81,6 respektivno) u poređenju sa netretiranom kontrolom (12,1). Tretmani sa nižim koncentracijama od 1, 5 i 10 mg/kg nano-Fe₃O₄ su pokazali sličan skor kao kontrolni tretman. Srednje oštećenje DNK u pozitivnoj kontroli (tretiranoj sa 100 mM H₂O₂) je bilo statistički značajno veće nego u netretiranoj kontroli (Tukey; p<0,05). Tretmani sa izuzeno visokim koncentracijama (50 i 100 mg/kg nano-Fe₃O₄) pokazali su više srednje oštećenje od ostalih tretmana. Treba napomenuti da je u najvišem tretmanu sa 100 mg/kg nano-Fe₃O₄ oštećenje DNK 6,7 puta veće on onog u netretiranm jedinkama, pa čak i 1,3 puta veće od pozitivne kontrole. Podaci pokazuju da su komete klase 3 i 4 (ćelije najvećih oštećenja) prisutne jedino u pozitivnoj kontroli i najvišim tretmanima 50 i 100 mg/kg nano-Fe₃O₄.

Procena koncentracije hemoglobina

Procenjene koncentracije hemoglobina u hemolimfi larvi *C. riparius* nisu pokazale statistički značajnu varijabilnost između tretmana (ANOVA $p > 0,005$), međutim vrednosti ukazuju na porast koncentracije hemoglobina pri koncentracijama višim od 1 mg/kg nano-Fe₃O₄ (tabela 74, slika 81). Najviša koncentracija hemoglobina uočena je u larvama tretiranim sa 5 i 10 mg/kg nano-Fe₃O₄ (oko 40 g/l).

Tabela 74 – Biološki test za procenu subletalnih efekata nano-Fe₃O₄ - uticaj na koncentraciju hemoglobina u hemolimfi larvi *C. riparius* (koncentracije su izražene kao mean ± SD)

Koncentracija nano-Fe ₃ O ₄ u sedimentu (mg/kg)	0 (kontrola)	1	5	10	50	100
Prosečna koncentracija hemoglobina ± SD (g hemoglobina / l uzorka)	12,50 ± 7,78	14,5 ± 6,4	40,33 ± 49,0	40,33 ± 33,6	27,50 ± 30,41	35,67 ± 21,55



Slika 81 - Biološki test za procenu subletalnih efekata nano-Fe₃O₄ – koncentracije hemoglobina u hemolimfi larvi u različitim tretmanima (izražene u g po litru uzorka sa SEM vrednostima)

POGLAVLJE 5

Diskusija

5.1 Odabir adekvatne podloge

Prilikom sprovođenja ekotoksikoloških ispitivanja na model-organizmima od ključne je važnosti predložiti jednostavan i efikasan dizajn laboratorijskih testova koji će omogućiti otkrivanje uticaja ispitivanog stresora pomoću specifičnih parametara (biomarkera). Ukoliko je potrebno ispitati subletalne efekte testiranog stresora (kao što su morfološke promene, aktivnost enzima stresa ili DNK oštećenja) neophodno je dizajnirati test koji ispunjava osnovne kriterijume validnosti, što podrazumeva preživljavanje najmanje 70% populacije u kontrolnom tretmanu, ali i smanjiti uticaj ostalih pozadinskih stresora, uz pravilnu formulaciju supstrata koji neće uticati na morfološke promene jedinki i druge važne populacione parametre. U standardnim protokolima preporučuje se korišćenje precizno formulisanog veštačkog supstrata iz nekoliko razloga: smanjena eksperimentalna varijabilnost, smanjeni troškovi pripreme (u odnosu na upotrebu prirodnog supstrata), mogućnost provere i ponovljivosti, kao i lakše poređenje rezultata sa ostalim laboratorijama (OECD, 2004; Davis, 1977). Modifikacija postojećeg standardnog supstrata se odobrava, dok god je obezbeđena adekvatna sredina za razvoj larvi i preživljavanje minimum 70% jedinki (OECD, 2004), a pogotovo ukoliko se dođe do ekonomičnijeg i jednostavnijeg rešenja.

Za odabir adekvatne laboratorijske podloge za dalja ispitivanja dugoročne izloženosti predstavnika roda *Chironomus* nanočesticama u sedimentu, u ovom istraživanju je ispitivan uticaj modifikacija standardnog OECD supstrata na preživljavanje i morfološke parametre jedinki *C. tentans* kroz ukupno deset tretmana: devet tretmana sa različitim kombinacijama standardnih komponenti i jednog tretmana bez ikakvog supstrata. Ovim setom eksperimenata je ispitivana mogućnost formulisanja supstrata pojednostavljenog sastava koji obezbeđuje zadovoljavajuće preživljavanje jedinki, sa što manje komponenti, kako bi se smanjio mogući uticaj na morfologiju usnog aparata jedinki, smanjila mogućnost kontaminacije i neželjenih interakcija sa nanočesticama, skratilo vreme pripreme, a samim tim povećala efikasnost laboratorijskih bioeseja.

Prihvatljivo preživljavanje je zabeleženo samo u sledeća četiri supstrata (prema prosečnom preživljavanju u opadajućem nizu): T+P > KP > STANDARD > SP, te su jedino ovi supstrati dalje razmatrani za moguću upotrebu u bioesejima. U svim ostalim supstratima zabeleženo je preživljavanje niže od 70%, dok u tretmanu bez supstrata nije preživela ni jedna jedinka ni u jednom replikatu. Rezultati pokazuju izuzetnu važnost prisustva podloge za normalan rast i razvoj larvi, ali i potencijalne negativne efekte prisustva gline, pre svega medicinske gline, na

preživljavanje larvi. Najviši rast (preko procene mokre mase) dostigle su larve u SP supstratu, a raspored supstrata prema rastu larvi (u opadajućem nizu) bio je sledeći: SP > T+G > STANDARD > KP > G+P > T > G > T+P > P+T+MG. Pokazalo se da je dužina tela najveća kod larvi sa najvećom mokrom masom (pre svega na podlogama SP, T+G, STANDARD i KP), dok dužina glave prati sličan trend, a širina glave odstupa od rasporeda vrednosti ostalih dimenzija i najveća je u tretmanima T, T+G, SP i KP. Visoka stopa preživljavanja i rasta primećena je na podlogama koje sadrže kvarcni pesak. U svim supstratima primećeno je veoma malo jedinki sa vidljivim deformitetima (odsustvo zuba kod ukupno četiri jedinki) na podlogama G+P, T+P, KP i G, na kojima je uočen i najveći broj oštećenih mentuma. U oba seta eksperimenata, procenat oštećenih i deformisanih mentuma bio je izuzetno nizak (u oba slučaja manje od 20%), međutim najmanje ovakvih jedinki uočeno je na podlogama sačinjenim iz samo jednog sastojka (uz izuzetak podloge od gline). Deformisani i oštećeni mentumi izbačeni su iz daljeg ispitivanja putem geometrijske morfometrije, kao ekstremno malformisani, a putem programa iz analize je naknadno izbačeno najviše jedinki iz G+P, potom iz T+P i STANDARD supstrata. Pokazalo se da su mentumi jedinki gajenih na većini podloga bliski "prosečnom" obliku, a pogotovo jedinki gajenih na T+P i T+G i STANDARD podlozi, te su kao takvi adekvatni za dalje analize putem geometrijske morfometrije. Najrazličitije mentume od "prosečnog" oblika, kao i od ostalih (najveće mahalanobisove distance) tretmana imale su jedinke gajene na P+T+MG (ujedno i najmanji mentumi) i G+P podlozi (ujedno i najveći mentumi), te ovakve podloge dalje nisu uzimane u obzir.

U dosadašnjoj literaturi postoji samo nekoliko studija koje elaboriraju upotrebu određenih supstrata u testovima toksičnosti na hironomidama. Ukoliko se prati efekat stresora na morfološke strukture jedinki, preporučuje se upotreba podloge koja izaziva minimalna oštećenja i smanjuje pojavu dodatnih deformiteta, za šta se preporučuje upotreba kvarcnog peska (Bird, 1997; Langer-Jaesrich i sar., 2010), međutim detaljnije studije nisu sprovedene. U studiji Bird, 1997, larve *C. tentans* su gajene na četiri različite podloge: celuloznom papiru, krupnom pesku, sitnom pesku i finoj glini, pri čemu je najviše preživljavanje zabeleženo na papirnoj podlozi. Autor ovog rada predpostavlja da se u podlogama sa peskom hrana "glavi" između čestica ili propada u dublje slojeve, čime postaje manje dostupna za larve i time povećava stopu mortaliteta. Međutim, autor preporučuje upotrebu krupnog kvarcnog peska u biološkim testovima u kojima se prate deformiteti larvi, jer su jedinke gajene na ovoj podlozi imale značajno manje istrošene mentume u odnosu na ostale. U ovom radu se ističe da hironomide unose čestice hrane manje od 1 mm i da postoji

moгуćnost da larve podlogu finije granulacije mešaju sa hranom, smanjujući time stvarnu količinu unesene hrane, a povećavajući oštećenja na mentumuma. Međutim, naši rezultati pokazuju zadovoljavajuće visoku stopu preživljavanja i na sitnom i na krupnom pesku, pri čemu larve gajene na sitnom pesku pokazuju neznatno manju stopu preživljavanja, ali i manje oštećenja na mentumu i znatno veću masu i dužinu od svih ostalih larvi. Analizom ovih dveju podloga SEM mikroskopijom pokazalo se da je veličina čestica podloge i od krupnog i od sitnog peska prosečno manja od jednog milimetra, te postoji mogućnost da larve unesu čestice obeju ovih podloga putem ingestije. Kao što je u uvodu navedeno, *Chironomus spp* su pretežno sakupljači kolektori i hrane se sakupljanjem sitnih čestica manjih od 1 mm iz sedimenta, ali manji deo hrane mogu da usvajaju i aktivnim filtriranjem ili čak izlaskom iz svojih cevčica i seckanjem čestica većih od 1 mm (Brabec i sar., 2020; Schmidt-Kloiber i Hering, 2015; Moog, 1995). U supstratu sa finim peskom primećeno je da se hrana zadržava na površini podloge i dostupnija je larvama, te se time može objasniti njihova veća masa i manja oštećenost usnog aparata u ovakvoj podlozi. Ingersoll i Nelson, 1990, su prvi izučavali pojavu gljiva i bakterija na površini sedimenta sa viškom hrane u testovima toksičnosti u trajanju od 29 dana sa larvama *C. riparus*: kada je dodavanje hrane smanjeno dovoljno da se smanji i rast gljiva na sedimentu, preživljavanje larvi nije promenjeno, ali je izletanje adultnih jedinki odloženo i trajalo je više od 28 dana. Zbog zavisnosti izletanja larvi od ishrane i problema sa rastom bakterija i gljiva pri dodavanju veće količine hrane, u našem slučaju, ukoliko je primećena pojava gljiva i bakterija na površini podloge, eksperiment je potpuno obustavljan i ponovljen, čime je izbegnuto potencijalno remećenje interpretacije rezultata ispitivanja.

S obzirom na dobijene rezultate, kao i poređenje sa dosadašnjim literaturnim podacima, odlučeno je da se dalje koristi podloga od sitnog kvarcnog peska. Ovaj odabir je u skladu sa istraživanjem Langer-Jaesrich i sar., 2010, u kome se preporučuje korišćenje podloge od kvarcnog peska, veličine čestica od 0,1 do 0,3 mm, a ovakva podloga korišćena i od strane drugih autora, međutim bez dodatnih obrazloženja (Langer-Jaesrich i sar., 2010; Meregalli i Ollevier, 2001; Bird, 1997). Langer-Jaesrich i sar., 2010, preporučuju upotrebu ove podloge pre svega zbog smanjene mogućnosti prisustva organskih i drugih nečistoća u samoj podlozi. Ovo je izuzetno važno pri ispitivanju uticaja nanočestica jer je njihova reaktivnost (interakcija česticama u sedimentu) nepoznanica i svaki nekontrolisani faktor može dovesti do smetnji u interpretaciji rezultata. Kvarcni pesak sastoji se predominantno iz SiO_2 (preko 95%), a manje od 5% sačinjavaju AlO_2 i

Fe₂O₃, pri čemu je sadržaj alkalnih (K₂O i Na₂O) i zemnoalkalnih metala (CaO i MgO) ograničen na maksimalno 0,4 procenta (Vandecasteele i sar., 2989), te stoga predstavlja hemijski inertan materijal idealan za ekotoksikološke testove. U mnogim studijama se uopšte i ne pominje tip upotrebljenog supstrata, pa čak ni tačan dizajn bioloških testova (Tomilina i Grebenyuk, 2020; Lee i sar., 2009), što umanjuje mogućnost reprodukcije, validacije i same interpretacije rezultata.

OECD i WPMN ističu da je za testiranje toksičnosti nanočestica na jedinkama roda *Chironomus* moguće koristiti postojeće protokole, ali uz poseban osvrt na parametre koji bi mogli da utiču na toksičnost testiranih nanočestica i interpretaciju rezultata, među kojima su i način mešanja i interakcije nanočestica sa podlogom (OECD, 2019). Stoga je u ovom istraživanju izvršena *in situ* karakterizacija dve od tri testirane nanočestice u samom sedimentu (nano-Fe₃O₄ i nano-CeO₂). Iz svih primenjenih *in situ* analiza, može se zaključiti da nanočestice imaju tendenciju formiranja agregata različitih veličina u sedimentu. Identičan trend je uočen u oba sedimenta (i sa krupnim i sa sitnim peskom): pri niskim koncentracijama nanočestice se uglavnom nalaze u blizini soli (pogotovo Ca), što otežava njihovo uočavanje; dok se pri vrlo visokim koncentracijama agregati uglavnom mogu uočiti prilepljeni za čestice peska (SiO₂), a vrlo malo nanočestica je “slobodno” nevezujući se za čestice sedimenta.

Radi provere validnosti upotrebe podloge od sitnog kvarcnog peska, izvršena je uporedna procena uticaja nano-CeO₂ na sitnom i krupnom kvarcnom pesku. Odabir podloge nije statistički značajno uticao na standardne životne parametre, međutim stepen rasta i preživljavanja bili su niži u podlozi sa krupnim peskom. Međutim, analiza količina unetih nanočestica (procenjena ICP-MS analizom) je pokazala da netretirane larve *C. tentans* gajene na podlozi sa krupnim peskom sadrže skoro duplo više nano-CeO₂ od onih koje su gajene na sitnom pesku. Ovo može biti posledica formiranja većih agregata nanočestica oksida metala u podlozi od krupnog peska, što je primećeno analizom nano-Fe₃O₄ u podlozi. Naime, pored ovih analiza, izvršena je i *in situ* karakterizacija nano-Fe₃O₄ na obe podloge i uočeno je da nanočestice interaguju sa česticama peska na isti način, ali da u sitnom pesku nanočestice formiraju agregate znatno manje veličine (o čemu će više reći biti kasnije). U oba slučaja nivo nanočestica se proporcionalno povećavao sa povećanjem koncentracije nano-CeO₂ u sedimentu, pri čemu je najveće variranje količine nanočestica u telima larvi primećeno pri najvišim koncentracijama, u oba slučaja. Ovo može biti posledica formiranja velikih agregata pri visokim koncentracijama, što je potvrđeno *in situ* nano-CeO₂ i nano-Fe₃O₄ karakterizacijom u sedimentu: agregati imaju širu distribuciju veličine pri višim koncentracijama.

Pored toga, ne samo da nano-CeO₂ formiraju agregate, već se ti agregati pretežno vezuju za SiO₂ čestice peska pri višim koncentracijama. Variranje veličine agregata nanočestica u sedimentu neosporno utiče i na variranje količine nanočestica u telima larvi.

Od ukupnog broja analiziranih struktura manji broj jedinki gajenih na sitnom pesku, izbačen je iz dalje analize nego na krupnom pesku (jedinke sa velikim oštećenjima i malformacijama struktura). Dalja analiza putem geometrijske morfometrije pokazala je statistički značajne razlike između tretmana na osnovu morfologije mandibula i mentuma u oba slučaja, međutim rezultati analize na sitnom pesku pokazali su jasnija i smislenija razdvajanja, pre svega evidentnu razliku kontrolne i grupe tretirane najvišom koncentracijom (o čemu će više reći biti kasnije).

Rezultati ovih analiza samo su potvrdili opravdanost odabira podloge od sitnog kvarcnog peska fine granulacije u daljim laboratorijskim bioesejima.

5.2 Procena ekotoksičnosti nanočestica oksida metala

U ovom istraživanju multiparametarskim pristupom ispitivana je ekotoksičnost tri tipa industrijski značajnih nanočestica oksida metala: nano-TiO₂, nano-CeO₂ i nano-Fe₃O₄. Pre početka bioeseja izvršena je ekstenzivna analiza i karakterizacija samih nanočestica.

Čestice su odabrane na osnovu obima njihove upotrebe, kao i predikcije potencijalnog zagađenja životne sredine, pri čemu se najekstenzivnije koriste nano-TiO₂ (koje mogu biti direktno štetne za ljude zbog upotrebe u prehrambenoj industriji), potom nano-CeO₂ (koje se prevashodno upotrebljavaju u automobilskoj i industriji boja) i konačno nano-Fe₃O₄ (koje se koriste u medicini i čija istraživanja su pokazala veoma nisku toksičnost) (Bundschuh i sar., 2018; Mahaye i sar, 2017; Markus i sar., 2016; Gottschalk i sar., 2013). Dosadašnja ispitivanja ovih tipova nanočestica pokazuju kontradiktorne rezultate, a ekotoksikološke studije uticaja na akvatične ekosisteme, pre svega organizme sedimenta, su veoma retke.

U prvom setu eksperimenata ispitivana je ekotoksičnost komercijalne bele boje za hranu E171 u vidu polikristalnog uzorka (praha) nano-TiO₂ sa 99% čistoće. Analize su pokazale široku distribuciju veličina (od 50 do 300 nm) sa prosečnom veličinom 167±50 nm, anataznu kristalnu formu, sa površinom delimično prekrivenim OH grupama i specifičnu površinu od 6,137 m²/g. Čestice su nestabilne u vodi, formiraju agregate i talože se, što je uzorkovano ζ-potencijalom koji se kreće u rasponu od -12,2±0,4 do -20,2±0,4 mV (Ova vrednost ukazuje na nestabilnost rastvora

jer je vrednost ζ -potencijala između -30 mV i +30 mV, što se smatra donjom i gornjom granicom stabilne koloidne disperzije). Pokazalo se da je prosečni hidrodinamički dijametar agregata izuzetno visok (671 ± 112 nm) i očigledno je da se agregati u prvih sat vremena brzo talože na dnu. Ovakva brza sedimentacija rezultuje padom prosečnog hidrodinamičkog prečnika preostalih agregata prisutnih u suspenziji.

U drugom setu eksperimenata ispitivana je ekotoksičnost nano-CeO₂. Analize su pokazale umerenu distribuciju veličina, 23-29 nm, sa prosečnom veličinom $25 \pm 1,8$ nm, fluoritnu kristalnu strukturu i specifičnu površinu od $42,602$ m²/g. Vrednost ζ -potencijala izmerena nakon pripreme suspenzije u dejonizovanoj vodi bila je 28 mV, a polidisperzitet u rasponu od 0,88 do 0,65, što ukazuje da nanočestice CeO₂ imaju umerenu stabilnost u dejonizovanoj vodi (umerena aglomeracija i taloženje). *In situ* karakterizacija pokazala je da je nano-CeO₂ rasut po sedimentu u vidu agregata različite veličine (od 5 do 25 μ m, zavisno od koncentracije) i da su ovi agregati uglavnom priljubljeni uz čestice Si, dakle uz sama zrna peska.

U trećem setu eksperimenata ispitivana je ekotoksičnost nano-Fe₃O₄, još uvek nedostupnih na tržištu, a sintetisanih sa namerom potencijalne primene u medicini. Dakle, po prvi put je izvršena sveobuhvatna analiza ovih konkretnih nano-Fe₃O₄, a dobijeni rezultati biće upotrebljeni za njihovo dalje usavršavanje i prilagođavanje daljoj bezbednoj upotrebi. Analize su pokazale usku distribuciju veličina, 4,4-10,1 nm, sa prosečnom veličinom $7,5 \pm 0,78$ nm, magnetitnu kristalnu strukturu i supermagnetna svojstva tipična za nanočestice magnetita. *In situ* karakterizacija pokazala je slične rezultate u podlozi od sitnog i krupnog kvarcnog peska: pri niskim koncentracijama (50 mg/kg) vrlo je teško uočiti agregate (prosečne veličine $4,968 \pm 1,922$ μ m u krupnom i $1,36 \pm 0,295$ u sitnom pesku) koji se lepe za Ca soli, što ograničava njihovu identifikaciju u sedimentu; pri višim koncentracijama uočeni su agregati različitih veličina: prosečno $10,515 \pm 9,831$ μ m u krupnom i $0,835 \pm 0,016$ μ m u sitnom pesku, pri koncentraciji od 100 mg/kg; a prosečno $3,712 \pm 4,364$ μ m u krupnom i $3,052 \pm 1,058$ μ m u sitnom pesku. Može se zaključiti da sa povećanjem koncentracije nano-Fe₃O₄ agregati imaju veću tendenciju interakcije sa česticama samog peska nego česticama soli u oba slučaja (slično kao i čestice nano-CeO₂), međutim da u sitnom pesku nanočestice formiraju agregate znatno manje veličine.

Analizirajući samo rezultate karakterizacije nanočestica, mogu se doneti preliminarni zaključci o njihovoj potencijalnoj reaktivnosti i toksičnosti (Garcia i sar, 2011). Kod nano-CeO₂ je ustanovljena čak četiri puta veća specifična površina nego kod nano-TiO₂, što bi potencijalno

moglo značiti i veću reaktivnost i toksikološki potencijal. Kod nanomaterijala sa većom specifičnom površinom proporcija atoma na površini u odnosu na proporciju atoma u unutrašnjosti je mnogo veća, što može dovesti do veće površinske reaktivnosti (povećanje adsorpcije i katalitičkih sposobnosti) (Handy i sar., 2008). Ova činjenica ohrabruje upotrebu specifične površine, pre nego mase ili koncentracije, u interpretaciji toksičnosti nanočestica, jer specifična površina može biti mnogo značajniji parametar u interpretaciji površinske reaktivnosti nanomaterijala. Naravno, ukupna površina čestica je funkcija specifične površine pomnožene masom, veličinom ili koncentracijom, tako da svi ovi parametri mogu značajno uticati na biodostupnost nanomaterijala. U ovom slučaju redosled nanočestica prema prosečnoj veličini (od najmanje ka najvećoj) je nano-Fe₃O₄ < nano-CeO₂ < nano-TiO₂. Međutim kod svih čestica primećeno je formiranje agregata (kako u vodi tako i u samom sedimentu), kao i veliki raspon veličina čestica (nano-TiO₂ > nano-CeO₂ > nano-Fe₃O₄) što takođe može umanjiti njihov toksikološki potencijal. Veličina ima velikog uticaja na druga fizička i hemijska svojstva, kao što su zeta potencijal i reaktivnost vezivanja metala (Madden i sar., 2006), tako da se osnovna znanja o reaktivnosti molekula i atoma moraju revidirati kada je u pitanju ekotoksičnost nanočestica. Primeri zavisnosti bitnih fiziko-hemijskih i toksikoloških svojstava od veličine su mnogobrojni. U studiji Jun i sar., 2008, kod Fe₂O₃ nanočestica od 55 nm ispoljavaju se feromagnetna svojstva, dok 12 nm nanočestice ispoljavaju superparamagnetna svojstva bez histerezisa; u studiji Taylor i sar., 2016, nano-Ce veličine 4-5 nm izazvao je reakcije na algama (pri čemu je primećen ulazak u ćelijske vezikule) u poređenju sa česticama veće veličine, iako je generalna toksičnost bila izuzetno niska; u studiji Lee i sar., 2009, genotoksičnost nano-CeO₂ veličine 15 nm bila je značajno veća nego kod istih čestica veličine 30 nm. Uticaj samog oblika nanočestica i njihove površine na potencijal prolaska kroz biološke membrane još uvek nije dovoljno ispitan u ekotoksikologiji, mada se pokazalo da predstavlja važan aspekt u respiratornoj toksičnosti kod sisara (Maynard i Aitken, 2007). Pored toga, variranje fizičke strukture nanočestica (kao što su različite kristalne forme istog materijala), potencijal ovih čestica da sadrže više od jedne supstance (npr. As-Ti nanokompoziti u antibakterijskim prevlakama) ili da se proizvedu sa više tipova površinskih liganada, predstavlja dodatne izazove u ekotoksikološkim ispitivanjima.

Ono što je zaista inovativno u okviru ove doktorske disertacije je precizna vrhunska karakterizacija ispitivanih nanočestica. Dobru karakterizaciju nanočestica je vrlo teško postići, a u ovom istraživanju upotrebljen je veliki broj različitih tehnika kako bi se što preciznije opisalo

stanje izloženosti u daljim testovima ekotoksičnosti. Pored toga, *in situ* karakterizacija nanočestica predstavlja još veći izazov, pre svega zbog poteškoća u detekciji i razlikovanju nanočestica u odnosu na čestice sedimenta. Pomoću EDX i SEM analize zlatom presvučenih uzoraka, uspešno su detektovani i vizuelizovani agregati nano-CeO₂ i nano-Fe₃O₄, a analizirana je i njihova interakcija sa samim sedimentom. Rezultati pokazuju izuzetan potencijal primenjenih tehnika u karakterizaciji nanočestica i otvaraju nova pitanja interpretacije rezultata ekotoksikoloških testova.

5.2.1 Ispitivanje toksičnosti nano-TiO₂

Set eksperimenata sastojao se iz dva bioeseja: prvog, za procenu letalnih efekata, koji se sastojao iz sedam tretmana sa visokim koncentracijama nano-TiO₂ (125; 250; 500; 1000; 2000; 4000 mg nano-TiO₂/kg sedimenta i kontrolni tretman) i drugog, za procenu subletalnih efekata, koji se sastojao iz četiri tretmana sa nižim koncentracijama nano-TiO₂ (2,5; 25; 250 mg nano-TiO₂/kg sedimenta i kontrolni tretman).

ICP-MS analiza je pokazala visoku korelaciju između koncentracije nano-TiO₂ u telima larvi i njegove koncentracije u sedimentu, čime je potvrđena bioakumulacija nano-TiO₂ od strane model organizma (pri čemu i netretirane larve *C. tentans* u svojim telima sadrže prosečno 55,13 mg nano-TiO₂ po kg mokre mase). Kod jedinki tretiranih najvišim koncentracijama primećena je visoka varijabilnost u količini nano-TiO₂ u telima larvi. Kao što je prethodno rečeno, ovo se može objasniti činjenicom da nano-TiO₂ ima tendenciju formiranja agregata (Pellegrino i sar., 2017), što je potvrđeno i analizama ζ-potencijala i hidrodinamičkog prečnika čestica. Potvrđeno je da hironomide izložene visokim koncentracijama mogu uneti varijabilne količine nano-TiO₂ u vidu pojedinačnih čestica ili agregata. Ingestija nano-TiO₂ primećena je u nekoliko drugih studija, kod riba, beskičmenjaka i mekušaca (Doyle i sar., 2015; Couleau i sar., 2012; Griffitt i sar., 2008; Galloway i sar., 2010; Canesi i sar., 2010).

U biološkom testu za procenu uticaja na standardne parametre nije bilo uticaja nano-TiO₂ na DT i DR. Međutim nano-TiO₂ imao je značajan uticaj na preživljavanje odraslih jedinki zavisno od doze: preživljavanje u kontroli je bilo značajno više nego u tretmanima sa visokim koncentracijama (1000, 2000, 4000 mg/kg nano-TiO₂), ali nisu postojale razlike između kontrolnog i tretmana sa niskim koncentracijama (125, 250, 500 mg/kg nano-TiO₂). Ovi podaci potvrđuju pretpostavku da nano-TiO₂ pri visokim koncentracijama može biti letalan za akvatične

organizme. Rezultati su u skladu sa analizama mnogih drugih studija u kojima se pokazalo da nano-TiO₂ izaziva mortalitet, smanjenje rasta, negativan uticaj na ćelije i DNK akvatičnih organizama, sa i bez fotoaktivacije u vidu izlaganja nanočestica svetlosti (Haynes i sar., 2017)

Doze niže od 500 mg/kg nano-TiO₂ (LOEC vrednost) su korišćene za dalju procenu subletalnih efekata. Ovo su ujedno i doze koje se realno mogu naći u prirodi. Pri izlaganju ovim, sredinski relevantnim, koncentracijama *C. tentans* larve su pokazale vrlo nisku stopu mortaliteta (mada je primećeno opadanje preživljavanja sa povećanjem koncentracija) i ujednačen rast međutim dalje analize su otkrile subletalne efekte nano-TiO₂.

Vidljivi deformiteti uočeni su na mentumima i mandibulama, međutim, u izuzetno malom procentu. Kod mandibula je uglavnom primećen nedostatak apikalnog zuba, a kod mentuma uglavnom gubitak bilo kog od zuba. Najviše deformiteta uočeno je u kontrolama u oba slučaja, a procenat deformisanih i istrošenih struktura bio je izuzetno mali u odnosu na ukupan uzorak. Ovo je u suprotnosti sa istraživanjem Tomilina i sar., 2015, u kome se pokazalo čak 65,8% deformisanih jedinki, kao i istraživanjem istih autora Tomilina i sar., 2020, gde je primećeno 44,6% deformisanih jedinki tretiranih anataznom formom nano-TiO₂ (od čega 15,5% deformisanih mentuma i mandibula) i povećanje incidence deformiteta tri do pet puta kod tretiranih grupa. Međutim, metodologija kompletne studije pomenutih autora je nejasno definisana, čak se i navedeni primeri deformiteta mogu pripisati loše napravljenim preparatima, pre nego realno deformisanim strukturama. Sa druge strane, veća incidenca deformiteta u njihovom radu može biti i posledica manje veličine nanočestica (25-50nm), kojima se pripisuje veći toksikološki potencijal (Tomilina i sar., 2020).

Metodom geometrijske morfometrije potvrđen je subletalni uticaj nano-TiO₂ na morfologiju *C. tentans* jedinki. Promena u obliku bila je najizraženija kod mentuma i to već pri PCA analizi. Vizualizacija specifičnih promena je pokazala tendenciju sužavanja baze mentuma, izduživanja zuba i izvijanja lateralnih zuba ka bočnim stranama sa povećanjem koncentracije nano-TiO₂. Istovremeno mandibule su pokazale najveće promene u prvom unutrašnjem zubu i tendenciju njegovog skraćivanja, ili čak potpunog gubitka, sa povećanjem koncentracije nano-TiO₂. Analiza krila odraslih jedinki potvrdila je postojanje polnog dimorfizma pri čemu ženke imaju genralno veća i šira krila sa skraćenijim proksimalnim delom nego mužjaci. Krila mužjaka su uža, pre svega u centralnom delu, sa izduženim proksimalnim delom i pomerenim radio-medijalnim nervom ka distalnom obodu. Tretman nanočesticama nije doveo do smanjenja razlika

između polova, ali je doveo do promena u morfologiji krila kod ženki. Promene u obliku krila slabije su izražene i sa manje vidljivih pravilnosti u odnosu na tretmane, nego kod mentuma i mandibula, međutim primećena je tendencija sužavanja baze krila kod ženki tretiranih višim koncentracijama TiO₂.

Mentumi larvi iz ovog eksperimenta analizirani su i metodom tradicionalne morfometrije, čime je, pre svega, ispitana osetljivost ove metode i potencijal njene upotrebe u detekciji efekata nanočestica. Analize pokazuju da svih osam parametara rastu sa dodatkom nano-TiO₂ (mentumi se generalno povećavaju i izdužuju), potom njihove vrednosti opadaju sa ekstremnim povećanjem koncentracija nanočestica. Statistički značajnu varijabilnost pokazala su samo dva od ukupno osam merenih parametara: širina baze unutrašnjeg lateralnog zuba sa leve strane mentuma i rastojanje između vrha centralnog i vrha poslednjeg lateralnog zuba, na desnoj strani mentuma *post hoc* testovi su pokazali značajnu razliku u ovim parametrima samo između kontrolne i grupe tretirane sa 2,5 mg/kg nano-TiO₂. Merena rastojanja trebalo bi da budu uniformna u okviru vrste jer predstavljaju standardne dužine koje se koriste u identifikaciji hironomida (Vallenduuk, 2017; Armitage i sar., 2012; Hein i Mahadeva, 1992). Dobijeni rezultati, stoga, ukazuju mogućnost promene čak i uniformnih morfoloških karaktera pod uticajem sredinskih stresora u vidu nanočestica oksida metala.

Iste ove nanočestice su korišćene i u prvom ikada *in situ* eksperimentu za procenu uticaja nano-TiO₂ na strukturu zajednice slatkovodnih bentosnih makroinvertebrata (Jovanović i sar., 2016b). U ovom eksperimentu se pokazalo da nano-TiO₂ u koncentraciji od 25 mg/kg (što je druga najniža koncentracija testirana i u ovoj doktorskoj disertaciji) dovode do promene u strukturi zajednice makroinvertebrata čak za 39%. Rezultati ove doktorske disertacije potvrđuju postojanje potencijalnih negativnih posledica nano-TiO₂ zagađenja akvatičnih ekosistema. Trenutno se procenjuje da sredinske koncentracije mogu biti približno 2,5 mg/kg (prema švajcarskom modelu, Jovanović i sar., 2016b; Gottschalk i sar., 2009) što su koncentracije 200x manje od onih koje su u ovom istraživanju izazvale značajane letalne posledice. Međutim, rezultati ukazuju na potencijalno negativno subletalno dejstvo nano-TiO₂ pri trenutno sredinski relevantnim koncentracijama. Pored toga, potvrđen je i visok potencijal bioakumulacije nano-TiO₂ u organizmima larvi, te ukoliko se u slatkovodnim sedimentima nađu i veće koncentracije ovih čestica, kao što mnoge studije predviđaju (Wang i Novichak, 2018), postoji opasnost od ozbiljnijih posledica po bentosne zajednice hironomida, a samim tim i celokupne hidrobiocenoze.

5.2.2 Ispitivanje toksičnosti nano-CeO₂

Set eksperimenata sastojao se iz dva bioeseja: prvog, za procenu letalnih efekata, koji se sastojao iz pet tretmana sa sledećim koncentracijama nano-CeO₂: 2,5; 25; 250 i 2500 mg/kg nano-CeO₂/kg sedimenta i kontrolni tretman; i drugog, za procenu subletalnih efekata koji se sastojao iz istih pet tretmana.

ICP-MS analiza je pokazala visoku korelaciju između koncentracije nano-CeO₂ u telima larvi i njegove koncentracije u sedimentu, čime je potvrđena bioakumulacija nano-CeO₂ od strane larvi (pri čemu netretirane larve *C. riparius* u svojim telima sadrže 2±5 mg nano-CeO₂ po kg mokre mase). Ingestija nano-CeO₂ primećena je u nekoliko dosadašnjih studija (Garaud i sar., 2015; Bour i sar., 2015a; 2016; Auffan i sar., 2013), pri čemu hironomide mogu biti vektori kontaminacije, izazivajući genotoksičnost i povećanu smrtnost kod svojih predatora (Bour i sar., 2017; 2016). Kod jedinki tretiranih najvišim koncentracijama primećena je visoka varijabilnost u količini nano-CeO₂ u telima larvi, kao i u slučaju sa nano-TiO₂, što se može takođe objasniti pojavom agregacije, koja je zabeležena i u dosadašnjoj naučnoj literaturi (Quik i sar., 2014; Keller i sar., 2010). U setu eksperimenata za ispitivanje nano-CeO₂ na krupnom pesku pokazao se isti obrazac povećanja koncentracije nano-CeO₂ u hironomidama sa povećanjem koncentracija u sedimentu, s tim što su analize pokazale mnogo više koncentracije nano-CeO₂ čak i kod netretiranih larvi, o čemu je više reči bilo u prethodnom odeljku.

Biološki test za procenu uticaja na standardne parametre pokazao je preživljavanje najvećeg broja jedinki u kontroli, međutim nije bilo značajnog uticaja nano-CeO₂ na razvoj i preživljavanje jedinki. S obzirom da nije bilo značajnog uticaja na mortalitet, iste doze su korišćene za dalju procenu subletalnih efekata. U eksperimentu za procenu subletalnih efekata *C. riparius* larve su takođe pokazale vrlo nisku stopu mortaliteta i ujednačen rast, ali su daljim analizama primećeni određeni subletalni efekti. U setu eksperimenata za ispitivanje nano-CeO₂ na krupnom pesku takođe nije bilo značajnog uticaja na standardne životne parametre (međutim u ovom biološkom testu uočena je niža stopa preživljavanja, što se može pripisati uticaju eksperimentalne podloge).

Odustvo efekta na populacione parametre zabeleženo je i u mnogim drugim studijama. Bour i sar., 2015, nisu primetili nikakav efekat na mortalitet, inhibiciju rasta, odlaganje razvoja larvi, pa čak i na pojavu deformiteta (pri 48-časovnom izlaganju hironomida koncentracijama od 0,01 do 100 mg/l nano-CeO₂); kao ni pri četvoronedeljnom izlaganju koncentraciji od 1 mg/l nano-

CeO₂ (Bour i sar., 2016). U navedenoj studiji hironomide su akumulirale velike količine nano-CeO₂ (282 i 266 mg/kg, respektivno), kao i u našem slučaju. Istraživanja sprovedena na drugim vrstama pokazuju donekle kontradiktorne rezultate. Nikakva akutna toksičnost nije uočena kod *Daphnia magna*, *Thamnocephalus platyurus* i *Danio rerio* pri koncentracijama 1, 5 i 200 mg/l, respektivno (Hoecke i sar., 2009). Sa druge strane, uočena je inhibicija rasta kod *Pseudokirchneriella subcapitata*, pri čemu se EC50 razlikuje između studija, od 10.3 mg/l (Rogers i sar., 2010) do 2.4–29.6 mg/l (Rodea-Palomares i sar., 2011).

Analize *in vivo* genotoksičnosti pokazale su da nano-CeO₂ može da izazove različit stepen oštećenja na DNK i to u zavisnosti od doze. Genotoksičnost počinje da se ispoljava pri koncentraciji od 25 mg/kg (LOEC vrednost) i progresivno raste pri višim koncentracijama. Treba napomenuti da je u najvišem tretmanu sa 2500 mg/kg nano-CeO₂ oštećenje DNK statistički značajno više od svih ostalih tretmana, pa čak i od pozitivne kontrole (tretirane poznatim genotoksičnim agensom H₂O₂). Ovi rezultati su u skladu sa istraživanjem nekoliko autora, Lee i sar., 2009., su prijavili slične rezultate nakon izlaganja *C. riparius* 1 mg/l nano-CeO₂ (pri čemu su čestice veličine 15 nm izazvale veća oštećenja DNK od onih veličine 30 nm). U radu Lee i sar., 2009, primećen je i porast mortaliteta: 10% kod čestica od 15 nm i 0% kod 30 nm, u odnosu na 5±4 % u kontrolama. Ovaj procenat mortaliteta, međutim, u granicama je očekivanih vrednosti čak i u kontroli, zbog čega se ne može smatrati značajnim efektom nanočestica (čak iako statistički testovi pokazuju značajne razlike).

Sa druge strane, u našem istraživanju nije bilo statistički značajnih razlika u oksidativnom odgovoru hironomida na nano-CeO₂ među tretmanima. Ovo može biti rezultat antioksidativnih osobina nano-CeO₂, zbog kojih su ove nanočestice našle primenu u biomedicini i farmaciji u zaštiti tkiva od oksidativnog stresa (García i sar., 2011). Mnoge studije ističu antioksidativna svojstva ovih nanočestica, u istraživanju Xia i sar., 2008., pokazalo se da su 25 mg/l nano-CeO₂ suzbile proizvodnju ROS i povećale ćelijsku otpornost na oksidativni stres. Naši rezultati su, međutim, u suprotnosti sa mnogim studijama u kojima su primećeni citotoksišni efekti nano-CeO₂ na ćelijama pluća, u koncentracijama 5-40 mg/l (Park i sar., 2008); bakterijama, 1,2-730 mg/l (Thill i sar., 2006; Pelletier i sar., 2010); zelenim algama i cijanobakterijama, 10 µg/l (Rodea-Palomares i sar., 2010). Ovakve razlike u rezultatima mogu biti posledica nejasnoća dizajna studija, različitosti veličine nanočestica (od ispod 4 do preko 30 nm) i njihovih koncentracija (od 10 do preko 730

mg/l), čime se ističe neophodnost standardizacije, preciznosti i detaljnosti u opisu svih elemenata eksperimentalne metodologije.

Vidljivi deformiteti uočeni su na mentumima i mandibulama, međutim, u izuzetno malom procentu (manjem nego kod izlaganja hironomida nano-TiO₂): uglavnom nedostatak apikalnog zuba ili potpuno izduživanje cele strukture mandibula i gubitak zuba ili dodatni zub na centralnom zubu mentuma. Najviše deformiteta uočeno je u tretmanu 2,5 mg/kg, u oba slučaja, a procenat deformisanih i istrošenih struktura bio je izuzetno mali u odnosu na ukupan uzorak. U eksperimentu na krupnom pesku bilo je neznatno više uočenih deformisanih struktura. Uticaj nano-CeO₂ na pojavu deformiteta kod hironomida do sada je ispitivan samo u već pomenutoj studiji Bour i sar., 2015, u kojoj takođe nije primećen značajan teratogeni efekat nano-CeO₂, kao ni efekat na sam rast i razvoj hironomida.

Metodom geometrijske morfometrije otkriven je subletalni uticaj nano-CeO₂ na morfološke promene *C. riparius* jedinki, pri čemu su najveće promene uočene na mentumima, potom mandibulama, krilima ženki i najmanje na krilima mužjaka. Već pri PCA analizi larve tretirane najvišim koncentracijama (2500 mg/kg) izdvajaju se od svih ostalih tretmana po obliku i veličini struktura usnog aparata (mandibula i mentuma), pri CVA analizi razdvajanje je još jasnije, pri čemu se efekat nano-CeO₂ najviše uočava na mentumima. Mandibule tretiranih jedinki karakteriše proširenje baze, uz povlačenje prvog i drugog unutrašnjeg zuba ka bazi, a najveće promene primećene su na apikalnom zubu, koji ima tendenciju izduživanja pri visokim koncentracijama nano-CeO₂. Utvrđena je značajna razlika između svih grupa, osim između kontrolne i grupe tretirane sa 25 i 250 mg/kg CeO₂, što ukazuje na najveću promenu oblika pri vrlo niskim (2,5 mg/kg) i vrlo visokim koncentracijama nano-CeO₂ (2500 mg/kg). Kod mandibula jedinki iz seta eksperimenta na podlozi od krupnog peska, specifičan obrazac variranja oblika u odnosu na količinu nanočestica je manje izražen. Primećuje se da se kod tretiranih jedinki celokupni unutrašnji deo mandibule širi, kao i na sitnom pesku, međutim primećuje se da se zubi zbijaju, a apikalni zub skraćuje u svim tretmanima, osim tretmanu od 25 mg/kg, koji je najbliži kontroli, što nije u potpunosti u skladu sa rezultatima dobijenim na sitnom pesku.

Sa povećanjem koncentracije nano-CeO₂ dolazi do blagog širenja baze mentuma i baze dva unutrašnja lateralna zuba, međutim sa ekstremno velikim koncentracijama dolazi do naglog izduživanja svih zuba, uz veliko povlačenje baze centralnog zuba, izduživanje vrhova unutrašnjih lateralnih zuba i skupljanje središnjeg dela čitavog mentuma. Značajna razlika postoji između

svih grupa osim između grupa tretiranih sa 25 i 250 mg/kg nano-CeO₂, što ukazuje na sličnu morfološku varijabilnost mentuma jedinki izlaganih ovim dvema koncentracijama. Kod mentuma jedinki iz eksperimenta na podlozi od krupnog peska, iako postoje značajne razlike između svih grupa, razdvajanje je manje očigledno: grupa tretirana sa najvećom koncentracijom izdvaja se od stalih tek prema CV3 osi, a kod ovih jedinki dolazi do veoma sličnih promena kao i na sitnom pesku: izduživanja centralnog zuba, izduživanja vrha unutrašnjeg lateralnog zuba, kao i do skraćivanja bočnih lateralnih zuba.

Analize struktura odraslih jedinki su potvrdile postojanja polonog dimorfizma (pri čemu se primećuje isti trend kao i kod tretmana nano-TiO₂), a statistički značajne razlike između mužjaka i ženki u veličini i obliku krila nisu umanjene tretmanom CeO₂ nanočesticama. Regresiona analiza, međutim, pokazuje manje razlike u veličini krila između mužjaka i ženki i manji uticaj alometrije, nego kod tretmana nano-TiO₂ što ukazuje na uticaj nano-CeO₂ u pravcu smanjenja razlika u veličini krila među polovima. Analize su pokazale uticaj tretmana na oblik i veličinu krila oba pola. PCA analizom krila ženki primećuje se da tretirane jedinke karakterišu izdužene baze krila sa izduženim analnim i radio-medijalnim nervom pomeranim ka bazi krila, dok CVA analiza pokazuje najveće promene kod jedinki tretiranih najmanjom i najvećom koncentracijom (2,5 i 2500 mg/kg CeO₂): izduživanje baze krila, povlačenje radio-medijalnog nerva ka bazi, izduživanje analnog nerva, smanjenje razmaka između vrhova kubitalnih i medijalnog nerva i povlačenje vrhova subkostalnog i prvog radijalnog nerva ka bazi krila. Ove jedinke ujedno imaju i manja krila od ostalih što može objasniti smanjenje razlika između polova primećenih regresionom analizom. Značajna razlika postoji između svih grupa, osim između grupa tretiranih sa 25 i 250 mg/kg nano-CeO₂, kao i u slučaju mentuma. Krila mužjaka pokazuju manju reakciju na tretman nanočesticama, iako postoji značajna razlika između svih grupa, specifičan obrazac variranja oblika krila u odnosu na količinu nanočestica ne može se uočiti. Grupa tretirana sa najvećom koncentracijom izdvaja se od stalih tek prema CV3 osi i karakterišu je proširenje baze krila, izduženje analnog nerva, izduženje medijalnog nerva i skraćivanje subkostalnog nerva.

Generalno, nano-CeO₂ je poznat po pozitivnim biološkim efektima, zbog čega je našao primenu u medicini (Zhang i sar., 2011), međutim u mnogim istraživanjima pokazalo se njegovo toksično dejstvo prilikom izlaganja dafnija (García i sar., 2011; Lee i sar., 2009), hironomida (Lee i sar., 2009), mekušaca (Koehlé-Divo i sar., 2018), nematoda (Roh i sar., 2010; Zhang i sar., 2011)

i algi (Manier i sar., 2011, 2013; Rogers i sar., 2010), ukazujući na to da, bez obzira na korisnost njegove upotrebe u industriji, može imati negativan uticaj na životnu sredinu.

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da nano-CeO₂ ne može biti letalan za hironomide u koncentracijama od najmanje 2500 mg/kg sedimenta, koje su znatno više od trenutno prisutnih u prirodi. Međutim, subletalno dejstvo nano-CeO₂ otkriveno je, pored analize oštećenja DNK, i metodom geometrijske morfometrije. Uočene su male, ali ipak značajne, promene važnih morfoloških struktura larvi i odraslih jedinki pri niskim i vrlo visokim koncentracijama nano-CeO₂, kao i potencijalni uticaj na smanjenje polnog dimorfizma. Jedini statistički značajan efekat nano-CeO₂ na subćelijskom nivou je oštećenje DNK, koje počinje da ispoljava tek pri koncentracijama od 25 mg/kg. Međutim, ova koncentracija je skoro 250 puta veća od trenutno najviše predviđene koncentracije od 0,1 mg/kg sedimenta, a čak 125.000 puta veća od najmanje predviđene sredinske koncentracije (Gottschalk i sar., 2015), te nano-CeO₂ ne predstavlja opasnost po hironomide i ostale članove hidrobiocenoza pri trenutno sredinski relevantnim koncentracijama. Najnovije studije, međutim predviđaju da koncentracije nano-CeO₂ mogu biti i veće od trenutno predviđenih i da je godišnji priliv nano-CeO₂ od 0,1 do 10 µg/l u površinskim vodama, a čak između 10 i 100 mg/kg na deponijama, sa kojih spiranjem mogu dospeti u slatkovodne ekosisteme i time povećati trenutne koncentracije u sedimentima (Wang i Novichak, 2018). Tačkasti izvori ispuštanja i akumulacije otpadnih voda mogu dodatno potencijalno povećati koncentraciju nano-CeO₂ iznad uočenog praga toksičnosti. Ukoliko ovome dodamo i činjenicu da je našim straživanjem potvrđena bioakumulacija nano-CeO₂ u telima hironomida, postoji realan rizik od trofičkog transfera nanočestica i posledica po organizme dalje u lancu ishrane.

5.2.3 Ispitivanje toksičnosti nano-Fe₃O₄

Set eksperimenata sastojao se iz dva bioeseja: prvog, za procenu letalnih efekata, koji se sastojao iz šest tretmana sa sledećim koncentracijama nano-Fe₃O₄: 1; 5; 10; 50; 100 mg nano-Fe₃O₄/kg sedimenta i kontrolni tretman; i drugog, za procenu subletalnih efekata, koji se sastojao iz istih šest tretmana.

U prvom eksperimentu nije bilo značajnog uticaja nano-Fe₃O₄ na razvoj i preživljavanje jedinki te su iste doze korišćene za dalju procenu subletalnih efekata. U biološkom testu za procenu

subletalnih efekata *C. riparius* larve su takođe pokazale vrlo nisku stopu mortaliteta i ujednačen rast ali su daljim analizama primećeni određeni subletalni efekti.

Analize *in vivo* genotoksičnosti pokazale su da nano-Fe₃O₄ može da izazove oštećenja na DNK tek pri veoma visokim koncentracijama. Genotoksičnost počinje da se ispoljava pri koncentraciji od 50 mg/kg (LOEC vrednost), pri čemu su oštećenja ćelija slična onim u pozitivnoj kontroli (tretiranoj sa H₂O₂), a raste u najvišem tretmanu sa 100 mg/kg nano-Fe₃O₄, gde je oštećenje DNK 6,7 puta veće on onog u netretiranm jedinkama, pa čak i 1,3 puta veće od pozitivne kontrole. Različiti rezultati analize genotoksičnosti pokazali su se u studijama u zavisnosti od model organizma i dizajna testova. Pöttler i sar., 2015, nisu uočili nikakav genotoksični efekat na granulocitima (HGL-5) izlaganim 50, 100 i 150 µg/ml nano-Fe₃O₄ koje su imale omotače. Gomaa i sar., 2015, ispitivali su genotoksični potencijal nano-Fe₃O₄ na *Salmonella* sojevima TA100, TA2638, TA102 i TA98 (doze od 0 do 70 µg/ml, tj. 0,07 g/l, veličine 8,0±2 nm) i primećen je mutageni efekat na jednom od sojeva pri najvišim koncentracijama nano-Fe₃O₄, pored toga kometa testom je primećen porast oštećenja DNK kroz povećanje “momenta repa” (eng. tail moment), kod humanih ćelija bubrega i limfocita izlaganih najvišim koncentracijama nano-Fe₃O₄. Genotoksični efekti primećeni su i u drugim studijama: Kőnczöl i sar., 2011, primetili su povećanje ROS koje je indukovalo oštećenja na DNK epitelnih ćelija alveola izlaganih nano-Fe₃O₄ veličine od 20 nm do 3 µm; Watanabe i sar., 2013, ističu da tek pri visokim koncentracijam (100 µg/ml) mogu uticati na vijabilnost ćelija, iako i pri niskim dozama podstiču produkciju ROS i oksidativna oštećenja DNK; Totsuka i sar., 2014, su primetili povećanje oksidativnog stresa i oštećenja DNK u ćelijama pluća miševa izloženih sa 0,05 i 0,2 mg nano-Fe₃O₄ po individui.

Statističke analize pokazale su značajno variranje kod svih parametara oksidativnog stresa (osim aktivnosti katalaze), pri čemu se u kontroli uočavaju najniže vrednosti oksidativnog stresa, a najviše vrednosti ukupnih proteina. Korelaciona analiza ukazuje na međusobnu pozitivnu korelaciju vrednosti TBARS, AOPP i CAT, kao i negativnu korelaciju ovih vrednosti sa količinom ukupnih proteina u larvama. Mnoga istraživanja su pokazala da nano-Fe₃O₄ mogu izazvati povećanje produkcije ROS (Liu i sar., 2013; Wu i sar., 2012; Zhu i sar., 2012; Sharifi i sar, 2012; Kim i sar., 2012), povećanje oksidativnog stresa, čak i ozbiljno oštećenje ćelija (Liu i sar., 2013; Kim i sar., 2012; Soenen i sar., 2011; Naqvi i sar., 2010). Oksidativni stres izazivaju uglavnom ukoliko se koriste bez površinskih liganada, kao što je slučaj i sa nano- Fe₃O₄ analiziranim u ovom istraživanju.

Procenjene koncentracije hemoglobina u hemolimfi larvi nisu pokazale statistički značajnu varijabilnost između tretmana, vrednosti ukazuju na porast količine i njegovu veliku varijabilnost u tretmanima sa koncentracijama višim od 1 mg/kg nano-Fe₃O₄. Najviša koncentracija hemoglobina uočena je u larvama tretiranim sa 5 i 10 mg/kg nano-Fe₃O₄, dok je najniža uočena u kontroli (čak tri puta niža). Hemoglobin hironomida se sintetise u masnom tkivu larvi i ekskretuje u hemolimfu gde ima važnu ulogu u oksidativnim procesima (Stanković i sar., 2020). Postoje indikacije da je sinteza hemoglobin regulisana putem juvenilnog hormona i egdizona, zbog čega dolazi do periodičnog pada njegove koncentracije pred svako presvlačenje larvi (Vafopoulou-Mandalos i Laufer, 1983). Naglo povećanje sadržaja hemoglobina u larvama tretiranim srednjim koncentracijama (5 i 10 mg/kg nano-Fe₃O₄) može se objasniti i ispuštanjem Fe tokom razlaganja nano-Fe₃O₄ u larvama. Naime, u studiji Hurtado-Gallego i sar., 2020, se pokazao pozitivan efekat na rast pri niskim koncentracijama nano-Fe₃O₄, što su autori objasnili pozitivnim dejstvom Fe koje se ispušta tokom raspadanja nanočestica u organizmu, dok su pri visokim koncentracijama nanočestice imale negativan uticaj na organizme. Ovo zapravo predstavlja hormezis - reakciju organizama koju karakteriše stimulacija ili blagotvorno dejstvo niskih doza i inhibicija ili toksični efekat visokih doza određenog toksikanta (Calabrese i Mattson, 2017), što bi u našem istraživanju mogao biti slučaj. U nekim studijama se pokazalo da sa smanjenjem količine hemoglobina dolazi do povećanja aktivnosti enzima stresa (AOPP) i obrnuto, što se može objasniti njihovom međusobnom kompenzacionom ulogom u održavanju detoksifikacije organizma (Choi i sar., 2000). Pokazalo se da u stanju hipoksije dolazi do autooksidacije methemoglobina u respiratornim tečnostima *C. riparius* larvi, što može dovesti do stvaranja superoksidnih radikala koji predstavljaju dalji supstrat za delovanje SOD (Choi i sar., 2000; 1999). Vrlo često se dešava da se pred presvlačenje larvi pojačava aktivnost antioksidativnih enzima (kao što je SOD) što mnogi autori navode kao kompenzacioni mehanizam smanjenja koncentracije hemoglobina u tom periodu (Choi i sar., 2000). Ove tvrdnje nikada nisu eksperimentalno potvrđene, a u našem slučaju nije uočeno značajno variranje SOD, te postoji mnogo mogućnosti za dalja ispitivanja na ovom polju.

Procenat deformisanih i istrošenih struktura bio je izuzetno mali u odnosu na ukupan uzorak (manji nego kod jedinki tretiranih ostalim dvema nanočesticama). Vidljivi deformiteti uočeni su samo na mandibulama, međutim, u izuzetno malom procentu (slično kao i kod jedinki

izlaganih nano-CeO₂), uglavnom nedostatak apikalnog zuba ili potpuno izduživanje cele strukture i to pretežno kod jedinki tretiranih najnižom koncentracijom od 1 mg/kg nano-Fe₃O₄.

Metodom geometrijske morfometrije otkriven je subletalni uticaj nano-Fe₃O₄ na morfološku varijabilnost *C. riparius* larvi, pri čemu su najveće promene uočene na jedinkama izlaganim dvema najvišim koncentracijama, kod kojih je uočeno i najveće oštećenje DNK. Već pri PCA analizi morfoloških struktura larvi (mandibula i mentuma) primećuje se izdvajanje jedinki tretiranih sa 50 i 100 mg/kg nano-Fe₃O₄, što je potvrđeno i CVA analizom. Analiza mandibula ukazuje na tendenciju zbijanja i povlačenja baza zuba, smanjenja prvog unutrašnjeg zuba i skraćanja apikalnog regiona mandibula sa povećanjem koncentracije Fe₃O₄ nanočestica. Značajne razlike postoje među svim grupama, osim između 1; 5 i 10 mg/kg nano-Fe₃O₄, koje su međusobno najslabije. Kod mentuma sa malim povećanjem koncentracije Fe₃O₄ nanočestica dolazi do vrlo slabog sužavanja baze mentuma i manjih promena u centralnom zubu, međutim sa ekstremno velikim povećanjem koncentracije nano-Fe₃O₄ dolazi do velikog izduživanja svih zuba, a najveće promene se uočavaju na bazi centralnog zuba, koja se povlači, kao i vrhovima unutrašnjih lateralnih zuba koji se izdužuju.

Analize struktura odraslih jedinki su potvrdile postojanja polonog dimorfizma (primećuje se isti trend kao i kod prethodnih tretmana), pri čemu je uočen manji uticaj alometrije nego kod tretmana sa nano-TiO₂, ali više nego trostruko veći nego kod tretmana sa nano-CeO₂. Statistički značajne razlike između mužjaka i ženki u veličini i obliku krila nisu umanjene tretmanom Fe₃O₄ nanočestica. Iako postoji odvajanje između grupa, ni kod ženki ni kod mužjaka se ne uočava jasna pravilnost u rasporedu u morfološkom prostoru u odnosu na tretman nanočesticama, osim što se jedinke kontrolne grupe blago izdvajaju od tretiranih grupa, a najveće variranje pokazuju kostalni i subkostalni nerv.

Mnoga istraživanja pokazuju pozitivna svojstva i veliki potencijal primene nano-Fe₃O₄ u mnogim industrijama, pre svega biomedicini i remedijaciji životne sredine (Hurtado-Gallego i sar., 2020; Matei i sar., 2016; Pöttler i sar., 2015; Liu i sar., 2013; Bamrungsap i sar., 2012; Laurent i sar., 2008; Yavuz i sar., 2006), pri čemu je najadekvatnije koristiti ih sa površinskim prevlakama koje smanjuju njihovu toksičnost i povećavaju preciznost uoptrebe (Laurent i sar., 2008; Tartaj i sar., 2006). Međutim, istraživanja su pokazala potencijalne probleme u njihovoj proizvodnji (Yew i sar., 2020), a malobrojne ekotoksikološke studije ističu potencijalno negativno dejstvo na životnu sredinu (Hurtado-Gallego i sar., 2020; Wang i Nowack, 2018), terestrične (Wu i sar., 2012,) i

akvatične organizme (Hurtado-Gallego i sar., 2020; Barhoumi i sar., 2015; Barhoumi i sar., 2013; Xiaoxiao i sar., 2012; Zhu i sar., 2012; Garcia i sar., 2011).

Rezultati pokazuju da nano-Fe₃O₄ (koji je u našem slučaju testiran bez ikakvih površinskih prevlaka) ne ispoljava letalne efekte pri svim testiranim koncentracijama, koje su znatno više od trenutno prisutnih u prirodi. Procenjuje se da je u slatkovodnim sedimentima prisutno prosečno 2 mg nanočestica oksida gvožđa po kg sedimenta, međutim ovde spadaju sve forme oksida gvožđa (hematit, α -Fe₂O₃, maghematit, γ -Fe₂O₃, magnetit, Fe₃O₄), sa i bez prevlaka (Wang i Nowack, 2018), tako da su realne koncentracije samo nano-Fe₃O₄ verovatno u rangu sa najnižom ispitivanom koncentracijom u našem slučaju. Trenutne sredinske koncentracije su mnogo niže od onih koje su u ovom eksperimentu izazvale ozbiljne posledice po jedinke hironomida. Genotoksičan efekat se ispoljava tek pri ekstremno visokim koncentracijama nano-Fe₃O₄, (50 i 100 mg/kg) pri kojima se primećuje i uticaj na oblik i veličinu važnih morfoloških strukutra larvi. Fenotipski uticaj nano-Fe₃O₄ se ispoljava i kod *C. riparius* i u odraslom stadijumu, mada je izuzetno blago izražen. Sa druge strane, pojava oksidativnog stresa (koja je uočena samo kod ovih nanočestica) ukazuje na potencijalno štetne subletalne efekte čak i pri nižim koncentracijama. Veoma je teško uporediti rezultate sa dosadašnjim studijama, obzirom na činjenicu da je ovo prvo sveobuhvatno ispitivanje potencijalne toksičnosti nano-Fe₃O₄ na hironomidama, kao i da su istraživanja na slatkovodnim bentosnim organizmima veoma retka.

5.3 Odabir adekvatnih metoda za procenu ekotoksičnosti nanočestica oksida metala u akvatičnim ekosistemima

U poslednje dve decenije pojavio se veliki broj podataka o potencijalnim efektima fabrički proizvedenih i prerađivanih nanomaterijala na organizme koji žive u slatkim vodama, zemljištu i sedimentima. Na polju ispitivanja toksikologije i ekotoksikologije nanočestica je postignut veliki napredak, podaci o metodama testiranja i problemima sa kojima se može susreti u laboratoriji su su sve obimniji, međutim metodologija rada je potpuno neusklađena, sa mnogo kontradiktornih rezultata i mnogo neigurnosti u proceni uticaja ovih čestica u prirodnim uslovima (Holden i sar., 2014). Povrh svega, regulatorne agencije još uvek nisu donele odluku o tome da li se nanočesticama treba baviti kao zasebnom klasom zagađivača (Lead i sar., 2018; Hund-Rinke i sar.,

2016). Nova svojstva koja su poželjna u nanoindustriji, a koja su detaljno opisana u uvodnom poglavlju (na primer, prostorno ograničenje elektronskih svojstava, velika specifična površina i veća izdržljivost), mogu, ali i ne moraju, podrazumevati i nov način interakcije sa abiotičkim i biotičkim okruženjem. Dosadašnja ispitivanja pokazala su da nanoveličina čestica implicira veću opasnost po narušavanje zdravlja prirodnih ekosistema zbog toksičnih efekata koji nastaju usled specifičnih osobina nanočestica, njihove povećane reaktivnosti, olakšanog transporta i interakcije sa biološkim sistemima, pre svega u vodenoj sredini. Međutim, još uvek ne postoji ni jedan zvaničan OECD standardizovan protokol za procenu uticaja nanočestica na akvatične organizme, a sve obimnija literatura ukazuje na neophodnost njegovog formulisanja (Hjorth i sar., 2017; Hund-Rinke i sar., 2016; Petersen i sar., 2015; Handy i sar., 2012).

Prema popisu nanotehnoloških potrošačkih proizvoda (eng. nanotechnology consumer products inventory) broj proizvoda je skočio sa 50 na skoro 2000 u roku od samo nekoliko godina (Vance i sar., 2015) što ukazuje na progresivni rast proizvodnje i upotrebe ovih proizvoda. Kombinovanjem podataka dobijenim uzorkovanjem iz prirode, analizom tržišta i kompjuterskim modelovanjem, evidentan je porast sredinskih koncentracija nanočestica, među kojima je najviše oksida metala (Wang i Novichak, 2018; Sun i sar., 2014; Meesters i sar., 2014; Piccinno i sar., 2012; Gottschalk i sar., 2009; Boxall i sar. 2007; Aitken i sar. 2006; Roco, 2003).

Iz navedenih razloga istraživanje u okviru ove doktorske disertacije predstavlja izuzetno važnu sveobuhvatnu multiparametarsku studiju (od molekularnog do ekološkog nivoa), toksičnosti značajnih nanočestica oksida metala. Kroz ovo istraživanje je ispitana osetljivost i praktičnost upotrebe velikog broja metoda za procenu uticaja nanočestica putem relevantnih biomarkera i bioindikatorskih akvatičnih vrsta.

Značajnost precizne karakterizacije nanomaterijala pre samog testiranja putem toksikoloških testova naglašena je u mnogim studijama (OECD, 2016; OECD, 2015; Coll i sar., 2016, Wagner i sar., 2014; Montes-Burgos i sar., 2010; Tsakovska i Worth, 2009; Mowat i sar., 2007), a potvrđena je i ovim istraživanjem. Hemijska i fizička svojstva, kao i interakcije sa drugim materijalima u sredini znatno utiču na biodostupnost i bioakumulaciju nanočestica kod slatkovodnih organizama (Lead i sar., 2018). Postojeća standardna metodologija ispitivanja nanomaterijala treba se koristiti sa oprezom, a fiziko-hemijska svojstva nanočestica moraju biti uključena u analize, kako bi se postigla adekvatna interpretacija, razumevanje i upoređivanje rezultata ekotoksikoloških testova. U tu svrhu, precizna karakterizacija nanočestica korišćena u

ovom istraživanju, putem velikog broja savremenih metoda (BET za analizu specifične površine; XPS spektroskopija za analizu površinske hemije materijala; XRD kristalografija za određivanje faznog sastava i kristalne strukture; TEM, SEM i AFM mikroskopija za dobijanje informacija o distribuciji veličine i agregaciji nanočestica, kao i fotografisanje uzoraka; EDX spektroskopija za kvalitativno i kvantitativno određivanje elemenata u ispitivanom uzorku; DLS spektroskopija za određivanje hidrodinamičkog prečnika, indeksa polidisperziteta i ζ potencijala), a pre svega i *in situ* karakterizacija nanočestica u samom eksperimentalnom sedimentu (EDX i SEM analizom) se pokazala izuzetno značajnom i efikasnom.

Veoma značajna je i ICP-MS analiza, primenjena u ovom istraživanju, kojom je procenjen sadržaj nanočestica u telima tretiranih i netretiranih larvi, čime je potvrđena bioakumulacija svih ispitivanih nanočestica od strane hironomida. Ovakvi rezultati pokazuju da, iako nanočestice ne moraju ispoljiti visoku toksičnost kod hironomida, postoji realan rizik od trofičkog transfera nanočestica i posledica po organizme dalje u prehrambenom lancu. Ovo je izuzetno važan podatak, a koji se u mnogim studijama izostavlja, iako je u velikom broju studija bioakumulacija potvrđena (Wang i Novichak, 2018; Garaud i sar., 2015; Bour i sar., 2015a, 2016; Gambardella i sar., 2014; Auffan i sar., 2013). Složenije studije procene biakumulacije su veoma retke. Gambardella i sar., 2014, su istraživali ekotoksičnost i unost nekoliko nanočestica oksida metala (SiO_2 , SnO_2 , CeO_2 , Fe_3O_4) od strane morskog ježa *Paracentrotus lividus* kroz njegovu ishranu mikroalgama *Cricosphaera elongata*. Istraživanje je pokazalo da nanočestice oksida metala mogu ući u lance ishrane i dovesti do poremećaja u razvoju drugih marinskih organizama. Istraživanja Bour i sar., 2016, potvrdila su nagomilavanje nano- CeO_2 na ljušturama i galerti silikatnih algi, u crevnom traktu hironomida i crevnom traktu vodozemaca, na površini i u organizmu *Daphnia pulex*. Larve hironomida imaju znatnu bioturbacijsku aktivnost (Armitage i sar., 1995) i veliki digestivni trakt u odnosu na veličinu tela (Bour i sar., 2016), što pruža potencijal za skladištenje velike količine kontaminiranog sedimenta u njihovim crevima, čime se može objasniti visoka koncentracija nanočestica u organizmu. Povrh toga, primećeno je da nanočestice mogu izazvati “začepljenje” crevnog trakta čime mogu negativno uticati na digestiju, a samim tim i izmeniti životne strategije kod primarnih konzumenata (Campos i sar., 2013). Sličan obrazac primećen je i kod detritusnih zajednica (Rosenfeldt i sar., 2015). S obzirom da količine nanočestica nisu proverene u telima odraslih jedinki u našem slučaju, ne može se sa sigurnošću tvrditi da ih hironomide nisu na neki način ekstrahovale iz organizma i da su nanočestice samo kratkoročno skladištene u larvama.

Međutim svakako potvrđuje činjenicu da hironomide mogu biti jedan od glavnih bioakumulatora nanočestica u akvatičnim sistemima. Mikroskopska analiza ekstracelularne i intracelularne lokalizacije, putem elektronske i atomske mikroskopije (Shen i sar., 2012; Buyukhatipoglu i sar., 2010), bi mogla upotpuniti dobijene rezultate i predstavljati dalji pomak u budućim istraživanjima internalizacije nanočestica.

Rezultati ekotoksikoloških testova predstavljaju osnovu za monitoring prisustva zagađujućih materija u životnoj sredini i promena koje one izazivaju u organizmima i čitavom ekosistemu, pri tom pružajući mogućnost ispitivanja štetnih supstanci u strogo kontrolisanim uslovima. Izbor adekvatnog model organizma ima značajan uticaj na ekološku relevantnost, uspeh, isplativost i interpretaciju ekotoksikološkog testa. Adekvatne bioindikatorske vrste moraju imati sposobnost preživljavanja u zagađenim sredinama, ali moraju i pokazati merljive reakcije na prisustvo sredinskog sresa, čime bi služile kao rani indikator zagađenja. Kako je u uvodnom poglavlju obrazloženo, hironomide predstavljaju idealne model organizme, čija upotreba se pokazala izuzetno prikladnom u ekotoksikologiji, bioindikaciji i biomonitoringu (Tomilina i sar., 2020; Park i Choi, 2017; Long i sar., 2015; De Bisthoven i sar., 2004; Servia i sar., 2000; ASTM, 1995; Ingersoll, 1995; US EPA, 1994; Hill, 1993; Warwick, 1985). Rezultati naših istraživanja potvrđuju izuzetan potencijal vrsta roda *Chironomus* u bioindikaciji zagađenja nanočesticama i ekotoksikološkoj analizi njihovog dejstva u laboratorijskim uslovima. Pri tom, vrsta *C. riparius* se pokazala neznatno efikasnijom u odnosu na *C. tentans* iz sledećih razloga: veća brojnost prirodnih populacija, jednostavnije održavanje laboratorijske populacije, kraće generacijsko vreme i manji broj deformacija usnog aparata u kontrolnim tremanima. Ovi rezultati u skladu su sa preporukama još nekolicine studija (Thorat i Nath, 2013; Watts i Pascoe, 2000a; Watts i Pascoe, 2000b), kao i dosadašnjim ispitivanjima biologije i ekologije ovih dveju vrsta (Brabec i sar., 2020; Schmidt-Kloiber i Hering, 2015; Pillot, 2009).

Stres izazvan proizvedenim nanočesticama može izazvati promene na molekularnom nivou, koje se amplifikuju i ispoljavaju u fenotipu jedinki, što može dovesti do promena u biologiji i ekologiji vrsta, poremećaja strukture i funkcije populacija i imati reperkusije na čitav ekosistem. Pored izbora adekvatnog model organizma i odabir biomarkera (parametara koji pokazuju uticaj ispitivanih stresora na njima) igra važnu ulogu u proceni toksičnosti nanočestica. Reakcije organizama mogu se detektovati na nekoliko nivoa putem ekotoksikoloških testova, međutim praćenjem suptilnih promena na organizmima moguće je otkriti subletalne efekte i time omogućiti

detekciju prisustva nanočestica u ekosistemu u ranim fazama zagađenja. Mnogi autori sugerišu da trenutne količine nanočestica u životnoj sredini zapravo i mogu izazvati samo subletalne efekte (na molekularnom nivou), a da se efekti na nivou organizama, vrsta i čitavih zajednica (uticaj na mortalitet, rast, reprodukciju i ostale značajne parametre) mogu očekivati u budućnosti, ukoliko se nastavi nekontrolisana ekspanzija nantehnologije i nanoindustrije (Mahaye i sar, 2017). Ispitivanjem u okviru ove doktorske disertacije su se predikcije pokazale tačnim: pri sredinski relevantnim koncentracijama nije bilo efekta na preživljavanje i rast hironomida (akutne i fiziološke toksičnosti), a pri vrlo visokim koncentracijama jedini značajan letalan efekat ispoljile su nano-TiO₂ čestice. Međutim otkriveni su mnogi negativni subletalni uticaji kroz ispitivanje enzima stresa, DNK oštećenja i morfološke varijabilnosti. Zbog toga je neophodno usmeriti fokus na razvoj metoda testiranja subletalnih efekata nanočestica i upotrebiti ih u biomonitoringu i predikciji nanozagađenja akvatičnih ekosistema.

U ovom istraživanju, analiza uticaja nanočestica na subcelularnom nivou ispitivana je putem praćenja parametara oksidativnog stresa (ukupna količina proteina; stepen lipidne peroksidacije određen putem količine malonil aldehida, MDA, ili količine supstanci koje reaguju sa tiobarbiturinskom kiselinom, TBARS; stepen proteinske oksidacije, AOPP; aktivnost superoksid dismutase - SOD i aktivnost katalaze - CAT) kao i *in vivo* genotoksičnosti (praćenjem oštećenja DNK somatskih ćelija pomoću kometa testa). Povećanje oštećenja na DNK je uočena pri izlaganju visokim koncentracijama nano-CeO₂ i nano-Fe₃O₄, dok je povećanje oksidativnog stresa primećeno pri izlaganju nano-Fe₃O₄. Biohemijski biomarkeri omogućavaju detekciju prvih bioloških odgovora povezanih sa prisustvom toksičnih agenasa, pogotovu u slučaju nanočestica oksida metala koje imaju tendenciju prolaska kroz biološke membrane i pospešivanja nastanka ROS, čime dolazi do oštećenja ćelijskih struktura (DNK, proteina, lipida, pa čak i čitavih ćelijskih membrana), indukcije transkripcije gena vezanih za oksidativni stres ili čak apoptozu (Haynes i sar., 2017; Dorier i sar., 2017; Liu i sar., 2013; Sharifi i sar, 2012; Kim i sar., 2012; Park i sar., 2008b; Moore, 2006; Li I sar, 2003; Hermes-Lima i Zenteno-Savin, 2002), a što je detaljno opisano u poglavlju 1.3.2.1. Posledice oksidativnog stresa (stepen oštećenja organizma) ispoljavaju se kada se poremeti odnos slobodnih radikala (ROS i drugih reaktivnih radikala) i antioksidanasa u organizmu, čime se smanjuje sposobnost reparacije sistema, a što se lako može detektovati standardnom metodologijom (Park i sar., 2008b; Lee i Choi, 2007). Pucanje DNK lanaca predstavlja jedno od glavnih vidova oštećenja DNK usled oksidativnog stresa (Cotelle i Ferard,

1999; Lacaze i sar., 2010; Valverde i Rojas, 2009), a može se lako detektovati primenjenom metodom alkalne verzije kometa testa (Bernabò i sar., 2017; Park i Choi, 2009). Nivo oštećenja DNK je u ovom istraživanju je određen razvrstavanjem kometa u kategorije na osnovu relativne količine oštećene DNK u “repu” komete u odnosu na “glavu”, tj neoštećeni deo DNK (Collins, 2004; Miyaji i sar., 2004). Postoje i savremenije procene analize preparata kometa testa. Naime, komete mogu analizirati putem kompjuterskih softvera kao što je “OpenComet” (Gyori i sar., 2014) sa ekstenzijama za obradu kometa, čime se mogu dobiti još precizniji rezultati i analizirati parametri kao što je “momenat repa” (eng. tail moment), što se svakako preporučuje u budućim istraživanjima.

Dosadašnja ispitivanja nanočestica oksida metala pokazala su da, iako mnoge od njih ne izazivaju letalne efekte, mogu dovesti do reakcije enzima stresa, kao i do oštećenja DNK, pri čemu postoji povezanost između ovih parametara: Oberholster i sar., 2010, su istraživali uticaj 7 različitih nanomaterijala na *C. tentans*, i u svim tretmanima pokazalo se da sa povećanjem koncentracije nanočestica povećava enzimatska aktivnost katalaze i peroksidaze, povećavaju oštećenja DNK i dolazi do inhibicije rasta; u studiji Mohmood i sar., 2014, se pokazalo da nanočestice oksida gvožđa izazivaju peroksidaciju koja dovodi do većih oštećenja lipida nego DNK; Lee i sar., 2009., su pokazali da nano-CeO₂ može biti genotoksičan za *Daphnia magna* i *C. riparius* (povećano oštećenje na DNK), dok TiO₂ nije izazvao nikakva vidljiva DNK oštećenja. Garcia i sar., 2011, ispitivali su akutnu toksičnost upravo iste (tri forme nanočestica kao i u ovom istraživanju) nano-TiO₂, nano-CeO₂ i nano-Fe₃O₄ (u koncentraciji od 1,12; 0,64 i 0,67 mg/l respektivno) na germinaciju semena nekoliko vrsta biljaka, preživljavanje *Daphnia magna*, i bioluminescenciju marinske bakterije *Vibrio fischeri* (Microtox test). Najveću toksičnost pokazale su čestice oksida cerijuma, potom titanijuma i najmanju gvožđa, a takođe se pokazalo da bioesej sa germinacijom semena nije najpovoljniji metod za testiranje efekta nanočestica, dok su se bioeseji sa *D. magna* i *V. fischeri* pokazali izuzetno osetljivim. Veoma malo istraživanja je rađeno na multigeneracijskom hroničnom efektu nanočestica, međutim većina ovakvih studija pokazala je povećanu osetljivost potomačkih generacija na izloženost nanočesticama i generalno veću osetljivost organizama usled dugotrajne izloženosti: hronični uticaj nano-TiO₂ na *Daphnia magna*, (Bundschuh i sar., 2012; Jacobash i sar., 2014) i *Drosophila melanogaster* (Moon i sar., 2017), hronični uticaj nano-Ag na *Caenorhabditis elegans* (Schultz i sar., 2016) i *Daphnia magna* (Hartmann i sar., 2019), hroničan uticaj nano-Ag na *Caenorhabditis elegans* (hroničan uticaj nano-

CeO₂ kod biljaka (Rico i sar., 2017). Procena uticaja nanočestica u više generacija na vrstama *Chironomus spp* je veoma retka: hronični uticaj fulerena na dve generacije *C. riparius* pokazala je veću osetljivost prve generacije i adaptaciju na prisustvo nanočestica već u drugoj generaciji (Waissi i sar., 2017). Uprkos trenutnom nedostatku razumevanja osnovnih procesa koji dovode do reakcija organizama na prisustvo nanočestica, podaci ukazuju na potencijalne dugoročne posledice na populacije i akvatičnih i terestričnih organizama. Zbog toga je neophodno ispitati što veći broj subcelularnih biomarkera, ali pratiti promene parametara i na višim nivoima biološke organizacije. Ono što je najvažnije, takvi efekti nisu obuhvaćeni većinom standardizovanih protokola, te su potrebna sistematska istraživanja hronične toksičnosti, kao i evolucionog potencijala populacija i zajednica da se prilagode ovim novim stresorima u životnoj sredini. U budućim istraživanjima, pored već opisanih metoda, mogli bi se sprovesti i *in vitro* testovi citotoksičnosti: eseji ćelijske vijabilnosti, proliferacije i diferencijacije ćelija, kao i analiza gentoksičnosti putem praćenja poremećaja ekspresije gena (Liu i sar., 2013; Shen i sar., 2012; Buyukhatipoglu i sar., 2010).

Pored navedenih, često u literaturi upotrebljivanih, subcelularnih biomarkera, uticaj nanočestica na subćelijskom nivou praćen je i kroz promenu količine hemoglobina u larvama izloženim nano-Fe₃O₄. Hemoglobini su proteini koji učestvuju u važnim oksidativnim procesima, reverzibilnom vezivanju, transportu i skladištenju kiseonika, a hironomide su jedne od retkih predstavnika insekata koji ih poseduju (Osmulski i Leyko., 1986). Pokazalo se da je preživljavanje slatkovodnih organizama u hipoksičnoj i zagađenoj sredini uslovljeno postojanjem biohemijskih mehanizama za odbranu od oksidativnog stresa, ali i održavanja aerobnog metabolizma (Choi i sar., 1999). U ovome zapravo pomaže ekstracelularni hemoglobin prisutan u obliku nekoliko izoformi monomera i dimera rastvorenih u hemolimfi, čija je sinteza stimulisana tokom hipoksije (Osmulski i Leyko, 1986). Uprkos posebnosti ovog respiratornog pigmenta, svega nekoliko toksikoloških studija se fokusiralo na ispitivanje hemoglobina hironomida (Ha i Choi, 2008; Choi, 2004), mada se njegova koncentracija, kao i ekspresija gena koji kodiraju njihovo formiranje, sve češće pominju kao potencijalni biomarkeri u ekotoksikološkim ispitivnjima (Lee i sar., 2006; Choi i sar., 2000). Fotometrijske metode za određivanje hemoglobina su veoma jednostavne i brze metode koje pokazuju izuzetno precizne rezultate (Yang i sar., 2013). U našem istraživanju analiza hemoglobina izvršena je pomoću automatizovanog hematološkog analizatora koja je prvi i jedini put primenjena u radu Stanković i sar., 2020. Podaci našeg istraživanja ukazuju na veliki potencijal

praćenja sadržaja hemoglobina hironomida u ekotoksikološkim studijama, pri čemu primenjena analiza hematološkim analizatorom može biti vrlo efikasna metoda za njegovo određivanje.

Kao što je u uvodu navedeno, poznato je da nanočestice mogu izazvati negativne posledice po fenotip i razvoj makroinvertebrata, koje se mogu lako kvalifikovati i kvantifikovati (Salmelin i sar., 2015; Dias i sar., 2008; Clarke, 1993; Lenat, 1993). Deformiteti hironomida, korišćeni su kao osetljivi indikatori stresa u mnogim studijama procene uticaja ljudskih aktivnosti na akvatične ekosisteme. Tačan uzrok i mehanizmi nastanka deformiteta nisu tačno utvrđeni, a smatra se da su regulisani velikim brojem faktora (Gagliardi, 2017). Međutim, pretpostavlja se da deformacije tokom ontogenije makroinvertebrata nastaju zbog poremećaja endokrine regulacije za vreme presvlačenja (Salmelin i sar., 2015; Meregalli i Ollivier, 2001); usled poremećaja ekspresije gena (Planello i sar., 2015) ili pak usled povećane sinteze proteina uslovljene povećanjem broja aktivnih nukleolusa u politenim hromozomima (što dovodi do povećane otpornosti na toksine, ali uzrokuje pojavu deformiteta) (Meregalli i sar., 2002).

De Bisthoven i sar., 2001, su sproveli multigeneracijski eksperiment na *C. riparius* jedinkama radi procene pojave deformiteta nakon izlaganja jedinki kadmijumu tokom 7 do 10 generacija. Pokazalo se da je kadmijum izazvao cepanje medijalnog zuba i deformitete na premandibulama, dok je kod larvi u kontroli došlo do velike pojave viška zuba na mentumima i mandibulama u odnosu na tretirane larve, sa velikom fluktuacijom u rezultatima kroz generacije. Kod tretmana sa povećanim brojem deformiteta beležen je i manji mortalitet narednih generacija, pa autori ističu da bi deformiteti mogli biti posledica adaptivnog kompromisa i ulaganja energije u preživljavanje u stresnim uslovima. Međutim, mnoge studije dovode u pitanje pouzdanost upotrebe deformacija hironomida kao biomarkera, pre svega zbog zabeležene visoke stope deformiteta u prirodnim populacijama (Langer-Jaesrich i sar., 2010), pa čak i u laboratorijskim populacijama (od 7% do 34%) i u kontrolama i u tretmanima (Janssens de Bisthoven i sar., 1998; Meregalli i Ollivier, 2001; Meregalli i sar., 2001). Slično ovome, u našem istraživanju deformisane jedinke uočavane su i u kontrolama i u tretmanima, međutim stope deformiteta su znatno niže od onih zabeleženih u literaturi (od 1,45% do maksimalno 6,36%). Visoka stopa deformiteta u dosadašnjim studijama može se objasniti nekontrolisanjem nekoliko važnih faktora u laboratorijskim bioesejima. Visoka stopa inbridinga u laboratorijskim populacijama može povećati pojavu malformacija (Vogt i sar., 2013), što se u ovom istraživanju izbeglo konstantnom obnovom laboratorijskih kultura novim jedinkama iz prirodnih populacija. Upotreba doza koje

izazivaju mortalitet (Gagliardi i sar., 2016), što se u ovom istraživanju izbeglo postavljanjem prvog bioeseja, za procenu letalnih efekata, na osnovi čijih rezultata su određivane doze za drugi bioesaj za procenu subletalnih efekata nanočestica. Sastav podloge može uticati na povećanu pojavu deformiteta (Bird, 1997; Meregalli i sar., 2001), zbog čega je u ovom istraživanju sproveden set preliminarnih eksperimenata, te je dalje korišćena podloga od kvarcnog peska fine granulacije bez prisustva potencijalnih organskih kontaminanata, kao što je predloženo i od strane Langer-Jaesrich i sar., 2010. Subjektivnost i neujednačenost analiza deformiteta može igrati važnu ulogu u pojavi kontrastnih rezultata ovakvih analiza (Salmelin i sar., 2015), kao i “pristrasnost publikovanja” u vidu tendencija objavljivanja pozitivnih rezultata zavisno od preovladavajućeg naučnog mišljenja (Gagliardi i sar., 2016). Istraživanja uticaja nano-TiO₂ (anatazne i rutilne izoforme) na deformitete hironomida grupe autora Tomilina i sar., 2015; 2020, pokazala su pozitivne rezultate, međutim praćen je samo procenat deformisanih struktura (u prvom radu je primećeno do 7% deformiteta u kontrolama a čak 46% u tretmanima). Naše analize pokazuju drugačije rezultate, u slučaju sve tri nanočestice nije bilo dovoljno deformisanih struktura za validnu statističku obradu, pri čemu se za neke od jedinki ne može sa sigurnošću tvrditi da li su malformacije na strukturama zaista deformiteti ili pak oštećenja nastala uticajem podloge ili čak tokom same pripreme preparata. Morfološke analize su, u mnogim disciplinama odavno prešle sa deskriptivnog (opis izgleda deformiteta) na kvantitativni način analize (Bookstein, 1998).

Iz navedenih razloga, po prvi put u dosadašnjoj literaturi izvršena je sveobuhvatna procena teratogenog efekta, uticaja nanočestica na morfološku varijabilnost hironomida putem precizne i ponovljive metode geometrijske morfometrije. Poslednjih godina, ova metoda predložena je kao pogodna za analizu fenotipskih karakteristika i detekciju finih morfoloških promena, pri čemu se, pre svega, izbegava subjektivnost analize (Arambourou i sar., 2012). Metod geometrijske morfometrije do sada je korišćen pre svega za rešavanje pitanja razlike vrsta i analize seksualnog dimorfizma (Lorenz i sar., 2017). U našem istraživanju, pre svega, potvrđeno je postojanje polnog dimorfizma i to u veličini i obliku krila kod *C. tentans* i *C. riparius* metodom geometrijske morfometrije, što predstavlja prvu analizu ovog tipa u dosadašnjoj literaturi. Dalje analize su pokazale značajan teratogeni uticaj na morfološke strukture jedinki koje se smatraju izuzetno uniformnim i nepromenljivim, zbog čega se i koriste u identifikaciji vrsta (Vallenduuk, 2017; Armitage i sar., 2012; Hein i Mahadeva, 1992). Najveći uticaj pokazao se na morfološke strukture larvi (neznatno više na mentume nego mandibule), ali i na strukture odraslih jedinki (pre svega na

krila ženki, a potom i mužjaka). Ovaj uticaj je lako kvalifikovan i kvantifikovan, a tačan izgled i pravac promena je vizuelizovan pomoću MorphoJ softvera (Klingenberg, 2011; Sheets, 2003; Rohlf, 2009; Ivanović i Kalezić, 2009) koji se pokazao izuzetnim alatom u proceni teratogenog dejstva nanočestica. Potencijal u korišćenju tradicionalne morfometrije u proceni uticaja nanočestica postoji, pri čemu treba ispitiati ovu metodu na većem broju uzoraka, kao i meriti samo one karaktere koji pokazuju značajno variranje pod uticajem sredinskog stresa. Tradicionalna morfometrija predstavlja i jednu od najstarijih principa analize u morfometriji (Ivanović i Kalezić, 2009) i kao takva nezamenjiva je u mnogim poljima istraživanja. Međutim, metod geometrijske morfometrije pokazao je najevidentnije rezultate u našem istraživanju. S obzirom na ostale prednosti ovog metoda (preciznost, uniformnost, mogućnost tačne vizuelizacije finih, teško uočljivih promena primenom kompjuterskih softvera) i najnovije preporuke naučne zajednice, pokazuje veliki potencijal za primenu u ekotoksikologiji i može značajno dopuniti ili čak u potpunosti zameniti metodu tradicionalne morfometrije.

Naši rezultati pokazuju da dejstvo nanočestica na morfologiju hironomida ispoljava i u odraslom stupnju (i to najviše kod tretmana sa nano-CeO₂, potom nano-Fe₃O₄ i najmanje kod tretmana nano-TiO₂), a uzork tome može biti dvojak: nanočestice ispljavaju efekte na stadijumu larve koji utiču na poremećaj razvića odraslih jedinki, ili pak odrasle jedinke u svojim telima zadržavaju nanočestice koje utiču na njih u ovom stupnju razvića, što može dovesti do potencijalnog među-ekosistemskog transfera nanočestica. U radu Bundschuh i sar., 2019, po prvi put je ispitan među-ekosistemski transfer nanočestica putem lanaca ishrane u protočnim mikrokozmmama. Potvrđeno je da jedinke trihoptera (*Chaetopteryx villosa*) prenose nano-TiO₂ (63 nm, u koncentraciji od 4 i 400 µg/l) i nano-zlato u svoje terestrične stadijume, uz to se pokazalo da ove nanoočestice dovode do odlaganja izletanja i smanjenja energetskih rezervi (merenih preko ukupne količine lipida) kod odraslih jedinki. Po najpesimističnijim procenama, pretpostavlja se da terestrični predatori koji se hrane akvatičnim organizmima (npr. slepi miševi) mogu da unesu čak tri puta veće količine nanočestica nego obično putem plena, pri čemu takav plen može biti niže nutritivne vrednosti, što može dovesti do negativnih posledica na meta-ekosistemskom nivou (Bundschuh i sar., 2019). Ovaj rad je ukazao na to da se nanočestice, koje dospevaju u akvatične iz terestričnih sredina, mogu ponovo vratiti u terestričnu sredinu putem makroinvertebrata koje u odraslom stadijumu izleću na površinu. Postoje velike šanse da i hironomide na sličan način prenose nanočestice iz larvalnog u odrasle stadijume, a ako se uzme u obzir njihova ogromna

biomasa (Armitage i sar, 1995; Shilova, 1976; Marier, 1951), mogu se očekivati posledice mnogo većih razmera.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da ne postoji velika opasnost od trenutno prisunih sredinskih koncentracija nano-CeO₂ i nano-Fe₃O₄, ali da nano-TiO₂ predstavljaju potencijalnu opasnost po bentosne organizme. Rezultati takođe ukazuju na to da uočene subletalne promene na hirnomidama, usled izlaganja svim trima nanočesticama, jesu značajne i da mogu potencijalno dovesti do promena na nivou organizama (promena metabolizma, načina ishrane i ponašanja), čime može doći do reperkusija još uvek neispitanih razmera. Mnoge studije predvidele su utrostručenje proizvodnje nanoproizvoda do 2020. godine, i ispuštanje velikog dela proizvedenih nanočestica u životnu sredinu (Lead i sar., 2018; Sun i sar., 2014), što ukazuje na neophodnost kontrola proizvodnje, distribucije i upotrebe, kao hitnog usavršavanja ekotoksikoloških ispitivanja njihovog delovanja. Nanotehnologija je nesumnjivo pomogla napredak i razvoj ljudske civilizacije, međutim postavlja se pitanje usklađivanja zahteva tržišta sa očuvanjem javnog zdravlja i zaštitom životne sredine. Uzimajući u obzir, kako dosadašnje studije, tako i rezultate istraživanja u okviru ove doktorske disertacije, međutim neophodno je istaći evidentnu potrebu standardizacije ekotoksikoloških ispitivanja nanočestica koja bi mogla osigurati uniformnost, preciznost i tačnost budućih ekotoksikoloških testova. Neophodno je izmeniti postojeće OECD protoko kako bi se prilagodili ispitivanju ovih specifičnih toksičnih agenasa (sa posebnim osvrtom na karakterizaciju čestica a potom i na dizajn eksperimenta, pripremu podloge i odabir adekvatnog model organizma i biomarkera). S obzirom na složene i još uvek nedovoljno ispitane karakteristike nanočestica oksida metala, multiparametarski pristup ispitivanjima je od izuzetne važnosti za adekvatnu procenu njihove ekotoksičnosti. Ovakav pristup bi omogućio bolje razumevanje uzročno-posledičnih veza između molekularnih i odgovora na višim nivoima biološke i ekološke organizacije, kao i odabir najadekvatnijih parametara i biomarkera za procenu uticaja ekotoksičnosti nanočestica. Usavršavanje metodologije testiranja može u mnogome poboljšati dalji monitoring stanja akvatičnih ekosistema i biomonitoring njegovog zagađenja nanočesticama, a samim tim i mogućnost rane purifikacije i remedijacije.

POGLAVLJE 6

Zaključci

Na osnovu predstavljenog istraživanja mogu se doneti sledeći zaključci:

1. Nanočestice oksida metala (nano-TiO₂, nano-CeO₂ i nano-Fe₃O₄) mogu imati negativno dejstvo na različitim nivoima biološke i ekološke organizacije u akvatičnim sredinama.
2. Za detaljnu karakterizaciju nanočestica upotreba savremenih analitičkih metoda (BET; XPS; XRD; TEM, SEM; AFM; EDX i DLS, kao i *in situ* karakterizacija pomoću EDX i SEM analize) pokazala se izuzetno efikasnim. Detaljna karakterizacija omogućava precizniju interpretaciju rezultata bioloških testova.
3. Karakterizacija svih nanočestica je pokazala visok stepen agregacije i sedimentacije i u tečnom medijumu (i vodi i etanolu) i u supstratu. Pri manjim koncentracijama čestice prave manje agregate i vezuju se za soli, dok pri višim koncentracijama agregati imaju veću tendenciju interakcije sa česticama samog SiO₂. Rezultati opravdavaju sumnju u taloženje oksida metala u akvatičnim sedimentima, a s obzirom na visok potencijal bioakumulacije od strane hironomida, ukazuju na opasnost daljeg trofičkog transfera i biomagnifikacije.
4. Podloga od kvarcnog peska pokazala je najadekvatnije rezultate (najniži uticaj na standardne i prametne morfološke varijabilnosti) i kao takva se može uključiti u standardne biološke testove.
5. ICP-MS analiza pouzdano kvantifikuje testirane nanočestice metala u model-organizmu i može se koristiti, a kao komplementarni pristup se može uključiti u standardne protokole OECD-a u cilju ispitivanja bioakumulacije nanočestica oksida metala. Sve tri nanočestice su pokazale visoku tendenciju akumulacije u telima larvi u korelaciji sa koncentracijama u sedimentu.
6. Vrste roda *Chironomus* pružaju mogućnost analize širokog spektra osetljivih biomarkera kojima se efikasno može detektovati uticaj nanočestica oksida metala u akvatičnoj sredini. Zbog navedenih karakteristika mogu biti adekvatni model-organizmi u laboratorijskim testovima toksičnosti.
7. Metod geometrijske morfometrije omogućio je objektivnu i preciznu detekciju efekta nanočestica oksida metala na morfološke strukture model-organizama. Raspored osetljivosti morfoloških struktura hironomida na nanozagađenje je sledeći (od najviše

- do najmanje osetljivih): mentum > mandibula > krila ženki > krila mužjaka. Biomonitoring zagađenja akvatičnih ekosistema putem praćenja uticaja nanočestica na morfološku varijabilnost hironomida može se sprovesti jedino ukoliko se ustanovi konceptualni okvir za analizu i poređenje rezultata.
8. Metod geometrijske morfometrije je potvrdio postojanje polnog dimorfizma u veličini i obliku krila kod *C. tentans* i *C. riaprius*: krila ženki su veća i šira, sa skraćenom bazom; dok su krila mužjaka uža, pre svega u centralnom regionu, sa izduženom bazom i radio-medijalnim nervom bližem distalnom obodu. Na ove razlike uticao je jedino tretman nano-CeO₂ u pravcu smanjenja razlika u veličini krila među polovima.
 9. Procena toksičnosti oksida metala u nanoformi ukazuje na visok ekotoksikološki potencijal i opravdava zabrinutost od posledica nanozagađenja akvatičnih sedimenata:
 - nano-TiO₂ ispoljava letalne efekte pri veoma visokim koncentracijama, a pri sredinski relevantnim koncentracijama utiče na varijabilnost morfoloških struktura hironomida. Sa povećanjem koncentracije nano-TiO₂ dolazi do sledećih morfoloških promena a) mentuma: sužavanja baze, izduživanja i izvijanja lateralnih zuba ka bočnim stranama; b) mandibula: skraćivanja ili čak potpunog gubitka prvog unutrašnjeg zuba; c) krila ženki: sužavanja u proksimalnom regionu;
 - nano-CeO₂ ne ispoljava letalne efekte ni pri ekstremno visokim koncentracijama, ali ispoljava subletalne efekte. Sa povećanjem koncentracije nano-CeO₂ dolazi do oštećenja DNK; remećenja polnog dimorfizma krila; morfoloških promena a) mentuma: širenja baze i izduživanja vrhova unutrašnjih lateralnih zuba, izduživanja svih zuba, povlačenja baze centralnog zuba i skupljanja čitavog središnjeg regiona; b) mandibula: proširenja baze, povlačenja prvog i drugog unutrašnjeg zuba ka bazi, izduživanja apikalnog zuba; c) krila ženki: izduživanja proksimalnog regiona uz povlačenje nerava i smanjenje celokupne veličine krila.
 - nano-Fe₃O₄ ne ispoljava letalne efekte ni pri ekstremno visokim koncentracijama, ali ispoljava značajne subletalne efekte. S povećanjem koncentracije nano-Fe₃O₄ dolazi do oštećenja DNK; pojave oksidativnog stresa (povišene nivoa TBRAS, AOPP i CAT); morfoloških promena a) mentuma: izduživanje zuba, povlačenje baze centralnog zuba, izduživanje vrhova unutrašnjih lateralnih zuba; b)

mandibula: zbijanje i povlačenje baza zuba, smanjenje prvog unutrašnjeg zuba i skraćanja apikalnog regiona; c) krila ženki: promene u kostalnom i subkostalnom nervu.

10. LOEC vrednosti su raspoređene u sledećem opadajućem nizu (prema najnižoj koncentraciji koja izaziva ozbiljne reakcije model-organizama): 25 mg/kg nano-CeO₂ (za pojavu genotoksičnosti); 50 mg/kg nano-Fe₃O₄ (za pojavu genotoksičnosti) i 500 mg/kg nano-TiO₂ (za značajno povećanje mortaliteta).
11. U cilju ispitivanja toksičnosti nanočestica oksida metala neophodno je prilagođavanje postojećih standardnih OECD smernica za testiranje hemijskih supstanci (pre svega testa 218 i 219), uz praćenje MAD i principa dobre laboratorijske prakse. Protokol prilagođen za analizu efekta nanočestica oksida metala treba da koristi multiparametarski pristup i sadrži sledeće elemente:
 - a. detaljna karakterizacija nanočestica savremenim analitičkim metodama;
 - b. model-organizam *Chironomus spp*; pri čemu se preporučuje pre svega upotreba *C. riparius*, a potom i *C. tentans*;
 - c. eksperimentalna podloga od sitnog kvarcnog peska (311 g peska fine granulacije sa preko 50% čestica veličine u rasponu od 0,05 do 0,2 mm) koja se pre upotrebe mora detaljno sterilisati (ispirati vodom, a potom inkubirati na 180° C u trajanju od 180 minuta);
 - d. analiza bioakumulacije ispitivanog agensa putem ICP-MS analize;
 - e. analiza standardnih biomarkera: mortalitet, preživljavanje, vreme, stopa i odlaganje razvića;
 - f. uvođenje analize savremenih biomarkera: oksidativnog stresa (AOPP, TBRAS i CAT izraženih preko količine proteina), DNK oštećenja (pomoću Kometa testa), procenta koncentracije hemoglobina (analizom hemolimfe) i promena morfološke varijabilnosti (pristupom geometrijske morfometrije putem MorphoJ softvera kojim se podaci mogu obraditi serijom statističkih analiza, a morfološke promene jednostavno vizuelizovati).

POGLAVLJE 7

Literatura

- Adams, W.J., Kimerle, R.A. and Barnett Jr, J.W., 1992. Sediment quality and aquatic life assessment. *Environmental science & technology*, 26(10), pp.1864-1875. DOI: <https://doi.org/10.1021/es00034a001>
- Aitken, R.J., Chaudhry, M.Q., Boxall, A.B.A. and Hull, M., 2006. Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. *Occupational medicine*, 56(5), pp.300-306. DOI: <https://doi.org/10.1093/occmed/kql051>
- Al-Shami, S.A., Salmah, M.R.C., Hassan, A.A. and Azizah, M.N.S., 2011. Evaluation of mentum deformities of *Chironomus spp.* (Chironomidae: Diptera) larvae using modified toxic score index (MTSI) to assess the environmental stress in Juru River Basin, Penang, Malaysia. *Environmental monitoring and assessment*, 177(1-4), pp.233-244. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10661-010-1630-1>
- Alvin, J.W., Erlichman, J.S. and Estevez, A.Y., 2011. Effects of cerium oxide nanoparticles on wild-type and superoxide dismutase deletion mutant strains of *Caenorhabditis elegans*. URL: https://www.fasebj.org/doi/abs/10.1096/fasebj.25.1_supplement.831.19
- Andreeva, L.I., Kozhemiakin, L.A. and Kishkun, A.A., 1988. Modification of the method of determining lipid peroxidation in a test using thiobarbituric acid. *Laboratornoe delo*, (11), p.41.
- Anderson, P.D. and D'Apollonia, S., 1978. Aquatic animals. *Principles of Ecotoxicology*. John Wiley & Sons, New York, pp.187-221. URL: <https://pdfs.semanticscholar.org/f5d3/51218448fcb7816fe32837bef0c4ec32e431.pdf>
- ANSES, 2019. AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif aux risques liés à l'ingestion de l'additif alimentaire E171. Maisons-Alfort. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. URL: <https://www.anses.fr/en/system/files/ERCA2019SA0036.pdf>
- Andersen, M.L. and Winter, L.M., 2019. Animal models in biological and biomedical research-experimental and ethical concerns. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170238>

- Antisari, L.V., Carbone, S., Gatti, A., Ferrando, S., Nacucchi, M., De Pascalis, F., Gambardella, C., Badalucco, L. and Laudicina, V.A., 2016. Effect of cobalt and silver nanoparticles and ions on *Lumbricus rubellus* health and on microbial community of earthworm faeces and soil. *Applied soil ecology*, 108, pp.62-71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.07.019>
- Arambourou, H., Beisel, J.N., Branchu, P. and Debat, V., 2012. Patterns of fluctuating asymmetry and shape variation in *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) exposed to nonylphenol or lead. *PloS one*, 7(11). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048844>
- Armitage, P.D., Pinder, L.C. and Cranston, P.S. eds., 2012. *The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges*. Springer Science & Business Media. URL: <https://books.google.rs/books?id=DHPyCAAQBAJ&lpg=PR10&ots=QU2QL6skRG&dq=Armitage%20Cranston%201995%20The%20chironomidae&lr&pg=PR10#v=onepage&q=Armitage%20Cranston%201995%20The%20chironomidae&f=false>
- Artells, E., Issartel, J., Auffan, M., Borschneck, D., Thill, A., Tella, M., Brousset, L., Rose, J., Bottero, J.Y. and Thiery, A., 2013. Exposure to cerium dioxide nanoparticles differently affect swimming performance and survival in two daphnid species. *PloS one*, 8(8). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071260>
- Auffan, M., Bertin, D., Chaurand, P., Pailles, C., Dominici, C., Rose, J., Bottero, J.Y. and Thiery, A., 2013. Role of molting on the biodistribution of CeO₂ nanoparticles within *Daphnia pulex*. *Water research*, 47(12), pp.3921-3930. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.063>
- Azonano. (2013, march 26). *Cerium (Ce) Nanoparticles - Properties, Applications*. Retrieved October 15, 2016, from <http://www.azonano.com/> : <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3275>
- Balbiani, E.G., 1881. Sur la structure du noyau des cellules salivaires chez les larves de *Chironomus*. *Zool. Anz*, 4(637-641), pp.662-667.

- Bamrungsap, S., Zhao, Z., Chen, T., Wang, L., Li, C., Fu, T. and Tan, W., 2012. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine*, 7(8), pp.1253-1271. DOI: <https://doi.org/10.2217/nnm.12.87>
- Barbehenn, R.V., 2002. Gut-based antioxidant enzymes in a polyphagous and a graminivorous grasshopper. *Journal of chemical ecology*, 28(7), pp.1329-1347. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1016288201110>
- Barhoumi, L., Oukarroum, A., Taher, L.B., Smiri, L.S., Abdelmelek, H. and Dewez, D., 2015. Effects of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on photosynthesis and growth of the aquatic plant *Lemna gibba*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 68(3), pp.510-520. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00244-014-0092-9>
- Barhoumi, L. and Dewez, D., 2013. Toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on green alga *Chlorella vulgaris*. *BioMed research international*, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/647974>
- Batac-Catalan, Z. and White, D.S., 1982. Creating and maintaining cultures of *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Entomological News*, 93, pp.54-58. URL: <https://biostor.org/pdfproxy.php?url=https%3A%2F%2Farchive.org%2Fdownload%2Fbiostor-77149%2Fbiostor-77149.pdf>
- Battin, T.J., Kammer, F.V., Weilhartner, A., Ottofuelling, S. and Hofmann, T., 2009. Nanostructured TiO₂: transport behavior and effects on aquatic microbial communities under environmental conditions. *Environmental science & technology*, 43(21), pp.8098-8104. DOI: <https://doi.org/10.1021/es9017046>
- Baun, A., Hartmann, N.B., Grieger, K. and Kusk, K.O., 2008. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. *Ecotoxicology*, 17(5), pp.387-395. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10646-008-0208-y>
- Bäuerlein, P.S., Emke, E., Tromp, P., Hofman, J.A., Carboni, A., Schooneman, F., de Voogt, P. and van Wezel, A.P., 2017. Is there evidence for man-made nanoparticles in the Dutch

- environment?. *Science of the Total Environment*, 576, pp.273-283. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.206>
- Bayat, N., Lopes, V.R., Schoelermann, J., Jensen, L.D. and Cristobal, S., 2015. Vascular toxicity of ultra-small TiO₂ nanoparticles and single walled carbon nanotubes in vitro and in vivo. *Biomaterials*, 63, pp.1-13. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.05.044>
- Belden, J.B. and Lydy, M.J., 2000. Impact of atrazine on organophosphate insecticide toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 19(9), pp.2266-2274. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5620190917>
- Beloqui, A., Solinís, M.Á., Rodríguez-Gascón, A., Almeida, A.J. and Préat, V., 2016. Nanostructured lipid carriers: promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(1), pp.143-161. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.09.004>
- Berggren, E., Amcoff, P., Benigni, R., Blackburn, K., Carney, E., Cronin, M., Deluyker, H., Gautier, F., Judson, R.S., Kass, G.E. and Keller, D., 2015. Chemical safety assessment using read-across: assessing the use of novel testing methods to strengthen the evidence base for decision making. *Environmental health perspectives*, 123(12), pp.1232-1240. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp.1409342>
- Bernabò, P., Gaglio, M., Bellamoli, F., Viero, G. and Lencioni, V., 2017. DNA damage and translational response during detoxification from copper exposure in a wild population of *Chironomus riparius*. *Chemosphere*, 173, pp.235-244. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.052>
- Bhatt, I. and Tripathi, B.N., 2011. Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment. *Chemosphere*, 82(3), pp.308-317. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.011>
- Bhushan, B., 2017. Introduction to nanotechnology. In *Springer handbook of nanotechnology* (pp. 1-19). Springer, Berlin, Heidelberg. URL: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-54357-3_1

- Bird, G.A., 1997. Deformities in cultured *Chironomus tentans* larvae and the influence of substrate on growth, survival and mentum wear. *Environmental Monitoring and Assessment*, 45(3), pp.273-283. URL: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1005782803930>
- Bird, G.A., Schwartz, W.J. and Joseph, D.L., 1995. The effect of ^{210}Pb and stable lead on the induction of menta deformities in *Chironomus tentans* larvae and on their growth and survival. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 14(12), pp.2125-2130. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5620141216>
- Bookstein, F.L., 1998. A hundred years of morphometrics. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 44(1-2), pp.7-59.
- Boxall, A.B., Chaudhry, Q., Ardern-Jones, A., Jefferson, B., Watts, C.D., Sinclair, C., Baxter-Jones, A.D., Aitken, R., Watts, C. and Chaudhry, Q., 2008. Current and future predicted environmental exposure to engineered nanoparticles. *Report by the Central Science Laboratory (CSL) York for the Department of the Environment and Rural Affairs (DEFRA)*, UK. URL: http://www.defra.gov.uk/science/Project_Data/DocumentLibrary/CB01098/CB01098_6270_FRP.pdf
- Bour, A., Mouchet, F., Cadarsi, S., Silvestre, J., Baqué, D., Gauthier, L. and Pinelli, E., 2017. CeO₂ nanoparticle fate in environmental conditions and toxicity on a freshwater predator species: a microcosm study. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(20), pp.17081-17089. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-017-9346-1>
- Bour, A., Mouchet, F., Cadarsi, S., Silvestre, J., Verneuil, L., Baqué, D., Chauvet, E., Bonzom, J.M., Pagnout, C., Clivot, H. and Fourquaux, I., 2016. Toxicity of CeO₂ nanoparticles on a freshwater experimental trophic chain: A study in environmentally relevant conditions through the use of mesocosms. *Nanotoxicology*, 10(2), pp.245-255. DOI: <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1053422>

- Bour, A., Mouchet, F., Silvestre, J., Gauthier, L. and Pinelli, E., 2015. Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: A review. *Journal of hazardous materials*, 283, pp.764-777. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.021>
- Bour, A., Mouchet, F., Verneuil, L., Evariste, L., Silvestre, J., Pinelli, E. and Gauthier, L., 2015a. Toxicity of CeO₂ nanoparticles at different trophic levels—effects on diatoms, chironomids and amphibians. *Chemosphere*, 120, pp.230-236. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.012>
- Bourgeault, A., Cousin, C., Geertsen, V., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., Durupthy, O., Chanéac, C. and Spalla, O., 2015. The challenge of studying TiO₂ nanoparticle bioaccumulation at environmental concentrations: crucial use of a stable isotope tracer. *Environmental science & technology*, 49(4), pp.2451-2459. DOI: <https://doi.org/10.1021/es504638f>
- Brabec, K., Janecek B.F.U., Rossaro B., Spies M., Bitusik P., Syrovatka V. & Schmidt-Kloiber, A.: Dataset "Chironomidae". www.freshwaterecology.info - the taxa and autecology database for freshwater organisms, version 7.0 (accessed on 07.05.2020). URL: www.freshwaterecology.info
- Brame, J.A. and Griggs, C.S., 2016. Surface area analysis using the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method: scientific operation procedure series: SOP-C. URL: <http://hdl.handle.net/11681/20339>
- Brunauer, S., Emmett, P.H. and Teller, E., 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American chemical society*, 60(2), pp.309-319. URL: <http://www.quimica.ufpb.br/arymaia/BET%201938.pdf>
- Brundin, L., 1966. Transantarctic relationship and their significance, as evidenced by chironomid midges. With a monograph of the subfamilies Podonominae and Aphroteniinae and the austral Heptagyiidae. K. *Svenska Vetensk Akad. Handl.*, 11, pp.1-472.
- Buchwalter, D.B. and Luoma, S.N., 2005. Differences in dissolved cadmium and zinc uptake among stream insects: mechanistic explanations. *Environmental science & technology*, 39(2), pp.498-504. DOI: <https://doi.org/10.1021/es0404421>

- Buchwalter, D.B., Sandahl, J.F., Jenkins, J.J. and Curtis, L.R., 2004. Roles of uptake, biotransformation, and target site sensitivity in determining the differential toxicity of chlorpyrifos to second to fourth instar *Chironomus riparius* (Meigen). *Aquatic toxicology*, 66(2), pp.149-157. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.08.004>
- Buffet, P.E., Richard, M., Caupos, F., Vergnoux, A., Perrein-Ettajani, H., Luna-Acosta, A., Akcha, F., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Guibbolini, M. and Risso-De Faverney, C., 2013. A mesocosm study of fate and effects of CuO nanoparticles on endobenthic species (*Scrobicularia plana*, *Hediste diversicolor*). *Environmental science & technology*, 47(3), pp.1620-1628. DOI: <https://doi.org/10.1021/es303513r>
- Bundschuh, M., Englert, D., Rosenfeldt, R.R., Bundschuh, R., Feckler, A., Lüderwald, S., Seitz, F., Zubrod, J.P. and Schulz, R., 2019. Nanoparticles transported from aquatic to terrestrial ecosystems via emerging aquatic insects compromise subsidy quality. *Scientific reports*, 9(1), pp.1-8. URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-52096-7>
- Bundschuh, M., Filser, J., Lüderwald, S., McKee, M.S., Metreveli, G., Schaumann, G.E., Schulz, R. and Wagner, S., 2018. Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to?. *Environmental Sciences Europe*, 30(1), pp.1-17. URL: <https://enveurope.springeropen.com/articles/10.1186/s12302-018-0132-6>
- Bundschuh, M., Seitz, F., Rosenfeldt, R.R. and Schulz, R., 2012. Titanium dioxide nanoparticles increase sensitivity in the next generation of the water flea *Daphnia magna*. *PLoS One*, 7(11). DOI: 10.1371/journal.pone.0048956
- Busacker, G., Anderson, D., Gibson, A. and Dillon, T., 1990. *Bioassessment Methodologies for the Regulatory Testing of Freshwater Dredged Material. Phase 2* (No. WES/MP/EL-90-7). ARMY ENGINEER WATERWAYS EXPERIMENT STATION VICKSBURG MS ENVIRONMENTAL LAB. URL: <https://apps.dtic.mil/dtic/tr/fulltext/u2/a221550.pdf>
- Butler, G.C. ed., 1978. *Principles of ecotoxicology*. Chichester, United Kingdom: Wiley.
- Buyukhatipoglu, K. and Clyne, A.M., 2011. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles change endothelial cell morphology and mechanics via reactive oxygen species formation.

- Journal of biomedical materials research* Part A, 96(1), pp.186-195. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32972>
- Calabrese, E.J. and Mattson, M.P., 2017. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine?. *NPJ aging and mechanisms of disease*, 3(1), pp.1-8. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41514-017-0013-z>
- Campos, B., Rivetti, C., Rosenkranz, P., Navas, J.M. and Barata, C., 2013. Effects of nanoparticles of TiO₂ on food depletion and life-history responses of *Daphnia magna*. *Aquatic toxicology*, 130, pp.174-183.
- Canesi, L., Ciacci, C., Vallotto, D., Gallo, G., Marcomini, A. and Pojana, G., 2010. *In vitro* effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO₂, SiO₂) on *Mytilus hemocytes*. *Aquatic Toxicology*, 96(2), pp.151-158. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.10.017>
- Cao, J., Feng, Y., Lin, X., Wang, J. and Xie, X., 2017. Iron oxide magnetic nanoparticles deteriorate the mutual interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and plant. *Journal of Soils and Sediments*, 17(3), pp.841-851. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11368-016-1561-8>
- Celardo, I., Traversa, E. and Ghibelli, L., 2011. Cerium oxide nanoparticles: a promise for applications in therapy. *J Exp Ther Oncol*, 9(1), pp.47-51. URL: https://www.researchgate.net/profile/Ivana_Celardo/publication/49792849_Cerium_oxide_nanoparticles_A_promise_for_applications_in_therapy/links/0deec518d2ba5d71f5000000/Cerium-oxide-nanoparticles-A-promise-for-applications-in-therapy.pdf
- Chandra, V., Park, J., Chun, Y., Lee, J.W., Hwang, I.C. and Kim, K.S., 2010. Water-dispersible magnetite-reduced graphene oxide composites for arsenic removal. *ACS nano*, 4(7), pp.3979-3986. DOI: <https://doi.org/10.1021/nn1008897>
- Chang, X., Zhang, Y., Tang, M. and Wang, B., 2013. Health effects of exposure to nano-TiO₂: a meta-analysis of experimental studies. *Nanoscale research letters*, 8(1), p.51. URL: <https://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-8-51>

- Chavali, M.S. and Nikolova, M.P., 2019. Metal oxide nanoparticles and their applications in nanotechnology. SN Applied Sciences, 1(6), p.607. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42452-019-0592-3>
- Chaki, S.H., Malek, T.J., Chaudhary, M.D., Tailor, J.P. and Deshpande, M.P., 2015. Magnetite Fe₃O₄ nanoparticles synthesis by wet chemical reduction and their characterization. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 6(3), p.035009. URL: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/2043-6262/6/3/035009/meta>
- Chen, P.J., Su, C.H., Tseng, C.Y., Tan, S.W. and Cheng, C.H., 2011. Toxicity assessments of nanoscale zerovalent iron and its oxidation products in medaka (*Oryzias latipes*) fish. *Marine pollution bulletin*, 63(5-12), pp.339-346. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.02.045>
- Choi, J., 2004. Biomarkers in environmental monitoring and its application in *Chironomus spp.* In *Ecological Issues in a Changing World* (pp. 203-215). Springer, Dordrecht. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2689-8_13
- Choi, J., Roche, H. and Caquet, T., 2000. Effects of physical (hypoxia, hyperoxia) and chemical (potassium dichromate, fenitrothion) stress on antioxidant enzyme activities in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) larvae: potential biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 19(2), pp.495-500. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5620190231>
- Choi, J., Roche, H. and Caquet, T., 1999. Characterization of superoxide dismutase activity in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) larvae - a potential biomarker. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 124(1), pp.73-81. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(99\)00045-6](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(99)00045-6)
- Christian, P., Von der Kammer, F., Baalousha, M. and Hofmann, T., 2008. Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology*, 17(5), pp.326-343. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10646-008-0213-1>

- Clarke, G.M., 1993. Fluctuating asymmetry of invertebrate populations as a biological indicator of environmental quality. *Environmental pollution*, 82(2), pp.207-211. DOI: [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(93\)90119-9](https://doi.org/10.1016/0269-7491(93)90119-9)
- Clemons, D., T., Kerr., H., R., Joos, A., 2019. 3.10 - Multifunctional Magnetic Nanoparticles: Design, Synthesis, and Biomedical Applications, Editor(s): David L. Andrews, Robert H. Lipson, Thomas Nann, in *Comprehensive Nanoscience and Nanotechnology (Second Edition)*, Academic Press, pp. 193-210, ISBN 9780128122969, DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10462-X>
- Clemente, Z., Castro, V.L., Jonsson, C.M. and Fraceto, L.F., 2014. Minimal levels of ultraviolet light enhance the toxicity of TiO₂ nanoparticles to two representative organisms of aquatic systems. *Journal of nanoparticle research*, 16(8), p.2559. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-014-2559-z>
- Clemente, Z., Castro, V.L., Feitosa, L.O., Lima, R., Jonsson, C.M., Maia, A.H.N. and Fraceto, L.F., 2013. Fish exposure to nano-TiO₂ under different experimental conditions: methodological aspects for nanoecotoxicology investigations. *Science of the total environment*, 463, pp.647-656. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.022>
- Clogston, J.D. and Patri, A.K., 2011. Zeta potential measurement. In *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 697 (pp. 63-70). Humana Press. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6
- Coll, C., Notter, D., Gottschalk, F., Sun, T., Som, C. and Nowack, B., 2016. Probabilistic environmental risk assessment of five nanomaterials (nano-TiO₂, nano-Ag, nano-ZnO, CNT, and fullerenes). *Nanotoxicology*, 10(4), pp.436-444. DOI: <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1073812>
- Collin, B., Auffan, M., Johnson, A.C., Kaur, I., Keller, A.A., Lazareva, A., Lead, J.R., Ma, X., Merrifield, R.C., Svendsen, C. and White, J.C., 2014. Environmental release, fate and ecotoxicological effects of manufactured ceria nanomaterials. *Environmental Science:*

- Nano*, 1(6), pp.533-548. URL:
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/EN/C4EN00149D#!divAbstract>
- Colvin, V.L., 2004. Sustainability for nanotechnology: making smaller safer and changing the way industry thinks in the process. *The Scientist*, 18(16), pp.26-28.
- Colvin, V.L., 2003. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature biotechnology*, 21(10), pp.1166-1170.
- Collins, A.R., 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular biotechnology*, 26(3), p.249. DOI: <http://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>
- Cornell, R.M. and Schwertmann, U., 2003. *The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses*. John Wiley & Sons. URL:
https://books.google.rs/books?hl=en&lr=&id=dIMuE3_klW4C&oi=fnd&pg=PA1&dq=iron+oxides&ots=l0oTThS1dI&sig=cr6Wji52h6uYOM1ZCbYzlYPSLzs&redir_esc=y#v=onepage&q=iron%20oxides&f=false
- Cotelle, S. and Férard, J.F., 1999. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environmental and molecular Mutagenesis*, 34(4), pp.246-255. DOI:
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1999\)34:4<246::AID-EM4>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1999)34:4<246::AID-EM4>3.0.CO;2-V)
- Couleau, N., Techer, D., Pagnout, C., Jomini, S., Foucaud, L., Laval-Gilly, P., Falla, J. and Bennasroune, A., 2012. Hemocyte responses of *Dreissena polymorpha* following a short-term in vivo exposure to titanium dioxide nanoparticles: preliminary investigations. *Science of the total environment*, 438, pp.490-497. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.095>
- Cummins, K.W., 1973. Trophic relations of aquatic insects. *Annual review of entomology*, 18(1), pp.183-206. URL:
<https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.en.18.010173.001151>
- Davis, J.C. 1977: Standardization and Protocols of Bioassays- Their Role and Significance for Monitoring, Research and Regulatory Usage. In Proceedings of the 3 rd Aquatic Toxicity Workshop, Halifax, Nova Scotia Nov. 2-3, 1976, Environment Canada, Tech. Report.

- Das, P., Williams, C.J., Fulthorpe, R.R., Hoque, M.E., Metcalfe, C.D. and Xenopoulos, M.A., 2012. Changes in bacterial community structure after exposure to silver nanoparticles in natural waters. *Environmental science & technology*, 46(16), pp.9120-9128. DOI: <https://doi.org/10.1021/es3019918>
- Datkhile, K.D., Mukhopadhyaya, R., Dongre, T.K. and Nath, B.B., 2009. Increased level of superoxide dismutase (SOD) activity in larvae of *Chironomus ramosus* (Diptera: Chironomidae) subjected to ionizing radiation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(4), pp.500-506. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.11.003>
- De Bisthoven, L.J., Gerhardt, A. and Soares, A.M., 2004. Effects of acid mine drainage on larval *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) measured with the multispecies freshwater Biomonitor®. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(5), pp.1123-1128. DOI: <https://doi.org/10.1897/02-603>
- De Bisthoven, L.J., Postma, J., Vermeulen, A., Goemans, G. and Ollevier, F., 2001. Morphological deformities in *Chironomus riparius* Meigen larvae after exposure to cadmium over several generations. *Water, Air, and Soil Pollution*, 129(1-4), pp.167-179. URL: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1010367524314>
- de Bisthoven, L.J., Postma, J.F., Parren, P., Timmermans, K.R. and Ollevier, F., 1998. Relations between heavy metals in aquatic sediments and in *Chironomus* larvae of Belgian lowland rivers and their morphological deformities. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55(3), pp.688-703. DOI: <https://doi.org/10.1139/f97-265>
- de Bisthoven, L. J., Huysmans, C., & Ollevier, F., 1996. The in situ relationships between sediment concentrations of micropollutants and morphological deformities in *Chironomus gr. thummi* larvae (Diptera, Chironomidae) from lowland rivers (Belgium): A spatial comparison. *Chironomids: From Genes to Ecosystems.*, 63-80.
- De Hoffmann, E., 2000. Mass spectrometry. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*.

- den Besten, P.J., & Munawar, M., 2016: *Ecotoxicological testing of marine and freshwater ecosystems: emerging techniques, trends and strategies*. CRC Press, Boca Raton. 297 p.
URL:
<https://books.google.rs/books?id=TnnLBQAAQBAJ&lpg=PP1&ots=qYRSHTwNG&lr&pg=PP1#v=onepage&q&f=false>
- Den Besten, P.J. and Tuk, C.W., 2000. Relation between responses in the neutral red retention test and the comet assay and life history parameters of *Daphnia magna*. *Marine environmental research*, 50(1-5), pp.513-516. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00129-X](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00129-X)
- Di Veroli, A., Santoro, F., Pallottini, M., Selvaggi, R., Scardazza, F., Cappelletti, D. and Goretti, E., 2014. Deformities of chironomid larvae and heavy metal pollution: from laboratory to field studies. *Chemosphere*, 112, pp.9-17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.053>
- Di Virgilio, A.L., Reigosa, M., Arnal, P.M. and De Mele, M.F.L., 2010. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Journal of hazardous materials*, 177(1-3), pp.711-718. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.089>
- Di Toro, D.M., Zarba, C.S., Hansen, D.J., Berry, W.J., Swartz, R.C., Cowan, C.E., Pavlou, S.P., Allen, H.E., Thomas, N.A. and Paquin, P.R., 1991. Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 10(12), pp.1541-1583. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5620101203>
- Dias, V., Vasseur, C. and Bonzom, J.M., 2008. Exposure of *Chironomus riparius* larvae to uranium: effects on survival, development time, growth, and mouthpart deformities. *Chemosphere*, 71(3), pp.574-581. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.09.029>
- Dickman, M. and Rygiel, G., 1996. Chironomid larval deformity frequencies, mortality, and diversity in heavy-metal contaminated sediments of a Canadian riverine wetland.

- Environment International*, 22(6), pp.693-703. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(96\)00060-8](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(96)00060-8)
- Dorier, M., Béal, D., Marie-Desvergne, C., Dubosson, M., Barreau, F., Houdeau, E., Herlin-Boime, N. and Carriere, M., 2017. Continuous in vitro exposure of intestinal epithelial cells to E171 food additive causes oxidative stress, inducing oxidation of DNA bases but no endoplasmic reticulum stress. *Nanotoxicology*, 11(6), pp.751-761. URL: <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1349203>
- Doudoroff, P., 1976. Keynote address—Reflections on pickle-jar ecology. In *Biological Monitoring of Water and Effluent Quality*. ASTM International. DOI: <https://doi.org/10.1520/STP27831S>
- Dowling, A.P., 2004. Development of nanotechnologies. *Materials Today*, 7(12), pp.30-35. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(04\)00628-5](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00628-5)
- Doyle, J.J., Ward, J.E. and Mason, R., 2015. An examination of the ingestion, bioaccumulation, and depuration of titanium dioxide nanoparticles by the blue mussel (*Mytilus edulis*) and the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Marine environmental research*, 110, pp.45-52. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.07.020>
- Duguet, E., Vasseur, S., Mornet, S. and Devoisselle, J.M., 2006. Magnetic nanoparticles and their applications in medicine. *Nanomedicine*, 1(2), pp.157-168. DOI: <https://doi.org/10.2217/17435889.1.2.157>
- ECETOC, European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals., 1996. Aquatic toxicity testing of sparingly soluble, volatile, and unstable substances.
- ECHA, 2017. Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment, Appendix R7-1 for nanomaterials applicable to Chapter R7a Endpoint specific guidance
- ECHA, 2008. Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Helsinki, Finland: European Chemicals Agency
- Edström, J.E. and Daneholt, B., 1967. Sedimentation properties of the newly synthesized RNA from isolated nuclear components of *Chironomus tentans* salivary gland cells. *Journal of*

- molecular biology*, 28(2), pp.331-343. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(67\)80013-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(67)80013-5)
- Ekrem, T., Stur, E. and Hebert, P.D., 2010. Females do count: Documenting Chironomidae (Diptera) species diversity using DNA barcoding. *Organisms Diversity & Evolution*, 10(5), pp.397-408. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13127-010-0034-y>
- Elsaesser, A., Taylor, A., de Yanés, G.S., McKerr, G., Kim, E.M., O'Hare, E. and Howard, C.V., 2010. Quantification of nanoparticle uptake by cells using microscopical and analytical techniques. *Nanomedicine*, 5(9), pp.1447-1457. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.06.014>
- Emsley, J., 2011. *Nature's building blocks: an AZ guide to the elements*. Oxford University Press. URL: [https://books.google.rs/books?hl=en&lr=&id=2EfYXzwPo3UC&oi=fnd&pg=PP2&dq=Emsley,+J.+\(2011\).+Nature%27s+Building+Blocks.+An+A-Z+Guide+to+the+Elements.+Oxford:+Oxford+University+Press.+doi:978-0-19-960563-7.&ots=qcxb9IFaUZ&sig=pAcAEKsB1vraUhbBux7yVBDZikI&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.rs/books?hl=en&lr=&id=2EfYXzwPo3UC&oi=fnd&pg=PP2&dq=Emsley,+J.+(2011).+Nature%27s+Building+Blocks.+An+A-Z+Guide+to+the+Elements.+Oxford:+Oxford+University+Press.+doi:978-0-19-960563-7.&ots=qcxb9IFaUZ&sig=pAcAEKsB1vraUhbBux7yVBDZikI&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- Ferrington, L.C., 2007. Global diversity of non-biting midges (Chironomidae; Insecta-Diptera) in freshwater. In *Freshwater animal diversity assessment* (pp. 447-455). Springer, Dordrecht. URL: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-8259-7_45
- Felton, G.W. and Summers, C.B., 1995. Antioxidant systems in insects. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 29(2), pp.187-197. DOI: <https://doi.org/10.1002/arch.940290208>
- Feng, L., Cao, M., Ma, X., Zhu, Y. and Hu, C., 2012. Superparamagnetic high-surface-area Fe₃O₄ nanoparticles as adsorbents for arsenic removal. *Journal of hazardous materials*, 217, pp.439-446. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.03.073>
- Feynman, R.P., 1960. There's plenty of room at the bottom. *California Institute of Technology, Engineering and Science magazine*. URL:

http://www.members.optusnet.com.au/frederickgreen3/resources/RF/Plenty_of_Room_1959.pdf

Filser, J., Arndt, D., Baumann, J., Geppert, M., Hackmann, S., Luther, E.M., Pade, C., Prenzel, K., Wigger, H., Arning, J. and Hohnholt, M.C., 2013. Intrinsically green iron oxide nanoparticles? From synthesis via (eco-) toxicology to scenario modelling. *Nanoscale*, 5(3), pp.1034-1046. URL:

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/nr/c2nr31652h/unauth#!divAbstract>

Fisheries, L.-I., 2020. Concept. Retrieved January, 2020, from <http://www.lake-lab.de/>: <http://www.lake-lab.de/index.php/concept.html>

Flohe, L., 1984. [10] Superoxide dismutase assays. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 93-104). Academic press. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05013-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05013-8)

Freitas Jr, R.A., 2005. What is nanomedicine?. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 1(1), pp.2-9.

Fu, G., Vary, P.S. and Lin, C.T., 2005. Anatase TiO₂ nanocomposites for antimicrobial coatings. *The journal of physical chemistry B*, 109(18), pp.8889-8898. URL: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp0502196>

Fujishima, A. and Honda, K., 1972. Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode. *nature*, 238(5358), pp.37-38 URL: <https://www.nature.com/articles/238037a0>

Gagliardi, B.S., 2017. *Differentiating pollutant-induced effects from non-contaminant stress responses in aquatic midges (Diptera: Chironomidae)* (Doctoral dissertation). URL: <https://minerva-access.unimelb.edu.au/handle/11343/193008>

Gagliardi, B.S., Pettigrove, V.J., Long, S.M. and Hoffmann, A.A., 2016. A meta-analysis evaluating the relationship between aquatic contaminants and chironomid larval deformities in laboratory studies. *Environmental science & technology*, 50(23), pp.12903-12911. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04020>

Galloway, T., Lewis, C., Dolciotti, I., Johnston, B.D., Moger, J. and Regoli, F., 2010. Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine

- polychaete. *Environmental Pollution*, 158(5), pp.1748-1755. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.11.013>
- Gambardella, C., Gallus, L., Gatti, A.M., Faimali, M., Carbone, S., Antisari, L.V., Falugi, C. and Ferrando, S., 2014. Toxicity and transfer of metal oxide nanoparticles from microalgae to sea urchin larvae. *Chemistry and Ecology*, 30(4), pp.308-316. DOI: <https://doi.org/10.1080/02757540.2013.873031>
- Gao, J., Gu, H. and Xu, B., 2009. Multifunctional magnetic nanoparticles: design, synthesis, and biomedical applications. *Accounts of chemical research*, 42(8), pp.1097-1107. DOI: <https://doi.org/10.1021/ar9000026>
- Garaud, M., Trapp, J., Devin, S., Cossu-Leguille, C., Pain-Devin, S., Felten, V. and Giamberini, L., 2015. Multibiomarker assessment of cerium dioxide nanoparticle (nCeO₂) sublethal effects on two freshwater invertebrates, *Dreissena polymorpha* and *Gammarus roeseli*. *Aquatic Toxicology*, 158, pp.63-74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.004>
- García, A., Espinosa, R., Delgado, L., Casals, E., González, E., Puentes, V., Barata, C., Font, X. and Sánchez, A., 2011. Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests. *Desalination*, 269(1-3), pp.136-141. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.10.052>
- Garner, K.L., Suh, S., Lenihan, H.S. and Keller, A.A., 2015. Species sensitivity distributions for engineered nanomaterials. *Environmental science & technology*, 49(9), pp.5753-5759. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00081>
- Gauss, J.D., Woods, P.E., Winner, R.W. and Skillings, J.H., 1985. Acute toxicity of copper to three life stages of *Chironomus tentans* as affected by water hardness-alkalinity. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, 37(2), pp.149-157. DOI: [https://doi.org/10.1016/0143-1471\(85\)90005-4](https://doi.org/10.1016/0143-1471(85)90005-4)
- Glišić, S.L., 2018. *Razvoj biokompleksa i nanočestica bioaktivnih metala stabilizovanih oligosaharidima* (Doctoral dissertation, Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet, Leskovac). URL: <http://nardus.mpn.gov.rs/handle/123456789/9588>

- Goharshadi, E.K., Samiee, S. and Nancarrow, P., 2011. Fabrication of cerium oxide nanoparticles: characterization and optical properties. *Journal of colloid and interface science*, 356(2), pp.473-480. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.01.063>
- Gomaa, I.O., Kader, M.H.A., Eldin, T.A.S. and Heikal, O.A., 2013. Evaluation of in vitro mutagenicity and genotoxicity of magnetite nanoparticles. *Drug discoveries & therapeutics*, 7(3), pp.116-123. DOI: <https://doi.org/10.5582/ddt.2013.v7.3.116>
- Goodman, B.A., 1994. Molecular spectroscopy: introduction and general principles. In *Clay Mineralogy: Spectroscopic and Chemical Determinative Methods* (pp. 1-10). Springer, Dordrecht. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-011-0727-3_1
- Gottardo, S., Alessandrelli, M., Amenta, V., Atluri, R., Barberio, G., Bekker, C., Bergonzo, P., Bleeker, E., Booth, A., Borges, T. and Buttol, P., 2017. *NANoREG framework for the safety assessment of nanomaterials*. European Commission Joint Research Centre. URL: <http://hdl.handle.net/11250/2480088>
- Gottschalk, F., Sun, T. and Nowack, B., 2013. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: review of modeling and analytical studies. *Environmental pollution*, 181, pp.287-300. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.06.003>
- Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W. and Nowack, B., 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environmental science & technology*, 43(24), pp.9216-9222. URL: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/es9015553>
- Griffitt, R.J., Luo, J., Gao, J., Bonzongo, J.C. and Barber, D.S., 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 27(9), pp.1972-1978. DOI: <https://doi.org/10.1897/08-002.1>
- Griscom, S.B., Fisher, N.S. and Luoma, S.N., 2000. Geochemical influences on assimilation of sediment-bound metals in clams and mussels. *Environmental Science & Technology*, 34(1), pp.91-99. DOI: <https://doi.org/10.1021/es981309+>

- Gulicovski, J.J., 2016. Svojstva i primena solova cerijum (IV) oksida sintetisanih postupkom forsirane hidrolize. *Универзитет у Београду*. DOI: <http://vinar.vin.bg.ac.rs/handle/123456789/7312>
- Günzler, H. and Williams, A., 2001. Handbook of analytical techniques. *Evolution*, WILEY-VCH Verlag GmbH, 1, pp.1-2. URL: http://sutlib2.sut.ac.th/sut_contents/64790_v2.pdf
- Gyori, B.M., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P.S., Hsu, D. and Clement, M.V., 2014. OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. *Redox biology*, 2, pp.457-465.
- Ha, M.H. and Choi, J., 2008. Effects of environmental contaminants on hemoglobin of larvae of aquatic midge, *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae): A potential biomarker for ecotoxicity monitoring. *Chemosphere*, 71(10), pp.1928-1936. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.01.018>
- Hackley, V.A. and Clogston, J.D., 2011. Measuring the hydrodynamic size of nanoparticles in aqueous media using batch-mode dynamic light scattering. In *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery* (pp. 35-52). Humana Press.
- Handy, R.D., van den Brink, N., Chappell, M., Mühling, M., Behra, R., Dušinská, M., Simpson, P., Ahtiainen, J., Jha, A.N., Seiter, J. and Bednar, A., 2012. Practical considerations for conducting ecotoxicity test methods with manufactured nanomaterials: what have we learnt so far?. *Ecotoxicology*, 21(4), pp.933-972. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10646-012-0862-y>
- Handy, R.D., Kammer, F.V., Lead, J.R., Hassello, M., Owen, R. and Crane, M., 2008. The toxicology and chemistry of the manufactured NPs. *Ecotoxicology*, 17, pp.287-314. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0199-8>
- Handy, R.D. and Shaw, B.J., 2007. Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology. *Health, Risk & Society*, 9(2), pp.125-144. DOI: <https://doi.org/10.1080/13698570701306807>

- Hansen, S.F., Sørensen, S.N., Skjolding, L.M., Hartmann, N.B. and Baun, A., 2017. Revising REACH guidance on information requirements and chemical safety assessment for engineered nanomaterials for aquatic ecotoxicity endpoints: recommendations from the EnvNano project. *Environmental Sciences Europe*, 29(1), p.14. URL: <https://enveurope.springeropen.com/articles/10.1186/s12302-017-0111-3>
- Hartmann, S., Louch, R., Zeumer, R., Steinhoff, B., Mozhayeva, D., Engelhard, C., Schönherr, H., Schlechtriem, C. and Witte, K., 2019. Comparative multi-generation study on long-term effects of pristine and wastewater-borne silver and titanium dioxide nanoparticles on key lifecycle parameters in *Daphnia magna*. *NanoImpact*, 14, p.100163. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.impact.2019.100163>
- Hashimoto, K., Irie, H. and Fujishima, A., 2005. TiO₂ photocatalysis: a historical overview and future prospects. *Japanese journal of applied physics*, 44(12R), p.8269. URL: <https://iopscience.iop.org/article/10.1143/JJAP.44.8269/meta>
- Haynes, V.N., Ward, J.E., Russell, B.J. and Agrios, A.G., 2017. Photocatalytic effects of titanium dioxide nanoparticles on aquatic organisms—Current knowledge and suggestions for future research. *Aquatic toxicology*, 185, pp.138-148. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.02.012>
- Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L. and Dewaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), pp.313-321. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hedrick, J.B., 1995. The global rare-earth cycle. *Journal of Alloys and Compounds*, 225(1-2), pp.609-618. DOI: [https://doi.org/10.1016/0925-8388\(94\)07134-9](https://doi.org/10.1016/0925-8388(94)07134-9)
- Hein, J. and Mahadeva, M.N., 1992. Rearing & Maintaining Midge Cultures (Chironomus Tentans) for Laboratory Studies. *The American Biology Teacher*, 54(4), pp.236-240. URL: <https://abt.ucpress.edu/content/ucpabt/54/4/236.full.pdf>
- Hellou, J., 2011. Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environmental Science and Pollution Research*, 18(1), pp.1-11. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-010-0367-2>

- Hendren, C.O., Badireddy, A.R., Casman, E. and Wiesner, M.R., 2013. Modeling nanomaterial fate in wastewater treatment: Monte Carlo simulation of silver nanoparticles (nano-Ag). *Science of the Total Environment*, 449, pp.418-425. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.078>
- Hermes-Lima, M. and Zenteno-Savín, T., 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 133(4), pp.537-556. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00080-7](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00080-7)
- Hill, I.R., 1993. *Guidance Document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments; from the "Workshop on Sediment Toxicity Assessment", Held at Slot Moermond Congressentrum, Renesse, the Netherlands, 8-10 November 1993*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Europe, SETAC.
- Hines, A., Staff, F.J., Widdows, J., Compton, R.M., Falciani, F. and Viant, M.R., 2010. Discovery of metabolic signatures for predicting whole organism toxicology. *Toxicological Sciences*, 115(2), pp.369-378. DOI: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq004>
- Hjorth, R., Skjolding, L.M., Sørensen, S.N. and Baun, A., 2017. Regulatory adequacy of aquatic ecotoxicity testing of nanomaterials. *NanoImpact*, 8, pp.28-37. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.07.003>
- Hjorth, R., 2016. Environmental risk assessment and management of engineered nanomaterials- The role of ecotoxicity testing. (Doctoral dissertation, Technical University of Denmark, DTU Environment) URL: <https://orbit.dtu.dk/en/publications/environmental-risk-assessment-and-management-of-engineered-nanoma>
- Hoecke, K.V., Quik, J.T., Mankiewicz-Boczek, J., Schamphelaere, K.A.D., Elsaesser, A., Meeren, P.V.D., Barnes, C., McKerr, G., Howard, C.V., Meent, D.V.D. and Rydzyński, K., 2009. Fate and effects of CeO₂ nanoparticles in aquatic ecotoxicity tests. *Environmental science & technology*, 43(12), pp.4537-4546. DOI: <https://doi.org/10.1021/es9002444>

Holden, P.A., Klaessig, F., Turco, R.F., Priester, J.H., Rico, C.M., Avila-Arias, H., Mortimer, M., Pacpaco, K. and Gardea-Torresdey, J.L., 2014. Evaluation of exposure concentrations used in assessing manufactured nanomaterial environmental hazards: are they relevant?. *Environmental science & technology*, 48(18), pp.10541-10551. DOI: <https://doi.org/10.1021/es502440s>

Hornyak, G.L., Dutta, J., Tibbals, H.F. and Rao, A., 2008. *Introduction to nanoscience*. CRC press. URL: <https://books.google.rs/books?id=zvrLBQAAQBAJ&lpg=PP1&ots=8UvTnDPJol&lr&pg=PR3#v=onepage&q&f=false>

Hornyak, G.L., Moore, J.J., Tibbals, H.F. and Dutta, J., 2018. *Fundamentals of nanotechnology*. CRC press. URL: https://books.google.rs/books?id=mf7KBQAAQBAJ&lpg=PP1&ots=hTzbRXtv_i&dq=Hornyak%20NANOTECHNOLOGY&lr&pg=PA5#v=onepage&q=Hornyak%20NANOTECHNOLOGY&f=false

Huang, J.T., Chan, S.H. and Hou, S.Y., 2008. Studies on the Photokilling of E. coli with TiO₂ Nanoparticles by Using Gel Electrophoresis Technology. *淡江理工學刊*, 11(2), pp.139-144.

Hund-Rinke, K., Baun, A., Cupi, D., Fernandes, T.F., Handy, R., Kinross, J.H., Navas, J.M., Peijnenburg, W., Schlich, K., Shaw, B.J. and Scott-Fordsmand, J.J., 2016. Regulatory ecotoxicity testing of nanomaterials—proposed modifications of OECD test guidelines based on laboratory experience with silver and titanium dioxide nanoparticles. *Nanotoxicology*, 10(10), pp.1442-1447. DOI: <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1229517>

Hurtado-Gallego, J., Pulido-Reyes, G., González-Pleiter, M., Salas, G., Leganés, F., Rosal, R. and Fernández-Piñas, F., 2020. Toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles to the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere*, 238, p.124562. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124562>

IBM Corp. Released 2010. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.

Ingersoll, C.G., 1995. *Sediment tests. Fundamentals of aquatic toxicology*, 2, pp.231-255.

Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Benoit, D.A., Norberg-King, T.J., Burton, G.A., Hoke, R.A., Landrum, P.F. and Winger, P.V., 1995. Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 14(11), pp.1885-1894. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5620141110>

Ingersoll, C.G. and Nelson, U.M., 1990. Testing sediment toxicity with *Hyalella azteca* (Amphipoda) and *Chironomus riparius* (Diptera). In *Aquatic toxicology and risk assessment: Thirteenth volume*. ASTM International. DOI: <https://doi.org/10.1520/STP20101S>

ISO13321, I.S., 1996. Methods for determination of particle size distribution part 8: Photon correlation spectroscopy. *International Organisation for Standardisation (ISO)*.

Ivanović, A., Kalezić, M. 2009. "Evoluciona morfologija - teorijske postavke i geometrijska morfometrija", Biološki fakultet Beograd, Str 216, ISBN: 978-86-7078-055-2, COBISS. SR-ID 157935116

Jacobasch, C., Völker, C., Giebner, S., Völker, J., Alsenz, H., Potouridis, T., Heidenreich, H., Kayser, G., Oehlmann, J. and Oetken, M., 2014. Long-term effects of nanoscaled titanium dioxide on the cladoceran *Daphnia magna* over six generations. *Environmental Pollution*, 186, pp.180-186. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.12.008>

Janecek, B.F.U., Moog, O., Moritz, C., Orendt, C. & Saxl, R., 2002. Chironomidae In: Moog, O. (Ed.): *Fauna Aquatica Austriaca, Lieferung 2002*. Wasserwirtschaftskataster, Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft, Wien.

- Janecek, B.F.U., Moog, O., Moritz, C., Orendt, C. & Saxl, R., 1995. Chironomidae In: Moog, O. (Ed.): *Fauna Aquatica Austriaca, Lieferung 1995*. Wasserwirtschaftskataster, Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Wien
- Jemec, A., Kos, M., Drobne, D., Koponen, I.K., Vukić, J., Ferreira, N.G., Loureiro, S. and McShane, H.V., 2016. In field conditions, commercial pigment grade TiO₂ was not harmful to terrestrial isopods but reduced leaf litter fragmentation. *Science of The Total Environment*, 571, pp.1128-1135. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.107>
- Jeppe, K.J., Carew, M.E., Long, S.M., Lee, S.F., Pettigrove, V. and Hoffmann, A.A., 2014. Genes involved in cysteine metabolism of *Chironomus tepperi* are regulated differently by copper and by cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 162, pp.1-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.02.006>
- Jin, C.Y., Zhu, B.S., Wang, X.F. and Lu, Q.H., 2008. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chemical research in toxicology*, 21(9), pp.1871-1877. DOI: <https://doi.org/10.1021/tx800179f>
- Jovanović, B., Bezirci, G., Çağan, A.S., Coppens, J., Levi, E.E., Oluz, Z., Tuncel, E., Duran, H. and Beklioğlu, M., 2016a. Food web effects of titanium dioxide nanoparticles in an outdoor freshwater mesocosm experiment. *Nanotoxicology*, 10(7), pp.902-912. DOI: <https://doi.org/10.3109/17435390.2016.1140242>
- Jovanović, B., Milošević, D., Piperac, M.S. and Savić, A., 2016b. *In situ* effects of titanium dioxide nanoparticles on community structure of freshwater benthic macroinvertebrates. *Environmental Pollution*, 213, pp.278-282. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.02.024>
- Jovanović, B., 2015. Critical review of public health regulations of titanium dioxide, a human food additive. *Integrated environmental assessment and management*, 11(1), pp.10-20. DOI: <https://doi.org/10.1002/ieam.1571>
- Jun, Y.W., Seo, J.W. and Cheon, J., 2008. Nanoscaling laws of magnetic nanoparticles and their applicabilities in biomedical sciences. *Accounts of chemical research*, 41(2), pp.179-189.

- Kallay, N., Preočanin, T., Kovačević, D., Lützenkirchen, J. and Chibowski, E., 2010. Electrostatic potentials at solid/liquid interfaces. *Croatica chemica acta*, 83(3), pp.357-370.
- Karadžić, B. and Marinković, S., 2009. Kvantitativna ekologija. *Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"*, Beograd, pp.1-489.
- Kalčíková, G., Englert, D., Rosenfeldt, R.R., Seitz, F., Schulz, R. and Bundschuh, M., 2014. Combined effect of UV-irradiation and TiO₂-nanoparticles on the predator–prey interaction of gammarids and mayfly nymphs. *Environmental Pollution*, 186, pp.136-140. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.11.028>
- Kaweeterawat, C., Chang, C.H., Roy, K.R., Liu, R., Li, R., Toso, D., Fischer, H., Ivask, A., Ji, Z., Zink, J.I. and Zhou, Z.H., 2015. Cu nanoparticles have different impacts in *Escherichia coli* and *Lactobacillus brevis* than their micro-sized and ionic analogues. *ACS nano*, 9(7), pp.7215-7225. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b02021>
- Kaya, H., Aydın, F., Gürkan, M., Yılmaz, S., Ates, M., Demir, V. and Arslan, Z., 2016. A comparative toxicity study between small and large size zinc oxide nanoparticles in tilapia (*Oreochromis niloticus*): Organ pathologies, osmoregulatory responses and immunological parameters. *Chemosphere*, 144, pp.571-582. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.024>
- Keller, A.A., McFerran, S., Lazareva, A. and Suh, S., 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of nanoparticle research*, 15(6), p.1692. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-013-1692-4>
- Keller, A.A., Wang, H., Zhou, D., Lenihan, H.S., Cherr, G., Cardinale, B.J., Miller, R. and Ji, Z., 2010. Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. *Environmental science & technology*, 44(6), pp.1962-1967. DOI: <https://doi.org/10.1021/es902987d>
- Kendall, D.G., 1977. The diffusion of shape. *Advances in applied probability*, 9(3), pp.428-430. DOI: <https://doi.org/10.2307/1426091>

- Kim, J., Lee, S., Kim, C.M., Seo, J., Park, Y., Kwon, D., Lee, S.H., Yoon, T.H. and Choi, K., 2014. Non-monotonic concentration–response relationship of TiO₂ nanoparticles in freshwater cladocerans under environmentally relevant UV-A light. *Ecotoxicology and environmental safety*, 101, pp.240-247. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.01.002>
- Kim, J.E., Shin, J.Y. and Cho, M.H., 2012. Magnetic nanoparticles: an update of application for drug delivery and possible toxic effects. *Archives of toxicology*, 86(5), pp.685-700. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-011-0773-3>
- Klaine, S.J., Koelmans, A.A., Horne, N., Carley, S., Handy, R.D., Kapustka, L., Nowack, B. and von der Kammer, F., 2012. Paradigms to assess the environmental impact of manufactured nanomaterials. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(1), pp.3-14. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.733>
- Klingenberg, C. P., 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* 11: 353-357. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x>
- Klingenberg, C.P., 2015. Analyzing fluctuating asymmetry with geometric morphometrics: concepts, methods, and applications. *Symmetry*, 7(2), pp.843-934. DOI: <https://doi.org/10.3390/sym7020843>
- Klingenberg, C.P., Barluenga, M. and Meyer, A., 2002. Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution*, 56(10), pp.1909-1920. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb00117.x>
- Klingenberg, C.P. and Monteiro, L.R., 2005. Distances and directions in multidimensional shape spaces: implications for morphometric applications. *Systematic Biology*, 54(4), pp.678-688. <https://doi.org/10.1080/10635150590947258>
- Koehle-Divo, V., Cossu-Leguille, C., Pain-Devin, S., Simonin, C., Bertrand, C., Sohm, B., Mouneyrac, C., Devin, S. and Giambérini, L., 2018. Genotoxicity and physiological effects of CeO₂ NPs on a freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*). *Aquatic Toxicology*, 198, pp.141-148. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.020>

- Kosyan, D.B., Rusakova, E.A., Sizova, E.A., Yausheva, E.V. and Miroshnikov, S.A., 2016. Toxic effect and mechanisms of nanoparticles on freshwater infusoria. *International Journal of GEOMATE*, 11(1), p.2170. URL: <https://geomatejournal.com/sites/default/files/articles/2170-2176-1156-Kosyan-July-2016-c1.pdf>
- Könczöl, M., Ebeling, S., Goldenberg, E., Treude, F., Gminski, R., Gieré, R., Grobéty, B., Rothen-Rutishauser, B., Merfort, I. and Mersch-Sundermann, V., 2011. Cytotoxicity and genotoxicity of size-fractionated iron oxide (magnetite) in A549 human lung epithelial cells: role of ROS, JNK, and NF- κ B. *Chemical Research in Toxicology*, 24(9), pp.1460-1475. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/tx200051s>
- Kwon, J.T., Hwang, S.K., Jin, H., Kim, D.S., Minai-Tehrani, A., Yoon, H.J., Choi, M., Yoon, T.J., Han, D.Y., Kang, Y.W. and Yoon, B.I., 2008. Body distribution of inhaled fluorescent magnetic nanoparticles in the mice. *Journal of occupational health*, 50(1), pp.1-6. DOI: <https://doi.org/10.1539/joh.50.1>
- Lacaze, E., Geffard, O., Bony, S. and Devaux, A., 2010. Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 700(1-2), pp.32-38. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.04.025>
- Laini, A., Bolpagni, R., Cancellario, T., Guareschi, S., Racchetti, E. and Viaroli, P., 2018. Testing the response of macroinvertebrate communities and biomonitoring indices under multiple stressors in a lowland regulated river. *Ecological Indicators*, 90, pp.47-53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.02.051>
- Lang, C., Schüler, D. and Faivre, D., 2007. Synthesis of magnetite nanoparticles for bio-and nanotechnology: genetic engineering and biomimetics of bacterial magnetosomes. *Macromolecular bioscience*, 7(2), pp.144-151. DOI: <https://doi.org/10.1002/mabi.200600235>
- Langer-Jaesrich, M., Köhler, H.R. and Gerhardt, A., 2010. Can mouth part deformities of *Chironomus riparius* serve as indicators for water and sediment pollution? A laboratory

- approach. *Journal of soils and sediments*, 10(3), pp.414-422. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11368-010-0195-5>
- Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L. and Muller, R.N., 2008. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical reviews*, 108(6), pp.2064-2110. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr068445e>
- Lead, J.R., Batley, G.E., Alvarez, P.J., Croteau, M.N., Handy, R.D., McLaughlin, M.J., Judy, J.D. and Schirmer, K., 2018. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects—an updated review. *Environmental toxicology and chemistry*, 37(8), pp.2029-2063. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.4147>
- Lead, J.R. and Wilkinson, K.J., 2006. Aquatic colloids and nanoparticles: current knowledge and future trends. *Environmental Chemistry*, 3(3), pp.159-171. DOI: <https://doi.org/10.1071/EN06025>
- Lee, S.W., Kim, S.M. and Choi, J., 2009. Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure. *Environmental toxicology and pharmacology*, 28(1), pp.86-91. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.03.001>
- Lee, S.B. and Choi, J., 2007. Effects of bisphenol A and ethynyl estradiol exposure on enzyme activities, growth and development in the fourth instar larvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 68(1), pp.84-90. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.07.003>
- Lee, S.M., Lee, S.B., Park, C.H. and Choi, J., 2006. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: a potential biomarker of freshwater monitoring. *Chemosphere*, 65(6), pp.1074-1081. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.02.042>

- León Muez, D., Peñalver Duque, P., Juan, M., Fuentes, F., Gallego, I. and Toja Santillana, J., 2010. Zooplankton richness in farm ponds of Andalusia (southern Spain) a comparison with natural wetlands. *Limnética*, 29 (1), 153-162. URL: <http://hdl.handle.net/11441/60723>
- Li, N., Hao, M., Phalen, R.F., Hinds, W.C. and Nel, A.E., 2003. Particulate air pollutants and asthma: a paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clinical immunology*, 109(3), pp.250-265. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2003.08.006>
- Limbach, L.K., Bereiter, R., Müller, E., Krebs, R., Gälli, R. and Stark, W.J., 2008. Removal of oxide nanoparticles in a model wastewater treatment plant: influence of agglomeration and surfactants on clearing efficiency. *Environmental science & technology*, 42(15), pp.5828-5833. DOI: <https://doi.org/10.1021/es800091f>
- Liu, G., Gao, J., Ai, H. and Chen, X., 2013. Applications and potential toxicity of magnetic iron oxide nanoparticles. *Small*, 9(9-10), pp.1533-1545. DOI: <https://doi.org/10.1002/sml.201201531>
- Liu, W.T., 2006. Nanoparticles and their biological and environmental applications. *Journal of bioscience and bioengineering*, 102(1), pp.1-7. DOI: <https://doi.org/10.1263/jbb.102.1>
- Llaneza, V., Rodea-Palomares, I., Zhou, Z., Rosal, R., Fernández-Pina, F. and Bonzongo, J.C.J., 2016. Polyvinylpyrrolidone and arsenic-induced changes in biological responses of model aquatic organisms exposed to iron-based nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 18(8), p.235. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-016-3541-8>
- Long, S.M., Tull, D.L., Jeppe, K.J., De Souza, D.P., Dayalan, S., Pettigrove, V.J., McConville, M.J. and Hoffmann, A.A., 2015. A multi-platform metabolomics approach demonstrates changes in energy metabolism and the transsulfuration pathway in *Chironomus tepperi* following exposure to zinc. *Aquatic toxicology*, 162, pp.54-65. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.009>

- Lorenz, C., Almeida, F., Almeida-Lopes, F., Louise, C., Pereira, S.N., Petersen, V., Vidal, P.O., Virginio, F. and Suesdek, L., 2017. Geometric morphometrics in mosquitoes: What has been measured?. *Infection, Genetics and Evolution*, 54, pp.205-215. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.029>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, pp.265-275. URL: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19511404458>
- Lu, W., Shen, Y., Xie, A. and Zhang, W., 2010. Green synthesis and characterization of superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 322(13), pp.1828-1833. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2009.12.035>
- Lüderwald, S., Schell, T., Newton, K., Salau, R., Seitz, F., Rosenfeldt, R.R., Dackermann, V., Metreveli, G., Schulz, R. and Bundschuh, M., 2019. Exposure pathway dependent effects of titanium dioxide and silver nanoparticles on the benthic amphipod *Gammarus fossarum*. *Aquatic toxicology*, 212, pp.47-53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.04.016>
- Lyman, W.J., Glazer, A.E., Ong, J.H. and Coons, S.F., 1987. *Overview of sediment quality in the United States. Final report* (No. PB-88-251384/XAB). Little (Arthur D.), Inc., Cambridge, MA (USA). URL: <https://www.osti.gov/biblio/6880008>
- Ma, H., Brennan, A. and Diamond, S.A., 2012. Phototoxicity of TiO₂ nanoparticles under solar radiation to two aquatic species: *Daphnia magna* and Japanese medaka. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(7), pp.1621-1629. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.1858>
- Mac, M.J., Edsall, C.C., Hesselberg, R.J. and Sayers Jr, R.E., 1984. *Flow-through bioassay for measuring bioaccumulation of toxic substances from sediment* (No. EPA-905/3-84-007). US Environmental Protection Agency. URL: <https://pubs.er.usgs.gov/publication/70006428>
- Madden, A.S., Hochella Jr, M.F. and Luxton, T.P., 2006. Insights for size-dependent reactivity of hematite nanomineral surfaces through Cu²⁺ sorption. *Geochimica et cosmochimica acta*, 70(16), pp.4095-4104. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gca.2006.06.1366>

- Manier, N., Garaud, M., Delalain, P., Aguerre-Chariol, O. and Pandard, P., 2011. Behaviour of ceria nanoparticles in standardized test media—influence on the results of ecotoxicological tests. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 304, No. 1, p. 012058). IOP Publishing. URL: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/304/1/012058/pdf>
- Mahaye, N., Thwala, M., Cowan, D.A. and Musee, N., 2017. Genotoxicity of metal based engineered nanoparticles in aquatic organisms: A review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 773, pp.134-160. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.05.004>
- Mahmoudi, M., Simchi, A., Milani, A.S. and Stroeve, P., 2009. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*, 336(2), pp.510-518. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.04.046>
- Masayasu, M. and Hiroshi, Y., 1979. A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. *Clinica Chimica Acta*, 92(3), pp.337-342. DOI: [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(79\)90211-0](https://doi.org/10.1016/0009-8981(79)90211-0)
- Markert, B., Wünschmann, S. and Baltrėnaitė, E., 2012. Innovative observation of the environment. Bioindicators and biomonitors: definitions, strategies and applications. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, 20(3), pp.221-239. DOI: <https://doi.org/10.3846/16486897.2011.633338>
- Markert, B.A., Breure, A.M. and Zechmeister, H.G. eds., 2003. *Bioindicators and biomonitors*. Elsevier. URL: <https://www.sciencedirect.com/bookseries/trace-metals-and-other-contaminants-in-the-environment/vol/6?page-size=100&page=1>
- Markert, B., Kayser, G., Korhammer, S. and Oehlmann, J., 2000. Distribution and effects of trace substances in soils, plants and animals. In *Trace Metals in the Environment* (Vol. 4, pp. 3-31). Elsevier. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0927-5215\(00\)80004-1](https://doi.org/10.1016/S0927-5215(00)80004-1)
- Markus, A.A., Parsons, J.R., Roex, E.W.M., De Voogt, P. and Laane, R.W.P.M., 2016. Modelling the transport of engineered metallic nanoparticles in the river Rhine. *Water research*, 91, pp.214-224. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.01.003>

- Mardia, K.V., Bookstein, F.L. and Moreton, I.J., 2000. Statistical assessment of bilateral symmetry of shapes. *Biometrika*, pp.285-300.
- Martinez, E.A., Moore, B.C., Schaumloffel, J. and Dasgupta, N., 2002. The potential association between menta deformities and trace elements in Chironomidae (Diptera) taken from a heavy metal contaminated river. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42(3), pp.286-291. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00244-001-0190-0>
- Matei, E., Predescu, A.M., Coman, G., Balanescu, M., Sohaciu, M., Predescu, C., Favier, L. and Niculescu, M., 2016. Magnetic nanoparticles used in environmental engineering for pb and zn removal. *Environmental Engineering and Management Journal*, 15(5), pp.1019-1025. URL: <https://hal-univ-rennes1.archives-ouvertes.fr/hal-01381126/>
- Maynard, A.D. and Aitken, R.J., 2007. Assessing exposure to airborne nanomaterials: current abilities and future requirements. *Nanotoxicology*, 1(1), pp.26-41. DOI: <https://doi.org/10.1080/17435390701314720>
- McAlpine, J.F., 1981. Morphology and terminology-adults. *Manual of nearctic Diptera*, 1, pp.9-63. URL: <http://drawwing.org/insect/chironomidae-wing>
- McArthur, S.L., Mishra, G. and Easton, C.D., 2014. Applications of XPS in biology and biointerface analysis. In *Surface analysis and techniques in biology* (pp. 9-36). Springer, Cham. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-01360-2_2
- McKee, M.S. and Filser, J., 2016. Impacts of metal-based engineered nanomaterials on soil communities. *Environmental Science: Nano*, 3(3), pp.506-533. DOI: <https://doi.org/10.1039/C6EN00007J>
- Meesters, J.A., Quik, J.T.K., Koelmans, A.A., Hendriks, A.J. and Van de Meent, D., 2016. Multimedia environmental fate and speciation of engineered nanoparticles: a probabilistic modeling approach. *Environmental Science: Nano*, 3(4), pp.715-727.
- Meesters, J.A., Koelmans, A.A., Quik, J.T., Hendriks, A.J. and van de Meent, D., 2014. Multimedia modeling of engineered nanoparticles with SimpleBox4nano: model

- definition and evaluation. *Environmental science & technology*, 48(10), pp.5726-5736. URL: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es500548h>
- Meregalli, G., Bettinetti, R., Pluymers, L., Vermeulen, A.C., Rossaro, B. and Ollevier, F., 2002. Mouthpart deformities and nucleolus activity in field-collected *Chironomus riparius* larvae. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 42(4), pp.405-409. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-001-0040-3>
- Meregalli, G. and Ollevier, F., 2001. Exposure of *Chironomus riparius* larvae to 17 α -ethynylestradiol: effects on survival and mouthpart deformities. *Science of the total environment*, 269(1-3), pp.157-161. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00824-X](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00824-X)
- MESOAQUA, 2009. Network of leading MESOCosm facilities to advance the studies of future AQUATIC ecosystems from the Arctic to the Mediterranean. Retrieved October 16, 2016, from www.mesocosm.eu: <http://www.mesocosm.eu/>
- Michels, C., Perazzoli, S. and Soares, H.M., 2017. Inhibition of an enriched culture of ammonia oxidizing bacteria by two different nanoparticles: silver and magnetite. *Science of The Total Environment*, 586, pp.995-1002. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.080>
- Milani, Z.M., Charbgo, F. and Darroudi, M., 2017. Impact of physicochemical properties of cerium oxide nanoparticles on their toxicity effects. *Ceramics International*, 43(17), pp.14572-14581. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.08.177>
- Milošević, D., Simić, V., Stojković, M., Čerba, D., Mančev, D., Petrović, A. and Paunović, M., 2013. Spatio-temporal pattern of the Chironomidae community: toward the use of non-biting midges in bioassessment programs. *Aquatic Ecology*, 47(1), pp.37-55. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10452-012-9423-y>
- Mitteroecker, P. and Gunz, P., 2009. Advances in geometric morphometrics. *Evolutionary Biology*, 36(2), pp.235-247. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11692-009-9055-x>

- Mitchell, E.J., Burgess, J.E. and Stuetz, R.M., 2002. Developments in ecotoxicity testing. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1(2), pp.169-198.
- Miyaji, C.K., Jordão, B.Q., Ribeiro, L.R., Eira, A.F.D. and Cólus, I.M.S., 2004. Genotoxicity and antigenotoxicity assessment of shiitake (*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler) using the Comet assay. *Genetics and Molecular Biology*, 27(1), pp.108-114. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-47572004000100018>
- Mohan, A.C. and Renjanadevi, B., 2016. Preparation of zinc oxide nanoparticles and its characterization using scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction (XRD). *Procedia Technology*, 24, pp.761-766. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2016.05.078>
- Mohmood, I., Ahmad, I., Asim, M., Costa, L., Lopes, C.B., Trindade, T., Duarte, A.C. and Pereira, E., 2015. Interference of the co-exposure of mercury with silica-coated iron oxide nanoparticles can modulate genotoxicity induced by their individual exposures—a paradox depicted in fish under in vitro conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(5), pp.3687-3696. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-014-3591-3>
- Montes-Burgos, I., Walczyk, D., Hole, P., Smith, J., Lynch, I. and Dawson, K., 2010. Characterisation of nanoparticle size and state prior to nanotoxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(1), pp.47-53.
- Moog, O. (ed.) 1995. Fauna Aquatica Austriaca - A Comprehensive Species Inventory of Austrian Aquatic Organisms with Ecological Notes. Federal Ministry for Agriculture and Forestry, *Wasserwirtschaftskataster Vienna*: loose-leaf binder. URL: https://www.researchgate.net/profile/Otto_Moog/publication/268521260_Fauna_Aquatica_Austriaca_-_Catalogue_for_autecological_classification_of_Austrian_aquatic_organisms/links/547046ba0cf24af340c09b62/Fauna-Aquatica-Austriaca-Catalogue-for-autecological-classification-of-Austrian-aquatic-organisms.pdf

- Moon, J., Kwak, J.I., Kim, S.W. and An, Y.J., 2017. Multigenerational effects of gold nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*: Continuous versus intermittent exposures. *Environmental pollution*, 220, pp.46-52. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.021>
- Moore, M.N., 2002. Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. *Aquatic toxicology*, 59(1-2), pp.1-15. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(01\)00225-9](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00225-9)
- Moore, M.N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment?. *Environment international*, 32(8), pp.967-976. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.06.014>
- Moros, M., Gonzalez-Moragas, L., Tino, A., Laromaine, A. and Tortiglione, C., 2019. Invertebrate Models for Hyperthermia: What We Learned from *Caenorhabditis Elegans* and *Hydra Vulgaris*. In *Nanomaterials for Magnetic and Optical Hyperthermia Applications* (pp. 229-264). Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813928-8.00009-0>
- Mowat, I., Moskito, J., Ward, I. and Hartzell, A., 2007. Analytical methods for nanotechnology. *NSTI Nanotech 2007 Proceedings, Santa Clara, May*, pp.20-24.
- Musee, N., 2011. Simulated environmental risk estimation of engineered nanomaterials: a case of cosmetics in Johannesburg City. *Human & experimental toxicology*, 30(9), pp.1181-1195. DOI: <https://doi.org/10.1177/09603271110391387>
- Naqvi, S., Samim, M., Abdin, M.Z., Ahmed, F.J., Maitra, A.N., Prashant, C.K. and Dinda, A.K., 2010. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *International journal of nanomedicine*, 5, p.983. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S13244>
- Nebeker, A.V., Cairns, M.A. and Wise, C.M., 1984. Relative sensitivity of *Chironomus tentans* life stages to copper. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 3(1), pp.151-158. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5620030117>

- Nesmelov, A., Cornette, R., Gusev, O. and Kikawada, T., 2018. The Antioxidant System in the Anhydrobiotic Midge as an Essential, Adaptive Mechanism for Desiccation Survival. In *Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation* (pp. 259-270). Springer, Singapore. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-13-1244-1_14
- Niu, J., Azfer, A., Rogers, L.M., Wang, X. and Kolattukudy, P.E., 2007. Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. *Cardiovascular research*, 73(3), pp.549-559. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.11.031>
- Norman, B.C., Frost, P.C., Blakelock, G.C., Higgins, S.N., Hoque, M.E., Vincent, J.L., Cetinic, K. and Xenopoulos, M.A., 2019. Muted responses to Ag accumulation by plankton to chronic and pulse exposure to silver nanoparticles in a boreal lake. *FACETS*, 4(1), pp.566-583. DOI: <https://doi.org/10.1139/facets-2018-0047>
- Oberholster, P.J., Musee, N., Botha, A.M., Chelule, P.K., Focke, W.W. and Ashton, P.J., 2011. Assessment of the effect of nanomaterials on sediment-dwelling invertebrate *Chironomus tentans* larvae. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(3), pp.416-423. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.12.012>
- Oberdörster, G., Oberdörster, E. and Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives*, 113(7), pp.823-839. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>
- OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development, 2020: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Effects on Biotic Systems. <https://doi.org/10.1787/20745761>
- OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development, 2019: GUIDANCE DOCUMENT ON AQUEOUS-PHASE AQUATIC TOXICITY TESTING OF DIFFICULT TEST CHEMICALS. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23 <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/0ed2f88e->

[en.pdf?expires=1588705829&id=id&accname=guest&checksum=C87B55DB2BE4100949CAABF98A625C98](https://www.oecd.org/env/ehs/testing/latestdocuments/draft-guidance-document-on-aquatic-and-sediment-toxicological-testing-of-nanomaterials.pdf?expires=1588705829&id=id&accname=guest&checksum=C87B55DB2BE4100949CAABF98A625C98)

OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development, 2018: DRAFT GUIDANCE DOCUMENT ON AQUATIC AND SEDIMENT TOXICOLOGICAL TESTING OF NANOMATERIALS. URL: <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/latestdocuments/draft-guidance-document-on-aquatic-and-sediment-toxicological-testing-of-nanomaterials.pdf>

OECD Organisation for Economic Co-operation and Development, 2016. Nanomaterials in Waste Streams: Current Knowledge on Risks and Impacts, OECD Publishing, Paris, DOI: <https://doi.org/10.1787/9789264249752-en>.

OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development, 2015: PRELIMINARY GUIDANCE NOTES ON NANOMATERIALS: INTERSPECIES VARIABILITY FACTORS IN HUMAN HEALTH RISK ASSESSMENT. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 58 URL: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2015\)31&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2015)31&doclanguage=en)

OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development, 2011. Test No. 235: *Chironomus Sp., Acute Immobilisation Test*. OECD Publishing. DOI: <https://doi.org/10.1787/9789264122383-en>

OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development, 2010. Test No. 233: Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, DOI: <https://doi.org/10.1787/9789264090910-en>.

OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development, 2004: Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. *OECD Publishing*, Paris, DOI: <https://doi.org/10.1787/9789264070264-en>

OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development, 2004a Test No. 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water, OECD Guidelines for the

- Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, DOI: <https://doi.org/10.1787/9789264070288-en>.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), pp.351-358. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Okupnik, A. and Pflugmacher, S., 2016. Oxidative stress response of the aquatic macrophyte *Hydrilla verticillata* exposed to TiO₂ nanoparticles. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(11), pp.2859-2866. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.3469>
- Osmulski, P. and Leyko, W., 1986. Structure, function and physiological role of Chironomus haemoglobin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 85(4), pp.701-722. DOI: [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(86\)90166-5](https://doi.org/10.1016/0305-0491(86)90166-5)
- Ozaki, A., Adams, E., Binh, C.T.T., Tong, T., Gaillard, J.F., Gray, K.A. and Kelly, J.J., 2016. One-time addition of nano-TiO₂ triggers short-term responses in benthic bacterial communities in artificial streams. *Microbial ecology*, 71(2), pp.266-275. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-015-0646-z>
- Park, B., Donaldson, K., Duffin, R., Tran, L., Kelly, F., Mudway, I., Morin, J.P., Guest, R., Jenkinson, P., Samaras, Z. and Giannouli, M., 2008. Hazard and risk assessment of a nanoparticulate cerium oxide-based diesel fuel additive—a case study. *Inhalation toxicology*, 20(6), pp.547-566. DOI: <https://doi.org/10.1080/08958370801915309>
- Park, S.Y. and Choi, J., 2017. Molecular characterization and expression analysis of P38 MAPK gene and protein in aquatic midge, *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae), exposed to environmental contaminants. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 72(3), pp.428-438. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00244-017-0366-0>
- Park, S.Y. and Choi, J., 2010. Geno-and ecotoxicity evaluation of silver nanoparticles in freshwater crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Engineering Research*, 15(1), pp.23-27. DOI: <https://doi.org/10.4491/eer.2010.15.1.428>

- Park, S.Y. and Choi, J., 2009. Genotoxic effects of nonylphenol and bisphenol A exposure in aquatic biomonitoring species: freshwater crustacean, *Daphnia magna*, and aquatic midge, *Chironomus riparius*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 83(4), pp.463-468. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00128-009-9745-1>
- Park, E.J., Choi, J., Park, Y.K. and Park, K., 2008b. Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology*, 245(1-2), pp.90-100. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.12.022>
- Pellegrino, F., Pellutiè, L., Sordello, F., Minero, C., Ortel, E., Hodoroaba, V.D. and Maurino, V., 2017. Influence of agglomeration and aggregation on the photocatalytic activity of TiO₂ nanoparticles. *Applied Catalysis B: Environmental*, 216, pp.80-87. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2017.05.046>
- Pelletier, D.A., Suresh, A.K., Holton, G.A., McKeown, C.K., Wang, W., Gu, B., Mortensen, N.P., Allison, D.P., Joy, D.C., Allison, M.R. and Brown, S.D., 2010. Effects of engineered cerium oxide nanoparticles on bacterial growth and viability. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(24), pp.7981-7989. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00650-10>
- Perkel, J.M., 2003. Nanoscience is out of the bottle: despite the naysayers, optimism abounds in the worlds of enhanced pharmaceuticals and nanomedicine. (Cover Story). *The scientist*, 17(15), pp.20-24. URL: <https://go.gale.com/ps/anonymous?id=GALE%7CA106422372&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs&issn=08903670&p=AONE&sw=w>
- Petersen, E.J., Diamond, S.A., Kennedy, A.J., Goss, G.G., Ho, K., Lead, J., Hanna, S.K., Hartmann, N.B., Hund-Rinke, K., Mader, B. and Manier, N., 2015. Adapting OECD aquatic toxicity tests for use with manufactured nanomaterials: key issues and consensus recommendations. *Environmental science & technology*, 49(16), pp.9532-9547. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00997>
- Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S. and Nowack, B., 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of*

- Nanoparticle Research*, 14(9), p.1109. URL:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-012-1109-9>
- Pillot, H.K.M., 2009. *Chironomidae Larvae, Vol. 2: Chironomini: Biology and Ecology of the Chironomini*. Brill. URL:
https://books.google.rs/books?hl=en&lr=&id=5ud5DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=chironomini&ots=uo-wqUHP9y&sig=-qtFgL5u_lqDStaPRD_YtmY7JF0&redir_esc=y#v=onepage&q=chironomini&f=false
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D. and Bitto, A., 2017. Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017. DOI:
<https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Planello, R., Servia, M.J., Gómez-Sande, P., Herrero, O., Cobo, F. and Morcillo, G., 2015. Transcriptional responses, metabolic activity and mouthpart deformities in natural populations of *Chironomus riparius* larvae exposed to environmental pollutants. *Environmental toxicology*, 30(4), pp.383-395. DOI: <https://doi.org/10.1002/tox.21893>
- Pöttler, M., Staicu, A., Zaloga, J., Unterweger, H., Weigel, B., Schreiber, E., Hofmann, S., Wiest, I., Jeschke, U., Alexiou, C. and Janko, C., 2015. Genotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in granulosa cells. *International journal of molecular sciences*, 16(11), pp.26280-26290. DOI:
<https://doi.org/10.3390/ijms161125960>
- Pradhan, A., Seena, S., Pascoal, C. and Cássio, F., 2011. Can metal nanoparticles be a threat to microbial decomposers of plant litter in streams?. *Microbial ecology*, 62(1), pp.58-68. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-011-9861-4>
- Proquin, H., Rodríguez-Ibarra, C., Moonen, C.G., Urrutia Ortega, I.M., Briedé, J.J., de Kok, T.M., van Loveren, H. and Chirino, Y.I., 2017. Titanium dioxide food additive (E171) induces ROS formation and genotoxicity: contribution of micro and nano-sized fractions. *Mutagenesis*, 32(1), pp.139-149. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/gew051>

- Quik, J.T., Velzeboer, I., Wouterse, M., Koelmans, A.A. and Van de Meent, D., 2014. Heteroaggregation and sedimentation rates for nanomaterials in natural waters. *Water research*, 48, pp.269-279. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.062>
- Rand, G.M. ed., 1995. *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment*. Second edition 2000, CRC press.
- Rand, G., M., Petrocelli, S., R., 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications*, Washington: Hemisphere Publishing. ISBN 0-89116-382-4.
- Rasband, W.S., 2011. US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. 1997-2018. URL: <https://imagej.nih.gov/ij/>
- Rawle, A., 2003. Basic of principles of particle-size analysis. *Surface coatings international. Part A, Coatings journal*, 86(2), pp.58-65.
- Recillas, S., García, A., González, E., Casals, E., Puentes, V., Sánchez, A. and Font, X., 2011. Use of CeO₂, TiO₂ and Fe₃O₄ nanoparticles for the removal of lead from water: Toxicity of nanoparticles and derived compounds. *Desalination*, 277(1-3), pp.213-220. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.04.036>
- Rebechi, D. and Navarro-Silva, M.A., 2012. Setting the reference for the use of *Chironomus sanctiparoli* (Diptera: Chironomidae) as bioindicator: Ontogenetic pattern of larval head structures. *Zoologia (Curitiba)*, 29(2), pp.167-171. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-46702012000200009>
- Reinhardt, K. and Winkler, H., 2000. Cerium mischmetal, cerium alloys, and cerium compounds. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*.
- Rico, C.M., Johnson, M.G., Marcus, M.A. and Andersen, C.P., 2017. Intergenerational responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) to cerium oxide nanoparticles exposure. *Environmental Science: Nano*, 4(3), pp.700-711.
- Roco, M.C., 2003. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Current opinion in biotechnology*, 14(3), pp.337-346. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00068-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00068-5)

- Rocco, L., Santonastaso, M., Mottola, F., Costagliola, D., Suero, T., Pacifico, S. and Stingo, V., 2015. Genotoxicity assessment of TiO₂ nanoparticles in the teleost *Danio rerio*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 113, pp.223-230. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.012>
- Rodea-Palomares, I., Boltes, K., Fernández-Pinas, F., Leganés, F., García-Calvo, E., Santiago, J. and Rosal, R., 2011. Physicochemical characterization and ecotoxicological assessment of CeO₂ nanoparticles using two aquatic microorganisms. *Toxicological Sciences*, 119(1), pp.135-145. DOI: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq311>
- Rogers, N.J., Franklin, N.M., Apte, S.C., Batley, G.E., Angel, B.M., Lead, J.R. and Baalousha, M., 2010. Physico-chemical behaviour and algal toxicity of nanoparticulate CeO₂ in freshwater. *Environmental Chemistry*, 7(1), pp.50-60. DOI: <https://doi.org/10.1071/EN09123>
- Roh, J.Y., Park, Y.K., Park, K. and Choi, J., 2010. Ecotoxicological investigation of CeO₂ and TiO₂ nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using gene expression, growth, fertility, and survival as endpoints. *Environmental toxicology and pharmacology*, 29(2), pp.167-172. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.12.003>
- Rohlf, F.J., 2009. TpsDig software, ver. 2.14. Digitize Landmarks and Outlines. Computer program and documentation, Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY. URL: <https://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- Rohlf, F.J., 1990. Morphometrics. *Annual Review of ecology and Systematics*, 21(1), pp.299-316.
- Rohlf, F.J. and Marcus, L.F., 1993. A revolution morphometrics. *Trends in ecology & evolution*, 8(4), pp.129-132. DOI: [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90024-J](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90024-J)
- Sahragard, A. and Rafatifard, M., 2010. Biology and effect of temperature on larval development time of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) under laboratory conditions. *Munis Entomology & Zoology*, 5(Supplement), pp.1025-1033. URL: <https://www.munisentzool.org/yayin/vol5/suppl/1025-1033.pdf>

- Rosenfeldt, R.R., Seitz, F., Zubrod, J.P., Feckler, A., Merkel, T., Lüderwald, S., Bundschuh, R., Schulz, R. and Bundschuh, M., 2015. Does the presence of titanium dioxide nanoparticles reduce copper toxicity? A factorial approach with the benthic amphipod *Gammarus fossarum*. *Aquatic Toxicology*, 165, pp.154-159. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.05.011>
- Salmelin, J., Vuori, K.M. and Hämäläinen, H., 2015. Inconsistency in the analysis of morphological deformities in chironomidae (Insecta: Diptera) larvae. *Environmental toxicology and chemistry*, 34(8), pp.1891-1898. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.3010>
- Samsonov, G.V., 2013. The oxide handbook. Springer Science & Business Media. URL: [https://books.google.rs/books?hl=en&lr=&id=Iq3fBwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=Samsonov+GV+\(1982\)+The+oxide+handbook.+IFI/Plenum+Press,+New+York&ots=R87wGeE9Vw&sig=W_23fJF8DUa3iVkt4lcYP-uRraE&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.rs/books?hl=en&lr=&id=Iq3fBwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=Samsonov+GV+(1982)+The+oxide+handbook.+IFI/Plenum+Press,+New+York&ots=R87wGeE9Vw&sig=W_23fJF8DUa3iVkt4lcYP-uRraE&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- Sanvicens, N. and Marco, M.P., 2008. Multifunctional nanoparticles—properties and prospects for their use in human medicine. *Trends in biotechnology*, 26(8), pp.425-433. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.005>
- Schmidt-Kloiber, A. and Hering, D., 2015. www. freshwaterecology. Info – An online tool that unifies, standardises and codifies more than 20,000 European freshwater organisms and their ecological preferences. *Ecological Indicators*, 53, pp.271-282. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.02.007>
- Schmid, K., Danuser, B. and Riediker, M., 2010. Nanoparticle usage and protection measures in the manufacturing industry—a representative survey. *Journal of occupational and environmental hygiene*, 7(4), pp.224-232. DOI: <https://doi.org/10.1080/15459621003609127>
- Schneider, C.A., Rasband, W.S. and Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), pp.671-675. URL: <https://www.nature.com/articles/nmeth.2089>

- Schneider, E.D., 1992. Global monitoring scales. In: McKenzie, D.H., Hyatt, D.E., McDonald, V.J (Eds), *Ecological Indicators. Elsevier Applied Science*, London, pp. 1009–1011.
- Schultz, C.L., Wamuch, A., Tsyusko, O.V., Unrine, J.M., Crossley, A., Svendsen, C. and Spurgeon, D.J., 2016. Multigenerational exposure to silver ions and silver nanoparticles reveals heightened sensitivity and epigenetic memory in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1832), p.20152911. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2911>
- Selck, H., Handy, R.D., Fernandes, T.F., Klaine, S.J. and Petersen, E.J., 2016. Nanomaterials in the aquatic environment: A European Union–United States perspective on the status of ecotoxicity testing, research priorities, and challenges ahead. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(5), pp.1055-1067. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.3385>
- Servia, M.J., Cobo, F. and González, M.A., 2000. Incidence and causes of deformities in recently hatched larvae of *Chironomus riparius* Meigen, 1804 (Diptera, Chironomidae). *Archiv fur Hydrobiologie*, 149(3), pp.387-401.
- Sharifi, S., Behzadi, S., Laurent, S., Forrest, M.L., Stroeve, P. and Mahmoudi, M., 2012. Toxicity of nanomaterials. *Chemical Society Reviews*, 41(6), pp.2323-2343. URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/cs/c1cs15188f/unauth#!divAbstract>
- Sharma, V.K., Alipour, A., Soran-Erdem, Z., Aykut, Z.G. and Demir, H.V., 2015. Highly monodisperse low-magnetization magnetite nanocubes as simultaneous T₁–T₂ MRI contrast agents. *Nanoscale*, 7(23), pp.10519-10526. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c5nr00752f>
- Sies, H., 2000. What is oxidative stress?. In *Oxidative stress and vascular disease* (pp. 1-8). Springer, Boston, MA.
- Singh, P.K., Jairath, G. and Ahlawat, S.S., 2016. Nanotechnology: a future tool to improve quality and safety in meat industry. *Journal of food science and technology*, 53(4), pp.1739-1749.

- Singh, S., Kumar, A., Karakoti, A., Seal, S. and Self, W.T., 2010. Unveiling the mechanism of uptake and sub-cellular distribution of cerium oxide nanoparticles. *Molecular BioSystems*, 6(10), pp.1813-1820. DOI: <https://doi.org/10.1039/c0mb00014k>
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175(1), pp.184-191. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Soenen, S.J., Himmelreich, U., Nuytten, N. and De Cuyper, M., 2011. Cytotoxic effects of iron oxide nanoparticles and implications for safety in cell labelling. *Biomaterials*, 32(1), pp.195-205. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.075>
- Sheets, H.D., 2003. IPM Suite (Integrated Morphometrics Package). Canisius College, Buffalo, NY.
- Shen, M., Cai, H., Wang, X., Cao, X., Li, K., Wang, S.H., Guo, R., Zheng, L., Zhang, G. and Shi, X., 2012. Facile one-pot preparation, surface functionalization, and toxicity assay of APTS-coated iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology*, 23(10), p.105601. URL: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0957-4484/23/10/105601/meta>
- Stanković, N., Kostić, I., Jovanović, B., Savić-Zdravković, D., Matić, S., Bašić, J., Cvetković, T., Simeunović, J. and Milošević, D., 2020. Can phytoplankton blooming be harmful to benthic organisms? The toxic influence of *Anabaena sp.* and *Chlorella sp.* on *Chironomus riparius* larvae. *Science of The Total Environment*, p.138666. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138666>
- StatSoft, Inc., 2004., STATISTICA (data analysis software system), version 7. www.statsoft.com
- Statzner, B., Bady, P., Doledec, S. and Schöll, F., 2005. Invertebrate traits for the biomonitoring of large European rivers: an initial assessment of trait patterns in least impacted river reaches. *Freshwater Biology*, 50(12), pp.2136-2161. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2005.01447.x>

- Sun, T.Y., Gottschalk, F., Hungerbühler, K. and Nowack, B., 2014. Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environmental pollution*, 185, pp.69-76. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.004>
- Swartz, R.C., DeBen, W.A., Jones, J.K.P., Lamberson, J.O. and Cole, F.A., 1985, January. Phoxocephalid amphipod bioassay for marine sediment toxicity. In *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Seventh Symposium*. ASTM International.
- Tarnuzzer, R.W., Colon, J., Patil, S. and Seal, S., 2005. Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage. *Nano letters*, 5(12), pp.2573-2577. DOI: <https://doi.org/10.1021/nl052024f>
- Tartaj, P., Morales, M.P., Veintemillas-Verdaguer, S., Gonzalez-Carreño, T. and Serna, C.J., 2006. Synthesis, properties and biomedical applications of magnetic nanoparticles. *Handbook of magnetic materials*, 16(5), pp.403-482.
- Taylor, L.N., & Scroggins, R.P. 2013: Standardization of Ecotoxicological Tests: The Process. In: Féraud, JF., & Blaise, C. (ed) *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, Dordrecht, 1221 p.
- Tella, M., Auffan, M., Brousset, L., Morel, E., Proux, O., Chanéac, C., Angeletti, B., Pailles, C., Artells, E., Santaella, C. and Rose, J., 2015. Chronic dosing of a simulated pond ecosystem in indoor aquatic mesocosms: fate and transport of CeO₂ nanoparticles. *Environmental Science: Nano*, 2(6), pp.653-663. URL: <https://pubs.rsc.org/--/content/articlehtml/2015/en/c5en00092k>
- Thill, A., Zeyons, O., Spalla, O., Chauvat, F., Rose, J., Auffan, M. and Flank, A.M., 2006. Cytotoxicity of CeO₂ nanoparticles for Escherichia coli. Physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism. *Environmental science & technology*, 40(19), pp.6151-6156. DOI: <https://doi.org/10.1021/es060999b>
- Thomas, R., 2013. *Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners*. CRC press. URL: https://books.google.rs/books?hl=en&lr=&id=kHNt75Bu1hwC&oi=fnd&pg=PP1&dq=ICP-MS+technique&ots=VBUCjqL-RY&sig=-aNp0pgyp90ykrjNpC-ElQVQo&redir_esc=y#v=onepage&q=ICP-MS%20technique&f=false

- Thompson, A.C., Attwood, D., Gullikson, E., Howells, M., Kim, K.J., Kirz, J., Kortright, J., Lindau, I., Liu, Y., Pianetta, P. and Robinson, A., 2009. X-ray properties of the elements. *X-Ray Data Booklet*, Thompson, AC (Ed.), pp.1-53. URL: <http://cxro.lbl.gov/x-ray-data-booklet>
- Thorat, L.J. and Nath, B.B., 2013. Chironomid midges: a forgotten model of developmental biology research. *Acta Zoologica*, 94(3), pp.249-253. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2011.00541.x>
- Tlili, A., Jabiol, J., Behra, R., Gil-Allué, C. and Gessner, M.O., 2017. Chronic exposure effects of silver nanoparticles on stream microbial decomposer communities and ecosystem functions. *Environmental science & technology*, 51(4), pp.2447-2455. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05508>
- Tomilina, I.I. and Grebenyuk, L.P., 2020. Malformations of Mouthpart Structures of *Chironomus riparius* Larvae (Diptera, Chironomidae) under the Effect of Metal-Containing Nanoparticles. *Entomological Review*, 100, pp.7-18. URL: <https://link.springer.com/article/10.1134%2FS0013873820010029>
- Tomilina, I.I., Gremyachikh, V.A., Grebenyuk, L.P., Smirnov, E.A. and Golovkina, E.I., 2015. Changes in biological parameters of freshwater animals under the impact of various crystal modifications of titanium dioxide nanoparticles. *Inland water biology*, 8(3), pp.309-318. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1995082915030153>
- Totsuka, Y., Ishino, K., Kato, T., Goto, S., Tada, Y., Nakae, D., Watanabe, M. and Wakabayashi, K., 2014. Magnetite nanoparticles induce genotoxicity in the lungs of mice via inflammatory response. *Nanomaterials*, 4(1), pp.175-188. DOI: <https://doi.org/10.3390/nano4010175>
- Tsakovska, I. and Worth, A., 2009. The use of computational methods for the assessment of chemicals in REACH. *Int J BIOautomation*, 13, pp.151-62. URL: http://clbme.bas.bg/bioautomation/2009/vol_13.4/files/13.4_3.04.pdf

- Truhaut, R., 1975. Ecotoxicology—A New Branch of Toxicology: A General Survey of its Aims Methods, and Prospects. In *Ecological Toxicology Research* (pp. 3-23). Springer, Boston, MA. URL: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4615-8945-7_1
- United Kingdom Royal Society, 2004. Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties. Report by the Royal Society and The Royal Academy of Engineering. URL: https://royalsociety.org/~media/Royal_Society_Content/policy/publications/2004/9693.pdf
- Vafopoulou-Mandalos, X. and Laufer, H., 1983. Tissue-specificity of hemoglobin synthesis: Localization of heme synthesis in the subepidermal fat body of *Chironomus thummi* (Diptera). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 1(2), pp.191-197. DOI: <https://doi.org/10.1002/arch.940010209>
- Valverde, M. and Rojas, E., 2009. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681(1), pp.93-109. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.11.001>
- Vandecasteele, C., Wauters, G., Dams, R. and de Jonghe, W., 1989. Analysis of high-purity quartz sand by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 4(5), pp.461-463 DOI: <https://doi.org/10.1039/ja9890400461>
- Vance, M.E., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., Hochella Jr, M.F., Rejeski, D. and Hull, M.S., 2015. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein journal of nanotechnology*, 6(1), pp.1769-1780. DOI: <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181>
- Vallenduuk, H.J., 2017. Chironomini larvae of western European lowlands (Diptera: Chironomidae). *Keys with notes to the species. With a redescription of Glyptotendipes (Caulochironomus) nagorskayae and a first description of Glyptotendipes (Caulochironomus) kaluginae new species. Lauterbornia*, 82, pp.1-216.

- Vevers, W.F. and Jha, A.N., 2008. Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on fish cells in vitro. *Ecotoxicology*, 17(5), pp.410-420. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10646-008-0226-9>
- Viscosi, V. and Cardini, A., 2011. Leaf morphology, taxonomy and geometric morphometrics: a simplified protocol for beginners. *PloS one*, 6(10).
- Vogt, C., Langer-Jaesrich, M., Elsässer, O., Schmitt, C., Van Dongen, S., Köhler, H.R., Oehlmann, J. and Nowak, C., 2013. Effects of inbreeding on mouthpart deformities of *Chironomus riparius* under sublethal pesticide exposure. *Environmental toxicology and chemistry*, 32(2), pp.423-425. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.2071>
- Wagner, S., Gondikas, A., Neubauer, E., Hofmann, T. and von der Kammer, F., 2014. Spot the difference: engineered and natural nanoparticles in the environment—release, behavior, and fate. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(46), pp.12398-12419. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201405050>
- Warheit, D.B., 2004. Nanoparticles: health impacts?. *Materials today*, 7(2), pp.32-35. URL: https://www.researchgate.net/profile/David_Warheit/publication/257553776_Nanoparticles_Health_Impacts/links/5717944508aed43f6322004d.pdf
- Wahajuddin, S.A., 2012. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *International journal of nanomedicine*, 7, p.3445. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S30320>
- Waissi, G.C., Väänänen, K., Nybom, I., Pakarinen, K., Akkanen, J., Leppänen, M.T. and Kukkonen, J.V.K., 2017. The chronic effects of fullereneC60-associated sediments in the midge *Chironomus riparius*—Responses in the first and the second generation. *Environmental Pollution*, 229, pp.423-430. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.015>
- Walkey, C., Das, S., Seal, S., Erlichman, J., Heckman, K., Ghibelli, L., Traversa, E., McGinnis, J.F. and Self, W.T., 2015. Catalytic properties and biomedical applications of cerium oxide nanoparticles. *Environmental Science: Nano*, 2(1), pp.33-53. DOI: <https://doi.org/10.1039/C4EN00138A>

- Warwick, W.F., 1985. Morphological abnormalities in Chironomidae (Diptera) larvae as measures of toxic stress in freshwater ecosystems: indexing antennal deformities in *Chironomus Meigen*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42(12), pp.1881-1914. DOI: <https://doi.org/10.1139/f85-236>
- Warwick, W.F. and Tisdale, N.A., 1988. Morphological deformities in *Chironomus*, *Cryptochironomus*, and *Procladius* larvae (Diptera: Chironomidae) from two differentially stressed sites in Tobin Lake, Saskatchewan. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45(7), pp.1123-1144. DOI: <https://doi.org/10.1139/f88-136>
- Warwick, W.F., 1988. Morphological deformities in Chironomidae (Diptera) larvae as biological indicators of toxic stress. *Advances in environmental science and technology* (USA).
- Watanabe, M., Yoneda, M., Morohashi, A., Hori, Y., Okamoto, D., Sato, A., Kurioka, D., Nittami, T., Hirokawa, Y., Shiraishi, T. and Kawai, K., 2013. Effects of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles on A549 cells. *International journal of molecular sciences*, 14(8), pp.15546-15560. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms140815546>
- Wang, Y. and Nowack, B., 2018. Dynamic probabilistic material flow analysis of nano-SiO₂, nano iron oxides, nano-CeO₂, nano-Al₂O₃, and quantum dots in seven European regions. *Environmental pollution*, 235, pp.589-601. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.004>
- Wang, R., Hashimoto, K., Fujishima, A., Chikuni, M., Kojima, E., Kitamura, A., Shimohigoshi, M. and Watanabe, T., 1997. Light-induced amphiphilic surfaces. *Nature*, 388(6641), pp.431-432. URL: <https://www.nature.com/articles/41233>
- Watts, M.M. and Pascoe, D., 2000a. Comparison of *Chironomus riparius* Meigen and *Chironomus tentans* Fabricius (Diptera: Chironomidae) for assessing the toxicity of sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 19(7), pp.1885-1892. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5620190724>
- Watts, M.M. and Pascoe, D., 2000b. A comparative study of *Chironomus riparius* Meigen and *Chironomus tentans* Fabricius (Diptera: Chironomidae) in aquatic toxicity tests. *Archives*

- of environmental contamination and toxicology, 39(3), pp.299-306. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s002440010108>
- Watts, M.M. and Pascoe, D., 1996. Use of the freshwater macroinvertebrate *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) in the assessment of sediment toxicity. *Water Science and Technology*, 34(7-8), p.101. URL: <https://search.proquest.com/openview/f3cfd7bb88fd45a6fe3f87376404e76b/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2044520>
- Weber, R.E., 1980. Functions of invertebrate hemoglobins with special reference to adaptations to environmental hypoxia. *American Zoologist*, 20(1), pp.79-101. DOI: <https://doi.org/10.1093/icb/20.1.79>
- Weltje, L., Bruns, E., SE, B. and AG, B., 2009. The chironomid full life-cycle test. *Validation report, First draft*. URL: <https://pdfs.semanticscholar.org/20ac/32537ac3afeee9e0bce24a9773f2842df434.pdf>
- Wiederholm, T., 1984. Incidence of deformed chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) in Swedish lakes. *Hydrobiologia*, 109(3), pp.243-249. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00007742>
- Williams, K.A., Green, D.W., Pascoe, D. and Gower, D.E., 1986. The acute toxicity of cadmium to different larval stages of *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) and its ecological significance for pollution regulation. *Oecologia*, 70(3), pp.362-366. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00379498>
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P. and Descamps-Latscha, B., 1996. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney international*, 49(5), pp.1304-1313. DOI: <https://doi.org/10.1038/ki.1996.186>
- Wu, J.Q., Kosten, T.R. and Zhang, X.Y., 2013. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 46, pp.200-206. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.02.015>

- Wu, Q., Li, Y., Tang, M. and Wang, D., 2012. Evaluation of environmental safety concentrations of DMSA coated Fe₂O₃-NPs using different assay systems in nematode *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*, 7(8). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043729>
- Xia, T., Kovochich, M., Liong, M., Madler, L., Gilbert, B., Shi, H., Yeh, J.I., Zink, J.I. and Nel, A.E., 2008. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS nano*, 2(10), pp.2121-2134. DOI: <https://doi.org/10.1021/nn800511k>
- Xiaoxiao, C., Xing, Z., Rui, L., Hanchao, Y., Zhisong, L. and Xu, Y., 2012. Photosynthetic toxicity and oxidative damage induced by nano-Fe₃O₄ on *Chlorella vulgaris* in aquatic environment. *Open Journal of Ecology*, 2012. DOI: <https://doi.org/10.4236/oje.2012.21003>
- Yang, X., Piety, N.Z., Vignes, S.M., Benton, M.S., Kanter, J. and Shevkoplyas, S.S., 2013. Simple paper-based test for measuring blood hemoglobin concentration in resource-limited settings. *Clinical chemistry*, 59(10), pp.1506-1513. DOI: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.204701>
- Yavuz, C.T., Mayo, J.T., William, W.Y., Prakash, A., Falkner, J.C., Yean, S., Cong, L., Shipley, H.J., Kan, A., Tomson, M. and Natelson, D., 2006. Low-field magnetic separation of monodisperse Fe₃O₄ nanocrystals. *science*, 314(5801), pp.964-967. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1131475>
- Yew, Y.P., Shameli, K., Miyake, M., Khairudin, N.B.B.A., Mohamad, S.E.B., Naiki, T. and Lee, K.X., 2020. Green biosynthesis of superparamagnetic magnetite Fe₃O₄ nanoparticles and biomedical applications in targeted anticancer drug delivery system: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), pp.2287-2308. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.04.013>
- Yokel, R.A., Hussain, S., Garantziotis, S., Demokritou, P., Castranova, V. and Cassee, F.R., 2014. The yin: an adverse health perspective of nanoceria: uptake, distribution, accumulation, and mechanisms of its toxicity. *Environmental Science: Nano*, 1(5), pp.406-428. DOI: <https://doi.org/10.1039/C4EN00039K>

- Zelditch, M.L., Swiderski, D.L. and Sheets, H.D., 2012. Geometric morphometrics for biologists: a primer. Academic Press. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-012778460-1/50003-X>
- Zhang, P., Ma, Y., Liu, S., Wang, G., Zhang, J., He, X., Zhang, J., Rui, Y. and Zhang, Z., 2017. Phytotoxicity, uptake and transformation of nano-CeO₂ in sand cultured romaine lettuce. *Environmental Pollution*, 220, pp.1400-1408. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.094>
- Zhang, H., He, X., Zhang, Z., Zhang, P., Li, Y., Ma, Y., Kuang, Y., Zhao, Y. and Chai, Z., 2011. Nano-CeO₂ exhibits adverse effects at environmental relevant concentrations. *Environmental science & technology*, 45(8), pp.3725-3730. DOI: <https://doi.org/10.1021/es103309n>
- Zhang, S., Niu, H., Cai, Y. and Shi, Y., 2010. Barium alginate caged Fe₃O₄@ C18 magnetic nanoparticles for the pre-concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons and phthalate esters from environmental water samples. *Analytica chimica acta*, 665(2), pp.167-175. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.03.026>
- Zhang, S., Zhao, X., Niu, H., Shi, Y., Cai, Y. and Jiang, G., 2009. Superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles as catalysts for the catalytic oxidation of phenolic and aniline compounds. *Journal of hazardous materials*, 167(1-3), pp.560-566. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.01.024>
- Zhang, F., Chan, S.W., Spanier, J.E., Apak, E., Jin, Q., Robinson, R.D. and Herman, I.P., 2002. Cerium oxide nanoparticles: size-selective formation and structure analysis. *Applied physics letters*, 80(1), pp.127-129. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.1430502>
- Zhao, J., Lin, M., Wang, Z., Cao, W., and Xing, B., 2020. Engineered nanomaterials in the environment: Are they safe?, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, DOI: <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1764279>
- Zhou, F., Zhao, X., Xu, H. and Yuan, C., 2007. CeO₂ spherical crystallites: synthesis, formation mechanism, size control, and electrochemical property study. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(4), pp.1651-1657. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp0660435>

Zhu, X., Tian, S. and Cai, Z., 2012. Toxicity assessment of iron oxide nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *PLoS One*, 7(9). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046286>

Zou, D., Xu, C., Luo, H., Wang, L. and Ying, T., 2008. Synthesis of Co_3O_4 nanoparticles via an ionic liquid-assisted methodology at room temperature. *Materials letters*, 62(12-13), pp.1976-1978. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2007.10.056>

POGLAVLJE 8

Prilozi

Prilog 1: nano-TiO₂ titanijum dioksid nanočestice – metode karakterizacije (izvršene u okviru rada Jovanović i sar., 2016a)

TEM

TEM fotomikrografije uzorka TiO₂ nanočestica dobijene su pomoću „FEI Tecnai G2 F30“ mikroskopa. Uzorci su pripremljeni odlivanjem 1 do 2 kapi disperzije nanočestica u etanolu na bakarnu mrežu obloženu ugljenikom.

AFM

Mikroskopija Atomskih Sila, AFM, izvršena je pomoću „PSIA KSE-100E“ spektroskopa sa mikrofabrikovanim silikonskim konzolama (Olimpus OMCL-AC160TS-V2) sa opružnom konstantom od 40 N/mm.

XPS

Rendgenska fotoelektronska spektroskopija, XPS, izvršena je pomoću “Thermo Scientific K-Alpha” uređaja. Korišćen je snop magnezijumskog rendgenskog zračenja K α linije ¹(Mg K α , energije fotona 1253.6 eV) sa izvorom snage 300 W. Za snimanje preglednih spektara je korišćena energija prolaza elektrona u analizatoru od 117.40 eV. Spektri su snimljeni koristeći ugao od 60 ° u odnosu na normalnu površinu.

XRD

Rendgenska difrakciona strukturalna merenja izvršena su pomoću „Pananalytical X’pert Pro“ višenamenskog rendgenskog difraktometra u refleksionoj geometriji. Korišćen je snop Cu zračenja K α linije (talasne dužine $\lambda = 0.154$ nm) energije 40kV i jačine 40 mA. Merenja su izvršena u intervalu uglova 2 θ od 1° do 80° u koracima od 0.05°.

BET

BET analiza specifične površine TiO₂ nanočestica je izvršena pomoću “Autosorb iQ Station 1” uređaja u azotnoj (N₂) atmosferi.

DLS i zeta potencijal:

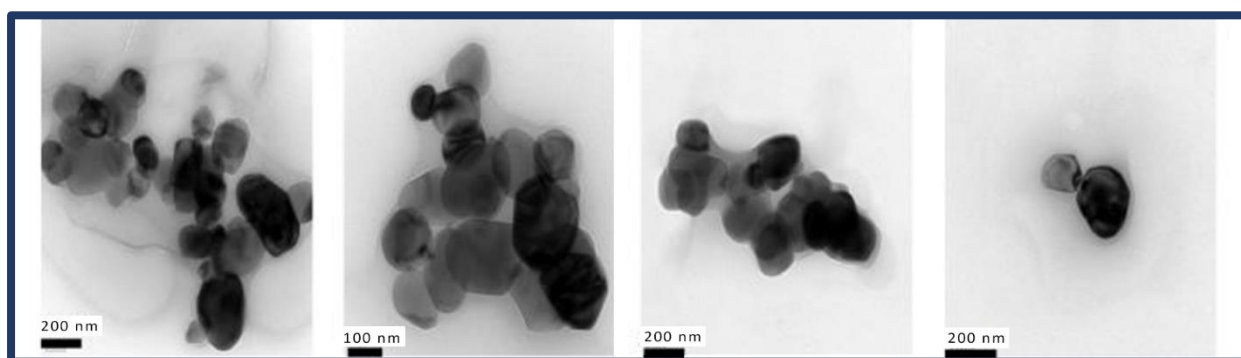
Hidrodinamički radijus i zeta potencijal TiO₂ nanočestica izmereni su na temperaturi od 25 °C pomoću „Malvern ZetaNano ZS“ uređaja za analizu čestica, koristeći U-kapilarnu ćeliju „DTS1060“ sa He-Ne laserskim izvorom, snage 5 mW i talasne dužine 633 nm. Suspenzija TiO₂

¹ K α zračenje nije u potpunosti monohromatsko, već se zapravo sastoji od K α 1 i K α 2, dve vrlo uske linije.

nanočestica u dejonizovanoj vodi je pripremljena u koncentraciji od 25 $\mu\text{g/L}$ i 250 $\mu\text{g/L}$. Prosečan hidrodinamički radijus meren je na svaka 5 minuta, prvih sat vremena nakon pripreme suspenzije, uz još jedno dodatno merenje nakon 24 časa. Zeta potencijali su mereni 15 minuta nakon pripreme suspenzije. Ovakva merenja su obavljena da bi se sagledala nestabilnost suspenzije tokom vremena, jer se očekivalo veliko taloženje, tj. sedimentacija nanočestica.

Prilog 2: nano-TiO₂ titanijum dioksid nanočestice – rezultati karakterizacije (dobijeni u okviru rada Jovanović i sar., 2016a)

TEM mikroskopijom je otkriveno da nano-TiO₂ ima široku distribuciju veličina čestica u opsegu od 50 do 300 nm, sa oštrim, čistim i jasno definisanim ivicama (slika 1 ovog priloga). Primećeno je da čestice formiraju aggregate u suspenziji etanola. AFM analiza pokazala je i preciznije dimenzije E171 nano-TiO₂. Prema AFM analizi, srednja veličina čestica \pm standardna greška je 167 ± 50 nm.

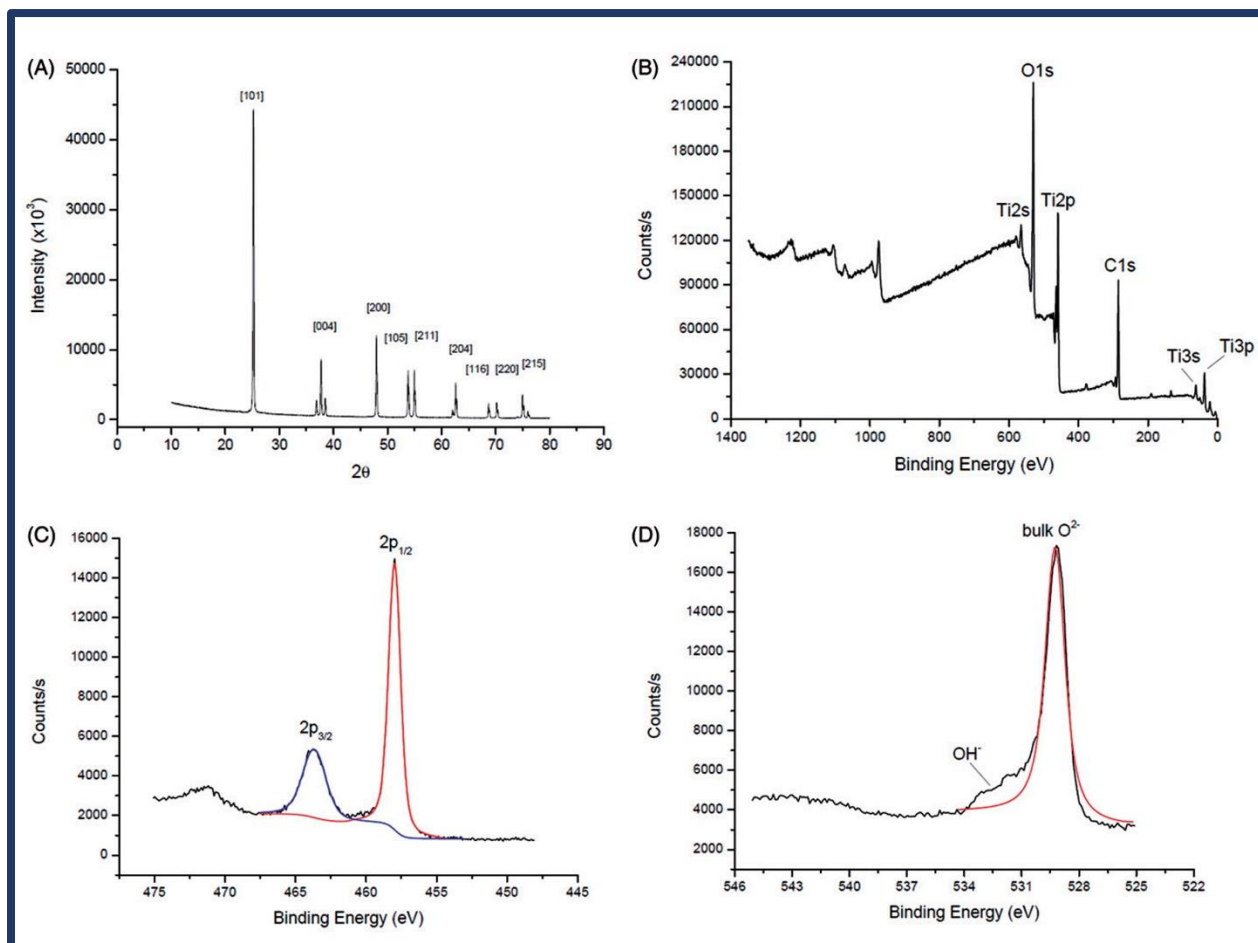


Slika 1 - Transmisioa Elektronska Mikrografija – TEM slike TeO₂ nanočestica na četiri različita uvećanja dobijene “FEI Tecnai G2 F30” uređajem. Preuzeta iz rada Jovanović i sar., 2016a.

Na slici 2 ovog priloga prikazan je XRD difraktogram zavisnosti relativnog intenziteta difraktovanog zračenja ($\times 10^3$) od dvostrukog ugla rasejanja, $2\theta/^\circ$. Svi difrakcioni pikovi su jasno definisani i savršeno odgovaraju anataznoj kristalnoj strukturi. Oštri pikovi odgovaraju (101), (004), (200), (105), (211), (204), (116), (220) i (215) kristalnim ravnima TiO₂ nanočestica. Nisu otkriveni karakteristični pikovi koji se odnose na druge kristalne forme (slika 2 A).

Pregledni XPS spektrogram nano-TiO₂ uzorka je prikazan na slici 2 B. Spektar Ti2p fotoelektronske linije pokazuje Ti 2p_{3/2} pik na 463.8 eV i Ti 2p_{1/2} pik na 458.0 eV, što je karakteristično za TiO₂ (slika 2 C). O 1s spektar pokazuje glavni pik na 529,2 eV, koji se pripisuje kiseoniku vezanom za tetravalentne Ti jone i “rame”, tj. prevoj na ~ 532.5 eV, što ukazuje na to da

je površina delimično pokrivena hidrosidnim OH grupama (slika 2 D). Odnos titanijuma i kiseonika takođe ukazuje na to da nano-TiO₂ ima anataznu kristalnu strukturu.



Slika 2 - Nano-TiO₂ karakterizacija: 2A- XRD šablon nano-TiO₂ kristalne strukture; 2B - XPS spektralna analiza TiO₂ nanočestica; 2C - XPS spektar Ti 2p pika; 2D - XPS spektar O 1s pika. Preuzeta iz rada Jovanović i sar., 2016a.

Prema BET analizi, specifična površina nano-TiO₂ praha iznosi 6.137 m²/g, dok je zapremina pora 0.123 cm³/g a prečnik 2.968 nm.

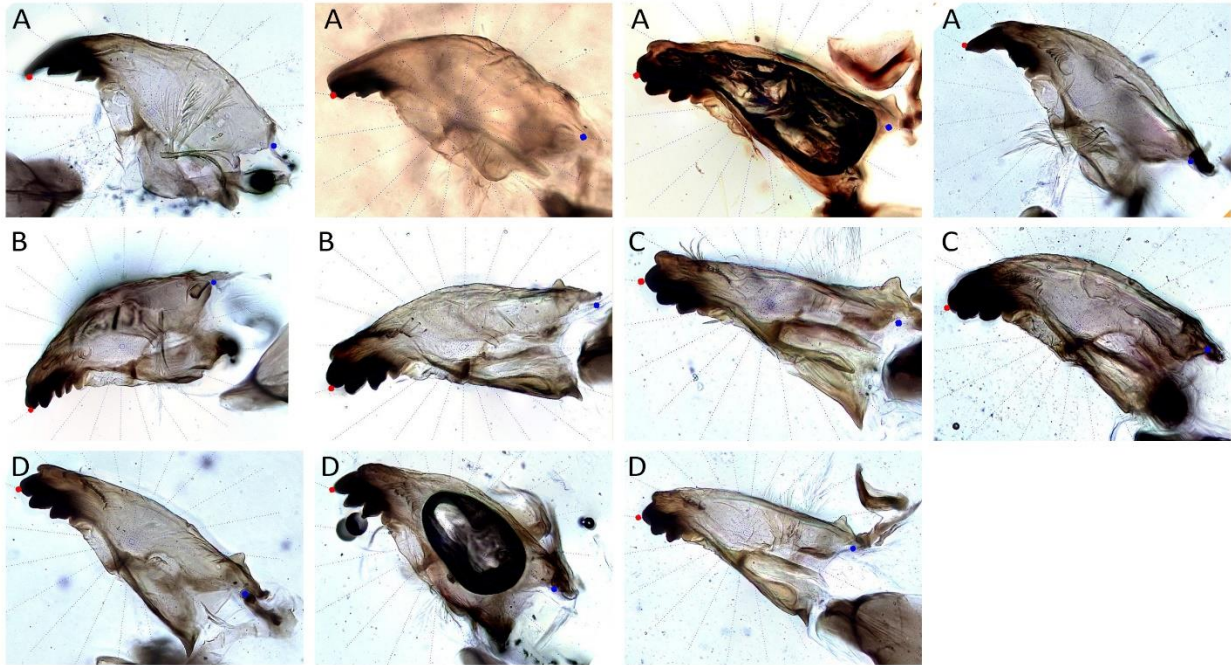
Prema DLS merenjima u čistoj vodi, prosečan hidrodinamički prečnik je manji od 100 nm za skoro 30% nano-TiO₂ čestica. Rezultati merenja hidrodinamičkih prečnika tokom vremena prikazani su u tabeli 1 ovog priloga. Prosečan hidrodinamički dijametar iznosi 671±112 nm. Polidisperzitet (PDI) uzorka je u rasponu od 0,9 do 1 što ukazuje na visoko polidisperzan rastvor. Pored toga, srednja vrednost ζ-potencijala izmerena nakon pripreme suspenzije u dejonizovanoj vodi kreće se u rasponu od -12,2±0,4 do -20,2±0,4 mV (srednja vrednost ± SD). Ovo ukazuje na

to da su nanočestice TiO₂ nestabilne u dejonizovanoj vodi i da mogu da formirati agregate i taložiti se.

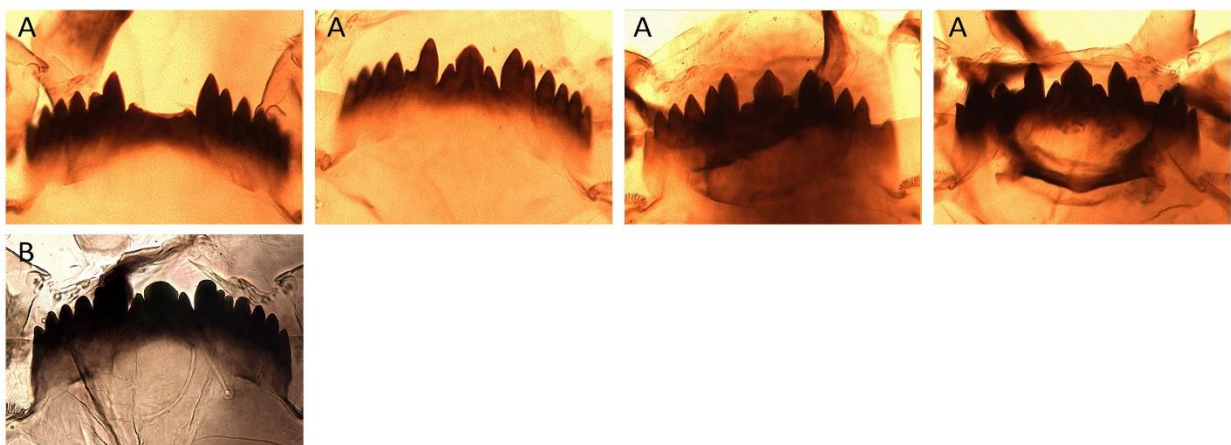
Tabela 1 - Procenjeni prosečni hidrodinamički prečnik (d_H) nano-TiO₂ čestica tokom vremena (u koncentracijama od 25 i 250 µg/l) ±SD se odnosi na standardnu devijaciju ukupno šest automatski ponovljenih skeniranja pomoću "Malvern ZetaNano ZS" uređaja. Preuzeta iz rada Jovanović i sar., 2016a.

Vreme (min)	25 µg/l d_H (nm) srednja vrednost±SD	250 µg/l d_H (nm) srednja vrednost±SD
0	2494±5	5540±4
5	1796±6	3622±3
10	1635±15	2991±8
15	1513±17	1744±11
20	1441±11	3058±2
25	1150±19	2791±3
30	1320±20	3974±4
35	1545±11	4168±4
40	1457±21	1943±10
45	1112±15	2135±9
50	/	3817±2
55	1282±22	/
60	1296±10	/
24 h	437±54	1148±63

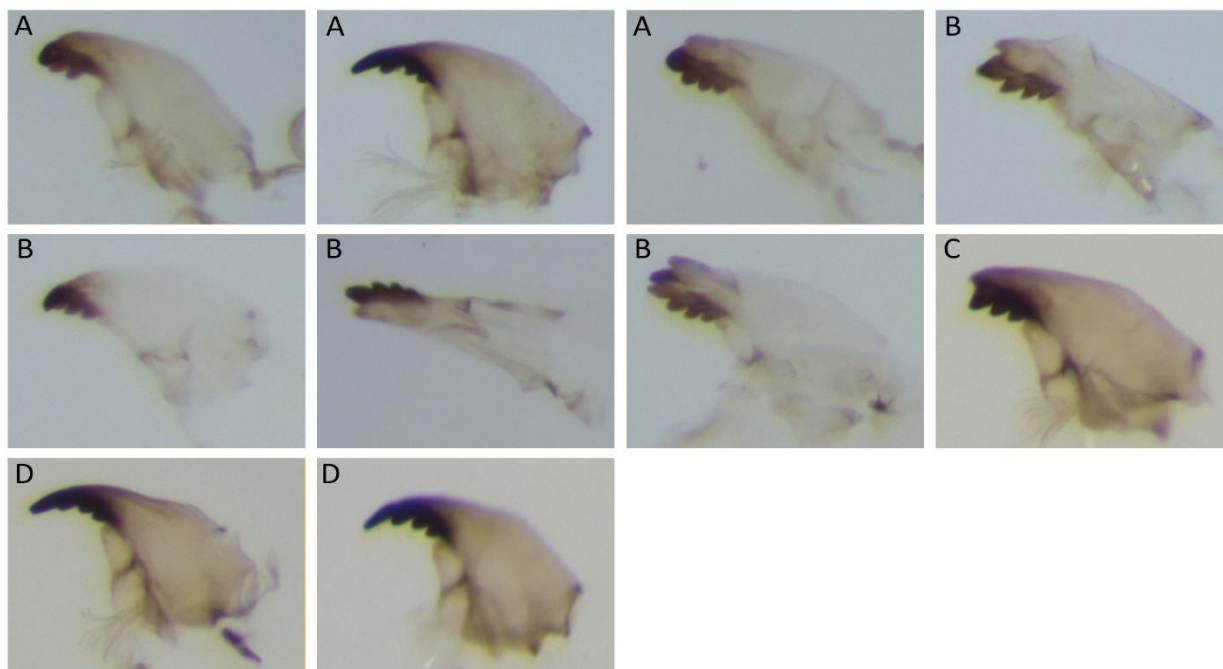
Prilog 3 – Mandibule sa uočenim deformitetima u setu eksperimenata za procenu uticaja nano-TiO₂. Uočeno je ukupno 11 (6,36% od ukupnog uzorka): A – kontrolni tretman; B - 2,5 mg/kg nano-TiO₂; C - 25 mg/kg nano-TiO₂; D - 250 mg/kg nano-TiO₂



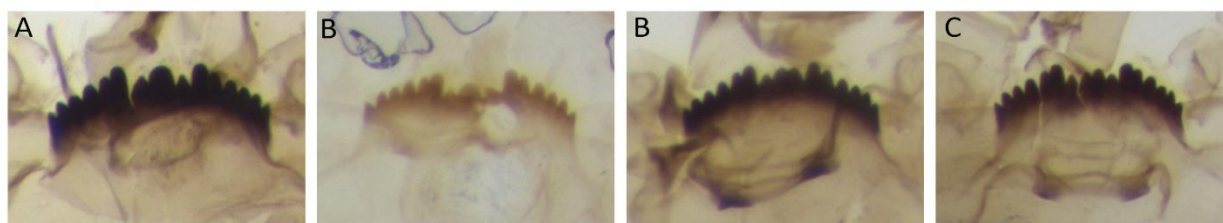
Prilog 4 – Mentumi sa uočenim deformitetima u setu eksperimenata za procenu uticaja nano-TiO₂. Uočeno je ukupno 5 (2,89% od ukupnog uzorka): A – kontrolni tretman; B - 25 mg/kg nano-TiO₂



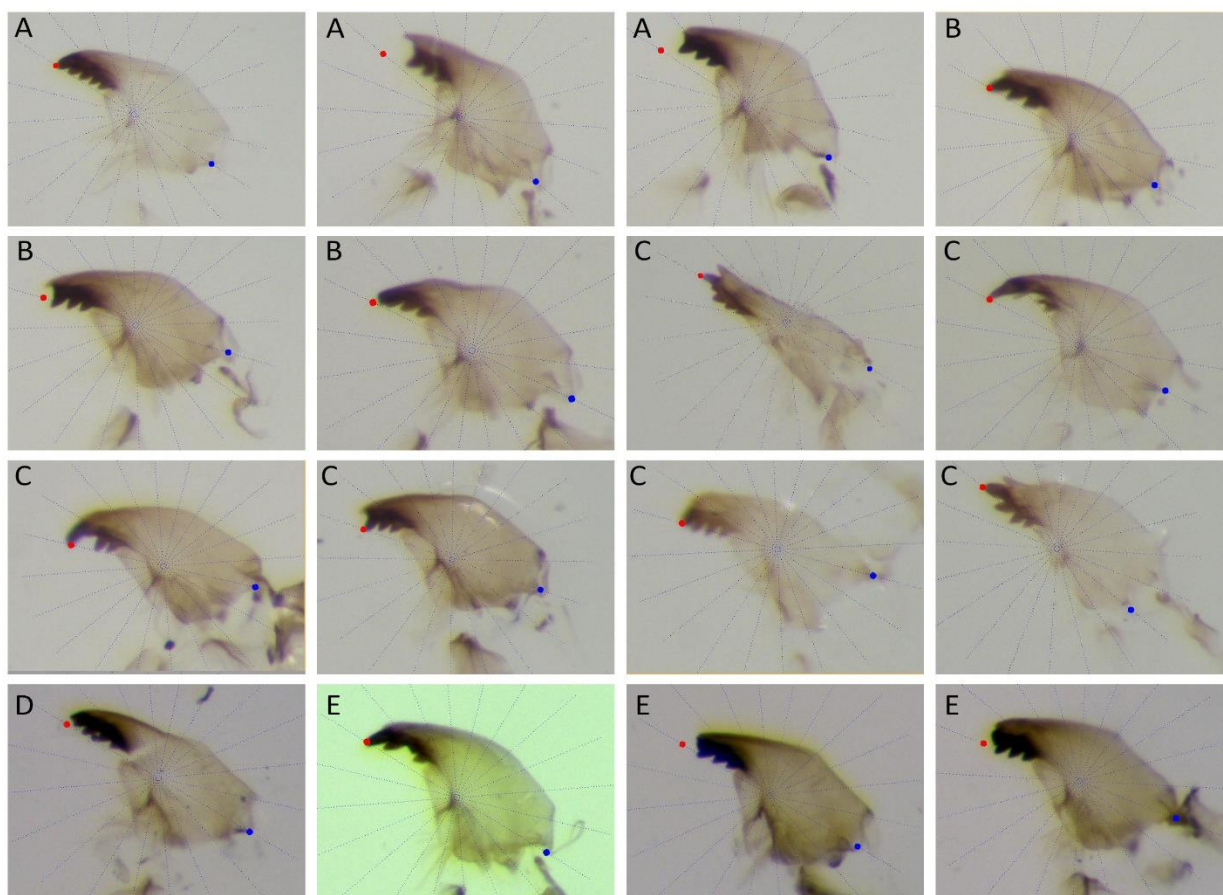
Prilog 5 – Mandibule sa uočenim deformitetima u setu eksperimenata za procenu uticaja nano-CeO₂. Uočeno je ukupno 10 (3,64% od ukupnog uzorka): A – kontrolni tretman; B - 2,5 mg/kg nano-CeO₂; C - 25 mg/kg nano-CeO₂; D - 2500 mg/kg nano-CeO₂.



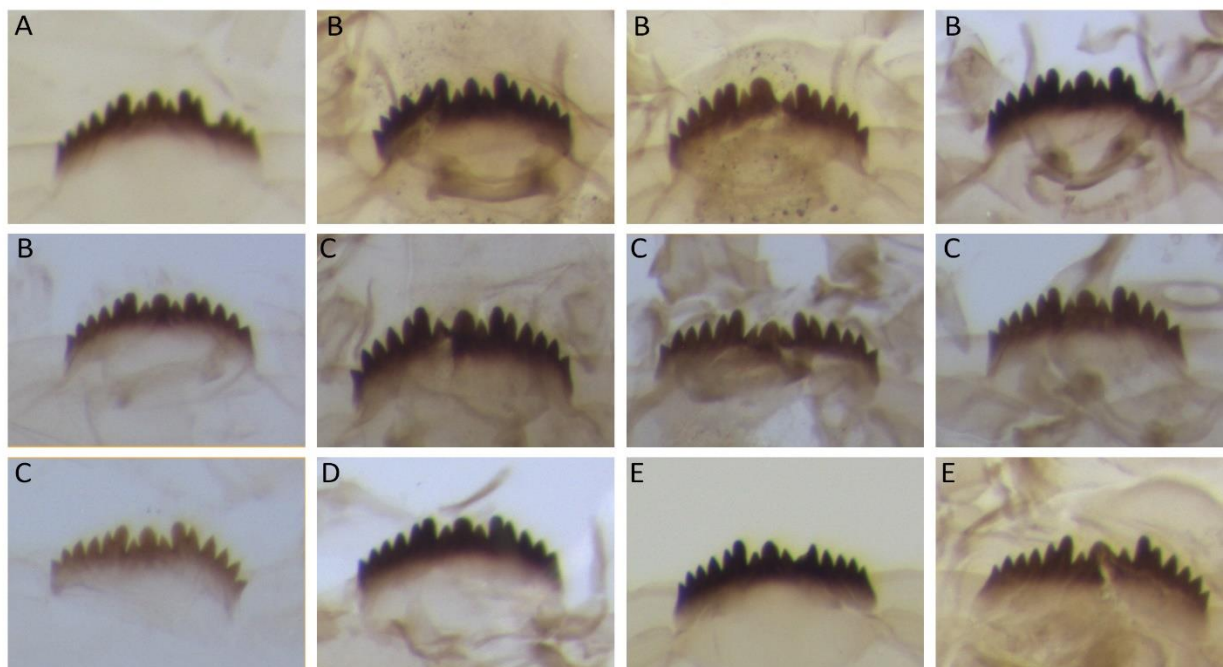
Prilog 6 – Mentumi sa uočenim deformitetima u setu eksperimenata za procenu uticaja nano-CeO₂. Uočeno je ukupno 4 (1,45% od ukupnog uzorka): A – kontrolni tretman; B - 2,5 mg/kg nano-CeO₂; C - 25 mg/kg nano-CeO₂.



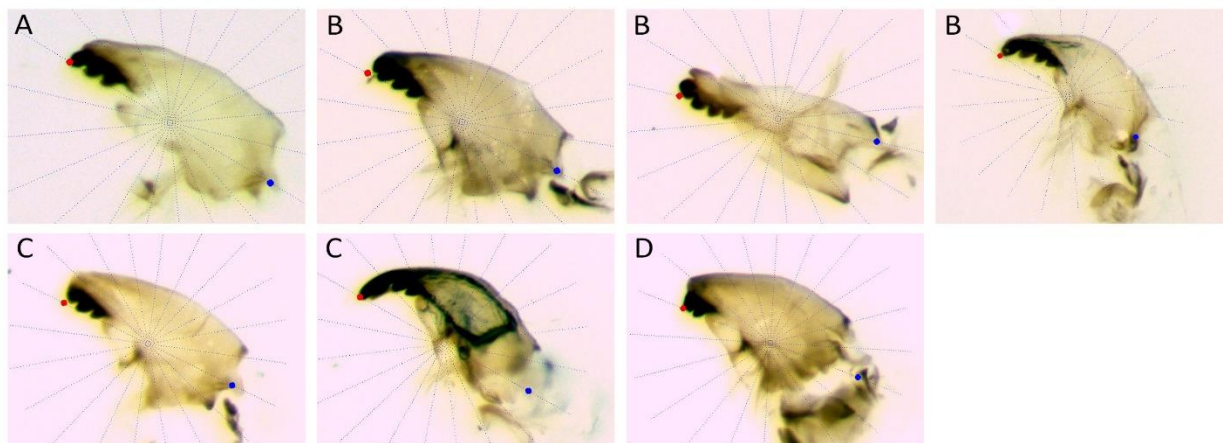
Prilog 7 – Mandibule sa uočenim deformitetima u dodatnom setu eksperimenata za procenu uticaja nano-CeO₂ na podlozi od krupno granulisanog kvarcnog peska. Uočeno je ukupno 16 (5,3% od ukupnog uzorka): A – kontrolni tretman; B - 2,5 mg/kg nano-CeO₂; C - 25 mg/kg nano-CeO₂; D - 250 mg/kg nano-CeO₂; E - 2500 mg/kg nano-CeO₂.



Prilog 8 – Mentumi sa uočenim deformitetima u dodatnom setu eksperimenata za procenu uticaja nano-CeO₂ na podlozi od krupno granulisanog kvarcnog peska. Uočeno je ukupno 12 (4% od ukupnog uzorka): A – kontrolni tretman; B - 2,5 mg/kg nano-CeO₂; C - 25 mg/kg nano-CeO₂; D - 250 mg/kg nano-CeO₂; E - 2500 mg/kg nano-CeO₂



Prilog 9 – Mandibule sa uočenim deformitetima u setu eksperimenata za procenu uticaja nano-Fe₃O₄. Uočeno je ukupno 7 (3,4% od ukupnog uzorka): A – kontrolni tretman; B – 1 mg/kg nano-Fe₃O₄; C - 5 mg/kg nano-Fe₃O₄; D - 10 mg/kg nano-Fe₃O₄.



Izvod

S napretkom ljudske populacije i razvojem tehnologije i industrije neminovan je i porast antropogenog pritiska koji narušava homeostazu prirodnih ekosistema. Ekspanzija nanotehnologije, koja je pokretač nove industrijske revolucije, usloвила je neophodnost usavršavanja ekotoksikoloških ispitivanja i kontrole proizvodnje nanotehnoških proizvoda.

Ovo istraživanje tiče se ekotoksikologije nerastvorljivih čestica antropogenog porekla koje se talože na dnu vodenih sistema i time utiču na zajednice hidrobiocenoza. Ispitivana je toksičnost tri oksida metala u nanoformi: titanijum dioksida, nano-TiO₂ (koristi se kao boja u ljudskoj ishrani), cerijum oksida, nano-CeO₂ (koristi se u automobilske industriji) i gvožđe oksida, nano-Fe₃O₄ (magnetne nanočestice proizvedene za upotrebu u medicini).

Pomoću savremenih metoda izvršena je detaljna karakterizacija nanočestica (BET analiza specifične površine; XPS analiza površinske hemije; XRD analiza faznog sastava i kristalne strukture; TEM, SEM i AFM za analizu veličine i agregacije nanočestica, kao i fotografisanje uzoraka; EDX kvalitativno i kvantitativno određivanje elemenata; DLS analiza hidrodinamičkog prečnika, indeksa polidisperziteteta i ζ potencijala, kao i *in situ* karakterizacija nanočestica u samom eksperimentalnom sedimentu, EDX i SEM).

Nakon karakterizacije sprovedeni su multiparametarski biološki testovi, na osnovu laboratorijskih protokola OECD-a, na akvatičnim model-organizmima, predstavnicima familije Chironomidae (Diptera): *Chironomus tentans* i *Chironomus riparius*. Analiziran je niz standardnih (mortalitet, preživljavanje, vreme, stopa i odlaganje razvića), kao i nestandardnih savremenih biomarkera (oksidativni stres – lipidna i proteinska oksidacija, aktivnost superoksid dismutaze i katalaze, izraženi preko ukupne količine proteina; *in vivo* genotoksičnost analizom oštećenja DNK; promena koncentracije hemoglobina; promena morfološke varijabilnosti). Prvi put u dosadašnjoj literaturi upotrebljen je metod geometrijske morfometrije za sveobuhvatna ispitivanja toksičnosti nanočestica.

Dokazana je bioakumulacija svih nanočestica od strane model-organizama. Utvrđena je subletalna toksičnost nanočestica oksida titanijuma, cerijuma i gvožđa, dok je u slučaju nano-TiO₂ utvrđen i letalni efekat. Modifikovani OECD protokol broj 218 sa upotrebom *C. riparius* model-organizma, podloge od finog kvarcnog peska, detaljne karakterizacije nanočestica, analize bioakumulacije, analize standardnih i komplementarnih subletalnih biomarkera, omogućava efikasnu procenu toksičnosti i monitoring nanočestica u akvatičnim ekosistemima.

SUMMARY

This research deals with ecotoxicity of insoluble metal oxide nanoparticles, that deposit at the bottom of aquatic ecosystems and therefore influence the hydrobiocenosis community: titanium dioxide nano-TiO₂ (used as a food colour), cerium oxide nano-CeO₂ (used in the automotive industry) and iron oxide nano-Fe₃O₄ (magnetic particles manufactured for medicinal use).

Detailed characterisation of examined nanoparticles was conducted through contemporary analytical methods (for the analysis of specific surface-BET; surface chemistry-XPS; phase and crystal structure-XRD; size, aggregation and sample photographing-TEM, SEM and AFM; qualitative and quantitative element analysis-EDX; hydrodynamic diameter, polydispersity index and ζ-potential-DLS; *in situ* nanoparticle characterisation in the experimental sediment-EDX and SEM). Multiparametric bioassays were conducted, according to the OECD protocol, on aquatic model organisms: Chironomidae (Diptera): *Chironomus tentans* and *Chironomus riparius*. A series of standard (mortality, survival rate, developmental time and rate and emergence delay), as well as nonstandard biomarkers were analysed (oxidative stress-lipid and protein oxidation, SOD and CAT activity, expressed by total protein content; *in vivo* genotoxicity via DNA damage analysis; haemoglobin concentration; morphological variability change). For the first time in known literature geometric morphometric method was used for comprehensive nanoparticle toxicity analysis.

Bioaccumulation of all tested nanoparticles by model organisms has been proven. The sublethal toxicity of titanium, cerium and iron oxide nanoparticles was determined, while in the case of nano-TiO₂, a lethal effect was observed as well. Modified OECD protocol number 218 that implies using *C. riparius* as model organism, fine quartz sand substrate, detailed nanoparticle characterization, bioaccumulation analysis, analysis of standard and complementary sublethal biomarkers, enables efficient assessment of toxicity and monitoring of nanoparticles in aquatic ecosystems.

Biografija i bibliografija autora

BIOGRAFIJA

Dimitrija Savić Zdravković rođena je 27. aprila 1990. godine u Nišu. Osnovnu, a potom i srednju umetničku školu u Nišu završava sa odličnim uspehom i kao nosilac Vukove diplome. Osnovne diplomatske studije biologije završava 2012, a 2013. godine upisuje master akademske studije na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu, smer ekologija i zaštita prirode. Zvanje master ekolog stiče 2015. sa prosečnom ocenom 9,80. Doktorske akademske studije upisuje 2015. godine na istom fakultetu. Položila je sve ispite predviđene planom i programom doktorskih akademskih studija sa ocenom 10.

Kao Stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja od 2016. do aprila 2018. bila je angažovana na projektu „Biosensing tehnologije i globalni sistem za kontinuirana istraživanja i integrisano upravljanje ekosistemima“, III43002. Od aprila 2018. bila je zaposlena na istom projektu kao istraživač-pripravnik, a od aprila 2019. kao istraživač-saradnik. Od januara 2020. zaposlena je kao istraživač-saradnik na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu, prema ugovoru 451-03-68/2020-14/200124 o finasiranju naučno-istraživačkog rada Fakulteta u 2020. godini. Od 2017. angažovana je u izvođenju praktične nastave u okviru četiri predmeta na Departmanu za biologiju i ekologiju ovog fakulteta.

Učesnik je nekoliko međunarodnih projekata: od 2019. godine Erasmus+ KA2 projekat „ECOBIAS“; tokom 2018. godine H2020-INFRAIA projekat broj 731065 „AQUACOSM“ sa boravkom u Ankari, Turska. Kao stipendista nemačke službe za akademsku razmenu, DAAD, sprovela je i kratki istraživački boravak na LMU Univerzitetu u Minhenu, Nemačka, 2017. godine.

Član je evropskog udruženja toksikologa SETAC, Srpskog biološkog društva i Entomološkog društva Srbije. Sekretar je i član upravnog odbora Biološkog društva „Dr Sava Petrović“. Trenutni je rukovodilac projekta „Skriveni uglovi Srbije“ i dobitnik dva konzervaciona granta fondacije The Rufford iz Velike Britanije.

BIBLIOGRAFIJA**A. Radovi u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (M21a)**

- Nikola Stanković, Ivana Kostić, Boris Jovanović, **Dimitrija Savić-Zdravković**, Sanja Matić, Jelena Bašić, Tatjana Cvetković, Jelica Simeunović, Djuradj Milošević: *Can phytoplankton blooming be harmful to benthic organisms? The toxic influence of Anabaena sp. and Chlorella sp. on Chironomus riparius larvae.* Science of The Total Environment, 04/2020, 729, p.138666., DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138666>
- Jelena Stanković, Djuradj Milosevic, **Dimitrija Savić-Zdravković**, Gülce Yalçın, Dilvin Yildiz, Meryem Beklioglu, Boris Jovanovic: *Exposure to a microplastic mixture is altering the life traits and is causing deformities in the non-biting midge Chironomus riparius Meigen (1804).* Environmental pollution, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114248>
- Djuradj Milošević, Aleksandar Milosavljević, Bratislav Predić, Andrew S. Medeiros, **Dimitrija Savić-Zdravković**, Milica Stojković Piperac, Tijana Kostić, Filip Spasić, Florian Leese: *Application of deep learning in aquatic bioassessment: towards automated identification of non-biting midges.* Science of The Total Environment 11/2019, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135160>

B: Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

- Dimitrija Savić-Zdravković**, Đurađ Milošević, Ezgi Uluer, Hatice Duran, Sanja Matić, Snežna Stanić, Janja Vidmar, Janez Ščančar, Domagoj Dikić, Boris Jovanović: *A Multiparametric Approach to Cerium Oxide Nanoparticle Toxicity Assessment in Non-Biting Midges.* Environmental Toxicology and Chemistry 10/2019; 39(1)., DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.4605>
- Dimitrija Savić-Zdravković**, Boris Jovanović, Aca Đurđević, Milica Stojković-Piperac, Ana Savić, Janja Vidmar, Djuradj Milošević: *An environmentally relevant concentration of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles induces morphological changes in the mouthparts of Chironomus tentans.* Chemosphere 07/2018; 211., DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.139>

C. Radovi u nacionalnim časopisima (M53)

Dimitrija Savić-Zdravković, Aca Đurđević, Zorana Lazarević, Nastasija Manić, Djuradj Milošević: *Affordable chironomid housing: proposed modifications of standard OECD substrate for testing of chemicals on aquatic midges*, *Biologica Nyssana*, accepted 26.03.2020. 11(1). In editing

Marko Nikolić, **Dimitrija Savić**, Maja Ilić, Dragana Stojadinović, Jelka Crnobrnja-Isailović: *A Note On Scavenging Behaviour Of Adult Hermann 'S Tortoise (Testudo Hermannii)*. 10/2016; 7(1):53-55., DOI:10.5281/zenodo.159104
<http://journal.pmf.ni.ac.rs/bionys/index.php/bionys/article/view/136>

D. Saopštenja na naučnim skupovima međunarodnog značaja štampana u izvodu (M34)

Jelena Stanković, Boris Jovanović, **Dimitrija Savić-Zdravković**, Ana Savic, Djuradj Milošević: *Influence of mixture of microplastic particles (MP) on non-biting midges of Chironomus riparius in laboratory setup*. 11th Symposium for European Freshwater Sciences, Zagreb, Croatia; 07/2019

Dimitrija Savić-Zdravković, Djuradj Milošević, Jelena Stanković, Aca Đurđević, Hatice Duran, Ezgi Uluer, Sanja Matić, Snežana Stanić, Janja Vidmar, Katarina Marković, Janez Ščančar, Domagoj Đikić, Marko Miliša, Boris Jovanović: *Evaluation of Cerium-oxide (CeO₂) nanoparticle toxicity to freshwater midge Chironomus riparius (Diptera, Chironomidae) - potential biomarkers*. 11th Symposium for European Freshwater Sciences, Zagreb, Croatia; 07/2019

Marko Lj. Nikolić, Jovana Cvetković, **Dimitrija Savić-Zdravković**, Jelena Conić, Milan Ilić, Slobodan Marković, Anđela Vučković, Biljana Macura, Jelka crnobrnja-isailovic: *Wildlife conservation and local folklore*. 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Stara planina Mt.; 06/2019

Dimitrija Savić-Zdravković: *Unraveling the hidden corners of Serbian nature*. INTERNATIONAL Rufford Small Grants Conference (2018 ; Silver Lake) Explore and protect the natural beauty of Balkans, Silver Lake, Serbia; 09/2018

Aca Djurdjević, Vladimir Žikić, **Dimitrija Nebojša Savić**, Maja Lazarević, Djuradj Milošević: *Can we guess the autecology following the variability of mandible shape in the Chironomidae family?*. 20th International Symposium on Chironomidae, MUSE - Museo delle Scienze, Trento, Italy.; 07/2017

Dimitrija Savić, Boris Jovanović, Aca Djurdjević, Milica Stojković Piperac, Ana Savić, Djuradj Milošević: *Variability of mentum shape in Chironomus tentans (Diptera, Chironomidae) larvae as an indicator of nano-TiO₂ contamination*. 20th International Symposium on Chironomidae, MUSE - Museo delle Scienze, Trento, Italy.; 07/2017

Jelka Crnobrnja-Isailović, Ilić Maja, Milićević Jelena, Ćosić Nada, Ćorović Jelena, Jovanović Bogdan, Ilić Marija, Nikolić Marko, **Savić Dimitrija**, Tijana Čubrić, Lazić Marko, Milošević Đurađ, Stojadinović Dragana: *Transition, urbanization approach and degree of impoverishment of local batracho- and herpetofauna..* The 8th World Congress of Herpetology, Hanzhou, China; 08/2016

Sabrina Eidinger, Vangelis Mizerakis, Gregorio Alejandro López Moreira Mazacotte, **Dimitrija Savić**, Libe Solagaistua, Anastasia Lampou, Momir Paunović, Nikos Skoulikidis: *Insights from stream ecological assessment on the Aegean island of Samothraki: aquatic chemistry and macroinvertebrate community*. Sustainable Mediterranean 2016: 39. <http://mio-ecsde.org/wp-content/uploads/2017/01/Sust-Med-73.pdf#page=41>

Maja Ilić, Marko Lj. Nikolić, **Dimitrija Nebojša Savić**, Jelka Crnobrna-Isailovic: *Amphibians on the territory of Niš*. Symposium on the flora of southeastern Serbia and neighboring regions, Kopaonik Mt.; 06/2016

E. Saopštenja na naučnim skupovima nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64)

Dimitrija Savić-Zdravković, Boris Jovanović, Aca Đurđević, Jelena Stanković, Stefan Nikolić, Nastasija Manić, Lazarević Zorana, Marko Janković, Vladimir Nikolić, Djuradj Milošević, Milan Ilić: *VRSTE IZ RODA CHIRONOMUS (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) KAO BIOINDIKATORI PRISUSTVA NANOČESTICA U VODENIM EKOSISTEMIMA*. XII Simpozijum Entomologa Srbije, Niš, Serbia. University of Niš 25-29th IX 2019; 10/2019

Aca Đurđević, Marko Lj. Nikolić, **Dimitrija Savić-Zdravković**, Milan Ilić, Miloš A Popović, Djuradj Milošević: *PREGLED FAUNE VILINSKIH KONJICA (ODONATA) GRADA NIŠA*

(SRBIJA). XII Simpozijum Entomologa Srbije, Niš, Serbia. University of Niš 25-29th IX 2019; 10/2019

Milan Ilić, Marko Lj. Nikolić, **Dimitrija Savić-Zdravković**, Aca Đurđević, Miloš A Popović: *AFINITET VRSTA ZERYNTHIA CERISY I Z. POLYXENA PREMA ODREĐENIM TIPOVIMA STANIŠTA (LEPIDOPTERA: PAPILIONIDAE)*. XII Simpozijum Entomologa Srbije, Niš, Serbia. University of Niš 25-29th IX 2019; 10/2019

Dimitrija Savić-Zdravković, Marko Lj. Nikolić, Milan Ilić, Aca Đurđević: *PRELIMINARNI PRIKAZ FAUNE VILINIH KONJICA (ODONATA) SLIVA TIMOKA U SRBIJI*. XII Simpozijum Entomologa Srbije, Niš, Serbia. University of Niš 25-29th IX 2019; 10/2019

Marko Lj. Nikolić, Milan Ilić, **Dimitrija Savić-Zdravković**, Aca Đurđević: *PRILOG POZNAVANJU DISTRIBUCIJE VRSTA CORDULEGASTER BIDENTATA I C. HEROS (ODONATA: CORDULEGASTRIDAE) U SRBIJI*. XII Simpozijum Entomologa Srbije, Niš, Serbia. University of Niš 25-29th IX 2019; 10/2019

Dimitrija Savić-Zdravković, Lazarević Zorana, Aca Đurđević, Jelena Stanković, Djuradj Milošević: *The influence of substrate type on mentum deformity variability of Chironomus tentans Fabricius, 1805 in toxicity tests*. 2nd congress of Serbian biologists, Kladovo, Serbia; 09/2018

Aca Đurđević, Miloš A Popović, Irena Raca, **Dimitrija Savić-Zdravković**: *PRVI PREGLED FAUNE VILINSKIH KONJICA (Odonata) DELIJSKOG VISA (Niš, Srbija)*. XI Simpozijum Entomologa Srbije, Goč, Serbia; 09/2017

Izjave autora

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Екотоксичност наночестица оксида метала и потенцијалне методе за њихов биомониторинг у акватичним екосистемима

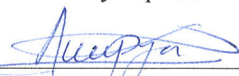
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 24.06.2020.

Потпис аутора дисертације:


Димитрија Н. Савић Здравковић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

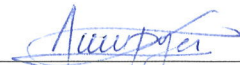
Наслов дисертације:

**Екотоксичност наночестица оксида метала и потенцијалне методе за њихов
биомониторинг у акватичним екосистемима**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 24.06.2020.

Потпис аутора дисертације:



Димитрија Н. Савић Здравковић

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Екотоксичност наночестица оксида метала и потенцијалне методе за њихов биомониторинг у акватичним екосистемима

која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 24.06.2020.

Потпис аутора дисертације:



Димитрија Н. Савић Здравковић