Stabilizacija nanočestica srebra proteinima i površinski aktivnim tvarima u morskoj vodi

Levak Zorinc, Maja

Doctoral thesis / Disertacija

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:708279

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Geološki odsjek

Maja Levak Zorinc

STABILIZACIJA NANOČESTICA SREBRA PROTEINIMA I POVRŠINSKI AKTIVNIM TVARIMA U MORSKOJ VODI

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020.

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Geološki odsjek

Maja Levak Zorinc

STABILIZACIJA NANOČESTICA SREBRA PROTEINIMA I POVRŠINSKI AKTIVNIM TVARIMA U MORSKOJ VODI

DOKTORSKI RAD

Mentor:

dr.sc. Željko Jakšić

Zagreb, 2020.

University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

Deparment of Geology

Maja Levak Zorinc

STABILIZATION OF SILVER NANOPARTICLES WITH PROTEINS AND SURFACTANTS IN SEAWATER

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:

Željko Jakšić, PhD

Zagreb, 2020.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Laboratoriju za morsku nanotehnologiju i biotehnologiju Centra za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr.sc. Željka Jakšića, v.zn.sur., u sklopu Interdiciplinarnog doktorskog studija iz Oceanologije pri Geološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALE

U prvom redu želim se zahvaliti na pruženoj prilici ljudima koji su me zaposlili: mome mentoru, dr. sc. Željku Jakšiću; na vođenju tijekom doktorata, strpljenju, ispravljanju razno-raznih „draftova“ i guranju do cilja. Hvala i voditelju laboratorija, dr.sc. Danielu Marku Lyonsu na svemu što je učinio za mene i svim pruženim prilikama tijekom doktorata.

Od srca hvala svima koji su mi pomogli s mjerenjima, savjetima, na praćenju i usmjeravanju, a to su: dr.sc. Maja Dutour Sikirić, dr.sc. Darija Domazet Jurašin, dr. Kristina Pikelj, dr.sc. Nevenka Mikac, dr.sc. Niko Bačić, Florian Meier, PhD, Luigi Calzolai, PhD, dr.sc. Petra Peharec Štefanić, dr.sc. Marin Petrović, dr.sc. Petra Burić, dr.sc. Lara Jurković, Nataša Kužat, Vedrana Antolić... Thank you very much.

Bez moje obitelji koja me podigla, žrtvovala se i bila uvijek uz mene, vjerovatno ne bi bilo niti ovih zahvala: hvala tati Vilimu, mami Milkici, sestri Marini, bakama Emiliji i Štefici, ujaku Žarku, hvala Caki i Sanjana.

Najdraži Lara i Gregore...
Vi ste svjetlo i radost mog života i zato ovaj doktorat
posvećujem vama.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Geološki odsjek

Doktorski rad

STABILIZACIJA NANOČESTICA SREBRA PROTEINIMA I POVRŠINSKI AKTIVNIM TVARIMA U MORSKOJ VODI

Maja Levak Zorinc

Laboratorij za morsku nanotehnologiju i biotehnologiju, Centar za istraživanje mora, Institut Ruđer Bošković, G. Paliage 5, Rovinj

Nanočestice srebra (engl. *Silver Nanoparticles,* AgNP) najšire su primjenjivana vrsta nanočestica zbog svojih antibakterijskih svojstava. Međutim, njihovo dospijevanje i zadržavanje u prirodnim vodama nije poželjno jer je nađeno da koloidno stabilne nanočestice osim na bakterije, štetno djeluju i na vodene organizme. Dosadašnja istraživanja upućuju na to da u morskoj vodi, AgNP brzo agregiraju i talože iz vodenog stupca. Cilj ovog rada je stoga istražiti utjecaj potencijalnih stabilizatora prisutnih u morskoj vodi na stabilizaciju AgNP. Istraživanja u ovom radu pokazala su da modelni protein, albumin iz goveđeg seruma (engl. *Bovine Serum Albumin,* BSA) može stabilizirati nanočestice srebra u umjetnoj morskoj vodi saliniteta između 5 i 38 kada su maseni omjeri proteina prema nanočesticama od 133:1 do 3332:1. Pri istim uvjetima i otapanje nanočestica je usporeno. Nanočestice srebra djelomično su stabilizirane i proteinima iz seruma hemolimfe mediteranske dagnje *Mytillus galloprovincialis* i celomske tekućine hridinastog ježinca, *Paracentrotus lividus*, također u umjetnoj morskoj vodi. Samo neionske površinski aktivne tvari uspješno su stabilizirale nanočestice, od kojih su se kao najbolji stabilizatori pokazale površinske aktivne tvari iz grupe Tweena. Tween 80 stabilizirao je AgNP u filtriranoj i nefiltriranoj prirodnoj morskoj vodi, ali ne i u umjetnoj morskoj vodi. Tween 80 je također jedini od ispitanih površinski aktivnih tvari usporio heteroagregaciju AgNP s česticama sedimenta. Potvrđeno je i da nanočestice stabilizirane prije dospijevanja u morsku vodu u manjoj mjeri podliježu heteroagregaciji s prisutnim sedimentom. Navedeni rezultati tvore temelj za daljnja istraživanja dugoročne sudbine nanočestica srebra i ostalih hidrofobnih nanočestica u moru i potrebi istraživanja njihove koloidne stabilnosti u različitim nišama morskog okoliša.

(147 stranica, 60 slika, 21 tablica, 193 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: albumin iz goveđeg seruma, montmorilonit, morska voda, nanočestice srebra, površinski aktivne tvari, prirodni sediment, proteini, serum celomske tekućine, serum hemolimfe.

Mentor: dr.sc. Željko Jakšić, v. zn. sur.

Ocjenjivači: dr.sc. Maja Dutour Sikirić
dr.sc. Tea Mišić Radić
prof. dr.sc. Davor Kovačević

Rad prihvaćen: 11.9.2020.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Geology

Doctoral thesis

STABILIZATION OF SILVER NANOPARTICLES WITH PROTEINS AND SURFACTANTS IN SEAWATER

Maja Levak Zorinc

Laboratory for Marine Nanotechnology and Biotechnology, Center for Marine Research, Ruđer Bošković Institute, G. Paliage 5, Rovinj

Silver nanoparticles (AgNP) are the most widely used type of nanoparticles due to their antimicrobial properties. Nevertheless, their arrival and persistence in natural waters is unwished-for due to the toxic effects of colloidally stable AgNP on aquatic organisms. Current studies indicate that AgNP are rapidly aggregating and settling out of the marine water column. The aim of this thesis is to examine the effect of naturally occurring potential stabilizers on AgNP colloidal stability in seawater. Results have shown that model protein, bovine serum albumin (BSA) has a stabilizing effect on silver nanoparticles in artificial seawater when the salinity is between 5 and 38 and BSA to AgNP mass ratios are between 133:1 and 3332:1. Under the same conditions, silver nanoparticles dissolute more slowly in the presence of BSA. Dispersion of AgNP is partly stabilized in artificial seawater by serum proteins from hemolymph of Mediterranean mussel *M. galloprovincialis* and serum proteins from coelomic fluid of sea urchin *P. lividus*. Only nonionic surfactants successfully stabilized silver nanoparticles, among which Tween 80 showed the most pronounced stabilizing effect in filtered and non-filtered natural seawater. Interestingly, stabilization of AgNP with Tween 80 in artificial seawater did not occur. In the presence of model (montmorillonite) and natural sediment from Lim Bay, same surfactant slowed down the heteroaggregation of nanoparticles with sediment particles. If AgNP are already stabilized with surfactants when entering seawater, they are less susceptible to heteroaggregation. Results from this thesis provide a foundation for further research on long-term colloidal stability of silver and other hydrophobic nanoparticles in different niches of marine ecosystem.

(147 pages, 60 pictures, 21 tables, 193 references, original in Croatian)

Keywords: BSA, coelomic fluid serum, hemolymph serum, montmorillonite, natural sediment, proteins, seawater, silver nanoparticles, surfactants, Tween 80.

Supervisor: Željko Jakšić, PhD, senior research associate

Reviewers: Maja Dutour Sikirić, PhD
Tea Mišić Radić, PhD
prof. Davor Kovačević, PhD

Thesis accepted: 11.9.2020.

Sadržaj

1. Uvod ... 1
2. Cilj i hipoteze istraživanja ... 3
3. Literaturni pregled ... 4
3.1. Nanotehnologija i nanomaterijali ... 4
3.2. Prirodne i antropogene nanočestice ... 5
3.3. Fizikalni razlozi posebnosti nanočestica u odnosu na makroskopske čestice ... 6
3.4. Električni dvosloj i zeta potencijal ... 7
3.5. DLVO teorija i utjecaj elektrolita na stabilnost koloidnih sustava ... 8
3.6. Nanočestice srebra ... 10
3.7. Mogući putevi ulaska nanočestica srebra u okoliš ... 12
3.8. Sudbina nanočestica srebra u prirodnim vodenim sustavima i mogući stabilizatori ... 13
3.9. Koloidna stabilnost nanočestica srebra u modelnim i prirodnim vodenim sustavima s dodatkom huminskih spojeva, polisaharida i proteina ... 14
3.10. Otapanje nanočestica srebra u prirodnim vodama ... 23
3.11. Međudjelovanja površinski aktivnih tvari i nanočestica u prirodnim vodama ... 25
3.12. Nanočestice i sediment u vodenim sustavima ... 26
4. Eksperimentalni dio ... 31
4.1. Materijali i priprema uzoraka ... 31
4.1.1. Kemikalije ... 31
4.1.2. Sinteza nanočestica srebra ... 33
4.1.3. Priprava medija za disperziju nanočestica srebra ... 33
4.1.4. Uzorkovanje seruma morskih beskralježnjaka ... 35
4.1.5. Priprema prirodnog sedimenta iz Limskog kanala ... 36
4.1.6. Priprema uzoraka za eksperimente stabilizacije nanočestica srebra proteinima ... 36
4.1.6.1. Priprema uzoraka za stabilizaciju nanočestica srebra albuminom iz goveđeg seruma ... 36
4.1.6.2. Priprema uzoraka za stabilizaciju nanočestica srebra proteinima iz seruma morskih beskralježnjaka ... 37
4.1.7. Priprema uzoraka za eksperimente stabilizacije nanočestica srebra pomoću površinski aktivnih tvari i polimera ... 38
4.1.8. Dodatak površinski aktivnih tvari nanočesticama srebra uz prisustvo modelnog i prirodnog sedimenta ... 39
4.1.8.1. Scenarij I – naknadni dodatak modelnog i prirodnog sedimenta ... 39
4.1.8.2. Scenarij II – istovremeni doticaj nanočestica srebra sa sedimentom i površinski aktivnim tvarima ... 40
4.1.8.3. Scenarij III – remobilizacija nanočestica srebra s modelnog sedimenta uz pomoć površinski aktivnih tvari u ultračistoj vodi ... 41

4.2. Metode 41
4.2.1. Karakterizacija medija 41
4.2.1.1. Određivanje saliniteta prirodne morske vode 41
4.2.1.2. Određivanje sadržaja otopljenog i čestičnog organskog ugljika u prirodnoj morskoj vodi 42
4.2.2. Određivanje koncentracije proteina iz seruma morskih beskralježnjaka metodom po Bradfordu 42
4.2.3. Karakterizacija sedimenta 43
4.2.3.1. Određivanje sastava 43
4.2.3.2. Određivanje ukupne površine 43
4.2.3. Određivanje stabilnosti nanočestica u ispitivanim sustavima 44
4.2.3.1. Određivanje koloidne stabilnosti nanočestica srebra UV-VIS spektroskopijom 44
4.2.4.2. Određivanje hidrodinamičkog promjera nanočestica dinamičkim raspršenjem svjetlosti 45
4.2.5. Određivanje koncentracije iona i nanočestica srebra u ispitivanim sustavima 45
4.2.5.1. Određivanje koncentracije iona srebra spektrometrijom masa s induktivno-spregnutom plazmom 45
4.2.5.2. Procjena koncentracije nanočestica srebra u vodenom stupcu pomoću UV-Vis spektroskopije 46
4.2.6. Elektronska mikroskopija 46
4.2.6.1. Transmisijska elektronska mikroskopija 46
4.2.6.2. Pretražna elektronska mikroskopija 47
4.2.6.3. Analiza mikrografija 47
4.2.7. Obrada podataka 47
5. Rezultati i Rasprava 42
5.1. Karakterizacija materijala 42
5.1.1. Karakterizacija nanočestica 42
5.1.2. Sadržaj otopljenog i čestičnog organskog ugljika u morskoj vodi 45
5.1.3. Karakterizacija sedimenta 46
5.1.3.1. Pretražna elektronska mikroskopija modelnog i prirodnog sedimenta 46
5.1.3.2. Određivanje specifične površine sedimenata 47
5.1.3.3. Određivanje mineralnog sastava 47
5.2. Stabilizacija nanočestica srebra proteinima u umjetnoj morskoj vodi 52
5.2.1. Stabilizacija nanočestica srebra albuminom iz goveđeg seruma u morskoj vodi 52
5.2.1.1. Utjecaj veličine nanočestice na stabilizaciju albuminom iz goveđeg seruma 52
5.2.1.2. Utjecaj saliniteta na stabilnost nanočestica srebra stabiliziranih albuminom iz goveđeg seruma 58

5.2.1.3. Utjecaj početne koncentracije disperzija nanočestica srebra stabiliziranih s albuminom iz goveđeg seruma na njihovu koloidnu stabilnost 62

5.2.1.4. Utjecaj koncentracije albumina iz goveđeg seruma na koloidnu stabilnost nanočestica srebra 65

5.2.1.5. Otapanje nanočestica srebra različitih veličina stabiliziranih s BSA 70

5.2.1.6. Otapanje nanočestica srebra bez i s dodatkom albumina iz goveđeg seruma . 72

5.2.2. Stabilizacija nanočestica srebra proteinima iz seruma morskih beskralježnjaka ... 76

5.2.2.1. Stabilizacija nanočestica srebra proteinima iz seruma mediteranske dagnje *M. galloprovincialis* 76

5.2.2.2. Stabilizacija nanočestica srebra proteinima iz seruma celomske tekućine ježinca *P.lividus* 78

5.3. Stabilizacija nanočestica srebra površinski aktivnim tvarima u morskoj vodi 85

5.3.1. Ispitivanje koloidne stabilnosti nanočestica srebra uz dodatak površinski aktivnih tvari i polimera u umjetnoj morskoj vodi niskog saliniteta 85

5.3.2. Stabilizacija nanočestica srebra Tweenom 80 u umjetnoj i prirodnoj morskoj vodi 87

5.3.2.1. Rezultati UV-VIS spektroskopije 87

5.3.2.2. Rezultati dinamičkog raspršenja svjetlosti 93

5.3.2.3. Morfologija nanočestica srebra stabiliziranih s Tweenom 80 94

5.3.2.3.1. Pretražna elektronska mikroskopija nanočestica stabiliziranih s Tweenom 80 u ultračistoj vodi 94

5.3.2.3.2. Pretražna elektronska mikroskopija nanočestica srebra s dodatkom Tweena 80 u umjetnoj i prirodnoj morskoj vodi 95

5.3.2.3.3. Transmisijska elektronska mikroskopija nanočestica srebra s Tweenom 80 u umjetnoj i filtriranoj prirodnoj morskoj vodi 97

5.3.3. Stabilizacija nanočestica srebra površinskim stabilizatorima prije i nakon dodavanja prirodne morske vode 100

5.4. Stabilnost nanočestica srebra u prisutnosti modelnog i prirodnog sedimenta 103

5.4.1. *Scenarij I:* Naknadni dodatak montmorilonita srebrnim nanočesticama stabiliziranim površinskim stabilizatorima u ultračistoj vodi 103

5.4.2. *Scenarij I:* Naknadni dodatak montmorilonita srebrnim nanočesticama stabiliziranim Tweenom 80 u umjetnoj i prirodnoj morskoj vodi 104

5.4.3. *Scenarij II:* Istovremeni doticaj nanočestica srebra, stabilizatora i modelnog sedimenta 106

5.4.3.1. Kratkotrajno miješanje 106

5.4.3.2. Neprestano miješanje 110

5.4.4. *Scenarij III:* Polukvantitativno određivanje uspješnosti remobilizacije nanočestica srebra s modelnog sedimenta 114

5.4.5. Pretražna elektronska mikroskopija za modelni i prirodni sediment sa srebrnim nanočesticama i Tweenom 80 117

6. Sažetak rasprave 123

7. Zaključci 128
8. Popis simbola i kratica 129
9. Literaturni izvori 130
10. Životopis 146

1.UVOD

1. Uvod

Koloidna stabilnost nanočestica srebra važna je za njihovu primjenu jer samo koloidno stabilne, neagregirane nanočestice daju željena svojstva u proizvodima i procesima u kojima se koriste. Međutim, stabilne ili naknadno stabilizirane nanočestice predstavljaju opasnost za morske organizme jer se dulje zadržavaju u vodenom stupcu, postupno otapaju i imaju štetne učinke na morsku biotu.

Nanočestice se u vodene sustave mogu otpuštati tijekom proizvodnje, upotrebe i odlaganja proizvoda koji ih sadrže ili ispiranjem tla, a ulaskom u vodotok mogu na koncu završavati u morskom ekosustavu. Iako su najvjerojatniji scenariji sudbine nanočestica u morskoj vodi otapanje, agregacija i taloženje (prvenstveno zbog visoke koncentracije soli, ali i zbog suspendirane tvari u vodenom stupcu)[1,2,3,4,5], pažnja se treba obratiti i na potencijalne stabilizatore koji bi mogli osigurati koloidnu stabilnost određenog dijela u okoliš ispuštenih nanočestica.

Dispergirane odnosno neagregirane nanočestice mobilnije su u odnosu na veće koloidne čestice i suspendiranu tvar pa zato mogu dospijevati na veće udaljenosti, što pospješuje njihovu biodostupnost organizmima u vodenom stupcu. Glavni razlog primjene srebrnih nanočestica je učinkovito ubijanje bakterija[6] zbog postupno otpuštanih iona srebra, Međutim, letalni učinak događa se i kod jednostaničnih organizmima poput fitoplanktona[7,8] te viših organizama kao što su žarnjaci, člankonošci[9], bodljikaši[10] i mekušci[11]. Za agregirane nanočestice i one koje su promijenile specijaciju[12] zasad nisu uočeni toksični učinci[13]. Zbog navedenoga, upravo koloidno stabilne nanočestice srebra predstavljaju potencijalnu opasnost po morske organizme.

Svrha ovog rada je odrediti, odnosno procijeniti koloidnu stabilnost nanočestica srebra u morskoj vodi s odabranim potencijalnim stabilizatorima te uz prisutnost sedimenta. Rezultati postavljenih eksperimenata pokazat će postoje li određene tvari koje mogu relativno dugotrajno (kroz desetak dana) stabilizirati nanočestice srebra u morskoj vodi. Dobiveni rezultati prvi su korak u procjeni njihove štetnosti za život u moru.

Kao mogući stabilizatori nanočestica srebra u morskoj vodi odabrane/i su:

- proteini (modelni protein, albumin iz goveđeg seruma (BSA), proteini iz seruma mediteranske dagnje *Mytillus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) i

proteini iz seruma celomske tekućine hridinastog ježinca *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1916).

- površinski aktivne tvari (PAT) te polimeri, zajednički naziv korišten za PAT i polimere u ovom radu bit će površinski stabilizatori (PS) različite molekulske mase i naboja

Koloidna stabilnost nanočestica srebra stabiliziranih s PAT određivana je i uz prisutnost modelnog (mineral gline, montmorilonit) i prirodnog sedimenta (Limski kanal, Rovinj). Mediji u kojima je ispitivana postojanost nanočestica su modelni sustavi (umjetna morska voda) te filtrirana i nefiltrirana prirodna morska voda različitih saliniteta (5-38). Naglasak je stavljen i na različite koncentracijske odnose stabilizatora i nanočestica kako bi se odredio omjer koji rezultira stabilnim nanočesticama.

Važnost ovog rada ogleda se u tome što bi se dobivena saznanja mogla primijeniti i na druge vrste nanočestica (npr. nanočestice zlata i plastike). Navedena pretpostavka proizlazi iz činjenice da hidrofobnost nanočestica srebra doprinosi njihovoj uspješnoj stabilizaciji s proteinima, polimerima i površinski aktivnim tvarima također hidrofobnog karaktera[14,15]. Tako je rad proizašao iz ovog doktorskog rada[16] bio polazišna točka istraživanja stabilizacije nanočestica polistirena u morskoj vodi i pijesku.

Rezultati ovog rada trebali bi dati temelje za istraživanje dugoročne sudbine nanočestica srebra i ostalih hidrofobnih nanočestica u moru i potrebi istraživanja njiihove koloidne stabilnosti u različitim nišama morskog okoliša.

2. CILJ I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

2. Cilj i hipoteze istraživanja

Cilj ove doktorske disertacije je saznati postoji li način stabilizacije nanočestica srebra u morskom vodenom stupcu unutar relevantnog perioda *(desetak dana).*

Hipoteze su:

i) u morskom vodenom sustavu postoje tvari koje mogu stabilizirati nanočestice srebra kroz nekoliko dana

ii) nanočestice srebra stabilizirane proteinima sporije se otapaju i dulje zadržavaju koloidnu stabilnost u morskoj vodi

iii) površinski aktivne tvari imaju stabilizirajući učinak na postojanost nanočestice srebra u morskoj vodi

iv) površinski aktivne tvari mogu umanjiti količinu nanočestica srebra vezanih na sediment

3. LITERATURNI PREGLED

3. Literaturni pregled

3.1. Nanotehnologija i nanomaterijali

Europska Komisija je 2011. godine izdala Preporuku o definiranju nanomaterijala koja glasi: „**Nanomaterijal** je prirodan, slučajno nastao ili proizveden materijal koji sadržava čestice u nevezanom stanju, u obliku agregata ili aglomerata, a 50% ili više čestica u raspodjeli po broju ima barem jednu vanjsku dimenziju manju od 100 nm[17]“. Iako dimenzija manjih od 1 nm, u Preporuci je dogovoreno da se pod nanomaterijalima smatraju i fulereni, jednostjenčane ugljikove nanocjevčice i grafenske pahulje.

Prema broju dimenzija na nanoskali, nanomaterijali se dijele na one koji su nanostrukturirani u sve tri dimenzije (**nanočestice**), zatim na one koji imaju dvije dimenzije na nanoskali (**nanocjevčice, nanovlakna**) te na nanomaterijale koji imaju samo jednu dimenziju na nanoskali (**nanofilmovi**). Treba napomenuti kako se nanomaterijalima ne smatraju proizvodi u koje su nanočestice, nanovlakna i nanofilmovi ugrađeni . Takvi materijali nazivaju se **nanokompozitnim materijalima** (nanokompoziti).

Riječ „nanotehnologija“ skovao je 1974. godine profesor Norio Taniguchi[18], međutim ocem nanotehnologije smatra se američki fizičar Richard Feynman jer je 1959. godine održao poznati govor na Caltech-u (Californian Institute of Technology) pod nazivom „*There's plenty room at the bootom*“[19] (*Mnogo je mjesta na dnu*). Govorom o manipuliranju tvarima na atomskoj razini, dr. Feynman otvorio je vrata novom području ljudskog djelovanja. Međutim, ono što je zaista omogućilo razvoj nanotehnologije je izum pretražnog tunelirajućeg mikroskopa kojeg su izumili Gerd Binnig i Heinrich Rohrer 1981. godine[20] Tada je po prvi put bilo omogućeno ujedno vidjeti atome i manipulirati njima, a prva otkrivena nanostruktura bio je buckminsterski fuleren[21]. Od tada do danas, osim što su brojni nanomaterijali otkriveni i sintetizirani, oni su se počeli primjenjivati u svakodnevnim proizvodima, medicini, poljoprivredi, raznim granama industrije pa i u zaštiti okoliša[22]. Prema tome, pojam nanotehnologija uključuje i znanost manipuliranja tvarima na nanoskali i njihovu primjenu u komercijalnim proizvodima i procesima.

3.2. Prirodne i antropogene nanočestice

Nanočestice su prirodna pojava već samom činjenicom da svaki kristal prolazi nano fazu, a o termodinamičkim svojstvima materijala i okoline ovisi koliko će se u toj fazi zadržati. Iako se najčešće nalaze i nastaju u obliku sfera, mogu postojati u obliku nanotrokuta, nanokockica, nanokaveza, nanozvjezdica, nanocvjetova pa čak i u dendrimernim oblicima – nanoježinca[23]. Nanočestice nastaju u svim sferama Zemlje (atmosfera, hidrosfera, litosfera i biosfera) kroz različite kemijske, fotokemijske, mehaničke, toplinske i biološke procese ili njihovom kombinacijom[24]. Nastaju i ljudskim djelovanjem (namjerno i slučajno), a ono što je zajedničko prirodnim procesima i ljudskom djelovanju je to da se dobivaju ili sintezom iz atomskih i molekulskih vrsta do nanooblika (pristup „odozdo prema gore“, engl. *bottom-up*) ili usitnjavanjem makroskopskih čestica sve do nanometarskih dimenzija (pristup „odozgo prema dolje“, engl. *top-down*). Primjeri *bottom-up* pristupa u prirodi, koji kreće od molekulskih i ionskih vrsta su nastanak ferihidritnih [$(Fe^{3+})_2O_3 \cdot 0{,}5\ H_2O$] nanočestica bakterijskom aktivnošću, formiranje nanočestica halita i hidriranih sulfata isparavanjem morskog aerosola te redukcija iona srebra prirodnom organskom tvari do nanočestica srebra[25]. *Top-down* način nastanka predstavljaju nanometarski mineralni fragmenti stvoreni erozijom vjetra u pustinjama ili pak gorenje biomase koje vodi do nastanka ugljikovih nanocjevčica[26]. Najveće skupine prirodnih nanočestica su metalni oksidi/hidroksidi, metali i legure, ugljikovi alotropi, silikati, sulfidi, halidi i karbonati[25].

Umjetno proizvedene ili antropogene nanočestice (engl. *Engineered Nanoparticles*, ENPs) se po kemijskom sastavu dijele na organske i anorganske (Tablica 1) Iako se antropogene nanočestice upotrebljavaju već stoljećima, do razvoja nanotehnologije nije se znalo da se radi o nanomaterijalima. Tako su nanočestice zlata ovisno o stupnju usitnjenosti korištene kao pigmenti različitih boja pa se koloidno zlato koristilo za bojanje stakla – poznata Likurgova čaša[27], vitraji u Crkvama[28]. Pregledom literature i internetskih baza podataka[29] koje popisuju proizvode s ugrađenim nanočesticama vidljivo je kako su najkorištenija (po brojnosti proizvoda u koje se ugrađuju) skupina upravo nanočestice srebra, a njih slijede metal-oksidne nanočestice (najkorištenije po tonaži). Tako se nano-TiO_2 (n-TiO_2) koristi u katalizi, pigmentima, bojama, kremama za sunčanje i to u kombinaciji sa nanočesticama ZnO. Nanočestice silicijeva dioksida, n-SiO_2, su u upotrebi kao vrhunski izolatori za električnu energiju i toplinu (kao silika aerogel). Nanočestice željezovih oksida često se koriste u pročišćavanju otpadnih voda ili kao agens u magentskoj rezonanci. Kvantne točke i metalne legure uglavnom imaju primjenu u elektroničkim sklopovima.

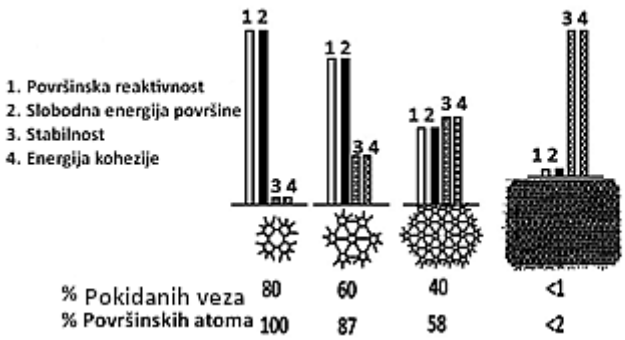
Tablica 1. Podjela umjetno proizvedenih nanočestica

Anorganske nanočestice	o metalne (*nanočestice zlata, srebra, željeza, platine...*) o metal-oksidne (TiO_2, ZnO, SiO_2, Fe_3O_4...) o kvantne točke (*CdS, CdSe...*) o metalne legure (*CrK, FeK, AuAg,...*)
Organske nanočestice	o dendrimeri o micele o liposomi o fulereni

Organske nanočestice obično imaju primjenu u medicini za dostavu lijekova na željena ciljana mjesta u tijelu[30], u prehrambenoj industriji[31] ili kao fluorescentni markeri[32].

3.3. Fizikalni razlozi posebnosti nanočestica u odnosu na makroskopske čestice

Najveća razlika između nanometarskih i čestica makroskopskih dimenzija je u tome što se kod prvih vrlo velik udio ukupnog broja atoma/molekula nalazi na samoj površini, u usporedbi sa zanemarivo malim udjelom površinskih atoma makroskopske čestice. Brojni atomi na površini nanočestica imaju nesparene elektrone što rezultira nesparenim spinovima te nasumično usmjerenim i prekinutim vezama. Zbog toga kemijski potencijal površine i površinska energija nanočestica rastu, a stabilnost i energija kohezije (energija potrebna za cijepanje materijala u individualne atome) se smanjuju, kao što se vidi na Slici 1.



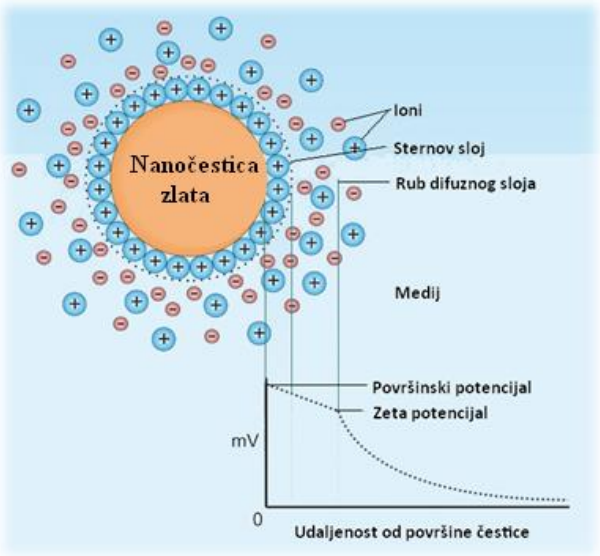
Slika 1. Ovisnost fizikalnih veličina o promjeru nanočestice, konstruirano prema literaturnom izvoru [24].

Poznato je kako svaki sustav teži smanjenju slobodne energije. Kod kristalnih nanočestica učinak takvog „pobuđenog“ stanja moguće je smanjiti već samim reorganiziranjem površine (nastajanje defekata u vezama te smanjenje ili povećanje jedinične ćelije[24]). Kako su površinski atomi obično u dodiru s kisikom ili vodenom otopinom, velika slobodna energija površine može se sniziti oksidacijom i kemijskim i/ili fizikalnim reakcijama s vrstama iz okoline. Drugi način snižavanja površinske energije je agregacijom s drugim česticama iste (homoagregacija) ili druge (heteroagregacija) vrste.

Još jedan razlog posebnosti nanočestica je velika specifična površina. Ista masena koncentracija manjih nanočestica ima veću brojnost čestica u odnosu na istu masenu koncentraciju većih nanočestica. Drugim rječima, ako masena koncentracija tvari ostaje jednaka, a veličina čestica biva sve manja kako se ide na nanoskalu, specifična površina raste budući da je u disperziji prisutno znatno više individualnih oplošja (površina). Velika specifična površina nanočestica upravo je razlog primjeni nanočestica za katalizu u industrijskim postrojenjima. Međutim, ako masa tvari ostaje jednaka, a nanočestice imaju veliku brojnost, sustav će postajati sve nestabilniji zbog sve češćih međusobnih sudara koji završavaju agregacijom. Iz tog razloga stabilnost nanočestica ovisi i o koncentraciji[33,34].

3.4. Električni dvosloj i zeta potencijal

U dodiru s polarnim medijem, koloidne čestice razvijaju naboj kao posljedicu ionizacije površine, adsorpcije iona iz otopine, ionskog otapanja ili zbog procesa poput izomorfne supstitucije (zamjena strukturnih kationa kod minerala glina). Naboj koloidne čestice privlači ione iz ostatka otopine koji se tada poslože oko njene površine. Ioni naboja suprotnog naboju čestice bit će čvrsto privučeni uz samu površinu Coloumbovim silama te će činiti prvi sloj. Ioni u drugom sloju do površine istovremeno će težiti i adsorbiranju na česticu i odlasku u volumen otopine zbog djelovanja osmotske sile. Tako uspostavljena ravnoteža, ima za rezultat nastanak **električnog dvosloja oko čestice** (engl. *Electrical Double Layer, EDL*). Prvi sloj u električnom dvosloju, *Sternov sloj*, sastoji se od čvrsto adsorbiranih iona naboja suprotnog površini čestice, dok se u drugom, difuznom sloju, nalaze i pozitivni i negativni ioni, s tim da prevladavaju suprotno nabijeni ioni, što je prikazano na Slici 2. Gustoća difuznog sloja opada s porastom udaljenosti od čestice, a d*ebljina je obrnuto proporcionalna koncentraciji elektrolita*. Električni dvosloj, u kojem se nalaze predominantno istovrsno nabijeni ioni uzrokuje elektrostatsko odbijanje između koloidnih čestica i pridonosi koloidnoj stabilnosti sustava[35,36,37].



Slika 2. Izgled električnog dvosloja na primjeru nanočestice zlata, konstruirano prema literaturnom izvoru [38].

Sljedeća važna veličina koja opisuje koloidne sustave i njihovu stabilnost je zeta potencijal. Zeta ili elektrokinetički potencijal predstavlja razliku potencijala između ruba difuznog sloja i medija u kojem se čestice nalaze. Kako se koloidna čestica giba kroz medij, električni dvosloj gibat će se zajedno s njom. Zeta potencijal predstavlja dakle skok potencijala koji se javlja pri relativnom premještanju faza tj. kada se čvrsta faza premješta u odnosu na nepokretnu tekuću fazu. Na zeta potencijal u najvećoj mjeri utječu pH sustava, koncentracija elektrolita, koncentracija aditiva u sustavu i temperatura. Kada govorimo o svojstvima koloidnih čestica, važna fizikalna veličina je točka nultog naboja (engl. *point of zero charge,* pH_{PZC}). To je pH pri kojem je koloidna čestica elektrostatski neutralizirana, odnosno ne nosi naboj. Ispod pH_{PZC} čestice nose pozitivan, a iznad pH_{PZC} negativan naboj. Važnost zeta potencijala ogleda se u tome što može ukazivati na stabilnost disperzija. Općenito vrijedi da ako je vrijednost zeta potencijala određenog koloidnog sustava manja od – 30 ili veća od 30 mV, taj se sustav smatra stabilnim.

3.5. DLVO teorija i utjecaj elektrolita na stabilnost koloidnih sustava

Nanočestice su čestice koje imaju sve tri dimenzije na nanoskali (1-100 nm). Kako nanoskala potpada pod dimenzije koloidnih čestica (1-1000 nm), one se ujedno smatraju koloidnim česticama te se uglavnom *ponašaju* u skladu s fizikalno-kemijskim zakonima koloidnih sustava. Upravo zbog toga, za opis i predviđanje njihove stabilnosti vrlo često se

koristi teorija koju su razvili Derjaguin, Landau, Verwey i Overbeek 1940-ih godina (DLVO teorija)[39,40]. Teorija predlaže da se međudjelovanja (interakcije) između čestica, odnosno iznos istih sastoji od dva doprinosa; doprinosa Van der Waalsovih (vdW) sila među česticama i doprinosa odbojnih međudjelovanja nastalih zbog uspostavljenog električnog dvosloja. Odbojne sile između čestica stvaraju energetsku barijeru koja ih sprječava da međusobno dođu u kontakt i povežu se. Ako se čestice pak sudare s dovoljno velikom energijom, većom od energije barijere, vdW sile će ih ireverzibilno povezati. Ako se čestice dovoljno jako odbijaju, koloidni sustav ostat će stabilan.

Van der Waalsove sile gotovo su uvijek prisutne među česticama, a rezultat su međudjelovanja rotirajućih ili fluktuirajućih dipola atoma i molekula. Prema DLVO teoriji, doprinos slobodne energije međudjelovanja, koji je funkcija udaljenosti između sfernih čestica, $W_{\mathrm{vdW}}(h)$ zbog van der Waalsovih sila je[39,40]:

$$W_{\mathrm{vdW}}(h) = -\frac{H}{12\,\pi\,h^2} \tag{3.1}$$

pri čemu je H Hamakerova konstanta koja govori o jakosti međudjelovanja, reda veličine između 10^{-21} i 10^{-19} J. Ona ovisi o polarizabilnosti materijala nanočestice i o svojstvima medija u kojem se nalaze. Udaljenost između čestica je h.

Doprinos međudjelovanja zbog električnog dvosloja, $W_{\mathrm{dl}}(h)$, opisan je izrazom 3.2.[39,40]:

$$W_{\mathrm{dl}}(h) = \frac{2\sigma_+\sigma_-}{\varepsilon_0\varepsilon\kappa}\exp(-\kappa h) \tag{3.2}$$

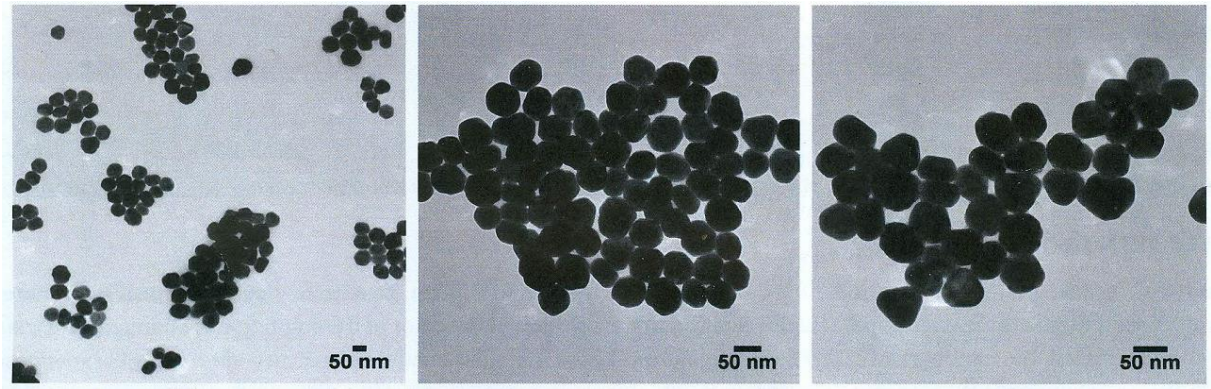
pri čemu su σ_+ i σ_- gustoće površinskog naboja za lijevu i desnu česticu, ε_0 je propusnost vakuuma, ε je dielektrična konstanta vode, dok je κ recipročna Debyeva duljina koja je dana izrazom [39,40]:

$$\kappa^{-1} = \left(\frac{k_{\mathrm{B}}T\varepsilon_0\varepsilon}{2q^2N_{\mathrm{A}}I}\right)^{\frac{1}{2}} = \frac{0.3\,nm}{\sqrt{I}} \tag{3.3}$$

pri čemu je k_{B} Boltzmanova konstanta, q je elementarni naboj, N_{A} Avogadrov broj, I je ionska jakost, a T je apsolutna temperatura. Nakon što se konstante u ovoj jednadži pomnože, ostaje vidljivo kako je recipročna Debyeva duljina obrnuto proprcionalna korijenu ionske jakosti. *Prema tome, što je koncentracija elektrolita u kojem se koloidne čestice nalaze veća, to će debljina električnog dvosloja biti manja.*

3.6. Nanočestice srebra

Za sintezu nanočestica srebra potrebni su Ag^+ ioni, tvar koja će ih reducirati i stabilizirati na nanoskali te energija. Redukcija Ag^+ do nanočestica srebra u prirodnim vodama odvija prirodnom organskom tvari kao što su huminske i fulvinske kiseline[41], proteini[42], ekstrakati mnogih biljaka[43] i izvanstanični polimerni spojevi[44]. Međutim, za okoliš su zbog neusporedivo veće koncentracije[45] značajnije masovno proizvedene, antropogene nanočestice srebra. Na Slici 3 prikazane su TEM mikrografije komercijalnih nanočestica (kupljenih od tvrtke Nanocomposix); sa Slike je vidljivo kako su nanočestice približno sferičnog oblika te vrlo ujednačenih veličina, za razliku od prirodnih, koje mogu dosta varirati u veličinama i oblicima[24,25].



Slika 3. TEM mikrografije komercijalnih nanočestica srebra omotanih citratom (kupljene od tvrtke Nanocomposix, San Diego, CA) prosječne veličine (promjera) 60 nm.

Nanočestice srebra, kao i ostale vrste nanočestica, imaju veliku tendenciju za agregiranjem, vrlo su podložne otapanju te im je u pojedinim slučajevima potrebno funkcionalizirati površinu za posebne primjene. Kako bi im se smanjila slobodna energija površine i zaštitilo od otapanja te funkcionaliziralo, površina nanočestice prekriva se zaštitnim omotačima (engl. *capping agents*). Iako brojne tvari mogu stabilizirati nanočestice, najčešće se koriste[12]:

- citratni anioni – *elektrostatička zaštita*
- poli(vinil-pirolidon)-PVP, poli(etilen-glikol)-PEG, arapska guma – *sterička zaštita*
- oleinska i taninska kiselina – *elektrosterička zaštita*.

Fizikalno-kemijska svojstva nanočestica uvelike ovise o vrsti zaštitnog omotača koji ih prekriva budući da je zaštitni omotač izravno u doticaju s medijem u kojem se nanočestice nalaze. Zaštitni omotači različitih su naboja, funkcionalnih skupina i molekulskih masa pa će

prema tome kemizam međudjelovanja medija i nanočestica ovisiti o kemijskim svojstvima obje tvari. Elektrosterička zaštita znači da će se nanočestice međusobno odbijati zbog istovrsnih naboja zaštitnog omotača na površinama nanočestica, sterička zaštita ih štiti od agregacije prostornim zaklanjanjem površine te tako umanjuje međusobne kontakte, a elektrosterička zaštita je kombinacija prethodna dva mehanizma: elektrostatskog odbijanja i steričkog zaklanjanja. Elektrosteričku zaštitu pružaju polielektroliti.

Metalne nanočestice poput srebra, zlata, platine i bakra imaju posebno svojstvo. Vodljivi elektroni na površini spomenutih nanočestica zajednički osciliraju oko jezgre i nazivaju se plazmonima. Kada disperziju nanočestica osvijetle specifične valne duljine svjetlosti, površinski elektroni nanočestice pobude se i prisilno osciliraju zajedno sa frekvencijom svjetlosti. Zajedničko osciliranje naziva se plazmonskom rezonancijom, a kako se odvija isključivo s površinskim elektronima, ovaj učinak naziva se **površinska plazmonska rezonancija** (engl. *Surface Plasmon Resonance, SPR*). Posljedica toga je izrazito jaka apsorpcija i raspršenje svjetlosti s nanočestica. SPR učinak izrazito ovisi o električnoj provodljivosti nanočestica i medija, o gustoći elektrona na površini te najbitnije; o obliku i veličini elektronskog oblaka nanočestice[46]. Upravo zahvaljujući SPR učinku, koncentrirane disperzije navedenih nanočestica obojene su jarkim bojama. Disperzije sfernih nanočestica srebra različitih su nijansi žute boje. Disperzije srebrnih nanotrokutića variraju od žute do narančaste, a mogu biti i plave boje (ovisno o veličini i o koncentraciji)[47]. Prema tome, stabilnost nanočestica srebra moguće je pratiti golim okom; ako je uzorak dovoljno koncentriran (približno 1 $\mu g\ mL^{-1}$) i ima barem blago žuto obojenje - u otopini se nalaze neagregirane nanočestice srebra. U Tablici 2 prikazane su vrijednosti maksimuma apsorbancije nanočestica srebra za AgNP najčešće korištenih veličina (10, 20, 40, 60 i 100 nm). Upravo po položaju maksimuma (njegove valne duljine) SPR pikova vrlo se brzo može procijeniti o kojoj veličini nanočestica srebra se radi.

Tablica 2. Maksimumi SPR pikova nanočestica srebra različitih veličina

promjer nanočestica, d / nm	λ_{MAX} / nm
10	390
20	390
40	420
60	430
100	485

Nanočestice srebra danas se najviše koriste u antibakterijskom tekstilu, filterima za vodu, bojama, kozmetici, dezodoransima, odjeći, ambalaži za hranu, funkcionaliziranoj plastici, medicinskim pomagalima, premazima za rane, kućnim pomagalima poput perilice za rublje i hladnjacima, detrdžentima, biosenzorima i biomedicinskim proizvodima[48].

3.7. Mogući putevi ulaska nanočestica srebra u okoliš

Nanočestice bivaju otpuštane u okoliš iz urbanih sredina kroz raznolike točkaste izvore kao što su postrojenja za obradu otpadnih voda ili izravno, iz industrija koje ih koriste. Mogu se dalje u okoliš otpuštati i iz difuznih izvora - otjecanjem ili istjecanjem iz tla. Emisije nanočestica ovise o vremenskim prilikama, načinima njihove primjene i gustoći populacije[22,49].

Istraživanja učinaka nanočestica na zdravlje ljudi i životinja nisu potpuna među ostalim, i iz razloga što su izolacija i karakteriziranje nanočestica iz složenih prirodnih uzoraka tek na počecima[50]. Zato je važno barem procijeniti otpuštene koncentracije nanočestica u okoliš za što je potrebna dobra baza podataka o stvarnim količinama i vrstama nanočestica koje su u upotrebi u komercijalnim proizvodima. Važan je i dobar model koji će na temelju dostupnih podataka procijeniti količine otpuštenih materijala u okoliš s dobrom prostornom rezolucijom. Neke baze podataka već su dostupne[29,51,52], a pojavila su se i prva istraživanja koja su procijenila otpuštanje nanomaterijala u okoliš[49].

Prema istraživanju iz 2018.[45], većina nanočestica srebra u okoliš dospijeva pranjem antibakterijskog tekstila, a važni izvori su i medicinski i proizvodi za čišćenje te kozmetika[48]. Na kraju životnog vijeka svih spomenutih proizvoda, nanočestice se otpuštaju u otpadnu vodu

koja ovisno o blizini obale ili učinkovitosti postrojenja za obradu otpadne vode može propustiti nanočestice dalje vodotocima u morski okoliš. Prema istraživanjima Levarda i sur.[12], AgNP će se u otpadnim vodama prvo asocirati sa tiosulfatom te će nakon toga dolaziti do transformacije u Ag_2S. Shafer i sur.[53] su pokazali kako čak 94% AgNP biva uklonjeno iz otopine otpadnih voda vezanjem na biološke čestice. Na lokacijama gdje nema obrade otpadnih voda, moguć je direktan izljev nanočestica u okoliš. Primjer takvog scenarija ulaska nanočestica u okoliš, ali za nanočestice titanova dioksida pokazali su Sánchez-Quiles i Tovar-Sánchez[54]. Ti znanstvenici pokazali su kako se na Mediteranskim plažama iz krema za sunčanje, može otpustiti i do 4 kg nano-TiO_2 dnevno. Kako se nanočestice srebra nalaze u raznovrsnim proizvodima, moguć je i njihov izravan ispust u kopnene pa i morske sustave.

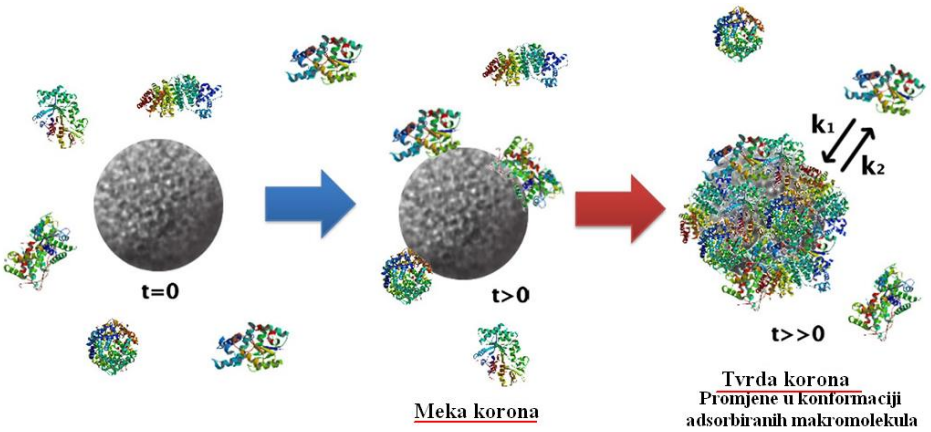
Predviđane koncentracije za nanočestice srebra u površinskim vodama kreću se između 10 i 100 ng L^{-1}, dok se u komunalnim vodama očekuje veća koncentracija, čak oko 5 μg L^{-1}[55].

3.8. Sudbina nanočestica srebra u prirodnim vodenim sustavima i mogući stabilizatori

Nanočestice srebra dospjele u morsku vodu neizbježno podliježu brojnim i dinamičnim fizikalno-kemijskim promjenama zbog složenosti njenog sastava. Sudbina nanočestica srebra (koloidna stabilnost i proces otapanja) ovisit će o njihovoj veličini (promjeru)[56,57], vrsti zaštitnog omotača[58], početnoj koncentraciji[33,34] u kojoj dospijevaju u okoliš, ali i uvelike o svojstvima medija u kojem se nađu: količini otopljenog kisika[59], ionskoj jakosti[58,60,61,62] i koncentraciji dvovalentnih kationa[63], raznih liganada[12], koncentraciji i vrsti prirodne organske tvari[5,41,63], pH[58,64], redukcijskom potencijalu[12,65], temperaturi[66], količini ostalih koloidnih i suspendiranih čestica[33,34,67,68] te o svjetlosti[69,70]. U literaturnom pregledu sažet će se dosadašnja saznanja koja opisuju ponašanje nanočestica srebra u morskom i u kopnenom vodenom sustavu (rijeke, jezera, ušća). Prethodno navedeni čimbenici imaju velik utjecaj na mobilnost AgNP – odnosno mogućnost prijenosa na veće udaljenosti i toksičnost. Potrebno je naglasiti kako većina istraživanja prati ponašanje AgNP u jednostavnim medijima koji u određenoj mjeri simuliraju prirodne vode. Razlog tome je potreba za izdvajanjem učinka pojedinih čimbenika, što je mnogo teže u kompleksnom sustavu.

3.9. Koloidna stabilnost nanočestica srebra u modelnim i prirodnim vodenim sustavima s dodatkom huminskih spojeva, polisaharida i proteina

Dolaskom sintetiziranih nanočestica u morsku vodu, na njih se bez obzira imaju li zaštitni omotač ili ne, mogu fizikalno ili kemijski vezati tvari iz okoline. Ako se radi o ulasku nanočestica u more, prvenstveno se očekuje fizikalno vezanje iona najzastupljenijih soli u morskoj vodi te postupna destabilizacija zbog smanjenja debljine električnog dvosloja. Kako nanočestice metala i metalnih oksida uglavnom nose barem mali naboj na površini, tako će se na njih elektrostatskim međudjelovanjima vezati ioni suprotnog naboja, a može čak doći i do stvaranja kompleksa sa zaštitnim omotačem, kemijskog vezanja s aktivnim centrima na površini nanočestice ili zamjene već postojećeg zaštitnog omotača. Na specifičnim lokacijama gdje za to postoje uvjeti (npr. velika primarna produkcija, razgradnja detritusa, bogat dotok antropogenih tvari s kopna i ostalo), može se na površinu nanočestica u većoj mjeri i adsorbirati organska tvar. Ako se na nanočestice u vodenom okolišu adsorbiraju molekule prirodne organske tvari kao što su to polisaharidi ili izvanstanični polimerni spojevi (izlučeni iz algi ili bakterija) te zaštitne omotače nazivamo *eko-korona*. Uđe li nanočestica u organizam ili se nalazi u njegovoj neposrednoj blizini i adsorbiraju li se na nju izlučeni proteini ili polisahardi te tjelesne tekućine poput celomske tekućine ili hemolimfe, govorimo o *bio-koroni*. Neovisno o tome radi li se o eko- ili biokoroni, ti prirodni omotači mogu biti *tvrdog* i *mekog* tipa, odnosno takozvane *meke* ili *tvrde* korone, koje se odlikuju brzom (kroz nekoliko minuta) i sporom (tijekom nekoliko sati) izmjenom makromolekula na površini nanočestice (Slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz i karakteristike tvrde i meke proteinske korone koje obavijaju nanočestice konstruirano prema literaturnom izvoru [72].

Prijenos i sudbina nanočestica u morskom okolišu ne ovisi samo o poznatim fizikalnim čimbenicima kao što su temperatura, ionska jakost, pH, početna koncentracija nanočestica, hidrofobnost, nego i o prirodnoj organskoj tvari (engl. *Natural Organic Matter, NOM*) prisutnoj u neposrednoj okolini. NOM može povećati stabilnost nanočestica u vodenom stupcu oblaganjem njihove površine zbog svojih negativnih naboja te uzrokovati međusobna elektrostatska i sterička odbijanja među česticama, ali ih može i destabilizirati mehanizmima poput „premoštavanja“ (engl. *bridging*)[63] gdje dvovaletni kation povezuje dvije susjedne, makromolekulama obavijene nanočestice. Tako bi fulvinske i huminske kiseline mogle pospješiti dispergiranje srebrnih nanočestica u umjetnoj morskoj vodi zbog velike gustoće naboja i zamjetne veličine svojih molekula, dajući time nanočesticama elektrostatsku zaštitu. S druge strane, upravo zbog spomenutog učinka *premoštavanja;* kada se dvovalentni kation poput Ca^{2+} jednim nabojem veže na huminske kiseline adsorbirane na jednoj, a drugim na huminske kiseline na drugoj nanočestici - time ih povezujući, stabilnost takvog koloidnog sustava opada i dolazi do agregacije. Uzastopnim premoštavanjem, opet nastaju veći agregati nanočestica u morskoj vodi i one više nisu ravnomjerno dispergirane u vodenom stupcu. Međutim, rezultati su pokazali kako premoštavanje ne ovisi samo o prisutnosti i vrsti kationa nego i o masenom omjeru između nanočestica i otopljene organske tvari kao i o tipu, sastavu i strukturi NOM-a[60]. Nadalje, tvari kao što su izvanstanični polimerni spojevi izlučeni iz algi (pogotovo algi kremenjašica) i bakterija (engl. *Extracellular Polymer Substances*, EPS) mogu u svoju strukturu vezati nanočestice srebra i silike time im osiguravajući dulji ostanak u stupcu, bile one više ili manje dispergirane[72]. U ovom poglavlju dan je pregled nekih dosadašnjih saznanja o stabilnosti nanočestica metala i metalnih oksida u morskoj vodi, ali i u manjoj mjeri u kopnenim vodenim sustavima, kako bi se mogle vidjeti razlike u stabilizaciji.

Baalousha i sur.[60] pokazali su da nedvojbeno jači utjecaj (50-65 puta) na agregaciju citratom omotanih nanočestica srebra imaju elektroliti s dvovalentnim kationima ($CaCl_2$, $Ca(NO_3)_2$, $CaSO_4$, $MgCl_2$, $MgSO_4$) u usporedbi s elektrolitima s monovalentnim kationima (NaCl, $NaNO_3$, Na_2SO_4). Elektrostatska zaštita od agregacije, kao što je citrat, učinkovita je u sprječavanju destabilizacije komercijalnih disperzija nanočestica srebra gdje je disperzno sredstvo ultračista voda i u primjenama gdje medij ima veoma nisku ionsku jakost. Međutim, zbog smanjenja debljine električnog dvosloja u prisutnosti monovalentnih, a pogotovo dvovalentnih kationa, nanočestice srebra mogu vrlo brzo postati nestabilne zbog toga što im se smanji debljina električnog dvosloja koji ih štiti od agregacije te do agregiranja dolazi kroz svega nekoliko minuta, a nastali agregati nekoliko su puta veći od svoje originalne veličine[60].

Jasno, tu se radi o koncentracijama elektrolita koje prelaze kritičnu koagulacijsku koncentraciju (engl. *Critical Coagulation Concentration, CCC*). Ipak, imaju li nanočestice učinkovit zaštitni omotač, čak ni pri visokoj koncentraciji elektrolita s dvovaletnim kationima, agregacija se neće događati tako brzo i spontano. Primjerice, kada su AgNP od agregacije zaštićene sterički (zaštitni omotač bio je PVP) i elektrosterički (zaštitni omotač je razgranati poli(etilen-imin)), čak i u otopinama $Ca(NO_3)_2$ koncentracija između 100 i 1000 mM, a u vremenu od nekoliko minuta, značajna agregacija se nije događala[60]. Ovdje se potvrđuje važnost steričke i elektrosteričke stabilizacije u otopinama elektrolita.

Zaštitni omotač u kombinaciji sa svjetlošću ima odlučujuću ulogu u koloidnoj stabilnosti i otapanju srebrnih nanočestica. Različiti omotači (citrat, PVP ili gole nanočestice) uzrokovali su zamjetno različite brzine otapanja, a nađeno je kako AgNP bez zaštitnog omotača pri svijetlosti valne duljine 365 nm otpuštaju superoksid i hidroksid radikale, citratom obavijene samo superoksidni radikal, a PVP-om omotane nanočestice srebra nisu otpuštale nikakve reaktivne kisikove vrste (engl. Reactive Oxygen Species, ROS)[74].

Razlike u kemijskom sastavu između kopnenog i morskog vodenog sustava vrlo su velike. Osnovna razlika, neovisno radilo se o rijekama, jezerima ili podzemnim vodama u usporedbi s morem je vrlo različita ionska jakost. Morska voda je zbog 3,5% anorganskih soli odnosno ionske jakosti od približno 0,7 M puno agresivnija (u smislu otapanja i poticanja agregacije) sredina od kopnenih voda čije se ionske jakosti kreću između 0,01 i 0,1 M. Prema tome, najvažniji čimbenik koji doprinosi destabilizaciji nanočestica u morskoj vodi je elektrolitima uzrokovano smanjenje debljine električnog dvosloja[75]. Da je taj čimbenik dominantan za destabilizaciju nanočestica, potvrdila su i druga istraživanja[13,60,76]. Sljedeća velika razlika je znatno veća količina prirodne organske tvari u kopnenim vodama, koja u kombinaciji s manjim salinitetom rezultira većom uspješnosti stabilizacije nanočestica u odnosu na morski okoliš. U istraživanju Kellera i sur.[77] ispitivana je koloidna stabilnost nanočestica TiO_2, CeO_2 i ZnO u desetak tipova prirodnih voda različitih kemizama što je prikazano na Tablici 3. Vidljivo je kako se prirodne vode mogu razlikovati čak za dva reda veličine u sadržaju ukupnog organskog ugljika (engl. *Total Organic Carbon, TOC*) – primjer morske vode i svježe vode iz mezokozma.

Tablica 3. Kemijska svojstva prirodnih voda (pH, ukupni sadržaj organskog ugljika – TOC (engl. *Total Organic Carbon*) i ionska jakost – *I*) u istraživanju Keller i sur. 2010[77].

	mjerna jedinica	morska voda*	umjetna morska voda	morska voda**	laguna	podzemna voda	rječna voda	Otpadne vode	mezokozm otpadna voda	kišnica	mezokozm svježa voda
pH	/	8,05	7,99	8,08	8,90	7,90	8,33	7,68	7,07	7,09	8,38
TOC	μM C	54,0	55,9	131,8	522,6	842,4	163,8	378,0	691,8	1564,0	5283,0
I	eq L^{-1}	0,707	0,639	0,679	0,215	0,0909	0,0184	0,0317	0,0032	0,0032	0,0072

*-morska voda iz lokacije Santa Barbara, CA, USA, **-morska voda s plaže Bodega Bay, CA, USA

Iz Tablice 3 vidljivo je kako su svi tipovi nanočestica općenito najstabilniji u kišnici, tretiranoj otpadnoj vodi iz postrojenja za obradu otpadnih voda i otpadnoj mezokozm vodi, koje su i inače vrlo niske ionske jakosti (I = 0,03 – 0,07), a istovremeno bogate ukupnim organskim ugljikom (378 – 5283 μM C). Prirodnu organsku tvar čine zaista vrlo raznovrsni spojevi[78], ali zajednička im je vrlo velika molekulska masa[79] i činjenica da se uglavnom radi o polielektrolitima predominantno negativnog naboja[80,81]. Upravo zbog toga, očekuje se da prirodna organska tvar stabilizira nanočestice u prirodnim vodama elektrosteričkim mehanizmom. Stabilnost u „agresivnijim“ vodama poput morske vode i vode iz lagune dosta se razlikuje što znači da i svojstva površine samih nanočestica pridonose razlikama u stabilnosti ovih sustava.

Vrlo slično istraživanje provedeno je sa srebrnim nanočesticama u četiri vodena medija; u prirodnoj i umjetnoj rječnoj, te prirodnoj i umjetnoj morskoj vodi[76]. U tom radu pokazana je ovisnost stabilnosti nanočestica u prirodnim medijima o zaštitnom omotaču. Srebrne nanočestice bile su omotane citratom (cit-AgNP) ili polivinilpirolidonom (PVP-AgNP). Unutar eksperimentalnog perioda od 6 sati, oba tipa (cit-AgNP i PVP-AgNP) nanočestica ostala su stabilna u rječnoj, dok se u morskoj vodi dogodila gotovo potpuna sedimentacija nakon 5 sati. Ipak, taloženje PVP-om omotanih nanočestica u morskoj vodi bilo je nešto sporije od citratom omotanih AgNP, što je i razumljivo jer je PVP nenabijeni polimer velike molekulske mase (približno 40 000 g mol^{-1}) koji pruža steričku zaštitu od agregacije, dok je citrat mali anion (189 g mol^{-1}) lako neutraliziran kationima iz morske vode. Sporija destabilizacija PVP-AgNPs dobivena je i u radu Wanga i suradnika[5] te Chinnapongse i sur.[2]. Oni su istraživali stabilnost nanočestica srebra (nominalnog promjera 20 nm) u morskoj i umjereno tvrdoj vodi, zatim umjereno tvrdoj vodi s dodatkom organske tvari i tri uzorka jezerske vode. Očekivano, najbrža destabilizacija nanočestica srebra dobivena je u morskoj vodi. Nakon jednog sata proteklog od početka mjerenja, samo 20% nanočestica je ostalo u morskoj vodi dok su ostale tvorile

aglomerate te ubrzo istaložile na dno kivete. Nakon deset sati, disperzija nanočestica potpuno je destabilizirana. Potom su mjereni hidrodinamički promjeri nanočestica; najmanje čestice nalazile su se u uzorcima jezerske i umjereno tvrde vode s dodatkom organske tvari (d_h do 100 nm) dok je u drugim medijima (morska i umjereno tvrda voda) dobiven mnogo veći hidrodinamički promjer nanočestica (d_h do 1000 nm).

Da su smanjeni salinitet i dovoljna koncentracija prirodne organske tvari ključni za koloidnu stabilnost nanočestica u morskoj vodi pokazano je i u istraživanju Wang i suradnika[5]. Korištene su 30-nm srebrne nanočestice (AgNPs) obavijene citratom (cit-AgNP) i polivinilpirolidonom (PVP-AgNP). Utjecaj morskih voda različitih saliniteta (0, 1, 5 i 30) i različitih koncentracija otopljenog organskog ugljika (engl. *Disolved Organic Carbon*, DOC) (0, 0,25, 3,25 i 10 mg L^{-1}) na stabilizaciju tih nanočestica istražen je određivanjem hidrodinamičkog promjera i zeta potencijala. Otopljeni organski ugljik bio je u obliku huminskih kiselina (engl. *Humic Acids, HA*) koje su vrlo dobro stabilizirale sva tri tipa nanočestica ali samo pri salinitetima manjim od 5. Bez prisutne organske tvari, cit-AgNPs agregirale su vrlo brzo u morskoj vodi i pri salinitetu od samo 1, a tijekom 24 sata promjeri su se povećali do veličine od 400 nm, dok su pri salinitetima 5 i 30 nanočestice stvorile agregate veće od 3 μm. Dodatkom otopljene organske tvari (engl. *Dissolved Organic Matter*, DOM) (3,25 mg L^{-1} HA) iste nanočestice imale su hidrodinamički promjer od 185 nm pri salinitetu 1. Dodatkom vrlo velike količine DOM-a, čak 10,25 mg L^{-1}, ove nanočestice narasle su samo do 424 nm pri salintetu 5 i nakon 240 h (u usporedbi s 3000 nm bez DOM-a). Veoma velike količine DOM-a (3,25 i 10,25 mg L^{-1}) uspjele su stabilizirati nanočestice srebra omotane PVP-om, ali samo pri salinitetu 5.

Na stabilizaciju nanočestica prirodnom organskom tvari utjecaj ima i njena molekulska masa te kemijski sastav. Louie i suradnici[79] uspoređivali su nisko- i visokomolekularne frakcije prirodne organske tvari rijeke Suwannee (engl. *Suwannee River Natural Organic Matter, SRNOM*) te njihov učinak na stabilizaciju nanočestica zlata obavijenih citratom u vodenom mediju ionske jakosti do samo 100 mM (jedini elektrolit bio je NaCl). Prirodna organska tvar rijeke Suwannee (po sastavu uglavnom huminski spojevi) razdvojena je na težu i lakšu frakciju centrifugalnom ultrafiltracijom na filteru koji propušta molekule molekulske mase manje od 100 000 g mol^{-1}. Zaostalu tvar na filteru (retenat) činile su molekule frakcije veće od 100 000 g mol^{-1} s masenim udjelom od 1,8% i prosječnom relativnom molekulskom masom 691 000 g mol^{-1}. U filtratu (98%) nalazile su se lakše molekule s prosječnom molekulskom masom M_w = 12 800 g mol^{-1}. Rezultati su pokazali kako je na zadržavanje

nanočestica zlata u otopini puno veći utjecaj imao retanat organske tvari s relativno velikim molekulskim masama jer je dodavanjem retenata kroz eksperimentalni period od 20 minuta zadržana gotovo originalna veličina nanočestica u otopini natrijeva klorida. Filtrat organske tvari (frakcija nižih mol. masa) također je omogućio bolju stabilnost nanočestica u otopini NaCl-a nego bez njega; nanočestice (tj. njihovi agregati) su otprilike 30% manjih veličina u odnosu na nanočestice u otopini bez NOM-a, ali svejedno počinju u većoj mjeri agregirati u NaCl-u u odnosu na slučaj *nanočestice+retenat/otopina NaCl-a*. Iako je za visokomolekularnu frakciju svojstven veći udio aromatskih skupina koje svojim djelovanjem povoljno utječu na stabilizaciju nanočestica, stabilizacija se ipak u ovom slučaju pripisuje većoj molekulskoj masi.

Manje molekule iz niskomolekularne frakcije prirodne organske tvari (engl. *Natural Organic Matter,* NOM) se zbog bržeg gibanja prve adsorbiraju na površinu nanočestice, ali veće komponente NOM-a postupno zamjenjuju „manji“ NOM na površini nanočestice jer je njihova adsorpcija termodinamički povoljnija. Gunsolus i sur.[82] su u svom istraživanju dali naglasak na kemijski sastav prirodne organske tvari koja je trebala stabilizirati nanočestice srebra. Autori su također koristili huminske spojeve izolirane iz NOM-a rijeke Suwannee (engl. *Suwannee river Humic Acid, SRHA*) i SRFA (engl. *Suwannee river Fulvic Acid, SRFA*) te jezera Pony (engl. *Pony Lake fulvic acid, PLFA*). Prema njima, interakcija prirodne organske tvari pomoću huminskih spojeva s nanočesticama srebra ovisi o: *i*) kemijskom sastavu NOM-a, pri čemu veći udio sumpora i dušika povećava stabilnost te *ii*) afinitetu zaštitnog omotača prema površini nanočestice gdje su one nanočestice koje imaju slabija međudjelovanja s komercijalnim zaštitnim omotačem, a jača s NOM-om konačno, bolje stabilizirane. Prirodna organska tvar može maknuti odnosno zamijeniti komercijalni zaštitni omotač na površini AgNP jer je to energetski povoljnije. Ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija pokazala je učinkovitost vrste NOM-a na stabilizaciju : SRFA < SRHA << PLFA. Navedeno više vrijedi za citratom nego polivinilpirlidonom omotane nanočestice što je vjerojatno povezano s većim afinitetom PVP-a prema površini nanočestica nego citrata. Organskoj tvari je lakše zamijeniti citrat nego PVP na istoj pa je to razlog boljoj stabilizaciji s citratom. PVP ima velik afinitet prema površini nanočestice te ga organska tvar teže zamjenjuje. Navedeni huminski spojevi imaju sličnu molekulsku masu; između 1300 i 1400 Da, ali se razlikuju u sadržaju dušika i sumpora. Vrste koje sadrže sumpor primjerice, u obliku tiola, imaju jača međudjelovanja s metalnim srebrom budući da elektron-donirajuće skupine poput tiola ili amina mogu djelovati kao koordinacijska mjesta za Ag^+. PLFA ima šest do sedam puta veći sadržaj sumpora u odnosu na SRHA i SRFA, s dvaput većim udjelom egzocikličnog sumpora od potonje dvije kiseline, ali i oko pet puta veći

sadržaj dušika. Osim toga, PLFA ima i manji udio kisika od ostalih kiselina što ukazuje na to da karboksilne skupine i fenoli u strukturi PLFA NOM-a imaju manji utjecaj na stabilizaciju srebrnih nanočestica u prirodnim vodama od primjerice dušika i sumpora. Kod stabilizacije nanočestica srebra NOM-om zanimljiv je i utjecaj svjetla: Zou i sur.[83] našli su kako su je NOM usporavao degradaciju nanočestica srebra sa svjetlom i to na nekoliko načina; prigušivanjem (atenuacijom) svjetla, omatanjem nanočestica i natjecanjem sa srebrom za fotone. NOM može zamjenjivati citrat kao zaštitni omotač jer se pri produljenom stajanju na svjetlu, citrat mineralizira. Nakon samo jednog dana, kod cit-AgNP počela se događati promjena morfologije iz sfernog oblika nanočestice u prizmu, što su našli i drugi istraživači[84].

U preglednom radu Grilla i suradnika[63] sumiran je utjecaj huminskih spojeva na nanočestice srebra, zlata, cinka, titanova dioksida, hematita, magnetita i aluminijeva oksida. Vidljivo je kako su se koncentracije NOM-a prirodnih voda korištenih u pregledanim istraživanjima kretale od oko 1 do čak stotinjak mg L^{-1}, a eksperimentalne ionske jakosti uglavnom nisu prelazile 0,1 M. Kako je morska voda siromašnija NOM-om, te uz monovalentne i dovoljno veliku koncentraciju dvovaletnih kationa, očekuje se da ovi spojevi ne mogu uspješno stabilizirati nanočestice u morskom mediju. Vrlo vjerojatno će učinak premoštavanja nanočestica pomoću NOM-a i Ca^{2+} iz morske vode uzrokovati agregaciju istih. Međutim, pri manjoj koncentraciji nanočestica u morskoj vodi, međusobni susreti nanočestica su manje vjerojatni te u tim slučajevima učinak premoštavanja ne bi trebao voditi do destabilizacije AgNP.

Nanočestice srebra mogu se stabilizirati i polisaharidnom frakcijom organske tvari u morskoj vodi. Stabilizacija polisaharidima nešto je vjerojatnija budući da bi polisaharidi mogli činiti čak i do 50 % morskog NOM-a[85]. Najčešće korišteni polisaharidi su alginati, arapska, guar i ksantan guma. Alginat je uzrokovao umjerenu stabilnost AgNP i relativno usporeno otapanje (<10% od ukupnog Ag) u NaCl-u do 1 M[61]. Arapska guma pokazala je nešto jači stabilizacijski učinak, ali samo kada u otopini NaCl-a nije bilo previše slobodnog Ag^{+}. Međutim, najznačajniji rezultat dobiven je kad su se nanočestice omotane arapskom gumom dispergirale u vodi iz fjorda. Da bi se karakterističan SPR pik AgNP u morskoj vodi iz fjorda smanjio na pola, trebalo je 5 sati, dok je u otopini NaCl-a iste ionske jakosti bilo potrebno samo 1-2 minute. Taj rezultat pripisuje se stabilizacijskom učinku prirodne organske tvari iz fjorda. Ipak, nepročišćene nanočestice (velika konc. neizreagiranog Ag^{+}) sintetizirane s arapskom gumom još su jače agregirale u morskoj vodi nego u NaCl-u. Razlog tome može biti, kako autori hipotetiziraju, taloženje AgCl vrsta na površinu nanočestice koje reagiraju sa zaštitnim

omotačima i smanjuju stabilnost AgNP. Callegaro i sur.[86] ispitivali su stabilizacijski učinak alginata na nanočestice TiO_2 koje nisu na svojoj površini imale nikakav zaštitni omotač, a bile su dodane u umjetnu morsku vodu bogatu tim polisaharidom. Veličine nanočestica bile su između 15 i 60 nm, ispitane koncentracije alginata 0,1, 1 i 10 g L^{-1}, a nanočestica TiO_2 1, 10 i 100 mg L^{-1}. Zbog toga što se alginat u većim koncentracijama ne može dobro otopiti, autori su ustvrdili da je najbolje koristiti 1 mg L^{-1}, a varirali su samo masene koncentracije nanočestica titan dioksida. Iako to u radu nije naglašeno, nađeno je kako postoji optimalan omjer alginata prema količini nanočestica. Kako je to omjer, međusobno različiti parovi koncentracija, ali optimalni i sukladni po omjeru najbolje će stabilizirati određeni tip nanočestica u različitim medijima. Tako se iz grafičkih prikaza u radu može vidjeti kako nakon 72 h, najmanje hidrodinamičke promjere ima disperzija od 10 mg L^{-1} TiO_2 koja je u sebi imala 1 g L^{-1} alginata. Prema tome, omjer alginata potreban za stabilizaciju nanočestica TiO_2 u umjetnoj morskoj vodi bio bi 100:1.

Nanočestice, dolaze li dispergirane u morsku vodu, mogu se na pojedinim lokacijama uhvatiti i u mrežu plutajućeg morskog gela. Morski gel je uglavnom sastavljen od izvanstaničnih polimernih spojeva (engl. *extracellular polymeric substances,* EPS) koje izlučuju fitoplankton i bakterije, a po sastavu je najvećim dijelom polisaharidnog karaktera, iako ga čine i proteini, nukleinske kiseline i lipidi. Adeleye i sur.[87] su našli kako topljiva frakcija EPS-a povećava kritične koagulacijske koncentracije $nTiO_2$, a interakcije između EPS-a i nanočestica vrlo su ovisne o ukupnoj površini nanočestica, kemijskoj strukturi zaštitnog omotača, intrinzičnom naboju $nTiO_2$ i njihovoj hidrofobnosti. Pletikapić i sur.[73] dodali su nanočestice srebra u morski gel alge *Cylindrotheca closterium* u ultračistoj vodi. Pokazalo se kako su nanočestice ili dobro dispergirane ili tvore manje agregate unutar gela čija struktura nije narušena ugrađivanjem nanočestica. Na ovaj način, nanočestice ostaju „zarobljene“ i mogu relativno dugo plutati u moru zajedno s gelastom nakupinom i tako se duže zadržati u vodenom stupcu, budući da se bez stabilizatora, vrlo brzo agregiraju zbog velike ionske jakosti morske vode koja naruši njihovu elektrostatsku stabilnost. U morskoj vodi je manja vjerojatnost da će nanočestice biti individualno dispergirane i kao takve se vezati na mrežu (osim kod cvata mora), međutim u slučaju manje početne koncentracije i eventualnog, već postojećeg i učinkovitog zaštitnog omotača, moguće je da će se vezati na mrežu kao manje nakupine i tako dulje ostajati u vodenom stupcu. S druge strane, u svojim istraživanjima Kadar i sur.[88,89] našli su kako su nanočestice ferihidrita koagregirane unutar EPS gela te s njim tvore stabilne agregate raznih

veličina (zbog heterogenosti EPS-a). Ujedno je i nađeno kako je EPS pojačao otapanje Fe iz ferihidrita za 30%.

Sljedeća tvar iz prirodne organske tvari koja bi mogla stabilizirati nanočestice u prirodnim vodama su proteini. Adsorpcija proteina ovisi o prirodi proteina i same nanočestice. Hung i sur.[90] pokazali su kako na adsorpciju globularnog proteina citokroma C na nanočestice zlata utječe odnos hidrofilnih i hidrofobnih domena omotača nanočestice. Utjecaj na stabilnost nanočestica može imati i maseni omjer proteina prema nanočesicama[91,92]. Za nanočestice zlata promjera 14 nm (TEM) pri omjerima nanočestica prema proteinima u rasponu od 1:50 do 1:1000 (maseni odnosi), dobiveno je kako proteinski monosloj čini između 20 i 35 molekula albumina iz humanog seruma (engl. *Human Serum Albumin*, HSA) [91]. U drugom radu[92] pokazano je kako HSA ne mijenja svoju sekundarnu strukturu adsorbiranjem na nanočestice srebra, dok ostala dva ispitivana proteina, homeotetramerni β-protein (hTTR) i lizin (α-β protein) imaju značajno drugačije sadržaje α uzvojnice i β ploče u prisutnosti nanočestica u odnosu na same proteine.

Proteinske korone oko nanočestica već su vrlo poznata i istražena pojava[93-96]. Tako je primjerice, korona od albumina iz ljudskog seruma omogućila koloidnu stabilnost nanočestica srebra[97] u 0,0154 M K_2SO_4. Za zasićenje površine površine nanočestice srebra (42 nm prema DLS-u) bilo je potrebno 274 molekula HSA.

Adsorpcija proteina na nanočestice ovisi o zakrivljenosti njhove površine i o stabilnosti proteina. Lundqvist i sur.[94] pokazali su kako veličina sferične nanočestice silike ima vrlo velik utjecaj na sekundarnu strukturu proteina koji se na nju adsorbira. Nanočestice s većim promjerima omogućavat će veću dodirnu površinu između proteina i NČ-e te tako uzrokovati značajnije promjene u sekundarnoj strukturi. Pretpostavka je naravno, da protein ima afinitet prema ispitivanoj površini. Novija istraživanja pokazala su pak kako se konformacija BSA mijenja samo kada su u dodiru s česticama većima od 200 nm[98], a istraživanje Sánchez- Perez i sur.[99] zapravo je potvrdilo prethodno, budući da se pri dodiru BSA s (nano)česticama od 82 i 200 nm nije događala zadovoljavajuća adsorpcija istog proteina. Naime, najoptimalnija adsorpcija BSA na nanočestice PS-a (u smislu dovoljne pokrivenosti površine proteinom) događala se kad su nanočestice bile relativno malene, promjera 38 nm, zato jer je tada ovaj protein ostao u svom nativnom stanju, a kao takav može se „gušće“ pakirati na površinu proteina te neće dolaziti do međusobnih elektrostatskih odbijanja među „razmotanijim“ proteinskim makromolekulama.

3.10. Otapanje nanočestica srebra u prirodnim vodama

Kinetika otapanja nanočestica uvelike ovisi o početnoj veličini nanočestice kao i o njihovoj početnoj koncentraciji te o zaštitnom omotaču i mediju u kojem se nalaze (otopljeni kisik, temperatura, pH vrijednost itd.)

Kittler i sur.[100] pratili su otapanje citratnih i PVP-om omotanih nanočestica srebra u ultračistoj vodi tijekom 125 dana pri temperaturama između 5,25 i 37 °C. Primjećeno je kako je pri svim slučajevim, otapanje dostiglo stabilnu razinu (plato) nakon kojeg više nije primjećen porast $[Ag^+]$. AgNP su bile dimenzija 50 ± 20 nm (TEM), a koncentracija između 50 i 350 mg L^{-1}. Porast temperature doveo je do bržeg otapanja, s tim da su se PVP-AgNP brže otapale nego cit-AgNP. Pri niskoj temperaturi (5 °C) PVP-AgNP otopile su se ≈ 10 %, pri 25 °C 50%, a pri 37 °C između 70 i 90% tijekom trajanja pokusa (125 dana). Citratom stabilizirane nanočestice otopile su se oko 10% pri tempraturi od 25 °C, ali se na temperaturi od 37 °C otapaju do oko 50% što je značajno manje od PVP-om omotanih.

Liu i Hurt[101] pokazali su kako kisik ima ključnu ulogu u procesu otapanja srebrnih nanočestica jer bez prisutnosti kisika, one nisu otpuštale Ag^+. Kinetika otapanja ovisila je i o početnoj koncentraciji nanočestica. Gotovo potpuno otapanje za 0,05 mg L^{-1} cit-AgNP postignuto je nakon 6 dana; za 0,2 mg L^{-1} nakon nešto više od 10 dana, a za 2 mg L^{-1} tek nakon 130 dana. Medij za ove pokuse bila je kisikom zasićena voda (9,1 mg L^{-1} otopljenog O_2) pri pH 5,68. Pokusi su provedeni u mraku. Također je i u tom istraživanju potvrđeno kako se otapanje značajno ubrzava porastom temperature medija jer su se nanočestice masene koncentracije 0,05 mg L^{-1} otopile u istom mediju pri 4 °C za 30%, a pri 37 °C gotovo 100% tijekom pet dana. U morskoj vodi dobiveni su neočekivani rezultati jer se u 8 dana otopilo samo 36% nanočestica dok je otapanje u ultračistoj vodi išlo do gotovo do potpunosti. Taj učinak pripisan je intenzivnoj agregaciji AgNP u morskoj vodi koja izrazito smanjuje površinu nanočestica dostupnu za otapanje. Pokazano je i kako prirodna organska tvar usporava otpuštanje Ag^+. U rada se navodi da su razlozi za to adsorpcija NOM-a na površinu nanočestica, gdje NOM zauzima aktivna mjesta za otapanje te redukcija Ag^+ u Ag^0 s huminskim i fulvinskim kiselinama. Agregacija nanočestica srebra dodatno je ubrzana kada je u otopini prisutan otopljeni kisik.

Zhang i sur.[59] uočili su 3-8 puta bržu i nasumičniju agregaciju nanočestica srebra (nasumično povećanje d_h) u prisutnosti kisika u odnosu na otopinu bez njega (sporija agregacija

i linearni rast d_h nanočestica). U prisutnosti kisika, utjecaj početne koncentracije na brzinu agregacije je najuočljiviji kod manjih nanočestica (20 i 40 nm), dok je za AgNP promjera 80 nm razlika u agregaciji mala. U istraživanju istih autora[102], praćena je kinetika otapanja citratnih nanočestica srebra jednakih veličina, ali različitih koncentracija (300 i 600 μg L^{-1}) u prisutnosti otopljenog kisika. Povećanje koncentracije značajno je ubrzalo rast $[Ag^+]$, a razlike su najuočljivije za AgNP promjera 20 nm. Najmanjim nanočesticama (20 nm) trebalo je i najduže da dostignu maksimalnu ravnotežnu koncentraciju otapanja (≈ 300 sati), dok je velikima (80 nm) trebalo samo 100 sati. Kroz cijeli eksperimentalni period nije došlo do potpunog otapanja nanočestica, što je dobiveno i u radu Kittlera i sur.[100]. Zaključci autora su sljedeći: ravnotežna koncentracija srebra ovisi o veličini nanočestica i početnoj koncentraciji. Eksperimenti su rađeni u Hoagland mediju s ¼ ionske jakosti. Jednak rezultat dobiven je i u radu Ma i sur. 2012.[56] gdje je koncentracija otopljenih nanočestica srebra bila obrnuto proporcionalna njihovom promjeru, dok primjerice, utjecaj zaštitnog omotača na otapanje nije pronađen. AgNP su bile obložene arapskom gumom i PVP-om te dispergirane u 1 mM $NaHCO_3$. Chen i sur. su 2013.[103] uspoređivali otapanje nanosrebra u jednostavnim otopinama elektrolita (NaCl i $CaCl_2$), otopini huminskih kiselina i prirodnim vodama (jezerska, podzemna i morska voda). Njihovi su rezultati pokazali kako na otapanje utječu agregacija nanočestica, prisutnost Cl^- i koncentracija prirodne organske tvari. Veća koncentracija klorida znači brže otapanje, dok ga prirodna organska tvar usporava. Dok su se nanočestice u 100 mM NaCl i $CaCl_2^-$ otopile do 12 i 20 % tijekom sedam dana, dodatkom huminske kiseline (1-10 mg L^{-1}) količina otpuštenog Ag^+ se smanjivala kroz 5 dana i od početnih 4% Ag^+ u otopini pala je na ispod 2%. Jezerska voda imala je 8,4 mg L^{-1} huminskih kiselina te su se u njoj AgNP otopile samo 5%, dok u podzemnoj vodi 6%. Otapanje u morskoj vodi doseglo je ravnotežni plato na 70% početne koncentracije srebra, a morska voda imala je 1,9 mg L^{-1} HA. Dobias i sur.[57] pratili su otapanje nanočestica srebra (citratnih, PVP-om i taninskom kiselinom omotanih) u jednoj jezerskoj i dvije rječne vode. U svim eksperimentima brzina otpuštanja Ag^+ smanjivala se s vremenom, a do potpunog otapanja nije došlo tijekom četiri mjeseca trajanja eksperimenta. Brz porast koncentracije Ag^+ uvijek se očitovao na početku eksperimenta, nakon čega je otapanje zamjetno usporenije. Autori tvrde kako je razlog relativno brzom početnom otpuštanju iona u prirodnim vodama prvenstveno desorpcija kemisorbiranog Ag^+ na površinama nanočestica. Oksidativno otapanje također je prisutno, ali je manje značajan proces zbog visokog pH prirodnih voda iz rada (7,9-8,4). Na svim lokacijama 5 nm AgNPs su se najbrže otapale (doseg 85-89%) dok su AgNP promjera 50 nm bile otopljene samo do 10% početne koncentracije. Zaštitni omotač imao je veliku ulogu u procesu otapanja. Sveukupno,

nanočestice omotane citratom najmanje su otpuštale (za jedan red veličine manje) Ag^+ što bi moglo biti zbog vezanja Ag+ s karboksilnim skupinama citrata ili zbog toga što citrat može reducirati Ag^+ natrag u Ag^0.

3.11. Međudjelovanja površinski aktivnih tvari i nanočestica u prirodnim vodama

Površinski aktivne tvari ili surfaktanti relativno su važna podskupina organske tvari u prirodnim vodama[104]. Uglavnom ih proizvode bakterije, a radi se o spojevima poput glikolipida i lipopeptida te onima više molekulske mase poput amfifatskih polisaharida, proteina, lipopolisaharida i lipoproteina[105]. Antropogene PAT dijele se s obzirom na naboj koji nose; na kationske, anionske, neionske i zwitter ionske surfaktante. Uglavnom se koriste kao sapuni, detrdženti za rublje, šamponi, detrdženti za posuđe, a u industrijske svrhe kao komponenta tvari za podmazivanje, obradi tekstila, rudarstvu, ekstrakciji i preradi nafte i pročišćavanju otpadnih voda. Prirodne površinski aktivne tvari su česta pojava na površini mora pogotovo tijekom povećane fitoplanktonske aktivnosti[106], zbog ispaše zooplanktona[107] te aktivnosti morskih bakterija[105]. Zbog svoje amfipatske prirode, nakupljaju se na međufaznoj granici more-zrak, a koncentriraniji su u površinskom mikrosloju u odnosu na pod-površinsku vodu [108,109].

Istraživanja su pokazala[110,111] da će se najjača međudjelovanja između PAT i nanočestica ostvarivati kada se radi o suprotnim nabojima. Hedberg i sur.[110] to su potvrdili pokazavši da pozitivno nabijene PAT koje se koriste u detrdžentima za pranje rublja snažno reagiraju s negativno nabijenim nanočesticama. Dogodila se i promjena naboja AgNP koja je reverzibilna, a ovisna o početnom naboju nanočestica i koncentraciji PAT. Eksperimenti su provedeni u ultračistoj vodi kojoj je samo namješten pH. U istom radu, neionska PAT, Berol, pokazala je slabije, hidrofobne interakcije s nanočesticama[110]. Skoglund i sur.[112] potvrdili su istraživanje Hedberga i sur. time što su dokazali kako Berol zaista destabilizira nanočestice, a to su pripisali tome što ova PAT stvara hidrofobniju sredinu oko nanočestice i umanjuje ioniziranost površinskih skupina. Mjerenja su također rađena u modelnim otopinama PAT gdje je jedini doprinos ionskoj jakosti elektrolit za namještanje pH i same nabijene PAT.

Bae i sur.[111] dokazali su veću toksičnost negativnih nanočestica stabiliziranih s pozitivnim PAT na bakteriju *E. coli* u odnosu na nanočestice stabilizirane anionskim i neionskim surfaktantima. Medij za bakterije imao je vrlo nisku ionsku jakost, zbog čega se u prirodnim vodama koje imaju veće ionske jakosti ne očekuje takav ishod stabilnosti.

U Istraživanju Li i suradnika[113] rječna, voda iz postrojenja za obradu otpadnih voda i voda iz slavine korištene su kao medij u kojima se nanočestice mogu nalaziti omotane/zaštićene pomoću PAT. Ti autori koristili su nanočestice TiO_2 kojima su dodali ili natrij dodecil sulfat (SDS) ili NPEO (engl. *nonylphenol ethoxylates,* ili Tergitol, NP-9). Iako su se obje PAT adsorbirale na površinu nanočestica, SDS je rezultirao više negativnim zeta potencijalom na površini istih. Eksperiment je proveden kroz samo 24 sata, a da bi stabilizacija uspjela, maseni udio površinski aktivnih tvari u otopini morao je prelaziti 0,015% (w:v). Iako je agregacija bila zamjetnija u prirodnim vodama u odnosu na ultračistu vodu, ipak je mjerljiva frakcija nanočestica uspješno stabilizirana u realnom uzorku. Niže koncentracije SDS-a (manje od 0,015%) uzrokovale su brzu sedimentaciju nanočetica iz vodenog stupca, dok je primjerice, pri koncentraciji od 0,020% SDS-a 95% nanočestica TiO_2 ostalo dispergirano u vodenom stupcu. Primjerice, dodatak 0,015 i 0,02% SDS-a u vodi postrojenja za obradu otpadnih smanjio je veličine agregata za 42,72 i 50,98%. Slične vrijednosti dobivene su za iste udjele SDS-a u tri tipa riječne vode, dok je u vodi iz slavine, bez ove PAT početna koncentracija nanočestica pala na 10%, a s dodatkom 0,030 % je ostala na 60% početne koncentracije nakon 24 sata.

3.12. Nanočestice i sediment u vodenim sustavima

Gallego-Urrea i sur.[33] proveli su važno istraživanje o sudbini nanočestica zlata (promjera 30 nm) u modelnim kopnenim te umjetnoj morskoj vodi pri vrlo niskim koncentracijama (80 μg L^{-1}) koje su bliske onim očekivanim u okolišu[71]. Autori su iznijeli veoma **važne zaključke: pri tako niskim koncentracijama, sedimentacija nije očekivana sudbina nanočestica**. Pad brojčane koncentracije AuNP (engl. *Gold nanoparticles,* AuNP) u modelnim kopnenim i umjetnoj morskoj vodi se dogodio, ali u niskom udjelu (maksimalno do 50% početne koncentracije) pa se može pretpostaviti da prisutni agregati nisu imali dovoljno veliku masu da prevladaju uzgon, trenje i difuzijske sile unutar vodenog stupca te sedimentiraju. Iako je u sustav dodan i mineral gline ilit, uz prisutnost prirodne organske tvari kao SRNOM (engl. *Suwannee River Natural Organic Matter, SRNOM*), nanočestice su pokazale stabilnost pri danim koncentracijama. Autori zaključuju **kako važnu ulogu u sudbini nanočestica u okolišu ima i početna (brojčana) koncentracija i omjer prirodne organske tvari prema nanočesticama**. Budući da su nanočestice u okolišu još nižih koncentracija, očekuju se još manje brzine agregacije. Rezultati rada pokazuju kako je heterokoagulacija nanočestica sa sedimentom najvjerojatniji ishod nakon njihovog međusobnog kontakta. Međutim, nanočestice

mogu (p)ostati koloidno stabilne pri različitim okolišnim uvjetima, pogotovo ako se radi o njihovim niskim početnim koncentracijama u prirodnim vodama. Takav ishod povećava mogućnost daljeg transporta pa se koloidno stabilne nanočestice mogu prenositi kroz kopnenene vode i stizati do ušća rijeka i morskih okoliša gdje će visok salinitet uzrokovati destabilizaciju većeg dijela nanočestica. Struktura prirodne organske tvari i njen omjer prema nanočesticama utjecat će na njihovu moguću stabilizaciju u takvom okolišu[33].

Osim homoagregacije, očekivano je da će nanočestice u realnim vodenim sustavima i heteroagregirati sa česticama glina[114,115].

Quik i suradnici[114] pratili su sedimentiranje nanočestica CeO_2 iz uzoraka rječne vode. Rječna voda bila je nefiltrirana i filtrirana kroz filter otvora pora od 0,22 μm . Koncentracije nanočestica su bile 1, 10 i 100 mg L^{-1}. Dok su više koncentrirane disperzije nanočestica CeO_2 (10 i 100 mg L^{-1}) nakon 12 dana gotovo u potpunosti istaložile iz vodenog stupca (99%-tna sedimentacija), najmanje koncentrirana disperzija (1 mg L^{-1}) nakon kontakta s nefiltriranom rječnom vodom izgubila je 80 – 86% nanočestica, a kada se radilo o filtiranoj rječnoj vodi, samo je 14 – 22% nanočestica istaložilo iz vodenog stupca. Pretpostavlja se da je heteroagregacija s prirodnim koloidima razlog takve razlike.

Li je u svom doktoratu[67] radio s 88-nm nanočesticama srebra koje su stabilizirane Tweenom 80, a uspoređivao ih je sa cit-AgNP i SDS-AgNP prvo u tri različita elektrolita (NaCl, $CaCl_2$ i $NaNO_3$). Dok su citratom omotane nanočestice agregirale vrlo brzo već u 40 mM NaCl-u, Tween-AgNPs počele su agregirati tek u 0,5 M otopini istog elektrolita. Vrlo začuđujuće je da je kritična koagulacijska koncentracija također Tweenom omotanih nanočestica u $CaCl_2$-u bila 700 mM, dok je za cit-AgNP u istom elektrolitu CCC 2 mM. Rezultati mjerenja elektroforetske mobilnosti pokazali su kako AgNP omotane Tweenom nose veoma maleni negativan naboj, stoga je zaključak koji iz toga proizlazi da se nanočestice sterički stabiliziraju. No još važnije, nakon toga je eksperiment proveden u prirodnoj rječnoj vodi ionske jakosti od 10 mM. Opet, jedino su Tweenom stabilizirane nanočestice ostale stabilne unutar 15 dana mjerenja, dok su druge agregirale već nakon nekoliko sati. U ovom istraživanju, koncentracija otopljenog organskog ugljika, DOC (engl. *Dissolved Organic Carbon,* DOC) je bila 5,7 mg L^{-1}. Tween-AgNP su čak nakon trećeg dana počele lagano otapati, što autori pripisuju vrlo dobroj dispergiranosti koja omogućuje veću izloženu površinu nanočestica koje onda *korodiraju* u prisutnosti kisika i svjetlosti.

Liu i sur.[116] pokazali su kako je stabilnost nanočestica srebra u dodiru s modelnim sedimentima montmorilonitom i kaolinitom, značajno povećana u prisutnosti Tweena 80. CCC vrijednosti za T80-AgNP u u dodiru sa sedimentima porasle su iznad 100 mM za NaCl, $NaNO_3$ i $CaCl_2$. Taj učinak autori pripisuju adsorbiranju samog T80 na površinu sedimenta koji tako utječe na usporavanje interakcija AgNP i sedimenta. Međutim, suvišak Tweena 80 na sedimentu opet može dovesti do suprotnog učinka-*premoštavanja* i destabilizacije suspenzije što smanjuje stabilnost takvog binarnog sustava. U istraživanju Liu i sur.[3] pokazano je kako nema značajnih razlika u koloidnoj stabilnosti između binarnih sustava glina-nanočestice i individualno samih nanočestica i individualno samih glina pri istom pH. Da bi se agregacija mogla događati, energetska barijera za agregacije je morala biti prijeđena, što je postignuto u otopinama veće ionske jakosti budući da je pri pH prirodnih voda površina gline negativna. Prema tome, takav binarni sustav može se smatrati monosustavom.

Zhou i sur.[115] potvrdili su kako miješanje montmorilonita (MMT) i AgNP pri pH 8 ne mijenja stabilnost takvog binarnog sustava u odnosu na pojedine komponente. Uspješnost sudara (engl. *attachment efficiency*) jednaka je za sve slučajeve (sam MMT, sam AgNP, MMT + AgNP). Ističe se da gline koje imaju pH_{PZC} između 5 i 8, mogu destabilizirati nanočestice. Inače, ovisnost vrijednosti pH_{PZC} o ionskoj jakosti nije jednoznačna i može se utvrditi potenciometrijskom masenom titracijom. Vrijednost pH_{PZC} obično se određuje eksperimentalno, u točki sijecišta krivulja površinskog naboja pri različitim ionskim vrijednostima[117].

Iako i gline brže sedimentiraju s porastom ionske jakosti, destabiliziranje ne mora biti izravno i trenutno jer su primjerice sedimenti iz ušća obično sastavljeni od otvorenih, poroznih struktura organo-glinenih kompleksa. Dodatkom hitina ili huminske kiseline montmorilonitu agregacija u umjetnoj morskoj vodi do saliniteta 7,2 je usporena. Polielektoriliti iz prirodnog vodenog sustava mogu se adsorbirati na inače pozitivne rubove glina i tako usporiti agregaciju. Polimeri se u slanoj morskoj vodi mogu odmotavati i time još više pridonositi steričkim odbijanjima[118].

Konačno, dospiju li nanočestice u više ili manje dispergiranom stanju do sedimenta, u kontinuumu morska voda-sediment također se očekuju nagle promjene specijacije ovisno o redoks uvjetima u okolini. U jednom istraživanju[119] nađeno je kako se nanočestice imobilizirane unutar prvih 10 cm sedimenta imaju dosta različite specijacije, a većinom se radi o srebru povezanom s reduciranim sumporom (primjerice u cisteinskom kompleksu ili kao

Ag_2S), pri čemu je dominantnija vrsta Ag_2S. Međutim, na specijaciju utječu i ciklusi plime i oseke zbog miješanja sedimenta.

4.EKSPERIMENTALNI DIO

4. Eksperimentalni dio

4.1. Materijali i priprema uzoraka

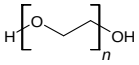
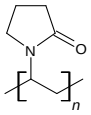
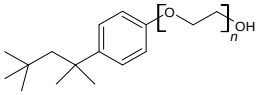
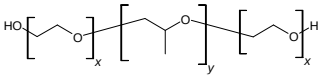
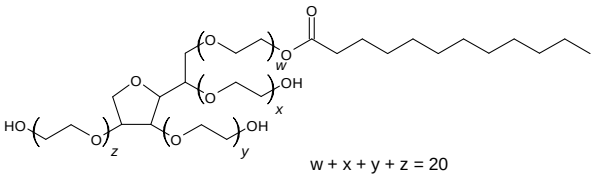
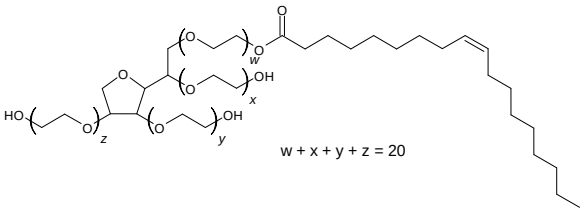
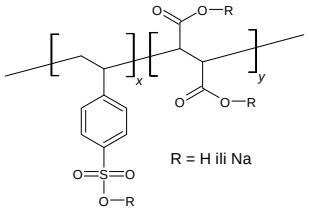
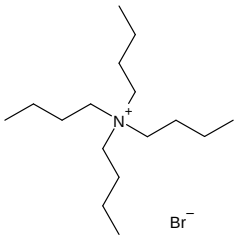
4.1.1. Kemikalije

Albumin iz goveđeg seruma (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA), natrijev hidroksid (NaOH), kalcijev klorid ($CaCl_2$), magnezijev sulfat heptahidrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), trinatrijev citrat dihidrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) i natrijev dodecil sulfat ($NaC_{12}H_{25}SO_4$) kupljeni su od proizvođača Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD) te su bili analitičke čistoće. Poli(vinil-pirolidon) (PVP) prosječne molekulske mase 40 000 g mol^{-1}, poli(etilen-glikol) ($C_{2n}H_{4n+2}O_{n+1}$) (PEG), Tween® 20 (poli(etilen-glikol) sorbitan monolaurat) ($C_{58}H_{114}O_{26}$), Tween® 80 (poli(etilen-glikol) sorbitan monooleat) ($C_{64}H_{124}O_{26}$), Triton® X-100 (poli(etilen-glikol) tert-oktilfenil eter) ($C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$(n=9-10)), taninska kiselina ($C_{76}H_{52}O_{46}$) (TA), razgranati poli(etilen-imin) (($C_2H_5N)_n$) (BPEI), poli(vinil-alkohol) ($CH_2CH(OH)_n$) (PVA), poli(etilen-glikol)-blok-poli(propilen-glikol)-blok-poli(etilen-glikol) (Pluronic® P-123 i Pluronic® F-127), heksadecilamin ($C_{16}H_{35}N$), tetraoktil amonijev bromid ($C_{32}H_{68}BrN$) (TOAB) kao i montmorilonit K10 ($(Na,Ca)_{0,3}(Al,Mg)_2Si_4O_{10}(OH)_2 \cdot nH_2O$) nabavljeni su također od tvrtke Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD). Srebrov nitrat ($AgNO_3$), natrijev (NaCl) i kalijev klorid (KCl) kupljeni su od Kemike d.d. (Zagreb, Hrvatska) te su bili analitičke čistoće. Krom-sumporna kiselina nabavljena je od tvrtke Gram-mol (Zagreb, Hrvatska). Disperzante Disperbyk 110, 111, 118, 180 i 190 proizvela je tvrtka Byk-Chemie GmbH (Wesel, Njemačka). U Tablici 4 prikazane su kemijske strukture površinski aktivnih tvari i polimera koji su korišteni za stabilizaciju nanočestica srebra. Za disperzante tvrtke Disperbyk sastav nije bio dostupan.

Nanočestice srebra (engl. *Silver nanoparticles*, AgNP) s citratom kao zaštitnim omotačem dobivene su iz tri izvora: a) od tvrtke Sigma Aldrich, s promjerima 10, 20, 40, 60 i 100 nm masenih koncentracija 20 μg mL^{-1} (Ag10, Ag20, Ag40, Ag60, Ag 100 SA, Sigma Aldrich-Merck, Kenilworth, NJ, SAD); b) od tvrtke Nanocomposix (San Diego, Kalifornija, SAD) promjera 60 nm i masene koncentracije 1000 μg mL^{-1} (Ag60 NC); i c) sintetizirane u laboratoriju, promjera 60 nm (Ag60 LMNB) te masene koncentracije 100 μg mL^{-1}. Postupak sinteze nanočestica opisan je u poglavlju 4.1.2.

Standardna otopina srebra, dušična kiselina (HNO_3) i indij (In) bili su najviše čistoće (*purissimum pro chromatographia*) i proizvođača Honeywell Fluka (Charlotte, NC, SAD), a korištene su za spektroskopiju masa s induktivno spregnutom plazmom.

Tablica 4. Površinski aktivne tvari i polimeri korišteni za stabilizaciju nanočestica srebra.

komercijalni naziv ili skraćenica	struktura	cmc*, medij za određivanje cmc-a	naboj
PVA		□	/
PEG		□	/
PVP		□	/
Triton© X-100		0,22-0,24 mM, etanol[120]	/
Pluronic© F127 i Pluronic© P123**		□	/
Tween© 20		0,059 mM[121], ultračista voda	/
Tween© 80		0,01 – 0,11 mM[122], ultračista voda	/
Na(4-PSS-M)		□	-
TOAB		□	+

*cmc (engl. *Critical Micelle Concentration*) – kritična micelarna koncentracija - koncentracija površinski aktivne tvari pri kojoj se počinju stvarati micele

□ podatak nije dostupan

** Pluronic je blok kopolimer formule $-(PEG)_x-(PPG)_y-(PEG)_x-$. Za Pluronic F-127 vrijedi da je $x \approx 100$, $y \approx 65$, a za Pluronic P-123 $x \approx 20$, a $y \approx 70$.

4.1.2. Sinteza nanočestica srebra

Nanočestice srebra pripravljene su redukcijom srebrova nitrata s trinatrijevim citratom dihidratom modificirano prema metodi za sintezu nanočestica zlata Turkevicha i sur.[123]: 21,25 mg srebrova nitrata otopljeno je u 120 mL ultračiste vode te zagrijavano do vrenja uz miješanje na magnetskoj miješalici. Nakon što je otopina uzavrela, 5 mL trinatrijevog citrata dihidrata masene koncentracije 1 % plastičnom je kapaljkom postupno dodavano u reakcijsku tikvicu kroz 3 minute. Grijanje i miješanje je nastavljeno sve do trenutka kad je otopina počela poprimati svjetložutu boju, nakon čega je reakcijska tikvica uklonjena s grijača te je ohlađena pod mlazom hladne vode. Tijekom hlađenja otopina je poprimila zlatno-žutu boju, koja ukazuje da su dobivene nanočestice srebra promjera približno 60 nm[124]. Prema stehiometrijskim omjerima reaktanata i uz maksimalnu iskoristivost, disperzija nanočestica srebra doseže koncentraciju ukupnog srebra od 107,7 μg mL^{-1}. Veličina nastalih nanočestica provjerena je tehnikom UV-VIS spektroskopije (engl. *ultraviolet-visible spectroscopy, UV-VIS*) i dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *Dynamic Light Scattering, DLS*). Neovisno radilo se o sintetiziranim ili komercijalnim nanočesticama srebra, alikvoti ishodnih disperzija uvijek su sonificirani u ultrazvučnoj kupelji tvrtke Bandelin Sonorex Digitec (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Njemačka) tijekom 3 min, pri snazi od 30 W, neposredno prije primjene u eksperimentima.

4.1.3. Priprava medija za disperziju nanočestica srebra

Ultračista voda (Mili-Q, MQ) električne otpornosti 18,2 MΩ·cm dobivena je propuštanjem bidestilirane vode kroz filtracijski sustav „Milipore Advantage System“ (Merck Milipore, Darmstadt, Njemačka).

Koncentrirana umjetna morska voda (engl. *Artificial Seawater,* ASW) saliniteta 108,7 pripravljena je otapanjem 26,29 g natrijeva klorida, 0,74 g kalijeva klorida, 0,99 g kalcijeva klorida, 6,09 g magnezijeva klorida heksahidrata te 3,94 g magnezijeva sulfata heptahidrata u 350 mL ultračiste vode uz miješanje na magnetskoj mješalici pri sobnoj temperaturi. Uobičajene recepture za umjetnu morsku vodu obično sadrže vitamine[125] te različite mikrokonstituente[126], međutim u ovom doktorskom radu težište je na ispitivanju utjecaja glavnih soli morske vode na mogućnost stabilizacije nanočestica srebra proteinima i površinski

aktivnim tvarima pa iz tog razloga u ovom postupku vitamini i ostali mikrokonstituenti nisu korišteni.

Ionska jakost umjetne morske vode izračunava se prema jednadžbi Lewisa i Randalla[127] koja opisuje aktivitete jakih elektrolita (jednadžba 4.1.):

$$I = \frac{1}{2}\sum_{i=1}^{n} c_i z_i^2 \tag{4.1.}$$

gdje je I ionska jakost, c_i molarna koncentracija elektrolita, a z_i predstavlja nabojni broj kationa ili aniona. Za izračun I pojedinog elektrolita zbrajaju se koncentracije njegovog kationa pomnoženo s kvadriranim nabojnim brojem s koncentracijom aniona pomnoženog s kvadriranim nabojnim brojem aniona. Izračun za ionsku jakost umjetne morske vode prikazan je u jednadžbi 4.2.

$$I_{\mathrm{ASW}} = \frac{1}{2}\sum_{i=1}^{n}(c_{\mathrm{NaCl}} \cdot 1^2 + c_{\mathrm{NaCl}} \cdot 1^2) + (c_{\mathrm{KCl}} \cdot 1^2 + c_{\mathrm{KCl}} \cdot 1^2) + (c_{\mathrm{CaCl_2}} \cdot 2^2 + 2 \cdot c_{\mathrm{CaCl_2}} \cdot 1^2) + (c_{c_{\mathrm{MgCl_2*6H_2O}}} \cdot 2^2 + 2 \cdot c_{\mathrm{MgCl_2*6H_2O}} \cdot 1^2) + (c_{\mathrm{MgSO_4 \cdot 6H_2O}} \cdot 2^2 + c_{\mathrm{MgSO_4 \cdot 6H_2O}} \cdot 2^2) \tag{4.2}$$

Uvrštavajući vrijednosti molarne koncentracije (jednadžba 4.3.) za NaCl (0,45 M), KCl (0,00993 M), $CaCl_2$ (0,00892 M), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,03 M) i $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,016 M) dobiva se:

$$I_{\mathrm{ASW}} = \frac{1}{2}\sum_{i=1}^{n}(0{,}45 \cdot 1^2 + 0{,}45 \cdot 1^2) + (0{,}00993 \cdot 1^2 + 0{,}00993 \cdot 1^2) + (0{,}00892 \cdot 2^2 + 2 \cdot 0{,}00892 \cdot 1^2) + (0{,}03 \cdot 2^2 + 2 \cdot 0{,}03 \cdot 1^2) + (0{,}016 \cdot 2^2 + 0{,}016 \cdot 2^2) \tag{4.3}$$

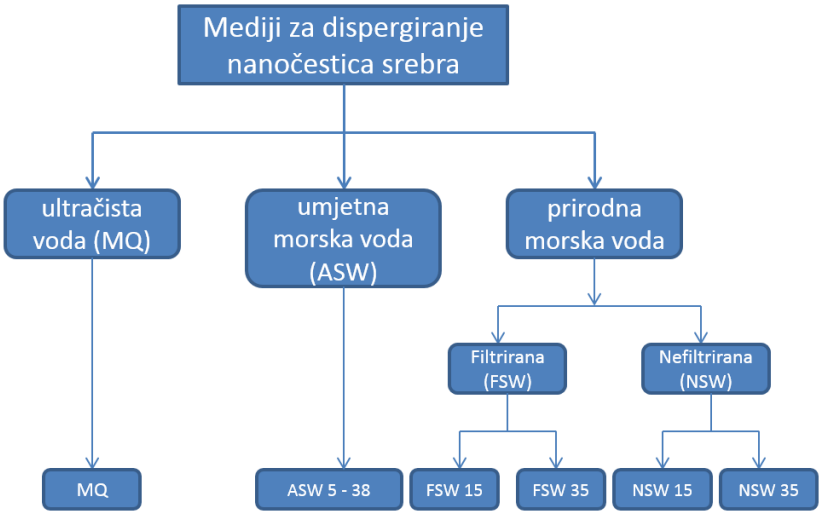
$$I_{\mathrm{ASW}} = 0{,}64\ \mathrm{M} \tag{4.4}$$

Prema tome, što je veći salinitet, veća je i ionska jakost.

Nakon što su se soli otopile, otopina se miješala na magnetskoj mješalici u laboratorijskim uvjetima (sobna temperatura, slobodan dotok zraka) još dva sata, a potom je pH vrijednost namještena na 8,2 dodatkom nekoliko kapi 0,1 M NaOH (pH-metar SevenEasy tvrtke Mettler Toledo, Columbus, Ohio, SAD). Prirodna morska voda uzorkovana je na lokacijama zapadne istarske obale: uvala Valdibora u Rovinju (45°05'10,7"N 13°38'20,8"E) i pulskom priobalju (šetalište Lungo Mare, 44°50'07"N 13°50'09"E), a filtriranjem kroz filtere promjera

pora 0,2 µm (Whatman 1, GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, UK) pripravljeni su njihovi filtrati.

Na Slici 5 dan je shematski prikaz ostalih medija korištenih za dispergiranje nanočestica i ispitivanje njihove koloidne stabilnosti. Umjetna morska voda simulirala je ionsku jakost prirodne morske vode bez otopljene i čestične frakcije organske tvari, prirodna morska voda (engl. *Natural Seawater*, NSW) bila je korištena bez ikakvih modifikacija, dok je u filtriranoj prirodnoj morskoj vodi (engl. *Filtered Seawater*, FSW) uklonjena čestična frakcija. Na koncu, prirodna morska voda je razjeđivana ultračistom vodom do željenih saliniteta. Saliniteti umjetne morske vode bili su u rasponu između 5 i 38, a saliniteti prirodne filtrirane i nefiltrirane morske vode 15 i 35. U navedenim medijima praćena je koloidna stabilnost i otapanje AgNP uz dodatak potencijalnih stabilizatora (proteini / površinski aktivne tvari / polimeri).



Slika 5. Vodeni mediji za nanočestica srebra i njihove kratice koje će se koristiti u tekstu

4.1.4. Uzorkovanje seruma morskih beskralježnjaka

Mediteranska dagnja *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) i hridinasti ježinac *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) uzorkovani su duž rovinjskog priobalja i držani u protočnim bazenima s morskom vodom dva tjedna prije postavljanja pokusa.

Dagnje su otvarane ručno, suprotnim smicanjem lijeve i desne ljuske, nakon čega je nastao mali prorez koji je rastvoren postavljanjem škarica za seciranje i njihovim zakretanjem

za 90°. U nastali prorez, blizu ruba (donji, tvrdi i zaobljeni rub ljušture) dagnje, uguran je plavi plastični nastavak za automatsku pipetu. Na taj način dagnja je bila dovoljno otvorena za uzorkovanje hemolimfe punkcijom aduktora (mišić koji služi za otvaranje i zatvaranje ljuštura) injekcijskom špricom s iglom (G 23). Iz svake dagnje bilo je moguće izvaditi 300 – 400 µL hemolimfe.

Ježincima je celomska tekućina izvađena prolaskom injekcijske šprice kroz peristom (membranu oko ustiju ježinca) i uvlačenjem celomske tekućine u injekcijsku špricu s iglom (G 23). Količina celomske tekućine koju je bilo moguće izvaditi iz pojedinog ježinca kretala se između 0,5 i 1 mL. Iz 10 jedinki dagnji pripravljen je kompozitni uzorak koji je razdijeljen u *eppendorf* tubice koje su potom centrifugirane na 4000 *g*, pri 4 °C tijekom 10 min kako bi se stanice hemolimfe odvojile od seruma. Jednaki postupak proveden je za celomsku tekućinu. Supernatanti (serumi) alikvotirani su u volumene po 1 mL i zamrznuti na – 20 °C do sljedeće upotrebe.

4.1.5. Priprema prirodnog sedimenta iz Limskog kanala

Prirodni sediment uzorkovan je u Limskom kanalu (45°08'N / 13°39'E) grabilom po Van Veen-u, nakon čega je sušen šest dana na sobnoj temperaturi te je potom prosijavan kroz niz sita od kojih je zadnje imalo promjere rupica 0,063 mm. Prosijani sediment još je jednom sušen na 60 °C tijekom jednog sata te je potom liofiliziran i pohranjen u zatvorenim kutijama na sobnoj temperaturi.

4.1.6. Priprema uzoraka za eksperimente stabilizacije nanočestica srebra proteinima

4.1.6.1. Priprema uzoraka za stabilizaciju nanočestica srebra albuminom iz goveđeg seruma

Uzorci za određivanje utjecaja BSA na stabilnost AgNP pripremani su na sljedeći način: u *eppendorf* tubice volumena 1,5 mL otpipetirano je 250 µL disperzije nanočestica srebra promjera 40 nm koje je proizvela tvrtka Sigma Aldrich (20 µg mL^{-1} nanočestica Ag40 SA) te 400 µL otopine BSA koncentracije 250 µM. Sadržaj tubice je nježno miješan tijekom tri minute, a potom je dodano 350 µL ASW saliniteta 108,7 koji je nakon razrjeđenja u konačnom

volumenu uzorka (1 mL) iznosio 38. Disperzija je ponovo lagano promiješana. Pripravljeni uzorci stajali su u laboratorijskim uvjetima, pri temperaturi od 22°C i ciklusima izmjene svjetla dan / noć te su alikvoti za mjerenja uzimani u razmacima od jednog dana. Volumen pripravljanih uzoraka uvijek je iznosio 1 mL, dok su pri eksperimentima mijenjane koncentracije nanočestica srebra (od 1 do 10 μg mL^{-1}), koncentracije BSA (od 0,001 do 500 μM), veličine nanočestica (od 10 do 100 nm) i saliniteta ASW (od 5 do 38). Kada se radilo o pokusima s mijenjanjem saliniteta (dok su koncentracije nanočestica i BSA ostale stalne), alikvoti komponenti držani su na 250 μL za disperzije nanočestica, 400 μL kad se radilo o otopini BSA, a volumen umjetne morske vode uvijek je iznosio 350 μL. Kako bi se to postiglo, primjerice, od otopine ASW početnog saliniteta 108,7 pripravljena je radna otopina saliniteta 85 te je već pomiješanim nanočesticama i BSA dodano 350 μL ASW 85 kako bi završni salinitet u volumenu od 1 mL iznosio 30.

4.1.6.2. Priprema uzoraka za stabilizaciju nanočestica srebra proteinima iz seruma morskih beskralježnjaka

Za ispitivanje koloidne stabilnosti nanočestica srebra u prisutnosti proteina iz seruma morskih beskralježnjaka odabrane su nanočestice promjera 60 nm. Prema rezultatima preliminarnih eksperimenata, bilo je vidljivo kako se i Ag40 i Ag60 zadovoljavajuće dobro stabiliziraju s albuminom iz goveđeg seruma pa su zbog složenosti uzorka seruma tjelesnih tekućina morskih beskralježnjaka odabrane Ag60 - nešto veća čestica može adsorbirati veću količinu proteina.

Nanočesticama srebra promjera 60 nm tvrtke Nanocomposix (Ag60 NC) dodavan je serum hemolimfe i celomske tekućine u ultračistoj (MQ) i umjetnoj morskoj vodi (ASW). Ispitivan je utjecaj dvaju saliniteta (15 ili 38) kako bi se provjerila mogućnost stabilizacije nanočestica proteinima u morskoj vodi „normalnog“ saliniteta (salinitet 38, Jadransko more) i u morskoj vodi dobro izmješanog estuarija (15). U *eppendorf* tubice volumena 1,5 mL prvo su dodavani alikvoti ishodne disperzije nanočestica (po 50 μL Ag60 NC početne konentracije 100 μg mL^{-1}), a zatim određeni volumen seruma hemolimfe odnosno celomske tekućine. Nakon dodavanja seruma, *eppendorf* tubica je ručno protresena i ostavljena stajati dvije minute do dodatka MQ ili ASW. Ukupni volumen uzorka iznosio je također 1 mL. Uzorci su stajali na sobnoj temperaturi te su bili podvrgnuti izmjenama prirodnog svjetla (dan/noć).

Kod uzoraka za ispitivanje stabilizacije nanočestica proteinima iz seruma morskih beskralježnjaka uvijek je korištena koncentracija AgNP od 5 μg mL^{-1} jer se očekuje da će se stabilizacija nanočestica događati u manjoj mjeri nego s modelnim proteinom (BSA), a ujedno je potrebno imati i dovoljno visoku koncentraciju koja se može lako detektirati pomoću najčešće korištenih tehnika; UV-VIS spektroskopijom i dinamičkim raspršenjem svjetlosti.

4.1.7. Priprema uzoraka za eksperimente stabilizacije nanočestica srebra pomoću površinski aktivnih tvari i polimera

U svim pokusima stabilizacije nanočestica korišten je Ag60 LMNB (nanočestice srebra promjera 60 nm, pripravljene u laboratoriju). U prethodnim pokusima pokazana je zadovoljavajuća stabilnost Ag60 kada je stabilizator bio BSA te je interes također usredotočen na pitanje može li se veća nanočestica stabilizirati s ispitanim površinskim stabilizatorima? Zbog vrlo velikog broja uzoraka, bilo je i ekonomičnije koristiti nanočestice sintetizirane u laboratoriju.

Za stabilizaciju nanočestica srebra površinskim stabilizatorima (što uključuje površinski aktivne tvari i polimere), u morskoj vodi pripremane su disperzije koje su se osim po sadržaju, razlikovale i po trenutku dodavanja pojedine komponente (nanočestica, PAT, odnosno morske vode) u svrhu simuliranja različitih scenarija kontakta nanočestica i tvari prisutnih u morskom vodenom stupcu.

Kako bi se ispitao učinak različitog naboja i strukture površinski aktivnih tvari na koloidnu stabilnost nanočestica, korištene su neionske, anionske i kationske površinski aktivne tvari i polimeri; Tween 20, Tween 80, PVP, PEI, PEG, PVA, T-X-100, Na(PSS-4-M), Pluronic P-123, Pluronic F-127, Disperbyk 110, 111, 118, 180 i 190, taninska kiselina (nije PAT niti polimer nego polifenol, sastojak NOM-a, korišten zbog moguće steričke stabilizacije prema AgNP), TOAB i heksadecilamin. Polisorbati Tween 20 i Tween 80 već su pokazali u prethodnim istraživanjima dobru stabilizaciju nanočestica u vodenoj okolini, ali istraživanja koloidne stabilnosti nisu provođena za morsku vodu[67,116,128,129,130]. Slično (dobra stabilizacijska moć) je nađeno i za skupinu Pluronica[131,132], stoga se sličan utjecaj očekuje i u morskoj vodi za nanočestice srebra. Triton-X-100 (T-X-100) se često koristi kao modelna PAT za ispitivanje koncentracije površinski aktivnih tvari u morskoj vodi[133], a i u raznim

biokemijskim istraživanjima[134]. Disperbyk skupina disperzanata[135,136] odabrana je zbog istraživanja desorpcije nanočestica sa sedimenta.

Sve navedene tvari bile su otapane u različitim medijima (Slika 5) na način da je potrebna odvaga pojedine PAT ili drugog površinskog stabilizatora otopljena u 40 mL ultračiste ili morske vode, na magnetskoj mješalici uz lagano grijanje (40-60°C) do potpunog otapanja. Od ishodne otopine pojedine PAT ili polimera u ultračistoj, umjetnoj ili morskoj vodi uzimani su alikvoti od 950 µL kojima su potom dodavane nanočestice (volumen nanočestica bio je 50 µL). U ovim eksperimentima masena koncentracija Ag60 LMNB iznosila je 5 µg mL^{-1}, a PAT između 1 i 10 mg mL^{-1} (0,1 – 1 % w/v). Ako se pak radilo o naknadnom dodavanju PAT u morsku vodu s nanočesticama, dodavani su alikvoti otopina pojedine PAT pripremljene u MQ, a zatim morska voda do željenog saliniteta. Uzorci su stajali na sobnoj temperaturi te su bili podvrgnuti ciklusima svjetla dan/noć.

4.1.8. Dodatak površinski aktivnih tvari nanočesticama srebra uz prisustvo modelnog i prirodnog sedimenta

4.1.8.1. Scenarij I – naknadni dodatak modelnog i prirodnog sedimenta

Uzorci u kojima su sedimenti dodavani naknadno (nakon nanočestica) pripremani su na sljedeći način: prvo je u *eppendorf* tubice volumena 1,5 mL ispipetiran alikvot od 950 µL prethodno pripremljene otopine pojedine PAT, čije su konačne koncentracije u 1 mL iznosile 1 – 10 mg mL^{-1}. Mediji za otopine PAT bili su ultračista voda i različite morske vode prikazane na Slici 5. Potom je u otopinu PAT dodavano po 50 µL Ag60 LMNB masene koncentracije 100 µg mL^{-1} tako da ukupni volumen tekućeg dijela uzorka bude 1 mL. Ovisno o eksperimentu, kontakt AgNP s PAT trajao je između 3 i 24 sata. U posebnim eppendorf tubicama odvagano je 5,0 ± 0,5 mg modelnog (montmorilonita) ili prirodnog sedimenta (sediment iz Limskog kanala). Konačno, po 1 mL ukupnog volumena tekućeg dijela uzorka ispipetirano je u *eppendorf* tubice sa sedimentom nakon čega su uzorci podvrgnuti kratkotrajnom ili dugotrajnom miješanju pri sobnoj temperaturi i u uvjetima izmjene svjetlosti dan/noć.

4.1.8.2. Scenarij II – istovremeni doticaj nanočestica srebra sa sedimentom i površinski aktivnim tvarima

U drugom scenariju određivana je koloidna stabilnost nanočestica prispjelih u morsku vodu bogatu PAT uz istovremenu prisutnost modelnog i prirodnog sedimenta. Da bi se dobila istovremena i stalna prisutnost sedimenta, eksperimenti su izvođeni uz rotaciju (miješanje), kako bi se osigurao maksimalan i ujednačen doticaj nanočestica sa česticama sedimenta. U tim eksperimentima razlikovala su se dva načina miješanja; kratkotrajno i dugotrajno. Razlog takvom pristupu leži u tome što je namjera bila saznati u kojoj mjeri se nanočestice zadržavaju u vodenom stupcu u priobalnom području kada u njemu nastane privremena turbulencija, a kakva je mogućnost zadržavanja nanočestica kad se u morskoj vodi suspendirana tvar duže zadržava uslijed dugotrajnijeg miješanja vodenog stupca (npr. zone s izraženim plimama i osekama).

Otopine različitih PAT (masenih koncentracija 1 – 10 mg mL^{-1}) pripremane su u svih 7 vrsta medija te su potom dodane (alikvoti od 950 µL) na odvagu sedimenta (prirodni ili modelni) koje su iznosile 5,0 ± 0,5 mg za svaki eksperiment. Odmah nakon toga, dodano je po 50 µL nanočestica srebra Ag60 LMNB koncentracije 100 µg mL^{-1}. Sav sadržaj tubice je ručno promiješan okretanjem te je nakon toga postavljen na rotaciju u laboratorijskim uvjetima. Kratkotrajno miješanje izvođeno je na laboratorijskom rotatoru PTR-25 (Grant-bio, Cambridge, UK) pri brzini 4, što odgovara brzini vrtnje od 17 okretaja u minuti. Tubice su na taj rotator postavljene vertikalno te su se okretale punih 360°. Nanočestice su se u kratkotrajnom režimu miješale 5 min. Dugotrajno miješanje izvođeno je na valjkastom laboratorijskom rotatoru RM 5 (Assistent, Karl Hecht, Sondheim/Rhon, Njemačka) gdje su se uzorci vrtili brzinom 36 okretaja u minuti, konstantno, kroz cijelo vrijeme trajanja eksperimenta (do 10 dana), osim kada su uzimani za mjerenja. Zbog osiguravanja prostora vrtnje za veću količinu *eppendorf* tubica, po 20 tubica sa uzorcima bilo je postavljano u plastičnu cilindričnu posudicu za sediment te su se uzorci grupno okretali. Područje oko čepa *eppendorf* tubice bilo je zaštićeno parafilmom.

4.1.8.3. Scenarij III – remobilizacija nanočestica srebra s modelnog sedimenta uz pomoć površinski aktivnih tvari u ultračistoj vodi

U trećem scenariju nanočestice su prvo postavljene u kontakt s modelnim sedimentom kroz neprestanu rotaciju na laboratorijskom rotatoru PTR-25 (opisan u prethodnom poglavlju) i to u ultračistoj vodi, dok nije postignuto ravnotežno stanje (koncentracija slobodnih nanočestica prestala se značajnije mijenjati jer nije dolazilo do promjene vrijednosti apsorbancije). Nakon toga dodavani su pojedini površinski stabilizatori u koncentracijama 0,1 – 10 mg mL^{-1}. Uzorci su konstantno miješani na rotatoru te su u neposredno prije mjerenja blago centrifugirani (1000*g* kroz 10 s). Jača centrifugalna sila uzrokovala je vidljiv pad koncentracije AgNP, stoga su izabrani blagi uvjeti centrifugiranja, a ukupna koncentracija nanočestica u traženim intervalima također je mjerena površinom ispod SPR pika. U dobivenim supernatantima ispitivana je prisutnost remobiliziranih nanočestica srebra tehnikom UV-VIS spektroskopije.

U tom pokusu medij je bila samo ultračista voda, a sediment samo modelni iz razloga što je očekivano teško odvajanje nanočestica sa sedimenta te bi kompleksni mediji s velikom ionskom jakosti samo dodatno umanjili uspješnost odvajanja, a cilj tog pokusa je saznati mogu li se uopće nanočestice odvojiti sa sedimenta uz pomoć PAT.

4.2. Metode

4.2.1. Karakterizacija medija

4.2.1.1. Određivanje saliniteta prirodne morske vode

Salinitet prirodne morske vode uzete iz protočnih bazena Centra za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković, koje u sustav ulaze u uvali Valdibora (45°05'10,7"N 13°38'20,8"E) određivan je na salinometru MS 310e tvrtke RBR Ltd. (Ottawa, Kanada). Kalibracija i standardizacija instrumenta provedene su s IAPSO (engl. *International Association for Physical Sciences of the Ocean, IAPSO*) standardnom morskom vodom tvrtke Ocean Scientific International Ltd. (Hampshire, UK). Polietilenske boce volumena 250 mL napunjene su do vrha morskom vodom i zatvorene podčepom i čepom kako bi se spriječilo dodatno otapanje CO_2. U bocama s uzorkom ne smije biti mjehurića zraka. Salinometrom se mjeri vrijednost omjera konduktiviteta (*R*) uzorka morske vode i IAPSO standardne morske vode saliniteta 35,000 čijim se uvrštavanjem u empirijske relacije izračunava salinitet[137].

4.2.1.2. Određivanje sadržaja otopljenog i čestičnog organskog ugljika u prirodnoj morskoj vodi

Laboratorijsko posuđe i sustav za filtraciju morske vode oprani su u krom-sumpornoj kiselini. Za određivanje koncentracije otopljenog organskog ugljika (DOC) jedna litra morske vode propuštana je kroz filtere od staklenih vlakana promjera pora 0,7 μm (Whatman GF/F, Whatman Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, SAD) koji su prethodno žareni u mufolnoj peći na 450 °C tijekom četiri sata. Od ukupnog volumena filtrata uzete su dvije kivete volumena 22 mL koje su također prethodno žarene na 450 °C/4 h te im je dodan živin (II) klorid ($HgCl_2$) koncentracije 2 g L^{-1} za konzerviranje. Uzorci su čuvani u mraku na 4 °C do mjerenja. Koncentracija DOC-a određena je metodom visokotemperaturne katalitičke oksidacije (engl. *High Temperature Catalytic Oxidation, HTCO*) na analizatoru ukupnog organskog ugljika (engl. *Total Organic Carbon, TOC*) TOC-$_{VCPH/CPN}$ (Shimadzu, Kyoto, Japan). **Čestični organski ugljik** (engl. *Particulate Organic Carbon, POC*) određen je iz materijala zaostalog na Whatman GF/F filteru, koji je nakon filtracije ispran s nekoliko mililitara ultračiste vode te pohranjen u zamrzivaču pri temperaturi od –50 °C. Filteri su nakon vađenja iz zamrzivača prosušeni na temperaturi od približno 40 °C tijekom dva sata, a potom ohlađeni na sobnu temperaturu te zakiseljeni s 2M HCl kako bi se uklonio sav anorganski ugljik. Preostali organski ugljik određen je metodom visokotemperaturne katalitičke oksidacije u modulu za krute uzorke SSM-5000A (Shimadzu, Kyoto Japan).

4.2.2. Određivanje koncentracije proteina iz seruma morskih beskralježnjaka metodom po Bradfordu

Koncentracija proteina u supernatantima celomske tekućine i hemolimfe određivana je metodom po Bradfordu[138] koristeći Roti® Nanoquant kit (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Njemačka). Test je rađen u mikropločama. Kalibracijska krivulja rađena je korištenjem standardnih otopina BSA koncentracija 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 75, 100 μg mL^{-1} i ultračiste vode kao slijepe probe, a uzorci hemolimfe i celomske tekućine sukcesivno su razrijeđivani (1, 5, 10, 20, 40, 100 i 500 puta) ultračistom vodom. U jažice je najprije dodano po 50 μL otopine BSA odnosno razrijeđenog uzorka, a zatim po 200 μL pet puta razrjeđene originalne Roti® Nanoquant otopine. Kao odziv na promjenu koncentracije mjerena je apsorbancija uzoraka pri 590 i 450 nm nakon čega je izračunat kvocijent A_{590}/A_{450}. Za

određivanje nepoznate koncentracije proteina u supernatantima hemolimfi i celomske tekućine korištene su vrijednosti kvocijenta navedenih apsorbancija koje su pokazale linearnu ovisnost o razrjeđenju i bile interpolirane u linearnu funkciju ovisnosti, dobivenu izračunatim vrijednostima za standardne otopine BSA.

4.2.3. Karakterizacija sedimenta

4.2.3.1. Određivanje sastava

Difraktogrami praškastih uzoraka modelnog i prirodnog sedimenta snimljeni su na difraktometru APD 2000 – PXRD (Malvern Panalytical, Malvern, UK) u Bragg – Brentano geometriji koristeći CuK_{α} zračenje. Difraktogrami su snimani u 2θ području 5° do 70° s korakom od 0,02° 2θ i brzinom snimanja 1 ° min^{-1}.

FTIR spektri uzoraka modelnog i prirodnog sedimenta snimljeni su na Tensor II FTIR spektrofotometru tvrtke Bruker (Bruker, s dijamantnim kristalom. Spektri su snimljeni u području 4000-400 cm^{-1}, s rezolucijom 2 cm^{-1}. Prikazani spektri su prosjeci 16 skenova.

4.2.3.2. Određivanje ukupne površine

Uzorci modelnog (montmorilonit, MMT) i prirodnog sedimenta (sediment iz Limskog kanala, NS) prije mjerenja sušeni su na 75 °C tijekom jednog sata. Analiza je provedena na instrumentu Gemini 2380 (Micromeritics, Norcross, Georgia, SAD). Ukupna površina uzoraka računala se po Brunauer–Emmett–Teller (BET) teoriji.

4.2.3. Određivanje stabilnosti nanočestica u ispitivanim sustavima

4.2.3.1. Određivanje koloidne stabilnosti nanočestica srebra UV-VIS spektroskopijom

Prisutnost stabilnih nanočestica srebra u disperziji mjerena je UV-VIS spektroskopijom koristeći dva instrumenta: (*i*) spektrofotometar Shimadzu UV-1800 (Shimatzu Coroporation, Kyoto, Japan) s dvostrukim optičkim snopom i (*ii*) TECAN Infinite M200 Pro spektrofluorimetar – čitač mikroploča (engl. *Microplate reader*) (Tecan Life Sciences, Männedorf, Švicarska). Raspon valnih duljina pri kojima su mjereni apsorpcijski spektri disperzija nanočestica bio je od 200 do 800 nm na UV Shimadzu spektrofotometru, a uzorci su bili mjereni u kvarcnim kivetama optičkog puta 1 cm. Razlučivost je bila 1 nm. Mjerenja apsorbancije uzoraka na spektroflouorimetru TECAN vršila su se u mikropločama BD Falcon 96 Flat Transparent (Deltalab, Barcelona, Španjolska), pri čemu je raspon valnih duljina iznosio 230 do 800 nm. Razlučivost je bila 2 nm, a svaka jažica očitana je tri puta.

Za obradu podataka (apsorbancija) korišteni su računalni programi UVProbe 2.3.1. (Shimadzu, Kyoto, Japan) i OriginPro 8.0 SR4 (Originlab Corporation, Northmapton, Massachusetts, SAD). Kao mjerila prisutnosti individualno dispergiranih AgNP korišteni su: a) maksimum apsorbancije, te b) ukupna površina karakterističnog SPR pika dobivenih spektrograma.

Razlog korištenja i maksimuma apsorbancije (tj. visine pika, A_{MAX}) i ukupne površine SPR pika u ovom doktorskom radu je taj što prva veličina u obzir uzima samo najbrojnije neagregirane nanočestice, a druga obuhvaća sve stabilizirane nanočestice u uzorku. Navedene veličine koreliraju, ali zbog boljeg opisivanja rezultata odabrano je korištenje i jedne i druge. Naime, čak i komercijalne disperzije nanočestica nisu potpuno uniformne u smislu da ne sadrže samo jednu, strogo definiranu veličinu nanočestica, nego se radi o nanočesticama koje uglavnom imaju definirani promjer uz primjese većih i manjih nanočestica. Maksimum apsorbancije SPR pika prikazuje najbrojniju frakciju neagregiranih nanočestica određene veličine, ali u tom uzorku ujedno su stabilizirane i nanočestice koje imaju nešto manje i nešto veće promjere te se one očitavaju tako što pik nije uzak, nego ima određenu širinu. Taj pristup je dovoljno dobar kada se radi o stabilizaciji nanočestica relativno uniformnih veličina s modelnim stabilizatorom kao što je BSA, ali u slučaju stabilizacije s proteinima seruma morskih beskralježnjaka (realan uzorak) i stabilizacije AgNP s PAT u uzorcima prirodne morske vode, očekuje se znatno proširenje pika. Visina SPR pika izravno govori o koncentraciji najbrojnije veličine nanočestica, dok se manje i veće nanočestice očituju u ostatku pika. Prema tome, sama

visina pika nije najbolji pokazatelj količine svih prisutnih nanočestica. Zato je odlučeno da se računa i površina SPR pika kojoj pridonose sve veličine stabiliziranih nanočestica. Takav pristup pokazan je i u radu Lodeira i suradnika[61].

4.2.4.2. Određivanje hidrodinamičkog promjera nanočestica dinamičkim raspršenjem svjetlosti

Raspodjela veličina čestica određivana je tehnikom dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS) u uzorcima nanočestica u različitim vodenim medijima te s dodatkom proteina ili površinski aktivnih tvari uz prisutnost sedimenta u pojedinim uzorcima. Mjerenja su provođena koristeći Zetasizer Nano ZS (Malevern Panalytical, Malvern UK) instrument. Intenzitet raspršene svjetlosti mjeren je pod kutem od 173° u polistirol/polistiren kivetama optičkog puta 1 cm. Vrijednosti hidrodinamičkih promjera dobivene su kao vrijednosti vrha pika volumne distribucije. Mjerenje raspršenja svjetlosti u svakom uzorku ponovljeno je 6 do 10 puta. Dobiveni podaci obrađivani su računalnim programom Zetasizer software 6.32 (Malvern Pananalytical, Malvern, UK), te je za svaki uzorak izračunata prosječna vrijednost d_h.

4.2.5. Određivanje koncentracije iona i nanočestica srebra u ispitivanim sustavima

4.2.5.1. Određivanje koncentracije iona srebra spektrometrijom masa s induktivno-spregnutom plazmom

Za određivanje koncentracije iona srebra u uzorcima korištena je tehnika spektrometrije masa s induktivno spregnutom plazmom (engl. *Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry, ICP-MS*). Ioni srebra izdvojeni su iz koloidnih disperzija nanočestica srebra primjenom ultrafiltracije (centrifugiranjem). Za to su korištene Whatman VectaSpin Micro centrifugalne tubice (GE Healthcare Life Sciences, Scherty, TX), u koje je dodan uzorak, koji se filtrirao pri rotaciji kroz membrane načinjene od celuloznog acetata s graničnom molekulskom masom komponente (eng. *Molecular weight cut-off, MWCO*) od 12 kDa. Centrifugiranje se provodilo koristeći Eppendorf 5417R centrifugu (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) pri 10000 *g* tijekom 20 min i temperaturi od 22 °C. Odsutstvo nanočestica u filtratu potvrđeno je tehnikom UV-VIS spektroskopije

Koncentracija iona srebra i srebrnih nanočestica u dobivenim filtratima mjerena je koristeći Thermo Scientific™ (High Resolution) Element 2™ ICP-MS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) s SC-2 DX FAST (Element Scientific, Omaha, NE, SAD) sustavom za autonomno uzorkovanje i analizu. U uzorcima su određivana dva izotopa srebra: nuklidi ^{107}Ag i ^{109}Ag. Filtrati koloidnih disperzija srebrnih nanočestica razrjeđeni su 20 puta s razrjeđenom dušičnom kiselinom (2% v/v) te je indij dodan kao unutrarnji standard (1 μg L^{-1}). Standardne otopine pripravljene su ciljanim razrjeđenijima ishodne otopine srebra (1,000 g L^{-1}) također u 2%-tnoj (v/v) dušičnoj kiselini.

4.2.5.2. Procjena koncentracije nanočestica srebra u vodenom stupcu pomoću UV-Vis spektroskopije

Masena koncentracija nanočestica srebra prisutnih u vodenom stupcu grubo je procijenjivana (polukvantitativna analiza) metodom opisanom u radovima Sikdera i Paramelle[139,140]. Metoda se zasniva na poznavanju molarnog apsorpcijskog koeficijenta AgNP različitih veličina i određivanju apsorbancije maksimuma SPR pika. Masena koncentracija AgNP, γ_{AgNP}, se određuje prema jednadžbi 4.5.:

$$\gamma_{\mathrm{AgNP}} = \frac{\pi d^3 \rho A N_{\mathrm{A}}}{6 L \varepsilon} \tag{4.5.}$$

gdje je d je promjer nanočestice, ρ označava gustoću srebra, N_{A} je Avogadrova konstanta, L je duljina optičkog puta, a ε je molarni apsorpcijski koeficijent koji za Ag60 i iznosi $739 \cdot 10^8$ M^{-1} cm^{-1}[140].

4.2.6. Elektronska mikroskopija

4.2.6.1. Transmisijska elektronska mikroskopija

Disperzije nanočestica analizirane su transmisijskom elektronskom mikroskopijom (engl. *Transmission Electron Microscopy,* TEM). Kapljica uzorka mikropipetom je prebačena na bakrenu mrežicu prekrivenu formvarom (EM-TEC Formvar®/Carbon Copper Grid, Micro To Nano, Nizozemska). Nakon što se kapljica uzorka osušila na mrežici, ista je bila pregledana transmisijskim elektronskim mikroskopom (Morgagni 268D, FEI, Nizozemska) pri naponu od

70 kV. Uzorci nisu bili isprani kako ne bi došlo do dodatne agregacije prilikom centrifugiranja i zamjene supernatanta ultračistom vodom. Isto vrijedi i za snimanje mikrografija pretražnom elektronskom mikroskopijom.

4.2.6.2. Pretražna elektronska mikroskopija

S dna tubica pipetirano je po 5 µl uzorka i naneseno na površinu ljepljive ugljikove trake koja je prethodno bila zalijepljena na standardne aluminijske nosače uzoraka. Uzorci su ostavljeni da se osuše preko noći, nakon čega su postavljeni na nosače pretražnog elektronskog mikroskopa Tescan Vega3 s volframovom elektrodom (Tescan Analitics, Actipôle St. Charles, Francuska). Za dobivanje slike korišten je detektor sekundarnih elektrona. Parametri označeni na svakoj od slika su: SEM HV - napon ubrzanja elektrona; WD - working distance tj. radna udaljenost; SEM MAG - povećanje mikroskopa.

4.2.6.3. Analiza mikrografija

Mikrografije dobivene s transmisijskog i pretražnog elektronskog mikroskopa obrađivane su računalnim programom za analizu fotografija Image J 1.52d (National Institute of Health, Maryland, SAD). Veličina nanočestica nije određivana automatskom funkcijom programa već pojedinačno na način da je svaka nanočestica aproksimirana na geometrijski lik kruga istog promjera kojem je potom izmjerena površina. Iz površine kruga (P) dobiven je promjer nanočestice (d) prema jednadžbi 4.6.:

$$d = 2\sqrt{\frac{P}{\Pi}} \tag{4.6.}$$

4.2.7. Obrada podataka

Krivulje otapanja nanočestica srebra modelirane su funkcijom rasta u programu OriginPro koristeći model Box Lucas1 prema jednadžbi 4.7.:

$$y = a\,(1 - e^{-bx}) \tag{4.7.}$$

pri čemu su imena parametara prilagođena za proces otapanja nanočestica srebra, opisan u radu Kittlera i sur. 2010[100] prema jednadžbi 4.8.:

$$[\mathrm{Ag}^+]_t = [\mathrm{Ag}^+]_{\text{konačno}} (1 - e^{kt}) \tag{4.8.}$$

gdje je $[\mathrm{Ag}^+]_t$ koncentracija otopljenog srebra u vremenu t, $[\mathrm{Ag}^+]_{\text{konačno}}$ je modelirani parametar konačne koncentracija kad $t \rightarrow \infty$, a k je konstanta brzine otapanja.

Krivulje koje pokazuju smanjenje apsorbancije nanočestica s vremenom modelirane su kao krivulje eksponencijalnog pada u dvije faze izvedenom u računalnom programu OriginPro prema jednadžbi 4.9.:

$$y = y_0 + A_1 e^{-x/t_1} + A_2 e^{-x/t_2} \tag{4.9.}$$

pri čemu je y_0 odsječak na ordinati, A_1 i A_2 su konstante (amplitude) prvog (brzog) i drugog (sporijeg) pada, dok su t_1 i t_2 vremena raspada za prvi i drugi eksponencijalni pad. Taj model izabran jer se slaže s prepoznatim mehanizmom agregacije koji se odvija u dva stupnja, u prvom stupnju je kontroliran reakcijom, a drugom difuzijom[141,142].

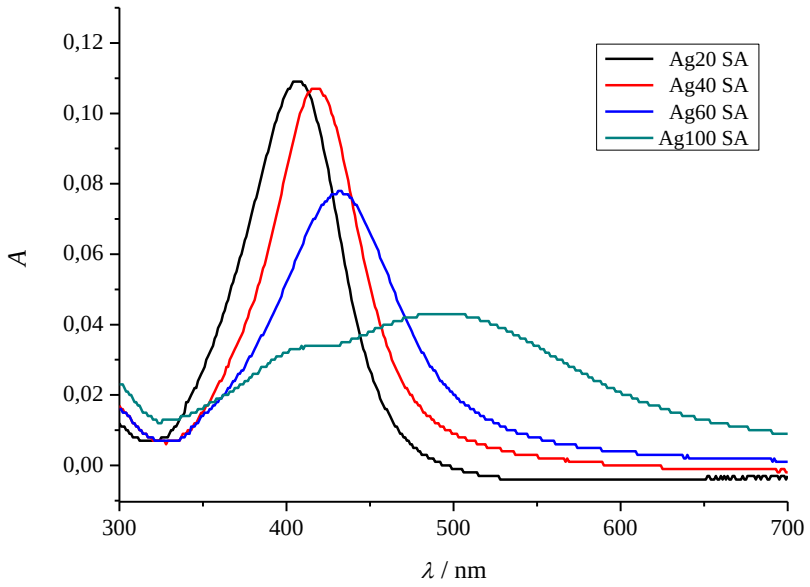
5. REZULTATI I RASPRAVA

5. Rezultati i Rasprava

5.1. Karakterizacija materijala

5.1.1. Karakterizacija nanočestica

Veličina nanočestica srebra uvelike određuje njihova fizikalno-kemijska te antibakterijska svojstva[143,144]. Zbog učinka površinske plazmonske rezonancije (engl. *Surface Plasmon Resonance*, SPR) (poglavlje 3.6.), AgNP snažno apsorbiraju svjetlost na valnim duljinama između približno 320 i 500 nm. Položaj vrha takozvanog SPR pika izrazito ovisi o veličini nanočestice, što se vidi na Slici 6.

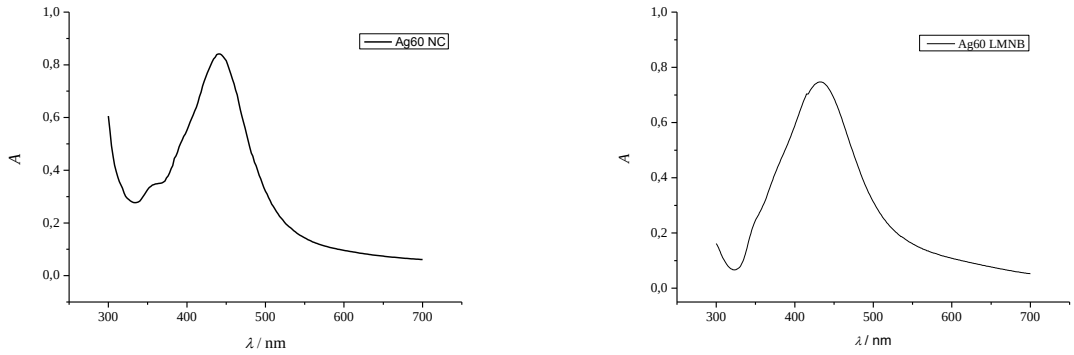


Slika 6. Apsorbancijski spektri za disperzije nanočestica srebra proizvođača Sigma Aldrich (SA) promjera 20, 40, 60 i 100 nm (Ag20 SA, Ag40 SA, Ag60 SA i Ag100 SA) i masene koncentracije 1 μg mL^{-1}. Medij za nanočestica je bila ultračista voda (MQ), a eksperiment i mjerenja su vršeni pri sobnoj temperaturi.

Primjećuje se kako su komercijalne nanočestice različitih veličina, a iste masene koncentracije davale značajno različite vrijednosti apsorbancije pri vrhovima pikova (A_{MAX}). Razlog tome je taj što je učinak površinske plazmonske rezonancije izraženiji za manje nanočestice te činjenica da je brojnost malih nanočestica veća nego brojnost većih nanočestica za istu masenu koncentraciju.

Apsorbancijski spektri za preostale dvije korištene vrste nanočestica; komercijalne, Ag60 NC i laboratorijski sintetizirane Ag60 LMNB prikazani su na Slici 7, dok su u Tablici 5

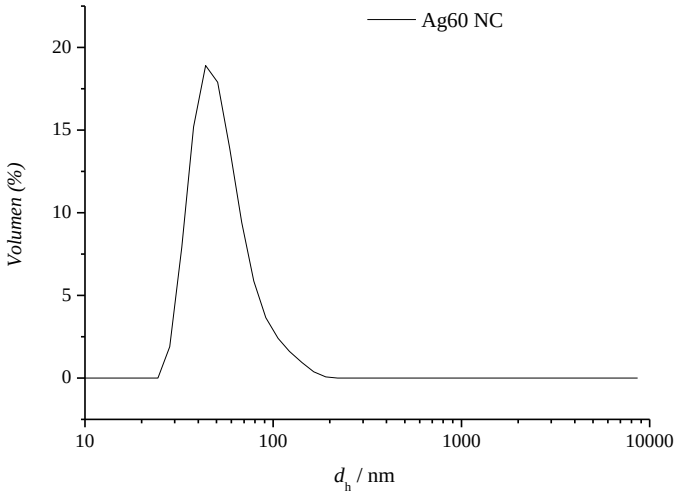
prikazani i hidrodinamički promjeri nanočestica (d_h) dobiveni dinamičkim raspršenjem svjetlosti (DLS). Na Slici 8 dan je grafički prikaz rezultata mjerenja d_h za Ag60 NC.



Slika 7. Apsorbancijski spektri disperzije nanočestica srebra proizvođača Nanocomposix promjera 60 nm (Ag 60 NC) (lijevo) i nanočestice sintetizirane u laboratoriju (Ag60 LMNB) (desno) u ultračistoj vodi (MQ). Masene koncentracije iznosile su 5 μg mL^{-1} za Ag60 NC i Ag60 LMNB. Eksperiment i mjerenja vršeni su pri sobnoj temperaturi.

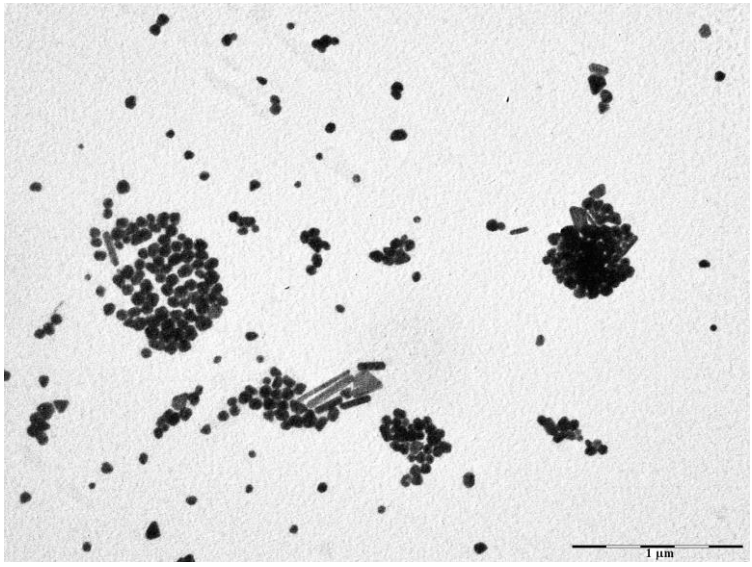
Tablica 5. Nominalni i mjereni hidrodinamički promjeri, d_h, za nanočestice srebra kupljene od tvrtke Sigma Aldrich (Ag40 SA), nanočestice kupljene od tvrtke Nanocomposix, promjera 60 nm (Ag60 NC) i nanočestice srebra promjera 60 nm, sintetizirane u laboratoriju (Ag60 LMNB). Sve masene koncentracije iznosile su 5 μg mL^{-1}. Čestice su bile suspendirane u ultračistoj vodi (MQ). Mjerenja su izvedena pri sobnoj temperaturi.

	nominalna veličina / nm	d_h / nm	SD
Ag40 SA / MQ	40	39,22	14,41
Ag60 NC / MQ	60	55,35	24,21
Ag60 LMNB / MQ	60	54,60	29,40

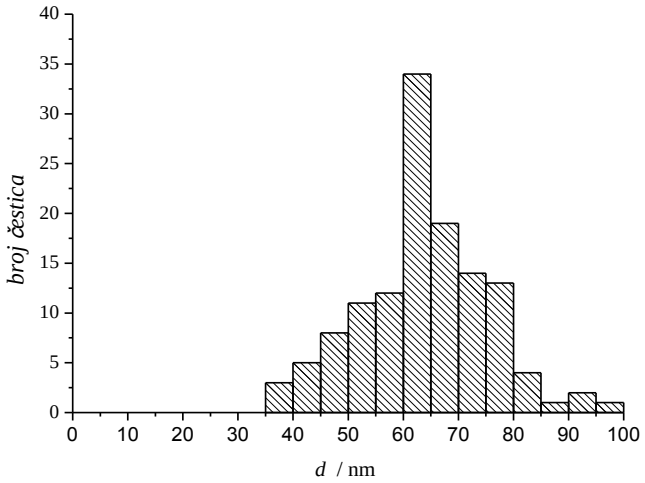


Slika 8. Volumna raspodjela hidrodinamičkog promjera (d_h) nanočestica Ag60 NC dispergiranih u ultračistoj vodi, masene koncentracije 5 μg mL^{-1} pri sobnoj temperaturi.

Slika 9 prikazuje mikrografiju nanočestica srebra nominalnog promjera 60 nm, sintetiziranih u laboratoriju (Ag60 LMNB) s citratom kao zaštitnim omotačem. Na slici se jasno razaznaje približno sferična morfologija nanočestica. Iako se u sintetiziranom uzorku nalaze dispergirane nanočestice, uočljivo je i postojanje aglomerata i agregata te štapićaste i strukture u obliku trokutića koje su uobičajena primjesa pri sintezi nanočestica srebra[145]. Korištenjem računalnog programa Image J analizirana je mikrografija u smislu određivanja promjera nanočestica, a rezultati su prikazani histogramom (Slika 10). Ukupno je



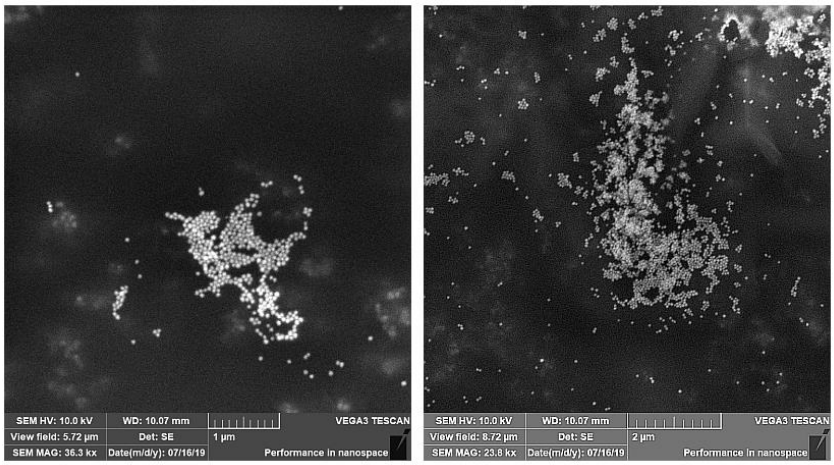
Slika 9. TEM mikrografija sintetiziranih nanočestica srebra nominalnog promjera 60 nm (Ag60 LMNB) i masene koncentracije 5 µg mL^{-1} dispergiranih u ultračistoj vodi.



Slika 10. Histogram promjera (*d*) nanočestica srebra sintetiziranih u Laboratoriju za morsku nanotehnologiju i biotehnologiju (Ag60 LMNB). Promjeri su dobiveni analizom mikrografije sa Slike 9 u programu ImageJ.

analizirano 127 nanočestica, a iz prebrojavanja su izostavljeni nanoštapići, nanotrokutići i nanoprizme. Analizom je ustanovljeno da su nanočestice sintetizirane u laboratoriju promjera 64,07 ± 11,58 nm (Ag60 LMNB), od kojih se 60% nalazi se u rasponu između 50 i 70 nm, dok je preostalih 40% raspoređeno u preostale veličinske razrede.

Komercijalne nanočestice kupljene od tvrtke Nanocomposix (Ag60 NC) snimljene pretražnom elektronskom mikroskopijom prikazane su na Slici 11.



Slika 11. SEM mikrografija komercijalnih nanočestica srebra nominalnog promjera 60 nm (Ag60 NC) i masene koncentracije 5 µg mL^{-1} dispergiranih u ultračistoj vodi.

Dinamičko raspršenje svjetlosti pokazalo je kako su mjereni hidrodinamički promjeri nanočestica nešto manji od nominalnih, što osim zbog polidisperznosti uzorka, može biti i zbog postupnog otapanja nanočestica. Iz rezultata UV-VIS spektroskopije (Slika 7 desno) može se zaključiti kako je uzorak sintetiziranih nanočestica (Ag60 LMNB) veće polidisperznosti nego Ag60 NC, što je očekivano, zbog bolje kontrole uvjeta sinteze komercijalnih nanočestica.

5.1.2. Sadržaj otopljenog i čestičnog organskog ugljika u morskoj vodi

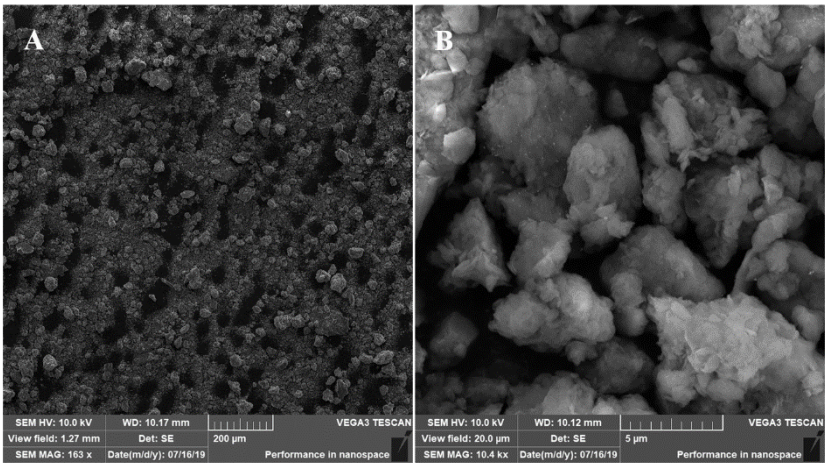
Koncentracija otopljenog (engl. *Dissolved Organic Carbon,* DOC) i čestičnog (engl. *Particulate Organic Carbon,* POC) ugljika u prirodnoj morskoj vodi iz protočnih bazena Centra za istraživanje mora u Rovinju određena je primjenom metode visokotemperaturne katalitičke oksidacije. Rezultati su:

- γ (DOC) = 0,064 mg L^{-1}
- γ (POC) = 1,543 mg L^{-1}.

5.1.3. Karakterizacija sedimenta

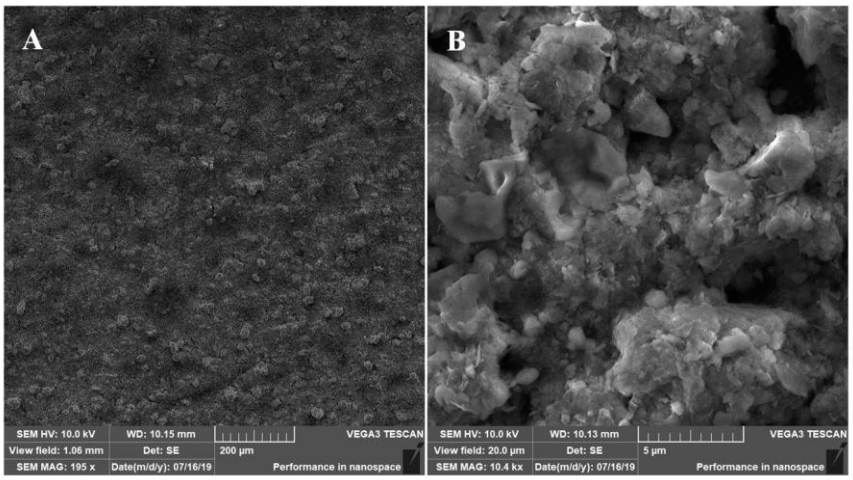
5.1.3.1. Pretražna elektronska mikroskopija modelnog i prirodnog sedimenta

Slika 12 prikazuje SEM mikrografije montmorilonita (MMT) dispergiranog u ultračistoj vodi. Na slici je uočljiva zrnata struktura i široka raspodjela veličina čestica koje uglavnom ne prelaze 80 μm. Pri većem povećanju (Slika 12B) vidljiva je pak listićasta struktura čestica MMT-a, veličina od nekoliko mikrometara, što je i očekivano jer se radi o filosilikatu.



Slika 12. SEM mikrografija modelnog sedimenta, minerala gline montmorilonita (MMT), pod povećanjem od A) 163 i B) 10 400 puta.

Prirodni sediment (engl. *Natural Sediment, NS*) je također relativno uniformne površine, ali su čestice vrlo raznolikih veličina i oblika (Slika 13). Pri povećanju od 10400 puta (Slika 13B), primjećuje se da je uzorak sadrži različitije oblike i manje čestice te je zbog toga i kompaktniji nego modelni sediment. Analizom mikrografije vidljivo je kako se veličine čestica kreću od nekoliko do približno 50 μm.



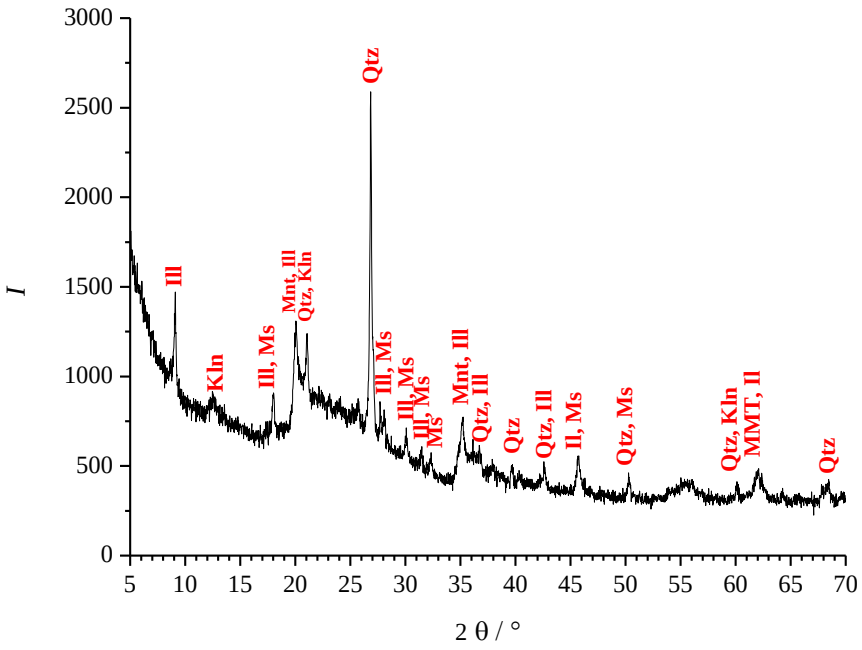
Slika 13. SEM mikrografija prirodnog sedimenta iz Limskog kanala (NS), pod povećanjem od A) 195 puta i B) 10400 puta.

5.1.3.2. Određivanje specifične površine sedimenata

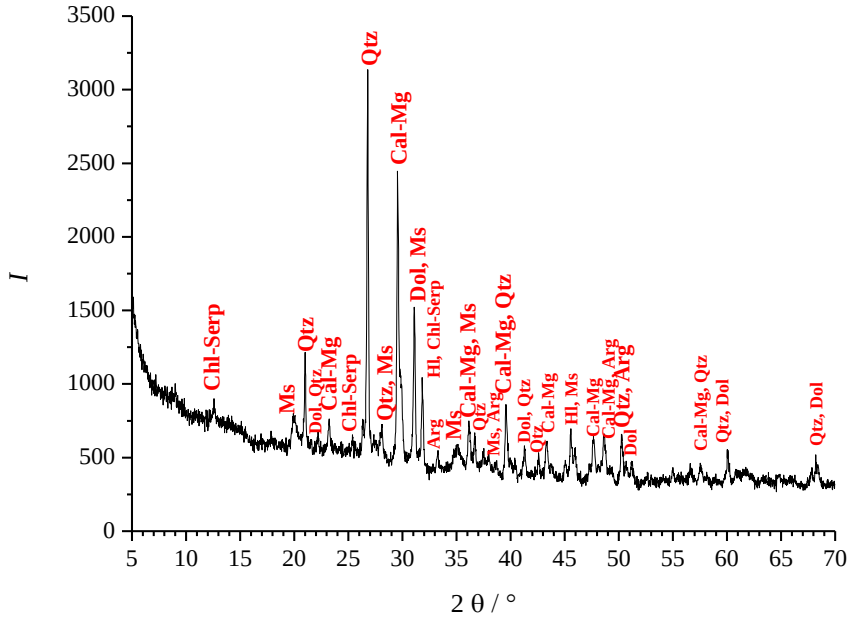
Specifična površina modelnog sedimenta, montmorilonita, iznosila je 193,5627 ± 0,4672 $m^2\ g^{-1}$, a prirodnog sedimenta iz Limskog kanala 13,9658 ± 0,0433 $m^2\ g^{-1}$. Razlika u specifičnim površinama očekivana je već na temelju dobivenih SEM mikrografija ova dva tipa sedimenta.

5.1.3.3. Određivanje mineralnog sastava

Računalni program za analizu rentgenograma X'Pert High Score tvrtke Panalytical (Malvern Panalytical, Malvern, UK) odredio je glavne mineralne komponente u oba tipa sedimenta. Analiza je kvalitativna i semikvantitativna, a rezultirajući rentgenogrami prikazani su na slikama 14 i 15. Montmorilonit K10 tvrtke Sigma Aldrich multifazni je uzorak koji se sastoji od 5 minerala poredanih po zastupljenosti; kvarc (kremen), montmorilonit, ilit, muskovit i kaolinit. Prikazani rentgenogram slaže se sa rezultatima Alastaira i sur.[146] gdje je također korišten montmorilonit tvrtke Sigma Aldrich.



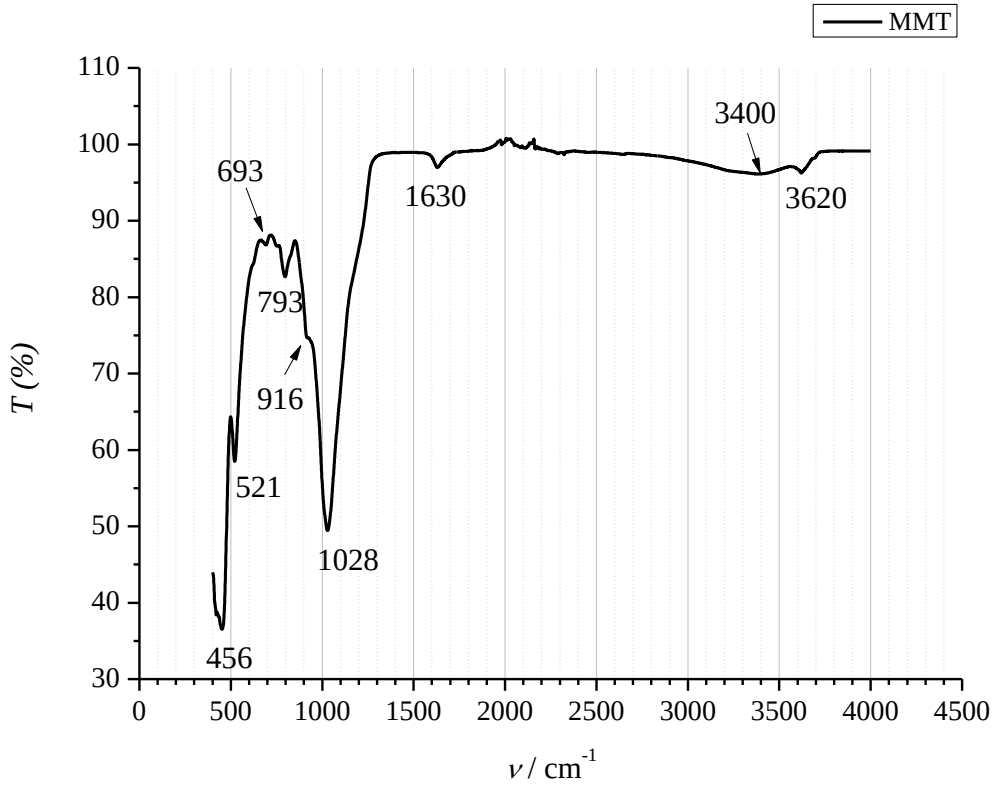
Slika 14. Rendgnenska difrakcija na uzorku montmorilonita. Nazivi minerala su skraćeni prema Kretz i sur.[147]; Ill = ilit, Kln = kaolinit, Ms = muskovit, Qtz = Kvarc, Mnt = montmorilonit.



Slika 15. Rendgenska difrakcija na uzorku prirodnog sedimenta iz Limskog kanala (NS). Kratice su prema radu Kretz i sur.[147]; Cal-Mg – kalcit magnezijski, Qtz = kvarc, Hl = halit, Dol = dolomit, Chl-Serp = klorit-serpentin, Ms = muskovit, Arg = aragonit.

Sediment iz Limskog kanala imao je još složeniji sastav što se vidi i na Slici 15. U prirodnom sedimentu iz Limskog kanala (NS) dominiraju nisko-magnezijski kalcit i kvarc. U manjoj količini prisutni su halit, dolomit, klorit, te aragonit. Navedene vrste minerala karakteristične su komponente sitno-zrnate frakcije (< 63 μm) površinskih sedimenata istočne obale jadranskog mora[148].

Slike 16 i 17 prikazuju FTIR spektre montmorilonita i prirodnog sedimenta iz Limskog kanala. Dobiveni FTIR spektri uspoređeni su sa spektrima montmorilonita, kalcita, kvarca, kaolinita i dolomita[149-152]. U slučaju podudarnosti više karakterističnih vrpci, može se reći da je određeni mineral prisutan u uzorku.

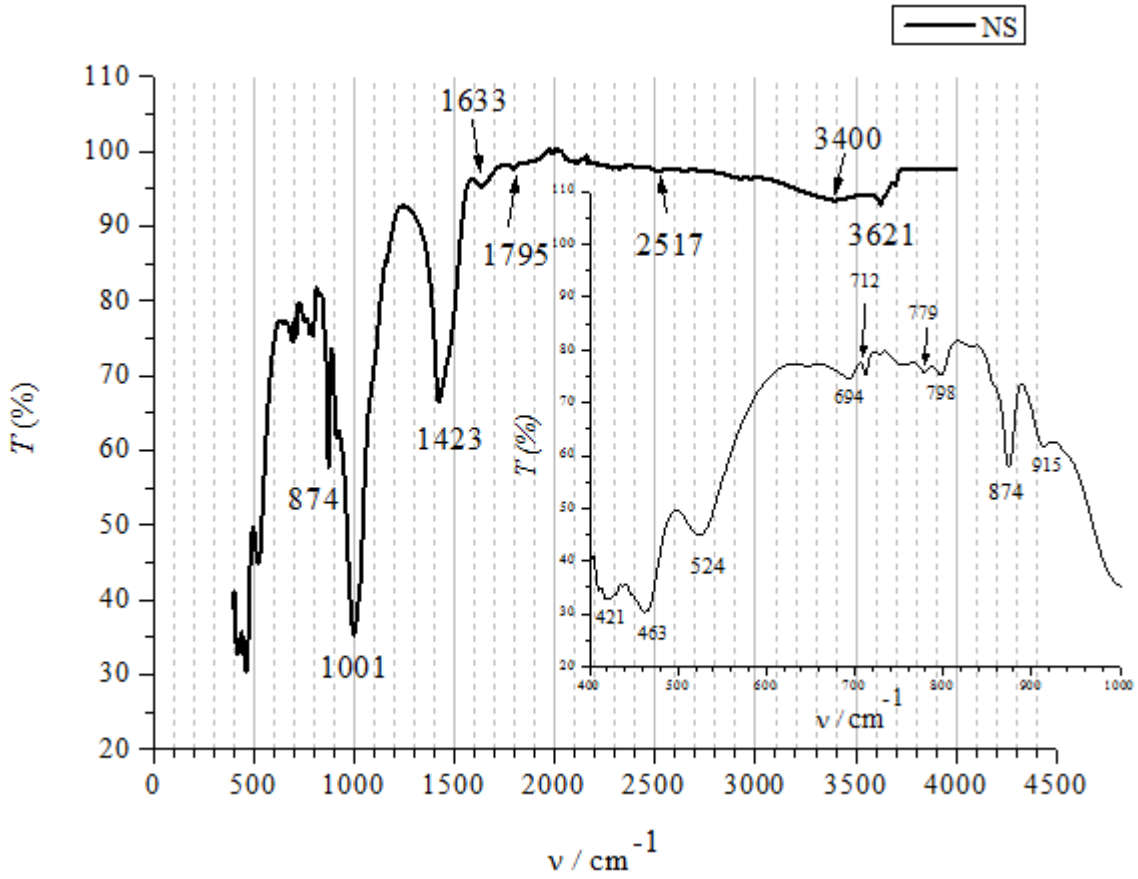


Slika 16. FTIR spektar montmorilonita K10 proizvođača Sigma Aldrich.

Tablica 6. Asignacija vrpci u FTIR spektru montmorilonita prema ref. [150].

ν / cm^{-1}	karakteristične vrpce
3620	O-H istezanje
3400	O-H istezanje
1630	O-H savijanje
1028	Si-O istezanje u ravnini
916	AlAlOH savijanje
793	Tridimit (pločasti oblici)
521	Si-O savijanje

Usporedbom Slike 16 i Tablice 6, može se primjetiti da su sve vibracije karakteristične za montmorilonit prisutne i u ovom uzorku tako da se može tvrditi da se radi o montmorilonitu. FTIR spekar prirodnog sedimenta prikazan je na Slici 17.



Slika 17. FTIR spektar prirodnog sedimenta iz Limskog kanala, NS

Tablica 7. Asignacija vrpci u FTIR spektru prirodnog sedimenta iz Limskog kanala prema ref. [150]

valni broj / cm^{-1}	**karakteristična vrpca**
3620	OH istezanje unutarpovršinskih OH skupina
3400	OH istezanje adsorbirane i zeolitne (unutarkanalne) vode
2517	kalcit
1633	OH-savijanje, deformacija vode
1423	CO_3 istezanje (kalcit)
874	savijanje izvan ravnine (kalcit)
798	Si-O istezanje (kvarc)
779	Si-O istezanje (kvarc)
712	Si-O istezanje + savijanje u ravnini (kalcit)
694	Si-O
463	Si-O

Prema radu Vaculíková i Plevová[150], vrpce u prirodnom sedimentu podudaraju se najviše sa FTIR spektrima kalcita i kvarca, što se slaže i s rezultatima rendgenske difrakcije. Vrpce kalcita nalaze se na 2517, 1423, 874 i 712 cm^{-1}, dok se one na 2872 i 1719 cm^{-1} ne

zamjećuju na Slici 17. Nekoliko karakterističnih vrpca kvarca nalazi se oko 700 cm^{-1}, a to su 798, 779, 694 te vrpca na 463 cm^{-1}. Spektar NS djelomično se podudara i sa spektrom muskovita koji je također potvrđen XRD-om. Podudarnost s dolomitom očituje se samo u vrpci na 1428 cm^{-1} jer se radi o CO_3 istezanju i 874 cm^{-1} koja odgovara savijanju izvan ravnine (kalcit). Zaključno, glavne mineralne komponenete poput nisko-magnezijskog kalcita i kvarca lako je prepoznati u FTIR spektru prirodnog sedimenta dok se ostale s manjim udjelima (dolomit, muskovit, aragonit, halit) ne prepoznaju.

5.2. Stabilizacija nanočestica srebra proteinima u umjetnoj morskoj vodi

Stabilizacija nanočestica srebra u umjetnoj morskoj vodi određivana je uz prisutnost albumina iz goveđeg seruma kao modelnog proteina te uz dodatak proteina iz seruma tjelesnih tekućina dva morska organizma: mediteranske dagnje *Mytillus galloprovincialis* i hridinastog ježinca, *Paracentrotus lividus*. Dobiveni rezultati omogućuju uvid u moguće ponašanje nanočestica srebra u morskoj vodi u slučaju kad je dostupna dovoljna količina proteina za njihovu stabilizaciju.

5.2.1. Stabilizacija nanočestica srebra albuminom iz goveđeg seruma u morskoj vodi

5.2.1.1. Utjecaj veličine nanočestice na stabilizaciju albuminom iz goveđeg seruma

Različite veličine nanočestica srebra proizvođača Sigma Aldrich (Ag20 SA, Ag40 SA, Ag60 SA i Ag100 SA) nisu se jednako uspješno stabilizirale albuminom iz goveđeg seruma u umjetnoj morskoj vodi saliniteta 38. Koncentracija BSA bila je konstantna kroz ovaj pokus. Salinitet 38 izabran je jer se željela ispitati koloidna stabilnost nanočestica srebra u realnom, čak i relativno visokom salinitetu, budući da su dosadašnja istraživanja ispitivala koloidnu stabilnost u modelnim sustavima niže ionske jakosti ili kombinaciji do tri elektrolita[41,58,60,75]. UV-VIS spektroskopijom dobiveni su spetri koji pokazuju vrijednosti apsorbancije AgNP između 300 i 800 nm te su maksimumi apsorbancije (tj. maksimumi SPR pikova) svake pojedine veličine nanočestica prikazani u ovisnosti o vremenu i prikazani na Slici 18 kao A_{MAX}. Valja napomenuti kako je masena koncentracija svih AgNP bila jednaka i iznosila 1 μg mL^{-1} no u slučaju nanočestica to ne znači i jednaku brojčanu koncentraciju. Brojčane koncentracije za nanočestice različitih promjera prikazane su u Tablici 8:

Tablica 8. Brojčane koncentracije nanočestica srebra AgNP SA, različitih promjera

d_h / nm	γ / μg mL^{-1}	N / mL^{-1}[153]
20	1	$2{,}25 \cdot 10^{10}$
40	1	$2{,}85 \cdot 10^{9}$
60	1	$8{,}50 \cdot 10^{8}$
100	1	$1{,}80 \cdot 10^{8}$

Na Slici 18 prikazane su vrijednosti apsorbancijskih maksimuma različitih veličina AgNP SA s dodanim BSA u umjetnoj morskoj vodi.

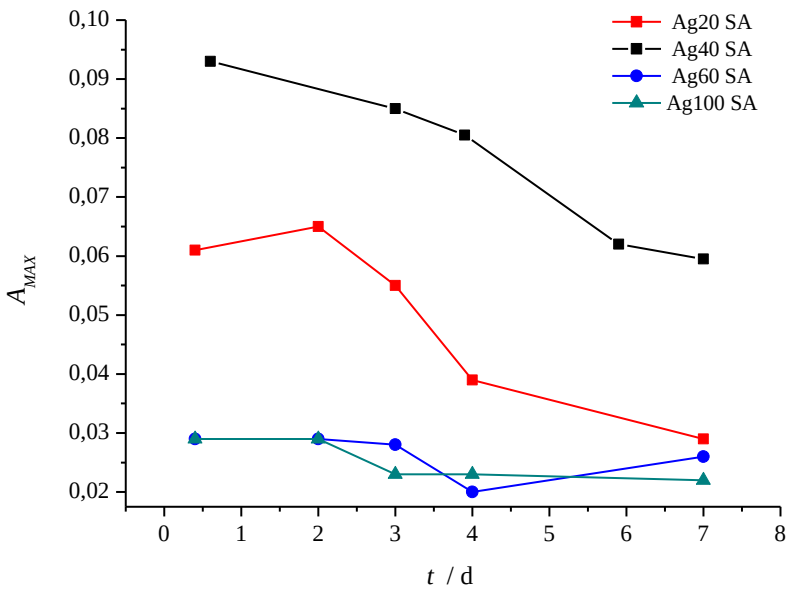
Najveći pad vrijednosti apsorbancijskih maksimuma, A_{MAX}, imale su Ag20 SA stabilizirane s BSA u ASW 38. Ove nanočestice su tijekom sedam dana izgubile čak 53 % svoje početne vrijednosti A_{MAX} kada im je dodana morska voda. Pogledaju li se rezultati dinamičkog raspršenja svjetlosti (Slika 19), d_h istih čestica bio je između 53 i 70 nm tijekom prva tri dana, nakon čega je četvrtog i petog dana mjerenja narastao na približno 1 μm. Ako se podrobnije pogleda Slika 18, vidljivo je i kako je UV-VIS spektar za iste čestice imao relativno visoke vrijednosti tijekom 0., 1. i 2. dana nakon čega nastupa značajan pad apsorbancije (četvrti i sedmi dan). Stabilizacija s BSA ovdje nije rezultirala nanočesticama od očekivanih 30-40 nm (20 nm je nominalni promjer nanočestice + sloj BSA koji bi dodao 5-7 nm polumjeru čestice, odnosno 10-14 nm sveukupno jer se mjeri promjer, a ne polumjer). Prema rezultatima DLS mjerenja može se zaključiti da se nanočestice sakupljaju u male aglomerate od po dvije ili tri čestice tijekom prva tri dana, nakon čega nastupa značajna agregacija jer promjeri nanočestica bivaju 996 i 774 nm. Razlog naglom padu apsorbancije nakon 4. dana može biti i velika brojčana koncentracija Ag20 (Tablica 8) jer što je veći broj čestica u disperziji, puno je veća vjerojatnost kontakata koji će zbog nedovoljno uspješne stabilizacije dovesti do agregacije. Osim toga, moguće je da stabilizacija Ag20 pomoću BSA nije toliko učinkovita i zbog „pakiranja“ molekula BSA oko nanočestica o čemu će biti govora niže u tekstu.

Disperzija nanočestica Ag40 SA s BSA je u mediju morske vode nakon sedam dana imala 36% nižu vrijednost apsorbancijskog maksimuma nego prvog dana mjerenja (dan 0). Trend pada apsorbancije vidljiv je kroz svih sedam dana provođenja eksperimenta. Rezultati dinamičkog raspršenja svjetlosti (Slika 19) pokazali su kako se d_h istih nanočestica za pet dana mjerenja kretao između 53 nultog dana i 47 nm četvrtog dana. Minimalno smanjenje promjera d_h s vremenom (Ag40 SA s BSA u ASW 38) može se pripisati i postupnom otapanju. Prema tome, u disperziji postoji populacija nanočestica srebra koje su zadržale svoj početni promjer uvećan za sloj BSA. Ti rezultati upućuju na to da je stabilizacija određene frakcije nanočestica u disperziji moguća čak i u morskoj vodi, ako je u njoj prisutan stabilizator ili ako se stabilizacija dogodi prije dolaska nanočestica u morsku vodu.

Apsorbancija disperzije nanočestica srebra promjera 60 nm s dodatkom BSA u ASW 38 ima vrlo niske vrijednosti što se može pripisati i manjoj koncentraciji u odnosu na primjerice Ag20 SA (Tablica 8). Ukupni pad apsorbancije za Ag60 SA s dodatkom BSA iznosio je samo

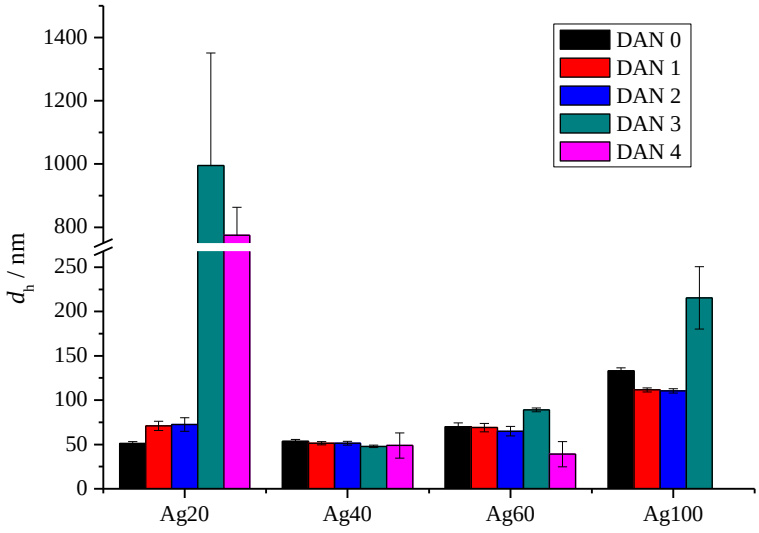
10%. Tijekom prva tri dana, hidrodinamički promjeri Ag60 SA s BSA u ASW 38 iznosili su oko 65 ± 3 nm, dok je četvrtog dana d_h porastao na 90 nm da bi petog dana pao na 40 nm (Slika 19). Ovakav trend za Ag60 se može usporediti i s rezultatima na Slici 18 gdje su prva tri dana nančestice zadržale početne vrijednosti A_{MAX} dok se četvrtog dana događa pad stabilnosti. Neovisno o tome, rezultati DLS-a tijekom pet dana mjerenja pokazali su kako se Ag60 s dodatkom BSA u umjetnoj morskoj vodi nisu značajno agregirale.

Disperzija nanočestica srebra promjera 100 nm sadržavala je 24% manje dispergiranih nanočestica nakon sedam dana, a mjerenja hidrodinamičkog promjera pokazala su da je prosječan d_h iznosio 152 nm. Ovakvi rezultati mogu se objasniti time što je brojčana koncentracija Ag100 više od 100 puta manja od primjerice, brojčane koncentracije Ag20 te je SPR učinak također slabije izražen. Iako ovdje nije prikazano, učinak površinske plazmonske rezonancije slabiji je u slučaju Ag100 i samim time što je komercijalna disperzija nanočestica tih veličina blijeđa (slabija je interakcija sa svjetlosti). Već petog dana mjerenja odnosno na dan 4 (Slika 19), u uzorku nije postojala populacija nanočestica koja bi ukazivala na postojanje BSA-om stabiliziranih Ag100.



Slika 18. Apsorbancijski maksimumi, A_{MAX}, u ovisnosti o vremenu za disperzije nanočestica srebra različitih veličina; 20, 40, 60 i 100 nm (Ag20 SA, Ag40 SA, Ag60 SA i Ag100 SA), masene koncentracije 1 μg mL^{-1} i koncentracije BSA 100 μM u umjetnoj morskoj vodi saliniteta 38. Eksperiment i mjerenja vršeni su pri sobnoj temperaturi.

Valja napomenuti kako je u ovom pokusu koncentracija nanočestica bila 1 μg mL^{-1} dok je zbog specifičnosti tehnike dinamičkog raspršenja svjetlosti, koncentracija nanočestica bila pet puta veća (5 μg mL^{-1}). Iako granica detekcije nije definirana na Malvern Zetasizeru jer ovisi o veličini nanočestice i njezinom indeksu refrakcije, iskustveno je nađeno da je optimalna koncentracija za rad s AgNP raznih veličina bila 5 μg mL^{-1}.



Slika 19. Promjena hidrodinamičkih promjera (d_h) nanočestica srebra različitih veličina (Ag20, Ag40, Ag60 i Ag100) masene koncentracije 5 μg mL^{-1} s dodatkom 100 μM BSA u umjetnoj morskoj vodi saliniteta 38 tijekom pet dana mjerenja. Eksperiment i mjerenja vršeni su pri sobnoj temperaturi.

Vrijednosti d_h u prisutnosti BSA u odnosu na nanočestice kojima BSA nije dodan narasle su kod Ag40 za 13 nm, kod Ag60 za 26 nm, a u slučaju Ag100 za 113 nm (Slika 19). Dok se kod Ag40 i Ag60 može pretpostaviti da je nastao monosloj oko Ag40 odnosno dvosloj BSA oko Ag60, kod Ag100 su mogući nastanci aglomerata od dvije ili tri čestice što znači da u tom slučaju stabilizacija s BSA nije bila uspješna. Hidrodinamički promjer BSA ovdje nije prikazan, ali iznosi 2,47 nm u ultračistoj vodi i 7,33 nm u ASW 38. BSA je u umjetnoj morskoj vodi čak 3,2 puta veći nego u ultračistoj, a razlog tome može biti stvaranje dimera i trimera BSA u umjetnoj morskoj vodi zbog visoke ionske jakosti[154]. Prema prikazanim rezultatima, albumin iz goveđeg seruma ne može postići zadovoljavajuću stabilizaciju za svaku veličinu nanočestica. Pokazalo se da je uspješna stabilizacija postignuta samo za Ag40 i Ag60. Razlozi tome mogu biti; a) najbolja konformacija BSA na tim veličinama nanočestica, b) nedovoljna brojnost molekula BSA ili c) bolje „pakiranje“ / slaganje BSA na većim česticama.

BSA, kao i drugi proteini mijenja konformaciju kako se mijenja pH vrijednost otopine, ali budući da je pH umjetne morske vode 8,2, on se još uvijek nalazi u svom nativnom stanju[155]. Satzer i sur.[98] tvrde kako BSA ne mijenja svoju konformaciju sve dok se ne adsorbira na čestice silike veće od 200 nm što su dokazali promjenama u strukturi vidljivim pomoću cirkularnog dikroizma, a slično pokazuju i Perez i sur.[99]. Prema tome, promjena konformacije ne bi trebala biti uzrok neravnomjernoj stabilizaciji nanočestica s obzirom na njihovu veličinu. Razlog slabije stabilizacije BSA prema manjim nanočesticama može ležati u geometrijskom razmještanju BSA s obzirom na nanočestice. Vrlo vjerojatno oblik i zakrivljenost Ag40 najviše odgovara adsorpciji proteina na način da se molekula BSA cijelom površinom veže na nanočesticu te je samim time „pakiranje“ tih makromolekula gušće i veća je površina nanočestice zaštićena od utjecaja soli. Nedovoljna pokrivenost površine može postati nezaštićeni „džep“ koji omogućava agregaciju. Prema proračunima, u sva četiri slučaja, BSA makromolekula ima dovoljno da bi zaštitile površinu BSA. Primjerice, množinska koncentracija BSA u ovom eksperimentu bila je 100 μM što daje brojčanu koncentraciju molekula proteina od $6{,}022 \cdot 1016^{16}$. Prema Tablici 8, brojčana koncentracija za nanočestice srebra promjera 40 nm i masene koncentracije 5 μg mL^{-1} je $1{,}425 \cdot 10^{10}$. Calzolai i sur. [156] daju jednostavnu formulu koja procjenjuje maksimalan broj proteina ubikvitina oko sferičnih nanočestica zlata:

$$N_{\mathrm{MAX}} = 0{,}65\ (R^3_{\mathrm{kompleks}} - R^3_{\mathrm{AuNP}})/R^3_{\mathrm{Ubq}} \tag{5.1.}$$

gdje je N_{MAX} maksimalan broj molekula ubikvitina koje se mogu adsorbirati na nanočesticu zlata, R_{kompleks} je polumjer nanočestice zlata zajedno s adsorbiranim proteinom, R_{AuNP} je nominalni polumjer nanočestice zlata, a R_{ubq} je polumjer molekule ubikvitina.

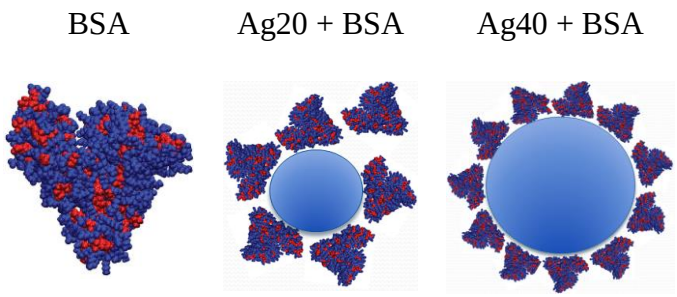
Proračun za N_{MAX} BSA adsorbiranih na Ag40 je sljedeći; za R_{kompleks} traži se hidrodinamički radijus nanočestica srebra s adsorbiranim molekulama BSA, a on iznosi prosječno 51,4 nm (Slika 19) što daje polumjer od 25,7 nm. Hidrodinamički promjer BSA je između 5 i 7 nm (str. 53) pa će se u procjenu uzeti manja vrijednost od 5 nm. Razlog za to je taj što je samostalan BSA promjera oko 3 nm u ultračistoj vodi, a adsorbiranjem na nanočestice u većini eksperimentata debljina sloja BSA iznosi oko 5 nm. Uzevši u obzir navedene vrijednosti može se procijeniti broj molekula BSA oko Ag40 prema formuli 5.2.:

$$N_{MAX} = 0{,}65\ (25{,}7^3 - 20^3)/2{,}5^3 \tag{5.2.}$$

$$N_{MAX} = 373 \tag{5.3}$$

Konačno, da bi se stabilizirano svih $1{,}425 \cdot 10^{10}$ nanočestica srebra, potrebno je maksimalno 373 puta više molekula BSA što iznosi $5{,}3 \cdot 10^{12}$. Kako je ukupan broj molekula BSA prisutan u uzorku $6{,}022 \cdot 10^{16}$, znači da je u vodenom stupcu prisutno 11 000 puta više molekula BSA.

Kod Ag20 nije niti uspostavljena uspješna stabilizacija nanočestica. Ipak, kada bi se uspostavio sličan monosloj kao na Ag40, za stabilizirati disperziju Ag20 bilo bi potrebno sveukupno $1{,}7 \cdot 10^{13}$ molekula BSA, dok je broj dostupnih molekula BSA 3500 puta veći. Prema tome, manjak makromolekula BSA ne bi trebao biti razlog neuspješnoj stabilizaciji nanočestica srebra promjera 20 nm u umjetnoj morskoj vodi. Jedina mogućnost za objašnjavanje nemogućnosti stabilizacije Ag20 s BSA je u prostornom razmještanju molekula BSA što je i slikovito prikazano na Slici 20. U nativnom stanju, makromolekula albumina iz goveđeg seruma srcolikog je oblika što je također prikazano na Slici 20 te se kroz literaturu daju dimenzije $17 \times 42 \times 42$ Å (srcoliki oblik)[157]. Ipak, u nekim istraživanjima je makromolekula BSA prikazana kao izduženi elipsoid u obliku cigatete dimenzija 14×140 Å[158]. Kako je hidrodinamički promjer BSA u ultračistoj vodi u ovom radu oko 3 nm, vrlo vjerojatno se ovdje radi o srcolikom obliku. Prema tome, BSA je u dvije dimenzije relativno ravnog oblika, a u trećoj zaobljen s time da mu se hidrofilne i hidrofobne domene izmjenjuju po cijelom volumenu (Slika 20). Budući da je umjetna morska voda izrazito hidrofilna sredina, za makromolekulu je vjerojatno energetski najpovoljnije ili se a) sa što većom površinom adsorbirati na također hidrofobne nanočestice ili b) međusobno se aglomerirati stvarajući dimere i trimere. Konačno, pretpostavka je da se Ag20 jedine nisu uspjele stabilizirati s BSA zato što je površina Ag20 prezakrivljena da bi adsorpcija bila energetski najpovoljnija. Sukladno tome, moguće je da su zakrivljenosti nanočestica Ag40 i Ag60 najoptimalnije za adsorbiranje ovog proteina na površinu istih. Važnost zakrivljenosti nanočestica za adsorpciju proteina istraživana je i u drugim radovima[99,159,160].

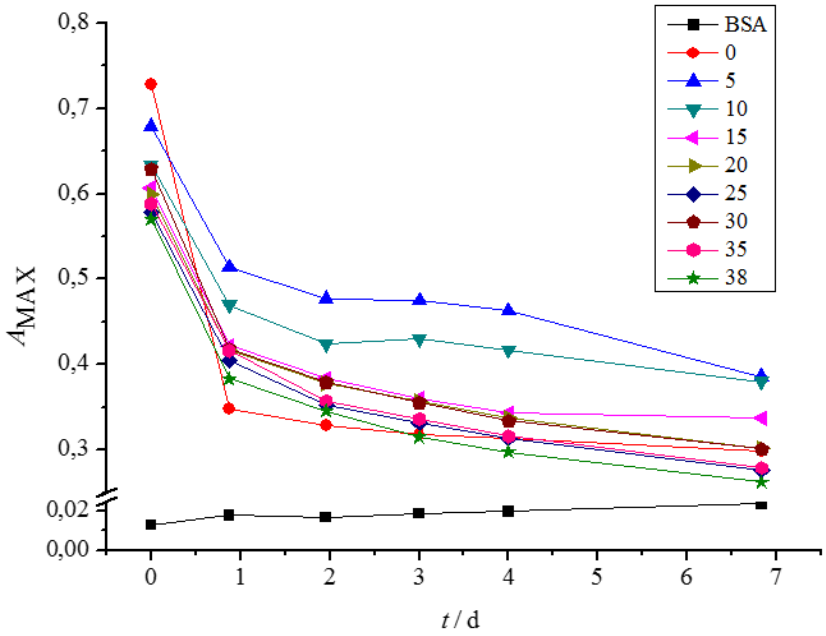


Slika 20. Skice mogućeg razmještanja i adsorpcije BSA na površine nanočestica različite veličine (Ag20 i Ag40), odnosno zakrivljenosti. Model BSA je preuzet iz rada Zhang i sur.[157]. Crvenom bojom u modelu označeni u hidrofobni, a plavom bojom hidrofilni dijelovi makromolekule. Slika ne predstavlja točne veličinske omjere BSA:AgNP.

Masene koncentracije nanočestica i proteina bile su konstantne kroz cijeli eksperiment, a jedina varijabla bila je promjer nanočestice. Prema tome, uspješnost stabilizacije je u ovom slučaju bila najviše ovisna o veličini nanočestice, a budući da se radi o sfernim nanočesticama, o zakrivljenosti. Pokazalo se kako se Ag40 SA najbolje stabilizira pomoću BSA, a nakon njih po uspješnosti stabilizacije slijedi Ag60. Može se reći da je koloidna stabilnost disperzija AgNP s dodatkom BSA u umjetnoj morskoj vodi saliniteta 38, poredana po količini dispergiranih nanočestica bila Ag40>Ag60>Ag100>Ag20.

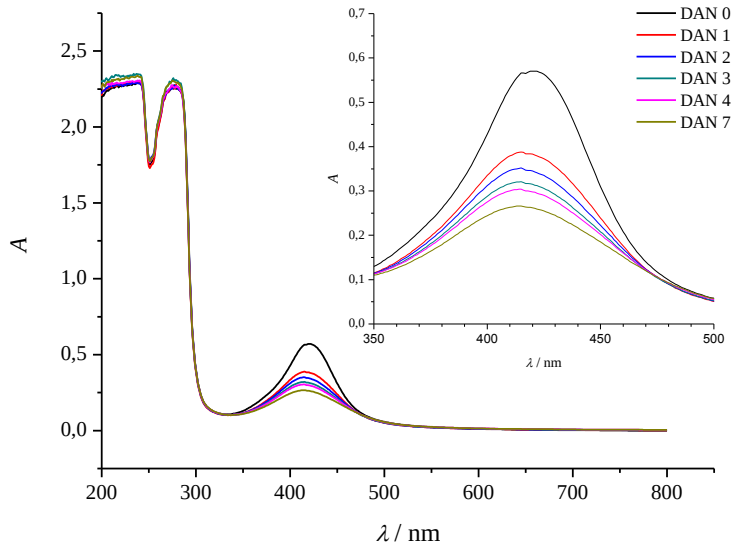
5.2.1.2. Utjecaj saliniteta na stabilnost nanočestica srebra stabiliziranih albuminom iz goveđeg seruma

Utjecaj saliniteta umjetne morske vode (ASW) na apsorbanciju komercijalnih nanočestica srebra omotanih citratom promjera 40 nm u prisutnosti albumina iz goveđeg seruma (Ag40-BSA) prikazan je na Slici 21. Koncentracija BSA bila je konstantna i kroz ovaj pokus. Primjećuje se kako su krivulje intenziteta apsorbancije u naglom padu tijekom prvih 24 sata za sve salinitete, nakon čega je pad postupniji. Ioni prisutni u umjetnoj morskoj vodi uzrokuju destabilizaciju zaštitnog omotača nanočestica (citrat) te jedan dio nanočestica odmah agregira i gubi svojstvo površinske plazmonske rezonancije. Prema grafičkom prikazu, to je otprilike 30% početne koncentracije. Međutim, preostalih 70% nanočestica ostaju individualno dispergirane u otopini. Iako s povećanjem saliniteta stabilnost Ag40-BSA neznatno pada, Ag40-BSA u dovoljnoj količini ostaju stabilne u mediju visoke ionske jakosti, koji inače uzrokuje vrlo brzu destabilizaciju nanočestica: bez stabilizatora kao što je BSA, nanočestice u istoj koncentraciji potpuno agregiraju unutar nekoliko sati[2,61].



Slika 21. Apsorbancijski maksimumi, A_{MAX}, za disperzije nanočestica srebra promjera 40 nm (Ag40 SA) masene koncentracije 5 µg mL^{-1} stabiliziranih s BSA (100 µM) u umjetnoj morskoj vodi različitih saliniteta (0-38) kroz period od sedam dana. Eksperiment i mjerenja vršeni su pri sobnoj temperaturi.

Na Slici 22. prikazani su i apsorpcijski spektri za Ag40 SA + BSA / ASW 38 što na Slici 21 predstavlja maslinasto-zelena krivulja. Vidljivo je kako se maksimumi SPR pikova nakon prvog dana gotovo linearno smanjuju s vremenom, dok apsorbancija BSA ostaje na približno istim vrijednostima.

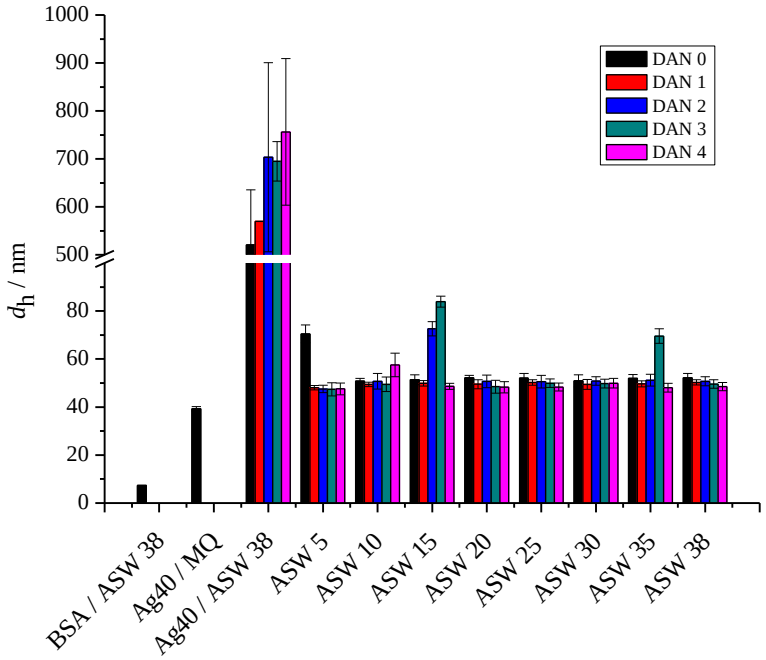


Slika 22. UV-VIS spektri za Ag40 SA (masene koncentracije 5 µg mL^{-1}) s dodatkom BSA (100 µM) u umjetnoj morskoj vodi saliniteta 38 kroz sedam dana. Eksperiment i mjerenja vršeni su pri sobnoj temperaturi.

Hidrodinamički promjeri citratom i BSA-om obavijenih komercijalnih nanočestica srebra u ASW različitih saliniteta prikazani su na Slici 23. Kod Ag40 uz dodatak BSA, usprkos variranju saliniteta, vrijednosti d_h ostaju uglavnom konstantne unutar ekperimentalnog perioda i kreću se između 47 i 61 nm s prosječnom vrijednosti 52,54 ± 3,84 nm.

Za usporedbu, citratom obavijene nanočestice srebra (AgNP bez BSA) u morskoj vodi i pri salinitetu 38 prestaju biti nanočestice budući da imaju promjere 500 nm nultog dana i 800 nm na peti dan mjerenja (dan 4) . Same nanočestice srebra nominalnog promjera 40 nm imaju promjer 39,24 nm u ultračistoj vodi.

Gotovo neovisno o salinitetu umjetne morske vode, između 50 i 70% početne koncentracije nanočestica srebra (Slika 21) u prisutnosti BSA zadržano je u ASW kroz sedam dana. Također, mjerenja hidrodinamičkog promjera nanočestica Ag40 koje su bile stabilizirane s BSA, a izložene različitim salinitetima pokazuju vrlo slične vrijednosti – d_h takvih nanočestica je bio 52,54 ± 3,84 nm. Tsai i sur.[155] tvrde kako promjer BSA varira između 4,2 i 7 nm ovisno o uvjetima u otopini. Ako se BSA adsorbira u monosloju na Ag40, to znači da bi se promjer Ag40 trebao povećati za maksimalno 14 nm.



Slika 23. Promjena hidrodinamičkih promjera (d_h) s vremenom za nanočestica srebra (5 µg mL^{-1}) nominalne veličine 40 nm. Nanočesticama je dodan BSA (100µM) u ultračistoj (MQ) i umjetnoj morskoj vodi (ASW) različitih saliniteta (5-38). Mjerenja su izvedena pri sobnoj temperaturi.

Rezultati ovog rada pokazuju kako se promjer nanočestica kojima je dodan BSA u ASW povećao za prosječno 13 nm što se slaže s pretpostavkom da dolazi do nastanka monosloja oko

površine nanočestice. Valjda podsjetiti da je *c* (BSA) bila konstantna kroz pokus. Iz rezultata sa Slika 21 i 23 može se pretpostaviti kako BSA stvara monosloj oko nanočestice i radi "tvrdu proteinsku koronu" budući da se promjer novonastalih čestica ne mijenja značajno kroz vrijeme, kao ni u otopinama različitih saliniteta. Može se reći da je albumin iz goveđeg seruma dovoljno dobar stabilizator da sačuva koloidnu stabilnost AgNP od agregacije uzrokovane soli što je u mnogim radovima[2,5,12,41,57,58,60,161] pokazano kao glavni uzrok njihovoj vrlo brzoj destabilizaciji u morskoj vodi. Koncentracije soli u umjetnoj morskoj vodi prelaze CCC vrijednosti koje su potrebne za destabilizaciju srebrnih nanočestica[67,161], ali one usprkos tome, u njoj ostaju stabilne barem sedam dana uz prisustvo BSA. Taj rezultat veoma je važan jer koloidno stabilne nanočestice imaju veću mobilnost (putuju na veće udaljenosti) pa samim time i veću biodostupnost te stoga predstavljaju potencijalnu opasnost po organizme koji žive u vodenom stupcu. Ipak, na stabilizaciju uvelike utječe i medij u kojem se stabilizator i nanočestica nalaze pa nije isto radi li se o mediju niske ionske jakosti ili o morskoj vodi. BSA je uvijek dodavan prije umjetne morske vode, stoga se iz dobivenih rezultata ne može tvrditi da će u prirodnoj morskoj vodi visokih saliniteta (npr. 38), a s dovoljnom količinom proteina, stabilizacija biti uspješna ako nanočestice u morski sustav dolaze bez zaštitnog omotača. Dobra stabiliziranost AgNP s prethodno dodanim BSA u umjetnoj morskoj vodi ukazuje na to da bi AgNP prethodno stabilizirane proteinima u uvjetima relativno niske ionske jakosti medija (primjerice, u rječnoj vodi) mogle ostati stabilne po dolasku u morsku vodu visokog saliniteta (između 35 i 38). Ipak, moguće je i da će nanočestice izravnim ulaskom u more, gdje je lokalno visoka koncentracija proteina, biti trenutno stabilizirane i na taj način se dulje zadržavati u vodenom stupcu.

Dominguez-Medina i sur.[161] pokazali su da u 20 mM otopini NaCl-a zeta potencijal nanočestica zlata (AuNP) dostiže relativno stalnu vrijednost pri koncentraciji BSA od 100 μM, dok se ona u ultračistoj vodi postiže tek pri 1000 μM BSA. Zbog tog rezultata, autori su postavili hipotezu da je hidrofobno međudjelovanje između BSA i AuNP u prisutnosti NaCl-a dominantni mehanizam adsorpcije BSA na citratom-obavijene AuNP. Ujedno i tvrde da BSA zamjenjuje citrat s površine zlatnih nanočestica. Nadalje, Kirchman[162] i sur. su pokazali kako je adsorpcija proteina u morskoj vodi mnogo jača na hidrofobnoj (parafilm) nego na hidrofilnoj površini (staklo). Pritom su pokazali i da je doseg adsorpcije jači u morskoj vodi nego u puferu niske ionske jakosti te su također zaključili da su hidrofobna međudjelovanja između proteina i hidrofobne površine razlog snažnijem adsorbiranju proteina na parafilm. Desorpcija proteina s parafilma događala se u puno manjoj mjeri nego sa stakle. Navedeno se slaže s rezultatima u

ovom doktorskom radu. Na Slici 21 vidljivo je kako je krivulja A_{MAX} za Ag40 s BSA u ultračistoj vodi (salinitet 0 na Slici 21) mnogo niža od krivulje u ASW 5 i 10. Prema tome, čini se kako soli iz morske vode zaista potiču snažniju adsorpciju BSA na nanočestice srebra. Također, iznenađujuće je kako su krivulje u salinitetima 15-38 vrlo bliske. Prema tome, kada je BSA već stabilizirao nanočestice, porast saliniteta u ovom rasponu nema velikog utjecaja na pad koloidne stabilnosti zbog izlaganja umjetnoj morskoj vodi.

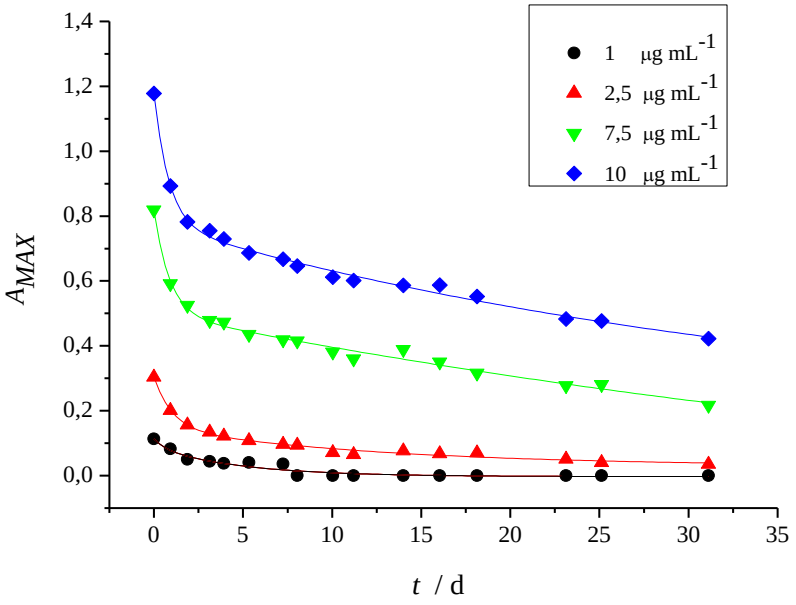
5.2.1.3. Utjecaj početne koncentracije disperzija nanočestica srebra stabiliziranih s albuminom iz goveđeg seruma na njihovu koloidnu stabilnost

Iz prethodnog poglavlja vidljivo je kako je u rasponu saliniteta umjetne morske vode između 5 i 38 postignuta koloidna stabilnost i do 70% početne koncentracije nanočestica srebra u prisustvu BSA nego bez njega (Slika 21). U svjetskim oceanima, prosječna vrijednost saliniteta kreće se oko 35[163], dok je morska voda u Jadranskom moru zbog slabog dotoka pitke vode i dominacije isparavanja nad razrjeđivanjem (dilucijom Mediteranskog bazena oborinama i dotokom slatke vode), saliniteta 38[164]. Taj salinitet predstavlja „teže“ uvjete za stabilizaciju te je iz tog razloga odabran; kako bi se vidjelo kakva je moć stabilizacije BSA u uvjetima relativno visokog saliniteta. Preračunato u ionsku jakost (engl. *Ionic Strength*, IS), ovaj salinitet daje IS = 0,64 M (poglavlje 4.1.3.).

Koloidna stabilnost disperzija nanočestica srebra promjera 40 nm i različitih koncentracija s dodatkom jednake količine BSA (100 μM) praćena je UV-VIS spektroskopijom u umjetnoj morskoj vodi saliniteta 38. Raspon koncentracija Ag40 bio je 1 – 10 μg mL^{-1}. Vrijednosti maksimuma intenziteta apsorbancije ovisno o vremenu prikazane su na Slici 24. Disperzijama nanočestica srebra s većim početnim koncentracijama; 7,5 i 10 μg mL^{-1}, apsorbancije se brže smanjuju tijekom prva tri dana, nakon čega se pad apsorbancije usporava. Nagibi drugog dijela krivulje smanjuju se kako koncentracija pada. Upravo zato, krivulje pada apsorpcijskog maksimuma (A_{MAX}) kroz vrijeme aproksimirane su modelom eksponencijalnog pada u dvije faze, opisanom u poglavlju 4.2.7., a parametri modela predočeni su u Tablici 9.

Iz Slike 24 vidljivo je kako model veoma dobro opisuje eksperimentalne podatke što znači da se nanočestice kao koloidne čestice ponašaju očekivano; agregacija teče u dvije faze, kemijski kontrolirano i difuzijski ograničeno. Prijelaz iz jedne faze agregacije u drugu može se procijeniti; vidljivo je na Slici 24 kako je prvi dio krivulje vrlo strm, a drugi dio krivulje ima

mnogo manji pad. Kada se za krivlju A_{MAX} vs. t za koncentraciju od 10 μg mL^{-1} kroz prvi i drugi dio krivulje povuku pravci, oni se sijeku u t = 1,5 d. Prema tome, prelazak iz jednog agregacijskog režima u drugi događa se približno nakon jednog i pol dana od početka mjerenja.

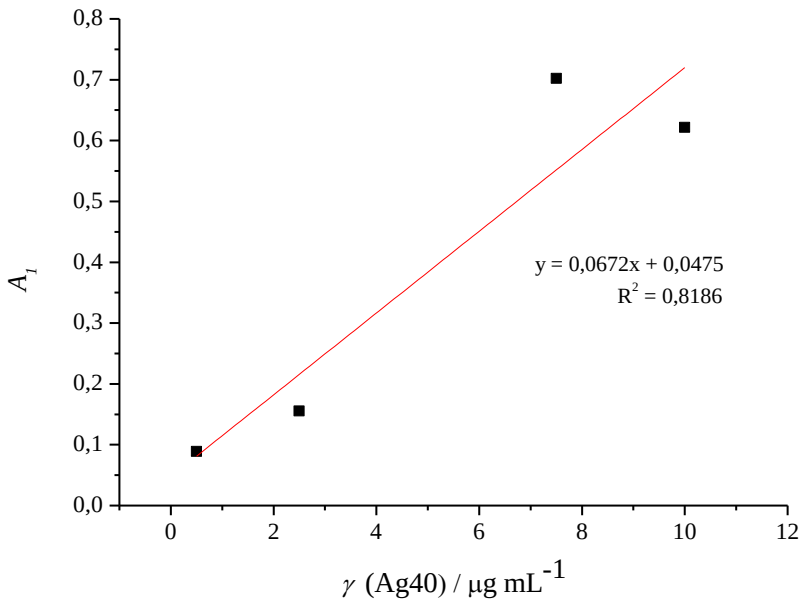


Slika 24. Vrijednosti apsorbancijskog maksimuma, A_{MAX}, za različite koncentracije (1 – 10 μg mL^{-1}) nanočestica srebra promjera 40 nm (Ag40) s dodatkom BSA (100 μM) u umjetnoj morskoj vodi saliniteta 38. Eksperiment i mjerenja provedeni su pri sobnoj temperaturi.

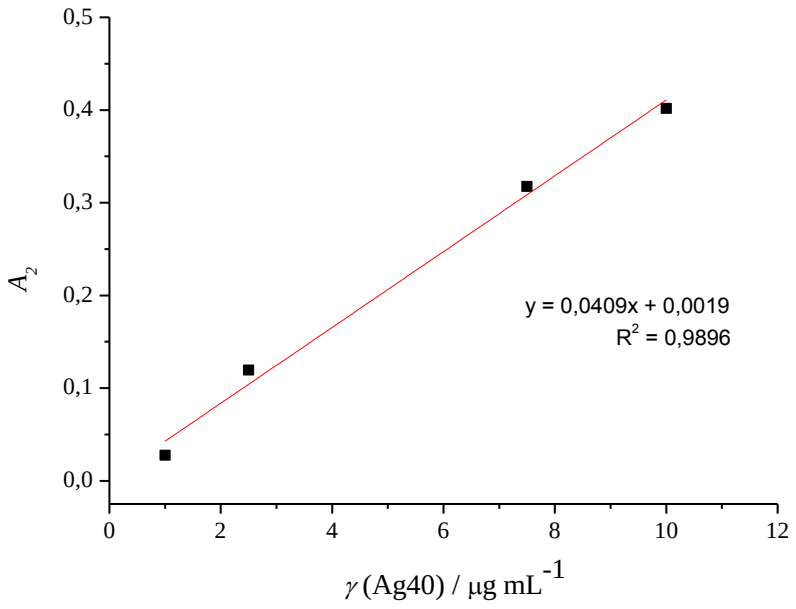
Na taj način (eksponencijalni pad u dvije faze, s jednom vrlo ubrzanom i jednom sporom brzinom raspada[60]) ponašaju se svi ostali sustavi nanočestica istraženi u ovom radu. Kako nanočestice srebra dolaze u morsku vodu, prvo se brzo i u velikom udjelu agregiraju zbog utjecaja soli morske vode, a nakon toga, frakcija koja je stabilizirana također teži agregiranju, ali puno sporije. Amplituda drugog eksponencijalnog pada, A_2, linearno je ovisna o koncentraciji disperzija, a korelacija je prikazana na Slici 26. Amplituda prvog eksponencijalnog pada nije ovisila o koncentraciji za mjereni raspon (1 – 10 μg mL^{-1}, Slika 25).

Tablica 9. Vrijednosti parametera modela eksponencijalnog pada u dvije faze, izvedenog u programu OriginPro 8.0 za različite koncentracije (1 – 10 μg mL^{-1}) disperzija nanočestica srebra promjera 40 nm (Ag40) s dodatkom BSA (100 μM) u umjetnoj morskoj vodi saliniteta 38.

	1 μg mL^{-1}	**2,5 μg mL^{-1}**	**7,5 μg mL^{-1}**	**10 μg mL^{-1}**
y_0	-0,00305	0,02855	-0,20237	0,15366
A_1	0,08906	0,15553	0,7021	0,62182
t_1	4,98972	1,02047	62,52253	37,90703
A_2	0,02762	0,11931	0,31757	0,40185
t_2	0,67485	12,82841	0,87209	0,83529
R^2	**0,9275**	**0,98754**	**0,98884**	**0,99385**



Slika 25. Linearna regresija vrijednosti amplitude prvog eksponencijalnog pada (režim kemijski kontrolirane agregacije), A_1, ovisno o koncentraciji nanočestica srebra (1 – 10 μg mL^{-1}) promjera 40 nm (Ag40) s dodatkom BSA (100 μM) u umjetnoj morskoj vodi saliniteta 38.

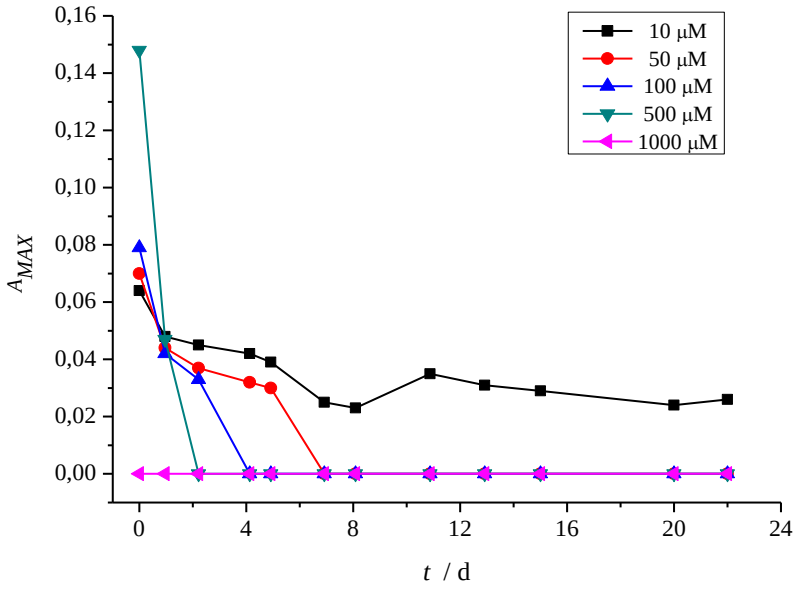


Slika 26. Linearna regresija vrijednosti amplitude drugog eksponencijalnog pada (režim difuzijski kontrolirane agregacije), A_2, ovisno o koncentraciji nanočestica srebra (1 – 10 μg mL^{-1}) promjera 40 nm (Ag40) s dodatkom BSA (100 μM) u umjetnoj morskoj vodi saliniteta 38.

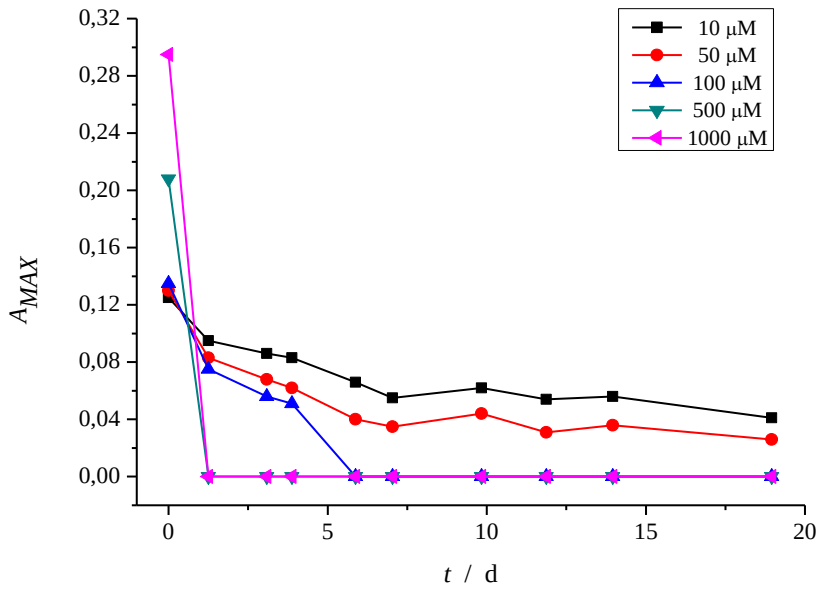
5.2.1.4. Utjecaj koncentracije albumina iz goveđeg seruma na koloidnu stabilnost nanočestica srebra

Učinak različitih koncentracija BSA u odnosu na konstatnu koncentraciju nanočestica srebra dispergiranih u umjetnoj morskoj saliniteta 38 prikazan je na Slikama 27, 28 i 29. Na Slici 27 vidi se kako samo najniža koncentracija BSA (10 μM) osigurava relativno dugotrajnu koloidnu stabilnost disperzije nanočestica srebra koncentracije 0,5 μg mL^{-1}. Veća količina BSA (50 i 100 μM) ne rezultira zamjetnom količinom stabilnih nanočestica (pad stabilnosti kroz 2-4 dana) dok više koncentracije BSA (500 i 1000 μM) gotovo odmah destabiliziraju disperzije Ag40 (nestanak nanočestica nakon prvog i drugog dana.

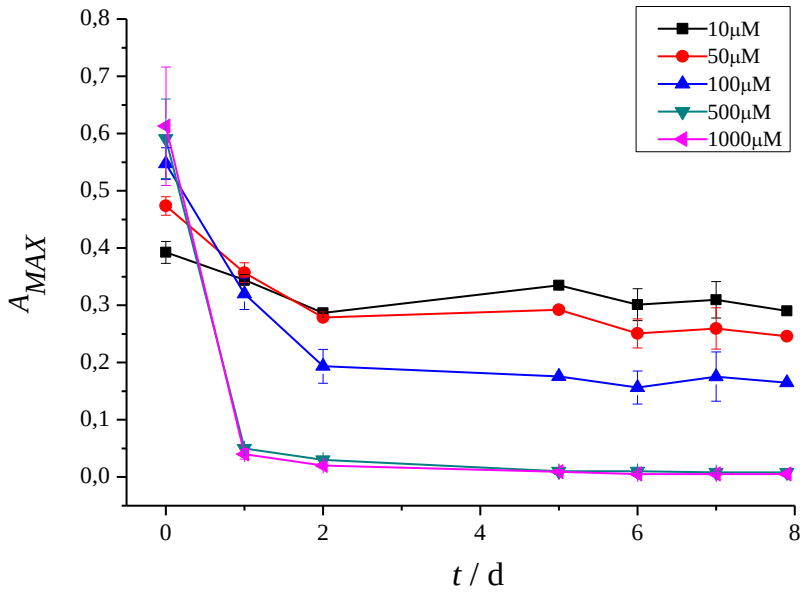
Dvostruko veća koncentracija AgNP (1 μg mL^{-1}, Slika 28) stabilizirana je i s 50 μM BSA u umjetnoj morskoj vodi, dok veće koncentracije BSA također uzrokuju destabilizaciju Ag40. Kad je u otopini prisutna relativno velika koncentracija Ag40, odnosno 5 μg mL^{-1}, veći raspon BSA (10 – 100 μM) pogoduje njihovoj stabiliziraciji (Slika 29).



Slika 27. Maksimumi apsorbancije, A_{MAX}, za disperzije nanočestica srebra (Ag40) masene koncentracije 0,5 μg mL^{-1} uz dodatak različitih koncentracija BSA (10 – 1000 μM) u umjetnoj morskoj vodi saliniteta 38. Eksperimenti i mjerenja izvedeni su pri sobnoj temperaturi.



Slika 28. Maksimumi apsorbancije, A_{MAX}, za disperzije nanočestica srebra (Ag40) masene koncentracije 1 μg mL^{-1} uz dodatak različitih koncentracija BSA (10 – 1000 μM) u umjetnoj morskoj vodi saliniteta 38. Eksperimenti i mjerenja izvedeni su pri sobnoj temperaturi.



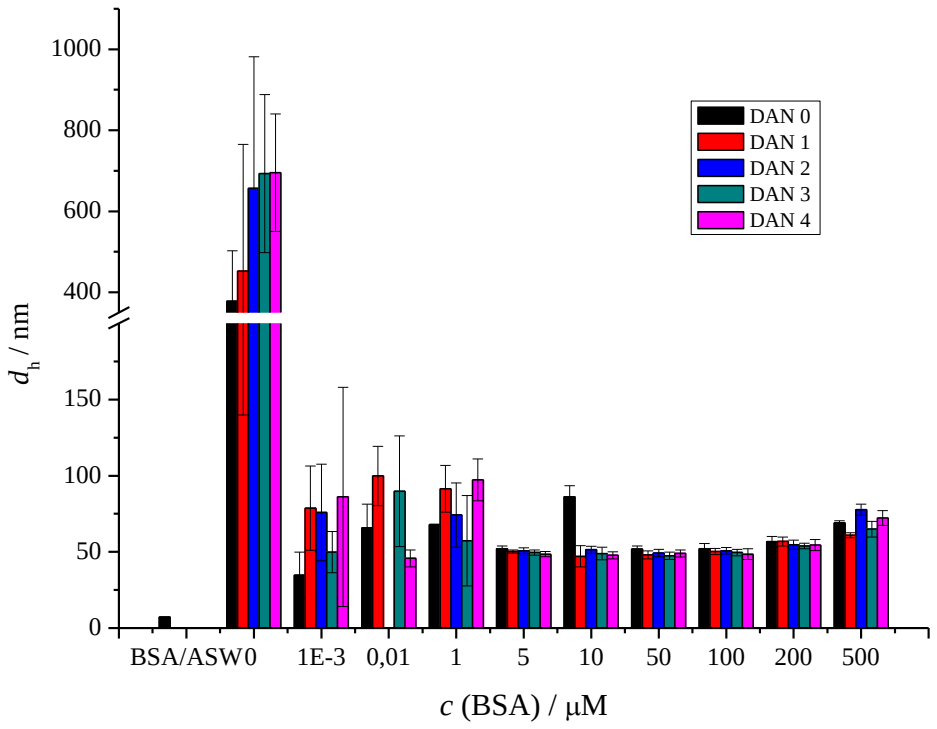
Slika 29. Maksimumi apsorbancije, A_{MAX}, za disperzije nanočestica srebra (Ag40) masene koncentracije 5 μg mL^{-1} uz dodatak različitih koncentracija BSA (10 – 1000 μM) u umjetnoj morskoj vodi saliniteta 38. Eksperimenti i mjerenja izvedeni su pri sobnoj temperaturi. Mjerenja su izvedena u triplikatima, na slici je prikazana njihova srednja vrijednost te je označena vrijednost standardne devijacije.

Rezultati mjerenja apsorbancije (A_{MAX}) za Ag40 u prisutnosti BSA ukazuju na to da za određenu koncentraciju nanočestica srebra, postoji odgovarajući raspon koncentracija BSA koji ih učinkovito štiti od brze agregacije u vrlo agresivnom mediju umjetne morske vode. Prevelika koncentracija BSA, iako se radi o makromolekulama nekoliko desetaka puta manjima od nanočestica, ne vodi do učinkovite stabilizacije nanočestica pa soli iz umjetne morske vode mogu destabilizirati nanočestice u roku od jednog dana (Slika 27), dok povoljna koncentracija BSA zadržava AgNP koloidno stabilnima i osam dana (Slika 29). Točni odnosi masenih koncentracija za ispitane sustave su prikazani u Tablici 10. Najmanji ispitani omjer BSA prema nanočesticama koji je pridonio stabilnosti Ag40 bio je 133:1, dok je najveći bio 3332:1.

Tablica 10. Preračunati maseni omjeri molekula BSA prema masenoj koncentraciji nanočestica srebra u uzorku. Zelenom bojom označeni su omjeri koji rezultiraju stabilnošću (Slike 27-29) dok su crveno obojani omjeri koji uzrokuju destabilizaciju nanočestica u morskoj vodi već nakon jednog dana.

		γ (Ag40 SA) / µg mL^{-1}		
		0,5	**1**	**5**
***c* (BSA) / µM**	**10**	1333	666	133
	50	6664	3332	666
	100	13328	6664	1333
	500	66640	33320	6664
	1000	133280	66640	133280

Nakon provjere stabilnosti UV-VIS spektroskopijom, ispitivane su i veličine nanočestica tehnikom dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS). Vrijednosti hidrodinamičkih promjera za Ag40 u prisutnosti BSA u umjetnoj morskoj vodi tijekom 4 dana prikazani su na Slici 30. Raspon koncentracija BSA u ovom mjerenju dodatno je proširen i iznosio je od 0,001 do 500 µM kako bi se ispitali i niži omjeri BSA:nanočestice. Uočljivo je da su nanočestice kojima je dodano 10 µM BSA nakon 24 sata ujednačenih promjera (nešto većih od 40 nm), a one u otopinama s koncentracijama BSA od 50 do 200 µM ujednačenih i stabilnih promjera oko 50 nm tijekom nekoliko dana te ne stvaraju agregate, koji su uočljivi u uzorcima s niskim koncentracijama BSA (0, 0,001 - 5 µM). Pogledaju li se vrijednosti d_h dane u Tablici 11, predviđa se kako su više koncentracije (npr. 100, 200 i 500 µM BSA) uzrokovale sukcesivno povećanje d_h za po nekoliko nanometara s porastom koncentracije BSA.



Slika 30. Promjena hidrodinamičkih promjera, d_h, nanočestica srebra veličine 40 nm (5 μg mL^{-1}) s dodatkom albumina iz goveđeg seruma različitih koncentracija (0,001 - 500 μM) tijekom pet dana u umjetnoj morskoj vodi saliniteta 38. Eksperiment i mjerenja vršena su pri sobnoj temperaturi.

Tablica 11. Prosječne vrijednosti d_h nakon 5 dana za nanočestice srebra veličine 40 nm (5 μg mL^{-1}) s dodatkom albumina iz goveđeg seruma različitih koncentracija (0,001 - 500 μM) tijekom pet dana u umjetnoj morskoj vodi saliniteta 38.

***c* (BSA) / μM**	**0**	**0,001**	**0,01**	**1**	**5**	**10**	**50**	**100**	**200**	**500**
***d_h* / nm**	694,14	86,32	43,97	97,78	-	45,61	47,25	48,89	52,16	70,17

U literaturnom pregledu spomenuto je kako početna koncentracija nanočestica ima velik utjecaj na njihovu koloidnu stabilnost. Što je koncentracija nanočestica veća, veća je vjerojatnost za međusobne sudare, dok u nisko-koncentriranim disperzijama nanočestice teško dolaze u kontakt pa time i sporije agregiraju[33,34]. Upravo su ta saznanja poslužila kao razlog za eksperimentalni pristup u poglavljima 5.2.1.3. i 5.2.1.4.: iako su koncentracije proteina i nanočestica[45] u okolišu relativno malene (iznimke su postrojenja za obradu otpadnih voda i cvjetanje mora[165,166]), što će se dogoditi ako AgNP dođu u prirodni vodeni medij u niskoj koncentraciji gdje je prisutna količina proteina dovoljna za stabilizaciju? Budući da dio korištene instrumentacije (UV-VIS, DLS) za rad treba relativno visoku koncentraciju AgNP (nekoliko μg mL^{-1}), ideja je bila mijenjati koncentracijske odnose BSA prema nanočesticama i saznati koliko proteina je potrebno za stabilizaciju AgNP te da li nakon dosega kritične

koncentracije BSA, stabilizacija AgNP postaje vjerojatna? Mijenjanjem omjera masenih koncentracija BSA prema nanočesticama za stalne vrijednosti saliniteta (38), dobiveni su značajno drugačiji ishodi stabilizacije. Niske koncentracije nanočestica nisu stabilizirane s relativno velikom količinom BSA (100 – 500 μM). Jedan primjer omjera koji nije rezultirao stabilnim disperzijama bio je 0,5 μg mL^{-1} Ag40 koji je brzo gubio na koloidnoj stabilnosti dodavanjem već samo 50 μm BSA, dok veća koncentracija nanočestica (primjerice 1 μg mL^{-1}) nije destabilizirana istom koncentracijom tog modelnog proteina. Prema tome, samo odgovarajući omjeri nanočestica i proteina mogu rezultirati stabilnim nanočesticama srebra u morskoj vodi. Za ispitivane koncentracije BSA prema Ag40 ti omjeri bili su između 133:1 i 3332:1. Pogledaju li se rezultati iz Tablice 11 koji su pokazali veće promjere s povećanjem koncentracije BSA, može se pretpostaviti da dolazi do višeslojnog adsorbiranja tog proteina na površinu nanočestice.

Činjenica da određene, prevelike količine BSA uzrokuju ubrzanu destabilizaciju nanočestica u umjetnoj morskoj vodi upućuje na to da se suvišak BSA vjerojatno nakuplja u veće agregate, a moguć je čak i nastanak BSA fibrila koji potom smanjuju količinu individualno dispergiranih nanočestica zasad nepoznatim mehanizmom. Moguće je da stvaranje fibrila po cijelom volumenu otopine stvara svojevrsnu „mrežu“ gdje nanočestice imaju manji volumen otopine za slobodno dispergiranje; čeće se sudaraju i agregiraju. Osim toga, ako se djelomično u fibrile uključuju i molekule BSA koje su adsorbirane na nanočestici, heteroagregacija i nastanak velikih bioagregata (proteini + nanočestice) neizbježna je. Zaman i sur.[167] tvrde kako se fibrilacija događa zbog lokalno visoke koncentracije peptida koji se potom postupno organiziraju u vlaknaste strukture. Prema tome, površine nanočestica služe kao platforme za asocijaciju proteina, a tome još dodatno pogoduje visoka koncentracija proteina te nastaju amiloidni agregati. Ako se svemu doda učinak soli koja povećava hidrofobnost BSA u morskoj vodi[161], destabilizacija nanočestica je sasvim očekivana. Međutim, pitanje je zašto se to ne događa pri svim, pa i optimalnim koncentracijama BSA? Najvjerojatnije i za fibrilaciju postoji kritična koncentracija koja bi se morala utvrditi u uvjetima umjetne morske vode što bi tek trebala biti tema nekog sljedećeg rada. Goy-Lopez i sur. potvrđuju da što je više proteina adsorbirano na nanočestice, fibrilacija će se teže događati jer je za proteine albumina iz ljudskog seruma energetski povoljnije biti adsorbirani nego dispergirani u disperziji nanočestica zlata[159]. Također, ističu kako je i zakrivljenost nanočestice ključni čimbenik u uspješnosti adsorpcije.

5.2.1.5. Otapanje nanočestica srebra različitih veličina stabiliziranih s BSA

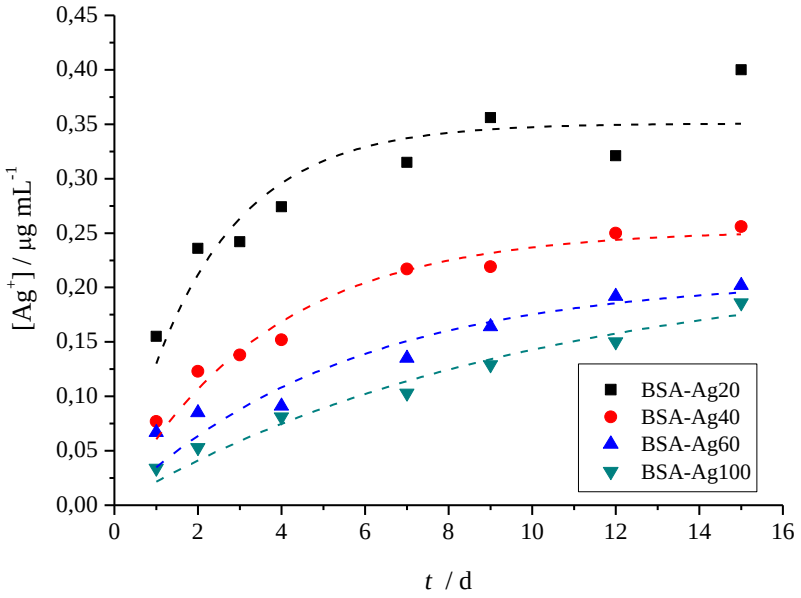
Kroz literaturni pregled navedena su ključna saznanja o otapanju nanočestica srebra; kinetika otapanja izrazito ovisi o veličini nanočestica – manje nanočestice brže se otapaju)[56,100,102]. Veća koncentracija otopljenog kisika[59,101], viša temperatura medija[100], svjetlost[83] i niži pH također ubrzavaju otpuštanje Ag^{+}[101]. Proces otapanja može usporiti agregacija[101] (manja specifična površina i izloženost nanočestica) i prisutnost prirodne organske tvari koja se adsorbira na aktivna mjesta na nanočestici[101,57]. Veoma bitno, brzina otapanja ovisna je i o početnoj koncentraciji nanočestica[102] zbog toga što manja brojnost nanočestica u određenom volumenu znači i manju vjerojatnost sudara, agregaciju i smanjenje specifične površine. Brzina otpuštanja Ag^{+} ovisit će i o vrsti zaštitnog omotača[56,57,100], te o sastavu medija u kojem su dispergirane[103]. Ako medij sadrži Cl^{-} anione koji imaju afinitet prema kationima srebra, otapanje će se također ubrzati[12,168]. Prema tome, zbog dobre oksigeniranosti površinskog sloja morske vode u koji će nanočestice prvotno ući, svjetlosti i velike prisutnosti klorida, otapanje bi moglo biti brzo, ali bi ga mogle usporiti NOM i agregacija. Upravo to je pitanje na koje bi rezultati ovog rada mogli odgovoriti.

Neovisno o stabiliziranosti nanočestica srebra, brzina otapanja i u ovom radu veća je za manje nanočestice, što se vidi na Slici 32. Za pokuse otapanja AgNP odabran je jedan od optimalnih koncentracijskih omjera BSA (10 μM): 1 μg mL^{-1} AgNP.

Najbrže su se otapale nanočestice srebra veličine 20 nm, iako im je BSA dodan, što se pokazuje u najvećem porastu početne koncentracije Ag^{+} iona unutar prva tri dana. Ag20-BSA jedine dostižu plato koncentracije Ag^{+} i to sedmog dana te im je konačni doseg otapanja, nakon 15 dana iznosio 35% početne koncentracije. Ovaj rezultat slaže se s rezultatima iz poglavlja 5.2.1.1 gdje je pokazano kako BSA nije uspješno stabilizirao nanočestice.

Veće nanočestice (Ag40, Ag60 i Ag100) za vrijeme trajanja eksperimenta nisu dosegle ravnotežu (nema vidljivog platoa otapanja) nego se samo usporenije otapaju ovisno o veličini. Kinetika otapanja modelirana je prema Kittleru i sur.[100]. Sve četiri krivulje ovisnosti $[Ag^{+}]$ o proteklom vremenu modelirane su prema jednadžbi 4.7. , a parametri modela; konstanta brzine otapanja (k) i konačni doseg otapanja, $[Ag^{+}]_{konačno}$ prikazani su u Tablici 12.

S porastom veličine nanočestice, nakon 1. dana, otapa se sve manja količina koloidnog srebra, što se primjećuje iz Slike 32. Konačno, 15. dana mjerenja Ag40 se otopio 25%, Ag60 20%, a Ag100 18 % u odnosu na početnu koncentraciju.

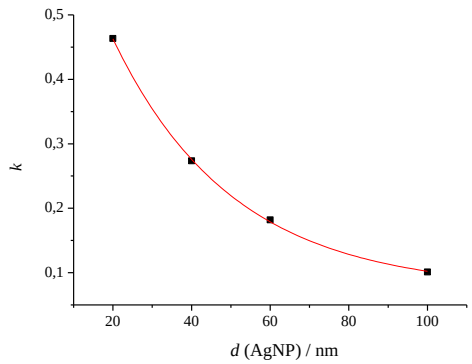


Slika 32. Koncentracija otopljenog srebra poteklog od nanočestica različitih promjera: 20, 40, 60 i 100 nm, početne koncentracije 1 µg mL^{-1} s dodatkom 10 µM BSA u umjetnoj morskoj vodi saliniteta 38. Mjerni podaci modelirani su s *Box Lucas1* funkcijom u programu OriginPro, a vrijednosti dobivenih krivulja prikazane su u Tablici 12. Eksperiment i mjerenja provedeni su pri sobnoj temperaturi.

Tablica 12. Parametri Box Lucas1 modela opisanog u jednadžbi 4.4. za otapanje nanočestica srebra.

promjer nanočestice (nm)	$[Ag^+]_{konačno}$	***stdev***	***k***	***stdev***	R^2
20	0,35073	*0,0177*	0,4634	*0,08347*	*0,8321*
40	0,25309	*0,01043*	0,27406	*0,03211*	*0,9584*
60	0,20905	*0,02692*	0,18208	*0,05773*	*0,8551*
100	0,22427	*0,03792*	0,10122	*0,03011*	*0,9549*

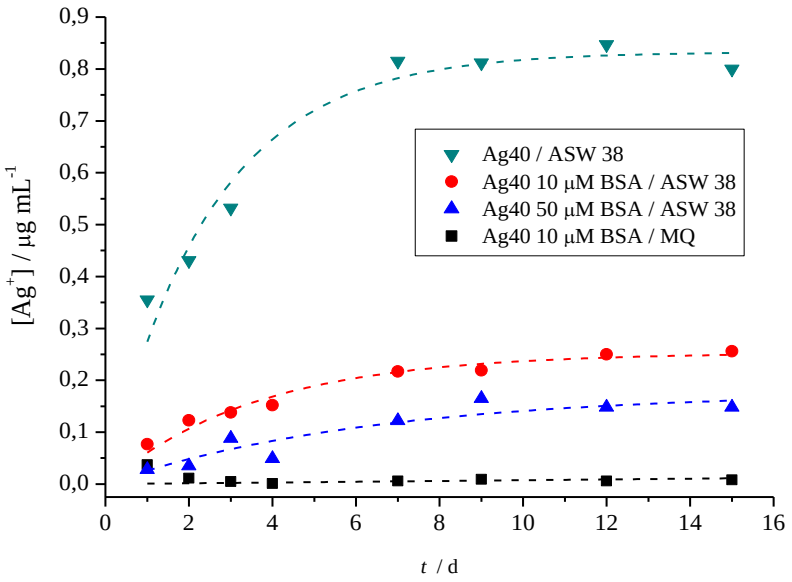
Nadalje, kontanta brzine otapanja (*k*) ovisno o promjeru aproksimirana je modelom eksponencijalnog pada i prikazana na Slici 33.



Slika 33. Ovisnost brzine otapanja o promjeru nanočestice, aproksimacija prema jednadžbi 4.5. Jednadžba krivulje glasi $y = 0{,}0739 + 0{,}748e^{-0{,}0327x}$, $R^2 = 0{,}9993$.

5.2.1.6. Otapanje nanočestica srebra bez i s dodatkom albumina iz goveđeg seruma

Utjecaj BSA na kinetiku otapanja nanočestica veličine 40 nm (Ag40) u usporedbi s nestabiliziranim nanočesticama prikazan je na Slici 34. Koncentracija srebrnih iona u otopini praćena je tijekom 15 dana te su rezultati također modelirani jednadžbom otapanja prema Kittleru i sur.[100], a parametri dani u Tablici 13.



Slika 34. Koncentracija otopljenog srebra poteklog od nanočestica srebra promjera 40 nm početne koncentracije 1 µg mL^{-1} s dodatkom 10 i 50 µM BSA u umjetnoj morskoj vodi saliniteta 38, bez BSA i u ultračistoj vodi (MQ). Mjerni podaci modelirani su *Box Lucas1* funkcijom u programu OriginPro, a vrijednosti dobivenih krivulja prikazane su u Tablici 13. Eksperiment i mjerenja provedeni su pri sobnoj temperaturi.

Tablica 13. Parametri *Box Lucas1* modela opisanog u jednadžbi 4.7. za otapanje nanočestica srebra bez BSA i s različitim koncentracijama BSA.

uzorak	$[Ag^+]_{konačno}$	*a stdev*	*k*	*b stdev*	R^2
Ag40 ASW	0,83278	0,02968	0,39969	0,05064	*0,94443*
Ag40 10 µM BSA ASW	0,25309	0,01043	0,27406	0,03211	*0,95843*
Ag40 50 µM BSA ASW	0,17736	0,03302	0,15811	0,06338	*0,84285*
Ag40 50 µM BSA MQ	-	-	-	-	-

Zaštitna uloga BSA kao koloidnog stabilizatora nanočestica srebra u morskoj vodi nastavlja se i kroz usporavanje njihovog otapanja. Bez BSA, nanočestice srebra otopile su se 80% od svoje početne koncentracije u umjetnoj morskoj vodi nakon 15 dana. Dodatak samo 10 µM BSA smanjio je koncentraciju otopljenog srebra u uzorku za čak 3,3 puta (doseg otapanja je iznosio 25%) što se primjećuje na crvenoj krivulji sa Slike 34, u odnosu na zelenu krivulju

koja prikazuje otapanje Ag40 bez BSA (80%). Dodatak veće količine BSA (50 μM) prema dobivenim rezultatima, još više usporava otapanje nanočestica jer je tada doseg otapanja 17%. Ipak, sa Slike 28 se vidi da je dodatak 50 μM BSA rezultirao s manje stabilnih Ag40 nego 10 μM BSA (niža krivulja A_{MAX} ovisno o vremenu) za koncentraciju disperzije 1 μg mL^{-1} koja je korištena i u ovom pokusu otapanja. Prema tome, lako je moguće da je manja koncentracija Ag^+ kad je dodano 50 μM BSA posljedica manje uspješne stabilizacije nanočestica koje su agregirale i istaložile iz vodenog stupca. U ultračistoj vodi otapanje nanočestica dostiglo je 4% početne koncentracije.

Očekivanja o sudbini nanočestica srebra u morskoj vodi upućuju na brzu agregaciju[2], otapanje i promjenu morfologije iz sfernih u pločaste oblike[83,84], ali čak i na usporavanje otapanja u prisutnosti prirodne organske tvari[57,101,103]. Liu i Hurt[101] tvrde kako će otapanje citratom obavijenih nančestica u morskoj vodi biti usporenije zbog izražene agregacije koja rezultira smanjenom dostupnom površinom nanočestica. Rezultat Liu i Hurta je samo 36% otopljenih AgNP koje su imale početni promjer između 5 i 10 nm. Agregirane, odnosno „sljepljene“ nanočestice imaju puno manju specifičnu površinu nego neagregirane te je manja površina AgNP izložena otopljenom kisiku. Nadalje, nanočestice gube nanometarske dimenzije te im se zato smanjuje kemijski potencijal za otapanje. Međutim, prirodna morska voda koju su autori koristili sadržavala je dodani NOM u obliku HA pa je sasvim moguće da je prirodna organska tvar također usporila otapanje. U ovom doktorskom radu, u ASW nije bila dodana niti jedna komponenta organske tvari (kako bi se istražio isključivo utjecaj soli na otapanje i agregaciju) te je konačno otapanje Ag40 doseglo 80%. Vjerojatno je i zbog prirodne tvari u jezerskoj vodi u radu Dobiasa i sur.[57] krajnji rezultat otapanja AgNPs promjera 50 nm nakon tri mjeseca iznosio samo 20%. Kad prirodna organska tvar nije prisutna ili se nalazi u mediju u malim količinama, tada su rezultati usporedivi rezultatima iz ovog rada; u radu Chena i sur.[103] cit-AgNP (promjera 10 nm) su se otopile do 70% unutar pet dana mjerenja, a koncentracija prirodne organske tvari iznosila je 1,9 mg L^{-1}. U radu Sikdera i sur.[139] gdje je medij bila morska voda, čak 92% PVP-AgNP se otopilo što se pripisuje visokoj koncentraciji klorida, dok su Wang i sur.[5] dobili kako se 60% AgNP otopilo nakon 10 dana u morskoj vodi saliniteta 30 s dodatkom NOM-a

Jedno relativno novo istraživanje[167] pokazalo je potpuno drugačije djelovanje BSA prema nanočesticama u smislu otapanja – hipoteza je da BSA ubrzava otapanje AgNP. Ipak uvjeti ovog rada bili su dosta drugačiji. Autori su za pokuse otapanja koristili AgNP sličnih promjera te početne masene koncentracije; 10, 20 i 40 nm te 1 μg mL^{-1}, ali medij za disperziju

nanočestica bio je citratni pufer s dodatkom 5 mM NaCl-a dok je koncentracija BSA bila samo 2 – 10 nM. Rezultati rada pokazali su kako se konstanta brzine otapanja nanočestica povećava s porastom koncentracije BSA, a BSA-om potaknuto otapanje bilo je najizraženije za najmanje nanočestice (Ag20 otapale su se 3,6 puta manje, a Ag40 7,7 puta manje od Ag10 s BSA). Autori pretpostavljaju da je korelacija između otapanja potaknutog s BSA i veličine nanočestica uzrokovana time što BSA odvlači Ag^+ s površine nanočestice u volumen otopine. Čini se da je tako malena količina BSA bila nedovoljna za pokrivanje svih površina (ukupne površine čestica) disperzija Ag10, Ag20 i Ag40 jer je samo 3,3, 4,0 i 4,4 % površina bilo potpuno prekriveno s BSA što se vidjelo i u minimalnim promjenama d_h kad je BSA bio prisutan. Zaista, utjecaj BSA pri manjim koncentracijama vrlo vjerojatno i je suprotan, što se može naslutiti i po rezultatima ovog doktorskog rada i postojanju optimalnih omjera BSA prema nanočesticama. Usporede li se ovaj doktorski rad i rad Boehmlera i sur.[167] treba razmoriti nekoliko činjenica: Boehmler i sur. nisu imali medij koji bi rezultirao značajnijom agregacijom nanočestica kao i agregacijom BSA (ASW) nego medij optimalan za dispergiranje nanočestica i stabiliziranje BSA (pufer s NaCl-om). Poznato je kako BSA ima afinitet prema nanočesticama srebra zbog tiolnih skupina u cisteinu koji je dio ovog proteina, međutim, proračunati suvišak BSA u ovom doktorskom radu značio bi da su površine nanočestica uglavnom zasićene s BSA koji već štiti nanočestice od otapanja i utjecaja soli. Površinski Ag^+ vjerojatno se i kompleksiraju s BSA, ali ostaju na površini nanočestice, a ako je Ag^+ i prisutan u otopini, BSA u volumenu otopine će se vezati s njim. Boehlmer i sur. su prema Langmuirovoj izotermi dobili kako zaista dolazi do stvaranja monosloja BSA na nanočesticama (zato je i korištena tako malena koncentracija BSA, a vrijednost konstante ravnoteže asocijacije pokazala je da se BSA najjače veže za veće nanočestice (Ag40).

Dio rezultata rada Boehmlera i sur. u potpunosti se podudara s ovim radom, a to je sljedeće: nađeno je kako je povezivanje BSA i AgNP najizraženije za Ag40, a Langmuirova izoterma pokazala je kako zaista manja konstanta asocijacije za Ag10 i Ag20 ujedno znači da će BSA poticati otapanje AgNP.

Doseg otapanja nanočestica srebra promjera 40 nm bez BSA u ASW 38 bio je 80% što se primjerice vrlo dobro slaže s istraživanjem Chen i sur.[103] koji su uočili da je 70% početne koncentracije (također početne koncentracije 1 μg mL^{-1}) nanočestica srebra izlaganjem morskoj vodi tijekom pet dana pretvoreno u Ag^+, a plato [Ag^+] je dostignut već drugog dana. Nanočestice srebra u ovom radu imale su citrat na svojoj površini, a promjer im je bio 10 nm. Pretpostavlja se da su razlog brzom otapanju AgNP u morskoj vodi prisutni kloridi[101,103]. I

Wang i sur.[5] dobili su kako je otapanje i citratom i polivinilpirolidonom obloženih nanočestica srebra u morskoj vodi saliniteta 30 nakon 10 dana iznosilo 60%. U ovom doktorskom radu dodatak 10 μM BSA nanočesticama srebra promjera 40 nm (Ag40) u ASW 38 umanjio je doseg njihovog otapanja za čak 3,3 puta u odnosu na Ag40 u morskoj vodi bez BSA. To je vrlo značajano smanjenje dosega otapanja što znači da ako nanočestice ostaju koloidno stabilne kako se pretpostavlja prema rezultatima iz poglavlja 5.2.1.1. – 5.2.1.4., one mogu dugotrajnije biti izvor Ag^+ što se pokazalo nepovoljnim za morske organizme (vidjeti lit. pregled). Međutim, dodatkom 50 μM BSA u otopinu s Ag40 prema Slici 23, otapanje je rezultiralo još manjom koncentracijom [Ag^+] nego s dodatkom 10 μM BSA. Prema tome, moguće je kako je nešto jača agregacija u uzorku s 50 μM BSA usporila otapanje nanočestica budući da su se one aglomerirale/agregirale te tako imale manju izloženu specifičnu površinu za oksidativno otapanje. Liu i sur.[101] su dobili rezultat da je otapanje AgNPs u morskoj vodi sporije nego u ultračistoj i u puferu niske ionske jakosti. Autori su to objasnili time da su nanočestice u morskoj vodi agregirane i zato imaju mnogo manju dostupnu površinu za oksidativno otapanje. Najvjerojatnije se isto dogodilo i u eksperimentima ovog doktorskog rada.

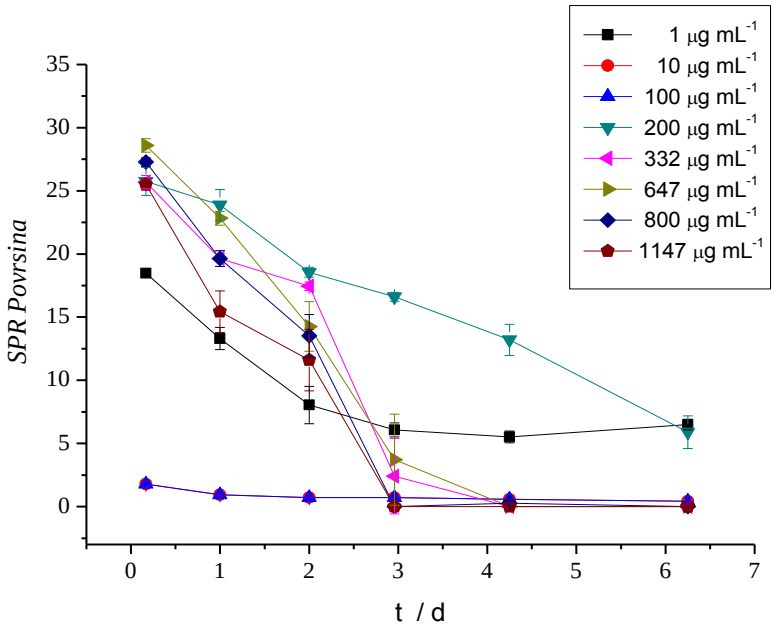
5.2.2. Stabilizacija nanočestica srebra proteinima iz seruma morskih beskralježnjaka

5.2.2.1. Stabilizacija nanočestica srebra proteinima iz seruma mediteranske dagnje *M. galloprovincialis*

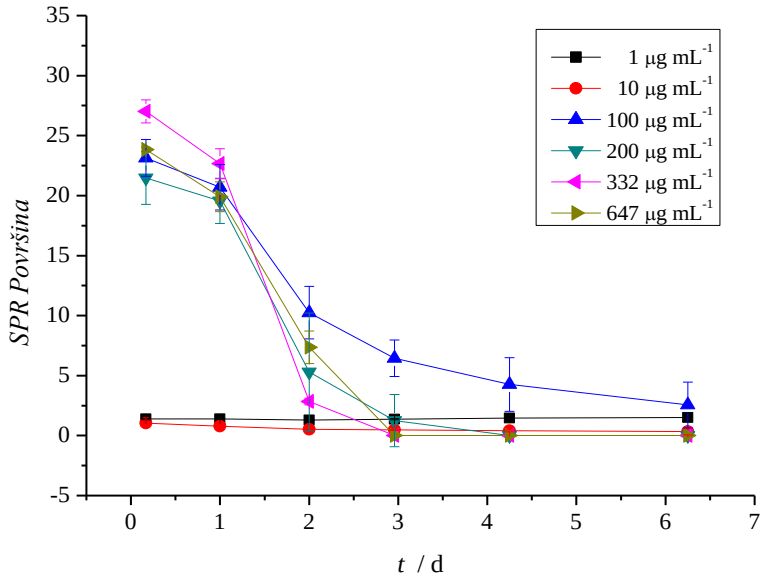
Nanočesticama srebra promjera 60 nm tvrtke Nanocomposix (Ag60 NC) dodavan je serum hemolimfe (S HL) mediteranske dagnje *M. galloprovincialis* kako bi se ispitao učinak širokog raspona koncentracija proteina iz S HL (1 - 1147 μg mL^{-1}) na stabilnost nanočestica. Taj raspon koncentracija proteina odabran je kako bi se provjerila pretpostavka dobivena stabiliziranjem AgNP s BSA da samo određeni maseni omjeri proteina prema nanočesticama pogoduju njihovoj stabilizaciji. Za AgNP stabilizirane proteinima S HL u ultračistoj vodi (MQ) postoje anomalije i nije nađen jasan trend pada stabilnosti nanočestica ovisno o koncentraciji proteina. Štoviše, sa Slike 35 vidi se kako većina ispitanih koncentracija S HL; 332 do 1147 μg mL^{-1} održava koloidnu stabilnost nanočestica do tri dana pa čak i pokazuje pravilan trend pada koloidne stabilnosti s povećanjem koncentracije proteina, dok male koncentracije proteina S HL; 10 i 100 μg mL^{-1} u ultračistoj vodi rezultiraju trenutnom destabilizacijom. Sasvim neočekivano, najbolju koloidnu stabilnost Ag60 NC u MQ uzrokovali su 1 i 200 μg mL^{-1} proteina S HL te su rezultirali s 23 i 36 % stabilnih nanočestica tijekom 6 dana.

U umjetnoj morskoj vodi saliniteta 15 (Slika 36), zamjetan pad stabilnosti očitava se već nakon 2 dana za sve ispitane koncentracije osim u slučaju kada je nanočesticama dodano 100 μg mL^{-1} proteina. Tada je stabilnost zadržana u puno većoj mjeri što se vidi po trećem danu mjerenja jer je Ag60 s dodanih 100 μg mL^{-1} proteina imala SPR površinu 6,6 što predstavlja 28% početne površine, dok su s ostalim koncentracijama nakon dva dana gotovo nestali SPR pikovi tako da se površina nije mogla izračunavati. Za razliku od sustava u ultračistoj vodi, ovdje najniže koncentracije; 1 i 10 μg mL^{-1} proteina ne uzrokuju stabilizaciju, dok je raspon koncentracija proteina 200 – 647 μg mL^{-1} pokazao slične vrijednosti stabilizacije unutar prva dva dana, bez značajne razlike.

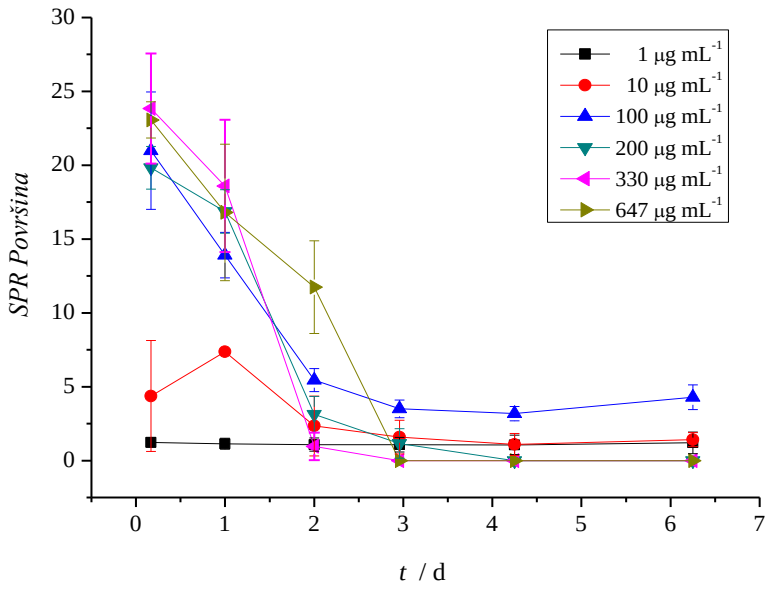
Kod nanočestica srebra promjera 60 nm, kojima su dodani proteini iz S HL, ali u mediju ASW 38 (Slika 37), jednaka koncentracija proteina pokazala se najpovoljnijom za stabilizaciju nanočestica (100 μg mL^{-1} prema 5 μg mL^{-1} Ag60 odnosno koncentracijski omjer 20:1). Stabilizirano je 21% Ag60. Kod većih koncentracija proteina (npr. 330 i 647 μg mL^{-1} u ASW 38) očitavaju se veće standarndne devijacije površine SPR pika što vrlo vjerojatno znači da je u uvjetima višeg saliniteta stabilizacija nanočestica kaotičniji proces.



Slika 35. Promjene SPR površine pika nanočestica srebra promjera 60 nm (Ag60 NC, masene koncentracije 5 μg mL^{-1}) kojima je dodan supernatant hemolimfe dagnje *M. galloprovincialis* različitog sadržaja proteina (1 – 1147 μg mL^{-1}) u ultračistoj vodi tijekom 6 dana pri sobnoj temperaturi.



Slika 36. Promjene SPR površine pika nanočestica srebra promjera 60 nm (Ag60 NC, masene koncentracije 5 μg mL^{-1}) kojima je dodan supernatant hemolimfe dagnje *M. galloprovincialis* različitog sadržaja proteina (1 – 647 μg mL^{-1}) u umjetnoj morskoj vodi saliniteta 15 tijekom 6 dana pri sobnoj temperaturi.



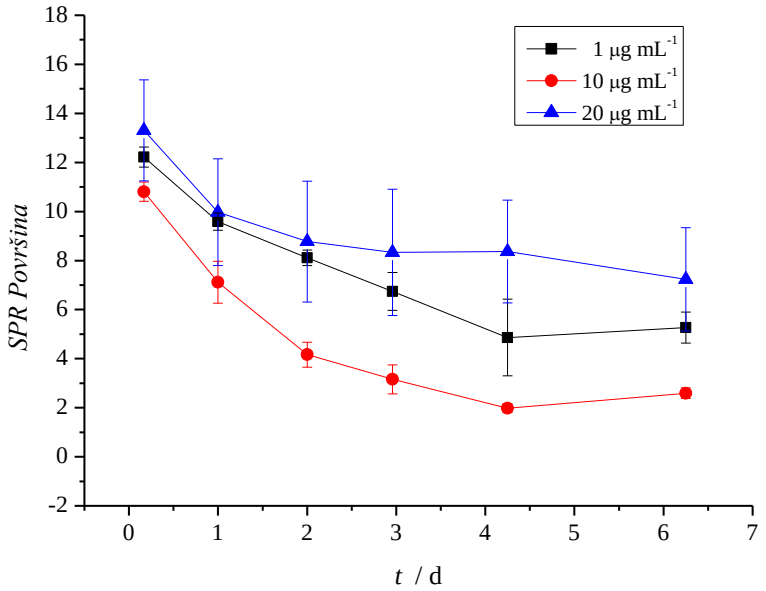
Slika 37. Promjene SPR površine pika nanočestica srebra promjera 60 nm (Ag60 NC, masene koncentracije 5 μg mL^{-1}) kojima je dodan supernatant hemolimfe dagnje *M. galloprovincialis* različitog sadržaja proteina (1 – 647 μg mL^{-1}) u umjetnoj morskoj vodi saliniteta 38 tijekom 6 dana pri sobnoj temperaturi.

5.2.2.2. Stabilizacija nanočestica srebra proteinima iz seruma celomske tekućine ježinca *P.lividus*

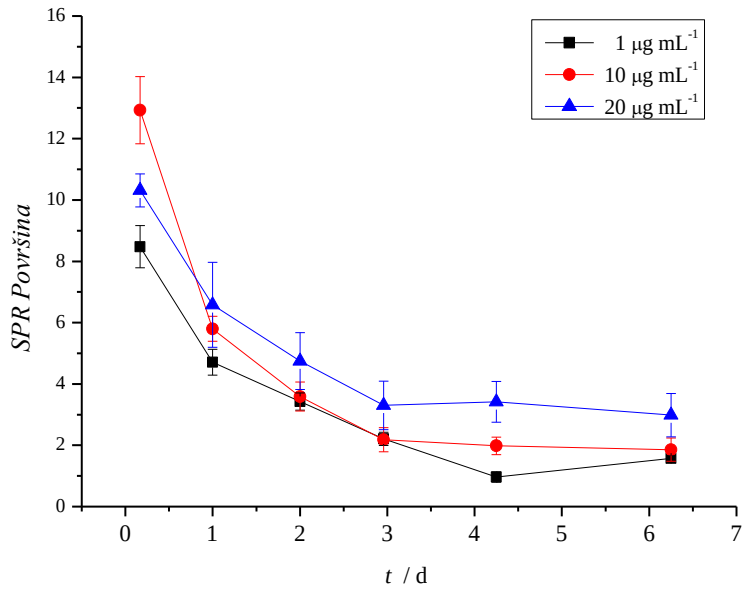
Krivulje koje opisuju SPR površine za nanočestice srebra stabilizirane serumom celomske tekućine u ultračistoj vodi prikazane su na Slici 38. Kao i u slučaju proteina iz S HL, u ultračistoj vodi nije dobiven jasan trend stabilizacije AgNP s porastom koncentracije proteina. Nakon 6 dana, najuspješnija stabilizacija postignuta je s 20 μg mL^{-1} proteina iz S C – 54 % stabiliziranih nanočestica, a zatim s 1 μg mL^{-1} – 42 % stabiliziranih nanočestica.

Kada je medij umjetna morska voda saliniteta 15 i 38 (Slika 39 i Slika 40), krivulje ovisnosti SPR površine o vremenu imaju izraženiji nagib unutar prva tri dana, u odnosu na nagib krivulje u MQ što znači da nanočestice brže agregiraju. Nakon 6 dana, SPR površine Ag60 s 10 i 20 μg mL^{-1} proteina iz celomske tekućine u ASW 15 iznose između 15 i 29 %.

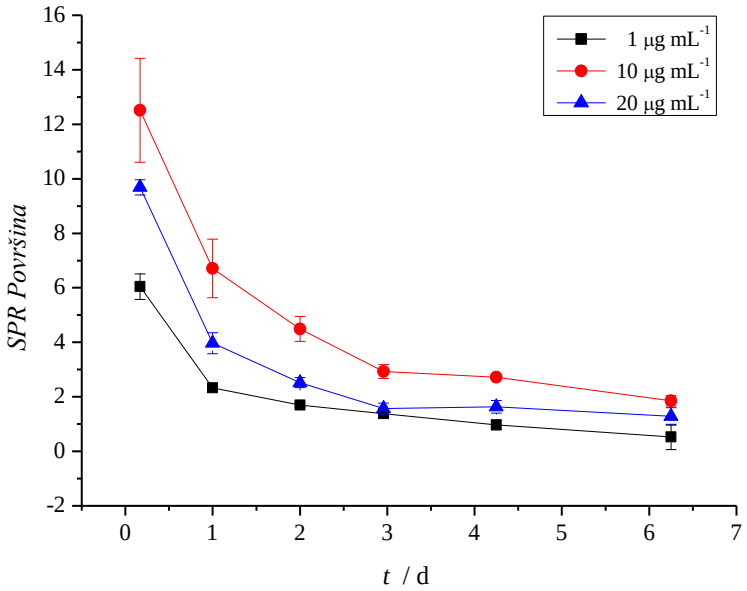
U ASW 38 se tijekom četiri dana uočavaju jasne razlike u uspješnosti stabilizacije Ag60 pomoću proteina iz S C; 1 < 20 < 10 μg mL^{-1} proteina, ali nakon 6 dana, razlike u SPR površina nisu značajne; 7 % (1 μg mL^{-1} proteina), 14 % (20 μg mL^{-1} proteina) i 15% (10 μg mL^{-1} proteina). Pokazalo se kako 20 μg mL^{-1} proteina iz celomske tekućine najviše stabilizira nanočestice, iako je zadržano samo 14% početne koncentracije.



Slika 38. Promjene SPR površine pika nanočestica srebra promjera 60 nm(Ag60 NC, masene koncentracije 5 μg mL^{-1}) kojima je dodan supernatant celomske tekućine ježinca *P. lividus* različitog sadržaja proteina (1 – 20 μg mL^{-1}) u ultračistoj vodi tijekom 6 dana pri sobnoj temperaturi.



Slika 39. Promjene SPR površine pika nanočestica srebra promjera 60 nm (Ag60 NC, masene koncentracije 5 μg mL^{-1}) kojima je dodan supernatant celomske tekućine ježinca *P. lividus* različitog sadržaja proteina (1 – 20 μg mL^{-1}) u umjetnoj morskoj vodi saliniteteta 15 tijekom dana pri sobnoj temperaturi.



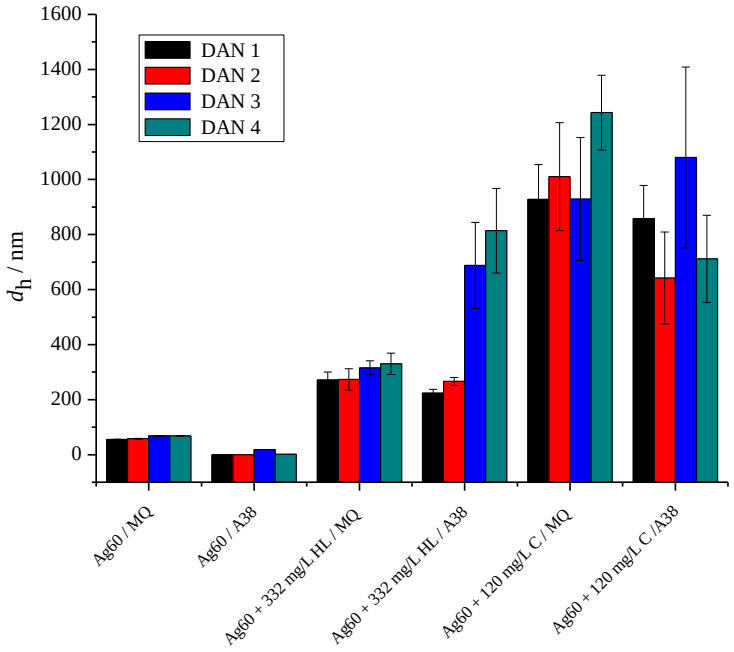
Slika 40. Promjene SPR površine pika nanočestica srebra promjera 60 nm (Ag60 NC, masene koncentracije 5 μg mL^{-1}) kojima je dodan supernatant celomske tekućine ježinca *P. lividus* različitog sadržaja proteina (1 – 20 μg mL^{-1}) u umjetnoj morskoj vodi saliniteteta 38 tijekom dana pri sobnoj temperaturi.

Za razliku od mjerenja apsorbancije koje je pokazalo male, ali mjerljive količine stabiliziranih nanočestica srebra (Ag60 NC) u ASW, hidrodinamički promjeri nanočestica kojima su dodavani supernatanti celomske tekućine i hemolimfe dagnje nemaju vrijednosti između 60 i 320 nm (Slika 41). Upravo te vrijednosti d_h nađene su dinamičkim raspršenjem svjetlosti za uzorke Ag60 s dodanim proteinima iz S HL u ultračistoj vodi (Slika 35) pa se slično očekuje i u ASW. Ag60 NC kojima je dodan S HL, kroz četiri dana imaju vrijednosti d_h između 270 i 320 nm. Nanočestice koje su u dodiru sa S C u MQ stvorile su velike agregate približno mikrometarskih veličina, između 800 i 1000 nm. Kada je medij umjetna morska voda saliniteta 38, tijekom prva dva dana, d_h za Ag60 s 332 μg mL^{-1} proteina iz S HL u ASW 38 kretale su se oko 200 nm, a onda su naglo porasle trećeg i četvrtog dana na više od 800 nm. 120 μg mL^{-1} proteina iz S C rezultiralo je variranjem d_h između 600 i 1000 nm.

Rezultati dinamičkog raspršenja svjetlosti nisu pokazali uniformne promjere nanočestica u doticaju sa serumima tjelesnih tekućina morskih beskralježnjaka. Zbog kompleksnosti uzorka seruma i raznovrsnosti proteina malo je vjerojatno da će nanočestice imati stalne promjere kao u slučaju s BSA na Slici 23. Ipak, Ag60 kojima su dodani proteini iz seruma hemolimfe u ultračistoj vodi imaju vrijednosti d_h između 270 i 350 nm. Moguće je da se radi o malim aglomeratima od nekoliko čestica na koje su adsorbirani proteini. Ipak, ove tvrdnje treba provjeriti elektronskom mikroskopijom (poželjno TEM). Dinamičkim

raspršenjem svjetlosti izmjeren je d_h u uzorcima Ag60 + proteini S HL i S C u MQ/ASW15/ASW38 u mediju koji sadrži ultračistu i umjetnu morsku vodu s proteinima. Tijekom trajanja eksperimenta, u svim medijima s prisutnim proteinima pojavljuju se čestice promjera oko 30 ± 10 nm. Mediji bez proteina nisu pokazivali čestice te veličine tako da se vjerojatno radi o proteinskim „agregatima“ relativno uniformnih veličina. Budući da je d_h(Ag60 NC/MQ) iznosio između 60 i 67 nm, a s dodatkom S HL i S C, kompleksi nanočestica s proteinima narastu do nekoliko stotina nanometara, gotovo je izvjesno da se radi uglavnom o agregatima nanočestica gdje se debljina sloja proteina oko nanočestica ne može procijeniti.

Nanočestice srebra s proteinim iz S HL u ASW 38 također imaju raspone veličina između 250 i 320 nm, ali samo prva dva dana što se slaže sa Slikom 37 gdje je koloidna stabilnost Ag60 s 330 μg mL^{-1} proteina u ASW 38 zadržana samo dva dana. Prema rezultatima DLS-a, Ag60 NC se nisu uspjele stabilizirati s 120 μg mL^{-1} proteina iz seruma celomske tekućine. Pokus dinamičkog raspršenja svjetlosti na Slici 41 proveden je prije spoznaja o optimalnim omjerima te su koncentracije proteina prevelike.



Slika 41. Hidrodinamički promjeri (d_h) nanočestica srebra promjera 60 nm (Ag60 NC) u različitim medijima i s dodatkom 120 μg mL^{-1} S C i 332 μg mL^{-1} S HL.

U istraživanjima toksičnosti nanočestica srebra prema vrsti *M. galloprovincialis* nađeno je kako 15-dnevno izlaganje dagnji PVP-AgNP (d < 100 nm, masene koncentracije 10 μg L^{-1}) uzrokuje oksidativni stres, peroksidaciju lipida u škrgama, te oštećenja u mehanizmima

regulacije toplinskog ili stresa nastalog zagađivalima[168]. Dok je koncentracija srebra u otvorenom oceanu između 0,03 i 0,1 ng L^{-1}, u obalnim regijama ona može biti znatno veća; 0,14 – 1,29 ng L^{-1}[169]. Dolaskom u more, gotovo je izvjesno da će se nanočestica prvo zadržavati u površinskom mikrosloju koji je bogat fitoplanktonom i ličinkama morskih beskralježnjaka, a poznato je da su niži organizmi najosjetljiviji na nanočestice srebra. Trofičkim prijenosom dolazi do biomagnifikacije zagađivala te se koncentracija srebra u obliku nanočestica ili iona može povećavati od nižih prema višim organizmima. Zato Magesky i Pelletier[170] ističu pitanje o kinetici otpuštanja Ag^+ s površine nanočestica što je izravno povezano s njihovom koloidnom stabilnošću – stupanj agregacije snažno utječe i na dinamiku otpuštanja iona srebra. Iz tih razloga je u ovom dijelu doktorata ispitana koloidna stabilnost nanočestica srebra koje su u doticaju s izvanstaničnim proteinima dva morska beskralježnjaka koja imaju stanište uz obalu.

Valja napomenuti da bi drugi pristup istraživanju stabilizacije nanočestica srebra proteinima iz seruma morskih beskralježnjaka bio izolirati proteine iz seruma te provesti odvajanje različitih proteinskih frakcija koje bi se naknadno mogle karakterizirati. Takav modelni pristup je važan kada se želi saznati koje točno vrste proteina pridonose stabilizaciji i na koji način. Međutim, svrha ovakvog eksperimentalnog pristupa s realnim, neizoliranim proteinima je prvo saznati postoji li uoće mogućnost da nanočestice, nakon što su internalizirane u organizam djelomično u njemu ostanu i stabilne što zbog postupnog otpuštanja iona srebra i učinka nanočestice same, može prouzročiti toksičnost.

Stabilizacija nanočestica srebra proteinima hemolimfe dagnje i celomske tekućine ježinca potvrdila je pretpostavku da samo optimalni omjeri proteina prema nanočesticama rezultiraju stabilizacijom. Također je uočeno kako ne postoje jasni trendovi stabilizacije Ag60 s porastom koncentracije proteina kada je medij ultračista voda. Kada je medij ASW, trendovi stabilizacije nešto su jasniji.

U ultračistoj vodi, stabilizacija AgNP s proteinima S HL dagnje dugoročno (6 dana) je uspjela u samo dva slučaja, kad su koncentracije bile:

1) 1 μg mL^{-1} proteina S HL i 5 μg mL^{-1} Ag60 = 1:5 (omjer masenih koncentracija)
2) 200 μg mL^{-1} proteina S HL i 5 μg mL^{-1} Ag60= 40:1 (omjer masenih koncentracija)

Dakle, čak niti u neagresivnom mediju (ultračista voda), prevelike količine proteina neće razultirati stabilizacijom, isto kao ni nedovoljne. Začuđujuće je što je stabilizaciji

pridonijela tako malena količina proteina, 1 μg mL^{-1}, a ujedno i velika (200 μg mL^{-1}). Osim ako se ne radi o eksperimentalnoj grešci, nije jasno zbog čega se to događa. Kada je medij za Ag60 i proteine S HL umjetna morska voda saliniteta 15 (ASW 15) i 38 (ASW 38), u oba slučaja najbolja stabilizacija 5 μg mL^{-1} Ag60 postiže se sa 100 μg mL^{-1} proteina S HL, odnosno masenim omjerom proteina prema nanočesticama 20:1. Prema tome, osim što bi proteini trebali potpuno obaviti površinu nanočestice, nanočestice vjerojatno od agregacije štiti i sama prisutnost velikog broja nevezanih makromolekula proteina. Ipak, količine nanočestica koje ostaju stabilne nakon 6 dana u sva tri ispitivana medija; MQ, ASW 15 i 38 su između 5 i 10% početne koncentracije. Rezultati DLS mjerenja (Slika 41) pokazuju kako se d_h za Ag60 + S HL u ASW 38 prva dva dana kreće oko 250 nm, a četvrtog dana dostižu vrijednosti hidrodinamičkog promjera od 800 nm. Prema tome, unutar prva dva dana, nanočestice se očito nalaze u obliku malih aglomerata ili agregata, dok trećeg i četvrtog dana dolazi do izražene agregacije. Taj rezultat u slaže s istraživanjem koje su proveli Canesi i suradnici[171] gdje je d_h polistirenskih nanočestica promjera 50 nm nakon samo dva sata izlaganja serumu dagnje *(M. galloprovincialis)* dosegao veličine od 178 do 186 nm. Autori su proteomskom analizom korone oko nanočestica polistirena saznali kako se samo jedan protein nalazi u koroni, a radi se o MgC1q6 proteinu engleskog naziva: „Putative C1q domain containing protein“.

Još je uvijek otvoreno pitanje da li je razlog nemogućnosti značajnije stabilizacije prekratko vrijeme uspostavljanja ravnoteže, heteroagregacija s nevezanim proteinima (nevezanim na nanočesticu) ili nešto nepoznato?

Dodatak proteina celomske tekućine, rezultirao je također relativno malenim postotkom stabilnih nanočestica. To se može zamijetiti iz rezultata površina SPR pikova, koji govore o ukupnoj količini stabilnih AgNP (Slike 39 i 40). Vrijednosti SPR površina u ASW 15 i 38 za prva dva dana su u rasponu od 6 i 10%, ali već trećeg dana, one padaju na tek nekoliko postotaka. Rezultati su zapravo dosta slični onima kad je stabilizacija pokušana sa serumom hemolimfe. Hidrodinamički promjeri mjereni tijekom prvih nekoliko dana međusobnog konatakta AgNP sa S HL i S C pokazali su kako u otopini ne postoji mjerljiva količina individualnih nanočestica srebra. Krajnji rezultat je takav da maksimalno 10% početne koncentracije nanočestica ostaje stabilizirano doticajem sa serumom hemolimfe i celomske tekućine tijekom 6 dana mjerenja.

U istraživanju Alijagica i sur.[172], nanočestice TiO_2 stavljene su u kontakt također s izvanstaničnim proteinima hridinastog ježinca (*P. lividus*). Karakterizacija nastale korone koja obavija nanočestice pokazala je da se radi o adhezijskim i citoskeletalnim proteinima. Unutar

24 h, korona je promijenila fizikalno-kemijska svojstva nanočestica u biološkom mediju te je došlo do agregacije. Tako agregirane nanočestice su uz one neagregirane, internalizirane u fagocite. Prema autorima, razlog agregaciji n-TiO_2 je najvjerovatnije premošćivanje (engl. *bridging)* između proteina, nanočestica i Ca^{2+} koji se nalazi u staničnom mediju. Premošćivanje se vrlo lako moglo dogoditi i u eksperimentima u ovom doktoratu, budući da ASW ima u svom sastavu koncentraciju Ca^{2+} koja se nalazi u morskoj vodi.

Grassi i sur.[173] istraživali su koloidnu stabilnost polistirenskih nanočestica funkcionaliziranih aminskom i karboksilnom skupinom (PS-NH_2 NP, promjera 50 nm i PS-COOH NP promjera 60 nm) u celomskoj tekućini iste vrste, ježinca *P. lividus*. Neovisno o naboju nanočestice, hidrodinamički promjeri za PS-COOH NP i PS-NH_2 NP bili su 154 i 154,5 nm tijekom 24 sata. Usprkos činjenici da su proteini uglavnom negativno nabijene vrste, rezultati su ukazali da je adsorpcija uspjela i na negativno funkcionaliziranu nanočesticu (PS-COOH). Također, proteini iz korone identificirani su kao proteini citoskeleta. To istraživanje pokazuje relativno zadovoljavajuću koloidnu stabilnost funkcionaliziranih polistirenskih nanočestica do konca prvog dana izlaganja istih proteinima u celomskoj tekućini.

Rezultati ovog doktorata sugeriraju kako bi se nanočestice internalizirane u mediteransku dagnju i hridinastog ježinca vrlo vjerojatno najvećim dijelom agregirale zbog prevelike koncentracije proteina, ali tijekom raspadanja organizma (nakon ugibanja) proteini iz tjelesnih tekućina završit će u morskoj vodi i tako određeno vrijeme mogu ostati u stupcu morske vode dok ih bakterije ne metaboliziraju. Proteini su jedna od labilnijih skupina tvari u morskoj vodi, ali i njihovo vrijeme zadržavanja ovisi o brojnim čimbenicima pa tako Keil i Kirchman[174] otkrivaju kako se u sjevernom Sargaškom moru vremena zadržavanja proteina po zimi kreću između 26 i 50 sati, dok tijekom ljeta između 300 i 400 h. Prema tome, razrjeđene tjelesne tekućine morskih beskralježnjaka imaju potencijal stabilizirati nanočestice koje pristignu u morsku vodu, ali to uvelike ovisi o međusobnim koncentracijskim omjerima i o početnoj koncentraciji nanočestica (razjeđenije disperzije teže agregiraju zbog smanjenog broja potencijalnih sudara).

5.3. Stabilizacija nanočestica srebra površinski aktivnim tvarima u morskoj vodi

5.3.1. Ispitivanje koloidne stabilnosti nanočestica srebra uz dodatak površinski aktivnih tvari i polimera u umjetnoj morskoj vodi niskog saliniteta

Mogućnost stabilizacije AgNP površinski aktivnim tvarima (PAT) i polimerima (skupni naziv: površinski stabilizatori, PS) prvo je ispitana u umjetnoj morskoj vodi kako bi se uklonio utjecaj nepoznatih komponenti. Na taj način može se utvrditi koliko je određeni stabilizator uspješan u zadržavanju koloidne stabilnosti samo s obzirom na salinitet. U prvom eksperimentu ispitana je koloidna stabilnost Ag60 (Ag60 LMNB) s dodatkom PS različitog naboja u ASW 5,10 i 15. Pritom su korišteni poli(etilen-glikol) (PEG), polietilen-polipropilen glikol (Pluronic® F-127) i poli(etilen-glikol sorbitan monooleat) (Tween® 80) kao predstavnici neionskih PS, te natrij poli(4-stirensulfonat-ko-maleinat) (Na(4-PSS-M) kao anionski i tetraoktilamonijev bromid (TOAB) kao kationski PS. Rezultati eksperimenta su prikazani u Tablici 14.

Tablica 14. Vrijednosti površine SPR pika nanočestica srebra promjera 60 nm (Ag60 LMNB) u ultračistoj (MQ) i umjetnoj morskoj vodi (ASW) saliniteta 5,10 i 15, bez i s dodatkom PS (masene koncentracije 1 mg mL^{-1}) tijekom 15 dana. Eksperiment i mjerenja provedeni su pri sobnoj temperaturi.

	medij	DAN 0	DAN 2	DAN 3	DAN 6	DAN 15
Ag60	MQ	34,51	34	33,39	30,80	27,44
	ASW 5	0	0	0	0	0
	ASW 10	0	0	0	0	0
	ASW 15	0	0	0	0	0
Ag60 + PEG	MQ	33,85	0	0	0	0
	ASW 5	0	0	0	0	0
	ASW 10	0	0	0	0	0
	ASW 15	0	0	0	0	0
Ag60 + Pluronic® F-127	MQ	35,00	0	0	0	0
	ASW 5	0	0	0	0	0
	ASW 10	0	0	0	0	0
	ASW 15	0	0	0	0	0
Ag60 + Na(4-PSS-M)	MQ	27,88	0	0	0	0
	ASW 5	2,77	0	0	0	0
	ASW 10	3,49	0	0	0	0
	ASW 15	4,79	0	0	0	0
Ag60 + TOAB	MQ	0	0	0	0	0
	ASW 5	0	0	0	0	0
	ASW 10	0	0	0	0	0
	ASW 15	0	0	0	0	0
Ag60 + Tween® 80	MQ	39,41	37,54	37,16	35,66	31,79
	ASW 5	38,29	33,41	31,41	28,04	20,41
	ASW 10	35,66	21,66	19,41	14,80	4,80
	ASW 15	24,17	14,17	13,93	4,43	0

Integriranjem površine SPR pika dobiveno je kako su u morskoj vodi niskog saliniteta (5-15) koloidnu stabilnost zadržale samo nanočestice s dodatkom površinski aktivne tvari Tweena 80. Niti jedan drugi PAT ili polimer nije pokazao zamjetan stabilizacijski učinak na Ag60 u danim uvjetima, iako se primjerice Pluronicom-stabilizirane nanočestice srebra koriste u medicini za dostavu lijekova u stanicu[175], ali i u katalizi, primjerice kao bimetalne Ag-AuNP[176]. Zbog navedenih primjena, očekuje se da će dodatak Pluronica rezultirati stabilnim nanočesticama barem u najnižem salinitetu (5), međutim, takve disperzije nisu pokazale mjerljiv SPR pik. U istraživanju Angelescu i sur.[177] je nađeno kako iako sinteza AgNP s Pluronicom daje vrlo dobro kontrolirane veličine nanočestica, monomeri Pluronica se s vremenom desorbiraju s površine nanočestice te uzrokuju agregaciju. Autori, Angelescu i sur.[177] destabilizaciju pripisuju promjenama u hidrofilno-hidrofobnim međudjelovanjima tog triblok-kopolimera s nanočesticama. Naime, Pluronic je zbog hidrofilnih (poli(etilen-glikol) i hidrofobnih (poli(propilen-oksid) domena vrlo podložan na promjene uvjeta u mediju te je vjerojatno zato izrazito hidrofilan medij – umjetna morska voda uzrokovala agregaciju nanočestica kojima je dodan Pluronic F-127. Iako je PEG također nenabijen polimer te se očekuje da će pružiti barem steričku zaštitu od agregacije nanočestica, to se ne primjećuje. Sam poli(etilen-glikol) ima dobru topljivost u vodi, ali vrlo vjerojatno adsorbiranje PEG-a ne vodi do zasićene površine nanočestice te nastupa agregacija. Pogleda li se kemijska struktura Pluronica, PEG-a i Tweena, jasno je da je PEG jedna od građevnih jedinica u sve tri navedene tvari, a ono što razlikuje Tween od prethodna dva stabilizatora je oleinat koji predstavlja hidrofobnu komponentu te površinski aktivne tvari. Pretpostavka je da nanočestice u umjetnoj morskoj vodi koja je bogata elektrolitima i hidrofilan je medij od agregacije štiti adsorpcija (makro)molekula koje imaju značajan sadržaj hidrofobne komponente koja će se tada organizirati na površini nanočestice i tako je štiti od agregacije. Sama nanočestica srebra se u vodenoj otopini ponaša kao hidrofobna tvar, prema istraživanju Catalottija i sur.[178] koji su našli kako se molekule vode oko nanočestice organiziraju kao oko hidrofobne tvari budući da prvi hidratacijski sloj ima drugačiju strukturu od strukture nastale vodikovim vezama u volumenu otopine, a to se pak pripisuje slabom povezivanju vodikova atoma s metalnom površinom nanočestice. Točne podatke o hidrofobnosti nanočestica vrlo je teško naći, ali autori novijih istraživanja razvili su metode za određivanje ove fizikalne veličine[179,180] budući da je to izrazito važno i za međudjelovanje nanočestica i proteina u ljudskom organizmu. TOAB-a i Na(4-PSS-M) vrlo vjerojatno ne uspijevaju stabilizirati nanočestice u ASW zbog prebrze neutralizacije naboja anionima i kationima iz morske vode, a moguće i zbog slabog međudjelovanja hidrofobnog segmenta PAT s površinom nanočestice[181,182].

5.3.2. Stabilizacija nanočestica srebra Tweenom 80 u umjetnoj i prirodnoj morskoj vodi

5.3.2.1. Rezultati UV-VIS spektroskopije

Budući da je nađeno kako od ispitanih PS, samo Tween 80 može stabilizirati AgNP u umjetnoj morskoj vodi unatoč salinitetima 5,10 i 15, slično se može očekivati i u realnom sustavu i u višim salinitetima. Iz tog razloga, nanočestice stabilizirane Tweenom izložene su prirodnoj morskoj vodi saliniteta 5 do 35 te je ponovno praćena količina postojanih nanočestica mjerenjem površine SPR pika.

Na Slikama 42 i 43 usporedno je prikazana koloidna stabilnost Ag60 u umjetnoj i prirodnoj morskoj vodi. Ag60 s dodatkom Tweena 80 vidljivo su stabilnije u prirodnoj morskoj vodi (engl. *Natural Seawater*, NSW). U NSW je do saliniteta 10 postojanost nanočestica uz dodatak T80 bliska kontrolnom uzorku (Ag60 + T80 / MQ) kroz cijeli istraživani period, dok za više salinitete (15 i 35) počinje padati nakon trećeg dana. Uočava se i kako su vrijednosti SPR površine vrlo slične za potonja dva saliniteta. U Tablici 15 dana je usporedba zadržane količine Ag60 u umjetnoj i prirodnoj morskoj vodi nižih saliniteta.

Tablica 15. Usporedba SPR površina za Ag60 LMNB (5 μg mL^{-1}) kojima je dodan Tween 80 (1 mg mL^{-1}) u umjetnoj i prirodnoj morskoj vodi saliniteta 5 i 10, nakon 10 dana mjerenja. Eksperiment je proveden pri sobnoj temperaturi.

***t* / d**	**ASW 5**	**ASW 10**	**NSW 5**	**NSW 10**
0	38,14	35,36	40,08	34,88
10	24,03	8,6	36,97	29,57
zadržano Ag60 (%)	**63**	**24**	**92**	**85**

Razlika u količini dispergiranih nanočestica (izračunato prema odnosima početnih i trenutnih SPR površina) kad se Ag60 stabilizira s Tweenom 80 u umjetnoj i prirodnoj morskoj vodi vrlo je velika. U ASW-u je nakon 10 dana mjerenja zadržano 63% nanočestica u slučaju saliniteta 5, a 24% u slučaju saliniteta 10. U prirodnoj morskoj vodi uz prisutnost Tweena 80 i saliniteta 5, nanočestice zadržavaju čak 92% svoje početne koncentracije, dok pri salinitetu 10, oko 85% što predstavlja vrlo velike postotke zadržanih nanočestica.

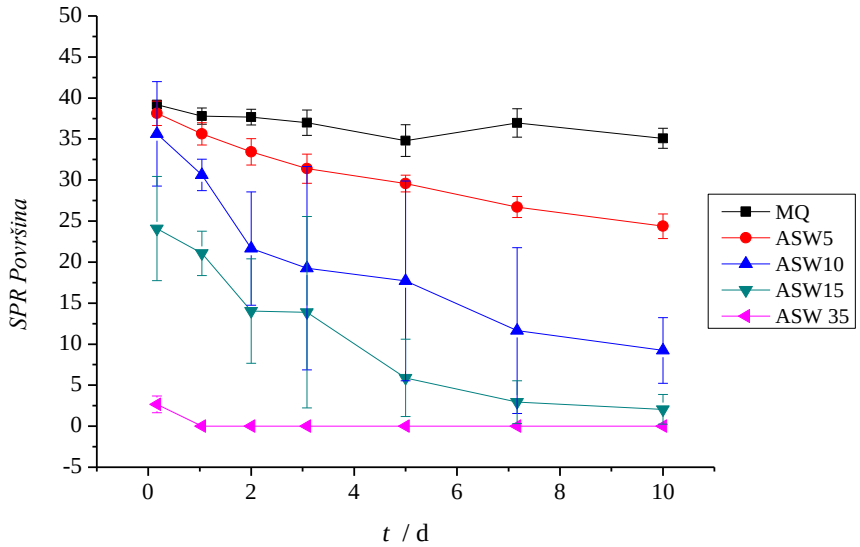
Slike 42 i 43 prikazuju promjene SPR površina s vremenom i u umjetnoj i prirodnoj vodi šireg raspona saliniteta; 5 do 35. Kada je medij za nanočestice umjetna morska voda s dodatkom Tweena 80, vidljivo je kako viši saliniteti (15 i 35) uzrokuju brzi pad apsorbancije.

Međutim, kada je medij prirodna morska voda, iste vrijednosti saliniteta rezultiraju mnogo usporenijiim padom apsorbancije. Preračunato prema početnim vrijednostima SPR površine, nakon sedam dana, u NSW 15 ostalo je 42% nanočestica, a u NSW 35 35%. Ove vrijednosti upućuju na to da je s Tweenom stabiliziran vrlo velik postotak početne, relativno koncentrirane disperzije Ag60.

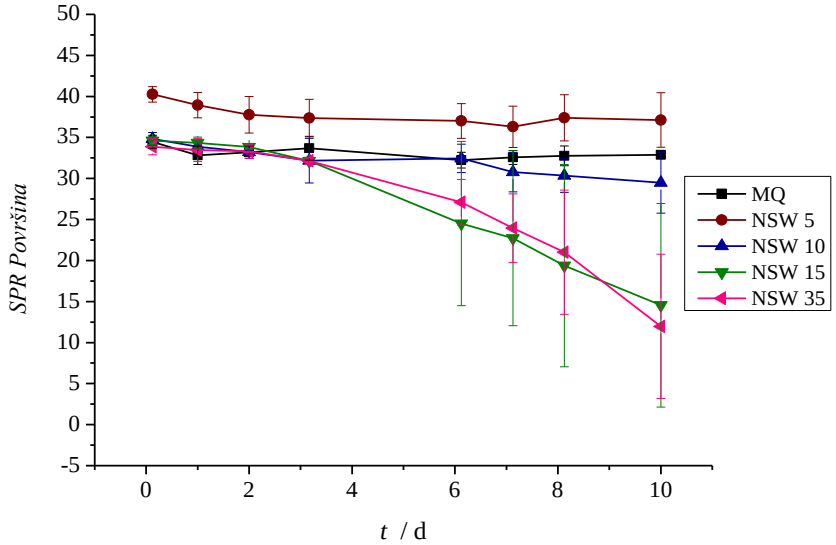
U toksikološkim i drugim istraživanjima nanočestice su stabilizirane s PAT iz grupe Tweena, čak i u morskoj vodi[129,183,184]. Primjerice, Wang i sur.[183] pokazali su kako Tween 20 pospješuje stabilizaciju AgNP u morskoj vodi saliniteta do 30 koja je bila testni medij za ispitivanje toksičnosti AgNP prema ribi vrste *Oryzias melastigma*, dok Lodeiro i sur[129] nalaze kako NM-300K nanomaterijal (AgNP s T20 kao stabilizatorom) uzrokuje toksičnost prema dijatomeji *Chaetocerus curvisetus* u staničnom mediju koji se među ostalim, sastoji i od filtrirane morske vode. Prema tome, vrlo vjerojatno određena organska tvar ili tvari prisutne u prirodnoj morskoj vodi dodatno pospješuju stabilizaciju nanočestica kojima je dodan Tween. Vjerojatno se radi o sinergističkom učinku jer je koncentracija prirodne organske tvari u morskoj vodi vrlo mala i u niti jednom istraživanju (prema znanju autorice) nije samostalno uspjela stabilizirati nanočestice, dok Tween ne može postići značajniju stabilizaciju u umjetnoj morskoj vodi. Kako bi se istražilo nalazi li se stabilizirajući čimbenik iz prirodne morske vode u otopljenoj ili partikulatnoj frakciji, morska voda je filtrirana te su pokusi stabilizacije napravljeni u prirodnoj morskoj vodi s dvije lokacije; rovinjskog i pulskog priobalja. Rezultati su prikazani na Slikama 44 i 45 gdje su dane vrijednosti relativnih SPR površina za Ag60 u 7 vrsta medija (ultračista i 6 vrsta morske vode) uz prisustvo ili odsustvo Tweena 80.

Dodatak Tweena 80 je i u slučaju rovinjske i pulske morske vode uzrokovao smanjenje SPR pika nanočestica za prosječno 20% u odnosu na nanočestice dispergirane u ultračistoj vodi. Bez Tweena, nanočestice srebra se zadržavaju (do 5% poč. konc.) samo prvi dan i to u prirodnoj morskoj vodi rovinjskog priobalja. Iako Tween ne uspijeva stabilizirati AgNP u umjetnoj morskoj vodi, u prirodnoj ih zadržava čak sedam dana od početka pokusa, relativno neovisno o sadržaju čestične organske tvari (o tome je li morska voda filtrirana ili ne). U vodi rovinjskog priobalja relativne SPR površine ne razlikuju se značajno ovisno o tome je li voda filtrirana ili ne pa čak niti o salinitetu. Može se pretpostaviti da je količina prirodne organske tvari koja dodatno pospješuje stabilizaciju u vodi rovinjskog priobalja nešto veća. U vodi pulskog priobalja, relativne SPR površine približno su veće za 20 do 30% u ASW 15 u odnosu na ASW 35. Budući da su rezultati gotovo istovjetni, može se reći da nema razlike u koloidnoj stabilnosti

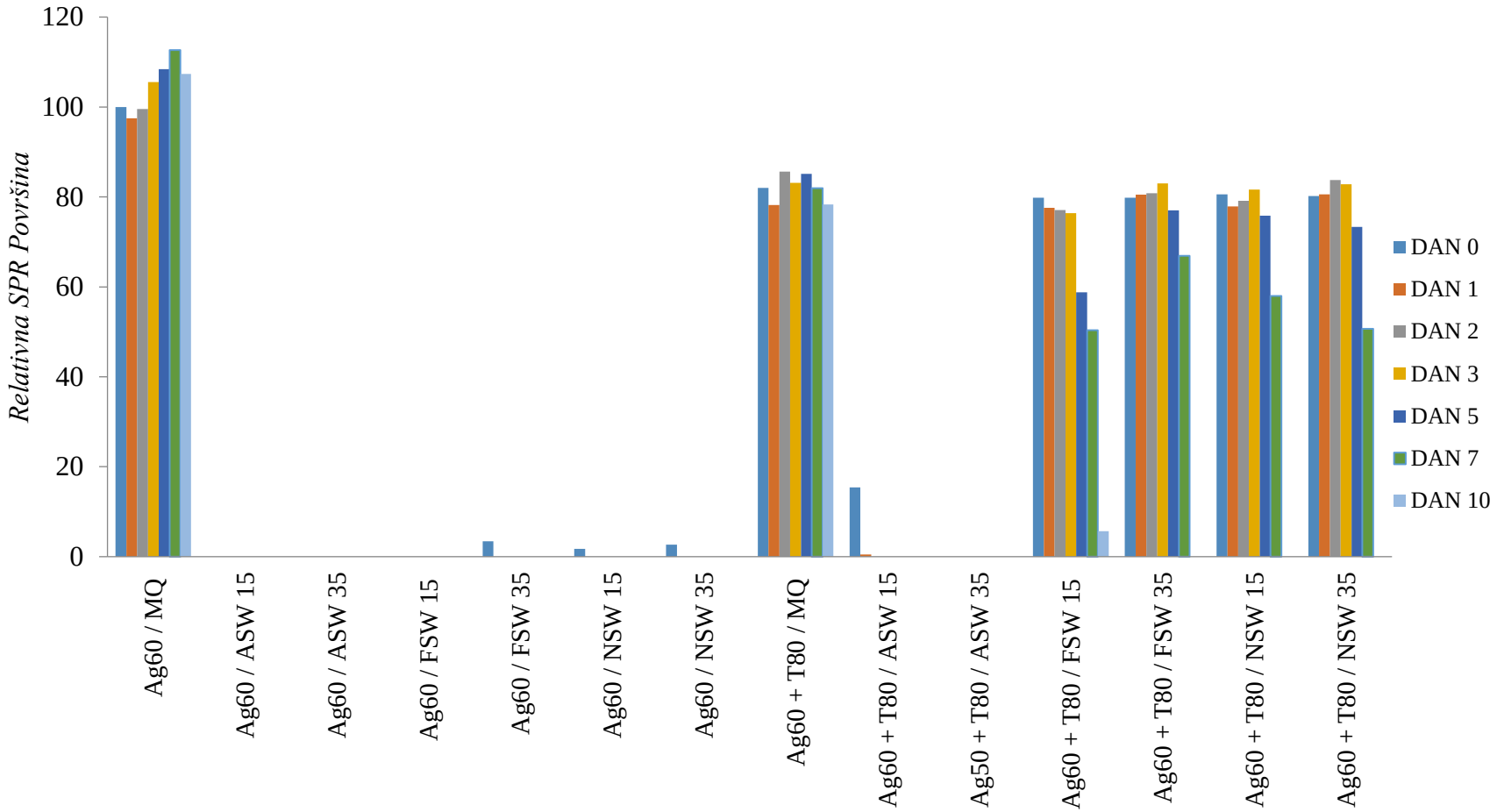
između morske vode dva različita lokaliteta. Filtiranje morske vode nije imalo značajnog utjecaja na stabilizaciju nanočestica pa se može reći da se stabilizirajući čimbenik nalazi u FSW.



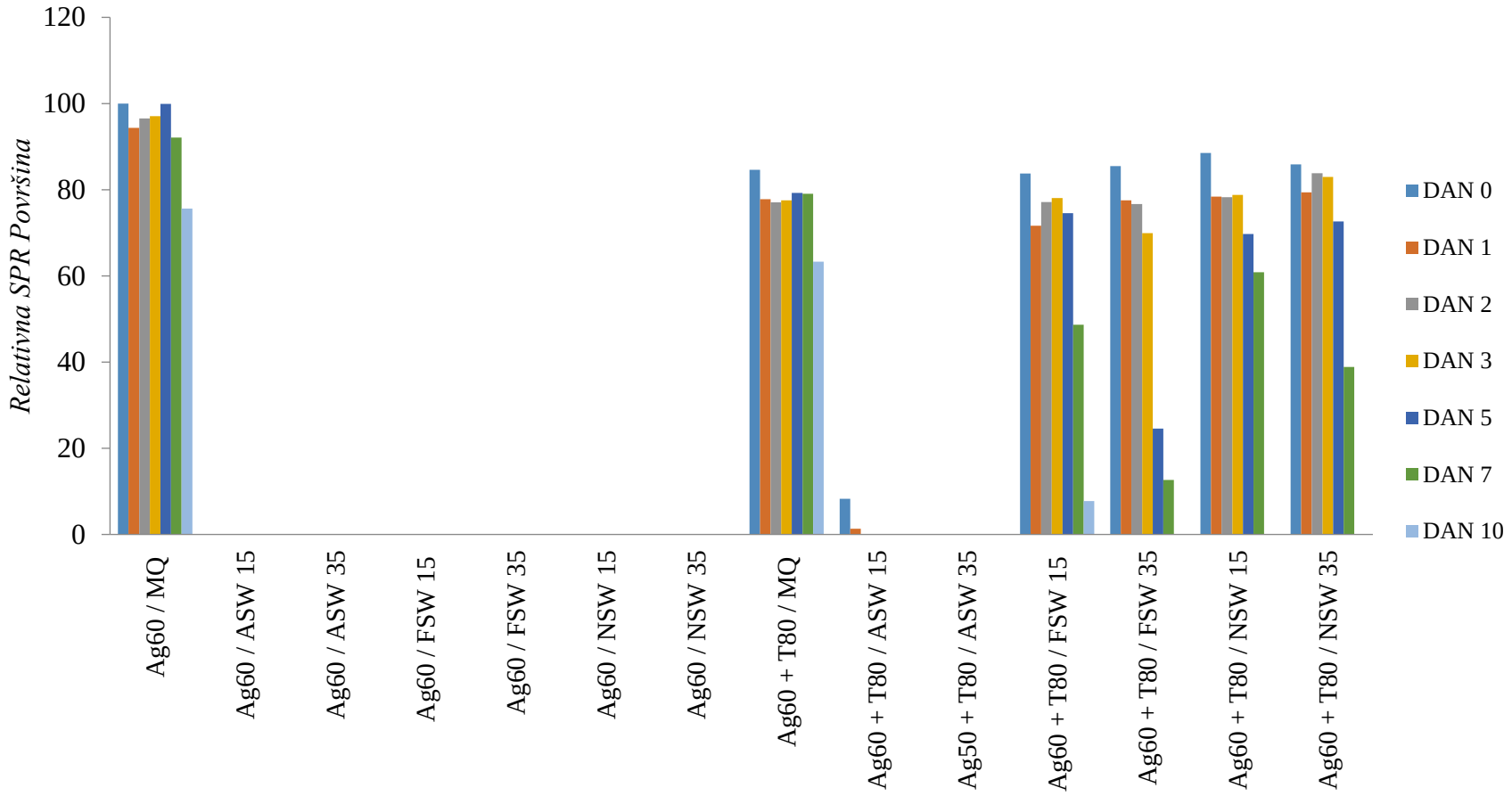
Slika 42. Promjene SPR površina za nanočestice srebra nominalne veličine 60 nm (5 µg mL^{-1} Ag60 LMNB) ovisno o vremenu s dodatkom 1 mg mL^{-1} Tweena 80 u umjetnoj morskoj vodi saliniteta 5, 10, 15 i 35 (ASW5, ASW10, ASW15 i ASW35). Eksperiment i mjerenja provedeni su pri sobnoj temperaturi.



Slika 43. Promjene SPR površina za nanočestice srebra nominalne veličine 60 nm (Ag60 LMNB, 5 µg mL^{-1}) s dodatkom T80 (1 mg mL^{-1}) prirodnoj morskoj vodi saliniteta 5,10,15 i 35 (FSW 5, FSW1 0, FSW 15 i FSW 35). Eksperiment i mjerenja provedeni su pri sobnoj temperaturi.



Slika 44. Promjena SPR površine nanočestica srebra (Ag60 LMNB, 5 µg mL^{-1}) s dodatkom Tweena 80 (1 mg mL^{-1}) izložene ultračistoj, umjetnoj, filtriranoj (FSW) i prirodnoj morskoj vodi (NSW) rovinjskog akvatorija, saliniteta 15 i 35. Morska voda uzeta je iz neposredne okoline Centra za istraživanje mora u Rovinju. Eksperiment i mjerenja provedeni su pri sobnoj temperaturi.



Slika 45. Promjena SPR površine nanočestica srebra (Ag60 LMNB, 5 µg mL^{-1}) s dodatkom Tweena 80 (1 mg mL^{-1}) izložene ultračistoj (MQ), umjetnoj, filtriranoj (FSW) i prirodnoj morskoj vodi (NSW) pulskog akvatorija, saliniteta 15 i 35. Morska voda uzeta je s šetališta Lungo Mare, Gortanova uvala, 44°51'14.4"N 13°49'46.7"E. Eksperiment i mjerenja provedena su pri sobnoj temperaturi.

5.3.2.2. Rezultati dinamičkog raspršenja svjetlosti

Rezultati dinamičkog raspršenja svjetlosti prikazani su u Tablici 16. Nanočestice srebra koje su korištene u pokusu imaju hidrodinamički promjer od 47,75 nm u ultračistoj vodi koji je 10. dana narastao za 20 nm. Taj učinak može se pripisati Ostwaldovom zrenju[185]; veće nanočestice rastu nauštrb manjih (otapanjem i adsorbiranjem manjih na veće). TEM mikrografije i vezani histogram prikazuju nekoliko populacija manjih nanočestica u disperziji Ag60 LMNB (Slika 9, Slika 10). U umjetnoj morskoj vodi nema koloidno stabilnih Ag60 niti tijekom prvog mjerenja (DAN 1) što se pripisuje izrazito brzoj agregaciji zbog velike količine soli i taloženju agregata ispod optičkog puta lasera te činjenici da su maksimalne mjerljive veličine čestica na instrumentu 5 μm. Dodatkom Tweena 80 postiže se koloidna stabilnost u uzorcima prirodne (NSW) i filtrirane (FSW) morske vode. Ipak, nanočestice srebra

Tablica 16. Hidrodinamički promjeri nanočestica srebra (Ag60 LMNB) s dodatkom 1 mg mL^{-1} Tweena 80 u različitim medijima. Prikazani su rezultati volumne raspodjele nanočestica.

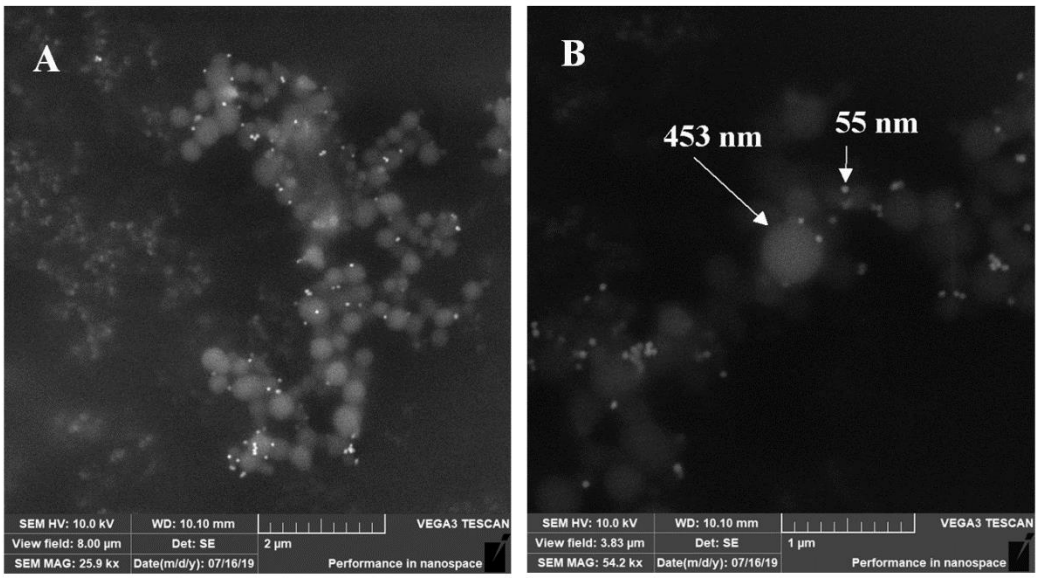
	d_h / nm			
uzorak	DAN 1	stdev	DAN 10	stdev
Ag60 / MQ	**47,75**	1,82	**67,57**	0
T80 / MQ	9,01	0,33	0	0
Ag60 + T80 / ASW15	0	0	0	0
Ag60 + T80 / ASW 35	0	0	0	0
Ag60 + T80 / FSW 15	62,32	1,5	0	0
Ag60 + T80 / FSW 35	65,47	2,29	0	0
Ag60 + T80 / NSW 15	58,72	2,59	0	0
Ag60 + T80 / NSW 35	66,1	7,04	0	0

se nakon 10 dana više se ne primjećuju u otopini, što se vidi i u rezultatima prikazanim na Slikama 44 i 45. Iznimka je kontrola, AgNP u ultračistoj vodi, što je pokazano i rezultatima UV-VIS spektroskopije. Inicijalno, čestice su hidrodinamičkog promjera od 47,75 nm, a s dodatkom Tweena 80, on se prosječno povećava između 11 i 18 nm, ovisno o vrsti medija u kojem se nanočestice nalaze. Moguće je adsorbiranje jednog sloja ove PAT na nanočestice budući da d_h micele koju tvori Tween 80 iznosi 9,01 nm. Čak i u uzorcima prirodne morske vode, u odnosima 1 mg mL^{-1} Tween 80 prema 5 μg mL^{-1} AgNP, Tween više nema stabilizacijsku moć.

5.3.2.3. Morfologija nanočestica srebra stabiliziranih s Tweenom 80

5.3.2.3.1. Pretražna elektronska mikroskopija nanočestica stabiliziranih s Tweenom 80 u ultračistoj vodi

Slika 46 prikazuje SEM mikrografije nanočestica srebra (Ag60 NC) s dodatkom Tweena u ultračistoj vodi. Za razliku od mikrografije samih nanočestica srebra (Slika 11), na ovim mikrografijama se primjećuje pojava bijelih *kuglica* promjera 326,09 ± 51,13 nm. Budući da DLS-om nisu otkrivene čestice tih veličina, moguće je da su one posljedica priprave uzorka ili evenutalno sam Tween 80. Sitnije bijele „točkice“ (promjera oko 60 nm) na slici su vrlo uniformih veličina i radi se o nanočesticama srebra. Može se pretpostaviti da nanočestice srebra bivaju adsorbirane na *kuglice* Tweena 80. Vrlo je upitno da li su ove sferične strukture zapravo Tween, ali pojava takvih oblika može se naći u nekoliko studija. U radu Mathewsa i sur.[186] mikroskopirano je nekoliko uzoraka Tweena 80 gdje je stabilizator emulzije bio di-heptil ftalat te su također vidljive ovakve *kuglice*, ali promjera od 1 do 5 μm no treba i napomenuti da je koncentracija Tweena bila veća; 10 g L^{-1}. Sferični oblici nalaze se i na TEM mikrografiji u radu Gosha i sur.[187] gdje je Tween 80 kombiniran s uljem bosiljka te je dobivena nanoemulzija s kapljicama promjera 30 – 40 nm. SEM-EDX analizom (pretražna elektronska mikroskopija s energo-disperzivnim detektorom X-zraka) uzoraka iz ovog doktorata pokušana je i analiza elementarnog sastava, ali agregati na kojima bi bio ispitivan sastav nisu imali dovoljnu veličinu (1 μm).



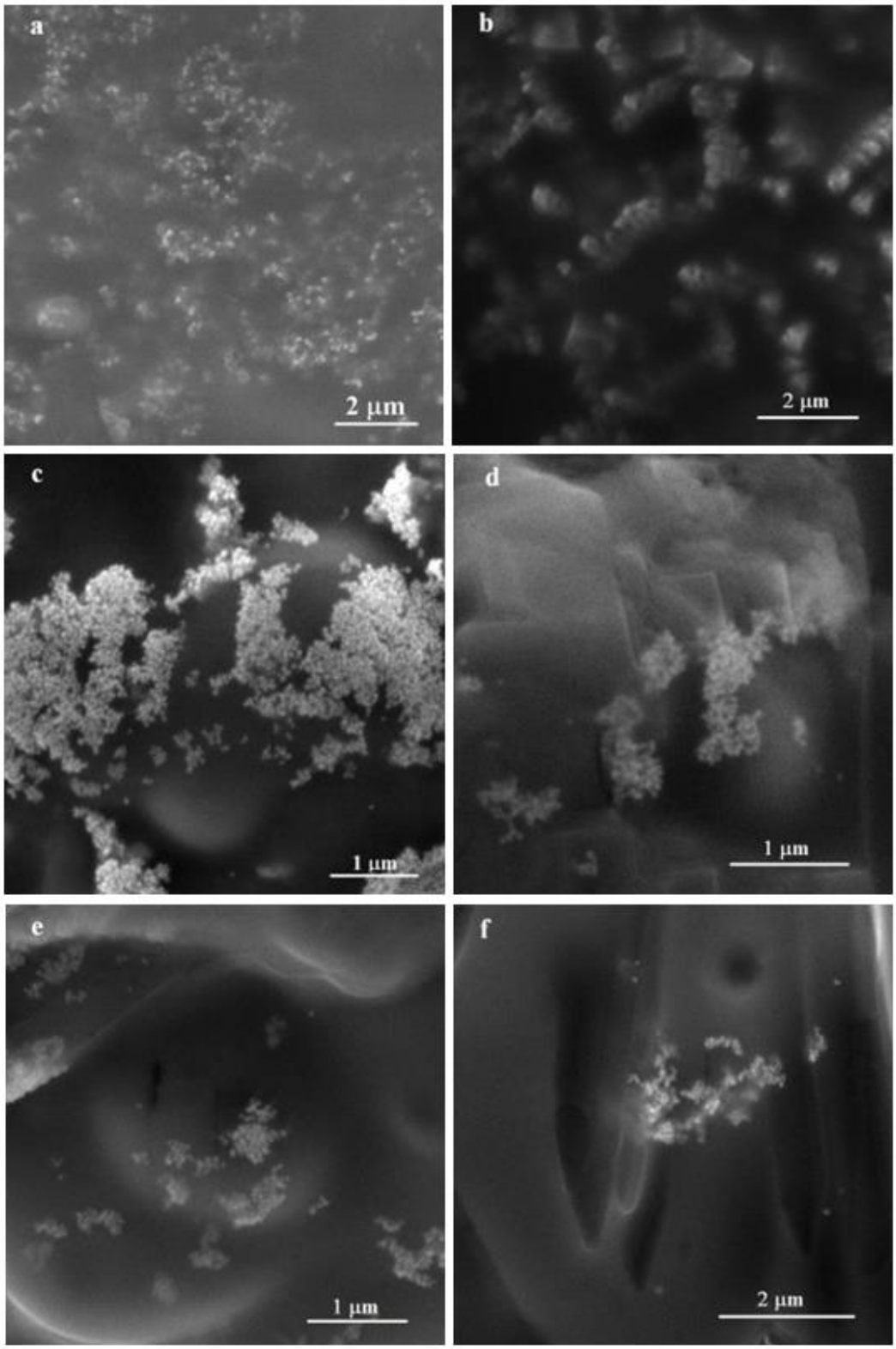
Slika 46. SEM mikrografija nanočestica srebra promjera 60 nm, Ag60 NC (5 μg mL^{-1}) s dodatkom 1 mg mL^{-1} Tweena 80 u ultračistoj vodi nakon 48 h, A) povećanje od 25 900 puta i B) povećanje od 54 200 puta.

5.3.2.3.2. Pretražna elektronska mikroskopija nanočestica srebra s dodatkom Tweena 80 u umjetnoj i prirodnoj morskoj vodi

Mikrografije dobivene pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM-om) sa Slike 47 daju uvid u morfologiju AgNP stabilizirnih s Tweenom 80 u morskoj vodi različitih saliniteta i ovisno o tome je li morska voda filtrirana ili ne. Razlike u oblicima čestica s obzirom na medij vrlo su vidljive.

Nanočestice dispergirane u umjetnoj morskoj vodi saliniteta 15 stvaraju nekompaktne odnosno agregate otvorene strukture dimenzija između 100-200 nm do 1 μm (Slika 47a). Čini se da se dio AgNP počeo otapati jer se gube jasni obrisi nanočestica. U većem salinitetu (ASW 35, 47b) agregati imaju kompaktniju i lančastu strukturu pri čemu je duljina agregata približno 2 μm, a širina 0,5 μm. Na istoj mikrografiji uočava se i nekoliko kubičnih oblika. Kubični oblici vrlo vjerojatno su kristali NaCl. Prema tome, umjetna morska voda medij je koji je prouzročio značajniju promjenu morfologije iako je nanočesticama dodan Tween 80. Ti rezultati slažu se s prethodno dobivenima koji ukazuju na nedovoljnu koloidnu stabilnost sustava Ag60 + Tween 80 / ASW 15 i 35.

U filtriranoj morskoj vodi nižeg saliniteta (FSW 15, Slika 47c) vidljivi su veliki, kompaktni aglomerati adsorbirani na nepoznatoj tvorbi koja je vrlo vjerojatno potekla iz FSW budući da je slično vidljivo i na slici 47d. Za razliku od onih na Slikama 47a i 47b, ovdje su nanočestice jasno zadržale sferične oblike kao na Slici 11 (TEM mikrografija za Ag60 NC u ultračistoj vodi). Aglomerati takvog tipa postoje i kod komercijalnih disperzija nanočestica (Slika 1). U višem salinitetu (35, Slika 47d) mikrografija je gotovo identična; aglomerati nanočestica dužine do 1 μm nalaze se na nepoznatoj tvari za koju je teško pretpostaviti porijeklo; jedino se može reći da se radi o tvari koja spada u otopljenu frakciju morske vode jer prolazi filter veličine pora od 0,22 μm. Konačno, u prirodnoj, nefiltriranoj morskoj vodi (NSW) aglomerati/agregati nanočestica još su manjih dimenzija nego u filtriranoj morskoj vodi te otvorene strukture. Ne može se tvrditi da su nanočestice zadržale početne oblike u prirodnoj morskoj vodi jer u drugom volumenu uzorka koji nije snimljen, morfologija može nalikovati onoj kao na Slikama 47c i d. Ipak, vidljivo je da su kao i u filtriranoj morskoj vodi, sferični oblici nanočestica zadržani te nisu nastali kompaktni i „sljepljeni“ agregati gdje se individualne čestice više ne mogu vizualno razlikovati.



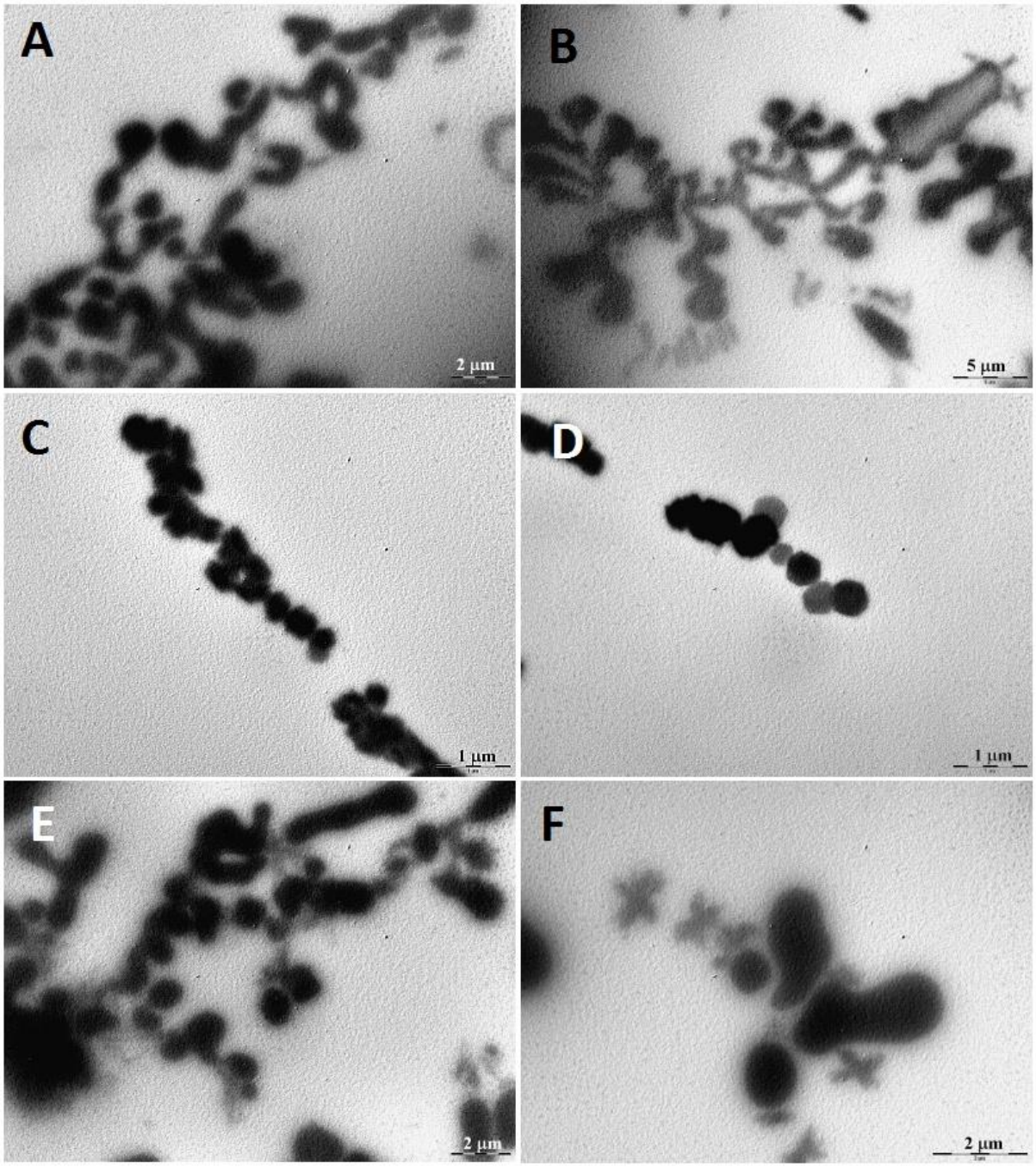
Slika 47. SEM mikrografije nanočestica srebra (Ag60 NC, 5 μg mL^{-1}) s dodatkom Tweena (1 mg mL^{-1}) u a) umjetnoj morskoj vodi saliniteta 15, b) umjetnoj morskoj vodi saliniteta 35, c) u filtriranoj prirodnoj morskoj vodi saliniteta 15, d) filtriranoj prirodnoj morskoj vodi saliniteta 35, e) prirodnoj nefiltriranoj morskoj vodi saliniteta 15 i f) prirodnoj nefiltriranoj morskoj vodi saliniteta 35. Eksperiment i mjerenja provedeni su pri sobnoj temperaturi, a nanočestice su u medijima bile 48 sati.

5.3.2.3.3. Transmisijska elektronska mikroskopija nanočestica srebra s Tweenom 80 u umjetnoj i filtriranoj prirodnoj morskoj vodi

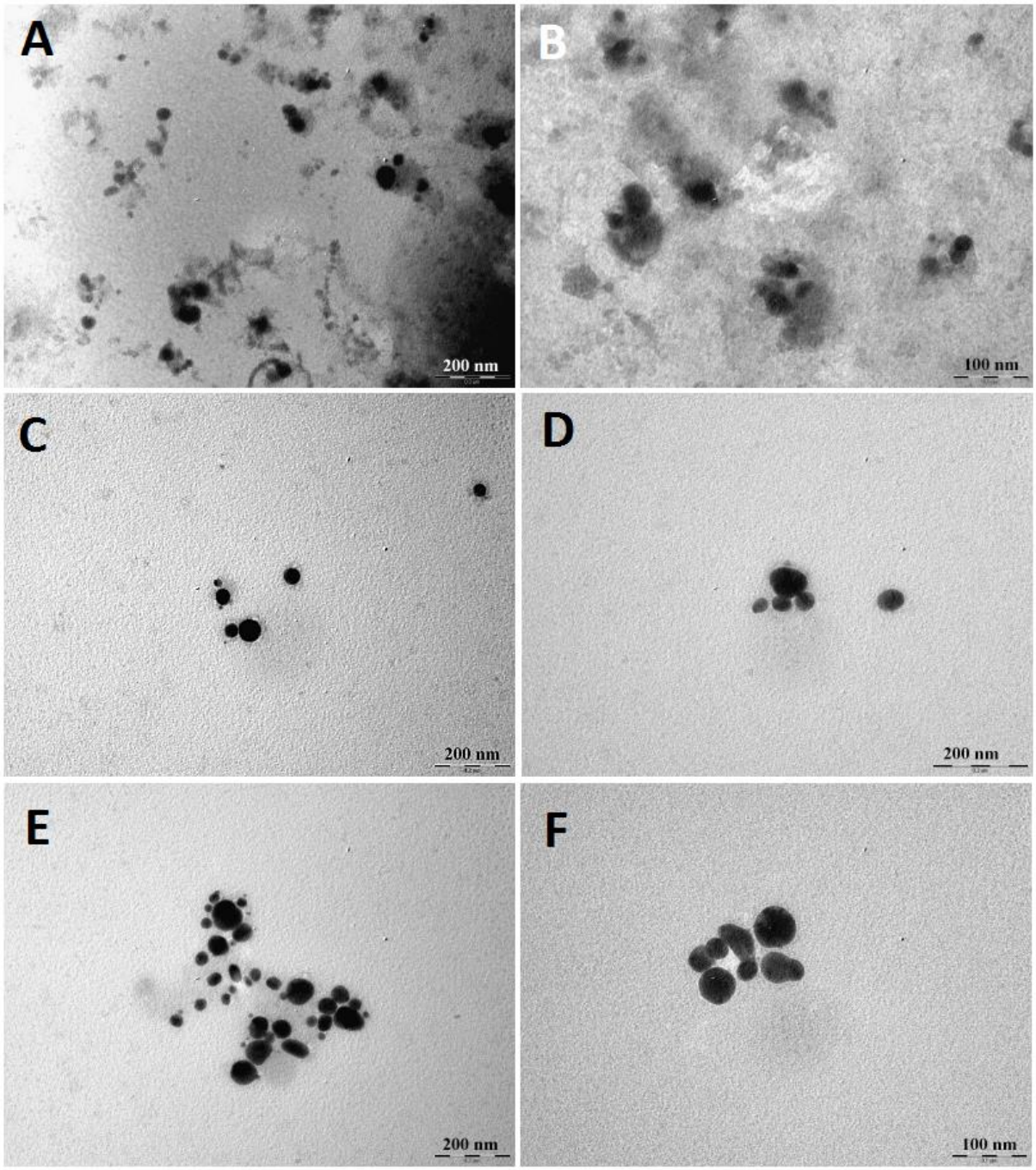
TEM mikrografije nanočestica srebra stabiliziranih s Tweenom također su ukazale na velike razlike u morfologiji nanočestica ovisno o tome radi li se o simuliranom mediju bez organske tvari (ASW) ili filtriranoj morskoj vodi (FSW).

Sa Slike 48 vidljivo je kako se u slučaju dispergiranja AgNP u ASW više ne radi o nanočesticama budući da veličine čestica prelaze 100 nm (Slika 48; C i D), dok se na dijelovima Slika 48A, B, E i F vide oblici za koje se više ne može reći da se radi o sfernim česticama. Na spomenutim slikama oblici su veliki približno 1 μm, a najvjerojatnije se radi o a) kompaktnim sfernim agregatima koji su od nanočestica čvrstim „sljepljivanjem“ narasli do mikrometarskih veličina, b) štapićastim nakupinama koje su vjerojatno potekle od lančastih agregata koji su se polako otapali, c) agregatima u dendrimernim oblicima i oblicima zvjezdice koji nastaju zbog otapanja i učinka Cl^- iona na nanočestice[84]. Na Slikama 48C i D uočavaju se također lančasti agregati, ali ovdje se još razaznaju oblici nanočestica.

Za razliku od Slike 48, na Slici 49 već samim pogledom na skale mikrografija vidi se da se radi o puno manjim i pravilnijim oblicima iako su nanočestice dispergirane u filtriranoj morskoj vodi. Na Slici 48 nema oblika sličnih onima na Slici 49. Zabilježen je raspon veličina nanočestica od 20 do 80 nm. Prema dobivenim mikrografijama ne može se zaključiti kako oko nanočestica u morskim vodama postoji omotač Tweena 80, ali svih šest mikrografija prikazuju niski stupanj agregacije. Na Slikama 49A i 49B nanočestice kao da su uklopljene u mrvičaste nakupine tvari, a kako se radi o filtriranoj morskoj vodi, najvjerojatnije je da se radi o otopljenoj organskoj tvari (kondenzati i nakupine proteina, polisaharida, lipida i raznih metabolita organizama koje žive u morskom vodenom stupcu).



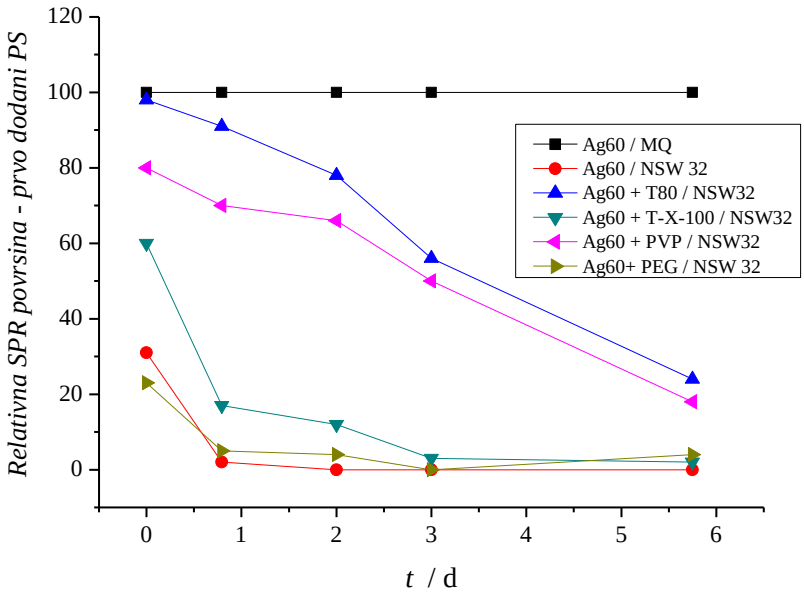
Slika 48. TEM mikrografije nanočestica srebra promjera 60 nm (Ag60 LMNB) dispergiranih u umjetnoj morskoj vodi saliniteta 15 (ASW 15) s dodatkom 10 mg mL^{-1} Tweena 80. Svaka od slika (A-F) predstavlja mikrografiju istog uzorka. Koncetracija nanočestica bila je 5 µg mL^{-1}. Nanočestice su dispergirane u mediju (ASW) 48 sati pri sobnoj temperaturi.



Slika 49. TEM mikrografije nanočestica srebra promjera 60 nm (Ag60 LMNB) dispergiranih u filtriranoj prirodnoj morskoj vodi saliniteta 15 (FSW 15) s dodatkom 10 mg mL^{-1} Tweena 80. Svaka od slika (A-F) predstavlja mikrografiju istog uzorka. Koncetracija nanočestica bila je 5 µg mL^{-1}. Nanočestice su odstajale u mediju 48 sati, a eksperiment i snimanje izvršeni su pri sobnoj temperaturi.

5.3.3. Stabilizacija nanočestica srebra površinskim stabilizatorima prije i nakon dodavanja prirodne morske vode

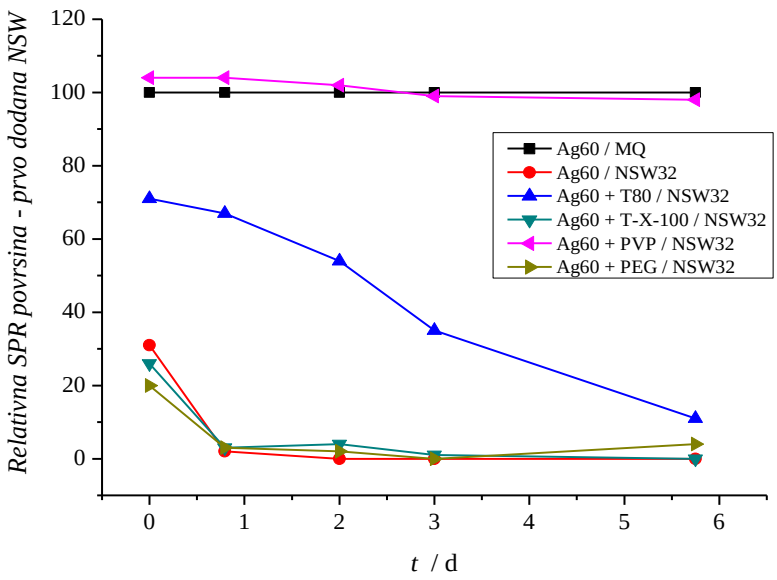
Koloidna stabilnost nanočestica srebra praćena je kroz dva „scenarija“ izlaganja prirodnoj morskoj vodi bogatoj polimerima i PAT. Istraženo je što se događa kada nanočestice prvo bivaju izložene vodenoj okolini s velikom koncentracijom tih stabilizatora, a naknadno dođu u doticaj s morskom vodom (Slika 50) i obratno (Slika 51). Kao mogući stabilizatori korišteni su poli(etilen-glikol sorbitan monooleat) (Tween 80), (poli(etilen-glikol p-(1,1,3,3) tetrametilbutil)-fenileter) (Triton X-100), poli (vinil-pirolidon) (PVP) i poli(etilen-glikol) (PEG), a stabilizacija je praćena UV-VIS spektroskopijom.



Slika 50. Relativne vrijednosti SPR površine za nanočestice srebra promjera 60 nm (Ag60 (LMNB), 5 μg mL^{-1}) kojima su stabilizatori dodani prije prirodne morske vode (salinitet 32,48) u masenoj koncentraciji 1 mg mL^{-1}. Eksperiment i mjerenja vršeni su pri sobnoj temperaturi.

Iako je vremenska razlika dodatka stabilizatora i morske vode veoma malena (10 minuta), *scenariji* izlaganja nanočestica morskoj vodi i PAT različtog su ishoda. Kada je nanočesticama srebra prvo dodan Tween 80, prvih dva dana stabilnost nanočestica je velika i kreće se između 100 i 80 % početne koncentracije u odnosu na scenarij 2 (Slika 51) gdje se radi o 70 i 50% početne koncentracije. Tween 80 ima bolji stabilizacijski učinak kad je nanočesticama srebra (Ag60 LMNB) dodan prije prirodne morske vode. Međutim, PVP pokazuje suprotan učinak; sa Slike 51 se vidi kako djelovanje ovog polimera ima značajno stabilizacijsko djelovanje ako je dodan nakon morske vode. Stabilnost Ag60 s PVP-om je u tom

slučaju gotovo konstanta i gotovo identična koloidnoj stabilnosti nanočestica srebra u ultračistoj vodi.



Slika 51. Relativne vrijednosti SPR površine za nanočestice srebra promjera 60 nm (Ag60 (LMNB), 5 μg mL^{-1}) kojima su stabilizatori dodani nakon prirodne morske vode (salinitet 32, 48) u masenoj koncentraciji 1 mg mL^{-1}.

Kada se u sustav prvo doda PVP, nanočestice postupno agregiraju te u otopini ostaje 17% nakon 5 dana. U slučaju Tritona X-100, uspoređujući Slike 50 i 51 vidljivo je kako je stabilnost nanočestica nešto bolja ako im se prvo doda ova površinski aktivna tvar, a nakon toga morska voda. U uzorcima s PEG-om je svejedno doda li se prije ili poslije morske vode jer kao i nanočestice bez ikakvog stabilizatora (u ultračistoj vodi) talože iz otopine već nakon prvog mjerenja (unutar 20 sati).

Sumarno, u slučaju kada su nanočesticama srebra prvo dodani navedeni površinski stabilizatori, samo Tween 80 i PVP postižu zamjetniji stabilizacijski učinak na nanočestice. Kada je prvo dodana morska voda, a nedugo zatim nekoliko vrsta PAT-ova, jedino zadržavanje koloidne stabilnosti opet su omogućili samo Tween 80 i PVP. Tweem 80 je pokazao sličnu uspješnost stabilizacije u oba slučaja, s tim da je stabilizacija bila uspješnija kada je prvo dodan T80, a nakon toga morska voda. PVP je pokazao neočekivan rezultat, stabilizacija je bila uspješnija naknadnim dodatkom nanočesticama.

PVP-om stabilizirane nanočestice srebra su osim citratnih, najčešće korištena skupina AgNP pa su tako neki autori ispitivali njihovu koloidnu stabilnost i u morskoj vodi. PVP-om stabilizirane nanočestice su u istraživanju Thio i sur.[76] imale manje hidrodinamičke promjere

u odnosu na citratom obavijene u umjetnoj morskoj vodi; 220 nm za PVP-AgNP i 311 nm za cit-AgNP početnog promjera 40 nm, dok su u prirodnoj morskoj vodi razlike d_h s obzirom na omotač minimalne (i PVP-om i cit-AgNP imaju promjere od 250 nm). Mjerenje d_h napravljeno je jednom te nema informacija o dugoročnoj stabilnosti ovih nanočestica. Sikder i sur.[139] našli su kako se prema apsorbancijskom maksimumu, 80% nanočestica (početni promjer 20 nm, koncentracija 100 μg mL^{-1}) gubi (agregiranjem, taloženjem i/ili otapanjem) unutar 4 dana od početka mjerenja kad je medij prirodna morska voda. Prema tome, PVP-om stabilizirane AgNP stabilnije su u morskoj vodi od citratnih, ali u usporedbi s Tweenom 80 kao stabilizatorom, nemaju toliku uspješnost zadržavanja nanočestica u morskoj vodi. Pitanje je zašto onda tako dobro stabilizira nanočestice kad je naknadno dodan u prirodnu morsku vodu? Kirsch[188] je našao kako se PVP u otopinama velike ionske jakosti snažno povezuje s anionima i to redoslijedom $Cl^- < Br^- < I^- < CNS^-$ dok se kompeksiranje s kationima ne primjećuje. Otopine pojedinih soli bile su ionske jakosti i do 1 M. U ovdje prikazanim rezultatima naknadni dodatak PVP-a u morsku vodu ima različit učinak ovisno o trenutkku dodavanja snažnog elektrolita. Moguće je da je struktura micele drugačija kada PVP otopini u kojoj su micele već formirane dodajemo morsku vodu, a opet drugačiju strukturu nalazimo kad PVP dodajemo u morsku vodu (m.v.) kao otapalo. Osim navedenog, ulaskom u tako hidrofilan medij kao što je morska voda moguće je da je energetski povoljnije da se dijelovi PVP makromolekule adsorbiraju oko relativno hidrofobne površine nanočestice srebra i tako se barem djelomično zaštite od djelovanja iona.

Na kraju, treba još jednom napomenti kako u ovom doktoratu PVP nema svrhu omotača, nego se pokušava saznati kakva će biti koloidna stabilnost AgNP ako dođu u doticaj s morskom ili drugom prirodnom vodom koja je bogata površinskim stabilizatorima poput PVP-a ili slične kemijske strukture.

5.4. Stabilnost nanočestica srebra u prisutnosti modelnog i prirodnog sedimenta

Nanočesticama srebra kojima su dodavani različiti površinski stabilizatori (površinski aktivne tvari i polimeri) istraživana je koloidna stabilnost u prisutnosti modelnog i prirodnog sedimenta pri različitom redoslijedu dodavanja spomenutih komponenti (nanočestice / površinski stabilizatori / sediment). Cilj je bio dobiti uvid u ponašanje i sudbinu nanočestica u (morskom vodenom) sustavu gdje je prisutna dovoljna količina stabilizatora koji bi nanočestice mogao zadržati u vodenom stupcu. Mobilnost nanočestica srebra u morskoj vodi nije poželjna zbog postupnog otpuštanja za niže organizme vrlo toksičnog Ag^+ pa je svrha ovih pokusa predvidjeti u kojim uvjetima bi do takvog scenarija moglo doći. Tri su istraživana scenarija kontakta nanočestica, PS i sedimenta; *i*) naknadni dodatak sedimenta stabiliziranim nanočesticama, *ii*) istovremeno dodavanje svih komponenti i *iii*) naknadni dodatak PS u svrhu desorpcije nanočestica sa sedimenta.

5.4.1. *Scenarij I:* Naknadni dodatak montmorilonita srebrnim nanočesticama stabiliziranim površinskim stabilizatorima u ultračistoj vodi

Po dodatku montmorilonita (MMT), samo su dva neionska površinska stabilizatora omogućila minimalno zadržavanje Ag60 u otopini (Ag60 LMNB, Tablica 17): PEG i PVA. PEG je zadržao približno 10 % početne koncentracije prva dva dana nakon dodatka MMT, dok je treći dan udio dispergiranih nanočestica pao na svega 6%. Najboljim stabilizatorom u scenariju naknadnog dodatka sedimenta nanočesticama pokazao se PVA koji je unutar tri dana stabilizirao 5 i 15% početne koncentracije nanočestica u ultračistoj vodi. Valja naglasiti kako je medij bila ultračista voda. Utjecaj masene koncentracije na količinu stabilnih nanočestica srebra ovdje nije uočen. Dodatak 10 mg mL^{-1} PEG-a Ag60 u MQ nije uzrokovao nikakav stabilizacijski učinak, dok je u slučaju PVA deset puta veća koncentracija Ag60 LMNB tek neznatno povećala očitanu SPR površinu. Nanočestice kojima su dodani Pluronic F-127 i TOAB su po dodatku montmorilonita potpuno nestale iz otopine.

Iako je medij ultračista voda, iz dobivenih podataka je jasno kako dodatak montmorilonita unutar 24 h izrazito smanji koloidnu stabilnost nanočestica, ako nemaju učinkovit stabilizator. Minimalno djelotvorni stabilizatori AgNP uz prisustvo sedimenta bili su neutralni polimeri; PEG i PVA jer su njima stabilizirane nanočestice ostale prisutne u disperziji prosječno između 5 i 9% početne koncentracije.

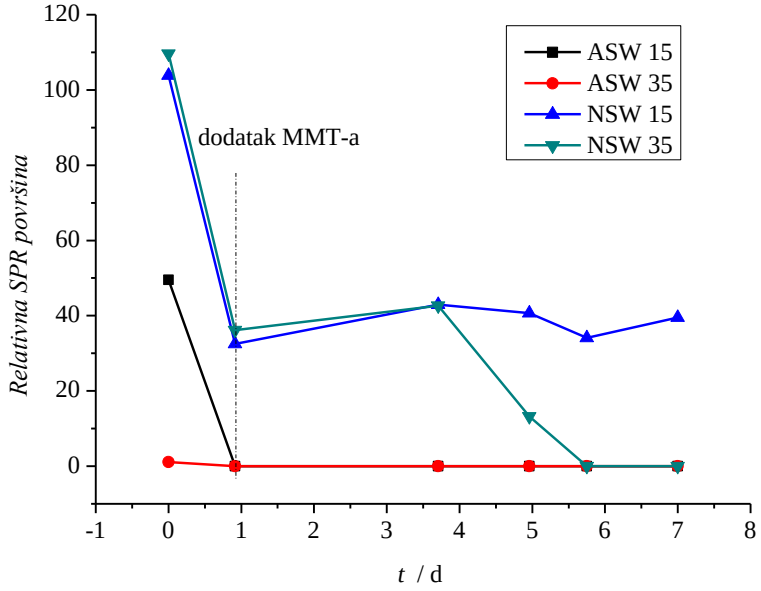
Tablica 17. Vrijednosti SPR površine nanočestica srebra (Ag60 LMNB) stabiliziranih s 1 i 10 mg mL^{-1} različitih polimera i PAT-ova prije (1 h) i nakon dodatka 5 mg mL^{-1} montmorilonita (MMT) u ultračistoj vodi tijekom tri dana.

t / h	Pluronic F-127 γ (mg mL^{-1})		PEG γ (mg mL^{-1})		Na(4-PSS_M) γ (mg mL^{-1})		PVA γ (mg mL^{-1})		TOAB γ (mg mL^{-1})	
	1	10	1	10	1	10	1	10	1	10
1	33,6	32,8	30,1	29,7	35,1	28,0	31,5	33,3	19,4	14,9
↓ dodatak montmorilonita ↓										
26	0	0	3,5	0	0	0	3,6	4,0	0	0
50	0	0	3,7	0	0	0	3,5	5,2	0	0
72	0	0	1,7	0	0	0	2,1	2,9	0	0

5.4.2. *Scenarij I:* Naknadni dodatak montmorilonita srebrnim nanočesticama stabiliziranim Tweenom 80 u umjetnoj i prirodnoj morskoj vodi

U koloidnom sustavu nanočestica srebra s Tweenom 80 umjetnoj morskoj vodi saliniteta 15, nanočestice su u potpunosti destabilizirane dodavanjem modelnog sedimenta, montmorilonita (Slika 52). Međutim, u istom eksperimentalnom scenariju, one sporije nestaju iz vodenog stupca kada je medij prirodna morska voda. Na Slici 52 vidi se kako je montmorilonit značajno smanjio količinu dostupnih nanočestica srebra u otopini, čak za 71%. Međutim, u prirodnoj morskoj vodi saliniteta 15 uz prisustvo Tweena 80, 29% nanočestica zadržano je u otopini tijekom 7 dana. U prirodnoj morskoj vodi saliniteta 35 nanočestice su zaostajale u otopini kroz tri dana (3. dan zadržano je 10%), nakon čega dolazi do potpune agregacije.

Ti rezultati upućuju na sljedeći stabilizacijski scenarij: AgNP koje se nađu u komunalnim ispustima s dovoljnom količinom neutralnih PAT mogu se njima stabilizirati i ostati u vodenom stupcu bogatom suspendiranom tvari kroz nekoliko dana, ako je izmiješanost morske i rječne vode dovoljno velika te je salinitet značajno manji od morskog (35-38). U višem salinitetu i uz prisutnost MMT, stabilizacija je također moguća, ali u kraćem periodu.



Slika 52. SPR površine nanočestice srebra promjera 60 nm (5 µg mL^{-1} Ag60 LMNB) u dodiru s Tweenom 80 masene koncentracije 10 mg mL^{-1} u ultračistoj (MQ), umjetnoj (ASW) i prirodnoj nefiltriranoj vodi (NSW) saliniteta 15 i 38, prije i nakon dodatka montmorilonita (5 mg mL^{-1} nakon 22 sata).

5.4.3. *Scenarij II:* Istovremeni doticaj nanočestica srebra, stabilizatora i modelnog sedimenta

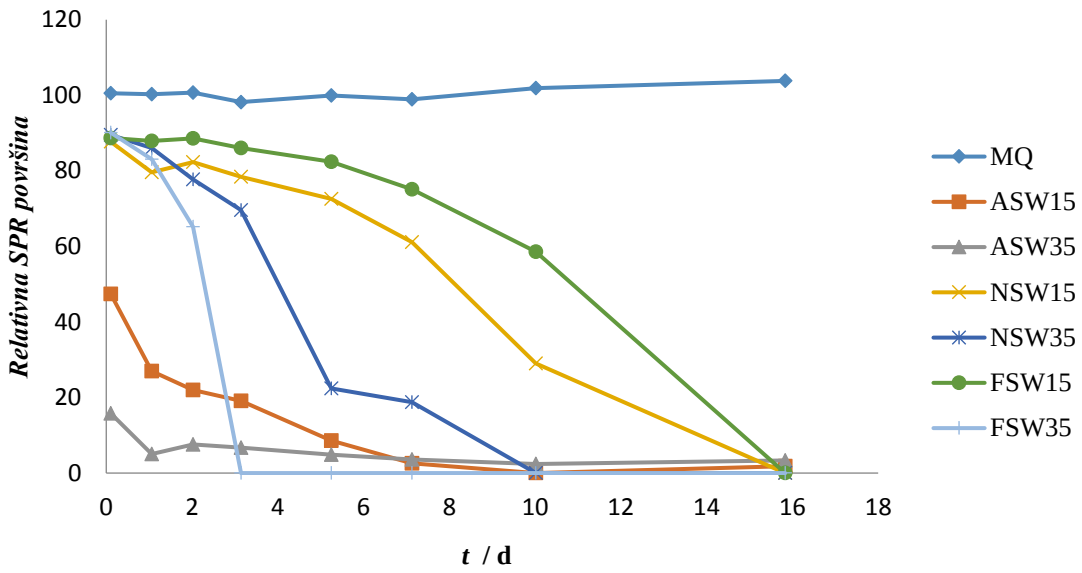
5.4.3.1. Kratkotrajno miješanje

Kroz poglavlje 5.4.1. pokazalo se da korišteni stabilizatori nisu uspješni u zadržavanju nanočestica u vodenom stupcu uz prisutnost sedimenta, stoga je odlučeno koristiti Tween 80 i PVP koji su pokazali moć stabilizacije u morskoj vodi te PAT iz grupe Tweena; Tween 20.

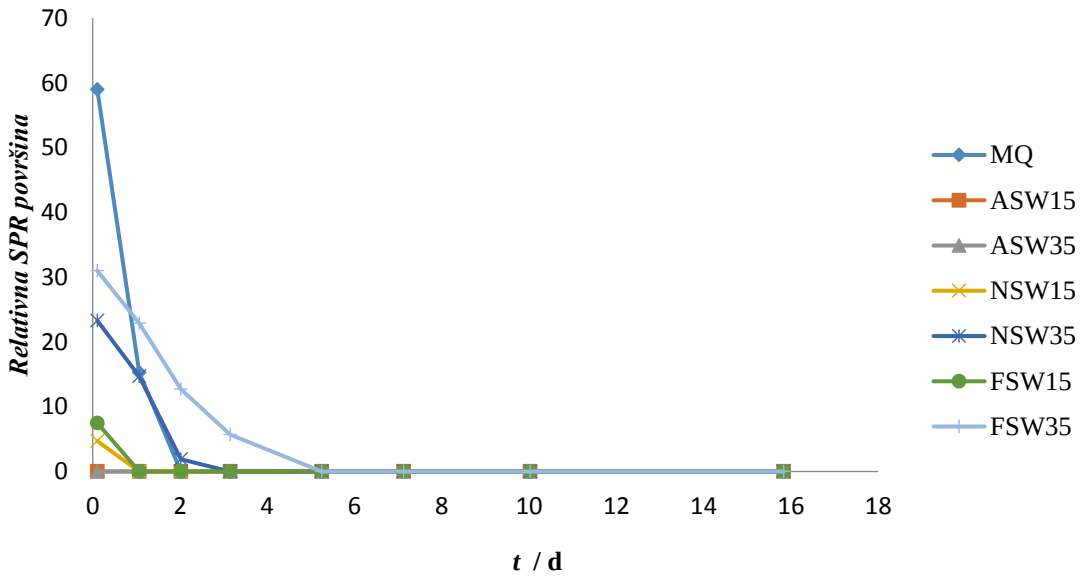
Usporedbom Slike 53 i 54, vidi se kako Tween 20 nije naročito uspješan u sprječavanju heteroagregacije nanočestica srebra (Ag60 LMNB) s montmorilonitom. Ipak, kad su nanočestice bile dispergirane u prirodnoj morskoj vodi saliniteta 35, čak i s dodatkom MMT-a, individualne nanočestice srebra prisutne su u otopini tijekom nekoliko prvih dana (od 31% nultog dana do 6% trećeg dana). Zanimljivo, SPR površine veće su u medijima većeg saliniteta (35) nego manjeg (15). U manjem salinitetu, SPR pikovi se više ne očitavaju na apsorpcijskom spektru uzoraka Ag60 + Tween 80 u FSW15 i Ag60 + Tween 20 u FSW15.

Tween 80 uspio (Slike 55 i 56) je u zadržavanju koloidne stabilnosti nanočestica koje su se rotirale zajedno sa montmorilonitom u slučajevima kada je medij morska voda nižeg saliniteta, 15 (FSW 15). U filtriranoj morskoj vodi, stabiliziranje Tweenom 80 i sprječavanje heteroagregacije s modelnim sedimentom značajno je usporeno, što se vidi iz visokih vrijednosti SPR pika. Čak i nakon 15 dana kontakta nanočestica i sedimenta, ostalo je 16% neagregiranih čestica u otopini. U nefiltriranoj morskoj vodi istog saliniteta, moć stabilizacije u prisutnosti sedimenta znatno je manja, ali vidljiva. Količina neagregiranih čestica kroz period od 7 dana kreće se oko 15%, a nakon toga, nanočestice više nisu prisutne u uzorku. U ostalim medijima, koloidna stabilnost Ag60 uz sediment nije uočena.

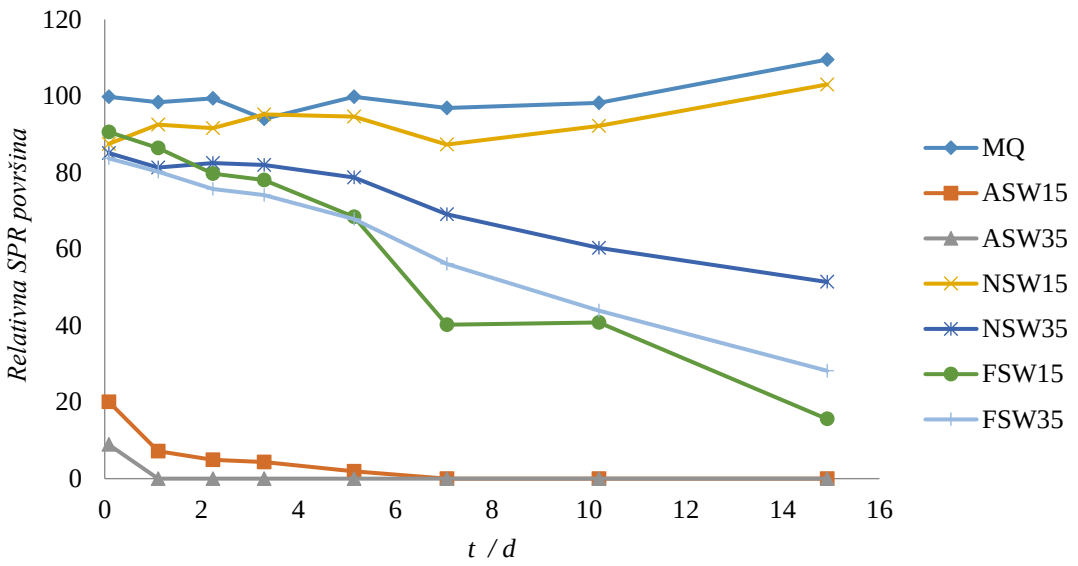
PVP je postigao uspješnu stabilizaciju AgNP u prisutnosti sedimenta i to u dva slučaja; kad se nanočestice nalaze u prirodnoj filtriranoj i nefiltriranoj morskoj vodi saliniteta 35 (Slika 57 i 58). Ovakav ishod zapravo se slaže s rezutatima iz poglavlja 5.3.3. gdje je dobiveno kako PVP još djelotvornije stabilizira nanočestice kad je dodan naknadno u morsku vodu. Soli iz morske vode na taj polimer djeluju tako da se još jače veže na nanočestice.



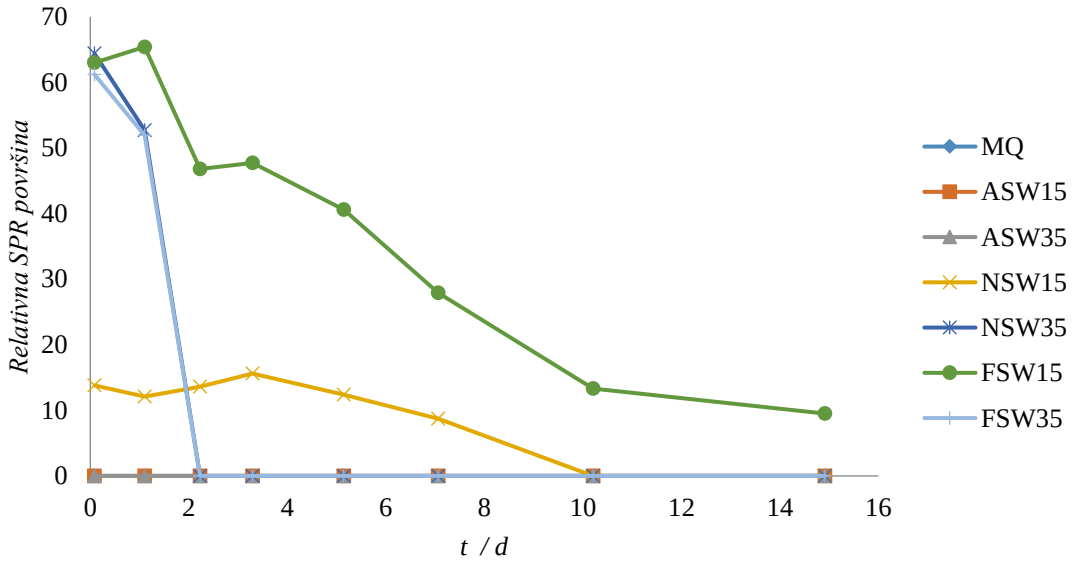
Slika 53. Relativne vrijednosti SPR površine nanočestica srebra promjera 60 nm (5 µg mL^{-1} Ag60 (LMNB)) s Tweenom 20 bez dodatka montmorilonita u ultračistoj (MQ), umjetnoj (ASW), filtriranoj (FSW) i nefiltriranoj morskoj vodi (NSW) saliniteta 15 i 35. Masena koncentracija Tweena 20 iznosila je 1 mg mL^{-1}.



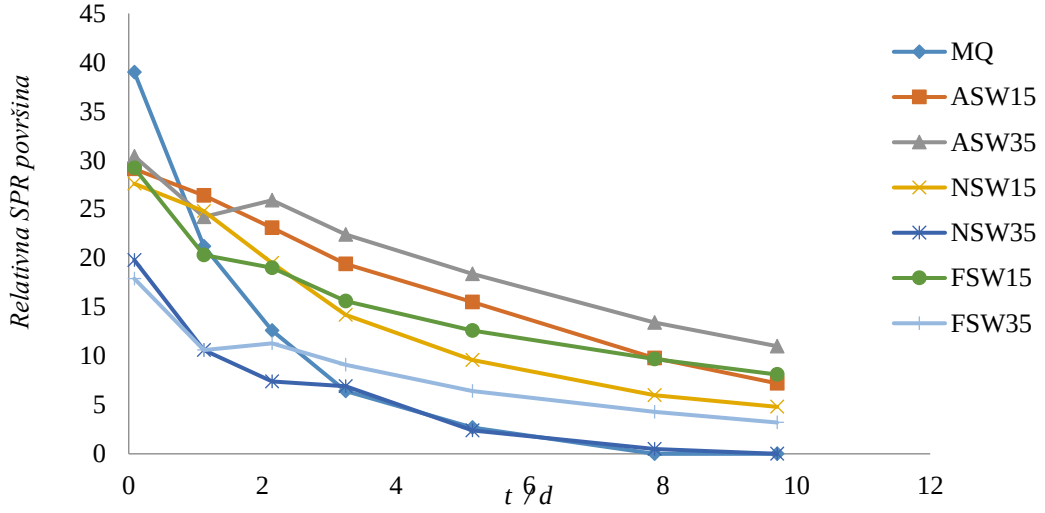
Slika 54. Relativne vrijednosti SPR površine nanočestica srebra promjera 60 nm(5 µg mL^{-1} Ag60 (LMNB)) s dodatkom Tweena 20 i montmorilonita (5 mg mL^{-1}) u ultračistoj (MQ), umjetnoj (ASW), filtriranoj (FSW) i nefiltriranoj morskoj vodi (NSW) saliniteta 15 i 35. Masena koncentracija Tweena 20 iznosila je 1 mg mL^{-1}.



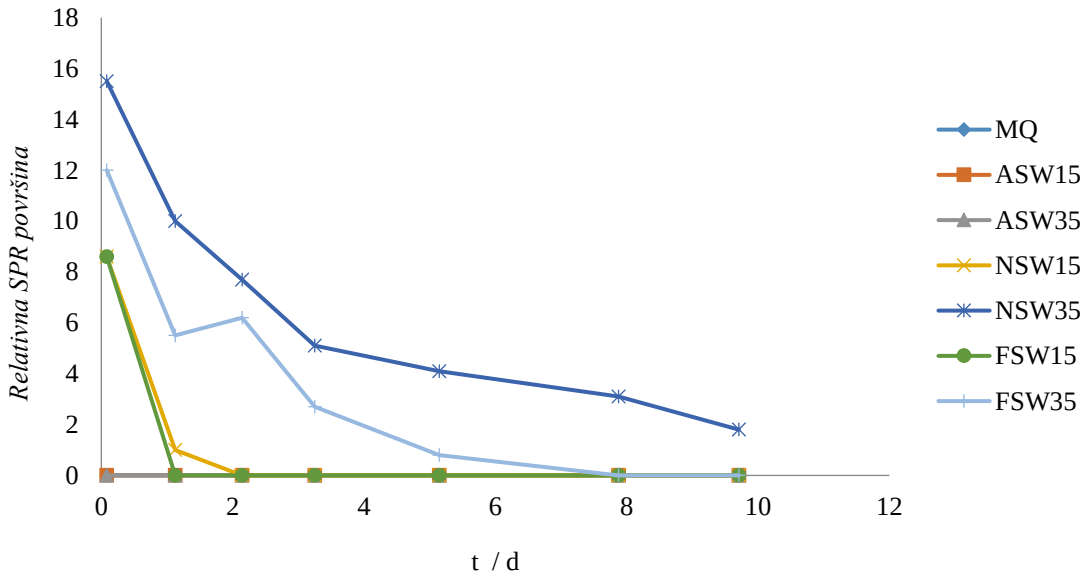
Slika 55. Relativne vrijednosti SPR površine nanočestica srebra promjera 60 nm (5 µg/mL Ag60 (LMNB)) **s** dodatkom Tweena 80, bez montmorilonita (5 mg mL^{-1}) u ultračistoj (MQ), umjetnoj (ASW), filtriranoj (FSW) i nefiltriranoj morskoj vodi (NSW) saliniteta 15 i 35. Masena koncentracija Tweena 80 iznosila je 1 mg mL^{-1}. Eksperiment i mjerenja provedena su pri sobnoj temperaturi.



Slika 56. Relativne vrijednosti SPR površine nanočestica promjera 60 nm (5 µg mL^{-1} Ag60 (LMNB**)**) s dodatkom Tweena 80 i montmorilonita (5 mg mL^{-1}) u ultračistoj (MQ), umjetnoj (ASW), filtriranoj (FSW) i nefiltriranoj morskoj vodi (NSW) saliniteta 15 i 35. Masena koncentracija Tweena 80 iznosila je 1 mg mL^{-1}. Eksperiment i mjerenja provedena su pri sobnoj temperaturi.



Slika 57. Relativne vrijednosti SPR površine nanočestica srebra promjera 60 nm (5 µg mL^{-1} Ag60 (LMNB)) s dodatkom PVP bez montmorilonita (5 mg mL^{-1}) u ultračistoj (MQ), umjetnoj (ASW), filtriranoj (FSW) i nefiltriranoj (NSW) morskoj vodi saliniteta 15 i 35. Masena koncentracija PVP iznosila je 1 mg mL^{-1}. Eksperiment i mjerenja provedena su pri sobnoj temperaturi.



Slika 58. Relativne vrijednosti SPR površine nanočestica srebra promjera 60 nm (5 µg mL^{-1} Ag60 (LMNB)) s dodatkom PVP-a i montmorilonita (5 mg mL^{-1}) u ultračistoj (MQ), umjetnoj (ASW), filtriranoj (FSW) i nefiltriranoj (NSW) morskoj vodi saliniteta 15 i 35. Masena koncentracija PVP-a iznosila je 1 mg mL^{-1}. Eksperiment i mjerenja provedena su pri sobnoj temperaturi.

5.4.3.2. Neprestano miješanje

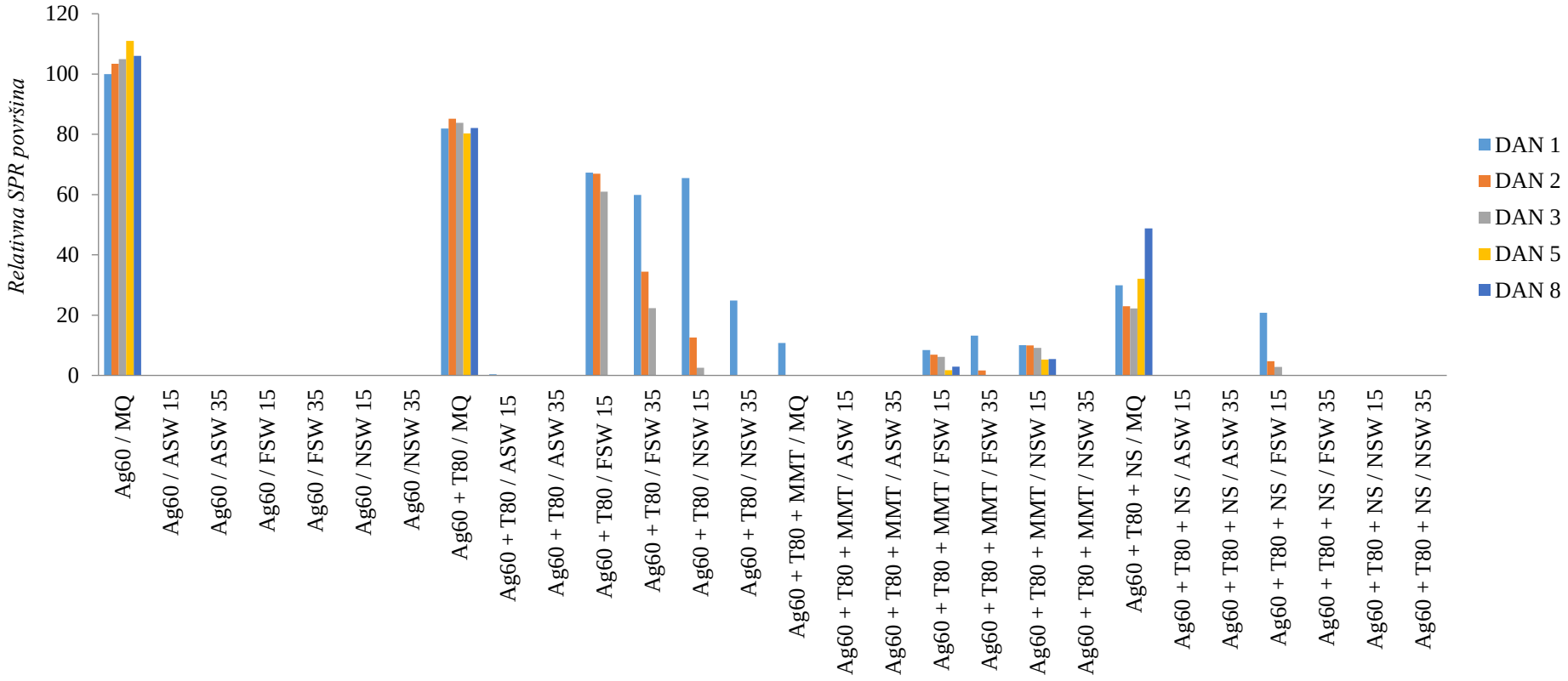
Istovremeni kontakt nanočestica, stabilizatora i sedimenta u ovim je eksperimentima konstantno održavan kako bi se saznalo koja je uspješnost stabilizacije Tweeena 80 uz koncentriranu disperziju modelnog (MMT) i prirodno sedimenta iz Limskog kanala (NS) tijekom osam dana.

Nanočestice srebra (Ag60 LMNB) i Tween 80 u ultračistoj vodi su očekivano, stabilne kroz cijeli tok eksperimenta, usprkos rotaciji (Slika 59). Iako je kroz prethodne eksperimente dokazano kako Tween 80 stabilizira nanočestice u prirodnoj morskoj vodi, zbog neprestane rotacije i češćih međusobnih kontakata, koloidna stabilnost im je puno manja nego u mirovanju. SPR površine u tim uzorcima mogu se izračunavati do tri dana za filtriranu, a samo jedan dan za prirodnu nefiltriranu morsku vodu (salinitet 35). Smanjenje koloidne stabilnosti u skladu je s porastom saliniteta s 15 na 35 za obje vrste morske vode. Prema Slici 59, Ag60 + T80 / FSW 15 imaju relativne SPR površine između 60 i 70% tijekom tri dana, nakon čega se SPR pik više primjećuje na apsorbancijskom spektru. U morskoj vodi višeg saliniteta, FSW 35, apsorbancijski spektri uzoraka imaju relativnu SPR površinu koja iznosi između 34 i 60% početne i to također unutar tri dana, nakon čega nestaju iz vodenog stupca. U prirodnoj nefiltriranoj morskoj vodi oba saliniteta (NSW 15 i 35) Ag60 talože već nakon drugog dana, iako je T80 bio prisutan u sustavu.

Pogleda li se Slika 59 - uzorci nanočestica stabiliziranih s Tweenom 80 u prisutnosti montmorilonita, vidi se kako se Ag60 LMNB minimalno, ali ipak, zadržavaju u morskoj vodi nižeg saliniteta (15) i u slučaju nefiltirane (NSW) i filtrirane (FSW) morske vode. Prvog dana zadržano je do 10% nanočestica i u jednom i u drugom slučaju te s prolaskom vremena, količina nanočestica smanjuje se približno linearno. Kad su saliniteti veći (35), Ag60 se zadržavaju samo prvi dan u filtriranoj morskoj vodi.

Ako se pažnja obrati na SPR površine sustava s prirodnim sedimentom (skupina Ag60+T80+NS) (također Slika 59), zamjećuje se nekoliko učinaka. Važno je usporediti nanočestice koje su se rotirale zajedno s prirodnim i nanočestice koje su se rotirale zajedno s modelnim sedimentom u ultračistoj vodi. U slučaju Ag60-Tween80-MMT-MQ uzoraka, nanočestice srebra ostaju stabilne samo prvi dan i to 20 % početne koncentracije, dok u slučaju AgNP-Tween80-MQ-NS, nanočestice su i nešto stabilnije prvi dan (30% početne koncentracije), ali još bitnije; ostaju stabilne u otopini kroz pet dana. Razlog boljoj stabilizaciji

nanočestica srebra u doticaju s prirodnim sedimentom može biti organska tvar nataložena na čestice prirodnog sedimenta. NOM na česticama sedimenta završava raspadanjem organizama iz vodenog stupca ili prijenosom organske tvari s kopna koja postpuno taloži na morsko dno[189,190]. Vrlo vjerojatno su se proteinska i polisaharidna frakcija adsorbirale na dio nanočestica i kratkotrajno sprječile heteroagregaciju sa česticama prirodnog sedimenta. Ipak, medij u kojem se stabilizacija dogodila je ultračista voda koja nije očekivani medij pa je upitno što će se događati u prirodnoj morskoj vodi? Slika 59. prikazuje da se minimalna stabilizacija Ag60 ipak dogodila u prisutnosti čestica prirodnog sedimenta i Tweena 80 kad je medij bila filtrirana morska voda relativno niskog saliniteta (FSW 15). Tijekom prvog dana, zadržano je čak 20% početne koncentracije Ag60, dok je trećeg dana ta vrijednost pala na 3% početne koncentracije nanočestica. Iznenađujuće je da se određena frakcija nanočestica ipak uspjela stabilizirati u dodiru s česticama prirodnog sedimenta. To se vjerojatno može pripisati sinegističkom učinku Tweena 80 i prirodne organske tvari.



Slika 59. Relativne SPR površine nanočestica srebra promjera 60 nm (5 µg mL^{-1} Ag60 LMNB) koje su se neprestano miješale (rotacija) s modelnim sedimentom montmorilonitom (MMT, 5 mg mL^{-1}) i prirodnim sedimentom (NS, 5 mg mL^{-1}) te s dodatkom Tweena 80 u ultračistoj (MQ), umjetnoj (ASW), prirodnoj (NSW) nefiltriranoj i prirodnoj filtriranoj morskoj vodi (FSW) saliniteta 15 i 35 kroz 8 dana. Referentna vrijednost je SPR površina AgNP / MQ na DAN 1. Eksperiment i mjerenja provedeni su pri sobnoj temepraturi.

Tablica 18. SPR površine nanočestica srebra koje su u kontakt s Tweenom 80 i sedimentima došle istovremeno te su se kroz cijeli tijek eksperimenta vrtile na rotacijskoj miješalici.

t / d →	1	2	3	5	8
Ag60 / MQ	100	103,4	104,9	111,0	106,0
Ag60 / ASW 15	0	0	0	0	0
Ag60 / ASW 35	0	0	0	0	0
Ag60 / FSW 15	0	0	0	0	0
Ag60 / FSW 35	0	0	0	0	0
Ag60 / NSW 15	0	0	0	0	0
Ag60 /NSW 35	0	0	0	0	0
Ag60 + Tween 80 / MQ	81,9	85,1	83,8	80,3	82,1
Ag60 + Tween 80 / ASW 15	0,4	0	0	0	0
Ag60 + Tween 80 / ASW 35	0	0	0	0	0
Ag60 + Tween 80 / FSW 15	67,3	66,9	61,0	0	0
Ag60 + Tween 80 / FSW 35	59,9	34,4	22,3	0	0
Ag60 + Tween 80 / NSW 15	65,5	12,6	2,5	0	0
Ag60 + Tween 80 / NSW 35	24,8	0	0	0	0
Ag60 + Tween 80 + MMT / MQ	10,8	0	0	0	0
Ag60 + Tween 80 + MMT / ASW 15	0	0	0	0	0
Ag60 + Tween 80 + MMT / ASW 35	0	0	0	0	0
Ag60 + Tween 80 + MMT / FSW 15	8,4	6,9	6,2	1,8	2,9
Ag60 + Tween 80 + MMT / FSW 35	13,2	1,6	0	0	0
Ag60 + Tween 80 + MMT / NSW 15	10,1	9,9	9,1	5,3	5,4
Ag60 + Tween 80 + MMT / NSW 35	0	0	0	0	0
Ag60 + Tween 80 + NS / MQ	29,9	23,0	22,2	32,0	48,8
Ag60 + Tween 80 + NS / ASW 15	0	0	0	0	0
Ag60 + Tween 80 + NS / ASW 35	0	0	0	0	0
Ag60 + Tween 80 + NS / FSW 15	20,8	4,7	2,8	0	0
Ag60 + Tween 80 + NS / FSW 35	0	0	0	0	0
Ag60 + Tween 80 + NS / NSW 15	0	0	0	0	0
Ag60 + Tween 80 + NS / NSW 35	0	0	0	0	0

5.4.4. *Scenarij III:* Polukvantitativno određivanje uspješnosti remobilizacije nanočestica srebra s modelnog sedimenta

U Tablici 19 prikazani su rezultati mjerenja apsorbancije supernatanata uzoraka u kojima je Ag60 LMNB bio prvotno adsorbiran na montmorilonit, a zatim su dodani polimeri i površinski aktivne tvari. Rezultati su polukvantitativni budući da je koncentracija nanočestica srebra određivana samo preračunavanjem vrijednosti intenziteta apsorbancije u masenu koncentraciju nanočestica. Izučavan je utjecaj koncentracije PAT koji su su dodavani u tri masena udjela (0,1, 1 i 10 %), a apsorbancija je mjerena nakon 1.,3. i 10. dana. Kao što se vidi i iz Tablice 19, nakon dodavanja PAT-ova i polimera, u supernatantu se ipak može očitati malena koncentracija srebrnih nanočestica. Vrijednosti se kreću između 5 i 10% početne koncentracije za PAT Pluronic F-127 i Pluronic P-123, dok su za neki polimeri poput PEG-a i PVA rezultirali vraćanjem između 10 i 30 % početne koncentracije natrag u otopinu. Ostali polimeri i PAT nemaju nikakav učinak na resuspendiranje (primjerice u ovom slučaju sve PAT komercijalnog imena Disperbyk). Općenito, resuspendiranje nanočestica u vodeni stupac, bilo to resuspendiranjem sa sedimenta ili deagregacijom, najbolje uspijeva sa polimerima i PAT neionske strukture. Međutim, dva tipa tih spojeva negativnog naboja i velike molekulske mase; taninska kiselina i natrijev (4-polistirensulfonat-ko-maleinat) su čini se, omogućili koloidnu stabilnost Ag60. Radi se zapravo o polielektrolitima naboja suprotnog naboju površine nanočestice, s velikim molekulskim masama (M_r (taninska kiselina) = 1701,19 g mol^{-1}, M_r (Poli(4-stirensulfonska kiselina ko - maleinska kiselina) natrijeva sol ~ 20 000 g mol^{-1}) tako da vjerojatno stabiliziraju nanočestice elektrosterički.

U odabranim uzorcima u kojima se pokazalo moguće odvajanje nanočestica srebra sa sedimenta uz pomoć polimera i površinski aktivnih tvari mjerena je i raspodjela veličina čestica tehnikom dinamičkog raspršenja svjetlosti (Tablica 20). Nanočestice srebra nominalne su veličine 60 nm, a budući da su sintetizirane u laboratoriju bez dodatnih postupaka čišćenja, moguća su odstupanja od te vrijednosti. DLS je pokazao kako su nanočestice srebra hidrodinamičkog radijusa 71,45 ± 4,52 nm (nominalna veličina 60 nm). Međutim, Ag60 u doticaju s polimerima i PAT-ovima imaju raspon veličina od 56 do 91 nm.

Tablica 19. Preračunata masena koncentracija nanočestica srebra promjera 60 nm, Ag60 LMNB nakon „potpune“ adsorpcije nanočestica na montmorilonit te naknadnog dodavanja navedenih polimera i površinski aktivnih tvari u ultračistoj vodi nakon jednog, tri i deset dana od priprave uzoraka. Eksperiment i mjerenja provedeni su pri sobnoj temperaturi.

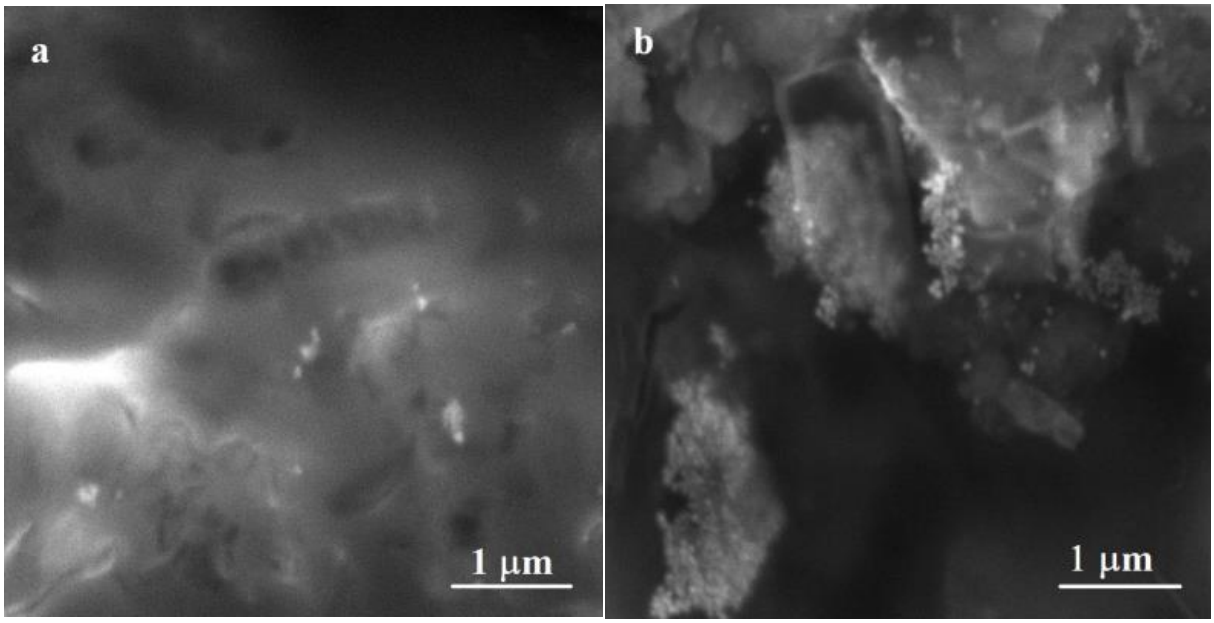
	1 d			3 d			10 d		
PAT	***0,1%***	***1%***	***10%***	***0,1%***	***1%***	***10%***	***0,1%***	***1%***	***10%***
Tween 20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tween 80	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Disperbyk 110	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Disperbyk 111	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Disperbyk 118	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Disperbyk 180	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Disperbyk 190	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Triton X-100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pluronic F-127	0	0,225	0	0,082	0,205	0	0,168	0,25	--
PVP	0	0	0	0	0	0	--	--	--
PEG	0,107	0,572	0,3	0,12	0	0,292	0,251	--	0,357
PEI	0	0	0	0	0	0	--	--	--
Na(4-PSS-M)	0,133	0,121	0	0,186	0	0	0,365	0,85	0,7
PVA	0	0,463	0,141	0,079	0	0,198	0,146	--	0,589
Taninska kiselina	0	0,738	0	0,125	0	0	--	--	--
TOAB	0	0,114	0	0	0,094	0	0	0,251	--
CTAB	0	0	0	0	0	0	--		--
Heksadecilamin	0	0	0	0	0	0	--		--
BSA	0	0	0	0	0	0	--		0,146
Pluronic P-123	0	0,242	0,178	0	0	0	--		
Ag60		**1,82**			**2,04**			**2,1**	

Tablica 20. Rezultati dinamičkog raspršenja svjetlosti za uzorke nanočestica srebra (Ag60 LMNB) koji su bili u dodiru sa sedimentom te su im naknadno dodani niže navedeni polimeri i PAT, a UV-VIS spektroskopijom je uočeno moguće remobiliziranje nanočestica sa sedimenta za dane uzorke.

	pik I		pik II		pik III		pik IV	
	***d*h / nm**	*%*	***d*h / nm**	**%**	***d*h / nm**	**%**	***d*h / nm**	**%**
AgNP 60 nm + MMT	**23,1**±0,99	*14,49±21,82*	**71,45**±4,52	*27,18±13,06*	**929,19**±118,58	*46,5±11,55*	**5405,5**±121,57	*5,8±5,37*
1 % PEG	**18,65**±1,14	*84,02±1,47*	**89,63**±4,7	*13,48±1,22*			**5055,44**±144,75	*2,51±0,44*
1 % Na(4-PSS-M)	**15,81**±0,06	*15,72±31,2*	**90,69**±6,4	*49,88±26,67*	**865,71**±196,38	*9,1±6,97*	**4129,98**±2345,27	*9,96±6,14*
1 % PVA	**13,71**±1,55	*79,29±2,0*	**56,01**±4,36	*19,16±1,95*			**4522,5**±224,15	*0,36±0,61*
1 % Taninska kiselina	**16,15**±2,27	*82,62±2,46*	**72,57**±9,09	*15,72±2,57*			**4949,5**±96,82	*1,78±0,21*
1 % Pluronic P-123	**15,03**±2,43	*76,6±3,68*	**61,01**±6,03	*21,36±3,54*			**5018,71**±198,07	*11,97±27,05*

5.4.5. Pretražna elektronska mikroskopija za modelni i prirodni sediment sa srebrnim nanočesticama i Tweenom 80

SEM analiza za uzorke modelnog i prirodnog sedimenta kojima su dodavane nanočestice (Ag60 LMNB) s Tweenom 80 (Slika 60) u prirodnoj morskoj vodi saliniteta 15 tijekom 10 dana pokazala je nanočestice asocirane sa sedimentom. Same čestice nalaze se blisko vezane za njega, ali se ne može se tvrditi da je nastao heteroagregat jer i sušenje uzorka može uzrokovati takve artefakte. Na mikrografijama je uočljivo nekoliko individualnih nanočestica na površini montmorilonita te postojanje malih homoagregata (Slika 60a), dok su na Slici 60b prisutni mogući heteroagregati nanočestica s prirodnim sedimentom. Potencijalni heteroagregati nanočestica i prirodnog sedimenta posebno su jasno uočljivi na Slici 60b.



Slika 60. SEM mikrografija uzoraka koji prikazuju nanočestice srebra promjera 60 nm (Ag60 NC, 5 μg mL^{-1} s dodatkom Tweena 80 (1 mg mL^{-1}) u filtriranoj morskoj vodi saliniteteta 15 u prisutnosti: a) modelnog sedimenta, MMT-a i b) prirodnog sedimenta iz Limskog kanala, NS nakon 10 dana.

Poglavlje o stabilizaciji nanočestica srebra u prisutnosti modelnog i prirodnog sedimenta podijeljeno je na različite scenarije njihovog međusobnog kontakta. Svrha ovakvog pristupa bila je procjeniti koji će od ispitanih načina rezultirati najvećom količinom individualnih nanočestica i je li moguće odvojiti nanočestice sa sedimenta pomoću različitih površinski aktivnih tvari.

Rezultati **Scenarija I** pokazali su kako su se dodatkom različitih površinskih stabilizatora (Pluronic F-127, PEG, Na(4-PSS-M), PVA, TOAB i Tween 80), a koji su

prethodno dodani nanočesticama srebra te nakon dodatka MMT-a, nanočestice (40% početne koncentracije) u morskoj vodi saliniteta 15 zadržale samo uz Tween 80 i to u morskoj vodi saliniteta 15 (Slika 41) kroz 6 dana. Međutim i pri višem višem salinitetu, u NSW 35, tijekom tri dana zadržava se jednaki udio AgNP, nakon čega dolazi do naglog smanjenja njihove stabilnosti i smanjenja količine u vodenom stupcu. Nadalje, PEG, PVA i TOAB pokazali su minimalno, ali ipak uočljivo zadržavanje AgNP u ultračistoj vodi. Međutim, ti isti polimeri i PAT nisu stabilizirali AgNP u uvjetima bez sedimenta, dok je sa sedimentom (montmorilonitom) prosječna uspješnost stabilizacije iznosila 10%. Razlog tome može biti konstantno miješanje koloidnog sustava sa sedimentom, gdje nanočestice koje ne heteoagregiraju sa sedimentom prisilno ostaju u otopini. Prema tome, turbulentniji uvjeti u stupcu morske vode mogli bi doprinositi koloidnoj stabilnosti u neagresivnom mediju koji ne smanjuje debljinu električnog dvosloja oko čestica.

Ako se usporede naknadni dodatak sedimenta (Scenarij I) i istovremeno miješanje svih komponenti (Scenarij II), u slučaju Ag60 + Tween 80 / NSW 15, vidljivo je kako kad je sediment dodan već stabiliziranim nanočesticama, stabilnost Ag60 s T80 u otopini je puno veća.

Relativna SPR površina (Ag60 + Tween 80 / NSW 15) za:

- **Scenarij I**, nakon 6 dana od dodatka MMT = 40% (Slika 52)
- **Scenarij II**, nakon 7 dana od dodatka MMT = 0 % (Slika 56).

U literaturi postoji nekoliko sličnih istraživanja; Liu je u svom doktorskom radu[116] pratio heteroagregaciju Ag60 s montorilonitom te s ilitom u modelnim otopinama elektrolita (NaCl, $NaNO_3$ i $CaCl_2$). Zaključio je kako se bez Tweena 80, binarni sustav nanočestica sa sedimentom ponaša istovjetno kao i nanočestice same i sedimenti pojedinačno. Dakle, sustav je kontroliran samo energetskom barijerom potrebnom za destabilizaciju električnog dvosloja oko nanočestice. Međutim, dodatak Tweena 80 je rezultirao zamjetnim povećanjem CCC vrijednosti za nanočestice srebra u modelnim otopinama elektrolita; s 40, 35 i 2 mM do preko 100 mM za NaCl, $NaNO_3$ i $CaCl_2$. Nanočestice srebra postale su mobilnije, a sam promjer Ag60 u prisutnosti Tweena 80 povećao se za 8 nm što bi značilo da je sloj oko Ag60 debeo približno 4 nm. Kada se u sustav koji sadrži Ag60, Tween 80 i otopinu jednog od tri navedena elektrolita dodao sediment, dodatakom MMT-a heteroagregacija je bila 50% manja nego u slučaju kada Tween 80 nije prisutan. Jedan od razloga može biti taj što se razni polimeri i PAT (Tween 80, PEG, PEO i organske molekule teže adsorbiraju na površine minerala glina te tako zauzimaju dostupnu površinu na koju bi se adorbirala nanočestica). U tezi koju je napisao Liu dane su

osnove za razumijevanje *sudbine* nanočestica srebra s neionskim PAT kao što je Tween 80 u modelnim sustavima, međutim, trajanje eksperimenata bilo je 15 min. Nađeno je kako Tween 80 povećava CCC vrijednosti za NaCl, $CaCl_2$ i $NaNO_3$ te su uz prisutnost sedimenata nanočestice mobilnije.

U ovom doktorskom radu vremenski okvir bio je minimalno pet dana, a mediji su bile modelna otopina (umjetna morska voda) i prirodna morska voda. Iako su masene koncentracije montmorilonita bile 1000 puta veće nego masene koncentracije nanočestica, one su pri konstantnom miješanju i uz Tween 80 ostajale stabilne barem sedam dana, kada je medij bila prirodna i filtrirana morska voda saliniteta 15. Prema tome, istovremenim doticajem AgNP s neionskim PAT poput Tweena 80 čak i uz prisutnost suspendirane tvari (sedimenta) u priobalnom sustavu niže ionske jakosti sasvim je moguće da će nanočestice ostajati koloidno stabilne kroz nekoliko dana.

U Scenariju II, Tween 20 zadržao je 6% nanočestica srebra tijekom tri dana u FSW 35 te 15% u NSW 35, ali samo nakon jednog dana. Međutim, manjak stabilizacije Ag60 s Tweenom 20 nije iznenađujuć jer i bez sedimenta, najzamjetnija stabilnost bila je u FSW 15 i NSW 15 (Slika 53). Dodatak PVP dao je drugačije rezultate; SPR površine za Ag60 s dodatkom PVP-a u prisutnosti MMT-a su relativno niske (5 i 3% za medije NSW 35 i FSW 35), i konzistentne. Iako se ovdje radi o malenoj količini stabiliziranih nanočestica, potrebno je naglasiti činjenicu da je PVP nenabijeni polimer koji se u morskoj vodi ponaša drugačije nego u ultračistoj (MQ). Važno je povezati rezultate iz poglavlja 5.3.3. gdje je nađeno kako PVP odlično stabilizira nanočestice kad je dodan naknadno u uzorak (nanočestice i morska voda već su bili u kontaktu, a 10 minuta nakon toga dodan je PVP i zadržano je 100% početne koncentracije nančestica). Kada je prvotno PVP dodan nanočesticama u ultračistoj vodi te je nakon toga dodana morska voda, stabilizirano je približno 20% nanočestica. Ovdje se vrlo vjerojatno radi o tzv. *salting out* (isoljavanje) učinku kod kojeg velika ionska jakost otopine uzrokuje smanjenje topljivosti ne-elektrolita. Smanjenjem topljivosti, moguće je da će hidrofobne interakcije između nanočestica i organskih makromolekula poput PVP-a dobiti na značaju i time će adsorpcija na čvrste površine biti izraženija. Treba imati i na umu da su uzorci bili konstantno miješani što uzrokuje češće sudare među česticama. Istovremeni kontakt (nanočestica, stabilizatora i sedimenta) uz konstantno miješanje nepovoljan je scenarij za nanočestice jer se ne stignu dovoljno stabilizirati pa je u slučaju Tweena 20, koji se pokazao kao nešto slabiji stabilizator od Tweena 80 (Slike 53 i 55) Ag60 veoma brzo taložе iz vodenog stupca. Iznimku pritom pokazuje uzorak Ag60 + Tween 20 + MMT / FSW 35, jer su nanočestice

dispergirane u do pet dana. Tween 20 nije se pokazao djelotvornim pri remobilizaciji odnosno odvlačenju nanočestica sa sedimenta (Scenarij III).

U odnosu na eksperimente kod kojih su uzorci kratkotrajno miješani (na početku) u sustavu koji je podvrgnut snažnijem i gotovo neprestanom miješanju (Slika 59), održavanje stabilnosti nanočestice bilo je otežano. SPR pikovi se u nekim slučajevima čak i bez sedimenta ne mogu integrirati više nakon samo tri dana, primjerice za Ag60 + Tween 80 u svim prirodnim vodama; (FSW 15, FSW 35, NSW 15, NSW 35). Međutim, i pri tako jakoj rotaciji s montmorilonitom, SPR površine su primjerice, nakon pet dana za Ag60 + Tween 80 u FSW15 i NSW 15 iznosile između 2 i 5% početnih vrijednosti. Takav rezultat upućuje na činjenicu da bi morska voda bogatija neionskim površinski aktivnim tvarima i polimerima, pa čak i uz čestice sedimenta, može biti sredina u kojoj će dio nanočestica ostati stabilan u vodenom stupcu. Tako su npr. Zhou i sur. naglasili[115] da je pri nižoj početnoj koncentraciji nanočestica, manja vjerojatnost da će se *naljepiti* na sediment ili se uopće međusobno sudariti. Još je važnije kako se i na koji način nanočestice stabiliziraju, da li ih obavija sloj stabilizirajuće PAT ili se one zapravo naljepljuju na „masne kuglice“ odnosno te tvari?

U dodiru s prirodnim sedimentom iz Limskog kanala zamjetna koloidna stabilnost AgNP očitava se samo u MQ i FSW 15 medijima. Udio stabilnih nanočestica u MQ kreće se između 22 do (čak) 48% unutar osam dana, dok u FSW 15 pada s 20% prvog dana mjerenja apsorbancije supernatanta do 3% trećeg dana. Budući da niti u jednom drugom uzorku NSW i FSW različitih saliniteta stabilizacija AgNP nije uočena, pretpostavka je da prirodna organska tvar pomaže u njihovoj stabilizaciji. U nefiltriranoj morskoj vodi i pri konstantnom miješanju koje je jak uzročnik agregacije i heteroagregacije nema „pozitivnih“ rezultata (Slika 59) budući da nema vidljivih SPR pikova. Ipak, pri kratkotrajnom miješanju, nanočestice su stabilne i u prirodnoj morskoj vodi.

Ako se uspoređuju Scenariji I i II, krajnji rezultat ukazuje na to da je više nanočestica zadržano u otopini sa Scenarijem I. Dakle, kada AgNP dolaze u većinskom udjelu kao stabilne u doticaj sa sedimentom, uspjevaju se dulje zadržavati što je i očekivano. Istovremenim dodatkom sedimenta, nanočestica i stabilizatora najvjerojatnije se dovoljan udio nanočestica nije uspio stabilizirati s Tweenom pa je zato krajnji doseg stabilizacije manji.

Pogledaju li se rezultati Scenarija 3, ne može se reći da je odvajanje nanočestica sa sedimenta uspjelo. Tek su PEG, PVA, Pluronic P-123 te taninska kiselina i Na(4-PSS-M) rezultirali mjerljivom koncentracijom nanočestica. Uzorcima u kojima je primjećena

minimalna resuspenzija nanočestica sa sedimenta mjeren je i d_h. Jedino bi hidrodinamički promjeri Ag60 s PEG-om i Na(4-PSS-M) mogli upućivati na jednoslojnu adsorpciju PAT na Ag60 jer su ostali promjeri premali da bi se moglo zaključiti da je došlo do stvaranja sloja PAT oko nanočestice.

Kada se nanočestice (Ag60), stabilizatori i sediment istovremeno dodaju uz neprestano miješanje, Tween 80 djelomično stabilizira nanočestice i značajno usporava njihov potpuni nestanak iz otopine. Kad je dodani sediment bio MMT, najbolji učinak zadržavanja koloidne stabilnosti Ag60 postignut je u morskoj vodi saliniteta 15. Sličan rezultat dobiven je i za filtriranu i nefiltriranu morsku vodu. U slučaju prirodnog sedimenta, zadržavanje nanočestica u vodenom stupcu, odnosno usporavanje heteroagregacije vrlo je uspješno u ultračistoj vodi. Razlog tome bi moglo biti djelovanje prirodne organske tvari koja se postupno taložila na sediment u prirodnom sustavu. Prirodna organska tvar često se spominje kao stabilizator nanočestica iz više razloga; najčešće se radi o složenim makromolekulama ili polielektrolitima koji ih stabiliziraju i nabojem i veličinom molekule (elektrosterički). Nadalje, makromolekule i ioni prirodne organske tvari često imaju dvostruke veze i aromatske strukture koje također pospješuju stabilizaciju nanočestica u stupcu prirodnih voda (kopnenih i mora)[79]. Zadnje, Tween 80 je u slučaju prirodnog sedimenta pokazao samo slabašnu stabilizaciju u filtriranoj morskoj vodi saliniteta 15. Prema tome, s obzirom na postignutu koloidnu stabilnost nanočestica srebra i salinitet u kojima je postignuta, može se očekivati da će dio AgNP koji dospijeva u ušća ostati stabiliziran. Naravno pretpostavka je da se ne radi o vertikalno izmiješanim ušćima gdje je salinitet isti od površine do dna.

6. SAŽETAK RASPRAVE

6. Sažetak rasprave

U literaturnom pregledu spomenuto je kako početna koncentracija nanočestica ima velik utjecaj na njihovu koloidnu stabilnost. Što je koncentracija nanočestica veća, veća je vjerojatnost za međusobne sudare, dok nanočestice u razrjeđenim disperzijama teško dolaze u kontakt i sporije agregiraju[33,34]. Upravo su ta saznanja poslužila kao polazna točka za sljedeći pristup: iako su koncentracije proteina i nanočestica[45] u okolišu relativno malene (iznimke su postrojenja za obradu otpadnih voda i cvjetanje mora[165,166]), što će se dogoditi ako razrjeđene disperzije AgNP dođu u okolinu s malom, ali dovoljnom količinom proteina?

Budući da dio korištene instrumentacije (UV-VIS, DLS) za rad treba relativno visoku koncentraciju AgNP (red veličine nekoliko μg mL^{-1}), eksperimentalni plan je bio mijenjati koncentracijske odnose BSA prema nanočesticama i saznati koliko proteina je potrebno za stabilizaciju AgNP te da li nakon dosega kritične koncentracije BSA, stabilizacija AgNP postaje vjerojatna? Mijenjanjem omjera masenih koncentracija BSA prema nanočesticama za stalne vrijednosti saliniteta (38), dobiveni su značajno drugačiji ishodi stabilizacije. Niske koncentracije nanočestica nisu stabilizirane kada je koncentracijski omjer BSA-AgNP veći od optimalnog. Jedan primjer „nestabilizacijskog“ omjera bio je 0,5 μg mL^{-1} Ag40 koji je brzo gubio na koloidnoj stabilnosti dodavanjem već samo 50 μm BSA, dok veća koncentracija nanočestica (primjerice 1 μg mL^{-1}) nije destabilizirana istom koncentracijom tog modelnog proteina. Prema tome, samo odgovarajući omjeri nanočestica i proteina mogu rezultirati stabilnim nanočesticama srebra u morskoj vodi. Za ispitivane koncentracije BSA prema Ag40 ti omjeri bili su između 133:1 i 3332:1. Pogledaju li se rezultati iz Tablice 11 koji su pokazali veće promjere s povećanjem koncentracije BSA, može se pretpostaviti da dolazi do višeslojnog adsorbiranja tog proteina na površinu nanočestice.

Kada su se AgNP s dodatkom BSA otapale u umjetnoj morskoj vodi, nanočestice s manjim promjerima brže su otpuštale Ag^+ ione u odnosu na veće (Slika 32), a kinetika otpuštanja Ag^+ linearno je rasla sa smanjenjem veličine nanočestice (Tablica 12). Taj učinak bi se ponajprije trebao pripisati tome što se manje nanočestice brže otapaju[56,102,191] zbog energije površine koja raste sa smanjenjem veličine čestice[56]. Ipak, zbog bliskosti krivulja otapanja za BSA-Ag40 i BSA-Ag60, može se pretpostaviti i da zakrivljenošću diktirana spospobnost BSA da omota nanočestice ima ulogu u bržem ili sporijem otpuštanju srebrnih iona. Već je nađeno kako zakrivljenost ima ključnu ulogu u sposobnosti proteina da se maksimalno adsorbira na površinu nanočestice[94,98,99], a u radu i Sánchez-Pérez i sur.[99] dobiveno je kako je upravo

nanočestica polistirena veličine 38,8 nm rezultirala optimalnom zasićenošću površine tim proteinom. Radi se o tome da pri tom odnosu veličina i zakrivljenosti nanočestica i BSA, nije došlo do promjene sekundarne niti tercijarne strukture proteina. Proteini su se adsorbirali u nativnom stanju i kao takvi zauzimaju maksimalnu moguću površinu nanočestice dok „otvorenije strukture“ rezultiraju elektrostatskim odbijanjima među tim makromolekulama.

Od svih ispitanih, pokazalo se kako mogućnost stabilizacije nanočestica srebra u umjetnoj morskoj vodi do maksimalno 10 dana ostvaruju samo neionske površinski aktivne tvari i jedan polimer, PVP. Dakle, najdjelotvorniji površinski stabilizatori su Tween 80, a slijede Tween 20 i PVP. Tweenovi ili polisorbati su uljaste tekućine dobivene iz etoksiliranog sorbitana (derivat sorbitola) koje su potom esterificirane masnim kiselinama kao što je laurinska (Tween 20), palmitinska (Tween 40), stearinska (Tween 60) i oleinska (Tween 80). Široko se koriste u proizvodnji hrane kao emulgatori te u kozmetici i biomedicinskim primjenama[192].

Tween 80, odnosno poli(etilen-glikol sorbitan monooleat) je pokazao najveću uspješnost stabilizacije nanočestica srebra u umjetnoj morskoj vodi nižih saliniteta (5-15), ali je neočekivano, stabilizacija još jače uspjela u prirodnoj morskoj, saliniteta do 35. Ta činjenica upućuje na to da zasad nepoznata tvar ili komponenta prisutna u prirodnoj morskoj vodi dodatno pospješuje stabilizaciju nanočestica s Tweenom 80 usprkos vrlo velikoj količini soli, što je potencijalno veoma važna informacija. Kako bi se procijenilo nalazi li se promotor stabilizacije u čestičnoj ili otopljenoj frakciji organske tvari, morska voda je filtrirana. Čestice su s dodatkom PAT izlagane nefiltriranoj (NSW) i filtriranoj morskoj vodi (FSW). Dobiveni rezultati ukazuju na to da su SPR površine nanočestica srebra podjednake, neovisno radilo se o tome radi li se o NSW ili FSW pa se može zaključiti da se promotor stabilizacije nalazi u otopljenoj frakciji morske vode koja je prisutna i u FSW i u NSW. U pokusima u kojima je korištena NSW sa prirodnih lokacija i uz dodatak T80, podjednaka mogućnost stabilizacije dobivena je i u pulskoj i u rovinjskoj morskoj vodi. Prema tome, uzrok bolje stabilizacije u prirodnoj morskoj vodi vrlo vjerojatno nije specifična tvar vezana samo za vodu određenog lokaliteta. Nadalje, dinamičko raspršenje svjetlosti pokazalo je kako se u uzorcima prirodne morske vode, hidrodinamički promjer nanočestica povećava 11 do 18 nm u odnosu na početnu veličinu, dok je hidrodinamički promjer za T80 iznosio 9 nm. Prema tome, ne može se tvrditi da je nastao monosloj Tweena 80 oko nanočestice srebra, ali činjenica je da je zamjetna količina individualnih, neagregiranih nanočestica prisutna u otopini do sedmog dana (Slike 44 i 45). Sa SEM mikrografije koja prikazuje AgNP s T80 u ultračistoj vodi (Slika 46) vidljivo je adsorbiranje AgNP na bijele *kuglice* koje bi mogle biti nakupine Tweena 80 budući da u otopinu

nije dodana niti jedna druga tvar osim nanočestica srebra i te PAT. Međutim, čestice tih promjera (približno 500 nm) nisu nađene, prema rezultatima dinamičkog raspršenja svjetlosti pa je moguće i da su *bijele kuglice* posljedica lošije pripreme uzorka.

Viši salinitet (35 u odnosu na 15) rezultira većim, ali stabiliziranim nanočesticama (Tablica 17) pa se može zaključiti da veći salinitet uzrokuje još jaču adsorpciju te PAT na nanočesticu. Vrijednosti SPR površina za Ag60 podjednake su u oba saliniteta. Taj rezultat znači da nakon što je postignuta dovoljno uspješna stabilizacija nanočestica, porast salniteta od 15 do 35 više nema utjecaja na koloidnu stabilnost. U disertaciji Li.[67] uočeno je kako CCC vrijednost za sustav nanočestice srebra u NaCl-u dodatkom Tweena 80 raste za jedan red veličine, s 40 mM NaCl na 500 mM NaCl, a ujedno je dobiveno kako Tween 80-AgNP nemaju naboj. Stoga se može zaključiti da je sterička stabilizacija Tweenom 80 glavni razlog za poboljšanja kolodine stabilnosti AgNP u vodenoj otopini NaCl.

Poznato je kako su PAT Tween grupe odlični stabilizatori nanočestica srebra[67,116]. Iz tog razloga Europska komisija (EC-Joint Research Centre, Ispra, Italija) je 2011. pripremila referentni materijal naziva „NM-300K“ za ispitivanje njihovog fizikalno-kemijskog ponašanja u različitim medijima te toksičnosti. NM-300K se sastoji od srebrnih nanočestica promjera 20 nm s 4% w/v mješavinom Tweena 20 i polioksoetilen glicerol trioleata. Lodeiro i sur.[129] su istraživali utjecaj NM-300K na morsku dijatomeju *Chaetoceros curvisetus.*. Dobiveno je kako se veličine nanočestica u ultračistoj i filtriranoj morskoj vodi veoma malo razlikuju. Veličina AgNP u ultračistoj vodi bila je 48, a u FSW 56 nm nakon 48 sati eksperimenta. U rezultatima ovog doktorskog rada, SPR površina srebrnih nanočestica se u filtriranoj morskoj vodi saliniteta 35 smanjila se za 20% nakon istog perioda. Međutim, visina SPR pika u radu Lodeira i suradnika smanjila se za 15% nakon 48 sati pa zapravo možemo govoriti o vrlo sličnim rezultatima iako se radi o nešto drugačijem PS-u.

Sva istraživanja moraju početi sa modelnim sustavima, što su za nanočestice srebra s Tweenom u otopinama elektrolita napravili Li i Liu[67,116]. Ovaj doktorat predstavlja korak dalje zbog toga što su nanočestice izlagane kompleksnijim matricama (različiti saliniteti umjetne, prirodne nefiltrirane i prirodne filtrirane morske vode) te je uočeno kako nepoznata tvar ili čimbenik prisutna u prirodnoj morskoj vodi dodatno pospješuje/u stabilizaciju u odnosu na umjetnu morsku vodu. Osim toga, nije uočena razlika u mogćunosti stabilizacije Tweenom 80, neovisno radilo se o filtriranoj ili nefiltriranoj morskoj vodi saliniteta 15 ili 35.

Pretpostavlja se da T80 ima najbolji stabilizacijski učinak u odnosu na ostale PAT grupe Tweenova (Tween 20, Tween 40 i Tween 60) zbog oleinata koji je mnogo veća skupina u odnosu na laurat, palminat i stearat te zbog dvostruke veze u svojoj strukturi[130]. Jača adsorpcija te PAT dodatno pospješuju i prianjanje poli(etilen-glikolnih) skupina uz površinu AgNP koje uvelike doprinose stabilizaciji[193].

Kada su nanočestice u kontaktu sa sedimentom, ishod stabilizacije značajno ovisi o trenutku njihova miješanja. Važno je i jesu li nanočestice srebra prethodno stabilizirane samo komercijalnim zaštitnim omotačem ili su se incidentno stabilizirale s proteinima, površinski aktivnim tvarima ili nekom drugom tvari. U ovom radu pokazano je kako samo neionski površinski aktivne tvari i to Tween 20 i Tween 80 te polimer PVP usporavaju heteroagregaciju nanočestica sa sedimentom i to kada se stabilizacija dogodila prije dolaska nanočestica u morsku vodu. Resuspenzija nanočestica sa sedimenta pomoću površinski aktivnih tvari i polimera nije bila uspješna.

7. ZAKLJUČCI

7. Zaključci

- Albumin iz goveđeg seruma omogućio je stabilizaciju nanočestica srebra u umjetnoj morskoj vodi, usprkos velikoj koncentraciji soli. Za uspješnu stabilizaciju potrebno je da je maseni odnos proteina prema nanočesticama između 133:1 do 3332:1. Također uspješnost stabilizacije ovisi i o zakrivljenosti i veličini nanočestice – najbolja stabilizacija postignuta je za Ag40 i Ag60.

- Otapanje nanočestica srebra stabiliziranih s BSA u umjetnoj morskoj vodi usporava se za približno tri puta u odnosu na nezaštićene nanočestice.

- Proteini iz seruma hemolimfe dagnje *M. galloprovincialis* i ježinca *P. lividus* djelomično su stabilizirali disperzije nanočestica srebra (10 – 20 % početne koncentracije tijekom šest dana), ali također samo pri određenim masenim omjerima.

- Nanočestice srebra u prirodnoj morskoj vodi bile su stabilne do deset dana samo kada su bile stabilizirane nenabijenim površinski aktivnim tvarima (Tween® 20 i Tween® 80) i PVP–om. U morskoj vodi nižih saliniteta (5,10 i 15), koloidna stabilnost nanočestica je dugotrajnija.

- Kao najbolji stabilizator u prirodnoj morskoj vodi pokazao se Tween 80 iako stabilizacija nije bila uspješna u umjetnoj morskoj vodi. Navedeno ukazuje na to kako zasad nepoznate tvari iz morske vode pospješuju stabiliziranje Tweenom.

- Scenarij miješanja umjetnog ili prirodnog sedimenta s nanočesticama i PAT imao je utjecaj na stabilizaciju. Nanočestice prethodno stabilizirane s neoionskim PAT (*Scenarij I*) su nakon dodatka modelnog sedimenta nešto dulje zadržane u vodenom stupcu u odnosu na istovremeni dodatak nanočestica, PAT, sedimenta i morske vode (*Scenarij II*), pogotovo ako je medij prirodna filtrirana morska voda nižeg saliniteta. Remobilizacija nanočestica sa sedimenta (*Scenarij III*) pomoću PAT nije dala značajne rezutate u smislu uspješnog resuspendiranja.

8. Popis simbola i kratica

SIMBOL ili KRATICA	**ZNAČENJE**
A_{MAX}	vrijednost apsorbancije nanočestica srebra pri vrhu SPR pika
AgNP SA	nanočestice srebra omotane s citratom kao zaštitnim omotačem prozvođača Sigma Aldrich
AgNP NC	nanočestice srebra omotane s citratom kao zaštitnim omotačem prozvođača Nanocomposix
Ag60 LMNB	nanočestice srebra omotane s citratom kao zaštitnim omotačem, nominalnog promjera 60 nm, a sintetizirane u Laboratoriju za morsku nanotehnologiju i biotehnologiju (LMNB)
ASW	umjetna morska voda
cit-AgNP	nanočestice srebra s citratom kao zaštitnim omotačem
d_h	hidrodinamički promjer
DLS	dinamičko raspršenje svjetlosti
DOC	otopljeni organski ugljik
HA	huminske kiseline
ICP-MS	spektrometrija masa s induktivno spregnutom plazmom
FSW	filtrirana prirodna morska voda
MMT	montmorilonit
NSW	prirodna morska voda
MQ	ultračista voda
NOM	otopljena organska tvar
NS	prirodni sediment iz Limskog kanala
PAT	površinski aktivne tvari
POC	čestični organski ugljik
PS	površinski stabilizatori; odnosi se na površinski aktivne tvari i polimere
PVP-AgNP	nanočestice srebra s poli(vinil-pirolidonom) kao zaštitni omotačem
S C	serum celomske tekućine
S HL	serum hemolimfe
SEM	pretražna elektronska mikroskopija
SPR	površinska plazmonska rezonancija
TEM	transmisijska elektronska mikroskopija
TOC	ukupni organski ugljik

9. Literaturni izvori

[1] Klaine, S.J.; Alvarez, P.J.; Batley, G.E.; Fernandes, T.F.; Handy, R.D.; Lyon, D.Y.; Mahendra, S.; McLaughlin, M.J.; Lead, J.R. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ. Toxicol. Chem*. **2008**, 27(9), 1825-1851.

[2] Chinnapongse, S.L.; MacCuspie, R.I.; Hackley, V.A. Persistence of singly dispersed silver nanoparticles in natural freshwaters, synthetic seawater and simulated estuarine seawater. *Sci. Total Environ.* **2011**, 409, 2443-2450.

[3] Liu, J. Hwang, Y.S.; Lenhart, J.J. Heteroaggregation of bare silver nanoparticles with clay minerals. *Environ. Sci. Nano* **2015**, 2, 528-540.

[4] Angel, B.M.; Batley, G.E.; Jarolimek, C.V.; Rogers, N.J. The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems. *Chemosphere* **2013**, 93(2), 359-365.

[5] Wang, H.; Burgess, R.M.; Cantwell, M.G.; Portis, L.M.; Perron, M.M.; Wu, F.; Ho, T.K. Stability and aggregation of silver and titanium dioxide nanoparticles in seawater: role of salinity and dissolved organic carbon. *Environ. Toxicol. Chem.* **2014**, 33 (5), 1023-1029.

[6] Sondi, I.; Salopek-Sondi, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E.coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J. Colloid Interf. Sci.* **2004**, 177-182.

[7] Gambardella, C.; Ferrando, S.; Morgana, S.; Gallus, L.; Ramoino, P., Ravera, S.; Bramini, M.; Diaspro, A.; Faimali, M.; Falugi, C. Exposure of *Paracentrotus lividus* male gametes to engineered nanoparticles affect skelletal bio-mineralization processes and larval plasticity. *Aquat. Toxicol.* **2015**, 158, 181-191.

[8] Sendra, M.; Yeste, M.P.; Gatica , J.M.; Moreno-Garrido, I.; Blasco, J. Direct and indirect effects of silver nanoparticles on freshwater and marine microalgae (*Chlamydomonas reinhartdtii* and *Phaeodactylum tricornutum*). *Chemosphere* **2017**, 179, 279-289.

[9] Gambardella, C.; Mesarič, T.; Milivojević, T.; Sepčić, K.; Gallus, L.; Carbone, S., Ferrando, S.; Faimali, M. Effects of selected metal oxide nanoparticles on *Artemia salina* larvae: evaluation of mortality and beharioural and biochemical responses. *Eniron. Monit. Assess*. **2014**, 186(7), 4249-4259.

[10] Magesky, A.; Pelletier, E. Toxicity of ionic silver and polymer-coated silver nanoparticles with interactions of functionalized carbon nanotubes on early development stages of sea urchin. *Aquat. Toxicol.* **2015**, 167, 106-123.

[11] Al-Sid-Cheikh, M.; Rouleau, C.; Pelletier, E. Tissue distribution and kinetics of dissolved and nanoparticulate silver in Iceland scallop (*Chlamys islandica*). *Mar. Environ. Res*. **2013**, 86, 21-28.

[12] Levard, C.; Hotze, E.M.; Lowry, G.V.; Brown, Jr. G.E. Environmental transformation of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environ. Sci. Technol*. **2012**, 46, 6900-6914.

[13] Wang, H.; Ho, K.T.; Scheckel, K.G.; Wu, F.; Cantwell, M.G.; Katz, D.R.; Horowitz, D.B.; Boothman, W.S.; Burgess, R.M. Toxicity, bioaccumulation and biotransformation of silver nanoparticles in marine organisms. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, 48, 13711-13717.

[14] Gessner, A.; Waicz, R.; Lieske, A.; B.-R. Paulke; Mäder, K.; Müller, R.H. Nanoparticle with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption. *Int. J. Pharm.* **2000**, 196, 245-249.

[15] Moyano, D.F.; Goldsmith, M.; Solfiell, D.J.; Landesman-Milo, D.; Miranda, O.R.; Peer, D.; Rotello, V.M. Nanoparticle hydrophobicity dictates immune response. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 3965-3967.

[16] Dong, Z.; Hou, Y.; Han, W.; Liu, M.; Wang, J.; Qiu, Y. Proteina corona-mediated transport of nanoplastics in seawater-saturated porous media. *Wat. Res.* **2020**, 182, 115978, https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115978.

[17] European Comission: Recommendation on the Definition of Nanomaterials EU/696/2011, 2011.

[18] Taniguchi, N. On the Basic Concept of Nanotechnology; *Proc. Intl. Conf. Prod. Eng.* Part II; Japan society of precision engineering, Tokyo, 1974; pp. 18-23.

[19] *There's plenty room at the bottom*, http://www.phy.pku.edu.cn/~qhcao/resources/class/QM/Feynman's-Talk.pdf, pristupljeno 27.1.2020.

[20] Binnig, G.; Rohrer, H.; Gerbe, Ch; Weibe, E. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys. Rev. Lett.* **1982**, 49(1), 57-61.

[21] Kroto, H.; Heath, J.R.; O'Brien, S.C.; Curl, R.F.; Smalley, R.E. C_{60}: Buckminsterfullerene. *Nature* **1985**, 318, 162-163.

[22] Domercq, P.; Praetorius A.; Boxall, A.B.A. Emission and fate modelling framework for engineered nanoparticles in urban aquatic systems at high spatial and temporal resolution, *Environ. Sci. Nano.* **2018**, 5, 533-543.

[23] Maysinger, D.; Moguin, A.; Choi, J.; Kodiha, M.; Stochaj, U. Gold nanourchins and celastrol reorganize the nucleo- and cytoskeleton of glioblastoma cells. *Nanoscale* **2018**, 10(4), 1716-1726.

[24] Banfield, J.; Navrotsky, A. Nanoparticles and the environment. *Rev. Mineral. Geochem.* **2001**, 44, pp 18.

[25] Sharma, V.K.; Filip, J.; Zboril, R.; Varma, R.S. Natural inorganic nanoparticles – formation, fate and toxicity in the environment. *Chem. Soc. Rev.* ***2014,*** 44, 8410-8423.

[26] Zaytseva, O.; Neumann, G. Carbon nanomaterials: production, impact on plant development, agricultural and environmental applications, *Chem. Biol. Technol. Agric*. **2016**, 3(17), doi: DOI 10.1186/s40538-016-0070-8.

[27] Freestone, I.; Meeks, N.; Sax, M.; Higgitt, C. The Lycurgus cup – a roman nanotechnology. *Gold. Bull.* **2007**, 40, 270-277.

[28] Nanoeffects in ancient technology and art and in space u Fundamentals and applications of nano silicon in plasmonics and fullerins, Current and Future Trends Micro and Nano Technologies 2018, pp. 497-518.

[29] Nanodatabase, http://nanodb.dk/, pristupljeno 29.10.2019.

[30] Lombardo, D.; Kiselev, M.A.; Caccamo, M.T. Smart nanoparticles for drug delivery application: development of versatile nanocarrier platforms in biotechnology and nanomedicine, *J. Nanomater.* **2019**, doi: 10.1155/2019/3702518.

[31] Kumar, R.; Lal. S. Synthesis of organic nanoparticles and their applications in drug delivery and food nanotechnology: a Review, J. Nanomater. Mol. Nanotechnol. 2014, 3:4, doi: 10.4172/2324-8777.1000150.

[32] Guan, Y.; Sun, T.; Ding, J.; Xie, Z. Robust organic nanoparticles for noninvasive long-term fluorescence imaging. *J. Mater. Chem. B* **2019**, 44, 6879-6889.

[33] Gallego-Urea, J.A.; Hammes, J.; Cornelis, G.; Hasselöv, M. Coagulation and sedimentation of gold nanoparticles and illite in model natural waters: influence of initial particle concentration. *Nanoimpact* **2016**, 3-4, 67-74.

[34] García-Negrete, C.A.; Blasco, J.; Volland, M.; Rojas, T.C., Hampel, M.; Lapresta-Fernández, A.; Jiménez de haro, M.C.; Soto, M.; Fernández, A. Behaviour of Au-citrate nanoparticles in seawater and accumulation in bivalves at environmentally relevant concentrations. *Environ. Pollut*. **2013**, 174, 134-141.

[35] Stern, O. Theorie der elektrolytischen doppelschiht. *Z. Elektr.* **1924**, 30, 508-516.

[36] Rhee, I.H.; Dzombak, D.A. Surface complexation Guoy-Chapman modelling of binary and ternary cation exchange. *Langmuir* **1998**, 14, 935-943.

[37] Pfeiffer, C.; Rehbock, C.; Hühn, D.; Carillo-Carion, C.; de Aberasturi, D.; Merk, V.; Barcikowski, S.; Parak, W.J. Interaction of colloidal nanoparticles with their local environment: the (ionic) nanoenvironment around nanoparticles is different from bulk and determines the physico-chemical properties of the nanoparticles. *J. R. Soc. Interface* **2013**, 11, doi: 10.1098/rsif.2013.0931.

[38] Zeta potential, Wikimedia Commons, https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Zeta_potential#/media/File:Diagram_of_zeta_potential_and_slipping_planeV2.svg, pristupljeno 27.1.2020.

[39] Derjaguin, B.; Landau, L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physicochim. Urs.* **1941**, 14, 633.

[40] Vervey, E.J.W.; Overbeek, J.Th.G. Theory of the stability of lyophobic colloids. *J. Phys. Chem.* **1947**, 51, 3, 631-636.

[41] Akaighe, N.; Depner, S.W.; Banerjee, S.; Sharma, V.K.; Sohn, M. The effects of monovalent and divalent cations on the stability of silver nanoparticles formed from direct reduction of silver ions by Suwannee River humic acid/natural organic matter. *Sci. Total Environ.* **2012**, *441*, 277-289.

[42] Xie, J.; Lee, J.Y.; Wang, D.I.C.; Ting, Y.P. Silver nanoplates: From biological to biomimetic synthesis. *ACS Nano* **2007**, 1(5), 429 –439.

[43] Virkutyte, J.; Varma, R.S. (2013) Green Synthesis of Nanomaterials: Environmental Aspects in *Sustainable Nanotechnology and the Environment: Advances and Achievements*, Chapter 2 , pp 11-39.

[44] Kang, F.; Alvarez, P.J.; Zhu, D. Microbial extracellular polymeric substances reduce Ag^+ to silver nanoparticles and antagonize Bactericidal Activity. *Environ. Sci. Technol*. **2014**, 48, 316-322.

[45] Giese, B.; Klaessig, F.; Park, B.; Kaegi, R.; Steinfeldt, M.; Wigger, H.; von Gleich, A.; Gottschalk, F. (2018) Risks, Release and concentrations of engineered nanomaterial in the environment. *Scientific Reports* **8**:1565, doi: 10.1038/s41598-018-19275-4.

[46] Kelly, K.L.; Coronado, E.; Zhao, L.L.; Schatz, G.C. The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *J.Phys. Chem. B.* **2003**, 107, 668-677.

[47] González, A.L.; Noguez, C.; Beránek, J.; Barnard, A.S. Size, shape, stability, and color of plasmonic silver nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2014**, 118, 9128-9136.

[48] McGillicuddy, E.; Murray, I.; Kavanagh, S.; Morrison, L.; Fogarty, A.; Cormican, M.; Dockery, P.; Prendergast, M.; Rowan, N.; Morris, D. Silver nanoparticles in the environment: sources, detection and ecotoxicology. *Sci. Total Environ.* **2017**, 575, 231-246.

[49] Gottschalk, F.; Sun, T.Y.; Nowack, B. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: review of modelling and analytical studies. *Environ. Pollut.* **2013**, 287-300.

[50] Final report summary – SMART-NANO (Sensitive Measurement, detection, and identification of engineered NANOparticles in complex matrices), https://cordis.europa.eu/project/id/280779/reporting, pristupljeno 27.1.2020.

[51] Project on Emerging Nanotechnologies Consumer Products Inventory, http://www.nanotechproject.org/cpi, pristupljeno 28.1.2020.

[52] Vance, M.E.; Kuiken, T.; Vejerano, E.P.; McGinnis, S.P.; Hochella, M.F.Jr.; Rejeski, D.; Hull, M.S. Nanotechnology in the real world: redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J. Nanotechnol*. **2015**, 6, 1769-1780.

[53] Shafer, M.M.; Overdier, J.T.; Armstong, D.E. Removal, partitioning, and fate of silver and other metals in wastewater treatment plants and effluent-receiving streams. *Environ. Toxicol. Chem.* **1998**, 17(4), 630-641.

[54] Sánchez-Quiles, D.; Tovar-Sánchez, A. Sunscreens as a source of hydrogen peroxide production in coastal waters. Environ Sci Technol. 2014, 48(16), 9037-9042

[55] Blaser, S. A.; Scheringer, M.; MacLeod, M.; Hungerbühler, K. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: contribution of nano-functionalized plastics and textiles. Sci. Total Environ. 2008, 390, 396-409.

[56] Ma, R.; Levard, C.; Marinakos, S.M.; Cheng, Y.; Liu, J.; Michel, F.M.; Brown, Jr.G.E.; Lowry, G.V. Size-controlled dissolution of organic-coated silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, 46, 752-759.

[57] Dobias, J.; Bernier-Latmani, R. Silver release from silver nanoparticles in natural waters. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 4140-4146.

[58] El Badawy, A.M.; Luxton, T.P.; Silva, R.G.; Scheckel, K.G.; Suidan, M.T.; Tolaymat, T.M. Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environ. Sci. Technol*. **2010,** *44(4)*, 1260-1266.

[59] Zhang, W.; Yao, Y.; Li, K.; Huang, Y.; Chen, Y. (2011) Influence of dissolved oxygen on aggregation kinetics of citrate-coated silver nanoparticles, *Environ. Pollut.* **159**, 3757-3762.

[60] Baalousha, M.; Nur, Y.; Römer, I.; Tejamaya, M.; Lead, J.R. Effect of monovalent and divalent cations, anions and fulvic acid on aggregation of citrate-coated silver nanoparticles. *Sci. Total. Environ.* **2013,** *454-455*, 119-131.

[61] Lodeiro, P.; Achterberg, E.P.; Pampín, J.; Affatati, A.; El-Shahawi, M.S. Silver nanoparticles coated with natural polysaccharides as models to study AgNP aggregation kinetics using UV-Visible spectrophotometry upon discharge in complex environments. *Sci. Total Environ.* **2016**, 539, 7-16.

[62] Loosli, F.; Le Coustumer, P.; Stoll, S. Effect of electrolyte valency, alginate concentration and pH on engineered TiO_2 nanoparticle stability in aqueous solution. *Sci. Total Environ*. **2015**, 535, 28-34.

[63] Grillo, R.; Rosa, A.H.; Fraceto, L.F. (2015) Engineered nanoparticles and organic matter: a review of the state-of-the-art, Chemosphere 119, 608-619.

[64] Siddiq, M.A.; Murugan, D.; Srivastova, R.; Alam, Md. S. Influence of pH on interaction of silver nanoparticles – protein: analyses by spectroscopic and thermodynamic ideology, Colloid. Surface. B. 2019, 184, 110524.

[65] Levard, C.; Reinsch, B.C.; Michel, F.M.; Oumahi, C.; Lowry, G.V.; Brown, G.E., Sulfidation process of PVP-Coated Silver Nanoparticles in Aqueous Solution: Impact on Dissolution Rate, *Environ. Sci. Technol*. **2011**, 45, 5260-5266.

[66] Peterson, K.I.; Lipnick, M.E.; Mejia, L.A.; Pullman, D.P. Temperature dependence and mechanism of chloride-induced aggregation of silver nanoparticles. *J. Phys. Chem. C.* **2016**, 40, 23268-23275.

[67] Li, X. Fate of silver nanoparticles in surface water environments. Doktorski rad. The Ohio State University, Columbus, OH, 2011.

[68] Liu, J.; Hwang, Y.S.; Lenhart, J.J. Heteroaggregation of bare silver nanoparticles with clay minerals. *Environ. Sci. Nano* **2015**, 2, 528-540.

[69] Hou, W.-C.; Stuart, B.; Howes, R.; Zepp, R.G. Sunlight-driven reduction of silver ions by natural organic matter: formation and transformation of silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol*. **2013**, 47(14), 7713-7721.

[70] Yu, S.; Yin, Y.; Zhou, X.; Dong., L.; Liu, J. Transformation kinetics of silver nanoparticles and silver ions in aquatic environments revealed by double stable isotope labeling. *Environ. Sci. Nano* **2016**, 3, 883-893.

[71] Tiede, K.; Hasselöv, M.; Breitbarth, E.; Chaudhry, Q.; Boxall, A.B. Considerations for environmental fate and ecotoxicity testing to support environmental risk assessments for engineered nanoparticles. *J. Chromatogr. A.* **2009**, 1216(3), 503-509.

[72] Lynch, I.; Dawson, K.A. Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today* **2008**, 3(1-2), 40-47.

[73] Pletikapić, G.; Radić, T.M.; Zimmermann, A.H.; Svetličić, V.; Pfannkuchen, M.; Marić, D.; Godrijan, J.; Žutić, V. AFM imaging of extracellular polymer release by marine diatom Cylindrotheca closterium (Ehrenberg) Reiman & J.C. Lewin. *J. Mol. Recognit.* **2011**, 24(3), 436-445

[74] Li, Y.; Zhang. W.; Niu, J.; Chen, Y. Surface-coating-dependent dissolution, aggregation, and reactive oxygen species (ROS) generation of silver nanoparticles under different irradiation conditions. *Environ. Sci. Technol*. **2013**, 47, 10293-10301.

[75] Brown, M.A.; Goel, A.; Abbas, Z. Effect of Electrolyte Concentration on the Stern layer thickness at a charged interface. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2016**, 55, 3790-3794.

[76] Thio, B.J.R.; Montes, M.O.; Mahmoud, M.A.; Lee, D.W.; Zhou, D.; Keller, A.K. Mobility of capped silver nanoparticles under environmentally relevant conditions. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, 46, 6985-6991.

[77] Keller, A.A.; Wang, H.; Zhou, D.; Lenihan, H.S.; Cherr, G.; Cardinale, B.J.; Miller, R.; Ji, Z. Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, 44(6), 1962-1967.

[78] Baalousha, M.; Afshinnia, K.; Guo, L. Natural organic matter composition determines the molecular nature of silver nanomaterial-NOM corona. *Environ. Sci. Nano* **2018**, 4, 868-881.

[79] Louie, S.M.; Tilton, R.D.; Lowry , G.V. Effects of molecular weight distribution and chemical properties of natural organic matter on gold nanoparticle aggregation. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, 47, 4245-4254.

[80] Neihof, R.A.; Loeb, G.I. The surface charge of particulate matter in seawater. *Limnol. Oceanogr.* **1972**, 17(1), 7-16.

[81] Penru, Y.; Simon, X.F.; Guastalli, A.R.; Esplugas, S.; Llorens, J.; Baig, S. Characterization of natural organic matter from Mediterranean coastal seawater. *J. Wat. Supply Res. T.* **2013**, 62(1), 42-51.

[82] Gunsolus, I.L.; Mousavi, M.P.S.; Hussein, K.; Bühlmann, P.; Haynes, C.L. Effects of humic and fulvic acids on silver nanoparticle stability, dissolution, and toxicity *Environ. Sci. Technol*. **2015**, 49(13), 8078-8086.

[83] Zou, X.; Shi, J.; Zhang, H. Morphological evolution and reconstruction of silver nanoparticles in aquatic environments: The roles of natural organic matter and light irradiation. *J. Hazard. Mater*. **2015**, 292, 61-69.

[84] Zhang, L.; Li, X.; He, R.; Zhang, L.; Zeng, J. Chloride-induced shape transformation of silver nanopartilces in a water environment, *Environ. Pollut*. **2015**, 204, 145-151.

[85] Benner, R.; Pakulski, J.D.; McCarthy, M.; Hedges, J.I.; Hatcher, P.G. Bulk chemical characteristics of dissolved organic matter in the ocean. *Science* **1992**, *255*, 1561–1564.

[86] Callegaro, S.; Minetto, D.; Pojana, G.; Bilanicová, D.; Libralato, G.; Volpi Ghirardini, A.; Hasselöv, M.; Marcomini, A. Effects of alginate on stability and ecotoxicity of nano-TiO_2 in artificial seawater. *Ecotox. Environ. Safe*. **2015**, 117, 107-114.

[87] Adeleye, A.S.; Keller, A.A. Interactions between algal extracellular polymeric substances and commercial TiO_2 nanoparticles in aqueous media. *Environ. Sci. Technol*. **2016**, 50 (22), 12258-12265.

[88] Kadar, E.; Batalham I.L.; Fisher, A.; Roque, A.C.A. The interaction of polymer-coated magnetic nanoparticles with seawater. *Sci. Total Environ*. **2014**, 487, 771-777.

[89] Kadar, E.; Cunliffe, M.; Fisher, A.; Stolpe, B.; Lead, J.; Shi, Z. Chemical interactio of atmospheric mineral dust-derived nanoparticles with natural seawater – EPS and sunlight mediated changes. *Sci. Total. Environ*. 2014, **468-469**, 265-271.

[90] Hung, A.; Mwenifumbo, S.; Mager, M.; Kuna, J.J.; Stellacci, F.; Yarovsky, I.; Stevens, M.M. Ordering surfaces on the nanoscale: implications for protein adsorption. *J. Am. Chem. Soc*. **2011**, 133, 1438-1450.

[91] Laera, S.; Ceccone, G.; Rossi, F.; Gilliland, D.; Hussain. R.; Siligardi, G.; Calzolai, L. Measuring protein structure and stability of protein – nanoparticle systems with synchrotron radiation circular dichroism. *Nano Lett*. **2011**, 11, 4480-4484.

[92] Capomaccio, R.; Ojea Jimenez, I.; Colpo, P.; Gilliland, D.; Ceccone, G.; Rossi, F.; Calzolai, L. Determination of the structure and morphology of gold nanoparticle – HSA protein complexes. *Nanoscale* **2015**, 7, 17653-17657.

[93] Cedervall, T.; Lynch, I.; Lindman, S.; Bergård, T.; Thulin, E.; Nilsson, H.; Dawson, K.A.; Linse, S. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, 104, 2050-2055.

[94] Lundqvist, M; Stigler, J.; Elia, G.; Lynch, I.; Cedervall, T.; Dawson, K.A. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, 105, 14265-14270.

[95] Monopoli, M.P.; Baldelli-Bombelli, F.; Dawson, K.A.; Nanoparticle coronas take shape, *Nat. Nanotechnol*. **2011**, 6, 11-12.

[96] Selva Sharma, A.; Ilanchelian, M. Comprehensive Multispectroscopic analysis on the interaction and corona formation of human serum albumin with gold/silver alloy nanoparticles. *J. Phys. Chem. B.* **2015**, 119, 9461-6476.

[97] Gebauer, J.S.; Malissek, M.; Simon, S.; Knauer, S.K.; Maskos, M.; Stauber, R.H.; Peukert, W.; Treuel, L. Impact of the Nanoparticle-Protein Corona on Colloidal Stability and protein structure. *Langmuir* **2012**, 28, 9673-9679.

[98] Satzer, P.; Svec, F.; Sekot, G.; Jungbauer, A. Protein adsorption onto nanoparticles induces onformational changes: particle size dependency, kinetics, and mechanisms. *Eng. Life Sci.* **2016**,16, 238-246.

[99] Sánchez-Pérez, J.A.; Gallardo-Moreno, A.M.; González-Martín,Vadillo-Rodríguez, V. BSA adsorption onto nanospheres: influence of surface curvature as probed by electrophoretic light scattering and UV/VIS spectroscopy. *Appl. Surf. Sci.* **2015**, 353, 1095-1102.

[100] Kittler, S.; Greulich, C.; Diendorf, J.; Köller, M.; Epple, M. Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. *Chem. Mater*. **2010**, 22, 4548-4554.

[101] Liu, J.; Hurt, R.H. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. Environ. *Sci. Tehnol.* **2010**, 44, 2169-2175.

[102] Zhang, Q.; Yao, Y.; Sullivan, N.; Chen, Y. Modelling the primary size effects of citrate-coated silver nanoparticles on their ion release kinetics, *Environ. Sci. Technol*. **2011**, 45, 4422-4428.

[103] Chen, S.F.; Zhang, H.; Lin, Q.L. Effect of different water conditions on dissolution of nanosilver. *Water Sci. Technol.* **2013**, *68(8)*, 1745-1750.

[104] Wurl, O.; Wurl, E.; Miller, K.; Johnson, K.; Vagle, S. Formation and global distribution of sea-surface microlayers. *Biogeosciences* **2011**, 8, 121-135.

[105] Satpute, S.K.; Banat, I.M.; Dhakephalkar, P.K.; Banpurkar, A.G.; Chopade, B.A.; Biosurfactants, bioemulsifiers, and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnol. Adv*. **2010**, 28(4), 436-450.

[106] Žutić, V.; Ćosović, B.; Marčenko, E.; Bihari, N. Surfactant production by marine phytoplankton. *Mar. Chem*. **1981**, 10, 505-520.

[107] Kujawinski, E.; Farrington, J.; Moffett, J. Evidence for grazing-mediated production of dissolved surface-active material by marine protists. *Mar. Chem*. **2002**, 77, 133-142.

[108] Frka, S.; Kozarac, Z.; Ćosović, B.; Characterization and seasonal variations of surface active substances in the natural sea surface micro-layers of the coastal Middle Adriatic stations. *Estuar. Coast. Mar. Sci.* **2009**, 85(4), 555-564.

[109] Perreira, R.; Schneider-Zapp, K.; Upstil-Goddard, R.C. Surfactant control of gas transfer velocity along an offshore coastal transect, results from a laboratory gas, exchange tank. *Biogeosciences* **2016**, 3981-3989.

[110] Hedberg, J.; Lundin, M.; Lowe, T.; Blomberg, E.; Wold, S.; Odnevall Wallinder, I. Interactions between surfactants and silver nanoparticles of varying charge. *J. Colloid Interf. Sci*. **2012**, 93-201.

[111] Bae, E.; Park, H.-J.; Park, J.; Yoon, J.; Kim, Y.; Choi, K.; Yi, Y. Effect of chemical stabilizers in silver nanoparticle suspensions on nanotoxicity. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2011**, 32(2), 613-619.

[112] Skoglund, S.; Lowe, T.A.; Hedberg, J.; Blomberg, E.; Wallinder, I.O.; Wold, S.; Lundin, M. Effect of laundry surfactants on surface charge and colloidal stability of silver nanoparticles. *Langmuir* **2013**, 29, 8882-8891.

[113] Li, X.; Yoneda, M.; Shimada, Y.; Matsui, Y. Effect of surfactants on the aggregation and stability of TiO_2 nanomaterial in environmental aqueous matrices. *Sci. Total Environ.* **2017**, 574, 176-182.

[114] Quik, J.T.K.; Stuart, M. C.; Wouterse, M.; Peijnenburg, W.; Hendriks, A.J.; van de Meent, D. Natural colloids are the dominant factor in the sedimentation of nanoparticles. Environ. Toxicol. Chem. **2012**, 5, 1019-1022.

[115] Zhou, D.; Abdel-Fattah, A.I.; Keller, A.K. Clay particles destabilize engineered nanoparticles in aqueous environments. Environ. Sci. Technol. 2012, 46, 7520-7526.

[116]] Liu, J. Heteroaggregation of silver nanoparticles with clay minerals in aqueous system. Doktorski rad, The Ohio State University, Columbus, OH, 2014.

[117] Preočanin, T.; Kallay, N. Point of zero charge and surface charge density of TiO_2 in aqueous electrolyte solutions as obtained by potentiometric mass titration. *Croat. Chem. Acta* **2006**, 79(1), 95-106.

[118] Furukawa, Y.; Watkins, J.L.; Kim, J.; Curry, K.J.; Bennett, R.H. Aggregation of montmorillonite and organic matter in aqueous media containing artificial seawater. *Geochem. Trans.* **2009**, 10(2), doi:10.1186/1467-4866-10-2.

[119] Khaksar, M.; Jolley, D.F.; Sekine, R.; Vasilev, K.; Johannessen, B.; Donner, E.; Lombi, E. In situ chemical transformations of silver nanoparticles along the water-sediment continuum. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, 49, 318-325.

[120] https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/t8532pis.pdf, pristupljeno 30.3.2020.

[121] https://www.serva.de/enDE/294_Information_Center_Detergents_Non_ionic_Detergents_TWEEN_reg_20.html, pristupljeno 28.3.2020.

[122] https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/p8074pis.pdf

[123] Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, 11, 55-75.

[124] Burić, P. Utjecaj srebrnih nanočestica na morske beskralježnjake: biološki učinci na modelima dagnje i ježinaca. Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2018.

[125] Andersen, R.A.; Berges, J.A.; Harrison, P.J.; Watanabe, M.M. Apendix A – Recipes for freshwater and seawater media. U: Robert A. Andersen, ur. Algal Culturing Techniques. Academic Press; 2004. Str. 429-532.

[126] Henson, M.W.; Pitre, D.M.; Weckhorst, J.L.; Lanclos, V.C.; Webber, A.T.; Thrash, J.C. Artificial Seawater Media Facilitate Cultivating members of the microbial majority from the Gulf of Mexico. *mSphere* **2007**, 1(2), doi: 10.1128/mSphere.00028-16.

[127] Lewis, G.N.; Randall, M. The activity coefficient of strong electrolytes. *J. Am. Chem. Soc.* **1921**, 43(5), 1112-1154.

[128] Shih, Y.-C.; Ke, C.-Y.; Yu, C.-J.; Lu, C.-Y.; Tseng, W.-L. Combined tween20-stabilized gold nanoparticles and reduced graphite oxide-Fe3O4 nanoparticle composites for rapid and efficient removal of mercury species from a complex matrix. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6(20), 17437-17445.

[129] Lodeiro, P.; Browning, T.J.; Acheterberg, E.P.; Guillou, A.; El-Shahawi, M.S. Mechanisms of silver nanoparticle toxicity to the coastal marine diatom *Chaetoceros curvisetus*. *Sci. Rep*. 2017, 7, 10777.

[130] Zhao, Y.; Wang, Z.; Zhang, W.; Jiang, X. Adsorbed Tween 80 is unique in its ability to improve the stability of gold nanoparticles in solutions of biomolecules, *Nanoscale* **2010**, 2, 2114-2119.

[131] Bodratti, A.M.; Alexandridis, P. Formulation of poloxamers for drug delivery. *J. Funct. Biomater.* **2018**, 9(11), doi: 10.3390/jfb9010011

[132] Lai, Jr.-I.; Kurikka, V.P.M.; Shafi, Ulman, A.; Loos, K.; Lee, Y.; Vogt, T.; Lee, W.-L.; Ong, N.P.; Controlling the size of magnetic nanoparticles using pluronic block copolymer surfactants, *J. Phys. Chem. B.* **2005**, 109, 1, 15-18.

[134] Koley, D.; Bard, A. J. Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM) . PNAS 2010, 107(39), 16783-16787.

[135] Frømyr, T.R.; Hansen, F.K.; Olsen, T. The optimum dispersion of carbon nanotubes for epoxy nanocomposites: evolution of the particle size distribution by ultrasonic treatment. *J. Nanotechnol.* **2012**, doi: 10.1155/2012/545930.

[136] Li, X.; Zhong, H.; Zhang, J.; Duan, Y.; Bai, H.; Li, J.; Jiang, D. Dispersion and properties of zirconia suspensions for stereolitography. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* **2019**, 00, 1-9. doi: 10.1111/ijac.13321.

[131 sad 137] UNESCO, 1983. Algorithms for computation of fundamental properties of seawater, UNESCO Technical Papers in Marine Science, 44, str.53.

[138] Bradford, M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248–254.

[139] Sikder, M.; Lead, J.R.; Chandler, T.; Baalousha, M. A rapid approach for measuring silver nanoparticle concentration and dissolution in seawater by UV-VIS. *Sci. Total Environ*. **2018**, *618*, 597-607.

[140] Paramelle, D.; Sadovoy, A.; Gorelik, S.; Free, P.; Hobley, J.; Fernig, D.G. Rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-Visible light spectra. *Analyst* 2014, 139, 4855-4861.

[141] Pamies, R.; Hernandéz Cifre, J.G.; Fernández Espín, V.; Collado-González, M.; Díaz Baños, F.G.; García de la Torre, J. Aggregation behaviour of gold nanoparticles in saline aqueous media. *J . Nanoparticle Res.* **2014**, 16:2376, doi: 10.1007/s11051-014-2376-4.

[142] Widrat, M.; Schneck, E.; Reichel, V.; Baumgartner, J.; Bertinetti, L.; Habraken, W.; Bente, K.; Fratzl, P.; Faivre, D. Combined experimental and theoretical approach to the kinetics of mangetite crystal growth from primary particles. *J. Phys. Chem. Lett*. **2017**, 8, 1132.

[143] Akter, M.; Sikder, Md. T.; Rahman, Md. M.; Atique Ullah, A.K.M.; Hossain, K.F.B.H.; Banik, S.; Hosokawa, T.; Saito, T.; Kurasaki, M. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: physicochemical properties and perspectives. *J. Adv. Res.* **2018**, 9, 1-16.

[144] Dong, Y.; Zhu, H.; Shen, Y.; Zhang, W.; Zhang, L. Antibacterial activity of silver nanoparticles of different particle size agains Vibrio Natriegens. *Plos One* **2019**, 14(9), doi: 10.1371/journal.pone.0222322.

[145] Zhang, Q.; Li, N.; Goebl, J.; Lu, Z.; Yin, Y. A systematic study of the synthesis of silver nanoplates: is citrate a „magic“ reagent? *JACS* **2011**, 133, 18931-18939.

[146] Alastair, M.; Andrew, H.; Pascaline, P.; Mark, E.; Pete, W. Alkali activation behaviour of un-calcined montmorillonite and illite clay minerals. *Appl. Clay Sci*. **2018**, 166, 250-261.

[147] Kretz, R. Symbols of rock-forming minerals. *Am. Mineral.* 1983, 68, 277-279.

[148] Pikelj, K.; Jakšić, L.; Aščić, Š.; Juračić, M. Characterization of the fine-grained fraction in the surface sediment of the eastern Adriatic channel areas. *Acta Adriatica* **2016**, 57(2), 195-208.

[149] Madejová, J.; Komadel, P. Baseline studies of the clay minerals society source clays: infrared methods, *Clays Clay Miner*. **2001**, 49(5), 410-432.

[150] Vaculíková, L. i Plevová, E. Identification of clay minerals and micas in sedimentary rocks. *Acta Geodyn. Geomater*. **2005**, 2(2), 167-175.

[151] Eng, C.C.; Ibrahim, N.A.; Zainuddin, N.; Ariffin, H.; Yunus, W.Md.Z.W.; Then, Y.Y.; Teh, C.C. Enhancement of mechanical and thermal properties of polylactic acid/polyprolactone blends by hydrophilic nanoclay. *Indian J. Eng. Mat. Sci*. **2013**, doi: 10.1155/2013/816503

[152] Caccamo, M.T.; Mavilia, G.; Mavilia, L.; Lombardo, D.; Magazú, S. Self-assembly processes in hydrated montmorillonite by FTIR investigations, Materials 2020, 13, doi: 10.3390/ma13051100.

[153] https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/nanomaterials/silver-nanoparticles.html

[154] Giancola, C.; De Sena, C.; Fessas, D.; Graziano, G.; Barone, G. DSC studies on bovine serum albumin denaturation, effects of ionic strength and SDS concentration. *Int. J. Biol. Macromol.* **1997**, 20, 193-204.

[155] Tsai, D.-H.; DelRio, F.W.; Keene, A.M.; Tyner, K.M.; MacCuspie, R.; Cho, T.J.; Zachariah, M.R.; Hackley, V.A. Adsorption and conformation of serum albumin protein on gold nanoparticles investigated using dimensional measurements and in situ spectroscopic methods. *Langmuir* **2011**, 27, 2464-2477.

[156] Calzolai, L.; Franchini, F.; Gilliland, D.; Rossi, F. Protein-nanoparticle interaction: identification of ubiquitin-gold nanoparticle interaction site. *Nano Lett.* **2010**, 10, 3101-3105.

[157] Zhang, F.; Skoda, M.W.A.; Jacobs, R.M.J.; Martin, R.A.; Martin, C.M.; Schreiber, F. Protein interactions studied by SAXS: effect of ionic strength and protein concentrations for BSA in aqueous solutions. *J. Phys. Chem. B.* **2007**, 111, 251-259.

[158] Peters, T.Jr. All about Albumin, Biochemistry, Genetics, and medical applications, Academic Press, San Diego, 1996. Str 9.-132.

[159] Goy-Lopéz, S.; Juárez, J.; Alatorre-Meda, M.; Casals, E.; Puntes, V.F.; Taboada, P.; Mosquera, V. Physicochemical characteristics of protein-NP bioconjugates: the role of particle curvature and solution conditions on human serum albumin conformation and fibrillogenesis inhibition. *Langmuir* **2012**, 28(24), 9113-9126.

[160] Lundqvist, M.; Sethson, I.; Jonsson, B.-H. Protein adsorption onto silica nanoparticles: conformational changes depend on the particles curvature and the protein stability. *Langmuir* **2014**, 20, 10639-10647.

[161] Dominguez-Medina, S.; Blankenburg, J.; Olson, J.; Landes, C.F.; Link, S. Adsorption of a protein monolayer via hydrophobic interactions prevents nanoparticle aggregation under harsh environmental conditions. *ACS Sustain. Chem. Eng*. **2013**, *1*, 833−842.

[162] Kirchman, D.L.; Henry, D.L.; Dexter, S.C. (1989) Adsorption of proteins to surfaces in seawater. *Mar. Chem.* **27**, 201-207.

[163] Open University Course Team, Seawater: Its Composition, properties and behaviour, Second Edition, Butterworth-Heinmann, Singapur, 1995. Str.29.

[164] Lipizer, M.; Partescano, E.; Rabitti, A.; Giorgetii, A.; Crise, A. Qualified temperature, salinity, and dissolved oxygen climatologies in a changing Adriatic Sea. *Ocean Sci*. **2014**, 10, 771-797., doi: 10.5194/os-10-771-2014.

[165] Westgate, P.J.; Park, C. Evaluation of proteins and organic nitrogen in wastewater treatmen effluents. *Environ. Sci. Technol*. **2010**, 44, 5352-5357.

[166] Moore, E.K.; Nunn, B.L.; Goodlett, D.R.; Harvey H.R. Identifying and tracking proteins through the marine water column: insights into the inputs and preservation mechanisms of proteins in sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 2012, 83, 324-359.

[167] Zaman, M.; Ahmad, E.; Qadeer, A.; Rabbani, G.; Khan, R.H. Nanoparticles in relation to peptide and protein aggregation. *Int. J. Nanomedicine* **2014**, 9, 899-912.

[168] Li, X.; Lenhart, J.J.; Walker, H.W. Dissolution-accompanied kinetics of silver nanoparticles. *Langmuir* **2012**, 26(22), 16690-16698.

[169] Boehmler, D.J.; O'Dell, Z.J.; Chung, C.; Riley, K.R. Bovine serum albumin enhances silver nanoparticle dissolution kinetics in a size- and concentration dependent manner. Langmuir 2020, 36(4), 1053-1061.

[170] Magesky, A.; Pelletier, É. Cytotoxicity and physiological effects of silver nanoparticles on marine invertebrates. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2018**, 1048, 285-309.

[171] Canesi, L.; Ciacci, C.; Fabbri, R.; Balbi, T.; Salis, A.; Damonte, G.; Cortese, K.; Caratto, V.; Monopoli, M.P.; Dawson, K.; Bergami, E.; Corsi, I. Interactions of cationic polystyrene nanoparticles with marine bivalve hemocytes in a physiological environment: role of soluble hemolymph proteins. *Environ. Res.* 2016, 150, 73-81.

[172] Alijagic, A.; Benada, O.; Kofroňova, O.; Cigna, D.; Pinsino, A. Sea urchin extracellular proteins design a complex protein corona on titanium dioxide nanoparticle surface influencing immune cell behavior. *Front. Immunol*. 2019, 10:2261, doi: 10.3389/fimmu.2019.02261

[173] Grassi, G.; Landi, Cl; Della Torre, C.; Bergami, E.; Bini, L.; Corsi, I. Proteomic profile of the hard corona of charged polystyrene nanoparticles exposed to sea urchin *Paracentrotus lividus* coelomic fluid highlights potential drivers of toxicity. *Environ. Sci. Nano* 2019, 6, 2937-2947.

[174] Keil, R.G.; Kirchman, D.L. Utilization of dissolved protein and amino acids in the northern Sargasso Sea. *Aquat. Microb. Ecol*. **1999**, 18, 293-300.

[175] dos Santos, C.A.; Jozala, A.F.; Pessoa, A.; Seckler, M.M. Antimicrobial efectiveness of silver nanoparticles co-stabilized by the bioactive copolymer pluronic F68. *J. Nanobiotechnol*. **2012**, 10(43), doi: 10.1186/1477-3155-10-43.

[176] Holden, M.S.; Nick, K.E.; Hall, M.; Milligan, J.R.; Chen, Q.; Perry, C.C. Synthesis and catalytic activity of pluronic stabilized silver-gold bimetallic nanoparticles. *RSC Adv*. **2014**, 4(94), 52279-52288.

[177] Angelescu, D.G.; Vasilescu, M.; Anastasescu, M.; Baratoiu, R.; Donescu, D.; Teodorescu, V.S. Synthesis and association of Ag(0) nanoparticles in aqueous Pluronic F-127 triblock copolymer solutions. Coll. Surf. A. 2012, 394, 57-66.

[178] Cataliotti, R.S.; Aliotta, F.; Ponterio, R. Silver nanoparticles behave as hydrophobic solutes towards the liquid water structure in the interaction shell. A Raman study in the O-H streching region. *Phys. Chem. Chem. Phys*. **2009**, 11, 11258-11263.

[179] Valsesia, A.; Desmet, C.; Ojea-Jimenez, I.; Oddo, A.; Capomaccio, R.; Rossi, F. Colpo, P. Direct quantification of nanoparticle surface hydrophobicity. *Commun. Chem*. **2018**, 1 (53), doi:10.1038/s42004-018-0054-7.

[180] Cao, Z.; Tsai, S.N.; Zuo, Y.Y. An optical method for quantitatively determining the surface fre[181 novo] Shon, Y.-S.; Chuc, S.; Voundi, P. Stability of tetraoctylammonium bromide-protected gold nanoparticles: effects of anion treatments. *Coll. Surf. A* **2009**, 12-17.

[181] Shon, Y.-S.; Chuc, S.; Voundi, P. Stability of tetraoctylammonium bromide-protected gold nanoparticles: effects of anion treatments. *Coll. Surf. A* **2009**, 12-17.

[182] Pal, A.; Yadav, S. Effect of copolymer poly(4-styrenesulfonic acid-co-maleic acid) sodium salt on aggregation behaviour of imidazolium based surface active ionic liquid in aqueous solution. *J. Mol. Liq*. **2017**, 342-349.

[183] Wang, J.; Wang, W.-X. Salinity influences on the uptake of silver nanoparticles and silver nitrate by marine medaka (Oryzias melastigma). Environ. Toxicol. Chem. 2014, 33(3), 632-640.

[184] Liu, J.; Hwang, Y.S.; Lenhart, J.J. Heteroaggregation of bare silver nanoparticles with clay minerals. *Environ. Sci. Nano* **2015**, 2, 528-540.

[185] Zhang. W.; Qiao, X.; Qui, X.; Chen, Q.; Cai, Y.; Chen, H.; Controllable synthesis and Ostwald ripening of silver nanoparticles. *Curr. Nanosci.* **2013**, 9(6), 10.2174/1573413711309060012.

[186] Mathews, R.G.; Donald, A.M. Conditions for imaging emulsions in the environmental scanning electron microscope. *Scanning* **2012**, 75-85.

[187] Gosh, V.; Mukherjee, A.; Chandrasekaran, N. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. *Ultrasonics Sonochemistry* **2013**, 20, 338-344.

[188] Kirsch, Y.E. Water soluble Poly-N-Vinylamides, Synthesis and physicochemical properties. John Wiley and Sons, New York, SAD, 1998. Str. 130-132.

[189] Arndt, S.; Jørgensen, B.B.; LaRowe, D.E.; Middelburg, J.J.; Pancost, R.D.; Regnier, P. Quantifying the degradation of organic matter in marine sediments: A review and synthesis. *Earth-Sci. Rev.* **2013**, 53-86.

[190] Barber, A.; Brandes, J.; Leri, A.; Lalonde, K.; Balind, K.; Wirick, S.; Wang, J.; Gélingas, Y. Preservation of organic matter in marine sediments by inner-sphere interactions with reactive iron. Sci. Rep. 2017, 7:366, doi: 10.1038/s41598-017-00494-0.

[191] Borm, P.; Klaessig, F.C.; Landry, T.D.; Moudgil, B.; Pauluhn, J.; Thomas, K.; Trotier, R.; Wood, S. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part V: role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles. *Toxicol. Sci.* **2006**, 90(1), 23-32.

[192] Smolinske, S.C.; Handbook of Food, Drug and cosmetic excipients, CRC Press, Denver, Colorado, USA, 1992. 295-296.

[193] Aslan, K.; Pérez-Luna, V.H. Surface modification of colloidal gold by chemisorption of alkanethiols in the presence of a nonionic surfactant. *Langmuir* **2002**, 18, 6059-6065.

10. ŽIVOTOPIS

10. Životopis

Maja Levak Zorinc rođena je u Zagrebu, 1. listopada 1988. godine. Osnovnu školu završila je u Velikom Trojstvu pokraj Bjelovara, a prirodoslovno – matematičku gimanaziju u Bjelovaru, 2007. godine. Iste godine upisuje se na Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, na smjer Kemija i inženjerstvo materijala gdje i diplomira 2013. godine s radom naziva: „Kinetika toplinske razgradnje polimernih mješavina PS/HDPE s dodatkom kompatibilizatora“ pod vodstvom dr.sc. Emi Govorčin Bajsić. 2015. godine zapošljava se u Centru za istraživanje mora, na projektu „SMART-NANO (*Sensitive MeAsuRemenT, detection, and identification of engineered NANOparticles in complex matrices*). Ujedno upisuje i doktorat iz Oceanologije pod vodstvom dr.sc. Željka Jakšića, kao doktorand Hrvatske Zaklade za Znanost. Autor je jednog prvoautorskog članka.

Znanstveni radovi

Trifuoggi, Marco; Pagano, Giovanni; Guida, Marco; Palumbo, Anna; Siciliano, Antonietta; Gravina, Maria; Lyons, Daniel Mark; Burić, Petra; Levak, Maja; Thomas, Philippe J. et al.
Comparative toxicity of seven rare earth elements in sea urchin early life stages. // Environmental science and pollution research international, 24 (2017), 25; 20803-20810 doi:10.1007/s11356-017-9658-1 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Levak, Maja; Burić, Petra; Dutour Sikirić, Maja; Domazet Jurašin, Darija; Mikac, Nevenka; Bačić, Niko; Drexel, Roland; Meier, Florian; Jakšić, Željko; Lyons, Daniel Mark
Effect of protein corona on silver nanoparticle stabilization and ion release kinetics in artificial seawater. // Environmental science & technology, 51 (2017), 3; 1259-1266 doi:10.1021/acs.est.6b03161 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Sažeci u zbornicima i časopisima

Burić, Petra; Levak, Maja; Perić, Lorena; Kovačić, Ines; Pavičić-Hamer, Dijana; Lyons, Daniel Mark
The use of selected marine organisms in nanoecotoxicology: experiments on mussels, sea urchins and crabs. // Book of Abstracts / Matović, Vesna (ur.).
Beograd: Dosije studio, 2018. str. 77-77 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Lyons, Daniel Mark; Burić, Petra; Levak, Maja; Pavičić-Hamer, Dijana; Manzo, Sonia; Schiavo, Simona; Oliviero, Maria; Khodaparast, Zahra; Galante-Oliveira, Susana; Barroso, Carlos et al.
From wastewaters to estuaries and coastal waters – entry pathways and effects of engineered

nanoparticles on brackish and marine organisms. // Proceedings of the Final Conference of COST Action ES1205 / Duester, Lars (ur.).Aveiro, 2017. str. 28-30 (pozvano predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Burić, Petra; Levak, Maja; Pavičić-Hamer, Dijana; Lyons, Daniel Mark
Sensitivity to different sizes of silver nanoparticles in the early life stages of two Mediterranean sea urchins Arbacia lixula (Linnaeus, 1758) and Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816). // Archives of Industrial Hygiene and Toxicology
Durgo, Ksenija ; Pavlaković, Željana ; Herman, Makso: Institute for Medical Research and Occupational Health, 2016. str. 32-32 (predavanje, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)

Levak, Maja; Burić, Petra; Pavičić-Hamer, Dijana; Lyons, Daniel Mark
Effect of BSA coated-silver nanoparticles on the embryonal development of Mediterranean sea urchin Paracentrotus lividus. // Archives of Industrial Hygiene and Toxicology / Durgo, Ksenija ; Pavlaković, Željana ; Herman, Makso (ur.).
Zagreb: Institute for Medical Research and Occupational Health, 2016. str. 32-32 (predavanje, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)

Lyons, Daniel Mark; Levak, Maja; Burić, Petra; Domazet Jurašin, Darija; Dutour Sikirić, Maja; Mikac, Nevenka; Meier, Florian; Welz, Roland
Effect of surface coating on nanoparticle stability and fate in high strength electrolytes – silver nanoparticles in marine waters. // Book of Abstracts
Nantes, 2016. str. 117-117 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Levak, Maja; Burić, Petra; Domazet Jurašin, Darija; Dutour Sikirić, Maja; Calzolai, Luigi; Lyons, Daniel Mark
Evaluation of AF4 for the fractionation of protein-coated silver nanoparticles in artificial seawater. // Book of Abstracts
Beč, Austrija, 2016. str. xx-xx (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)