



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ



Јелена С. Стојановић

**Примена хистопатолошких промена као
потенцијалних биомаркера у акватичној
екотоксикологији за процену токсичног ефекта
наночестица на модел организму *Chironomus
riparius***

Докторска дисертација

Ниш, 2024.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS



Jelena S. Stojanović

**Application of histopathological changes as potential
biomarkers in aquatic ecotoxicology assessment of
nanoparticle toxic effect on model organism**

Chironomus riparius

Doctoral dissertation

Niš, 2024.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:	Др Ђурађ Милошевић, ванредни професор на Департману за биологију и екологију, Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу
Наслов:	Примена хистопатолошких промена као потенцијалних биомаркера у акватичној екотоксикологији за процену токсичног ефекта наночестица на модел организму <i>Chironomus riparius</i>
Резиме:	<p>Акватичне средине су највећи сакупљачи отпада који ту доспева директно, бацањем и отпуштањем отпада, или индиректно, спирањем земљишта, наношењем путем ветра итд. Овакво стање повлачи за собом и потребу за истраживањима која би допринела бољем разумевању токсичности појединачних загађивача али и осмишљавању најбољих механизма за процену ризика и дефинисању смерница и закона о управљању отпадом.</p> <p>Као модел организам у овој дисертацији коришћен је <i>Chironomus riparius</i>, код кога је хистолошком анализом најпре описана нормална морфологија ткива дигестивног и екскреторног система, као и масног ткива.</p> <p>За испитивање токсичности наночестица оксида метала (TiO_2, CeO_2, Fe_3O_4), LCFA и МП коришћен је мулти-биомаркер приступ. Најпре је урађена карактеризација свих испитиваних честица како би се добило више информација о њима. Наночестице оксида метала и МП су већ описане у претходним истраживањима па је овде оригинално урађена карактеризација честица LCFA.</p> <p>У акутном тесту са наночестицама оксида метала највећи токсични потенцијал поседовао је нано-Fe_3O_4 који је изазвао интензивну вакуолизацију региона I средњег црева и Малпигијевих цевчица. Нано-CeO_2 изазвао је благу вакуолизацију Малпигијевих цевчица. Нано-TiO_2 довео је до ремоделације масног ткива и епитела црева. Анализом суб-индивидуалних биомаркера у хроничном тесту уочено је да наночестице оксида метала и МП могу утицати на ензиме оксидативног стреса, док су се нано-CeO_2 и нано-Fe_3O_4 показале и као генотоксичне. LCFA честице су утицале на скоро све испитиване параметре.</p>

Дужина микровила се показала као параметар који има снажан потенцијал да постане хистопатолошки биомаркер који се може у будућности користити у екотоксиколошким студијама.

Научна област:

Биологија

Научна
дисциплина:

Биологија ћелија и ткива и екотоксикологија

Кључне речи:

Chironomus riparius, хистологија, биомаркери, екотоксикологија, наночестице, микропластика, оксиди метала, генотоксичност, оксидативни стрес, хемоглобин, OECD протоколи, микровили

УДК:

[616-091.8+615.9]:597.7(043.3)

CERIF
класификација:

В 003 Екологија; В 210 Хистологија, цитохемија, култура ткива

Тип лиценце
Креативне
заједнице:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

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

Title: Application of histopathological changes as potential biomarkers in aquatic ecotoxicology assessment of nanoparticle toxic effect on model organism *Chironomus riparius*

Abstract:

The aquatic environment is the largest collector of waste, which enters it directly, through dumping and releasing waste, or indirectly, through soil runoff, and wind deposition. This implies the need for detailed research that would contribute to a better understanding of individual pollutant toxicity as well as designing the best mechanisms for risk assessment and defining guidelines and laws on waste management.

In this dissertation, *Chironomus riparius* was used as a model organism, with histological analysis initially used to describe the normal morphology of the digestive and excretory systems, as well as adipose tissue.

A multi-biomarker approach was used for detecting the toxicity of metal-oxide nanoparticles (TiO₂, CeO₂, Fe₃O₄), LCFA, and MP. First, the characterization of the tested particles was done in order to get more information about them. Metal-oxide nanoparticles and MP were described in previous studies, so the original characterization of LCFA particles was done in the dissertation.

An acute test with metal-oxide nanoparticles revealed the high toxicity of nano-Fe₃O₄ that caused intensive vacuolization of the midgut region I and Malphigian tubules. Nano-CeO₂ caused mild vacuolization of Malphigian tubules. Nano-TiO₂ provoked the remodeling of fat body tissue and gut epithelium. By analyzing sub-organismal biomarkers in chronic tests, it was revealed that metal oxide nanoparticles and MP have the potential to affect oxidative stress enzymes, while nano-CeO₂ and nano-Fe₃O₄ have also been shown to be genotoxic. LCFA particles affected almost all analyzed parameters.

Microvilli length has been shown to be a parameter that has a strong potential to become a histopathological biomarker that can be used in ecotoxicological studies in the future.

--

Scientific
Field:

Biology

Scientific
Discipline:

Cell and tissue biology and ecotoxicology

Key Words:

Chironomus riparius, histology, biomarkers, ecotoxicology, nanoparticles, microplastic, metal oxides, genotoxicity, oxidative stress, hemoglobin, OECD protocols, microvilli

UDC:

[616-091.8+615.9]:597.7(043.3)

CERIF
Classification:

B 003 Ecology; B 210 Histology, cytochemistry, histochemistry, tissue culture

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND

МЕНТОР:

Др Ђурађ Милошевић, ванредни професор

Департман за биологију и екологију, Природно-математички факултет, Универзитет у Нишу

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

Др Александра Зарубица, редовни професор

Департман за хемију, Природно-математички факултет, Универзитет у Нишу

Др Јелена Виторовић, ванредни професор

Департман за биологију и екологију, Природно-математички факултет, Универзитет у Нишу

Др Маргарета Крачун-Коларевић, виши научни сарадник

Департман за Хидрологију и заштиту вода, Институт за Биолошка Истраживања „Синиша Станковић“, Национални Институт Републике Србије, Универзитет у Београду

Др Димитрија Савић-Здравковић, научни сарадник

Департман за биологију и екологију, Природно-математички факултет, Универзитет у Нишу

Датум одбране _____



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Јелена С. Стојановић
Ментор, МН:	Ђурађ Милошевић
Наслов рада, НР:	Примена хистопатолошких промена као потенцијалних биомаркера у акватичној екотоксикологији за процену токсичног ефекта наночестица на модел организму <i>Chironomus riparius</i>
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2024.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО: <small>(поглавља/страница/ цитата/табела/слика/графика/прилога)</small>	8 поглавља, 159 стр., 8 прилога, 13 табела, 32 слике
Научна област, НО:	Биологија
Научна дисциплина, НД:	Биологија ћелија и ткива и екотоксикологија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	<i>Chironomus riparius</i> , хистологија, биомаркери, екотоксикологија, наночестице, микропластика, оксиди метала, генотоксичност, оксидативни стрес, хемоглобин, OECD протоколи, микровили
УДК	[616-091.8+615.9]:597.7(043.3)
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	/

Извод, ИЗ:	<p>Акватичне средине су највећи сакупљачи отпада који ту доспева директно бацањем и отпуштањем отпада или индиректно, спирањем земљишта, наношењем путем ветра итд. Овакво стање повлачи за собом и потребу за истраживањима која би допринела бољем разумевању токсичности појединачних загађивача али и осмишљавању најбољих механизма за процену ризика и дефинисању смерница и закона о управљању отпадом.</p> <p>Као модел организам у овој дисертацији коришћен је <i>Chironomus riparius</i>, код кога је хистолошким анализом најпре описана нормална морфологија ткива дигестивног и екскреторног система, као и масног ткива.</p> <p>За испитивање токсичности наночестица оксида метала (TiO_2, CeO_2, Fe_3O_4), LCFA и МП коришћен је мулти-биомаркер приступ. Најпре је урађена карактеризација свих испитиваних честица како би се добило више информација о њима. Наночестице оксида метала и МП су већ описане у претходним истраживањима па је овде оригинално урађена карактеризација честица LCFA.</p> <p>У акутном тесту са наночестицама оксида метала највећи токсични потенцијал поседовао је нано-Fe_3O_4 који је изазвао интензивну вакуолизацију региона I средњег црева и Малпигијевих цевчица. Нано-CeO_2 изазвао је благу вакуолизацију Малпигијевих цевчица. Нано-TiO_2 довео је до ремоделације масног ткива и епитела црева. Анализом суб-индивидуалних биомаркера у хроничном тесту уочено је да наночестице оксида метала и МП могу утицати на ензиме оксидативног стреса, док су се нано-CeO_2 и нано-Fe_3O_4 показале и као генотоксичне. LCFA честице су утицале на скоро све испитиване параметре.</p> <p>Дужина микровила се показала као параметар који има снажан потенцијал да постане хистопатолошки биомаркер који се може у будућности користити у екотоксиколошким студијама.</p>
Датум прихватања теме, ДП:	08.11.2021.
Датум одбране, ДО:	
Чланови комисије,	Председник:
	Члан:
	Члан:
	Члан:
	Члан, ментор:

Образац Q4.09.13 - Издање 1



ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Jelena S. Stojanović
Mentor, MN :	Đurađ Milošević
Title, TI :	Application of histopathological changes as potential biomarkers in aquatic ecotoxicology assessment of nanoparticle toxic effect on model organism <i>Chironomus riparius</i>
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2024
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradaska 33.
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	8 chapters, 159 pages, 8 appendixes, 13 tables, 32 pictures
Scientific field, SF :	Biology
Scientific discipline, SD :	Cell and tissue biology and ecotoxicology
Subject/Key words, S/KW :	<i>Chironomus riparius</i> , histology, biomarkers, ecotoxicology, nanoparticles, microplastic, metal oxides, genotoxicity, oxidative stress, hemoglobin, OECD protocols, microvilli
UC	[616-091.8+615.9]:597.7(043.3)
Holding data, HD :	library
Note, N :	/

<p>Abstract, AB:</p>	<p>Aquatic environments serve as a sink for waste, which can reach it through various ways such as direct throwing, release, precipitation, or wind. This implies the need for detailed research that would contribute to a better understanding of individual pollutant toxicity as well as designing the best mechanisms for risk assessment and defining guidelines and laws on waste management.</p> <p>In this dissertation, <i>Chironomus riparius</i> was used as a model organism, where histological analysis was first used to describe the normal morphology of the digestive and excretory systems, as well as adipose tissue.</p> <p>A multi-biomarker approach was used for detecting the toxicity of metal-oxide nanoparticles (TiO_2, CeO_2, Fe_3O_4), LCFA, and MP. First, the characterization of the tested particles was done in order to get more information about them. Metal-oxide nanoparticles and MP were described in previous studies, so the original characterization of LCFA particles was done here.</p> <p>An acute test with metal-oxide nanoparticles revealed the high toxicity of nano-Fe_3O_4 that caused intensive vacuolization of the midgut region I and Malphigian tubules. Nano-CeO_2 caused mild vacuolization of Malphigian tubules. Nano-TiO_2 provoked remodeling of fat body and gut epithelium. By analyzing sub-organismal biomarkers in chronic tests, it was revealed that metal oxide nanoparticles and MP have the potential to affect oxidative stress enzymes, while nano-CeO_2 and nano-Fe_3O_4 have also been shown to be genotoxic. LCFA particles affected almost all analyzed parameters.</p> <p>Microvilli length has been shown to be a parameter that has a strong potential to become a histopathological biomarker that can be used in ecotoxicological studies in the future.</p>
<p>Accepted by the Scientific Board on,</p>	<p>08.11.2021.</p>
<p>Defended on, DE:</p>	
<p>Defended Board, President:</p>	
<p>Member:</p>	
<p>Member:</p>	
<p>Member:</p>	
<p>Member,</p>	

Образац Q4.09.13 - Издање 1

„If I have seen further it is by standing on the shoulders of giants“

Isaac Newton

Огромну захвалност дугујем свом ментору проф. др Ђурађу Милошевићу који је стрпљиво пропратио сваки сегмент на путу од идеје до реализације ове докторске дисертације. Хвала Вам што сте ме увели у свет екотоксикологије и омогућили ми да видим све чари лабораторијског и теренског рада.

Хвала драгим колегама на предивној сарадњи и стручној помоћи, као и стварању прелепе атмосфере за рад. Хвала колегама из Биолошког друштва „Др Сава Петровић“, који су кроз дуге године заједничког рада постали и моји пријатељи. Такође, огромну захвалност дугујем проф. др Борису Јовановићу на корисним саветима, сугестијама и великој помоћи приликом анализе резултата што је за мене било од непроценљиве вредности.

Експериментални део реализован је захваљујући сарадњи са неколико других институција. Хвала проф. др Јелени Башић и њеним колегама са Департмана за Биохемију Медицинског факултету у Нишу. Хвала проф. др Natice Duran и њеним колегама са Департмана за Науку о Материјалима и Нанотехнологију, ТОББ Универзитета у Анкари, Турска. Хвала др Маргарети Крачун-Коларевић из Одељења за Хидроекологију и Заштиту Вода, Института за Биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду. Хвала проф. др Александри Зарубици и др Радомиру Љупковићу са Департмана за Хемију, Природно-математичког факултета у Нишу. Хвала проф. др Јелени Виторовић са Департмана за Биологију и Екологију, Природно-математичког факултета у Нишу која је значајно утицала на побољшање квалитета истраживања и анализе резултата ове дисертације. Посебно хвала др Димитрији Савић-Здравковић на стручној сарадњи, али и на великом пријатељству које ће, сигурна сам, трајати још дуго.

Посебне речи захвалности припадају најближима који су укалупили моју личност. Велико хвала мом супругу Стефану и мојој деци на подстреку, безграничној љубави и стрпљењу. Супруговим родитељима се захваљујем на подршци. Хвала мојим најдражим родитељима за све што су ме научили о животу и омогућили ми

школовање. Мом брату и сестри велико хвала на неизмерној љубави. Посебну захвалност дугујем деди који је оставио велики траг у мом животу и студијама. Њима у част је од срца посвећена ова дисертација.

Ова докторска дисертација урађена уз подршку Министарства науке, Технолошког развоја и Иновација под уговором бр. 451-03-47/2023-01/200124 о финансирању научно истраживачког рада Природно-математичког факултета, Универзитета у Нишу.

Аутор

Садржај

1. Увод	1
1.1. Нове загађујуће супстанце у животној средини.....	3
1.2. Наночестице	4
1.2.1. Наночестице титанијум диоксида (TiO_2)	7
1.2.2. Наночестице церијум диоксида (CeO_2).....	9
1.2.3. Наночестице гвожђе (II, III) оксида (Fe_3O_4).....	11
1.3. Електрофилтерски пепео.....	13
1.4. Микропластика.....	16
1.5. Акватична екотоксикологија	20
1.6. Модел организми.....	26
1.7. Хирономиде као модел организми.....	28
1.8. <i>Chironomus riparius</i>	29
1.8.1. Морфологија	29
1.8.2. Животни циклус	32
1.8.3. Биологија и исхрана	32
1.9. Биомаркери	33
1.10. Биомаркери код хирономида	35
1.11. Хистопатологија у акватичној екотоксикологији	36
2. Циљеви истраживања	40
3. Методологија	42
3.1. Карактеризација честица.....	43
3.2. Наночестице оксида метала	43
3.2.1. Наночестице TiO_2	43
3.2.2. Наночестице CeO_2	43
3.2.3. Наночестице Fe_3O_4	43
3.3. LCFA честице	44
3.3.1. Brunauer-Emmett-Teller (BET) анализа	44
3.3.2. Скенирајућа електронска микроскопија (SEM).....	44
3.3.3. Рендген фотоелектронска спектроскопија (XPS).....	44
3.4. Микропластика.....	45
3.5. Модел организам	45
3.5.1. Лабораториски узгој	46
3.5.2. Експерименталне јединке	48

3.6. Дизајн експеримената.....	48
3.6.1. Хистолошка анализа различитих развојних стадијума <i>Chironomus riparius</i>	49
3.6.2. Акутни тест са наночестицама оксида метала.....	49
3.6.3. Хронични тест са наночестицама оксида метала, микропластиком и LCFA	50
3.7. Хистолошке анализе.....	52
3.7.1. Бојење.....	53
3.7.2. Микроскопска анализа хистолошких пресека	55
3.8. Физичко-хемијски параметри воде	55
3.9. Комет тест.....	55
3.9.1. Бојење и анализа плочица комета теста.....	57
3.10. Оксидативни стрес	57
3.11. Концентрација хемоглобина.....	58
3.12. Статистичка анализа података	58
3.12.1. Акутни тест	58
3.12.2. Хронични тест.....	58
4. Резултати	60
4.1. Карактеризација честица.....	61
4.1.1. Наночестице Fe ₃ O ₄ коришћене у хроничном тесту	61
4.1.2. LCFA.....	61
4.2. Хистолошка анализа нетретираних ларви <i>Chironomus riparius</i>	63
4.3. Хистолошка анализа различитих развојних стадијума <i>Chironomus riparius</i>	65
4.4. Акутни тест са наночестицама оксида метала	67
4.4.1. Физичко-хемијски параметри воде.....	67
4.4.2. Хистолошка анализа	67
4.5. Хронични тест са наночестицама оксида метала, микропластиком и LCFA	71
4.5.1. Физичко-хемијски параметри воде.....	71
4.5.2. Хистолошка анализа	72
4.5.3. Комет тест	75
4.5.4. Оксидативни стрес.....	76
4.5.5. Концентрација хемоглобина	77
5. Дискусија	78
5.1. Хистолошка анализа нетретираних ларви.....	79
5.2. Хистолошка анализа ларве четвртог ступња, препупе и пупе.....	80
5.3. Детекција најосетљивијих ткива при акутној изложености нанозагађивачима код третираних ларви <i>C. riparius</i>	81

5.4. Детекција најосетљивијих ткива при хроничној изложености нано- и микрозагађивачима код третираних ларви <i>C. riparius</i>	85
6. Закључци	96
7. Литература	99
8. Прилози	137

Поглавље 1

Увод

Вода је есенцијални ресурс неопходан за живот (Weinbren, 2019). Живот је настао у води и она се одвајкада користи за основне потребе човечанства: за пиће, купање, појење животиња и иригацију пољопривредних површина (Hasan и сар., 2019). Међутим, континуирани развој људске популације довео је до повећане потребе за њом. Услед неправилне географске дистрибуције воде, поједини делови света су у воденом дефициту (Оки и Канае, 2006). Поред тога, климатске промене и загађење антропогеног порекла довеле су до осетне кризе услед несташице воде (Chellaney, 2013). Развој индустрије, пољопривреде, рударства као и други фактори донели су са собом и повећано загађење акватичних екосистема (Hasan и сар., 2019). Захваљујући високим животним стандардима и захтевима конзумента, загађење животне средине је вишеструко повећано (Rasheed и сар., 2019). Један од значајнијих и добро познат индикатор глобалног загађења воде је смањење броја коралних гребена. У последњих неколико деценија покривеност коралним гребенима у Карипском мору опала је за чак 80%, док је овај покривач у Индо-Пацифичкој области опао за 50% (Gardner и сар., 2003; Bruno и Selig., 2007). Следеће масовно избељивање корала прогнозирано је да ће се догодити до 2050. године, где ће више од 95% коралних гребена подлећи трајном оштећењу (Li и сар., 2022).

Један од најизраженијих показатеља загађења водених екосистема је смањење њиховог биодиверзитета. Иако заузимају само 1% укупне водене површине, слатководни екосистеми представљају дом за 10% укупног броја свих врста (Tickner и сар., 2020). Процењује се да је стопа опадања бројности популације слатководних кичмењака скоро дупло већа од стопе опадања бројности популације морских или копнених кичмењака (Grooten и Almond, 2018). Поред тога, 27% слатководних врста се према IUCN (енг. *International Union for Conservation of Nature*) црвеној листи угрожених врста воде као врсте којима прети изумирање (Tickner и сар., 2020).

Акватични екосистеми обухватају слатководне и морске водене средине и представљају највеће колекторе отпада антропогеног порекла. Отпадне воде, које настају контаминирањем од стране човека, врше велики притисак на акватичне системе (Bashir и сар., 2020). Из тог разлога, неопходно је подвргнути их различитим физичким, хемијским и биолошким третманима чиме се њихов квалитет побољшава у зависности од сврхе даље употребе (отпуштање у акватичне средине, за пиће или иригацију) и тиме спречава негативан ефекат који могу имати на животну средину (Englande и сар., 2015).

1.1. Нове загађујуће супстанце у животној средини

Истраживања која се тичу негативног утицаја различитих загађивача на живи свет су све интензивнија, при чему су у главном фокусу нове загађујуће супстанце у животној средини (енг. *emerging contaminants*, ECs) (Khan и сар., 2022). ECs су микро-загађивачи, који се налазе у веома ниским концентрацијама мерљивим у микро- и нанограмима по литру, и представљају широк спектар синтетичких и природних једињења и материјала, али и микроорганизама који до сада нису били познати, детектовани или посматрани, а поседују потенцијал да штетно утичу на животну средину. (Gomes и сар., 2018; Chaukura и сар., 2022; Rosenfeld и Feng., 2011). У њих спадају и различите синтетичке компоненте пореклом из производа који се свакодневно употребљавају, као што су пестициди, козметички препарати, фармацеутски производи, али и супстанце природног порекла које поседују потенцијал да негативно утичу на животну средину и здравље људи (Rosenfeld и Feng, 2011). Многе од ових супстанци не поседују утврђене смернице за безбедну употребу да би се избегли ризици по животну средину, а могу имати штетно дејство на човека и акватичне организме, чак и у ниским концентрацијама када доспеју у воду (Rasheed и сар., 2019). Опасност од ECs лежи у томе што су недовољно испитани, а сама детекција њиховог присуства и концентрације у води може представљати изазов (Rosenfeld и Feng, 2011). Акватични екосистеми глобално су под утицајем загађивача који се кроз историју нису сматрали опасним, као и новим загађивачима који су релативно скоро креирани и уведени у употребу и на тај начин су стигли у животну средину. Многи производи за личну негу, као што су детерџенти, одлазе директно у отпадне воде путем одводних система. Са друге стране, фармацеутски производи се кроз организам човека или животиња метаболишу, а затим се екскретују у облику различитих метаболита који се такође отпадним водама односе у животну средину (Ternes и сар., 2004). Комплексност проблема оваквих загађивача лежи у томе што многи од њих подлежу физичкој и хемијској деградацији већ када доспеју у животну средину, па се и производи добијени њиховом трансформацијом морају узети у обзир приликом процене њиховог утицаја на живи свет (Boxall и сар., 2010). Како се ECs налазе у свакодневној употреби, а путем отпадних вода и канализационих система најчешће стижу у водене екосистеме, сматра се да су управо отпадне воде главни извор ECs који доспева у акватичну средину (Barber, 2014).

Аутори врло често термин „emerging contaminants“ користе како би нагласили колико је неки загађивач, чије су присуство открили у животној средини, нов. Међутим,

постоје несугласице око тога колико се нешто наведено као ново, заиста од скоро налази у животној средини и да ли се може стварно назвати ЕСs. С обзиром на то да је сам термин „emerging contaminants“ недовољно прецизно дефинисан и коришћен, супстанце које спадају у ову групу загађивача могу се разликовати од аутора до аутора (Kümmerer, 2011). Поједине супстанце одавно постоје у природи, али нису биле детектоване због ограничења хемијских аналитичких метода и веома ниских концентрација или уопште недостатка литературе о њима. Са друге стране, ЕСs који су интензивно истраживани, временом се искључују из ове групе загађивача, док се неки други недовољно истражени укључују. Оно што је дефинитивно је да је ЕСs група микро- и нанозагађивача која није хомогена и има потенцијал да негативно утиче на животну средину и здравље људи. Поједини аутори сматрају да би овај термин требало потпуно искључити из науке (Kümmerer, 2011).

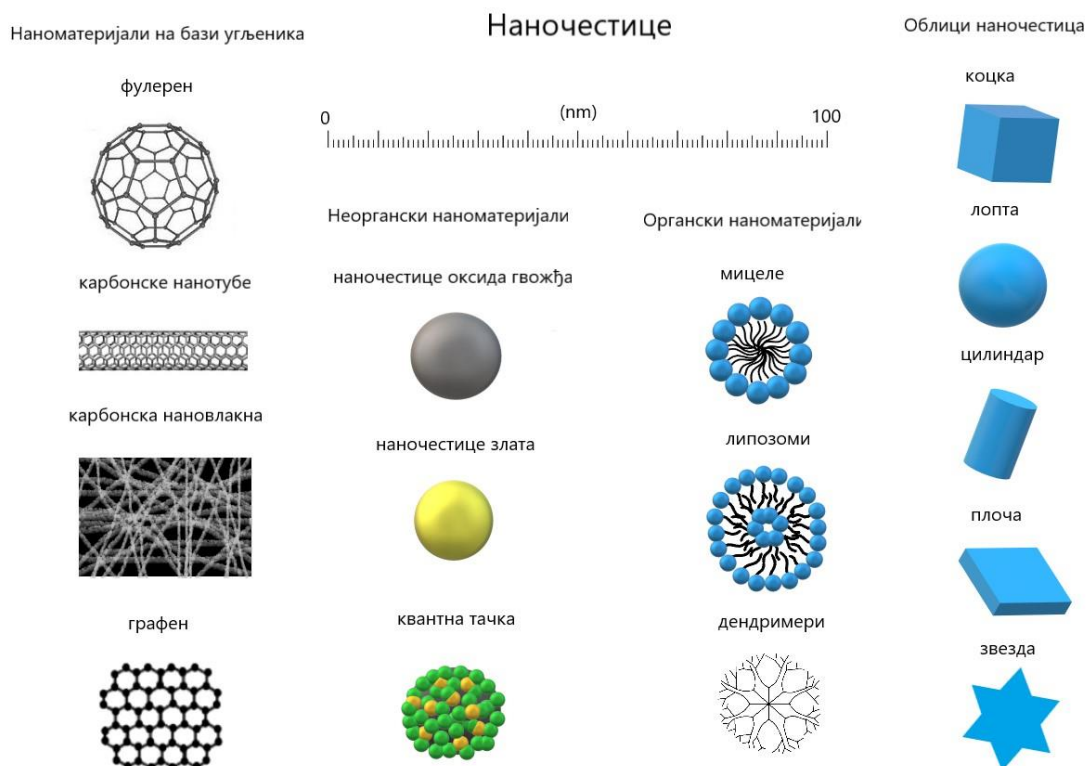
1.2. Наночестице

Термин наночестице обухвата широк спектар партикула веома малих димензија које се мере нанометрима (nm). Међународна организација за стандардизацију (енг. *International Organization for Standardization*, ISO) дефинисала је наночестице као нано-објекте чије су све три екстерне димензије мерљиве на наноскали, односно у опсегу од 1-100 nm (Boverhof и сар., 2015). Наночестице су одувек постојале у природи у облику минерала, глине, бактеријских продуката и биле су коришћене од стране човека. Међутим, наменски дизајниране и произведене наночестице са специфичним карактеристикама су се појавиле у претходних неколико деценија, и релативно су нове за животну средину (Gupta и Xie, 2018). Напредак технологије допринео је развоју и експанзији производње и употребе наноматеријала и наночестица у различитим пољима. Због својих унапређених физичких и хемијских карактеристика, наночестице се користе у индустрији хране, козметике, аутомобила, производњи чипова и медицине (Altammani сар., 2023).

Постоји више подела наноматеријала и наночестица у зависности од тога која се карактеристика узима у обзир. На основу састава, наноматеријали се могу поделити у 4 категорије (Jeevanandam и сар., 2018) (слика 1):

1. Наноматеријали на бази угљеника, као што и сам назив каже, поседују у свом саставу угљеник и ту спадају фулерени, карбонске нанотубе, карбонска нановлакна, графен и карбонски лукови (Kumar и Kumbhat, 2016).

2. Неорганиски наноматеријали, који обухватају наночестице и наноматеријале метала и металних оксида (Jeevanandam и сар., 2018).
3. Органски наноматеријали, органског су порекла и њихове слабе ковалентне везе им омогућавају трансформацију у жељене структуре, као што су мицеле, липозоми, дендримери и полимери наночестица (Jeevanandam и сар., 2018).
4. Комбиноване наночестице, представљају вишефазне наноматеријале и наночестице које имају једну фазу мерљиву на наноскали, и може се комбиновати или са другим наночестицама, или са наночестицама везаним за неке крупније структуре (Jeevanandam и сар., 2018).



Слика 1. Шематски приказ наночестица (аутор: Јелена Стојановић)

На основу порекла, наноматеријали се могу поделити на природне и синтетичке. Природни наноматеријали настају кроз природне биолошке, хемијске и физичке процесе који се одвијају ван антропогеног утицаја (Nocella и сар., 2015). Они обухватају вирусе, протеине, минерале, различите колоиде, честице магле, наночестице настале вулканском ерупцијом и таласима (Griffin и сар., 2017). Синтетичке наночестице настају механичким млевењем, сагоревањем горива, или наменском синтезом путем физичких, хемијских,

биолошких или хибридних метода (Wagner и сар., 2014). Свакодневне антропогене активности доводе до производње великих количина наночестица. Било каква врста сагоревања, као што је рад мотора и термоелектрана су само неке од процеса у којима долази до отпуштања наночестица у животну средину. Поједине наночестице, као што су титанијум диоксид (TiO_2) и церијум диоксид (CeO_2) присутне су у прехранбеним и козметичким производима за комерцијалну употребу (Jeevanandam и сар., 2018).

Са повећањем продукције и употребе наночестица, јавља се и потреба за успостављањем одговарајућих стратегија процене ризика. Како се ове честице у животној средини налазе од скоро, њихов утицај на здравље човека, али и на читаву животну средину је упитан.

Наночестице могу доспети у акватичну средину директно, изливањем урбаних или индустријских отпадних вода, али и индиректно, спирањем терестричних површина као и разношењем ваздухом. Када доспеју у воду, наночестице могу формирати конгломерате са другим наночестицама (хомоагрегати) или агрегирате са другим органским материјама при чему настају хетероагрегати. Овакви комплекси мењају један другом физичка и хемијска својства па се самим тим ремети природна интеракција органске материје са живим светом. Са друге стране, органска материја може мофиковати токсични потенцијал наночестица метала за које се веже, мењањем одређених карактеристика као што су електростатичке интеракције, биолошка доступност јона метала из наночестица и потенцијал за генерацију реактивних кисеоничних врста (енг. *reactive oxygen species*, ROS) (Gupta и Xie, 2018).

Радна група за наноматеријале Европског Центра за Екотоксикологију и Токсикологију Хемикалија (енг. *The European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals*, ECETOC) дала је препоруку о формирању оквира за груписање и тестирање наноматеријала (енг. *DF4nanoGrouping*) због лакшег развоја одговарајућих стратегија за процену ризика (Arts и сар., 2015). Овај оквир се састоји од три нивоа на основу којих се наноматеријали деле у четири главне групе: растворљиви, биоперзистентни високог аспекта, пасивни и активни наноматеријали. Како би се обухватили сви битни аспекти животног циклуса наноматеријала и њиховог биолошког пута, дефинисани су нивои са одређеним критеријумима. Ниво 1 подразумева карактеристике материјала као што су хидрофилност, морфологија честица и хемијски састав. Ниво 2 обухвата растворљивост у биолошком медијуму, површинску реактивност, дисперзibilност честица и *in vitro*

ефекат. Ниво 3 служи за корекцију карактеристика из нивоа 1 и 2 резултатима добијеним у краткорочним *in vivo* студијама. На овај начин, омогућена је свеобухватна анализа конкретног наноматеријала, на основу које се могу развити одговарајуће стратегије процене ризика, док се са друге стране употреба животиња у ове сврхе своди на минимум (Landsiedel и сар., 2017).

Пре него што се уопште узме у обзир за коришћење, сваки синтетички наноматеријал мора проћи кроз одређене токсиколошке студије. Међутим, униформност у токсиколошким анализама наноматеријала до сада није постигнута (Jeevanandam и сар., 2018). Различите методе се користе како би се утврдила токсичност, међу којима су најчешће комет тест, електронска микроскопија, МТТ тест (енг. *colorimetric assay for measuring cell metabolic activity*), као и анализа имунохистохемијских биомаркера и хемокина (Pisanic и сар., 2007; Liu и сар., 2013; Bahadar и сар., 2016). Током последње деценије у развоју је *in silico* методологија која подразумева коришћење компјутерске методологије која користи математичке моделе за процену ризика хемикалија и наноматеријала по животну средину (Raies и Вајис., 2016).

1.2.1. Наночестице титанијум диоксида (TiO₂)

Титанијум (Ti) је девети по реду елемент по заступљености у кори земље. Просечна концентрација Ti у земљиној кори је 4400 mg/kg. Титанијум диоксид је природни оксид овог елемента који се може пронаћи у природи, и сматрало се да поседује слабу токсичност и занемарљив биолошки ефекат (Grande и Tucci, 2016). Како би се створила слика о томе колико се овај оксид метала није сматрао токсичним можемо поменути чињеницу да се користио као негативна контрола у токсиколошким студијама са другим партикулама (Shi и сар., 2013). Масовна производња TiO₂ почела је почетком XX века у облику нетоксичне замене за белу боју (Ziental и сар., 2020). Међутим, након студије у којој су пацови 2 године излагани високим концентрацијама честица TiO₂ (дијаметра 1,5-1,7 μm), и након тога развили тумор плућа, откривен је токсични потенцијал ових честица (Lee и сар., 1985). Ова студија је касније стављена под знаком питања, а канцерогени потенцијал приписан је физичком утицају услед пренагомилавања честица у плућима, пре него директном токсичном ефекту самих честица (ILSI Risk Science Institute, 2000). Према Олин (2000), до формирања тумора у плућима пацова долази услед генерације слободних радикала, оштећења плућа

оксидативним путем што изазива хроничне упалне процесе у плућима и на крају пролиферацију епителних ћелија овог органа (Olin, 2000).

Након открића појачане каталитичке активности TiO_2 у облику наночестица у односу на исти оксид чије су партикуле крупније, производња и употреба нано- TiO_2 расте великом брзином. (Maupard, 2005). Да постоји забринутост око безбедности употребе нано- TiO_2 говори у прилог и све већи број студија на тему његове потенцијалне токсичности, како за здравље људи, тако и за здравље целокупног живог света. Данашња глобална производња TiO_2 прелази четири милиона тона годишње, а наночестице овог оксида нашле су примену у различитим производима за свакодневно коришћење, у прехранбеној индустрији, производњи пластике, кремама за сунчање, соларним ћелијама, као и у медицини за стимулацију пролиферације коштаних ћелија (O'Regan и Grätzel, 1991; Ziental и сар., 2020; Altammar, 2023).

Бројне студије рађене су у циљу детерминације токсичног потенцијала нано- TiO_2 . Подаци из доступне литературе ипак подржавају чињеницу да су ове наночестице токсичне за људе, модел организме кичмењака, бескичмењака, биљака, алги и микроорганизама (Rashid и сар., 2021). Сматра се да постоје три механизма путем којих токсичност може бити испољена: 1) генерација ROS и индукција оксидативног стреса, 2) везивање наночестица за површину мембране електростатичким силама, при чему се мембрана ћелија директно оштећује, и 3) везивање наночестица за интрацелуларне органеле и макромолекуле (Нои и сар., 2019).

Повећана производња и употреба наночестица TiO_2 повлачи за собом и велику количину отпуштања ових наночестица у акватичну средину. Доступне студије су углавном фокусиране на морску средину (Rashid и сар., 2021). С обзиром на то да након отпуштања у водену средину, наночестице подлежу различитим процесима физичке, хемијске и биолошке трансформације (агрегација, адсорбција, хемијска трансформација, биотрансформација), мења се и њихова интеракција са живим организмима са којима долази у контакт. Генерално, иако се нано- TiO_2 кроз студије показао као токсичан, његова токсичност је ипак била веома ниска (Rashid и сар., 2021). Студије на планктонским рачићима врсте *Daphnia magna* нису показале значајнији штетан ефекат у акутном тесту, док је субхроничи и хронични тест довео до 40% смртности и поремећаја у њиховом расту (Zhu и сар., 2010a). Такође, откривено је да се ове наночестице могу акумулирати у телу модел организма (Adams и сар., 2006; Zhu и сар., 2010a). Акутни тест није показао

никакву токсичност ни код зебрица *Danio rerio* (Zhu и сар., 2008). Генерално, код риба није забележен морталитет након изложености наночестицама TiO_2 , али су детектовани различити сублетални ефекти који укључују оксидативни стрес, утицај на респираторни тракт, поремећаје метаболизма, интестиналну ерозију, оштећење ДНК молекула и патолошке промене на јетри и шкргама (Federici и сар., 2007; Scown и сар., 2009; Linhua и сар., 2009; Galloway и сар., 2010). Оно што је веома битно је то да је доказан трансфер ових наночестица кроз трофичке ланце (Zhu и сар., 2010б). Такође, висока адсорпциона површина самих наночестица TiO_2 , и његов електростатички потенцијал омогућавају трансфер и акумулацију других загађивача у различитим органима. Како је вода главни „сакупљач“ загађивача, између осталог и тешких метала, поменуте карактеристике нано- TiO_2 могу довести до боље биолошке доступности других тешких метала акумулираних у води. Ово је и доказано у студијама где је присуство нано- TiO_2 омогућило бољу биоаккумуляцију кадмијума (Cd) и арсена (As) у ткивима шарана (Zhang и сар., 2007; Sun и сар., 2007).

Студија која је пратила утицај средински релевантних концентрација наночестица TiO_2 на заједницу слатководних макробескичмењака, показала је да су на присуство ових загађивача најосетљивији пужеви врсте *Planorbarius corneus*, *Radix labiata*, и муве које припадају фамилији Ceratorogonidae (Jovanović и сар., 2016а). Када се узму у обзир сви доступни подаци, нанотоксични потенцијал TiO_2 још увек је контроверзан. Међународна Агенција за Истраживање Рака (енг. *International Agency for Research on Cancer, IARC*) класификовала је ове наночестице као потенцијално канцерогене за људе, док их је Информациони систем о хазардним материјалима (*Hazardous Materials Information System, HMIS*) у пословним просторима класификовала као хемијски ризик (Rashid и сар., 2021).

1.2.2. Наночестице церијум диоксида (CeO_2)

Наночестице CeO_2 су у последњој деценији придобиле велику пажњу у погледу коришћења у различитим пољима индустрије и медицине. Због својих карактеристика ове наночестице користе као катализатори, полупроводници, антиоксиданти и ћелијски електролити. Као што је углавном случај и са другим наночестицама, CeO_2 има већи токсични потенцијал у нанооблику у односу на исти оксид већих димензија (Zhao и сар., 2017). Организација за економску сарадњу и развој (енг. *Organisation for Economic Cooperation and Development, OECD*) је 2010. године сврстала наночестице CeO_2 на

листу приоритетних наноматеријала за тестирање и процену ризика њиховог еко-токсичног потенцијала (OECD, 2010a). Ове наночестице имају тенденцију да агрегирају у воденом раствору што смањује њихову изложену контактну површину и тако им смањује реактивност. Показано је да тенденција за агрегацију ових наночестица зависи од рН вредности раствора у коме се налазе, што отежава предикцију нивоа токсичности у акватичним срединама (Hotze и сар., 2010). На основу доступне литературе, процењена је вредност површинске концентрације нано- CeO_2 у води при чему су добијене вредности биле веома мале и мериле су се у $\mu\text{g/l}$ (O'Brien и Cummins, 2011). Са друге стране, емпиријске и модел студије показале су њихов потенцијал за брзо таложење (Quik и сар., 2014). Ова карактеристика приписана је могућношћу да формирају хомоагрегате, али и хетероагрегате са природним колоидима, након чега се таложе и доспевају у седимент па представљају потенцијални ризик за седимент акватичних система (Quik и сар., 2012; Cross и сар., 2019). Могућност наночестица да плутају на површини воде али и да се таложе у седимент, потпомогнуте биотурбацијом бентосних организама формира својеврсну бентосно-пелагичну спрегу (Cross и сар., 2019).

Један од предложених механизма токсичности наночестица CeO_2 је формирање слободних радикала преласком из $3+$ у $4+$ стање и обрнуто (Фентон реакција) (Heckert и сар., 2008). Овај механизам приписан је и сублеталном оксидативном стресу изазваном код бентосног амфиподног рака *Corophium volutator* након излагања нано- CeO_2 (Dogra и сар., 2016). Када су ове наночестице уведене у мезокозме, дошло је до њиховог брзог уклањања и неравномерне дистрибуције између различитих акватичних врста (Zhang и сар., 2012). Код бентосних организама дошло је до трансформације Ce^{4+} у Ce^{3+} у дигестивним жлездама (Lu и сар., 2010), при чему је токсичност и биолошка доступност зависила од величине и површинских модификација самих честица (Zhang и сар., 2016; Pulido-Reyes и сар., 2015). Осим оксидативног стреса, наночестице CeO_2 изазвале су и оштећења ДНК молекула као и ћелијску смрт код различитих акватичних врста (Zhang и сар., 2016; Arnold и сар., 2013). Зао и сар. (2017) су у својој студији, у којој је испитан утицај нано- CeO_2 на организме лабораторијски конструисане микрокозме, указали да се 88,7% од укупне концентрације наночестица унетих у систем наталожило у седимент. Наночестице су довеле до видљивих промена код хидрофита у виду губитка хлорофила, структурних промена пиреноида, и издуживања корена (Zhao и сар., 2017). Студија у којој је испитивана еко- и генотоксичност наночестица CeO_2 показала је високу корелацију између нивоа оштећења ДНК молекула и стопе морталитета код рачића *D.*

magna и хирономиде *Chironomus riparius*. Како би се избегла агрегација наночестица, коришћена је концентрација од 1 mg/l, а комет тест и тест екотоксичности изведени су након 96 h у случају врсте *D. magna* и у моменту када је достигнут четврти ларвени ступањ у случају врсте *C. riparius* (Lee и сар., 2009). Узимајући у обзир доступну литературу, добијени резултати који се тичу механизма токсичности наночестица CeO_2 веома су контрадикторни. Наиме, иако се као главни механизам токсичности нано- CeO_2 наводи њихов потенцијал да индукују слободне радикале и изазову оксидативни стрес конверзијом валенце, управо се иста карактеристика користи у медицинским студијама у којима ове наночестице испољавају потенцијал за сакупљање слободних радикала у организму човека и тако се потенцијално могу користити у терапијама болести као што су дијабетско стопало, артритис, неуродегенеративне болести и канцер (Huang и сар., 2023). Оваква супротност у студијама вероватно је последица коришћења наночестица чија се биосинтеза и/или површинска модификација, концентрација, као и саме димензије наночестица, разликовала.

Досадашње студије показале су да нано- CeO_2 може доспети у саме ћелије различитим механизмима ћелијског транспорта, као што је фагоцитоза и ендоцитоза/пиноцитоза посредована рецепторима. Након уношења у ћелије, честице се даље транспортују до органела (митохондрија, лизосома, ендоплазматичног ретикулума, цитоплазме, па чак и нуклеуса). Ћелијски унос CeO_2 наночестица зависи од физичко-хемијских карактеристика самих честица као и од типа ћелија на којима се врши студија (Chen и Inbaraj, 2018). Сама чињеница да нано- CeO_2 може интераговати са интрацелуларним структурама доводи до закључка да се њихов токсични потенцијал мора детаљније испитати пре искоришћавања њиховог антиоксидативног потенцијала.

1.2.3. Наночестице гвожђе (II, III) оксида (Fe_3O_4)

Наночестице Fe_3O_4 , који се још назива и магнетит, пронашле су широку примену у технологији, али се истичу и по свом потенцијалу у области биомедицине (Jayakumar и сар., 2009). Суперпарамагнетичне наночестице оксида гвожђа (енг. *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*, SPIONs) су наночестице чије језгро чини оксид гвожђа обложен органским или неорганским омотачем и имају суперпарамагнетна својства као што су контролисана величина, велики однос површина/запремина и нетоксичност. Голе SPIONs наночестице су токсичне па омотач служи за спречавање агрегације, агломерације и редукцију оксидације (Seabra и сар., 2017). Када се убризгају у крв, ове

наночестице могу доћи до циљног ткива које захтева лечење. Поред тога, наночестице магнетита користе се и за сепарацију ћелија, за магнетну резонанцу, појачање контраста, репарацију ткива и хипертермију (Gysin и сар., 2011). Иако су ове наночестице врло обећавајуће када је у питању *in vivo* апликација, треба узети у обзир и њихове негативне стране. Првенствено, наночестице оксида гвожђа су неорганске и лако могу изазвати имуну реакцију организма. Са друге стране, неправилна биодистрибуција ових наночестица може довести до токсичног ефекта. Такође, мале димензије, мерљиве на наноскали, омогућавају њихову пенетрацију у ткива и ћелије (Wallyn и сар., 2019). Студије су показале да је токсичност наночестица Fe_3O_4 уско повезана са површинским омотачем. У *in vitro* студијама, ове наночестице обложене декстраном редуковале су ћелијску пролиферацију и изазвале ћелијску смрт у сличној мери као голе SPIONs (Berry и сар., 2003). Друге студије показале су потенцијал нано- Fe_3O_4 да индукује липидну пероксидацију, ослобађање металних јона, оштећење ћелијског зида и генерацију ROS (Malhotra и сар., 2019). Интраперитонеална администрација SPIONs наночестица обложених ди-меркапто-сукцинском киселином (енг. *dimercaptosuccinic acid*, DMSA), акумулирала се у слезини, јетри и плућима пацова али без икаквог токсичног ефекта (Ruiz и сар., 2015).

Досадашње *in vivo* студије рађене су на различитим модел организмима, као што су пацови, мишеви, рибе и акватични бескичмењаци. Ниске дозе наночестица Fe_3O_4 нису изазвале значајније биохемијске и бихејвиоралне промене код одраслих јединки *D. rerio*. Међутим, у истој студији, високе концентрације ових наночестица изазвале су повећање нивоа ацетилхолина и каталазе, а редукацију нивоа серотонина, ацетилхолин естеразе и допамина (Malhotra и сар., 2019). Акутни третман ембриона *D. rerio* голим наночестицама Fe_3O_4 довео је до повећања стопе морталитета чија је стопа зависила од концентрације (Zhu и сар., 2012).

Студија у којој је праћена биоакумулација и локализација наночестица Fe_3O_4 , као и њихов трансфер кроз трофичке ланце, укључивала је три карике ланца исхране, *Elodea canadensis* (водена куга), *Melanopsis praemorsa* (слаткободни пуж) и *Oncorhynchus mykiss* (калифорнијска пастрмка). Након гајења *E. canadensis* у воденом раствору са нано- Fe_3O_4 у трајању од три дана и апсорбције наночестица, ова биљка је служила за исхрану *M. praemorsa*. Исти мекушци су затим коришћени за храњење *O. mykiss*. Резултати анализе показали су да је дошло до усвајања наночестице од стране црева риба, при чему су се оне акумулирале у цитоплазми епителних ћелија и појединим органелама као што су

митохондрије и лизозоми. Даље, ове наночестице су ушле у крвоток рибе и синусоидима јетре доспеле у цитоплазму, митохондрије и лизозоме хепатоцита (Agayeva и сар., 2020).

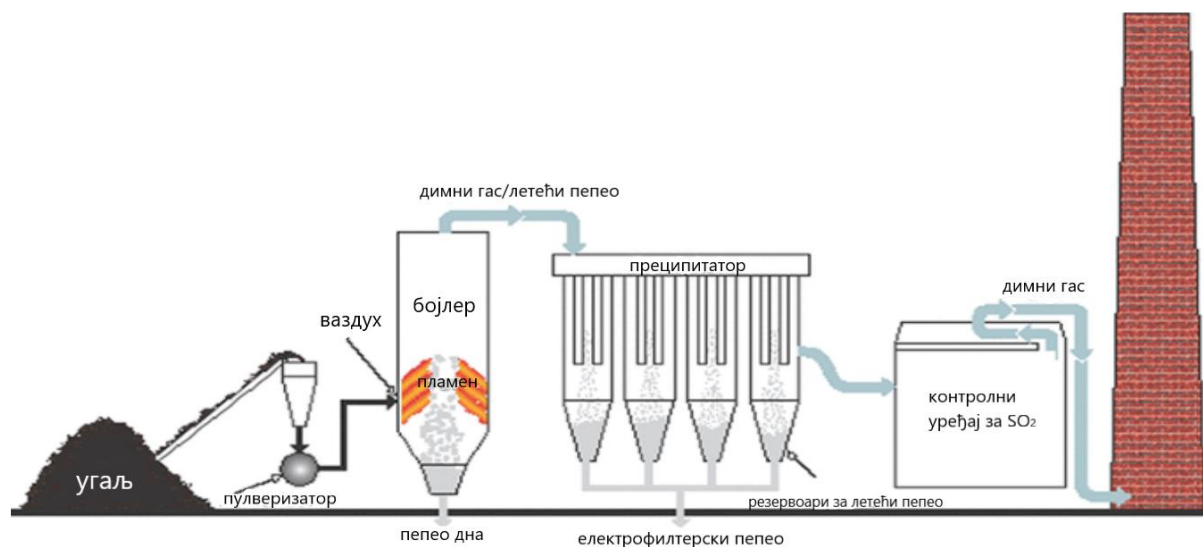
Хронични третман показао је имунотоксичност нано-Fe₃O₄, као и негативан утицај на ниво метаболичких ензима код рибе *Oreochromis niloticus* (Ates и сар., 2016). Утицај наночестица Fe₃O₄, широког опсега димензија, на екосистем мора испитан је третирањем шкампа *Artemia salina*. Цисте (капсулиране и декапсулиране) и ларве ове врсте третиране су наночестицама, и детектована је инхибиција раста I, II и III ларвеног ступња која је зависила од концентрације самих честица. Такође, уочена је и промена активности антиоксидативних ензима, као и малформација митохондрија у виду руптуре криста и оштећења на мембрани (Zhu и сар., 2017).

Иако наночестице Fe₃O₄ имају велики потенцијал за примену у биомедицини, на основу доступне литературе може се закључити да је њихов негативан утицај на акватичне врсте евидентан. Осим што долази до директног усвајања нано-Fe₃O₄ од стране биљака и омниворних организма, који неселективно усвајају храну, ове наночестице се могу преносити и кроз трофичке ланце, што указује на то са коликом се опрезношћу наночестице морају користити у било којој сфери људског живота.

1.3. Електрофилтерски пепео

Угаљ је веома распрострањено фосилно гориво које је одговорно за 38% светске продукције електричне енергије (Zierold и Odoh, 2020). Од 2017. до 2018. године употреба угља порасла је за 3%, при чему је за највећи део овог пораста одговорна Кина. Како у Кини коришћење угља за производњу електрицитета расте, паралелно је забележен пад употребе овог фосилног горива у САД и Европи. Да би се стекао утисак о томе колико угља се сагори због производње електричне енергије, можемо узети у обзир податак да су у САД-у термоелектране одговорне за производњу 27-30% електричне енергије, док су у Индији и Кини оне одговорне за производњу чак 72% (Chen и сар., 2014; Zierold и Odoh, 2020). Када се сагори угаљ, добија се нуспродукт који се назива угљени пепео или угљени прах. Овај пепео обухвата електрофилтерски пепео (летећи пепео), пепео дна, котловску шљаку и материјал за одсумпоравање димног гаса (слика 2). Процењено је да се на сваке четири тоне сагорелог угља добија једна тона угљеног пепела (Shahzad и Yousaf, 2017). Овај угљени пепео се може поново користити у производњи бетона и зидних плоча, али се један део просипа у депоније пепелишта, или језера која се налазе уз термоелектране (Zierold и Odoh, 2020). Од целокупне светске

производње угљеног пепела, 64% се успешно поново користи (Harris и сар., 2019). Остатак који се депонује у пепелишта представља велики ризик за животну средину.



Слика 2. Шематски приказ процеса добијања електрофилтерског пепела у термоелектранама (слика преузета из рада Chou, 2012, преведено на српски)

Један од загађивача који добија на све већем интересовању је електрофилтерски пепео који настаје као нуспродукт сагоревања угља у термоелектранама. Главне компоненте електрофилтерског пепела су силицијум (Si), алуминијум (Al), оксиди гвожђа, калцијум (Ca), кисеоник (O), док се остали тешки метали могу наћи у траговима (Upadhyay и Edrisi, 2021). Основне карактеристике, као што су минерална густина и величина честица пепела, разликују се у зависности од врсте угља која се користи за сагоревање (лигнит или камени угаљ), температуре сагоревања и места узорковања (Kozbek и сар., 2022). Електрофилтерски пепео пореклом од лигнита генерално има више Si, Al и оксида гвожђа, при чему су његове честице сферичне са глатком површином, док електрофилтерски пепео пореклом од каменог угља може поседовати неке додатне минерале, као што су соли Ca. Самим тим што електрофилтерски пепео представља мешавину наночестица велике разноврсности, његова токсичност може потицати од токсичног потенцијала сваке компоненте засебно али и синергистичког дејства комплекса свих његових компоненти. Између осталог, у његов састав улазе и неки органски молекули као што су полихлоровани бифенили, полициклични ароматични угљоводоници, као и микроелементи као што су цинк (Zn), олово (Pb), кадмијум (Cd), никл (Ni), арсен (As), хром (Cr) и бакар (Cu) (Upadhyay и Edrisi, 2021). Сматра се да годишња продукција електрофилтерског пепела достиже вредност од 544 милиона тона, при чему се 80% просипа на депонијама.

Као што је поменуто, у састав електрофилтерског пепела такође улазе и органске компоненте, те се он сматра опасним по животну средину. Различите карактеристике електрофилтерског пепела могу утицати на спречавање раста биљака на местима где се он депонује. Од хемијских фактора могу се издвојити високе концентрације соли и потенцијал да промени рН вредности земљишта. Такође, садржај фитотоксичних елемената, као што је бор (В), или дефицит неопходних елемената као што је азот (N), утичу негативно на раст биљака. Поред свега, компактност честица физички онемогућава раст корена. Слаба микробиолошка активност и низак ниво нутријената у комбинацији са поменутиим факторима јасно доводе до закључка да је биљни раст на местима депоновања електрофилтерског пепела веома ограничен (Jambhulkar и сар., 2018).

Ларве хириномида (Diptera: Chironomidae), као становници бентоса у слатководним екосистемима, могу доћи у контакт са електрофилтерским пепелом на различите начине. Док неке врсте показују изузетну отпорност на присуство електрофилтерског пепела у односу на друге акватичне организме, дуже излагање овом загађивачу може имати негативан ефекат на њихов раст и преживљавање (Cherry и сар., 1979; Вае и сар., 2014; Sherrard и сар., 2015).

Једна од највећих еколошких катастрофа која се догодила 2008. године у САД-у, била је изливање огромних количина угљеног пепела из Кингстон фабрике (енг. *Kingston factory*) фосилног угља, у округу Роане, Тенеси у околне реке Емори и Клинч, две притоке реке Тенеси. Анализе бентосне заједнице ових река показале су да концентрације угљеног пепела које прелазе 40%, за њих представљају умерен ризик, при чему је уочен негативан ефекат на раст и преживљавање врсте *Chironomus dilutus* у обема притокама, где је пепео доспео (Sherrard и сар., 2015). Са друге стране, у *in vitro* анализама на ћелијама везивног ткива миша линије NCTC клон 929, индекс цитотоксичности (енг. *cytotoxicity index*, CI_{50}) износио је 33%. У акутном тесту токсичности са врстом *Daphnia similis*, где је као параметар коришћена имобилизација организма, ефективна концентрација, (енг. *effective concentration*, EC_{50}), електрофилтерског пепела износила је 7,25%. У случају врсте *D. rerio*, летална концентрација (енг. *lethal concentration*, LC_{50}), била је 4,39% (Damasceno и сар., 2019).

Студија која је анализирала токсичност електрофилтерског пепела пореклом из шест различитих термоелектрана, детектовала је велику осетљивост врсте *D. magna* која

је приписана високој концентрацији Cr у пепелу. Негативан ефекат детектован је и код микроалге *Pseudokirchneriella subcapitata*, међутим, није пронађена корелација са тешким металима који су присутни у анализираном пепелу. Грам негативна бактерија *Vibrio fischeri* била је најмање осетљива на присуство овог загађивача (Tsiridis и сар., 2006; Tsiridis и сар., 2012).

Електрофилтерски пепео, са својим разноврсним саставом и потенцијалним негативним дејством на животну средину, постао је предмет велике забринутости, намећући потребу за детаљнијим истраживањима која се тичу његовог утицаја на слатководни екосистем и његове отпорне врсте као што су ларве хирономиде (Sherrard и сар., 2015).

1.4. Микропластика

Пластика представља широк спектар различитих синтетичких и полусинтетичких полимера високе молекулске тежине са угљеничним ланцем, који имају могућност обликовања у чврсте објекте (Токива и сар., 2009). Глобална продукција пластике достигла је 390,7 милиона тона у 2021. години. Процене су да ће до 2050. године око 12 билиона тона доспети у животну средину. Вртоглав раст продукције пластике приписује се све већој разноврсности ове групе материјала па се самим тим и широк спектар продуката може произвести од пластике. Главни светски произвођач пластике је Кина, са 32% укупне глобалне производње у 2021. години. У последњих неколико година, просечна производња пластике у Кини на месечном нивоу износи између 6 и 12 милиона тона. Друга на листи је Северна Америка, са 18% укупне глобалне производње пластике 2021. године (Tiseo, 2021). У основи, пластични полимери креирани су да би олакшали свакодневни живот човека, међутим нагомилавање пластике у животној средини временом је постајао све већи проблем за целокупан живи свет (Millican и Agarwal, 2021). Тренутно се пластика налази у сваком елементу животне средине (води, земљи и ваздуху). Један од водећих проблема је тај што су производња и паковање хране уско повезани са пластиком, при чему је квалитет хране смањен због контаминације истом. Неретко долази и до хемијске интеракције између паковања и самог садржаја што доводи до тога да производ више није безбедан за употребу (Pradeau, 2006).

Честице микропластике дефинисане су као „синтетичке чврсте честице или полимерне матрице, правилног или неправилног облика и величине од 1 µm до 5 mm, примарног или секундарног производног порекла, које су нерастворљиве у води“ (Frias

и Nash, 2019). Под примарном пластиком подразумевају се партикуле пластике које се користе у току производње пластичних производа, док је секундарна пластика продукт распадања пластичних производа кроз различите процесе деградације (биодеградација, фотодеградација, физичка деградација) (Syberg и сар., 2015). Интензивна експлоатација пластике са слабо развијеним системом за управљање овим отпадом довео је до акумулације великих количина пластичног отпада у животну средину (Ziani и сар., 2023). Микропластика може садржати два типа хемикалија према пореклу и то су:

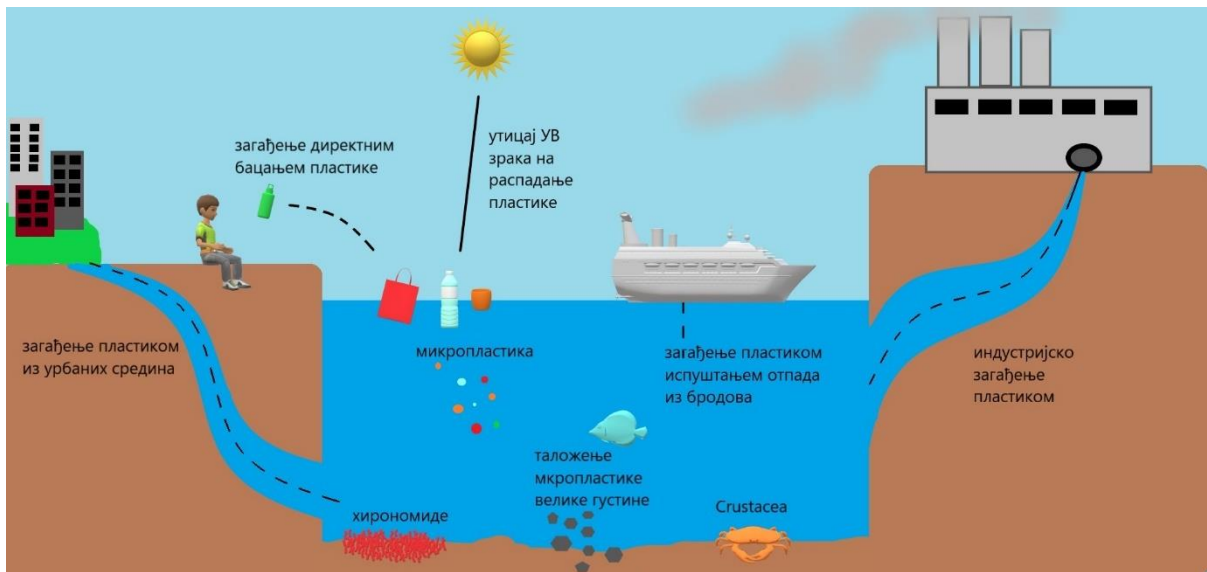
1. адитиви и полимерне сировине које се додају у току производње пластике како би се унапредио њен квалитет, као што су боје, антиоксиданси, стабилизатори и лубриканти.
2. супстанце адсорбоване на површину микропластике из окружења.

Многи од адитива који се користе рутински у производњи пластике су се већ показали као веома токсични и сврстани су у групу ендокриних дисруптора, односно хемикалија који утичу на нормалну хомеостазу хормона (Campanale и сар., 2020). У њих спадају естри фталне киселине, бисфенол А, полибромовани дифенил етри и органотин (Chakraborty и сар., 2022; Ullah и сар., 2023).

Контаминација микропластиком тесно је повезана са терестричном средином, при чему су урбане средине један од проблематичнијих извора емисије пластике. У урбаним срединама, поред индустријског отпада, микропластика може доспети у реке путем отпадних вода, спирањем земљишта, и директним бацањем смећа (Кау и сар., 2018; Hurley и сар., 2018; Wagner и сар., 2019).

Судбина микропластике у акватичним срединама у највећој мери зависи од њене густине, при чему је већина пластичних полимера мале густине, па она углавном плута у води (Слика 3). Међутим, колонизација пластике која плута, може довести до повећања њене густине и тоњења у дубље слојеве воде (Duis и Coors, 2016). Микропластику могу колонизовати бактерије, гљиве, вируси, археје, алге и протозое које формирају биофилм, другачије назван пластисфера. Микробијални састав пластисфере се увелико разликује од микробијалног састава околине. У иницијалној фази колонизације доминирају зелене алге, цијанобактерије и диатоме. Како пластисфера сазрева, тако се разноврсност бактеријске фауне повећава. На састав пластисфере највећи утицај имају сами услови животне средине, али и полимери који је окружују (Zhai и сар., 2023). Када пластика доспе у водену средину она подлеже различитим процесима разградње. У оквиру њих,

најизраженији су механичка деградација, фото-деградација, термална-деградација и биодеградација. Механичка разградња обухвата утицај таласа, седимента, межурића и плиме на смањење величине честица пластике. На овај начин, честице пластике могу достићи и нано-димензије. Такође, степен механичке деградације се повећава под утицајем ултраљубичастих (енг. *ultraviolet*, UV) зрака (Duan и сар., 2021). У ствари фото- и механичка деградација симултано учествују у разградњи пластике тако што UV зраци разбијају C-C и C-H везе на површини пластике, након чега се тај слој одстрањује механичким деловањем поменутих фактора (Kholodovych и сар., 2007). Термална деградација има најмању улогу у воденој средини због нижих температура које владају у овој средини (Duan и сар., 2021). У оквиру биолошке деградације, главну улогу имају микробијална деградација, биолошка ингестија и дигестија. Степен деградације зависи од микробиолошког састава који у њему учествује. Сви ови процеси делују на пластику кроз три главне групе механизма: физичке, хемијске и биолошке. Физички механизми фрагментишу пластику кроз генерацију микропукотина било кроз процес производње или механичке деградације (Enfrin и сар., 2020). Хемијска деградација подразумева термалну и фото- деградацију која доводи до исецања ланаца, гранања и генерације оксигенисаних интермедијарних продуката. Разлика између ове две деградације је у узрочнику хемијског процеса деградације и њиховог крајњег продукта (Liu и сар., 2020). Биолошка деградација од стране микроорганизама подељена је у четири главне фазе. Прва фаза подразумева већ поменуто колонизацију површине пластике од стране микроорганизама који секретују лепљиви матрикс и омогућавају другим организмима да населе површину пластике. У другој фази физички долази до биоразградње пластике, док у трећој ензими секретовани од стране насељених микроорганизама разграђују полимере пластике на диполимере и мономере при чему долази до ослобађања адитива. Последња фаза, подразумева коришћење малих молекула и адитива од стране микроорганизама као извор угљеника и енергије. На овај начин интермедијарни продукти подлежу процесима асимилације, минерализације и добијају се крајњи метаболити као што су CO₂ и H₂O (Jasquin и сар., 2019).



Слика 3. Загађење акватичних средина микропластиком (аутор: Јелена Стојановић)

Због својих малих димензија, микропластика се лако може унети у организам ингестијом, али и преносити ланцем исхране и дуго опстајати у животној средини због своје отпорности на биодеградацију (Lee и сар., 2023). Захваљујући овим карактеристикама, микропластика поседује потенцијал да негативно утиче на живи свет. Различите студије су показале да се микропластика може акумулирати у акватичним организмима и проузроковати неухрањеност изазивањем лажног осећаја ситости, запаљенске процесе, смањену фертилност, па чак и морталитет (Lee и сар., 2023). На овај начин, угрожен је и организам у коме се микропластика акумулирала, али кроз ланац исхране, и организам који се храни контаминираном врстом.

Осим што се микропластика може унети у алиментарни канал акватичних врста ингестијом, студије су показале да мање димензије ових партикула имају потенцијал да прођу кроз епител црева и акумулирају се у масном ткиву (Rosenkranz и сар., 2009). Такође, микропластика пречника 0,5 μm може се усвојити и транслоцирати у хемолимфу, хепатопанкреас, оваријуме и шкрге шкољки (Farrell и Nelson, 2013).

Према доступној литератури, око 700 врста погођено је акумулацијом микропластике у акватичној средини. Два су типа негативног утицаја микропластике на живе организме: физички и хемијски. Физички негативан ефекат обухвата утицај облика, димензија и концентрације самих честица микропластике на живе организме, док је хемијски утицај повезан са утицајем штетних супстанци које су везане за саме честице (Issac и Kandasubramanian, 2021).

Досадашња истраживања показала су да микропластика утиче штетно на акватичне врсте путем различитих механизма. Микрочестице полистирена изазвале су смањење фертилности и раста код острига, при чему је у њиховом фецесу детектована микропластика димензија 6 μm (Sussarellu и сар., 2016). Сличан ефекат имале су микрочестице полистирена димензија 20 μm на копеподног рака *Calanus helgolandicus*. Оне су утицале негативно на масу адулта, величину јаја и њихово излегање (Cole и сар., 2015). Такође, примећен је и негативан утицај микро-полистирена на исхрану и раст морског црва *Arenicola marina*, праћен повећањем стопе морталитета и биоакумулацијом микропластике (Besseling и сар., 2017). Показано је да микропластика има способност инхибиције синтезе филамената бисуса код дагњи и може утицати на синтезу протеина укључених у виталне процесе као што су имуни одговор, метаболизам и структурни развој (Green и сар., 2019).

Примећено је да се у желуцу рака *Nephrops norvegicus* микропластика може уситнити на још ситније партикуле које доспевају до нижих трофичких нивоа ланца исхране (Cau и сар., 2020). Осим тога, континуирано уношење микропластике од стране ракова доводи и до инхибиције раста и развоја самих организама, али и до повећања смртности (Welden и Cowie, 2016).

Акумулација микропластике у акватичним срединама негативно утиче на раст и развој организама који долазе у контакт с њом. Негативни ефекат партикула зависи од више фактора као што су физичке и хемијске карактеристике истих, али и врсте интеракције са околином (Syberg и сар., 2015).

1.5. Акватична екотоксикологија

Екотоксикологија је кроз литературу дефинисана на различите начине. Генерално, свака се дефиниција може свести на главни циљ екотоксикологије, а то је проучавање структурних и функционалних поремећаја екосистема који су проузроковани кратким, средњим или дугим излагањем факторима загађења. Ови фактори обухватају физичке, хемијске и биолошке агенте који су настали директно или индиректно утицајем човека. Екотоксикологија се базира на основним принципима екологије који имају за циљ да разумеју односе између живих организама и њихове околине. Екологија користи еколошке системе на различитим нивоима еколошке организације. С обзиром на то да се екосистем састоји од абиотичке и биотичке компоненте, екотоксикологија прати ту интеракцију и анализира биотичку компоненту на више биолошких и еколошких нивоа

организације, почевши од молекуларног и целуларног па све до нивоа појединачног организма, популације једне врсте или читаве биоценозе (Boudou и Ribeyre, 1997). Чак и у природним условима, који нису ремећени антропогеним фактором, диверзитет абиотичких и биотичких компоненти је толико велики и јединствен у простору и времену, да се идентичан екосистем никада не може наћи на два простора, али ни екосистем на једном простору неће бити исти кроз време, нити се може поновити (Seitz, 1994). Како би се спровела било каква екотоксиколошка студија, неопходно је поседовање основног знања о еколошким процесима. На основу тога може се утврдити да ли, и у коликој мери постоји ремећење ових процеса, да ли су реверзибилни, као и анализирати квантитативни и квалитативни параметри који ће описати средње или дугорочне ризике (Boudou и Ribeyre, 1997). Поменута разноврсност екосистема, као и разноврсност природног и антропогеног утицаја на исте, отежавају поређење нарушеног и ненарушеног екосистема (Kelly и Harwell, 1989).

Акватична екотоксикологија је почела са интензивним развојем као нова интердисциплинарна област 1970-их. Главни фокус акватичне екотоксикологије представља судбина загађивача (миграција, трансформација, седиментација и друге интеракције) у акватичној средини и њихов утицај на индивидуе, популације, заједнице и екосистеме (Kelly и Harwell, 1989).

У акватичној екотоксикологији, утицај загађивача на живе организме зависи од биодоступности токсина. Сви организми поседују биолошке баријере у виду ћелијских мембрана и епителних структура (интегумент, цревни зид, шкрге). У зависности од биолошке доступности, абиотички фактори могу утицати на структурне и функционалне карактеристике биотичких система. На пример, уколико дође до повећања температуре воде, то ће довести и до повећања унутрашње температуре код организама који ту живе (Kelly и Harwell, 1989). С обзиром на то да долази до константне размене између индивидуа и њиховог окружења, трансфер загађивача између биотопа и биоценозе и њихов токсични утицај зависи од интеракције између три фундаментална пола екотоксикологије: абиотичке компоненте, загађивача и биотичке компоненте (Boudou и Ribeyre, 1989).

Постоји неколико приступа у акватичној екотоксикологији која се тичу типа студија. Приступ који се сматра најверодостојнијим су *in situ* студије. Оне описују феномене на лицу места где настају. С обзиром на то да се прате природни процеси и

одговори на присуство загађивача са целокупним комплексом абиотичких и биотичких фактора, резултати који се добију су реалан приказ токсичног ефекта испитиваног загађивача. Недостатак овог приступа је немогућност да се изолују главни механизми одговорни за реакцију екосистема на присуство загађивача па је врло тешко превазићи дескриптивну фазу представљања резултата (Boudou и Ribeyre, 1997).

Други приступ је *ex situ* модел у контролисаним лабораторијским условима који може испитивати утицај загађивача на једну врсту (моноспецифични модел). Предност моноспецифичног модела је у томе што се може испитати већи број параметара који укључују чак и оне веома специфичне као што су хемијска сигнализација одговорна за реакције модел организама на присуство загађивача. Друга предност је могућност да се дефинишу стандардни протоколи и тестови који ће служити за предикцију токсичног потенцијала загађивача на одређену врсту. Међутим, како се ове студије одвијају у лабораторијски контролисаним условима, екстраполација резултата на реалне екосистеме, где су услови неретко и непредвидиви је веома тешка (Boudou и Ribeyre, 1997).

Мултиспецифични модел је приступ између *in situ* модела и *ex situ* моноспецифичног лабораторијског модела. Може бити изведен на отвореном или у лабораторији. Мултиспецифични модел изведен на отвореном се још назива и мезокозма, и представља експерименталну поставку у полуконтролисаним условима како би се премостио јаз између резултата добијених у лабораторијским условима и онима добијених након *in situ* посматрања. О томе колико је веродостојан и вредан овај модел, говори и чињеница да је 1987. године, америчка Агенција за заштиту животне средине (енг. *Environmental Protection Agency*, EPA) објавила званичан документ са смерницама како спровести тест у акватичним мезокозмама (Touart и сар., 1988).

Свака контаминација акватичне средине може се сматрати стресом за њене становнике. Акватични организми су кроз еволуцију развили саморегулаторне механизме којима одржавају хомеостазу својих виталних активности прилагођавајући се на промене услова животне средине (Moiseenko, 2008). Свако излагање стресу, било природног или антропогеног порекла, изазива сличну реакцију: појединачне индивидуе покушавају да се прилагоде новим условима, док се на нивоу популације елиминишу најмање отпорни појединци (селекција) па долази до генетичке адаптације саме популације (Forbes, 1994). Селекција омогућава већу отпорност популације на присуство

загађивача, међутим, на дуже стазе доводи до губитка генетичке разноврсности популације и подложности негативном дејству других неповољних услова (Adams и Ryon, 1994).

Преадаптација представља могућност одређене карактеристике да усвоји нову биолошку функцију уз никакву или веома малу промену у структури (Ardila, 2016). Један од најважнијих фактора преадаптације организама је њихов биоенергетски механизам. Када се организам нађе у нагло промењеним условима, долази до трошења велике количине енергије (Newman, 1995; Moiseenko, 2008). Стање ниске ентропије у нормалним условима, односно способност организма да развије и одржава висок ниво „сређености“ енергије, једна је од најважнијих карактеристика сваког живог бића (Moiseenko, 2008).

Када се нека супстанца дефинише као штетна, неопходно је одредити њене карактеристике које је таквом чине. Први корак је дефинисање везе између њене концентрације у медијуму и негативног утицаја који она има на живе организме. Један од најпознатијих концепта у токсикологији јесте „Доза ствара отров“ (лат. *Dosis facit venenum*, Paracelsus) (Croom, 2016; Sánchez-Bayo и Tennekkes, 2020). Дозно/концентрационо-зависна токсичност је термин који описује промену ефекта стресора на организам која зависи од дозе/концентрације самог стресора у одређеном периоду. Ово је у исто време и основни принцип на коме почивају сви токсиколошки и екотоксиколошки тестови који имају за циљ да опишу узрочно-последичне везе у односу доза/концентрација-одговор (Teodorović и Kaišarević, 2015). Међутим, установљено је да ефективну токсичну дозу одређује и време изложености (временски зависна токсичност), па је на основу тога дефинисано Хаберово правило по коме је токсични ефекат одређене супстанце (E) продукт примењене дозе (д) и времена изложености тестираној супстанци (т): $E = д * т$ (Sánchez-Bayo и Tennekkes, 2020). Ефекат представља реакцију организма на присуство токсина, и у зависности од дужине деловања на организам, дели се на акутни и хронични. Акутни ефекат се манифестује као брза реакција живих организама на стрес, док хронични подразумева спор развој патолошких процеса који има два исхода: адаптацију на стресор или развој хроничне болести која скраћује животни век (Moiseenko, 2008).

Студије о судбини и биогеохемијском циклусу загађивача у екосистемима су од великог значаја за утврђивање процене ризика за животну средину. Такође је неопходно

и истражити потенцијал загађивача да се креће кроз трофичке ланце, почевши од седимента, преко микроорганизама, бескичмењака па до кичмењака (предаторских риба). Када су ове информације доступне, могуће је прерачунати његову предвиђену концентрацију у животној средини (енг. *predicted environmental concentration, PEC*). Ове процене су веома важне, нарочито за супстанце које је тешко или немогуће квантитативно измерити у акватичној средини, као што су наночестице (Amiard и Amiard-Triquet, 2015).

Први постављени акутни тестови пратили су само једну крајњу тачку (енг. *endpoint*) и то је била леталност, док су параметри као што је раст, репродукција и понашање били праћени у хроничним тестовима. Акутни тестови првенствено дају информацију о средњој ефективној концентрацији (енг. *effective concentration, EC₅₀*) која узрокује негативан ефекат на 50% испитане популације, као и средњој леталној концентрацији (енг. *lethal concentration, LC₅₀*) која узрокује леталност код 50% испитане популације. У хроничним тестовима може се детерминисати концентрација без видљивог ефекта (енг. *no observed effect concentration, NOEC*) и концентрација са најмање видљивим ефектом (енг. *low observed effect concentration, LOEC*). Када постоје информације о NOEC за одговарајућ брoј врста, на основу доступних података може се прерачунати и предвиђена концентрација без видљивог ефекта (енг. *predicted no effect concentration, PNEC*) за тестирану супстанцу. Како би се одредило да ли је одређена супстанца ризична и подлеже предузимању мера за смањење ризика анализира се однос PEC/PNEC. Уколико је тај однос већи од 1, супстанца се убраја у загађиваче који изазивају забринутост (Amiard и Amiard-Triquet, 2015).

Термини који се врло често користе за опис токсичног потенцијала загађивача јесу и токсикокинетика и токсикодинамика. Токсикокинетика описује како токсин улази у организам и доспева до циљног ткива. Токсикодинамика има за циљ да објасни шта се дешава са циљним ткивом када токсин достигне ефективну дозу. Токсикокинетика може бити подељена на четири главне фазе: апсорпција, дистрибуција, метаболизам (биотрансформација) и екскреција (елиминација). На ове четири фазе највећи утицај имају два фактора а то су генетика и понашање. Пример утицаја генетике су мутације које могу значајно да промене токсикокинетичку организма. Када је у питању понашање, узимање лекова или коришћење заштитних помагала могу утицати на било коју од четири фазе токсикокинетике (Сгоом, 2016). Токсиколошки посматрано, након апсорпције, ксенобиотик има три категорије циљних места у организму: циљно место

дејства (место где испољава своје токсично дејство), циљно место метаболизма (место где долази до трансформације ксенобиотика при чему долази до детоксификације или биоактивације) и циљно место депоновања (место где немају ни токсично дејство нити се метаболишу већ се само акумулирају и мирују до одређеног момента) (Teodorović и Kaišarević, 2015). Токсикодинамика описује процесе који се дешавају на циљном месту дејства. Они се такође могу поделити на неколико нивоа: молекуларни, ћелијски, ткивни и ниво органа. С обзиром на то да ова четири нивоа настају, мењају се или нестају у различитим развојним стадијумима, утицај токсина на њих зависи од развојних промена и момента када је токсин испитан (Croom, 2016).

Многи стандардизовани протоколи и тестови објављени су од стране различитих регулаторних тела за тестове токсичности за седимент и воду. Ови тестови се могу поделити на тестове који се изводе у статичним, семистатичним и проточним условима (ЕС, 2005). Статични услови подразумевају тестове у којима се у току експеримента не мења раствор. Код семистатичних, раствор се мења периодично, док код проточних услова постоји константни проток свежег раствора или се раствор често мења (Amiard и Amiard-Triquet, 2015).

Како би се детерминисали горе поменути параметри и крајње тачке, неопходно је дефинисати стандардизоване тестове са смерницама које их описују. У случају индустријских наноматеријала, ОЕСД поставила је смернице за акутне и хроничне тестове токсичности. У смерницама се налазе неопходне анализе крајњих тачака загађивача које подразумевају физичко-хемијске особине, разградивост, акумулација и ефекат на биолошке системе (ОЕСД, 2014). Такође, постоје препоруке за припрему и дозирање супстанце која се испитује и оне су од великог значаја за утврђивање реалног излагања тест организама (ОЕСД, 2012). ОЕСД протоколи су међународно признати документи који се имплементирају у научним студијама акватичне екотоксикологије (Petersen, 2015).

У оквиру ОЕСД протокола, постоје два типа теста: акутни и хронични. Акутни тестови су краткорочни тестови и хронолошки се најчешће спроводе први, како би се проценило преживљавање модел организма (Boros и Ostafe, 2020). У случају ларви хирономида (Diptera: Chironomidae), ови тестови трају 48 h, при чему се тест организми излажу различитим концентрацијама истог загађивача. На крају експеримента прерачунава се EC_{50} испитиване супстанце (ОЕСД, 2011). На основу вредности EC_{50} ,

акутна токсичност испитане супстанце групише се у једну од пет категорија које су дефинисане од стране US EPA и Уједињених Нација (енг. *United Nations*, UN) (Табела 1).

Табела 1. Рангирање токсичности испитиване супстанце у акутном тесту за акватичну екотоксикологију.

Категорије према EPA	Категорије према UN	EC ₅₀ (mg/L)
Веома токсично (енг. <i>Very highly toxic</i> , VHT)	Акутно 1.1 (A1.1)	< 0,1
Високо токсично (енг. <i>Highly toxic</i> , HT)	Акутно 1.2 (A1.2)	0,1–1
Умерено токсично (енг. <i>Moderately toxic</i> , MT)	Акутно 2 (A2)	> 1–10
Ниско токсично (енг. <i>Slightly toxic</i> , ST)	Акутно 3 (A3)	> 10–100
Практично нетоксично (енг. <i>Practically nontoxic</i> , PNT)	Акутно 4 (A4)	> 100

Хронични тестови се углавном спроводе након акутних, уколико је за испитану супстанцу процењено да постоји ризик за животну средину. На крају хроничних тестова процењују се сублетални ефекти на раст и репродукцију тест организма (Boros и Ostafe, 2020). Када се хирономиде излажу хроничним тестовима токсичности, експеримент почиње пребацивањем ларви првог ступња ларвеног стадијума. Препоручено је да се након десет дана измери маса ларви и процени стопа преживљавања. На крају експеримента одређује се стопа развоја и излетања адулта (OECD, 2023a; OECD, 2023b).

1.6. Модел организми

Модел организми представљају врсте живих организама које се проучавају ради утврђивања биолошких феномена и чији се резултати, модели и теорије потенцијално могу успешно применити на друге организме, углавном сложеније од самог модел организма (Leonelli и Ankeny, 2013). Нека од највећих научних открића у 20. веку добијена су захваљујући коришћењу шест модел организама: *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe yeast*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* и *Mus musculus* (Matthews и Vosshall, 2020). Међутим, многе раније коришћене експерименталне животиње нису биле, нити су икад постале модел организми. У ствари, експериментални организми користили су се углавном из два разлога: за проучавање неког специфичног биолошког феномена или због тога што је организам сам по себи интересантан за проучавање (Leonelli и Ankeny, 2013). Термин „модел организам“ се потенцира због притиска који се врши на научнике да се оправда коришћење било каквог организма у експерименталне сврхе (Maher и сар., 2009). Са друге стране, активисти за животињска права изричито су против коришћења

експерименталних животиња, а као један од главних аргумената користе неуспех појединих модел организама да предвиде озбиљне последице одређених лекова на човека. Такође, развој културе ћелија и *in silico* методе не иду у прилог употреби модел организама. Са друге стране, лако заборављамо да скоро сво знање које поседујемо из ћелијске биологије дугујемо управо модел организмима (Hunter, 2008).

Како би експериментални организам постао модел организам, мора поседовати неке кључне карактеристике. Прва карактеристика је та да морају представљати већу групу организама, и служити као основа за одређене механизме и процесе који су заједнички за велики број, ако не и све друге организме. Друга карактеристика је могућност да се анализира јединка као целина, заједно са системима и механизмима који се иначе јављају у живим организмима као што су генетика, развој, физиологија, еволуција и екологија. Како би се постигла оваква комплексна анализа, неопходан је интердисциплинарни приступ, захваљујући коме ће се касније индивидуална врста користити као референтна за упоређивање са другим испитиваним врстама. Трећа карактеристика обухвата економичност и лако одржавање и руковање врстом, и укључује: мале физичке и геномске величине, мале трошкове узгоја, одржавања и транспорта, кратак животни циклус, висока стопа фертилитета и висока стопа мутација (Leonelli и Ankeny, 2013).

Међутим, многи научници сматрају да је за дефинисање доброг модел организма потребно и мало среће (Müller и Grossniklaus, 2010; Leonelli и Ankeny, 2013). Догађало се да се, након што одређени експериментални организам достигне критичну величину заинтересоване научне заједнице, нове предности организма препознају, те он постане све популарнији. Један од примера је биљка *Arabidopsis thaliana* која се данас користи у истраживањима технологије трансформације биљака због незахтевног руковања и примењивања метода трансформације за добијање трансгених биљака (Clough и Vent, 1998). Са друге стране, многи модел организми временом су изгубили тај статус због откривања баријера које онемогућавају примену одређених метода за истраживање, док се у исто време сличне или идентичне методе лако примењују на другим експерименталним организмима. Оваква ситуација десила се у случају морског прасета и пацова, углавном због потешкоћа за примењивање метода за генетичка истраживања (Hunter, 2008; Müller и Grossniklaus, 2010).

1.7. Хирономиде као модел организми

Фамилија Chironomidae (Diptera), једна је од најбројнијих фамилија акватичних макробескичмењака, како по броју врста, тако и по броју јединки појединачних врста. Хирономиде су широко распрострањене и настањују најразличитије услове, чак и оне екстремне. Могу се пронаћи на сваком континенту, укључујући и Антарктик (Bouchard и сар., 2006; Ferrington, 2008). Настањују екстремне надморске висине чији се опсег креће од 5.600 m надморске висине (Хималаји) до преко 1000 m дубине (Бајкалско језеро) (Koshima, 1984; Linevich, 1971). Изразито су толерантне на високе и ниске температуре па се поједине врсте хирономида могу наћи како на температурама од 38,8 °C, тако и на веома ниским температурама мањим од -20 °C (Hayford и сар., 1995; Carrillo и сар., 2004). Једна од стратегија за прилагођавање оваквим условима је и дужина трајања животног циклуса. Поједине врсте, као што је *Apedilum elachistus* имају екстремно кратак животни циклус, при чему период од јаја до достизања адулног стадијума износи само седам дана, док са друге стране, постоје врсте које живе у барама тундре на Аљасци и животни циклус им траје чак седам година (Nolte, 1996; Butler, 1982). Једна су од ретких група инсеката која настањује морске екосистеме (Brodin и Andersson, 2008).

Око 15.000 врста хирономида груписано је у 11 субфамилија које припадају фамилији Chironomidae (Ferrington, 2008). Ови инсекти спадају у групу холометаболичких инсеката, при чему су ларвени ступањ и лутка подређени акватичној средини, док су адулти летећи и обично се могу наћи близу места метаморфозе. Сви развојни стадијуми хирономида су од великог значаја за екосистеме јер представљају интегрални део трофичког ланца служећи као храна другим бескичмењацима и кичмењацима (Sharifian и сар., 2014).

Морфолошка група хирономида припада групи Culiciforma што значи да су морфолошки слични комарцима, међутим закржљалост усних делова и атрофија мандибула им онемућава да гризу. За Culiciforma карактеристичне су дуге антене које су мање или више дужине главе (Karima, 2021).

Хирономиде имају неколико предности када је у питању њихов потенцијал биоиндикатора. Једна од главних је њихова тесна веза са седиментом, водом и површинским слојем воде дуг временски период (Warrin, 2008). Хирономиде су мање-више већ добро објашњене и стандардизоване као модел организми у екотоксиколошким студијама (Fousault и сар., 2018). ОЕСД протоколи за испитивање утицаја хемикалија на

седимент и воду препоручују употребу хириномида као модел организма, за шта постоје и званични протоколи о томе како треба успоставити и одржавати лабораторијску популацију, као и за употребу јединки у експерименталне сврхе (OECD, 2010a; OECD, 2010b; OECD, 2011; OECD, 2023a; OECD, 2023b).

Постоји неколико разлога због чега су хириномиде изузетно погодне као модел организми за развој стандардизованих тестова испитивања токсичности хемикалија. Као што је већ поменуто, хириномиде представљају једну од најраспрострањенијих и најразноврснијих таксономских група акватичних макробескичмењака. Ендокрини систем бескичмењака најбоље је описан код инсеката, па се код њих може пратити утицај токсина на овај систем. Кратак животни циклус омогућава извођење хроничних тестова на хириномидама при чему се могу пратити сви развојни стадијуми холометаболичких инсеката и утицај хемикалија на њих. Након метаморфозе, пол адулта се може идентификовати на основу неколико уочљивих морфолошких карактеристика (изглед антена, дужина и ширина абдомена). Када одређени загађивач доспе у воду, организми могу доћи у контакт са њим путем седимента, воде или слоја воде изнад седимента (капиларна вода). Како су ларве хириномида бентосне, на њима се могу испитати сва три начина излагања. Системи у којима се могу чувати лабораторијске популације нису компликовани и не захтевају проточну воду. За исхрану се може користити комерцијална храна TetraPhyll/TetraMin који се лако може наћи на тржишту (Weltje и Bruns, 2009).

Протоколи успостављени од стране OECD сматрају да је управо врста *C. riparius* најпогоднија за извођење тестова због најлакшег руковања (OECD, 2023b).

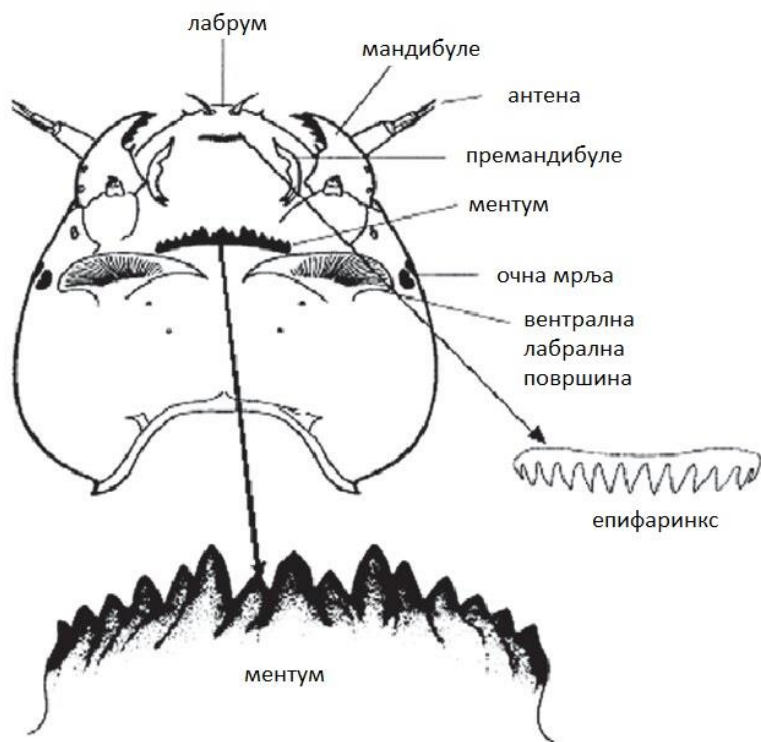
1.8. *Chironomus riparius*

1.8.1. Морфологија

C. riparius се обимно користи у екотоксиколошким студијама као модел организам. Ларве ове врсте имају велики потенцијал за био-мониторинг акватичне животне средине. Граде цевасте кућице и могу се наћи у муљу са високим органским садржајем у потоцима, коповима за дренажање, барама или дуговечним барама северне хемисфере (Hooper и сар., 2003). *C. riparius* је мултиволтина врста, што представља појаву развоја више генерација у току једне године.

Ларва

Ларве хирономида имају склеротизовану главену капсулу која је састављена од дорзалне апотоме и пара латералних образа. На месту састава ових склерита долази до пуцања и раздвајања интегумента у току пресвлачења (Armitage и сар., 1995). Према усном апарату, вентрално се налази назубљена плоча која се према новијој терминологији назива ментум (Слика 4). У састав ментума улазе две структуре, вентроментум који стоји у средини као централни зид, и дорзоментум који се извија латерално иза вентроментума. Латерални израштаји ментума називају се вентроменталне плоче јер се налазе у наставку вентроментума. Постериорни део ментума, подељен је на субментум на који се настављају окципиталне маргине. Антериорно, на дорзалну апотому наставља се лабрум са сетама. Антеролатерална маргина лабрума поседује кутикуларне структуре које се називају хете (длачице). Вентрална лабрална површина поседује карактеристичне структуре, премандибуле и палатум, односно епифаринкс. Премандибуле су парне, покретне и назубљене. Најуочљивије структуре усног апарата хирономида су парне мандибуле. Мандибуле поседују дорзални и апикални зуб и између њих варијабилни број унутрашњих зуба. Дорзолатерално од ментума налазе се максиле, које имају улогу у исхрани и продукцији свиле. На глави хирономида налазе се сегментисане антене и представљају сензорни орган инсеката. Очи су им парне, веома једноставне и представљају пигментисана подручја испод кутикуле (Armitage и сар., 1995). Тело ларви је подељено на два главна региона, торакални и абдоминални. Торакални регион поседује три сегмента, док је абдоминални регион подељен на девет сегмената, нешто ужих од торакалних. Ларве четвртог ступња су карактеристичне по томе што имају натечене торакалне сегменте. На антериорном делу торакалног региона налазе се парне параподије, односно лажне ножице. Преанално, могу се уочити процерци, односно парни израштаји који апикално носе чуперак четина (Armitage и сар., 1995). Најзначајнија карактеристика ларви јесте њихова црвена боја која је последица присуства хемоглобина у хемолимфи (Karima, 2021).



Слика 4. Шематски приказ главене капсуле *Chironomus* spp. (преузето из рада Veneberu и Mengistou, 2014)

Пуна

Пуна има облик „запете“, са крупнијим цефалотораксом у односу на дорзовентрално спљоштен абдомен. Тело пупе подељено је на три дела: главу, торакс и абдомен. У току метаморфозе, долази до дорзалног пуцања торакса пупе. Најкарактеристичнија структура код лутки је торакални рог који се налази медиолатерално на тораксу, и представља респираторни орган (Armitage и сар., 1995).

Адулт

Глава адулта је округла, поседује антериопостериорну раван и скраћене делове усног апарата. Једна од главних структура која се разликује код мужјака и женки јесу њихове антене. Антене мужјака су карактеристично перасте и састављене су од уског стабла, глобуларне петељке и бројних цилиндричних флагеломера. Код женки је петељка антене мања, са мањим бројем, краћих, цевастих флагеломера. Очи су парне и бубрежастог облика. Торакс адулта је дорзално конвексан и најдоминантнији сегмент торакса је мезонотум, други торакални сегмент на коме се налазе мишићи за летење. И у случају крила изражен је полни диморфизам, при чему женке имају шира крила у односу

на мужјакe. Што се тиче абдомена, првих седам сегмената код женки је шире и краће (Armitage и сар., 1995).

1.8.2. Животни циклус

С обзиром на то да је *C. riparius* холометаболан, ови инсекти кроз животни циклус пролазе кроз четири развојна стадијума: јаје, ларва, пупа и адулт (Karima, 2021). На температури од 20 °C комплетан животни циклус заврши се за 25 дана (Weltje и Bruns, 2009).

Женке полажу јаја у масама одмах након копулације, а затим угибају. Маса може садржати 20-30 јаја која су причвршћена за неки објекат, углавном лист биљке. Маса јаја имају цилиндричан облик и покривена су желатинозном супстанцом, а сама јаја су у маси распоређена спирално. Време између полагања јаја и излегања истих зависи од температуре и креће се између два и по и шест дана (Thienemann, 1954). Ларве припадају бентосним организмима и након излегања почињу да граде тубе, сакупљањем алги и другог доступног органског и неорганског материјала уз помоћ усног апарата. Као везивна компонента служи им секрет који се лучи са ивица усног апарата. У процесу формирања тубе, од околног супстрата састављају крупни пакет у који се ларва увлачи и формира тунел (Armitage и сар., 1995). Ларве пролазе кроз четири ларвена ступња, а након четвртог почињу процес улуткавања улазећи у стадијум препупе. Након улуткавања, лутка проводи време у туби коју је направила у ларвеном стадијуму. Када крене да сазрева, креће се ка површини воде захваљујући ваздуху који почиње да испуњава интеркутикуларни простор адулта. Метаморфоза у адулта се дешава врло брзо након што лутка стигне на површину воде (Karima, 2021).

1.8.3. Биологија и исхрана

У првим сатима живота, након што се излегну, младе ларве хране се муцилагинозном масом која је држала јаја. Након тога, прелазе на микродетритиворну исхрану уносећи мале органске партикуле. Када достигне други ларвени ступањ, ларва уноси површински филм дна, где ингестији подлежу живе и неживе алге, као и неорганска материја (Karima, 2021). *C. riparius* према функционалној групи спада 98,39% у групу сакупљачи/колектори (Ђурђевић и сар., 2023). Лутка повезује ларвени и адултни стадијум и она се не храни. Једине покрете које изводи имају три циља, пресвлачење у току улуткавања и ослобађање од ларвеног интегумента, респирацију и доспевање до површине воде због метаморфозе. Адулти су слободнолетећи и праве карактеристичне

ројеве због копулације (Karima, 2021). До скоро се сматрало да се адулти уопште не хране због својих нефункционалних делова усног апарата, међутим неке студије су показале да се ипак хране сукрозом (Burt и сар., 1986; Foucault и сар., 2018).

1.9. Биомаркери

Биомаркер као термин уведен је 1987. године од стране Националног Истраживачког Већа (енг. *National Research Council*, NRC) САД-а, и дефинисан је као: „ксенобиотички индуковане варијације у ћелијским или биохемијским компонентама или процесима, структурама или функцијама које су мерљиве у биолошким системима или узорцима“ (NRC, 1987). Како је ова првобитна дефиниција непрецизна, истраживачи су се после тога дуго бавили допунама дефиниције биомаркера као и њиховом употребом. Биомаркери су предложени за употребу у процени стања животне средине као реакција популационих параметара (преживљавање, популациони раст) на присуство токсина (Depledge и Fossi, 1994). Ван Гастел и Брумелен (1996) су се задржали код суб-индивидуалних реакција и представили биомаркере као варијације биолошког одговора који укључују физиолошке и бихејвиоралне параметре (Van Gastel и Brummelen, 1996). Биомаркери су најкомплетније дефинисани 1997. године:

„Биомаркер се дефинише као мерљива и/или видљива промена у биолошком или биохемијском одговору, у распону од молекуларног до физиолошког нивоа и укључује бихејвиоралне промене. Одговор биомаркера указује или на излагање или на токсични ефекат срединских стресора и мора бити еколошки релевантан. Биомаркери се сматрају системима раног упозорења и укључени су у процену квалитета екосистема. Могу се користити за процену реакције хемијском излагању или негативног ефекта загађивача биоте *in situ*. Мере се на нивоу индивидуе али њихов одговор мора предвидети утицај на нивоу популације.“ (Lagadic и сар., 1997).

Увођење биомаркера у науку имало је циљ да служе као рани знаци упозорења који сигнализирају токсичност и предвиђају негативне ефекте на нивоу организма или популације. Као такви представљају ефикасне дијагностичке алате у природним системима који су изложени загађивачима. Како би неки параметар постао биомаркер, он мора испунити одређене захтеве (Cossu-Leguille и Vasseur, 2013):

- Мора бити веома осетљив на присуство загађивача, како би послужио као рани знак упозорења;

- Основне информације и референтне вредности морају бити добро дефинисане како би се могла направити разлика између природне варијабилности и ефекта загађивача (специфичност биомаркера);
- Фактори који изазивају шум у одговору биомаркера и њихов утицај на биомаркере морају бити познати;
- Однос између реакције биомаркера и дозе и времена излагања загађивачу морају бити идентификовани;
- Мора бити описана веза између реакције биомаркера на присуство загађивача и дугорочног ефекта на организам.

Временом је примећено да је за процену ризика поремећаја животне средине неопходна шира слика, односно употреба различитих биомаркера који ће заједно дати комплетнију информацију о ефекту загађивача на екосистем. Из овог разлога препоручује се коришћење комплементарних биомаркера различитих нивоа биолошке организације. На основу ових захтева, дефинисана је метода названа Интегрисани Одговор Биомаркера (енг. *Integrated Biomarker Response*, IBR) која управо користи више комплементарних биомаркера како би добила информацију о стресу, биодоступности загађивача и њиховог ефекта на живи свет у студијама (Beliaeff и Burgeot, 2002).

Биомаркери се могу поделити у неколико група: биомаркери излагања, биомаркери ефекта и биомаркери осетљивости.

Биомаркери излагања показују да је организам изложен неком загађивачу али без индикација да постоји токсични ефекат истог (Depledge и Fossi, 1994). На пример, када је организам изложен тешким металима долази до синтезе металотионеина који има улогу у одржавању хомеостазе метала и спречавању токсичног ефекта тешких метала у организмима (Hamer, 1986).

Биомаркери ефекта су мерљиве биохемијске, хистолошке, физиолошке и молекуларне промене у ткивима и телесним течностима који могу бити препознати и повезани са одређеним оштећењима или болестима (Allan и сар., 2006). Један од познатијих биомаркера ефекта је липидна пероксидација која резултује деградацијом полинезасићених масних киселина ћелијске мембране, када је одбрамбени систем оксидативног стреса преоптерећен (Doyotte и сар., 1997).

Биомаркери осетљивости представљају урођену или стечену способност организма да реагује на присуство ксенобиотика. На пример, више фактора може

утицати на одговор организма на стрес, као што је пол, старост и величина. Како би се разјаснила варијабилност реакције на загађивач између различитих организама, ови биомаркери морају бити узети у обзир. У екотоксиколошким студијама се препоручује укључивање поменутих фактора у анализе како би се добиле прецизније информације о токсичном потенцијалу испитаног загађивача (Cossu-Leguille и Vasseur, 2013).

1.10. Биомаркери код хирономида

Према постојећим OECD протоколима, стандардизовани тестови акутне и хроничне токсичности за хирономиде подразумевају анализу биомаркера који се тичу само стандардних животних параметара (раст, преживљавање, број излетелих адулта, време излетања) (OECD, 2023a; OECD, 2023b). Међутим, како је већ поменуто, ради добијања опште слике о утицају неког загађивача неопходно је увести биомаркере на различитим нивоима биолошке и еколошке организације. Ова потреба је препозната, па истраживачи активно уводе и анализирају биомаркере који су до сада били стандардни за неке друге кичмењачке модел организме као што су генетички, биохемијски, ћелијски и ткивни (Domingues и сар., 2007; Rebecchi-Baggio и сар., 2016; Stojanović и сар., 2021; Vranković и сар., 2022).

Генотоксичност је мера за негативне промене у генетичком материјалу које су изазване директно или индиректно утицајем ксенобиотика. Најчешће методе за мерење нивоа оштећења ДНК молекула су комет и микронуклеус (енг. *m micronucleus*, MN) тест. Комет тест мери укупно оштећење ДНК молекула изазвано загађивачем, без обзира на то да ли се оштећење може санирати или не – биомаркер излагања. MN тест мери оштећења која се не могу отклонити репарационим механизмима организма – биомаркер ефекта (Colin и сар., 2016).

Један од главних механизма токсичног дејства контаминаната је њихов потенцијал да индукују генерацију ROS. Продукција ROS је нормална појава код здравих организама која се одржава под контролом захваљујући антиоксидативним ензимима које организми поседују. Међутим, када продукција ROS превазилази антиоксидативни капацитет организма, јавља се оксидативни стрес (Schuijt и сар., 2021). Акватични организми поседују бројне антиоксидативне ензиме, који се користе као биомаркери за детекцију прооксидативног потенцијала ксенобиотика. Најчешће анализирани биомаркери оксидативног стреса код хирономида су реактивне супстанце тиобарбитуринске киселине (енг. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS),

количина протеинских продуката оксидације (енг. *advanced oxidation protein products*, AOPP), активност каталазе (енг. *catalase activity*, CAT) и активност супероксид дисмутазе (*superoxide dismutase activity*, SOD) (Stojanović и сар., 2023; Savić-Zdravković и сар., 2019).

Ларве *C. riparius* су карактеристичне због поседовања црвеног пигмента хемоглобина. Овај протеин има велики потенцијал да се уврсти у биомаркере због својих функција у одржавању хомеостазе организма. Главна функција хемоглобина хирономида је да омогући аеробне метаболичке процесе у анаеробним условима (Grazioli и сар., 2016). Додатно, сматра се да хемоглобин може имати улогу пуфера па тако ларве имају могућност адаптације на киселе услове (Jernelöv и сар., 1981). Новија истраживања показала су да овај пигмент поседује високу антиоксидативну активност у хирономидама и може разградити водоник-пероксид на воду и кисеоник (Szczerkowska-Majchrzak и Jarosiewicz, 2020). Све ове карактеристике јасно показују потенцијал хемоглобина као биомаркера за детекцију токсичног дејства загађивача. Из тог разлога, анализа концентрације хемоглобина се може наћи у све већем броју студија које се баве акватичном екотоксикологијом и користе мулти-маркер приступ (Stojanović и сар., 2023; Stanković и сар., 2020б).

Осим поменутих квантитативних суб-индивидуалних биомаркера, у последње време почиње да се користи и хистопатологија као метода која може представити биомаркере како квантитативно тако и квалитативно (Sørensen и сар., 1994). Ларве хирономида морфолошки немају комплексне системе ткива и органа, а како су омнивори, ксенобиотици лако долазе у контакт првенствено са дигестивним системом, а потенцијално и са осталим ткивима и органима (уколико дође до абсорпције). Како би се уочиле хистопатолошке промене изазване токсинима, мора се спровести хистолошка анализа здравих јединки и описати њено базално стање и морфолошки изглед ткива. До сада је на овај начин описано неколико врста хирономида које укључују *Polypedilum sp.*, и *Chironomus columbiensis* (Ospina-Pérez и сар., 2019; Grueso-Gilaberth, 2020).

1.11. Хистопатологија у акватичној екотоксикологији

Хистопатологија представља веома важан алат у детекцији патолошких промена ткива. Ова метода представља комбинацију хистологије, која представља науку о живим ткивима, и патологије, која представља науку о променама изазваних дејством различитих токсина. Прве пионирске хистолошке студије датирају још пре више од

хиљаду година. Како тада микрофотографија још увек није постојала, хистолошке студије базирале су се на цртежима уметнички надарених научника који су умели вешто да прикажу морфологију и анатомију ткива различитих организама. Неке од ових историјских хистолошких студија користе се и дан данас, као што је хистолошки приказ дигестивне жлезде код главоножаца нацртан од стране немачког биолога Френзела још 1886. године (Costa, 2018). Увођењем микрофотографије у другој половини 20. века, хистологија добија нову димензију, и постаје веома важна за биомедицинску дијагностику, док у исто време хистолошке технике губе популарност у наукама о животној средини. Неколико година након увођења токсикологије животне средине као научне дисциплине, почиње значајан развој хистопатологије као методе у екотоксикологији, који је трајао између 1970. и 1990. године. Вестер и Вос су 1994. године, у својој студији на лабораторијским рибама *Poecilia reticulata* (гупи) и *Oryzias latipes* (јапанска медака), показали огороман значај хистопатологије у акватичној екотоксикологији, тврдећи да ова метода може бити сензитивнија у односу на екотоксиколошке параметре који се рутински користе у тестовима (морталитет, абнормалности у понашању, маса јединки) (Wester и Vos, 1994).

Развој дигиталне микрофотографије у другој половини 21. века доводи до револуције у хистолошким техникама због могућности добијања серије микрофотографија за кратак временски период. На овај начин омогућена је бржа квантификација добијених резултата па хистопатологија добија велики значај за науку о животној средини, посебно екотоксикологију. Иако је технологија унапређена, интерпретација хистопатолошких резултата и даље је веома захтеван и комплексан подухват. Добар хистопатолог мора поседовати знање из различитих грана биолошких наука као што су зоологија, патологија, физиологија, токсикологија, биохемија, као и многе друге које могу помоћи у објашњењу добијених хистопатолошких резултата (Costa, 2018).

Постоји неколико приступа у хистопатологији. Један од њих је квалитативна анализа која почива на дескриптивној анализи појаве нове хистопатолошке промене. Како је врло субјективна, да би се овакви резултати валидирани неопходно је обезбедити довољан број поновака и користити одговарајућу терминологију, али је и препоручљиво да квалитативна хистопатолошка анализа прати неку другу анализу која може подржати добијене резултате, као што је молекуларна или биохемијска. Са друге стране, резултате је најбоље квантификовати, уколико не директним мерењем одређених ткивних и

ћеијских структура, онда бар раслојавањем тестираних организама према старости, полу, сексуалној зрелости или било ком другом фактору који може утицати на резултате (Costa, 2018).

Акватична екотоксикологија је, уз биомедицину, допринела све већем развоју хистопатологије. С обзиром на то да се истраживања акватичне екотоксикологије базирају на рибама као модел организмима, хистопатологија акватичних кичмењака, углавном риба, постала је веома битан алат у детекцији ткивних промена проузрокованих загађивачима (Costa, 2018). Излагање различитим загађивачима може изазвати различите промене на хистолошком нивоу у виду вакуолизација, малформација и некрозе ткива (Van der Oost и сар., 2003). Овакве промене могу бити веома битни биомаркери сублеталног дејства ксенобиотика, при чему сама израженост промена може зависити од његове концентрације (Stentiford и сар., 2003).

Одређивање хистопатолошких биомаркера као јасно дефинисаних промена насталих под утицајем токсина није једноставан посао. Нпр. када се анализира постојање одређеног паразита, одговарајућим анализама може се добити недвосмислен доказ његовог присуства. У случају хистопатологије, не постоји специфична промена која ће указивати на утицај токсина, већ се она базира на анализи промена, које се могу јавити и у нормалном физиолошком стању, али су у овом случају више или мање изражене. Из тог разлога, пре почетка било какве хистопатолошке анализе, хистопатолог мора бити добро упознат са референтним хистолошким стањем нетретираних јединки како би могао уочити било каква одступања и приписати их негативном ефекту испитаног ксенобиотика (Costa, 2018).

Познато је да је једна од главних карактеристика које потенцијални биомаркер мора испунити, да би био узет у разматрање, његова сецифичност (Cossu-Leguille и Vasseur, 2013). Међутим, када је у питању хистопатологија, биомаркери не могу у потпуности испунити овај услов јер не постоји директна веза токсин-биомаркер. Различити токсини покренуће различите биолошке путеве и интераговати са биомаркерима директно или индиректно па тако довести и до различитих хистопатолошких промена. Такође, хистопатолошка промена се ретко јавља као изолована промена, већ у комбинацији са другим алтерацијама ткива формира шаблон на основу ког се може одредити здравствени статус испитане јединке (Costa, 2018).

Као што је већ поменуто, једна од првих хистопатолошких студија урађена је 1994. године од стране Вестер и Вос. Они су још тада анализирали хистологију свих ткива код риба и на тај начин поставили основу за даља хистопатолошка истраживања код акватичних кичмењака (Wester и Vos, 1994). Циљни органи риба који се увелико користе у хистопатолошким анализама студија токсичности су шкрге, јетра и бубрези (Yancheva и сар., 2015). Што се тиче бескичмењака, циљни органи за хистопатолошку анализу се бирају према аналогiji са онима код кичмењака, односно томе који су органи међу првима изложени утицају токсина. Како је јетра главни орган за детоксикацију код кичмењака, па је самим тим и један од циљних органа, код мекушаца је уместо ње циљни орган дигестивна жлезда, док је код ракова то хепатопанкреас (Costa, 2018). Код хирономида, студије су показале да су најосетљивија ткива на присуство ксенобиотика епител црева, Малпигијевих цевчица, и масно ткиво (Richardi и сар., 2018).

Хистопатологија се често користи у *in vivo* процени ризика наночестица на животињским моделима. Студије су показале да се код честица хемијска реактивност, као и њихов потенцијал да генеришу ROS, повећава са смањењем димензија. Мале димензије честица загађивача им омогућавају да продру кроз природне баријере организма, доспеју до органа и ткива, након чега интерагују са интрацелуларним структурама и ремете њихову нормалну морфологију и функцију на различите начине (Zoroddu и сар., 2014). Овакве промене у нормалној архитектури ткива могу се детектовати хистопатологијом (Gurcan и сар., 2009).

Поглавље 2

Циљеви истраживања

Ово истраживање бави се дефинисањем нових хистопатолошких биомаркера код акватичних модел организама, осетљивих на присуство нано- и микрозагађивача антропогеног порекла.

Општи циљ овог истраживања је детектовање и дефинисање потенцијалних хистопатолошких биомаркера код врсте *C. riparius*, осетљивих на присуство најчешћих нано- и микрозагађивача. Како би се постигао општи циљ, постављени су следећи специфични циљеви:

1. Анализа хемијских и физичких особина нано- и микрозагађивача који су коришћени у експериментима.
2. Хистолошка анализа нетретираних, референтних ларви *C. riparius* и дефинисање организације ткива код истих.
3. Детекција најосетљивијих ткива при акутној изложености нанозагађивачима код третираних ларви *C. riparius*.
4. Детекција најосетљивијих ткива при хроничној изложености нано- и микрозагађивачима код третираних ларви *C. riparius*.
5. Развој квантитативних биомаркера на основу циљних ткива код хирономида.
6. Анализа других суб-индивидуалних биомаркера осетљивих на присуство загађивача који укључују ДНК оштећења, оксидативни стрес и концентрацију хемоглобина.
7. Одређивање нивоа корелације одговора потенцијалних хистопатолошких биомаркера за другим анализираним суб-индивидуалним биомаркерима.

Поглавље 3

Методологија

3.1. Карактеризација честица

У истраживањима у оквиру докторске дисертације коришћене су супстанце у микро- и наноформи. Од појединачних наночестица тестиране су наночестице оксида метала: титанијум диоксид (TiO_2), церијум диоксид (CeO_2) и гвожђе (II,III) оксид (Fe_3O_4), док је као мешавина различитих наночестица коришћен летећи пепео настао сагоревањем лигнита из термоелектране (енг. *Lignite coal fly ash* - LCFA). Такође, у експериментима је коришћена мешавина три врсте микропластике (МП): полиетилен (енг. *Polyethylene* - PE), поливинил-хлорид (енг. *Polyvinyl-chloride* - PVC) и полиамид (енг. *Polyamide* - PA). Детаљнија карактеризација нано- и микрочестица биће објашњена у даљем тексту.

3.2. Наночестице оксида метала

3.2.1. Наночестице TiO_2

Нано- TiO_2 честице, коришћене у експериментима, купљене су од „Fiori Colori Spa“, Италија, а дистрибуиране од стране „Pharmorgana GmbH“, Немачка. Супстанца је била у форми комерцијалне прехранбене боје (E171) са 99% чистоће. Детаљна карактеризација може бити пронађена у претходном истраживању, у коме су коришћене исте честице (Јовановић и сар., 2016b). С обзиром на то да су наночестице TiO_2 коришћене у експериментима у оквиру дисертације, методологија коришћена за њихову карактеризацију је описана у прилогу 1.

3.2.2. Наночестице CeO_2

Наночестице CeO_2 купљене су од „Sigma Aldrich, USA“. Према произвођачу, дијаметар честица био је $< 25 \text{ nm}$. Детаљна карактеризација описана је у претходној студији од стране Савић-Здравковић и сар. (2020) (Savić-Zdravković и сар., 2020). Методологија коришћена за карактеризацију ових наночестица налази се у прилогу 2.

3.2.3. Наночестице Fe_3O_4

Наночестице Fe_3O_4 , коришћене у акутном тесту, синтетисане су на Департману за Науку о Материјалима и Нанотехнологији, ТОББ Универзитета за Економију и Технологију, Анкара, Турска. Методологија за одређивање карактеризације нано- Fe_3O_4 описана је у Савић-Здравковић (2020), а може се пронаћи у прилогу 3 (Savić-Zdravković, 2020).

Наночестице Fe_3O_4 , коришћене у хроничном тесту, синтетисане су на Департману за Хемију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Нишу. Ове честице синтетисане су према карактеризацији наночестица Fe_3O_4 које су коришћене у акутном тесту токсичности. За одређивање њихове карактеризације коришћена је метода рендгенске дифракције (XRD).

3.3. LCFA честице

LCFA честице добијене су из термоелектране у Турској, која није желела да објави своје име јавно. Карактеризација ових честица урађена је на Департману за Науку о Материјалима и Нанотехнологију, ТОББ Универзитета у Анкари, Турска. Методологија која је коришћена је објашњена у даљем тексту.

3.3.1. Brunauer-Emmett-Teller (BET) анализа

BET анализа површине адсорбента извршена је на „Autosorb-iQ Station 1“ (Quantachrome Instruments) у N_2 атмосфери. Анализа BET специфичне површине LCFA честица добијена је уз помоћ N_2 адсорбицијско-десорбицијског теста на 77,350 K (-195,8 °C). Дегасификација узорка извршена на 120 °C током 24 h пре самог мерења.

3.3.2. Скенирајућа електронска микроскопија (SEM)

SEM/EDAX (енг. *Scanning electron microscopy with Energy Dispersive X-Ray Analysis*) спектроскопија LCFA честица урађена је на „Zeiss Evo 50“ скенирајућем микроскопу опремљеним „Oxford EDAX“ детектором. Морфологија, величина честица и дистрибуција величине честица LCFA су анализирани на SEM (FEI Quanta 200 FEG SEM with 4 nm resolution). EDAX (Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy) and X-Ray (Rigaku model ZSX Primus II XRF) анализе извршене су како би се одредио елементарни састав компоненти LCFA.

3.3.3. Рендген фотоелектронска спектроскопија (XPS)

Анализа елементарног састава и електронске структуре LCFA извршена је на „Thermo Scientific K-Alpha“ уз коришћење $\text{Mg K}\alpha$ (1486,6 eV) извора рентгенских зрака снаге 300 W. Анализа спектра урађена је енергијом проласка електрона од 117,40 eV. Снимање је извршено под углом од 60° у односу на нормалну површину. UV/vis апсорпциони спектар боја анализиран је уз помоћ „Hitachi U-5100“ спектофотометра.

3.4. Микропластика

У експериментима је коришћена мешавина три врсте микропластике: PE, PVC и PA. PE ултра-високе молекулске тежине и PVC високе молекулске тежине купљени су од „Sigma-Aldrich“, каталожки бр. 434272 и каталожки бр. 81387, респективно. PA за колонску хроматографију купљен је од Carl Roth, каталожки бр. 9620,1. Методологија коришћена за одређивање карактеризације ових полимера објашњена је у претходним истраживањима од стране Станковић и сар. (2021) (Stanković и сар., 2021) и може се пронаћи у прилогу 4.

3.5. Модел организм

У експериментима је као модел организм коришћена врста *C. riparius*. Ларве ове врсте узете су из лабораторијске популације која се узгаја на Департману за Биологију и Екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Нишу. Популација је успостављена и одржавана према смерницама OECD (2023а). Приликом успостављања популације, хирономиде су узорковане уз обалу реке Нишаве ($43^{\circ}19'22''$ N; $21^{\circ}51'57''$ E), на надморској висини од 189 m (слика 5). Узорци су однешени у лабораторију Природно-математичког факултета након чега су очишћени и идентификовани. Узорковање и идентификација до нивоа врсте урађена је коришћењем одговарајућих идентификационих кључева (Schulze, 1994; Epler, 2001; Vallenduuk и Pillot, 2007; Anderson и сар., 2013; Pillot, 2014).



Слика 5. Локалитет на коме су узорковане јединке *C. riparius* за формирање лабораторијске популације (Извор: Google Earth)

3.5.1. Лабораторисјки узгој

Лабораторијска популација *C. riparius* узгаја се у акваријумима димензија 10 x 20 x 20 cm, запремине 4 l. На акваријумима налази се посебан поклопац са мрежицом који спречава излазак одраслих јединки са испупченим делом у коме се оне сакупљају. Одрасле јединке се пребацују у већи акваријум (50 x 40 x 40 cm, запремина 80 l) који такође поседује поклопац са мрежицом и испупченим делом. У овом акваријуму се одрасле јединке роје и женке полажу пакете јаја (слика 6).

На дну акваријума за узгој налази се супстрат дебљине до 4 cm који представља посебно обрађен целулозни папир. Припрема супстрата обухвата потапање 50 g чистог целулозног папира у 100% ацетон, 30 min, како би се уклониле све нечистоће. Папир се оцеди и потапа још три пута, након чега се папир испире чесменском водом кроз сито док се ацетон потпуно не уклони. Након испирања чесменском, следи испирање дестилованом водом, а затим кување 1 h у истој. Папир се затим хомогенизује и оцеди и од тако припремљене смесе праве се куглице, димензије пола шаке које се замрзавају до коришћења. Овако припремљена једна куглица довољна је као субстрат за један акваријум од 4 l.

Вода у акваријумима је мешавина чесменске и дестиловане у размери 1:1. Чесменска вода се пре употребе дехлорише стајањем на собној температури 24 h. Висина воденог стуба у акваријумима за узгој износи 15 cm.

Сваки акваријум за узгој и ројење опремљен је грејачима и системом за довод аерације како би се обезбедили одговарајући услови за обављање комплетног животног циклуса хирономида. Параметри се редовно проверавају при чему се температура проверава на дневном нивоу и одржава на $22 \pm 0,5$ °C, док се рН, тврдоћа воде и електропроводљивост проверавају једном месечно и одржавају у следећем опсегу: рН $6,52 \pm 0,4$; тврдоћа $7,3 \pm 0,25$ °dH; електропроводљивост воде $325 \mu\text{S}/\text{cm}^3$.

Акваријумима је обезбеђен сталан фотопериод од 16/8 (16 h светлости, 8 h мрака) неонским лампама. Спољна температура средине у којој се акваријуми налазе одржава се на 20 ± 2 °C.

Ларве се хране TetraMin® храном за рибице, при чему се 1-3 g хране раствори у 20 ml дестиловане воде хомогенизовањем, а затим се по 5 ml додаје у сваки акваријум

једном дневно. Концентрација раствора хране се прилагођава броју хирономида који се налази тренутно у акваријуму.



Слика 6. Акваријуми за узгој (горе) и рођење (доле) популације *C. riparius* (аутор: Јелена Стојановић)

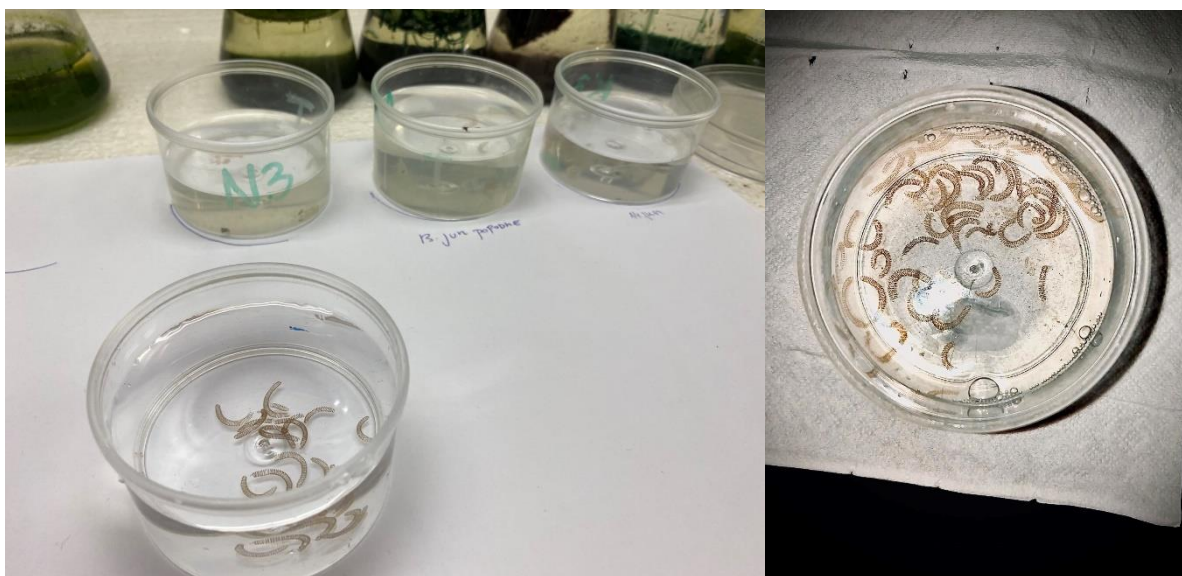
Вода у акваријумима мења се на максимално седам дана. Популација се сматра вијабилном уколико је способна да преживи шест месеци. Лабораторијску популацију је неопходно освежити, тако што се на три до шест месеци у постојећу популацију уводе нове јединке из природе како би се спречила појава инбридне депресије.

У циљу праћења свих параметара који су круцијални за одржавање вијабилне лабораторијске популације *C. riparius*, оформљен је лабораторијски дневник у коме се свакодневно уписују подаци који прате популационе параметре (број јаја, број лутки,

број одраслих женки и мужјака), услове средине (температура, аерација, замена воде), датум и потпис особе која је проверила стање популације.

3.5.2. Експерименталне јединке

Како би се обезбедила генетичка униформност експерименталних јединки, за сваки експеримент је одвајан пакет јаја који се посебно узгајао док ларве нису достигле жељени ларвени ступањ за експеримент, углавном први (слика 7). Ларве су затим пребачене пастеровом пипетом како би се могућност да дође до повреде јединки свеле на минимум. Овако добијене јединке коришћене су за процену акутне и хроничне токсичности наночестица. Акутни тест изведен је како би се утврдило да ли наночестице доводе до било каквих промена на хистолошком нивоу, а затим су хроничним експериментом анализирале хистопатолошке промене у циљу идентификације и дефинисања хистопатолошких биомаркера.



Слика 7. Пакети јаја врсте *C. Riparius* (аутор: Јелена Стојановић)

3.6. Дизајн експеримената

У оквиру дисертације постављено је три експеримената. На крају сваког од њих урађена је хистолошка анализа експерименталних јединки. Експерименти су спровођени по OECD (OECD, 2010b; OECD, 2011; OECD, 2023a, OECD, 2023b) протоколима који су у одређеној мери прилагођени како би се обезбедили одговарајући услови за све анализе након завршетка експеримента. Модификације и остали детаљи су објашњени у даљем тексту у оквиру описа сваког биолошког теста.

3.6.1. Хистолошка анализа различитих развојних стадијума *Chironomus riparius*

Стаклена тегла, запремине 700 ml, опрана је и стерилисана. Након стерилизације у теглу је пребачено 105 cm³ стерилног, небојеног, кварцног песка, гранулације 1-2 mm. Тегла је напуњена мешавином чесменске и дестиловане воде (1:1) и у њу је постављен грејач како би се одржавала константна температура од 23 °C ± 2 °C. Обезбеђен је сталан 16/8 фотопериод, уведен систем за аерацију и поставка је остављена 24 h како би се стабилизовали услови пре увођења организама. За потребе хистолошке анализе ларви четвртог ступња, и јединки у стадијуму препупе и пупе, селектован је један пакет јаја који је пребачен у теглу и редовно храњен. Узорковање јединки почело је након што су јединке достигле четврти ступањ ларвеног стадијума. По 10 јединки свакодневно је узорковано до првог излетања, а узорковане ларве, препупе и пупе фиксиране су у 70% етанолу.

3.6.2. Акутни тест са наночестицама оксида метала

Акутни тест реализован је у складу са смерницама OECD протокола бр. 235 (OECD, 2011). За експеримент су изабране ларве четвртог ступња, с обзиром на то да су оне најкрупније и одговарајуће за хистолошке анализе. Будући да ларве четвртог ступња захтевају седимент, обезбеђена им је адекватна подлога од кварцног песка. Стаклене тегле, запремине 700 ml, дијаметра дна 8 cm су претходно опране и стерилисане. Као подлога, коришћен је кварцни песак крупне гранулације 1-2 mm, небојен. Песак је опран и стерилисан у сувом стерилизатору 120 min на 160 °C. У сваку теглу додато је 105 cm³ седимента са умешаним наночестицама (у третманима) или без њих (у контроли). Концентрације наночестица коришћене у овом тесту су максималне дозе које нису показале никакав леталан ефекат на хирономиде у претходним студијама (Jovanović и сар., 2016b; Savić-Zdravković и сар., 2018; Savić-Zdravković и сар., 2019; Zdravković, 2020) и приказане су у табели 2.

Табела 2. Концентрације наночестица (g/kg седимента)

Контрола	/
TiO ₂	0,0525
CeO ₂	0,2625
Fe ₃ O ₄	0,0105

Теглама је затим додата мешавина чесменске и дестиловане воде у размери 1:1 до врха и оне су пребачене у водено купатило где је обезбеђена стална температура $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Такође, свакој тегли је обезбеђена аерација која је постављена на минимум 1 cm од седимента како би се избегла турбуленција. Експериментална поставка је припремљена 48 h пре пребацивања ларви како би се услови стабилизовали (слика 8).

Укупно 280 ларви четвртог ступња пребачено је у тегле, по десет у сваку теглу. Сваки од три третмана имао је осам поновака, док је контрола имала четири. Ларве су одмах након пребацивања нахрањене како би, уз храну, осигурали уношење седимента и наночестица. Експеримент је прекинут након 72 h, а ларве су конзервисане у 70% етанолу.



Слика 8. Изотермална комора са постављеним репликама за акутни екотоксиколошки тест (аутор: Јелена Стојановић)

3.6.3. Хронични тест са наночестицама оксида метала, микропластиком и LCFA

Хронични тест изведен је уз праћење смерница OECD протокола бр. 218 и бр. 219 (OECD, 2023a; OECD, 2023b). За сам експеримент коришћене су тегле истих димензија као и за акутни тест (поглавље 3.6.2.). Као подлога, коришћен је кварцни песак

гранулације 1-2 mm. Песак је опран и стерилисан у сувом стерилизатору 120 min на 160 °C. У сваку теглу додато је 105 cm³ седимента са умешаним честицама (у третманима) или без њих (у контроли). Концентрације коришћене у овом тесту су приказане у табели 3.

Концентрације наночестица оксида метала су максималне дозе које нису показале никакав леталан ефекат на ларве хирономида у претходним студијама (Јовановић и сар., 2016b; Savić-Zdravković и сар., 2018; Savić-Zdravković и сар., 2019; Zdravković, 2020), док је за микропластику коришћена концентрација која се сматра средински релевантном (Stanković и сар., 2020a). Услед недостатка информација о средински релевантним концентрацијама LCFA, емпиријски је одређена концентрација LC₂₀ (летална концентрација за 20% третираних ларви хирономида). Како би се одредила LC₂₀ концентрација коришћена је серија концентрација према OECD протоколу бр. 219 како је већ објашњено од стране Станковић и сар. (2022) (Stanković и сар., 2022; OECD, 2023b). За детерминацију LC₂₀ коришћен је софтвер „Risk Assessment Tool Analysis Software - RA V1.0.“, а концентрација конвертована у g/kg седимента.

Табела 3. Концентрације честица (g/kg седимента)

Контрола	/
TiO ₂	0,0525
CeO ₂	0,2625
Fe ₃ O ₄	0,0105
Микропластика	0,2
LCFA	0,0069

Теглама је затим додата мешавина чесменске и дестиловане воде у размери 1:1 до врха и оне су пребачене у водено купатило где је обезбеђена стална температура 23 °C ± 2 °C. Такође, свакој тегли је обезбеђена аерација која је постављена на минимум 1 cm од седимента како би се избегла турбуленција. Експериментална поставка је припремљена 48 h пре пребацивања ларви како би се услови стабилизовали.

Укупно 840 јединки првог ступња ларвеног стадијума пребачене су у 24 тегле, у сваку по 35. Сваки од третмана имао је четири поновка, укључујући и контролу. Ларве су храњене како би, уз храну, осигурали уношење седимента и честица из третмана. Експеримент је завршен када су ларве достигле четврти ступањ. Модификација

хроничног теста састојала се у ранијем прекиду експеримента због будућих анализа које су захтевале ларве четвртог ступња (слика 9).

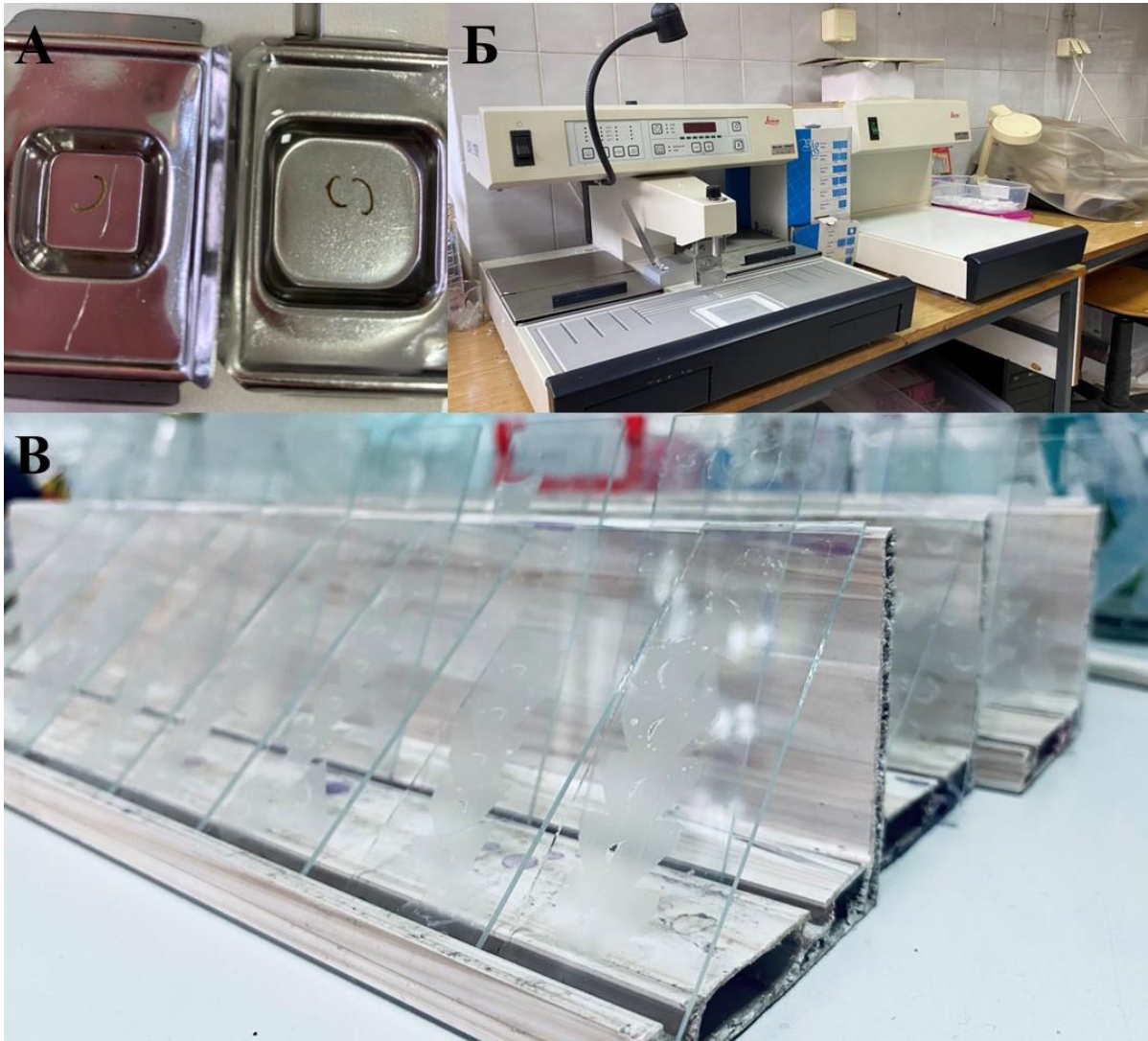


Слика 9. Изотермална комора са постављеним репликама за хронични екотоксиколошки тест (аутор: Јелена Стојановић)

3.7. Хистолошке анализе

Након завршетка акутног и хроничног теста, за хистолошку анализу узете су по пет јединке из сваког поновка, по случајном одабиру. Ларве су подвргнуте процесу дехидратације, провлачењем кроз серију растуће концентрације етанола (70%, 80%, 90%, 96%), при чему су јединке у свакој концентрацији алкохола стајале по 45 min са једном променом. Након дехидратације, уследило је избељивање толуеном, у коме су ларве биле потопљене 10 min. Узорци су затим пребачени у парапласт и остављени преко ноћи у термостату на температури од 54 °C. Парапласт је сутрадан промењен још два пута а затим је уследило калуљење ткива. Узорци су пребачени у металне калупе напуњене течним парапластом (слика 10А). Сваки узорак је оријентисан у калупу, покривен пластичном касетом, обележен и пребачен на хладну плочу (слика 10Б). Када се парапласт стегао, узорци су пребачени у фрижидер и сутрадан сечени на микротому.

Исечци дебљине 5 μm направљени су на микротому „Leica® RM 2125RT“, пребачени у водено купатило на исправљање а затим хватани чистим предметним плочицама. Плочице су обележене и остављене да се суше преко ноћи (слика 10В). Након 24 h се приступило бојењу узорака.

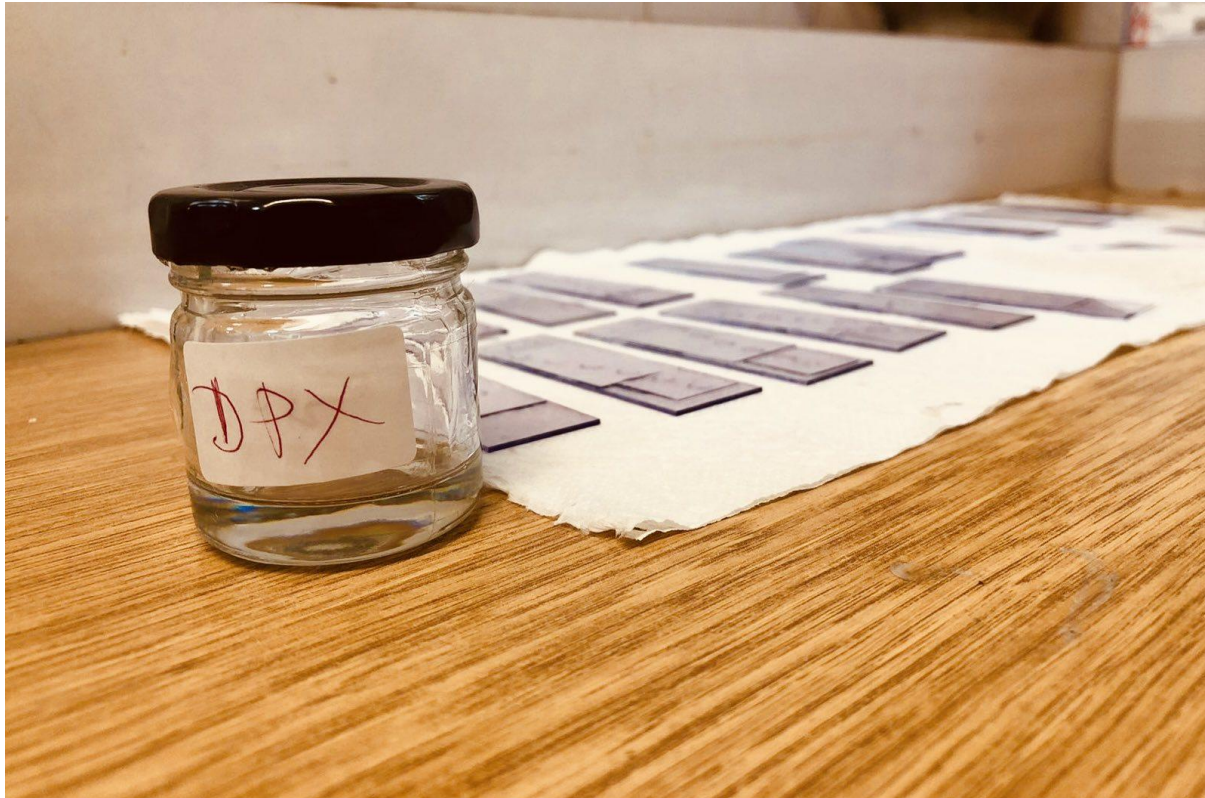


Слика 10. Хистолошка анализа. (А) ларве хириномида у металним калупима; (Б) апарат за калупљење и хладна плоча; (В) хистолошки пресеци ларви (аутор: Јелена Стојановић)

3.7.1. Бојење

Узорци су бојени хематоксилин и еозин методом (H&E метода). Плочице са исечцима су наређане у држач за бојење, пребачене у инкубатор на 60 °C и остављене да се депарафинишу 1 h. Узорци су затим потопљени у тоуол 10 min, а онда провучени кроз серију алкохола са опадајућом концентрацијом (100%, 96%, 80%) и на крају потопљени у дестиловану воду (dH_2O). Бојење узорака је најпре вршено хематоксилином у трајању од 5 min након чега су испрани текућом водом. Затим је уследило бојење еозином у

трајању од 2 min, испирање водом и дехидратација узорака серијом алкохола растуће концентрације. Након сушења, плочице са узорцима су потопљене у толуол, покривене покровним љуспицама уз коришћење DPX лепка и остављене да се суше (слика 11).



Слика 11. Готови хистолошки пресеци (аутор: Јелена Стојановић)

Трајање сваког корака у процедури бојења хистолошких препарата приказано је у табели 4.

Табела 4. Трајање појединачног корака у процесу бојења хистолошких препарата

Толуол	10 min
Етанол (100%)	2 min
Етанол (96%)	2 min
Етанол (80%)	2 min
dH ₂ O	2 min
Хематоксилин	5 min
Текућа вода	5 min
Еозин	2 min
dH ₂ O	2 min
Етанол (80%)	2 min
Етанол (96%)	2 min
Етанол (100%)	2 min

Сушење	5 min
Толуол	10 min

3.7.2. Микроскопска анализа хистолошких пресека

Препарати хистолошких пресека ларви хирономида посматрани су и анализирани микроскопима Leica DM 1000 i Leica DM 2500.

У оквиру акутног теста квалитативна анализа пресека се састојала у дескриптивној анализи архитектуре ткива нетретираних јединки као и детекцији очигледних промена и појава у ткивима третираних јединки и њиховом поређењу са контролом. Квантитативна анализа подразумевала је анализирање сва три региона средњег црева и морфометријско мерење различитих параметара епителних ћелија црева. Морфометријско мерење урађено је у програму ImageJ® (Schneider и сар, 2012). Код сваке јединке, анализирано је по десет дигестивних ћелија у сваком региону средњег црева. Од параметара мерена је површина ћелија (ПЋ) и дужина микровила (ДМ) који јој припадају и одређиван је однос између њих (ДМ/ПЋ).

Микроскопска анализа у хроничном тесту урађена је по већ објашњеној методи коришћеној у акутном тесту. Модификација састојала се у додатној анализи параметра „дужина микровила“ који је за разлику од ДМ/ПЋ односа пратио дужину четкасте ивице независно од површине ћелије којој припада.

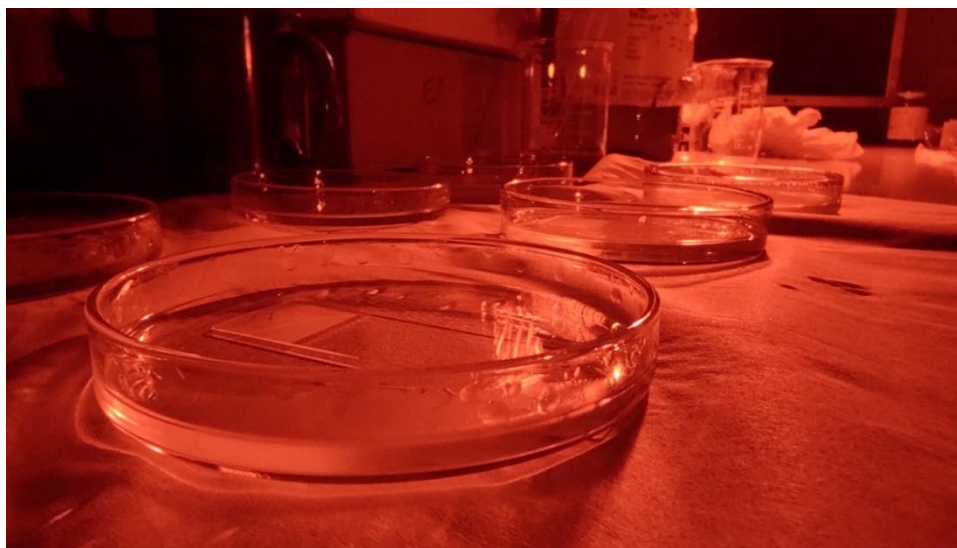
3.8. Физичко-хемијски параметри воде

Физичко-хемијски параметри измерени су на почетку и на крају експеримената према препорукама OECD 233 (OECD, 2010). Од параметара у акутном тесту посматрани су рН вредност, концентрација O_2 и проводљивост, који су мерени на теренском апарату „Multi 3420 SET G“. У хроничном тесту анализа је проширена и укључивала је и мерење концентрације калцијум-карбоната ($CaCO_3$), N, амонијака (NH_3) и амонијум катјона (NH_4) која је извршена на апарату „Lovibond® Water Testing“.

3.9. Комет тест

У оквиру хроничног теста праћена је генотоксичност тестираних нано- и микрозагађивача која је анализирана уз помоћ електрофорезе појединачних ћелија на гелу која се још назива и комет тест. За ову методу коришћен је протокол из Bernabò и сар. (2017) уз модификацију, односно без изолације појединачних ћелијских линија. Као

позитивна контрола служиле су ларве које су третиране 20 mM H₂O₂ у трајању од 1 h, док су као негативна контрола коришћене нетретиране ларве. По десет јединки из сваког поновка су хомогенизоване помоћу авана и тучка, а затим су испране кроз филтер за ћелије у микротубе (Eppendorf) запремине 1,5 ml коришћењем 1,5 ml пуфера за суспензију ћелија. Узорци су затим центрифугирани 15 min на 1.500 rpm на температури од 4 °C. Супернатант је избачен, а пелет је ресуспендован у 300 µl пуфера за суспензију. Ћелијска суспензија је разблажена на концентрацију од 1000 ћелија/µl и 30 µl ове суспензије је помешано са 70 µl 1% агарозе са ниском тачком топљења произвођача „Sigma-Aldrich“. Од овако направљене финалне суспензије, по 70 µl је пренето на микроскопске плочице, које су претходно пресвучене танким слојем 1% агарозе са нормалном тачком кључања, покривено покровном љуспом димензија 24 * 32 cm и остављено 5 min на 4 °C како би се гел са ћелијском суспензијом стегао. Плочице су потопљене у пуфер за лизу (Tris 10 mM, EDTA 100 mM, NaCl 2.5 M, DMSO 10%, Triton X-100 10%, pH = 10) и остављене у фрижидеру преко ноћи. Како би се спречио негативан утицај светлости на ДНК молекула из лизираних ћелија, следећи кораци изведени су у мраку под тихом црвеном светлошћу (слика 12). Сутрадан, плочице су потопљене у алкални пуфер за денатурацију 45 min на 4 °C, при чему је пуфер мењан на сваких 15 min, а затим наређане у кадицу за електрофорезу и изложене електричном пољу 1 V/cm, 300 mA у трајању од 25 min у пуферу за денатурацију. Након завршене електрофорезе, плочице су испране дуго дестилованом водом (ddH₂O) и остављене да се суше преко ноћи.



Слика 12. Комет тест са ларвама четвртог ступња излаганим тестираним честицама: потапање плочица у алкални пуфер под црвеним светлом (аутор: Јелена Стојановић)

3.9.1. Бојење и анализа плочица комета теста

Процедура бојења и анализе процента оштећене ДНК урађена је на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“. Плочице су бојене коришћењем 20 μ l боје GelGreen, произвођача „Biotium“ и анализирани на флуоресцентном микроскопу „Leica DM4 B“ на увећању од 400, и уз помоћ ексцитационог филтера опсега 450-490 nm и баријерног филтера од 510 nm. На свакој плочици скоровано је по 50 једра коришћењем софтвера „TriTek CometScore Pro 2.0.0.38 Software“ (TriTek Corp., Sumerduck, USA). Као мера оштећења ДНК молекула узет је интензитет репа (енг. *tail intensity*, TI%)

3.10. Оксидативни стрес

Анализа ензима оксидативног стреса у хроничном тесту извршена је на Департману за Биохемију, Медицинског факултета, Универзитета у Нишу. По пет ларви из сваког поновка су хомогенизоване у 1,25 ml Tris-EDTA (TE, pH 7,8) пуферу и центрифугиране 15 min на 500 G (RCF). Супернатант је пребачен у нове тубице и поново центрифугиран 30 min на 12.000 G (RCF). Финални супернатант је коришћен за анализу параметара оксидативног стреса: концентрација реактивних супстанци тиобарбитурне киселине (енг. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS), количина протеинских продуката оксидације (енг. *advanced oxidation protein products*, AOPP), активност каталазе (енг. *catalase activity* CAT) и активност супероксид дисмутазе (*superoxide dismutase activity*, SOD).

Укупна концентрација протеина је анализирана коришћењем Ловри методе (Lowry и сар., 1951), са говеђим серумом албумином као стандардом.

Липидна пероксидација је одређена мерењем концентрације TBARS које настају реакцијом тиобарбитурне киселине (енг. *thiobarbituric acid*, TBA) и малондиалдехида (енг. *malondialdehyd*, MDA) (Andreeva и сар., 1988). Концентрација пинк хромогена мерена је спектрофотометријски на 532 nm уз помоћ „Multiscan Ascent 96/384“ спектрофотометра (Thermo Labsystems). За одређивање TBARS концентрације коришћен је $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ коефицијент екстинкције и резултати су представљени у $\mu\text{mol/l}$, а затим конвертовани у μmol TBARS по mg укупних протеина.

Концентрација AOPP је такође је одређена спектрофотометријски, при чему је за калибрацију коришћен хлорамин-Т раствор, који апсорбује светлост таласне дужине $\lambda = 340 \text{ nm}$ у присуству калијум-јодида (Witko-Sarsat и сар., 1996). Резултати су изражени у

$\mu\text{mol/l}$ хлорамина-Т еквивалената и на крају преведени у $\mu\text{mol AOPP}$ по mg укупне концентрације протеина.

Активност CAT је одређена на основу њене способности да разложи H_2O_2 , при чему је ензимска реакција прекинута додавањем амонијум молибдата (Góth и сар., 1991). Резултирајући комплекс H_2O_2 и молибдата, жуте боје, мерен је спектрофотометријски на таласној дужини од 405 nm у односу на пробу. Активност ензима изражена је у U/l и конвертована у U CAT по mg укупних протеина.

Активност SOD је одређена мерењем формазан-обојеног продукта који настаје у реакцији између нитроплаво тетразолијума (енг. *nitroblue tetrazolium*, NBT) и супероксид анјона продукованог аутооксидацијом пирогалолола (Minami и Yoshikawa, 1979). Резултати мерења изражени су у U/l и онда конвертовани у U SOD по mg укупних протеина. Једна јединица SOD активности дефинисана је као количина ензима која има способност да изазове 50% инхибиције аутооксидације пирогалолола.

3.11. Концентрација хемоглобина

Концентрација хемоглобина урађена је према методи описаној од стране Станковић и сар. (2020b). Након прекида експеримента, пет свежих ларви четвртог ступња су декапитоване и хемолимфа је узоркована коришћењем капиларне тубе. Узорци су анализирани фотометријски на аутоматском хематолошком анализатору „Medonic M16M/M20M, Sweden“. Резултати су представљени као g/l хемолимфе.

3.12. Статистичка анализа података

3.12.1. Акутни тест

Статистичка разлика дужине микровила у акутном тесту између контролне групе и третираних ларви анализирана је уз помоћу непараметарске алтернативе т теста, Ман-Whitney теста коришћењем „SPSS“ софтвера, пакет „Ver. 13.0“ за Windows. Ниво значајности подешен је на $p < 0,05$.

3.12.2. Хронични тест

Како би се анализирила разлика између контроле, третмана са TiO_2 , CeO_2 , Fe_3O_4 , микропластиком и LCFA, за дужину микровила, ПТ/ДМ однос и ТП% коришћена је једнофакторска ANOVA, док је за пост хок упоређивање контроле са сваким третманом понаособ коришћен Дунет тест (енг. *Dunnnett's test*). За одређивање разлике између

контроле и поменутих третмана за параметре оксидативног стреса и концентрацију хемоглобина коришћен је Man-Whitney тест. Све статистичке анализе урађене су у „SPSS“ софтверу, пакет „Ver. 13.0“ за Windows.

Резултати мерења комета теста анализирани су коришћењем ANOVA теста и Дунет теста за пост хок поређење, док је за анализу резултата оксидативног стреса и концентрације хемоглобина коришћен Kruskal-Wallis тест, као и Man-Whitney теста за пост хок поређење.

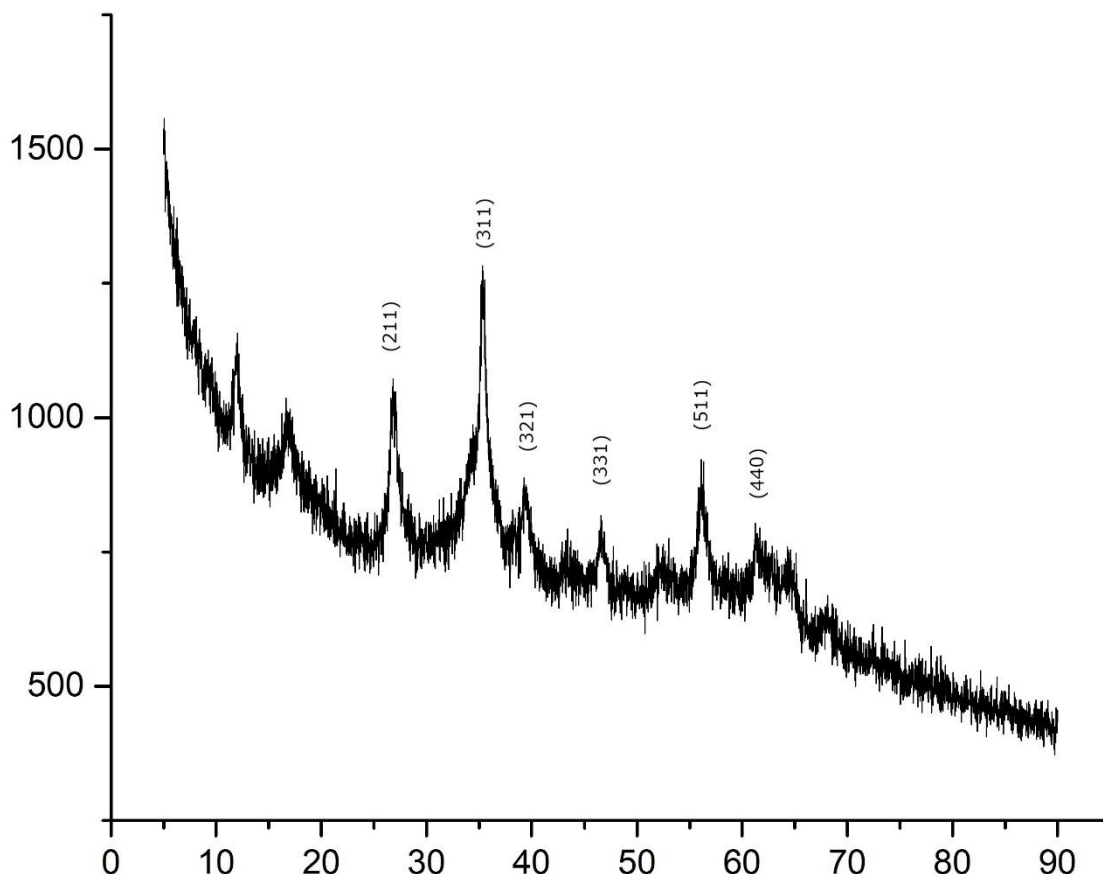
Поглавље 4

Резултати

4.1. Карактеризација честица

4.1.1. Наночестице Fe_3O_4 коришћене у хроничном тесту

XRD дифрактограм наночестица Fe_3O_4 показао је присутност аморфне и кристалне фазе у узорку наночестица. Пикови који одговарају кристалним равнима (211), (311), (321), (331), (511) и (440) су присутни и оштри (слика 13). Величина кристалита израчуната на основу Debye-Scherrer једначине за пик на $35,34^\circ 2\Theta$ износила је око 2 nm.



Слика 13. XRD дифрактограм наночестица Fe_3O_4

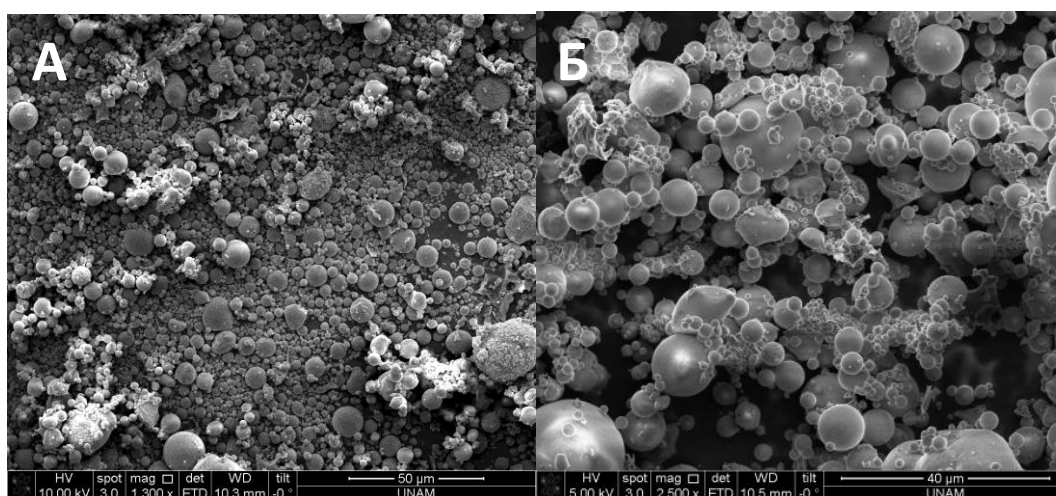
4.1.2. LCFA

Хемијски састав LCFA анализиран је уз помоћ XRF пре и после испирања као што је приказано у табели 5. LCFA је испран dH_2O на 50°C и раствор је мешан на магнетној мешалици 4 h на 350 - 400 rpm. Ратвор је затим исфилтриран кроз Whatmann филтер папир. Процедура је поновљена три пута док није добијен бистар супернатант. С обзиром на то да LCFA поседује хидросолубилне минерале и соли хлора (Cl), испирање је изведено како би се ове соли уклониле. LCFA пре испирања је процентуално садржао 53,19% силицијум диоксида (SiO_2), 27,86% алуминијум оксида (Al_2O_3), 7,02 % гвожђе

(III) оксида (Fe_2O_3), и 11,93% осталих оксида. Садржај Si и Al је био у благом порасту након испирања, док је проценат оксида гвожђа опао. Највећа промена након испирања примећена је у морфологији самих честица. Како је приказано на слици 14, процес испирања водом обезбеђује уклањање нечистоћа у облику минерала који су депоновани на површини LCFA честица након чега се добије глатка површина истих. Према резултатима EDX, проценат тежине елемената као што су Ca, магнезијум (Mg) и натријум (Na) био је већи на LCFA пре испирања у поређењу са LCFA након испирања (табела 5). Анализа величине честица LCFA SEM микроскопијом на површини од $20 \mu\text{m}^2$ показала је варијацију величине честица између $0,5 \mu\text{m}$ и $120 \mu\text{m}$. Специфична површина LCFA мерена BET анализом била је $173,18 \text{ m}^2/\text{g}$ а преобладајући дијаметар пора кретао се између 1,9 и 2 nm.

Табела 5. Хемијски састав LCFA пре и после испирања dH_2O измерена уз помоћ XRF.

Тежински удео (%) (Без супстанци испод 1%)	LCFA пре испирања	Након испирања (Дестилована вода на 50°C)
SiO_2	53,193	55,021
Al_2O_3	27,860	28,289
Fe_2O_3	7,018	6,2488
K_2O	4,500	5,1300
MgO	2,068	1,9201
CaO	1,818	1,6317
TiO_2	1,232	1,2182



Слика 14. SEM микрографија (А) LCFA пре испирања и (Б) након испирања dH_2O на 50°C

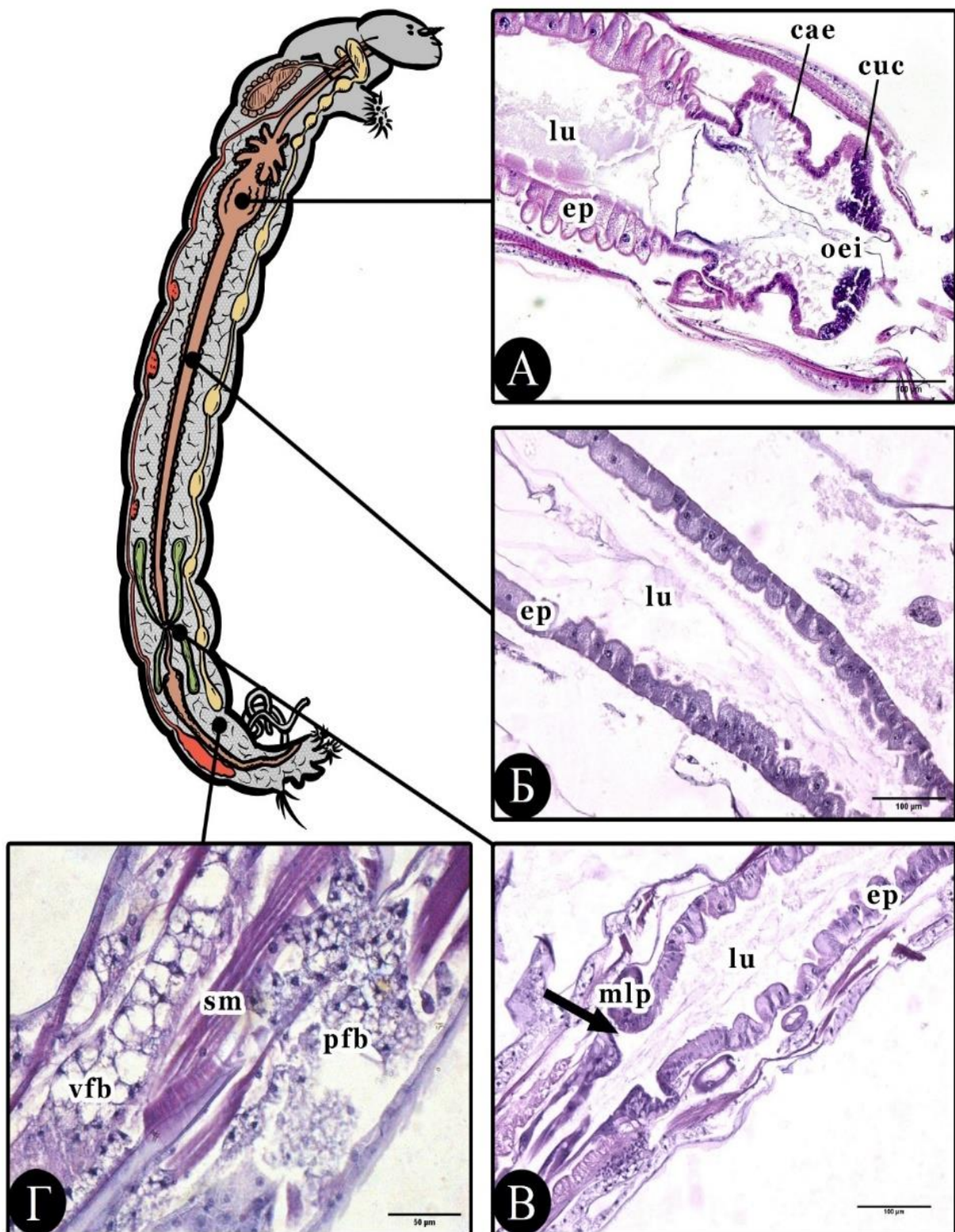
4.2. Хистолошка анализа нетретираних ларви *Chironomus riparius*

Хистолошка анализа нетретираних ларви обухватала је дигестивни систем, систем за екскрецију и масно ткиво. У оквиру дигестивног система могу се издвојити три региона: предње, средње и задње црево. Предње црево почињало је устима, а завршавало се у метатораксу на месту езофагеалне инвагинације. Езофагус састојао се од пљоснатих ћелија са великим нуклеусом које су била окружене ћелијама глатког мишићног ткива. На граници између предњег и средњег црева налазио се стомодеални залистак са езофагеалном инвагинацијом. У наставку су се пружале „*Cuénot*“ ћелије које су поседовале јако базифилну цитоплазму и крупан нуклеус са кондензованим хроматином, на шта су се надовезивали дивертикулуми предњег дела средњег црева, организовани у прстен (слика 15А).

У оквиру средњег црева разликовала су се три региона на основу облика ћелија. Ћелије I региона биле су ирегуларног облика, заобљене базе и конвексног врха са краћим четкастим ободом (слика 15А). Регион II су сачињавале кубичне ћелије са базифилном цитоплазмом, крупним нуклеусом са кондензованим хроматином и дужим четкастим ободом (слика 15Б). Ћелије III региона биле су сличне онима из II региона али видљиво мање и са краћим четкастим ободом (слика 15В).

Прелаз између средњег и задњег црева био је обележен проктодеалним зализком изграђеним од цилиндричних базифилних ћелија. На овом месту уливале су се Малпигијеве цевчице. Задње црево састојало се из илеума, колоне и ректума који су били сличне ћелијске структуре као езофагус. Малпигијеве цевчице биле су изграђене од једног слоја плочастих ћелија са нуклеусом који се пројектовао у лумен самих цевчица (слика 15В).

Масно ткиво хирономида пронађено је дуж целог тела ларви у две форме, висцерално масно ткиво (ВМТ) које је покривало висцералне органе, и паријетално масно ткиво (ПМТ) које је било смештено између епидермиса и интерсегменталних мишића. Обе форме масног ткива биле су изграђене од трофоцита, масних ћелија са вакуолизираном цитоплазмом и перинуклеарним регионом који је једини поседовао афинитет према хематоксилину. Трофоцити ВМТ били су крупнији, док су трофоцити ПМТ били ситнији, збијенији и у вези са интегументом ларве (слика 15Г).



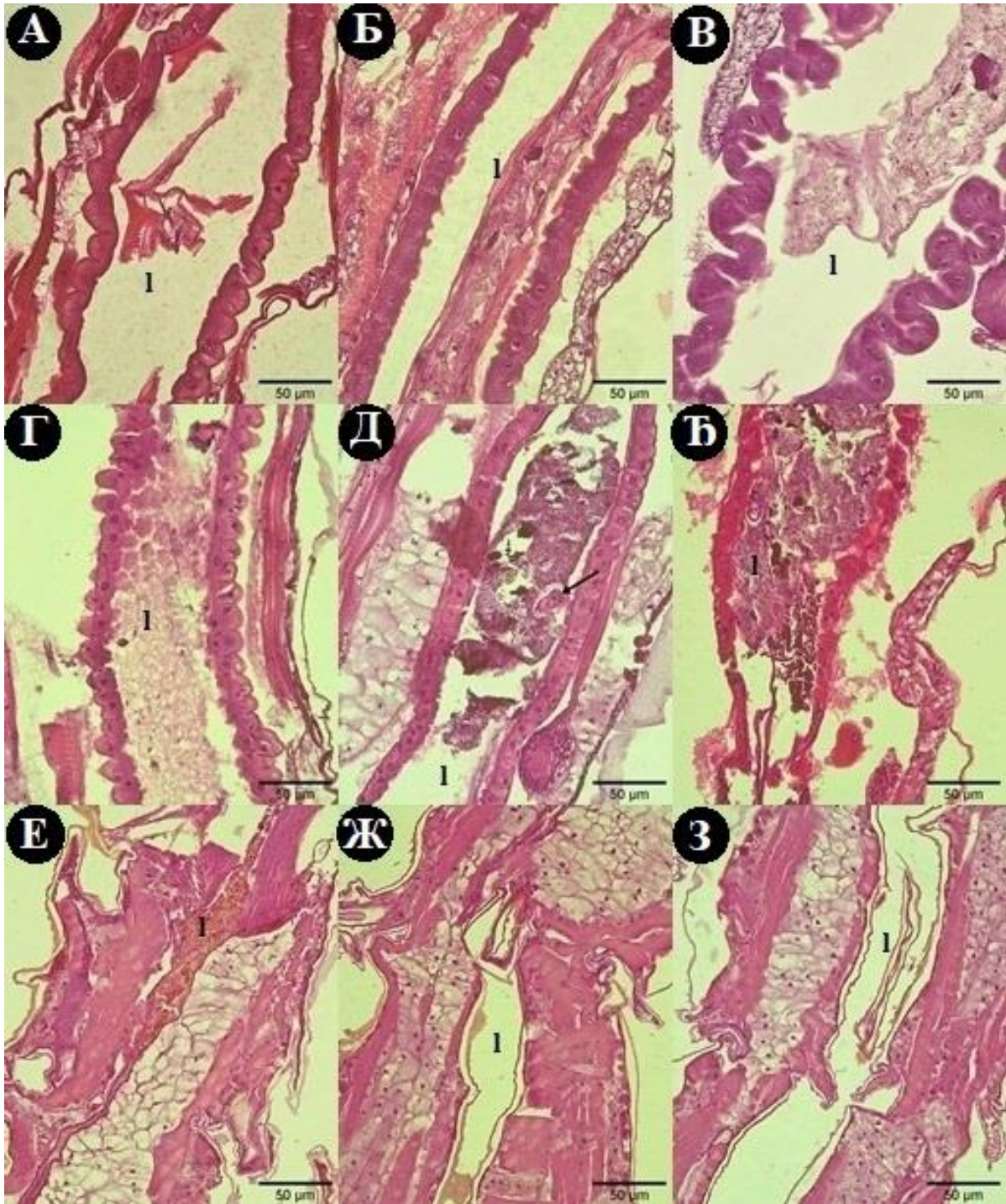
Слика 15. Дигестивни систем, екскреторни систем и масно ткиво нетретираних ларви. А - Лонгитудинални пресек региона I средњег црева који приказује ћелијску организацију структура на преласку предњег у средње црево; Б – Лонгитудинални пресек региона II средњег црева; В – лонгитудинални пресек проктодеалног залиска који приказује место инсерције Малпигијевих цевчица

(стрелица) и епителне ћелије региона III средњег црева; Г – лонгитудинални пресек који приказује масно ткиво. сае: цревни дивертикулуми (енг. *gastric caeca*); сус: Cuénot ћелије (енг. *Cuénot cells*); е: епителне ћелије средњег црева (енг. *epithelial cells of the midgut*); лу: лумен (енг. *lumen*); млр: Малпигијеве цевчице (енг. *Malpighian tubules*); оеи: езофагеална инвагинација (енг. *esophagus invagination*); рfb: паријетално масно ткиво (енг. *parietal fat body*); см: глатко ткиво (енг. *smooth muscle*); vfb: висцерално масно ткиво (енг. *visceral body fat*). Слика преузета из рада Стојановић и сар. (2021).

4.3. Хистолошка анализа различитих развојних стадијума

Chironomus riparius

Од укупно 50 анализираних јединки, 10 су биле ларве четвртог ступња, 22 јединке у стадијуму препупе и 18 у стадијуму пупе. Анализа хистолошких препарата препупе и пупе показале су промене у архитектури ткива алиментарног канала током процеса улуткавања. Поређењем I региона средњег црева између анализираних стадијума, уочена је појава двојслојног епитела код препупе (слика 16А, Г). У II региону стадијума препупе уочен је пар обложених ћелија које су се налазиле у лумену, одвојене од епителног слоја црева (слика 16Д). Регион III средњег црева стадијума препупе изгубио је инвагинације које су уочљиве у ларвалном стадијуму (слика 16В, Ђ). Средње црево пупе поседовало је другачију морфологију цревног епитела у сва три региона (слика 16Е, Ж, З). Епителни слој био је видљиво тањи, а ћелије су изгубиле свој облик карактеристичан за ларвени стадијум. Лумен црева пупе био је ужи и без садржаја у поређењу са претходна два анализираних стадијума, ларве и препупе.



Слика 16. Фотомикрографија средњег црева једники *C. riparius* у различитим фазама развојних стадијума. А-В – I, II и III регион четвртог ларвеног ступња, редом; Г-Ђ – I, II и III регион стадијума препупе, редом; Е-З – I, II и III регион стадијума пупе, редом. Стрелица (Д) показује обложен пар ћелија који се пројектује у лумен црева l (енг. *lumen*). Слика преузета из рада Стојановић и сар., 2023.

4.4. Акутни тест са наночестицама оксида метала

Акутни тест је трајао 48 h, а забележена стопа морталитета на крају експеримента била је 0% у свим групама. Ларве на крају експеримента налазиле су се у четвртом супњу, међутим, у појединим групама се одређен проценат ларви улуткао (табела 6).

Табела 6. Процент лутки (пупа) у укупном броју јединки по третману.

Третман	Процент пупа (%)
Контрола	0,032
Наночестице TiO_2	0,04
Наночестице CeO_2	0,021
Наночестице Fe_3O_4	0,021

4.4.1. Физичко-хемијски параметри воде

Резултати мерења физичко-хемијских параметара воде показали су да су вредности у оквиру препорука ОЕСД протокола (табела 7).

Табела 7. Вредности физичко-хемијских параметара воде у теглама пре почетка и на крају експеримента.

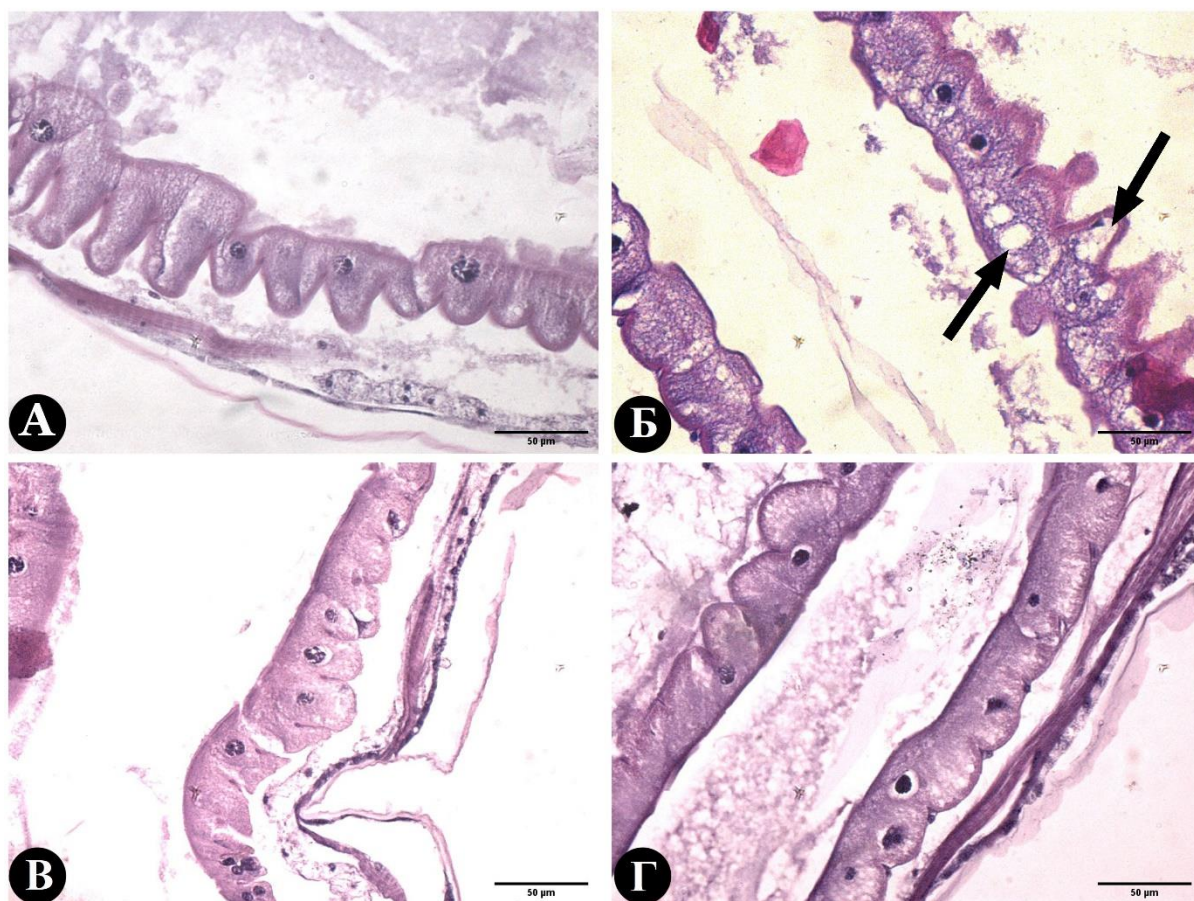
	почетак/крај експеримента	pH	O ₂ (mg/l)	O ₂ (%)	проводљивост ($\mu S/cm$)	T (°C)
Контрола	почетак	7,2	8,80	101,69	199,4	22
	крај	6,58	7,92	95,47	288	23,4
TiO_2	почетак	7,52	8,73	100,69	180,6	22
	крај	6,01	8,52	100,32	265	22,5
CeO_2	почетак	7,51	8,65	100	209	22,5
	крај	6,6	7,3	88,09	295	23,5
Fe_3O_4	почетак	7,5	8,59	99,15	207	22,2
	крај	6,22	6,6	79,71	299	23,1
МП	почетак	7,35	8,57	98,54	207	21,5
	крај	6,38	7,2	87,06	285	23,2
LCFA	почетак	7,41	8,64	98,95	195	21,8
	крај	6,6	8,31	95,17	250	23,2

4.4.2. Хистолошка анализа

Анализом ткива дигестивног система, система за екскрецију и масног ткива откривене су промене у свим третираним групама. Алтерације у дигестивном систему

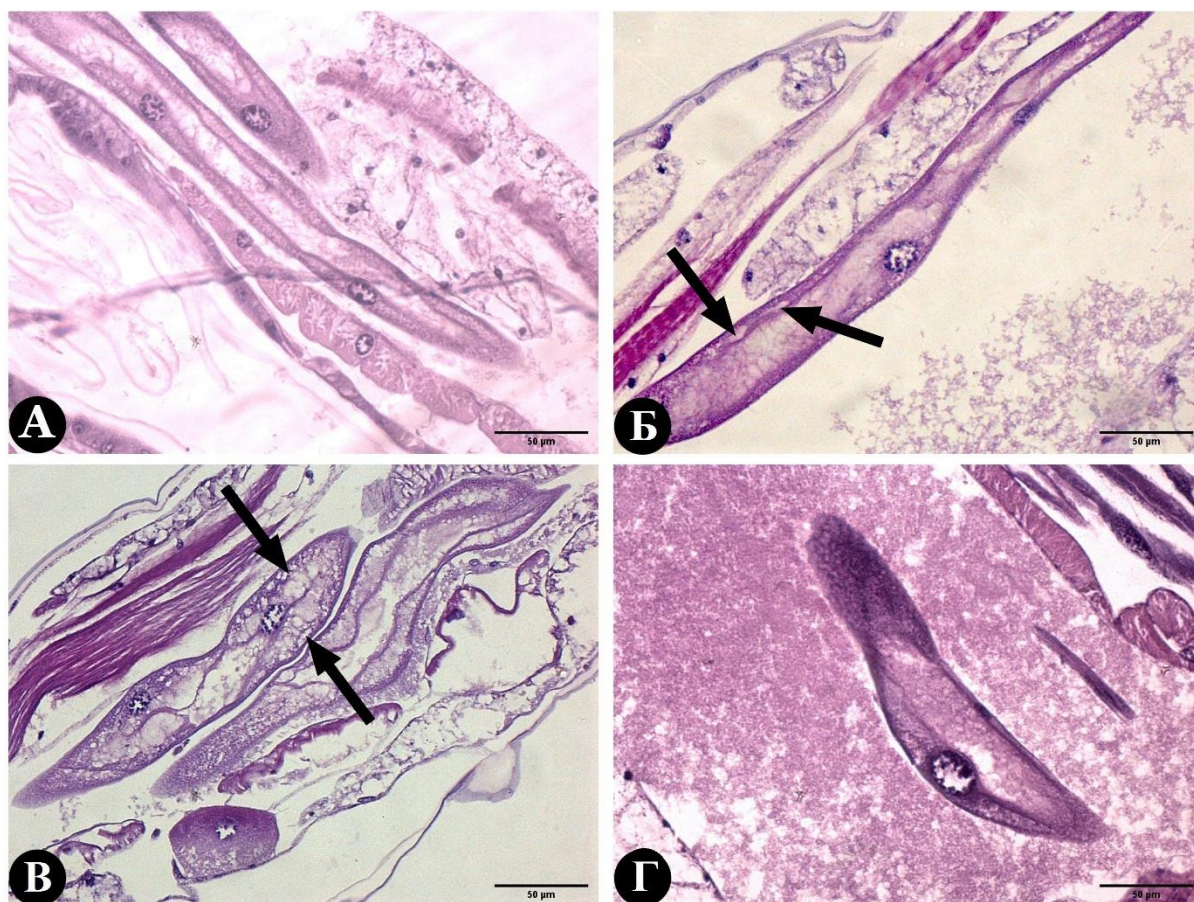
су детектоване у средњем цреву у I и II региону. Ларве третиране сублеталним дозама наночестица Fe_3O_4 , показале су промене и у I региону, што није био случај са осталим третманима. Контролна група је у I региону поседовала епителне ћелије ирегуларног облика, са еозинофилним базалном и апикалном ивицом, грануларном цитоплазмом и крупним, округлим нуклеусом кондензованог хроматина. Уочен је и четкаст обод окренут ка лумену црева.

Ларве третиране наночестицама Fe_3O_4 поседовале су различит ниво вакуолизације I региона средњег црева. Крупне вакуоле уочене су у базалном и апикалном делу ћелије код 17/40 третираних јединки. Дигестивне ћелије I региона код ларви третираних наночестицама CeO_2 и TiO_2 биле су сличне онима из контролне групе (слика 17).



Слика 17. Хистолошке промене у I региону средњег црева. А – контролна група са ирегуларним дигестивним ћелијама; Б – група третирана наночестицама Fe_3O_4 у којој је присутна вакуолизација дигестивних ћелија (стрелица); В – група третирана наночестицама CeO_2 ; Г – група третирана наночестицама TiO_2 . Слика преузета из рада Стојановић и сар., 2021.

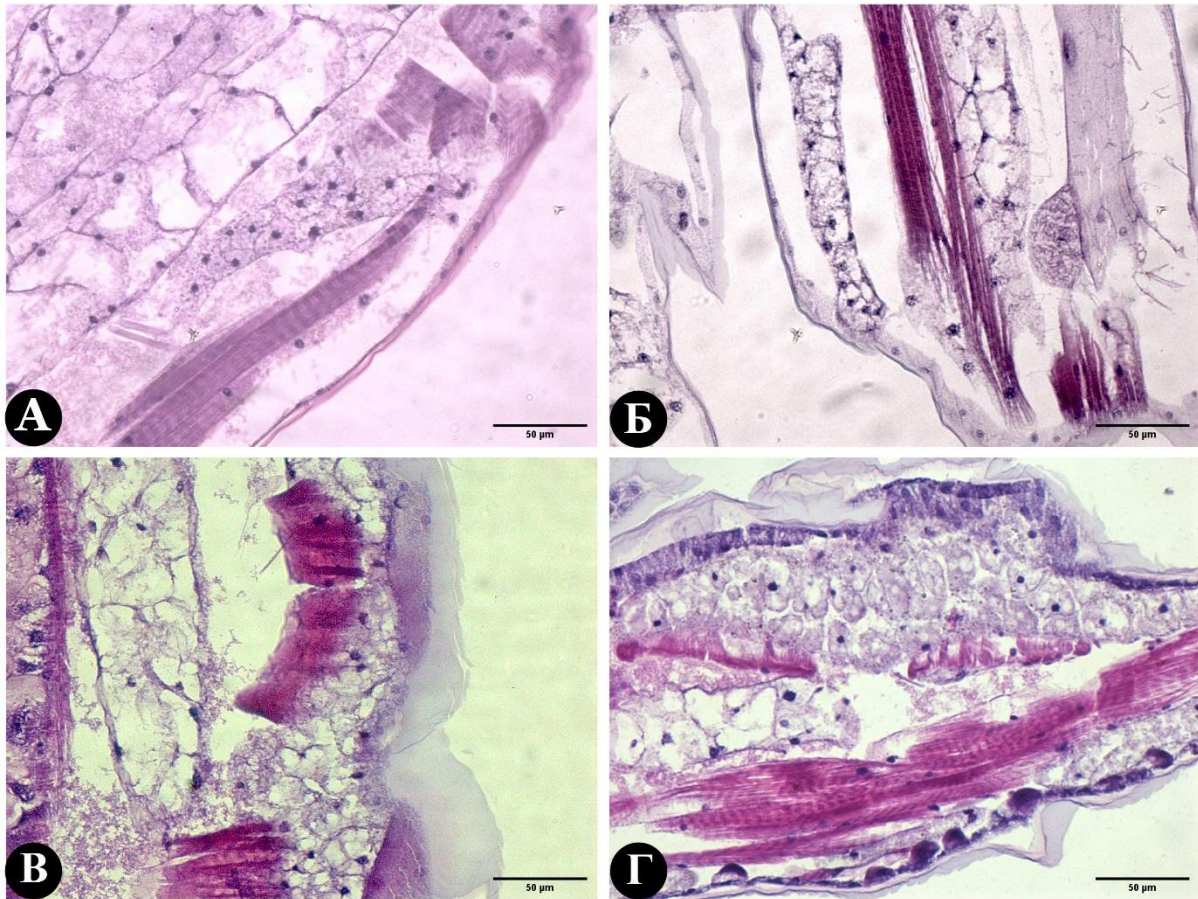
Хистолошка анализа Малпигијевих цевчица показала је промене у епителним ћелијама овог екскреторног органа код ларви третираних наночестицама Fe_3O_4 и CeO_2 . У овим групама, детектована је врло јасна вакуолизација Малпигијевих честица код 21/40 индивидуа у групи третираној са нано- Fe_3O_4 и код 19/40 индивидуа третираних са нано- CeO_2 . Ларве третиране наночестицама TiO_2 нису показале вакуолизацију Малпигијевих цевчица. Ови екскреторни органи у контроли били су изграђени од једног слоја плочастих ћелија са грануларном цитоплазмом и крупним једром који се пројектовао у лумен цевчица (слика 18).



Слика 18. Хистолошке промене на Малпигијевим цевчицама. А – Малпигијеве цевчице контролне групе; Б – група третирана наночестицама Fe_3O_4 у којој је присутна вакуолизација епитела Малпигијевих цевчица (стрелица); В – група третирана наночестицама CeO_2 у којој је присутна вакуолизација епитела Малпигијевих цевчица (стрелица); Г – група третирана наночестицама TiO_2 у којој није детектована вакуолизација. Слика преузета из рада Стојановић и сар., 2021.

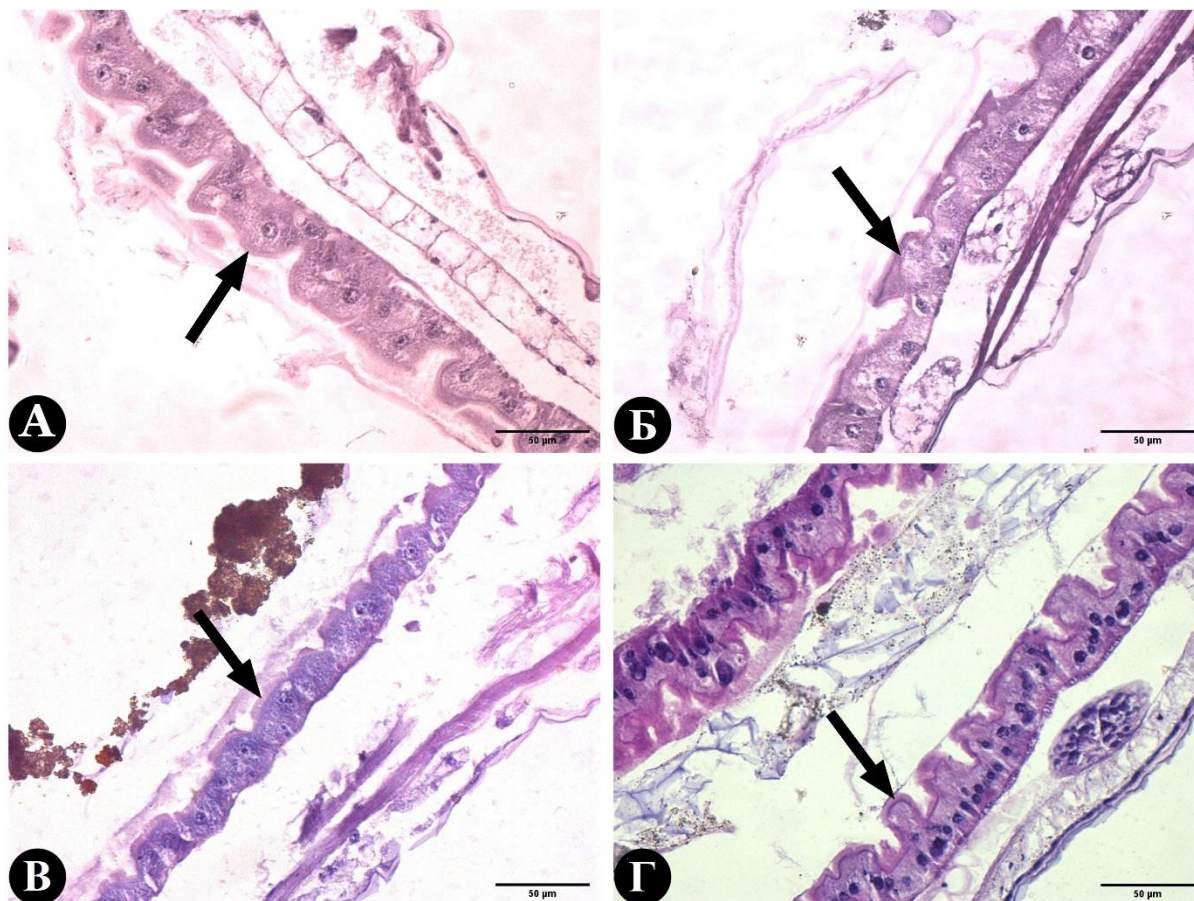
Промене у морфологији ћелија масног ткива уочене су у третману са нано- TiO_2 , где је 20/40 анализираних индивидуа показало измене у ПМТ. Трофоцити овог масног ткива били су округлији у односу на оне из контролне групе и међусобно одвојени са

јасно видљивим међућелијским простором. ПМТ контролне групе, као и група третираних наночестицама Fe_3O_4 и CeO_2 састојало се од полигоналних трофоцита са вакуолизираном цитоплазмом и ситним нуклеусом (слика 19).



Слика 19. Хистолошке промене на трофоцитима ПМТ. А – контролна група у којој су трофоцити мали, груписани и полигоналног облика; Б – група третирана наночестицама Fe_3O_4 и В – група третирана наночестицама CeO_2 са ПМТ сличним контролној групи; Г – група третирана наночестицама TiO_2 у којој су трофоцити заобљени и раздвојени са видљивим интерцелуларним простором. Слика преузета из рада Стојановић и сар., 2021.

Код 11/20 ларви код којих су детектоване промене у ПМТ, уочене су промене и у II региону средњег црева. Ове промене су се огледале у видљиво већем броју епителних ћелија које су биле збијеније у односу на оне из контроле (слика 20).



Слика 20. Хистолошке промене у II региону средњег црева. А – контролна група у којој су присутне кубичасте епителне ћелије са четкастом ивицом (стрелица); Б – група третирана наночестицама Fe_3O_4 и В – група третирана наночестицама CeO_2 у којима су присутне епителне ћелије са четкастом ивицом (стрелица) сличне онима у контролној групи; Г – група третирана наночестицама TiO_2 у којој је присутан већи број епителних ћелија, издужених ка лумену. Слика преузета из рада Стојановић и сар., 2021

Мерењем дужине четкастог обода примећено је значајно скраћивање микровила у групи третираној наночестицама Fe_3O_4 , док ове варијације у другим третманима није било (Mann-Whitney test, $P < 0.05$).

4.5. Хронични тест са наночестицама оксида метала, микропластиком и LCFA

4.5.1. Физичко-хемијски параметри воде

Резултати мерења физичко-хемијских параметара воде показали су да су вредности у оквиру препорука OECD протокола (табела 8 и 9).

Табела 8. Вредности физичко-хемијских параметара воде у теглама пре почетка и на крају експеримента.

	почетак/крај експеримента	pH	O ₂ (mg/l)	O ₂ (%)	проводљивост (μS/cm)	T (°C)
Контрола	почетак	7,3	8,61	99,5	198,2	21
	крај	6,31	7,25	87,4	286	23,4
TiO ₂	почетак	7,26	8,6	99,2	182,5	21
	крај	5,8	8,34	98,2	263	23,5
CeO ₂	почетак	7,46	8,65	100	210	21
	крај	6,5	7,35	88,7	291	23,5
Fe ₃ O ₄	почетак	7,5	8,62	99,5	204	21,2
	крај	6,24	6,64	80,2	293	23,2
МП	почетак	7,4	8,61	99	203	21
	крај	6,4	7,12	86,1	288	24,2
LCFA	почетак	7,26	8,64	99,3	193,4	20,8
	крај	6,46	8,28	105,2	252	26,5

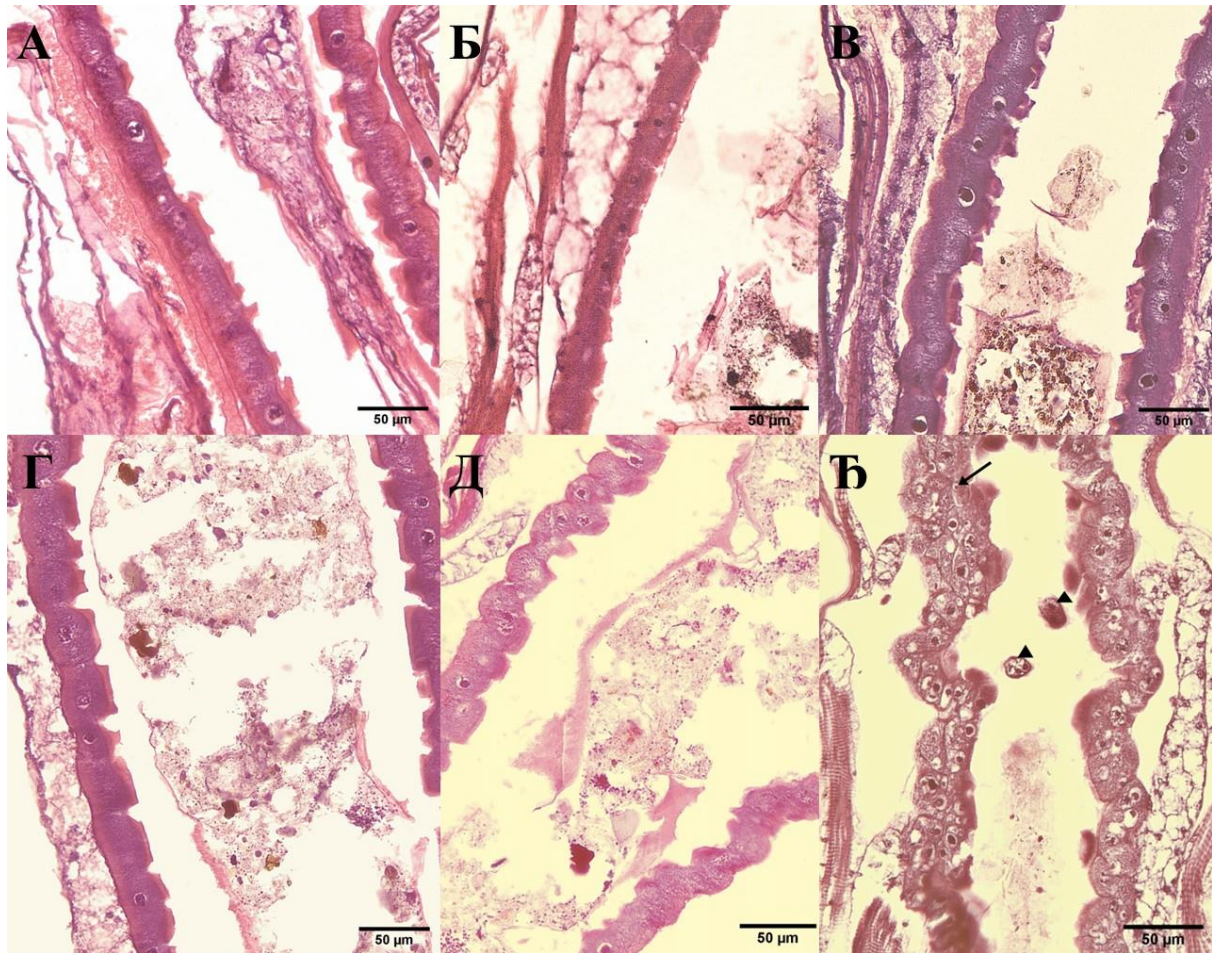
Табела 9. Вредности хемијских параметара воде у теглама пре почетка и на крају експеримента.

	почетак/крај експеримента	CaCO ₃ (mg/l)	N (mg/l)	NH ₃ (mg/l)	NH ₄ (mg/l)
Контрола	почетак	235	0,29	0,3538	0,3741
	крај	260	overrange>2,5	overrange	overrange
TiO ₂	почетак	230	0,23	0,2806	0,2967
	крај	235	overrange>2,5	overrange	overrange
CeO ₂	почетак	230	0,34	0,4148	0,4386
	крај	280	overrange>2,5	overrange	overrange
Fe ₃ O ₄	почетак	275	0,27	0,3294	0,3483
	крај	245	overrange>2,5	overrange	overrange
МП	почетак	270	0,27	0,3294	0,3483
	крај	270	overrange>2,5	overrange	overrange
LCFA	почетак	235	0,22	0,2684	0,2838
	крај	270	2,41	30,012	31,734

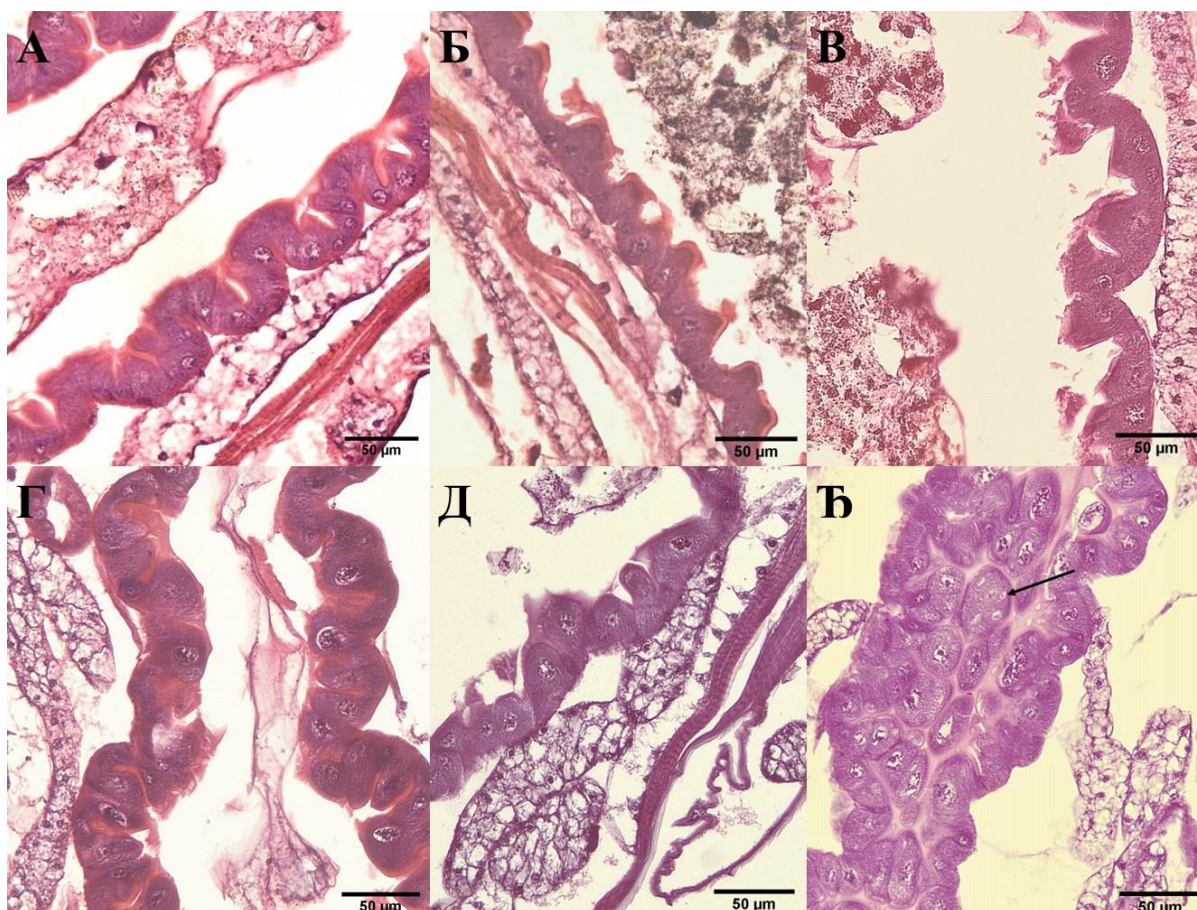
4.5.2. Хистолошка анализа

Хистолошка анализа показала је промене у дигестивном систему у свим третманима. Нормална архитектура ткива средњег црева поремећена је појавом вакуола и потенцијалних апоптотичних тела, као и алтерацијама четкастог обода. Интензивна вакуолизација појавила се у третману са LCFA. Од 20 анализираних ларви, 11 су

поседовале вакуоле у II региону (Слика 21Б) и 6 у III региону (Слика 22Б) средњег црева, док I регион није садржао вакуоле.

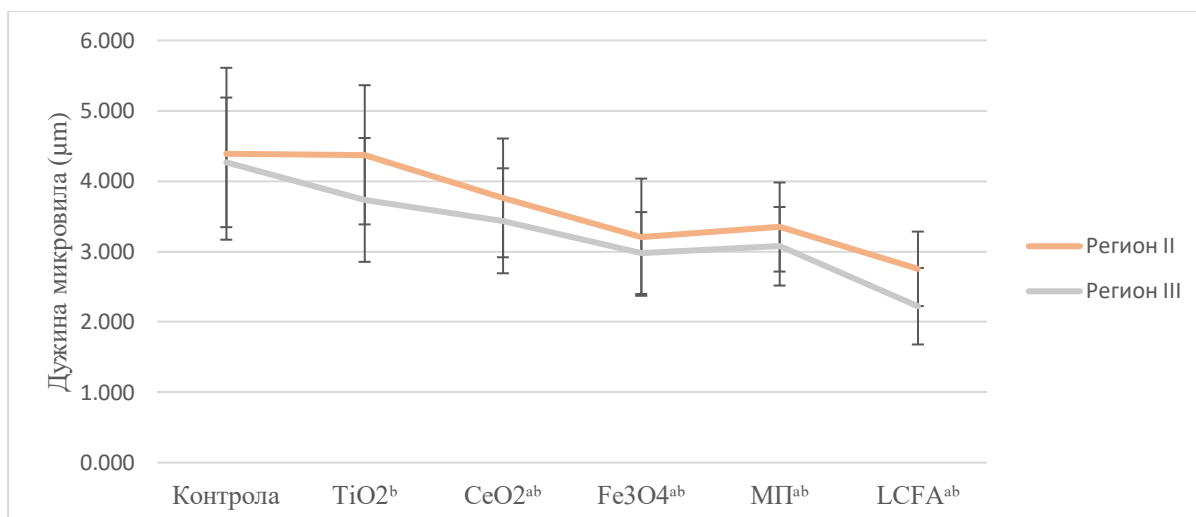


Слика 21. Фотографије дигестивних ћелија II региона средњег црева у А - контролној групи; Б - групи третираној наночестицама TiO_2 ; В - групи третираној наночестицама SeO_2 ; Г - групи третираној наночестицама Fe_3O_4 ; Д - групи третираној МП; Ђ - групи третираној LCFA. Стрелица показује вакуолу са потенцијалним апоптоичним телом. Глава стрелице показује ћелије које су се одвојиле од једнослојног епитела црева и ушле у цревни лумен.



Слика 22. Фотографије дигестивних ћелија III региона средњег црева у А - контролној групи; Б - групи третираној наночестицама TiO_2 ; В - групи третираној наночестицама CeO_2 ; Г - групи третираној наночестицама Fe_3O_4 ; Д - групи третираној МП; Ђ - групи третираној LCFA. Стрелица показује вакуолу са потенцијалним апоптоичним телом.

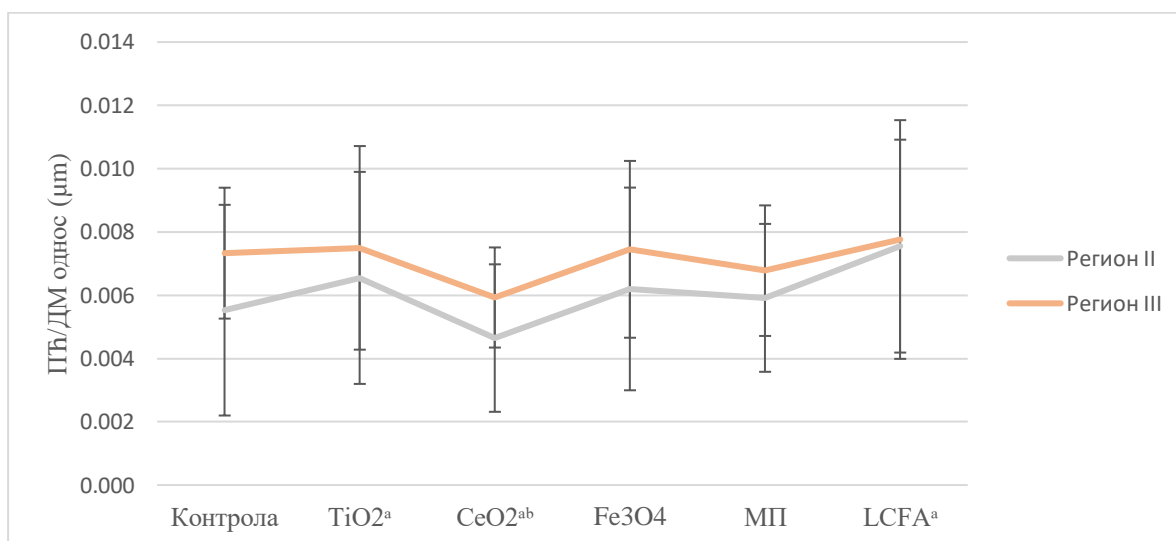
Мерењем дужине микровила, откривена је њихова тенденција да се скраћују када се изложе токсинима. Када је праћена искључиво сама дужина микровила, II регион средњег црева показао је значајно скраћивање у свим третманима (једнофакторска ANOVA $F(5,1104) = 109,233$, $p < 0,001$; Dunnett test, $p < 0,05$), осим у групи третираној TiO_2 наночестицама (Слика 23). Регион III средњег црева поседовао је значајне промене у дужини микровила у свим третманима ($F(5,1104) = 188,744$, $p < 0,001$; Dunnett test, $p < 0,05$) у поређењу са контролом (Слика 23). Однос ДМ/ПЋ II региона средњег црева показао је значајне промене у групама третираним наночестицама TiO_2 , CeO_2 и LCFA (One-way ANOVA $F(5,1084) = 21,964$, $p < 0,001$; Dunnett test, $p < 0,05$). У III региону средњег црева, само група третирана наночестицама CeO_2 поседовала је значајно ниже вредности ДМ/ПЋ односа ($F(5,1084) = 9,294$, $p < 0,001$; Dunnett test, $p < 0,05$) (Слика 24).



Слика 23. Дужина микровила (μm) II и III региона средњег црева. Вертикалне линије представљају стандардну девијацију.

^a-статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у II региону средњег црева

^b- статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у III региону средњег црева



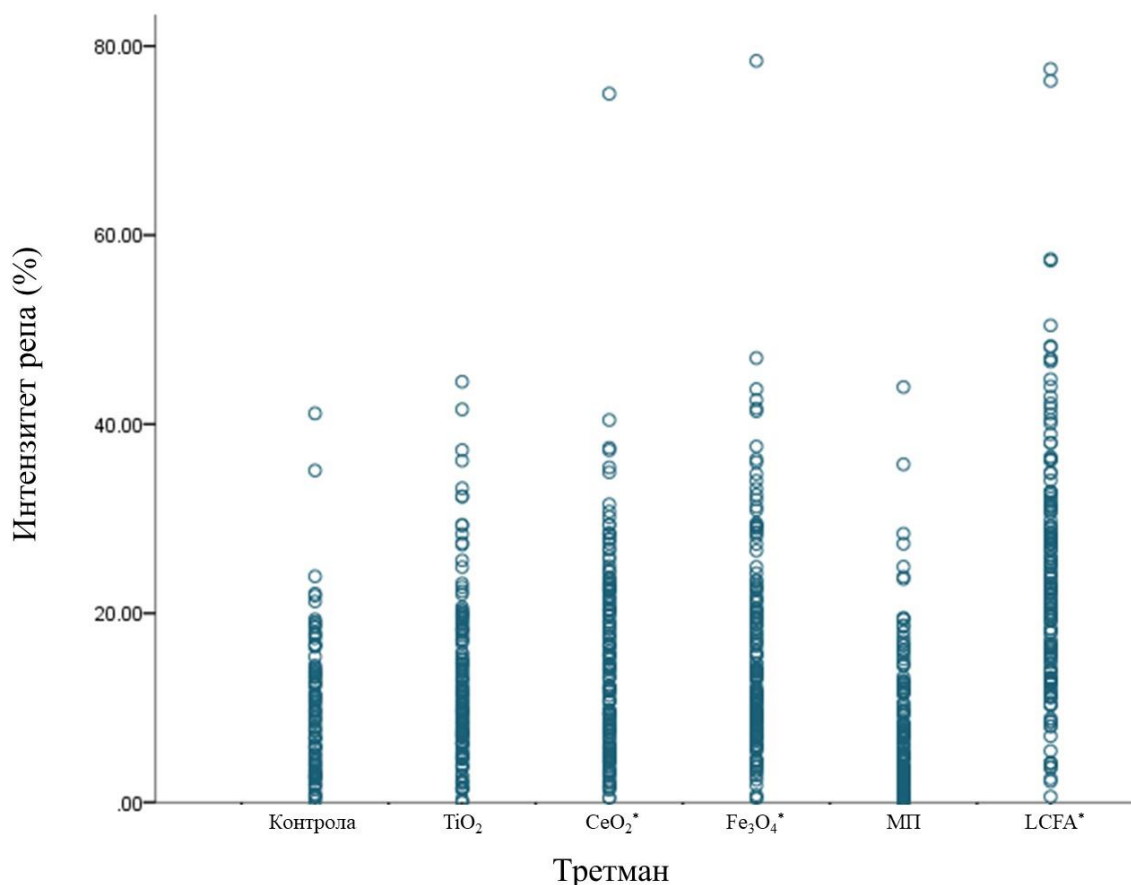
Слика 24. ПТб/ДМ однос (μm) II и III региона средњег црева. Вертикалне линије представљају стандардну девијацију.

^a-статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у II региону средњег црева

^b- статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у III региону средњег црева

4.5.3. Комет тест

Једнофакторска ANOVA и Дунет пост хок тест показали су значајно већи ниво оштећења ДНК молекула ($p < 0,05$) у третманима са CeO₂, Fe₃O₄ и LCFA у односу на негативну контролу, док оваквих оштећења није било у третманима са TiO₂ и МП (слика 25).



Слика 25. Ниво оштећења ДНК молекула представљен као интензитет репа комете (PI%) измерен у ћелијској суспензији свих ћелија ларви врсте *C. riparius* третираних наночестицама оксида метала, МП и LCFA.

*статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у третману у односу на контролу.

4.5.4. Оксидативни стрес

Укупна концентрација протеина кретала се од 0,69 до 0,89 mg/ml у тестираним узорцима (Табела 10). Man-Whitney тест показао је значајну разлику у концентрацији TBARS у третманима са CeO₂, Fe₃O₄ и МП (Man Whitney, $p < 0,05$). Осим у третману са TiO₂, ниво AOPP био је значајно висок у свим осталим третманима (Man Whitney, $p < 0,05$). Појачана активност CAT детектована у третманима са Fe₃O₄ и LCFA (Man Whitney, $p < 0,05$), док је активност SOD била значајно виша у односу на контролу у третманима са TiO₂, МП и LCFA (Man Whitney, $p < 0,05$).

Табела 10. Параметри оксидативног стреса ларви врсте *C. riparius* третираних наночестицама оксида метала, МП и LCFA.

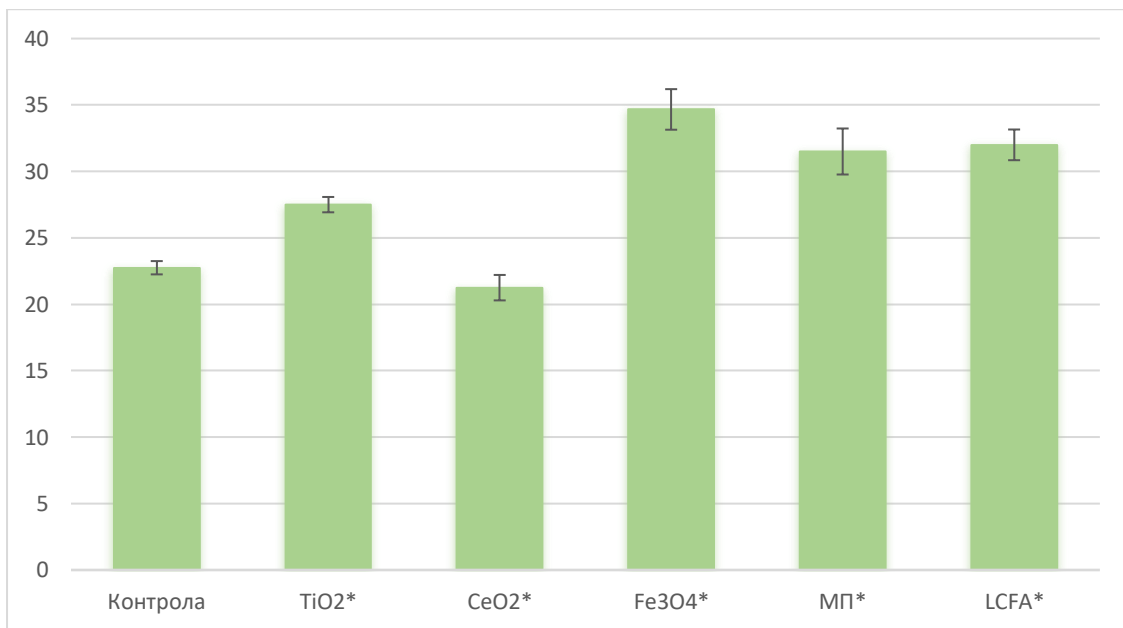
	Протеини	TBARS	AOPP	CAT	SOD
Контрола	0,89 ± 0,11	0,0062 ± 0,0005	0,0069 ± 0,0007	0,1029 ± 0,0122	5,8629 ± 1,1471

TiO_2	$0,71 \pm 0,14$	$0,0069 \pm 0,0005$	$0,0073 \pm 0,0018$	$0,0984 \pm 0,0323$	$8,3167 \pm 1,9963^*$
CeO_2	$0,79 \pm 0,12$	$0,0088 \pm 0,0007^*$	$0,0095 \pm 0,0009^*$	$0,0671 \pm 0,0478$	$6,6634 \pm 1,9776$
Fe_3O_4	$0,76 \pm 0,02$	$0,0098 \pm 0,0019^*$	$0,0129 \pm 0,0025^*$	$0,1202 \pm 0,0085^*$	$6,7677 \pm 1,2569$
МП	$0,69 \pm 0,08$	$0,0077 \pm 0,0003^*$	$0,00109 \pm 0,0019^*$	$0,0938 \pm 0,0307$	$7,8393 \pm 1,2295^*$
LCFA	$0,71 \pm 0,07$	$0,0069 \pm 0,0008$	$0,0088 \pm 0,0005^*$	$0,1203 \pm 0,0081$	$7,3972 \pm 0,5963^*$

*статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у третману у односу на контролу

4.5.5. Концентрација хемоглобина

Значајно ниске концентрације хемоглобина детектоване су у групи третираној наночестицама CeO_2 , док је у осталим третманима концентрација хемоглобина била значајно висока у поређењу са контролом (Man Whitley, $p < 0,5$) (слика 26).



Слика 26. Средња концентрација хемоглобина ларви врсте *C. riparius* третираних наночестицама оксида метала, МП и LCFA представљени као g/l хемолимфе. Вертикалне линије представљају стандардну девијацију.

*статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у третману у односу на контролу

Поглавље 5

Дискусија

Модерно доба донело је са собом широк спектар микро- и нанозагађивача. Како би се њихов негативан утицај уочио и анализирао, неопходно је развити ефикасне биомаркере који би допринели раном разоткривању сублеталних ефеката и предузимању одговарајућих мера за спречавање или санирање последица њиховог утицаја. Акутни и хронични тест спроведени у овој студији показали су да дужина микровила дигестивних ћелија средњег црева има велики потенцијал као хистопатолошки биомаркер за рану детекцију токсичности микропластике, наночестица оксида метала и LCFA.

5.1. Хистолошка анализа нетретираних ларви

Идентификацијом уз помоћ одговарајуће литературе наведених у методологији, потврђено је да је врста коришћена у експериментима *C. riparius*. Тачна идентификација врсте била је веома битна из разлога што се грађа појединих ткива може разликовати између врста (Ospina-Pérez и сар., 2019; Grueso-Gilaberth и сар., 2020). У вези с тим, осетљивост организама и хистопатолошке промене које може изазвати загађивач, такође зависи од врсте која се анализира (Ospina-Pérez и сар., 2019).

У неколико студија, средње црево је окарактерисано као циљни орган на које делује присуство ксенобиотика због процеса апсорпције (El-Saad и сар., 2017; Richardi и сар., 2018). Генерално, средње црево показало је сличну морфологију оној која је описана код врста *Chironomus columbiensis* и *Polypedilum* sp. (Ospina-Pérez и сар., 2019; Grueso-Gilaberth и сар., 2020). Примећена је разлика у броју прстена које формирају цревни дивертикулуми. Код врсте *C. sancticaroli* описано је три до пет прстена, код *C. columbiensis* три до четири, док је код *Polypedilum* sp. забележен само један прстен (Richardi и сар., 2015; Ospina-Pérez и сар., 2019; Grueso-Gilaberth и сар., 2020). Анализом хистолошких препарата ларви *C. riparius* уочено је два до три прстена. Претпоставља се да је улога ових набора у повећању капацитета апсорпције, па је поменута разлика између врста од великог значаја кад је у питању испитивање токсичности ксенобиотика унетих у организам ингестијом. Такође, дужи микровили у II и III региону указују на већи апсорпциони потенцијал у односу на I регион, па су самим тим и подложнији негативном утицају токсичних супстанци што је и потврђено у више студија (Richardi и сар., 2018; Ospina-Pérez и сар., 2019).

Због своје улоге у екскрецији, Малпигијеве цевчице се такође сматрају једним од најподложнијих органа када је у питању сублетални ефекат ксенобиотика. Број Малпигијевих цевчица варира између врста, па су код *Polypedilum* sp. забележене само

две Малпигијеве цевчице, док су код *C. sancticaroli* и *C. columbiensis* забележене четири, што је случај и са врстом *C. riparius* која је анализирана у овој дисертацији (Richardi и сар., 2015; Ospina-Pérez и сар., 2019; Grueso-Gilaberth и сар., 2020). Разлика у броју Малпигијевих цевчица може утицати на брзину екскреције токсина из организма што на даље утиче на осетљивост врсте на присуство ксенобиотика.

Описана варијабилност у броју прстена цревних дивертикулума и Малпигијевих цевчица између врста иде у прилог хистологији као обећавајућој методи за решавање таксономских недоумица око детерминације врста. С обзиром на то да поједине врсте хириномида показују веома сличну спољашњу морфологију, анализом унутрашње морфологије може се са већом сигурношћу детерминисати јединка до нивоа врсте (Spies и Sæther, 2004).

Како поједини ксенобиотици имају потенцијал да поремете енергетски метаболизам, масно ткиво такође представља један од циљних органа када је сублетални ефекат токсина у питању (Servia и сар., 2006). Поред трофоцита, у састав масног ткива улазе и еноцити, ћелије за које се сматра да су аналози хепатоцитима и имају улогу у метаболизму липида, детоксификацији организма и неутрализацији токсина код хириномида (Ospina-Pérez и сар., 2019). Трофоцити ларви *C. riparius* били су слични онима описаних код ларви *C. sancticaroli* и *Polypedillum* sp. (Richardi и сар., 2015; Grueso-Gilaberth и сар., 2020). Међутим, код *C. columbiensis* су примећене обојене грануле за које се претпоставља да су резерве гликогена или протеина, што није детектовано у нашој студији (Ospina-Pérez и сар., 2019).

5.2. Хистолошка анализа ларве четвртог ступња, препупе и пупе

Процес метаморфозе код хириномида подразумева и реорганизацију средњег црева (Wu и сар., 2006). Као што је већ поменуто, ткиво средњег црева представља једно од најосетљивијих ткива на присуство токсина. Како би се утврдило да ли је узрок промена у архитектури ткива токсин или улуткавање, неопходно је описати процес ремоделације ткива који се дешава у току метаморфозе хириномида. Претходне студије на комарцима показале су да у стадијуму препупе долази до одвајања ларвалних дигестивних ћелија од цревног епитела пупе, при чему се ларвални цревни епител временом потпуно губи и замењује новим, карактеристичним за стадијум пупе. Читав процес ремоделације цревног епитела код комараца траје 12 h, након чега се добија тањи цревни епител са ужим луменом (Wu и сар., 2006). Ова студија је у корелацији са

результатима добијеним у анализи у оквиру ове дисертације, где је на хистолошком препарату јасно уочено одвајање дигестивних ћелија у II региону средњег црева у стадијуму препупе. Анализом метаморфозе дуванског пупољка (*Heliothis virescens*) уочено је да ремоделација цревног епитела представља резултат два преклапајућа процеса у коме истовремено долази до генерације новог цревног епитела и дегенерације старог. У ларвалном стадијуму повећана је потреба за уношењем и акумулацијом нутријената, па су дигестивне ћелије средњег црева метаболички активније и имају развијенију четкасту ивицу. У току улуткавања, регенеративне стем ћелије постају активне и замењују ларвални епител средњег црева адултним (Tettamanti и сар., 2007). Пролиферација ћелија је такође примећена код *C. riparius*, при чему је примећен други слој епитела у I региону средњег црева. До сада је сматрано да се адулти ове врсте не хране активно због нефункционалних делова усног апарата, међутим, новије студије показале су да се они ипак хране, највероватније сукрозом (Foucault и сар., 2018). Хистолошком анализом дигестивног система уочено је да стадијум пупе има знатно ужи лумен црева без јасног садржаја у II и III региону, док је у I региону постојао садржај који се разликовао од оног детектованог у стадијуму ларве.

Познавање промена које се дешавају услед метаморфозе је од велике важности за коришћење хистопатологије као методе у екотоксиколошким студијама, јер се ремоделација ткива у нормалном животном циклусу хирономида може лако погрешно протумачити као промена проузрокована негативним дејством токсина (Stojanović и сар., 2021). Резултати хистолошке анализе показали су да се ремоделација епитела средњег црева у току метаморфозе *C. riparius* заиста дешава, где долази до истовремене пролиферације новог епитела и одвајања старог, при чему дигестивне ћелије доспевају у лумен црева и тако се уклањају. На крају овог процеса добија се потпуно нов епител средњег црева, видљиво тањи са ужим луменом и без цревног садржаја, осим у I региону. Оваква промена у морфологији ткива вероватно је последица промене средине и начина исхране током различитих развојних стадијума врсте *C. riparius* која захтева другачију организацију алиментарног канала како би се задовољиле потребе адултног стадијума.

5.3. Детекција најосетљивијих ткива при акутној изложености наногађивачима код третираних ларви *C. riparius*

Хистопатолошке анализе имају велику улогу у идентификацији токсичног ефекта нано-оксида на ткивном нивоу и разумевању последица које акумулација наночестица у акватичој средини изазива на врстама које долазе у директан или индиректан контакт са

њима. Хистолошке анализе су у овој студији показале промене на ткивима код ларви свих третмана, при чему су различити нано-оксиди изазвали различите степене хистолошких промена на циљним ткивима и органима.

Претходна истраживања наночестица TiO_2 , CeO_2 и Fe_3O_4 на ларвама хириномида недвосмислено упућују на токсичан ефекат ових агенаса. Високе концентрације нано- TiO_2 биле су леталне за ларве, док су средински релевантне концентрације истог нано-оксида изазвале морфолошке промене на усним структурама (Јовановић и сар., 2016b; Савић-Здравковић и сар., 2018). Истраживања са нано- CeO_2 показала су да је овај нано-оксид генотоксичан за ларве *C. riparius* (Савић-Здравковић и сар., 2019), док су морфометријске анализе откриле његов потенцијал да проузрокује деформитете на усним структурама код третираних ларви (Здравковић, 2020). Нано- Fe_3O_4 показао је своју токсичност на морфолошком нивоу, узрокујући промене на усном апарату ларви, као на биохемијском и молекуларном нивоу, индукујући оксидативни стрес и оштећења ДНК молекула (Здравковић, 2020).

Највећи део дигестије и апсорпције хране одиграва се у средњем цреву (Huang и сар., 2015), а ларве контролне групе имале су сличну морфологију овог региона у поређењу са већ описаним врстама *Chironomus sancticaroli* и *Chironomus columbiensis* (Richardi и сар., 2015; Ospina-Pérez и сар., 2019). Анализом ларви третираних наночестицама Fe_3O_4 , код великог броја јединки је примећена интензивна вакуолизација у дигестивним ћелијама I региона средњег црева. Вакуоле пронађене у нано- Fe_3O_4 третману нису пронађене у осталим третманима, као ни у контроли. Раније студије су показале да нано- Fe_3O_4 може изазвати оксидативни стрес и оштећење ДНК код ларви *C. riparius* (Здравковић, 2020), па поменута вакуолизација вероватно упућује на цитотоксични ефекат ових наночестица. Вакуоле у дигестивним ћелијама антериорног дела средњег црева уочене су и у другим студијама са загађивачима вода. Ларве врсте *Polypedilum* sp. узорковане на загађеним притокама у близини рудника, поседовале су висок проценат вакуолизације епитела средњег црева (Grueso-Gilaberth и сар., 2020). Студија која је испитивала утицај инсектицида на врсту *Chironomus calligraphus* имала је сличне резултате (Lavarías и сар., 2017). Вакуоле се иначе могу наћи и у здравим епителним ћелијама средњег црева (Costa и сар., 2014) и претпоставља се да су продукт процеса трансцитозе (Huang и сар., 2015). Међутим, појава интензивне вакуолизације вероватно указује на активирани процес ћелијске смрти (da Silva Costa и сар., 2016). Перитрофна мембрана (ПМ) је семипермеабилна мембрана која штити средње црево од

механичких и хемијских оштећења. Дијаметар пора ПМ се смањује према задњем цреву и дозвољава само малим молекулима да прођу до мембране дигестивних ћелија средњег црева, те не представља никакву баријеру за наночестице (Holtof и сар., 2019), што је и потврђено у претходној студији где је показано да наночестице могу да уђу у дигестивне ћелије средњег црева (Chaika и сар., 2020). Ове карактеристике средњег црева чине га веома подложним штетном ефекту унетих токсина (Lavarías и сар., 2017; Grueso-Gilaberth и сар., 2020). У предњем и средњем цреву нису примећене уочљиве модификације ткива, вероватно због слоја кутикуле који покрива епител црева (Huang и сар., 2015). Хистолошким анализом Малпигијевих цевчица нису уочене промене у контролној групи и групи третираној наночестицама TiO_2 , док је у групама третираним наночестицама CeO_2 и Fe_3O_4 примећена јасна вакуолизација епителних ћелија. Малпигијеве цевчице поседују механизам активног транспорта токсина па, заједно са средњим цревом, веома брзо реагују на њихово присуство (Cintra-Socolowski и сар., 2016; Sogouг и сар., 2001). Ова карактеристика чини их веома добрим кандидатом за хистопатолошке биомаркере у екотоксиколошким студијама (Cintra-Socolowski и сар., 2016), као што је показано у другим студијама са инсектима (Richardi и сар., 2015; Grueso-Gilaberth и сар., 2020). Вакуолизација епителних ћелија Малпигијевих цевчица је уочена код западних медоносних пчела (*Apis mellifera*) изложених инсектицидима, као индикатор почетка процеса ћелијске смрти (de Almeida Rossi, 2013). Слични резултати су добијени и у студијама са комарцима врсте *Aedes aegypti* (Pintong и сар., 2020). На основу резултата ове студије као и доступне литературе, високо токсични агенси индукују ћелијску смрт у Малпигијевим цевчицама генерисањем великог броја вакуола које се могу уочити у цитоплазми епителних ћелија. Ћелијски унос нано- CeO_2 као и њихова цитотоксична активност је већ показана (Goushbolagh и сар., 2018), а као главни механизам ове токсичности стоји генерисање ROS које узрокују оксидативни стрес и оштећење самих ћелија (Mittal и сар., 2014). Сличан ефекат примећен је и код наночестица Fe_3O_4 (Liu и сар., 2013). Приликом анализе масног ткива, уочене су промене у ПМТ само код ларви третираних наночестицама TiO_2 . У поређењу са контролом која је поседовала полигоналне трофоците чврсто везане једне за друге, масне ћелије из третмана са нано- TiO_2 биле су више заобљене са уочљивим интерцелуларним простором. Слична појава описана је код врсте *D. melanogaster* у току препупалног стадијума у фази дисагрегације, али као део нормалног животног циклуса (Nelliot и сар., 2006). Међутим, претходна студија није показала да постоји скраћивање периода од излегања из јаја до метаморфозе у адулта код ларви *C. riparius* третираних истим нано-

оксидима у сублеталним концентрацијама (Zdravković, 2020). Хистолошком анализом различитих стадијума *C. riparius* уочено је да у току улуткавања долази до ремоделације средњег црева кроз два преклапајућа процеса који обухватају развој епитела средњег црева пупе и дегенерацију епитела средњег црева ларве. Код ларви третираних наночестицама TiO_2 уочен је знатно већи број дигестивних ћелија које су густо збијене, у поређењу са контролном групом. Ова појава детектована је код 11 од укупно 20 ларви код којих су изазване промене у ПМТ. Међутим, у процесу улуткавања забележена је и дегенерација Малпигијевих цевчица код *Apis mellifera* (Aljedani, 2018), што овде није био случај. Показано је да се код пчела у одговору на стрес троши садржај масног ткива у циљу повећања енергетске имобилизације (Even и сар., 2012). Врста и концентрација липида у масном ткиву инсеката је варијабилна у стресним условима, као што је излагање инсектицидима (Wojciechowska и сар., 2019). Овакве промене у саставу масног ткива могу утицати и на морфолошки изглед самог ткива (Fruttero и сар., 2019). Наночестице TiO_2 могу пенетрирати епителне ћелије средњег црева и ту се акумулирати, што је показано у студији са *Ceriodaphnia dubia* (Dalai и сар., 2013). Такође, ларве имају способност регенерације цревног епитела након инфекција или излагања ксенобиотицима (Castagnola и сар., 2016), што може објаснити ткивне промене у средњем цреву. Резултати ове студије указују на то да нано- TiO_2 изазива видљиве промене на масном ткиву и ткиву средњег црева, али је нејасно да ли су поменуте промене последице индиректног утицаја на ткива изазивањем метаморфозе или резултат директног утицаја изазваног токсичним потенцијалном самог нано-оксида.

Микровили покривају епителне ћелије средњег црева и имају различите функције као што је продукција и секреција дигестивних ензима, асимилација нутријената, одржавање јонске хомеостазе и сигнализација (Schneider и сар., 2012). У контролној групи, II регион средњег црева поседовао је дугу и континуирану четкасту ивицу на апикалној страни дигестивних ћелија који је окренут ка цревном лумену. Мерењем дужине четкасте ивице у II региону средњег црева, откривено је статистички значајно скраћивање микровила код ларви третираних наночестицама Fe_3O_4 . Показано је да токсини могу изазвати дисрупцију четкасте ивице код хирономида (Richardi и сар., 2018). Редукција дужине микровила описана је код *D. melanogaster* у студији изгладњивања, при чему је трансмисиона електронска микроскопија показала да долази до формирања абнормалних капљица или малих везикула на крајевима микровила, што изазива њихово ломљење и евентуално скраћивање (Li-Buarlay и сар., 2016). Микровили нису статичне

структуре, већ поседују актинске филаменте који контролишу њихову дужину, реагујући на услове физиолошког стреса као што су гладовање или патолошке инфекције (Friederich и сар., 2006). Епител црева инсеката игра огромну улогу у имунитету, па у вези с тим, скраћивање четкасте ивице може бити врста одбране од токсина који су присутни у лумену црева (Huang и сар., 2015). На овај начин, апсорпција је сведена на минимум и могућност уношења токсина је редукована.

Неколико студија је описало цитотоксичност Fe_3O_4 која лежи у његовом потенцијалу да индукује оксидативни стрес путем генерисања ROS (Liu и сар., 2013). Претходна студија са *C. sancticaroli* показала је да су у акутној изложености токсинима најосетљивији органи дигестивног система, Малпигијеве цевчице и масно ткиво (Richardi и сар., 2018).

5.4. Детекција најосетљивијих ткива при хроничној изложености нано- и микрозагађивачима код третираних ларви *C. riparius*

Како би се боље разумеле хистопатолошке промене код ларви *C. riparius* неопходно је било урадити и хронични тест изложености средински релевантним концентрацијама загађивача. Поред тога, потребно је било анализирати и друге познате суб-организмалне биомаркере како би се добијени потенцијални хистопатолошки биомаркери корелисали са њима. У хроничном тесту, поред наночестица оксида-метала, ларве су изложене и LCFA, који представља мешавину наночестица оксида метала. За утврђивање токсичности микрочестица, коришћена је мешавина МП, која је дефинисана као ЕСs. Разумевање утицаја ових загађивача је од велике важности за осмишљавање ефикасних стратегија за заштиту животне средине. Различите екотоксиколошке студије, спорадично урађене коришћењем различитих биомаркера и екотоксиколошких експерименталних дизајна, показале су токсичност наночестица TiO_2 , CeO_2 , Fe_3O_4 , МП и LCFA на акватичне модел организме (Savić-Zdravković и сар., 2018; Savić-Zdravković и сар., 2019; Malhotra и сар., 2019; Rodrigues и сар., 2020; Stanković и сар., 2020a). У овој студији анализирали смо неколико биомаркера коришћених у екотоксиколошким тестовима из претходних студија, упоредили их са променама на хистолошком нивоу, и пружили свеобухватан увид у однос између биомаркера погодних за процену токсичног ефекта тестираних микро- и наночестица. Овакав експериментални дизајн омогућио је интеркалибрацију и дефиницију нових хистопатолошких биомаркера код слатководних модел организама који могу бити коришћени у будућим екотоксиколошким проценама токсичности.

Информације о потенцијалном хистопатолошком ефекту наночестица TiO_2 , CeO_2 и Fe_3O_4 су веома оскудне. Различите хистопатолошке промене детектоване су у студијама на рибама које су изложене веома ниским концентрацијама нано- TiO_2 (1 mg/l) и нано- CeO_2 (0,01 $\mu\text{g/l}$). Ове промене детектоване су на јетри, шкргама и кожи риба у виду хипертрофије, вакуолизације и дегенерације ћелија које улазе у састав ових органа (Lee и сар., 2012; Rezende и сар., 2018; Correia и сар., 2019). Међутим, поменуте промене нису уочене на ћелијама ларви *C. riparius* изложеним наночестицама оксида метала у нашој студији. Сматра се да је висок ниво оксидативног стреса изазван високим концентрацијама нано- TiO_2 повезан са реакцијом која изазива оштећење ћелија, док ниже концентрације овог оксида метала изазивају активацију механизма осетљивог на присуство ROS (Skocaj и сар., 2011), па је вероватно да је концентрација коришћена у овој студији довела до активације антиоксидативне одбране и тиме спречила појаву оштећења уочену у наведеним студијама. Акутни тест са истим наночестицама оксида метала није показао никакву вакуолизацију у II и III региону средњег црева, међутим, у третману са нано- Fe_3O_4 дошло је до појаве вакуола у I региону, што није уочено у хроничном тесту. Главна функција I региона средњег црева је секреција дигестивних ензима (Cassia и сар., 2019) што даље имплицира да појава вакуола у акутном тесту може бити врста прве линије одбрамбеног механизма који покушава да смањи токсични ефекат загађивача. Са друге стране, хронично излагање може активирати друге сигналне путеве који укључују већу активност антиоксидативних ензима, као и хемоглобина. Слични резултати добијени су у другој студији са наночестицама магнетита, где је објашњено да иако не постоји видљива цитотоксичност, наночестице могу довести до суптилног али за организам значајног оштећења ДНК молекула (Singh и сар., 2010).

Резултати хроничног теста показали су уочљиву вакуолизацију само у групи третираној са LCFA. У хроничном тесту, интензивна вакуолизација у дигестивним ћелијама средњег црева детектована је у II и III региону код ларви третираних са LCFA. Хронично излагање морске шкољке, *Cerastoderma edule*, гориву у праху такође је изазвало интензивну вакуолизацију или потпуну атрофију дигестивних жлезди (Bowmer и сар., 1994). Вакуоле које су се појавиле у дигестивним ћелијама ларве *C. riparius* изгледале су као интрацелуларне инклузије које личе на апоптотска тела, слична онима описаним код медитеранске дагње, *Mytilus galloprovincialis* (Romero и сар., 2011), што означава да ове ћелије вероватно пролазе кроз процес ћелијске смрти. Апоптоза је облик ћелијске смрти који је веома битан за одржавање хомеостазе дигестивног епитела и

одговора на стрес, што је вероватно случај код ларви третираних са LCFA. Са друге стране, Дентон и сар. (2009) показали су да је кључни механизам у метаморфози ларви, која подразумева дегенерацију цревног епитела и стварање новог, у ствари процес аутофагије (Denton и сар., 2009). Евидентно је да је дигестивни епител код LCFA третираних ларви пролазио кроз процес реорганизације ткива. Апоптотичне ћелије са великим садржајем апоптотских тела и одвајање ћелија („љуштење“ ћелија) са ацидофилном цитоплазмом које упадају у лумен могу бити објашњене као реакција на присуство токсичних супстанци.

Уочена осетљивост дигестивних ћелија на присуство тестираних честица, као и резултати акутног теста, указивали су на то да квантитативне хистопатолошке биомаркере токсичности треба потражити управо у дигестивном систему. Како би закључили да ли постоји зависност дужине микровила од површине ћелије којој припадају, дефинисан је и анализиран параметар П \bar{H} /ДМ. Промене у параметру „однос П \bar{H} /ДМ“ детектоване су у II региону средњег црева у третманима са нано-TiO₂, нано-CeO₂ и LCFA, као и у III региону у третману са нано-CeO₂. Постериорни регион средњег црева инсеката поседује дуге, танке и регуларно распоређене микровиле у односу на anteriорни (Cassia и сар., 2019), што иде у прилог селекцији четкасте ивице II и III региона као потенцијалног хистопатолошког биомаркера. Висока стандардна девијација овог параметра указује на то да површина дигестивних ћелија варира дуж црева. Један од разлога може бити дубина пресека приликом прављења хистолошких препарата. Иако су епителне ћелије II и III региона средњег црева већ описане као кубичне, оне нису униформне у својој структури па димензија исте ћелије може варирати кроз различите хистолошке пресеке. Са друге стране, постоји природна варијација у величини цревних епителних ћелија, па се и ова чињеница може приписати високој стандардној девијацији. Из наведених разлога, закључено је да П \bar{H} /ДМ однос није поуздан као биоиндикатор у екотоксиколошким студијама. Анализом параметра „дужина микровила“, примећена је тенденција микровила да се скраћују у III региону средњег црева када су изложени свим тестираним загађивачима. У случају II региона, скраћивање микровила није детектовано само у третману са нано-TiO₂. Као што је већ објашњено у акутном тесту, претпоставља се да је скраћивање микровила врста одбрамбеног механизма против усвајања токсичних материја из загађивача. Сличан резултат добијен и у акутном и у хроничном тесту, иде у прилог могућем коришћењу овог параметра као хистопатолошког биомаркера који реагује на загађиваче различитих димензија.

Генотоксични потенцијал загађивача се може квантификовати мерењем нивоа оштећења ДНК молекула помоћу комет теста код бескичмењака и кичмењака, као и примарних продуцентата (Schuijt и сар., 2021). Главне предности ове методе су њена осетљивост, једноставност, економичност и применљивост на скоро сваки тип ћелија. Комет тест се најчешће користи на хуманим ћелијама, али се такође примењује и на ћелијама квасца, биљака, као и на ћелијама бескичмењака и кичмењака (Singh, 2016). Међутим, комет тест има и неколико негативних страна као што је немогућност да детектује анеугени ефекат и епигенетске механизме који не утичу директно на ДНК молекул (Costa и Teixeira, 2014). У нашој студији генотоксични ефекат загађивача, односно статистичко значајно оштећење ДНК молекула, детектован је у третманима са нано- CeO_2 , нано- Fe_3O_4 и LCFA. Наночестице TiO_2 , нису изазвале знаћајна оштећења ДНК која су анализирана комета тестом. Супротно подацима добијеним у овом истраживању, у студији са средински релевантним концентрацијама наночестица TiO_2 (0,2 mg/l и 1 mg/l), којима је третирана ловорова шкољка, *Mytilus trossulus*, детектовано је оштећење ДНК молекула (Kukla и сар., 2021). Са друге стране, ове наночестице у концентрацији од 1 mg/l, нису имале генотоксичан ефекат на врстама *D. magna* and *C. riparius* (Lee и сар., 2009) што је у сагласности и са нашим резултатима.

Резултати истраживања у оквиру ове дисертације показали су значајно већи интензитет репа у групи третираној са нано- CeO_2 у односу на контролну групу, што је у корелацији са доступним литературним подацима. Досадашња литература показала је да чак и веома ниске концентрације (10 $\mu\text{g/l}$) изазивају оштећења молекула ДНК код шкољки *Corbicula fluminea* (Koehlé-Divo и сар., 2018). Такође, примећено је да генотоксични потенцијал наночестица зависи и од величине честица. Мање честице изазивале су већа оштећења ДНК код врста *C. riparius* и *D. magna* (Lee и сар., 2009). Савић-Здравковић и сар. (2019) су детектовали генотоксичну активност ових наночестица код ларви *C. riparius* која је била различитог степена у зависности од концентрације честица.

Наночестице магнетита имају широку примену у биомедицини, па су до скоро сматране безбедним за употребу на биомедицинском пољу. Међутим, новије студије указују да њихов токсични потенцијал зависи од различитих фактора, као што су величина честица, облик, површинска превлака, доза, тип третмана и тип ћелија (Valdiglesias и сар., 2016). Информације о генотоксичности наночестица магнетита на акватичне бескичмењаке су веома оскудне. Студија са планаријама које су излагане

средински релевантним концентрацијама наночестица оксида гвожђа није показала генотоксични ефекат (Tran и сар., 2019). Насупрот томе, генотоксичност је детектована у акутном и хроничном тесту са гупијима (*Poecilia reticulata*), али у случају наночестица Fe₂O₃ (Qualhato и сар., 2017). Такође, описан је већи потенцијал магнетита да изазове оштећење ДНК молекула оксидативним путем у односу на онај који поседује магхемит (Fe₂O₃) (Singh и сар., 2010). Комет тестом детектовано је значајно веће оштећење ДНК молекула у групи третираној наночестицама магнетита у односу на контролу, што потврђује генотоксични потенцијал ових честица и изазива забринутост због њихове акумулације у акватичној средини.

Резултати хроничног теста добијени у оквиру ове докторске дисертације показали су најјачи генотоксични потенцијал у третману са LCFA, што је и очекивано с обзиром на то да је LCFA комплекс различитих наночестица металних оксида, за које је познато да имају негативан ефекат на живи свет. Оштећење ДНК молекула је детектовано и у студији са земљишним црвом, *Dichogaster curgensis*, у суспензији целомоцита. Претпоставља се да је формирање ROS одговорно за механизам настанка генотоксичних промена у овом случају (Manerikar и сар., 2008).

У третману са МП није детектовано статистички значајно повећање интензитета репа након комет теста. Литературни подаци указују да је међу полимерима микропластике PE најмање опасан по животну средину (Lithner и сар., 2011). Овај микрополимер пластике поседовао је најмањи генотоксични потенцијал према еритроцитима рибе у односу на полиетилен терефталат (енг. *polyethylene terephthalate*, PET) и полистирен (енг. *polystyrene*, PS) (Jakubowska и сар., 2020). Са друге стране, анализом суб-организмалног одговора ларви *C. riparius*, изложеним МП, откривена је повећана експресија гена који учествују у репарацији ДНК молекула (Muñiz-González и сар., 2021). С обзиром на то да комет тест детектује и оштећења која се могу репарирати, могуће да је управо дошло до репарације оштећења у третману са МП услед чега није забележено статистички значајно оштећење у односу на контролну групу животиња.

Промене у параметрима оксидативног стреса детектоване су у свим третманима са нано- и микрозагађивачима у оквиру ове дисертације. Досадашња истраживања показала су да нано-TiO₂ има потенцијал за изазивање оксидативног стреса како у присуству, тако и одсуству UV зрака (Skocaj и сар., 2011). Краткорочна изложеност овим наночестицама изазивала је повећање активности антиоксидативних ензима код

бескичмењака (Pikula и сар., 2020; Varma и сар., 2013) при чему су чак и веома ниске концентрације активирале SOD (Zhu и сар., 2011), што је случај и у нашој студији. С обзиром на то да је SOD веома битан антиоксидативни ензим који елиминише супероксидне радикале, ови резултати указују на то да чак и веома ниске концентрације наночестица TiO_2 узрокују генерацију ROS и активирају антиоксидативне ензиме.

Наночестице CeO_2 се због свог јединственог редокс потенцијала описују као снажан антиоксиданс (Xia и сар., 2008; Nikitchenko и сар., 2023). Међутим, информације о антиоксидативним, односно прооксидативним својствима ових наночестица су контрадикторне. Многе студије показале су потенцијал нано- CeO_2 да генеришу ROS и изазову оксидативни стрес код различитих акватичних модел организама, чак и при веома ниским концентрацијама као што је случај са нематодом, *C. elegans* (Zhang и сар., 2011; Dogra и сар., 2016; Koehlé-Divo и сар., 2018). У хроничном тесту урађеном у оквиру ове дисертације, детектована је значајно висока концентрација TBARS и AOPP у групи третираној наночестицама CeO_2 , али без значајних промена у активности SOD и CAT, што указује на то да долази до оштећења протеина и мембрана узроковано наночестицама. Поменуто генерисање слободних радикала који повећавају ниво липидне пероксидације је у корелацији са резултатима добијеним у студији са амфиподама *Corophium volutator* (Dogra и сар., 2016). Један од путева који доводе до генотоксичности нано- CeO_2 сматра се управо генерација ROS који директно или индиректно оштећују ДНК молекулу (Ali и сар., 2015). Заправо, антиоксидативна, односно прооксидативна активност наночестица CeO_2 зависи од физичких и хемијских својстава самих честица (Baldim и сар., 2018).

Новије студије описале су повећање нивоа -ОН у више органа након третмана ултра малим наночестицама магнетита што је проузроковало појаву оксидативног стреса (Wu и сар., 2022). Резултати хроничног теста показали су повећање концентрације TBARS, AOPP као и повећану активност CAT у третману са нано- Fe_3O_4 . Активност SOD је била благо повећана када се посматрају средње вредности иако није забележена статистичка значајност. Повећање параметара оксидативног стреса доводи до закључка да наночестице магнетита изазивају генерацију ROS што даље може довести до оштећења ДНК молекула које је детектовано комет тестом. Овакав механизам генотоксичности наночестица оксида гвожђа описан је у култури MCF-7 ћелијске линије и култури лимфоцита (Alarifi и сар., 2014; Gaharwar и сар., 2017).

Доступна литература анализирао је утицај електрофилтерског пепела на генерацију ROS, углавном на рибама. Акутни тест са змијоглавом рибом *Channa punctata* резултирао је индукцијом липидне пероксидације у свим анализираним ткивима, укључујући бубреге, јетру и шкрге, као и повећаном активношћу CAT и GST, што указује на то да овај пепео узрокује оштећење ДНК молекула путем оксидативног стреса (Ali и сар., 2004). Бескичмењаци генерално имају способност да савладају висок ниво оксидативног стреса (Chaitanya и сар., 2016), међутим, када концентрација токсина превазиђе способност антиоксидативне одбране, појава оксидативног стреса је незаобилазна (Schuijt и сар., 2021). Ниво антиоксидативних ензима може бити поремећен када је организам изложен токсинима, што ове параметре чини погодним биомаркером за мерење интензитета проузрокованог оксидативног стреса (Schuijt и сар., 2021). Повећана активност антиоксидативног ензима SOD, детектована у хроничном тесту у оквиру ове дисертације, указује на активирани антиоксидативни механизам при третману који савладава изазвани оксидативни стрес па не долази до повећане липидне пероксидације као ни оштећења самих мембрана ћелија. Са друге стране, повећана генотоксичност, као и концентрација AOPP указује на то да је у основи изазване апоптозе дигестивних ћелија доминантно оштећење ДНК молекула и протеина.

Промене у анализираним параметрима оксидативног стреса су биле евидентне и у третману са МП. Детектоване високе концентрације TBARS и AOPP, као и повећана активност SOD јасно указује на потенцијал МП да генерише ROS и индукује оксидативни стрес. Претходне студије са ларвама *C. riparius* такође су уочиле повећање нивоа липидне пероксидације, што је објашњено потенцијалом МП да проузрокује физички стрес пре него хемијски (Silva и сар., 2021). Када се размотре сви анализирани параметри, вероватно је да МП генерише ROS што изазива деградацију липида, процесом липидне пероксидације, који се одражава повећањем концентрације TBARS. Додатно, ниво SOD је такође био значајно повећан. Интересантно је да су сви анализирани параметри оксидативног стреса у третману са МП били промењени, осим CAT. Претходне студије претпоставиле су да се CAT активира у првим сатима/првог дана излагања овом загађивачу, а затим његова активност постепено опада (Regoli и сар., 2011). Са друге стране, постоје студије које тврде да CAT не учествује активно у оксидативном одговору на присуство МП код бескичмењака (Ribeiro и сар., 2017). С обзиром на то да су хирономиде бескичмењаци, непромењена активност CAT не би требало да буде изненађујућа.

Ниво хемоглобина био је под утицајем у свим третманима са тестираним наночестицама и микропластиком. Досадашње студије потврдиле су потенцијал хемоглобина код бескичмењака као доброг биомаркера за мониторинг квалитета животне средине (На и Choi, 2008). Међутим, како је већ објашњено, веома битна функција хемоглобина код ларви *C. riparius* јесте његово учешће у антиоксидативним процесима, где се његов ниво подиже у условима оксидативног стреса. Пероксидазном активношћу, хемоглобин елиминише водоник пероксид деградацијом на воду и кисеоник и тако спречава липидну пероксидацију (Szczerkowska-Majchrzak и Jarosiewicz, 2020). Поред тога, повећано присуство активних респираторних пигмената побољшава ефикасност антиоксидативних ензима (На и Choi, 2008), па није необично што је у овом хроничном излагању ларви хирономида нано- и микрочестицама, концентрација хемоглобина значајно већа у односу на контролу у третманима са нано-TiO₂, нано-Fe₃O₄, LCFA и МП. Међутим, третман са нано-CeO₂ јесте имао значајну разлику у концентрацији хемоглобина у односу на контролу, али насупрот осталим третманима, концентрација је била значајно мања. Претходне студије показале су да поједини загађивачи изазивају смањење нивоа окси-хемоглобина, трансформишући га у мет-хемоглобин (На и Choi, 2008), као што је то случај код ларви *C. riparius* третираних хромом, бисфенол А диглицидил етром (енг. *bisfenol A diglicidil etar*, BPA) и хлорпирифосом (енг. *chlorpyrifos*, CP) (Choi и Roche, 2004; На и Choi, 2008). Овакав облик хемоглобина није у могућности да везује кисеоник, а његова детекција на спектрофотометру врши се на другој таласној дужини (Heckl и сар., 2021), што може бити узрок смањеној детекцији концентрације хемоглобина у нашој студији у третману са наночестицама CeO₂.

Када се узму у обзир сви анализирани параметри, наночестице оксида метала показале су токсичан ефекат анализом биомаркера оксидативног стреса и дужине микровила. Комет тест указао је на генотоксични потенцијал нано-CeO₂ и нано-Fe₃O₄, међутим третман са нано-TiO₂ није се значајно разликовао од контроле. Као што је већ поменуто, иако постоји могућност да ове наночестице нису генотоксичне, вероватније је да су се активирали репарациони механизми због којих општећење ДНК молекула, ако га је и било, није детектовано. На основу добијених резултата, можемо закључити да су тестирани параметри оксидативног стреса, као и дужина микровила у својству хистопатолошких биомаркера показали високу осетљивост на присуство тестираних наночестица. Ако се узме у обзир функција хемоглобина код хирономида, овај се

пигмент може придружити биомаркерима оксидативног стреса, с обзиром на то да је његова концентрација варијала са значајношћу која је пратила промену активности антиоксидативних ензима анализираних у овој студији. Иако је врло тешко предвидети токсичност неке супстанце праћењем само једног биомаркера, можемо приметити да је дужина микровила III региона средњег црева реаговала на све испитане наночестице, за разлику од осталих биомаркера код којих одговор није био конзистентан. Одговори анализираних биомаркера оксидативног стреса зависили су од врсте наночестица којима су ларве биле изложене, при чему је на присуство нано-TiO₂ реаговао SOD, док су на присуство нано-CeO₂ реаговали TBARS и AOPP, а на присуство нано-Fe₃O₄ реаговали TBARS, AOPP и CAT. На крају, иако већи код третмана са нано-TiO₂ и нано-Fe₃O₄, ниво хемоглобина био је значајно мањи код третмана са нано-CeO₂ када се упоредио са контролом. Добијени резултати акутног и хроничног теста са поменутиим наночестицама доводе до закључка да дужина микровила има велики потенцијал као хистопатолошки биомаркер за детекцију токсичног ефекта наночестица оксида метала.

Претходне студије показале су да електрофилтерски пепео поседује проапоптотични ефекат на хепатоците риба, при чему је сам узрок апоптозе приписан оксидативном стресу (Ali и сар., 2007). Параметри оксидативног стреса били су значајно повишени у третману са LCFA у односу на контролну групу и у нашој студији, а укључивали су SOD, AOPP и хемоглобин. Како је LCFA значајно утицао на скоро све анализиране суб-организмалне биомаркере, можемо закључити да ова мешавина наночестица има јако токсично дејство на ларве *C. riparius*. Токсичност је била јасно уочљива и на нивоу ткива, где се огледала у интензивној вакуолизацији и појави потенцијалних апоптотских тела који су праћени скраћивањем микровила у II и III региону средњег црева. У студији у којој су рибе биле изложене пестицидима у контаминираним рекама, детектована је интензивна вакуолизација хепатоцита праћена повећањем активности антиоксидативних ензима. Појава вакуола је овде објашњена прекомерном активношћу органа да елиминише токсине из тела (Shah и Parveen, 2022). С обзиром на то да је црево инсеката мултифункционално, односно учествује у више функција, укључујући нутрицију, имунитет и осморегулацију (Huang и сар., 2015), вакуолизација средњег црева може имати функцију детоксификације, сличну оној описаној у јетри риба. Са друге стране, појава вакуола са садржајем које личе на апоптотска тела, може указивати на директан негативан утицај самог LCFA који доводи до ћелијске смрти, како је већ описано у студији са акутним тестом на ларвама *C. riparius*

(Stojanović и сар., 2021). Биохемијски и целуларни одговор код организама даје информацију о здравственом статусу анализираних индивидуе. Резултати ове докторске дисертације указују на то да је за правилну анализу утицаја наночестица TiO_2 , CeO_2 , Fe_3O_4 и LCFA, као и МП неопходно користити мулти-биомаркер приступ, што је такође наглашено и у неколико претходних студија (Noletto и сар., 2021; Shah и Parveen, 2022).

Третман са МП проузроковао је повећање нивоа липидне пероксидације и концентрације продукта оксидације протеина, што указује на потенцијално оштећење мембрана дигестивних ћелија проузроковано оксидативним стресом. Активност SOD била је виша и од оне у третману са LCFA, док утицај на активност CAT није детектован. Претходне студије показале су да је главни механизам токсичности МП у ствари индукција оксидативног стреса (Qiao и сар., 2019; Ну и Palić, 2020). Осим скраћених микровила и појединачних апоптотичних ћелија које су се спорадично појављивале, друге хистопатолошке промене у средњем цреву ларви третираних са МП нису детектоване. Сама величина МП онемогућава њихово усвајање од стране ћелија, што је вероватно и један од разлога због којих нису уочене промене на ткивима, али ни генотоксични потенцијал (Jovanović и сар., 2018). С обзиром на то да је уношење честица МП у лумен црева, као њихов потенцијал да агрегирају и блокирају пролаз у цревима већ описан (Silva и сар., 2021), скраћивање микровила може бити резултат директног механичког оштећења. Такође, недостатак нутритивних партикула у лумену црева због акумулације честица МП такође може довести до појаве скраћивања микровила, сличне оној описаној у студији изгладњивања са *D. melanogaster* (Li-Buarlay и сар., 2016). Како је већ поменуто, претходне студије описале су потенцијал МП да индукује физички стрес пре него хемијски, па је највероватније да је хронично излагање овим партикулама довело до њиховог нагомилавања у лумену, што је изазвало смањење уноса хранљивих нутријената и довело до појаве оксидативног стреса са једне стране, док је са друге стране дошло до реакције микровила црева на присуство МП који су својим скраћивањем довели до смањења апсорпционе моћи црева како би негативан утицај присуства поменутих честица свели на минимум.

Реакција дужине микровила III региона средњег црева на све тестиране загађиваче у овој студији говори у прилог потенцијалу поменутог параметра за употребу у екотоксиколошким тестовима детекције токсичности микро- и нанозагађивача. Комбинација различитих суб-организмалних биомаркера помаже у бољем схватању механизма токсичности ксенобиотика. Овакви биомаркери представљају ране знаке

„повреде“ изазване присуством загађивача (Gusso-Choueri и сар., 2015). Холистички приступ показао је предност у процени загађења различитих акватичних средина, с обзиром на то да појачава осетљивост и детектује одговоре на промене у животној средини, чак и при веома ниским концентрацијама загађивача (Gusso-Choueri и сар., 2015).

Поглавље 6

Закључци

Експерименти и анализе резултата у оквиру спроведених истраживања, довели су до следећих закључака:

1. Анализа физичких и хемијских особина тестираних наночестица и микропластике помогла је у бољем разумевању механизма њихове токсичности у акватичној средини. Величина и облик честица, њихова чистоћа, као и заступљеност појединих елемената у случају LCFA, поред концентрације, играју велику улогу у њиховој биодоступности и реактивности. Као што је описано, састав LCFA је променљив и веома је битно дефинисање токсичног потенцијала на основу више фактора који подразумевају тип угља и услове у којима он сагорева.
2. На основу хистолошке анализе добијен је адекватан опис морфолошких карактеристика ткива код ларви четвртог ступња врсте *C. riparius*. Успешно изведена хистолошка анализа на овом модел организму, који је препоручен у тестовима акватичне екотоксикологије од стране OECD, отвара врата хистопатолошким анализама и омогућава детекцију потенцијалних промена проузрокованих ксенобиотицима.
3. У акутном тесту изложености нанозагађивачима као најосетљивија ткива ларви врсте *C. riparius* показала су се ткива која улазе у састав дигестивног система, Малпигијевих цевчица и масно ткиво. Појаву интензивне вакуолизације у региону I средњег црева изазвале су наночестице Fe₃O₄, док је вакуолизација Малпигијевих честица изазвана у третману са нано-Fe₃O₄ и нано-CeO₂. Када је у питању нано-TiO₂ уочљиве промене у изгледу масног ткива и дигестивних ћелија доводе до закључка да ове наночестице утичу на ремоделацију ткива у циљу неутрализације њиховог штетног ефекта. Такође, дужина микровила у акутном тесту детектована је као потенцијални квантитативни хистопатолошки биомаркер хириномида.
4. Хронични тест показао је да се приликом дугорочног излагања загађивачима активирају други механизми одбране, с обзиром на то да вакуолизација региона I средњег црева није забележена у третману са нано-Fe₃O₄ као у акутном тесту, али је уочена вакуолизација региона II и III у третману са LCFA. Такође, Малпигијеве цевчице су остале интактне. С обзиром на то да цревни епител први долази у контакт са ингестованим честицама, закључено је да ће он и први реаговати на њих. Реакција микровила на присуство било ког од тестираних загађивача пружа

потпору дужини микровила као одличном параметру који може бити коришћен као квантитативни хистопатолошки биомаркер, што је примећено још у акутном тесту.

5. Анализа односа ДМ/ПТ показала се као непоуздан биоиндикатор у екотоксиколошким студијама због велике варијације у површини дигестивних ћелија на хистолошким пресецима од које не зависи дужина микровила. Овоме у прилог говори висока стандардна девијација. Као погодан квантитативни биомаркер дефинисана је само дужина микровила II и III региона средњег црева. Овај параметар реаговао је на ниске концентрације наночестица оксида метала како у акутном тако и у хроничном тесту, као и на средински релевантне концентрације МП и LC₂₀ LCFA.
6. Анализом других суб-индивидуалних биомаркера закључено је да нано-TiO₂ има потенцијал да генерише ROS у одређеној мери што се може видети на основу значајног повећања антиоксидативне активности SOD и концентрације хемоглобина. Наночестице CeO₂, Fe₃O₄, честице МП и LCFA јасно су показале свој генотоксични потенцијал, као и потенцијал да индукују оксидативни стрес код ларви.
7. Упоредивањем хистопатолошких промена са променама других анализираних суб-индивидуалних биомаркера, закључено је да се негативан утицај самих честица може испољити путем различитих механизма који не морају укључивати генотоксичност. Са друге стране, промене вредности антиоксидативних параметара, хемоглобина и дужине микровила јавиле су се у свим третманима.

Добијени резултати подржавају мулти-маркер приступ у екотоксиколошким истраживањима јер се само на основу њега може добити комплетнија слика о токсичном потенцијалу загађивача и механизмима које он покреће у модел организму. На овај начин се њихов негативан утицај лакше може екстраполирати на целе популације као и заједнице акватичне средине.

Поглавље 7

Литература

- Adams, L.K., Lyon, D.Y. & Alvarez, P.J. (2006) Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Research*, 40:3527–3532. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.08.004>
- Adams, M.S. & Ryon, M.G. (1994) A comparison of health assessment approaches for evaluating the effects of contaminant-related stress on fish populations. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 3:15-25. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00045153>
- Agayeva, N.J., Rzayev, F.H., Gasimov, E.K., Mamedov, C.A., Ahmadov, I.S. & Sadigova, N.A. (2020) Exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles in simplified food chain: Study on ultrastructural characterization. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12):3258-3266. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.032>
- Alarifi, S., Ali, D., Alkahtani, S. & Alhader, M.S. (2014) Iron Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress, DNA Damage, and Caspase Activation in the Human Breast Cancer Cell Line. *Biological Trace Element Research*, 159:416–424. doi: <https://doi.org/10.1007/s12011-014-9972-0>
- Ali, D., Alarifi, S., Alkahtani, S., Al Kahtane, A.A. & Almalik, A. (2015) Cerium Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress and Genotoxicity in Human Skin Melanoma Cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 71:1643–1651. doi: <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0386-6>
- Ali, M., Parvez, S., Pandey, S., Atif, F., Kaur, M., Rehman, H. & Raisuddin, S. (2004) Fly ash leachate induces oxidative stress in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environment International*, 30:933–938. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.03.004>
- Ali, M., Rahman, S., Rehman, H., Bhatia, K., Ansari, R.A. & Raisuddin, S. (2007) Pro-apoptotic effect of fly ash leachates in hepatocytes of freshwater fish (*Channa punctata* Bloch). *Toxicology in Vitro*, 21:63–71. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.08.011>
- Aljedani, D.M. (2018) Comparing the Histological Structure of the Fat Body and Malpighian Tubules in Different Phases of Honeybees, *Apis mellifera jemenatica* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Entomology*, 15(3):114-24. doi: <https://doi.org/10.3923/je.2018.114.124>

- Allan, I.J., Vrana, B., Greenwood, R., Mills, G.A., Roig, B. & Gonzalez, C. (2006) A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European Union’s Water Framework Directive. *Talanta*, 69:302–322. doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.09.043>
- Altammar, K.A. (2023) A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 14:1155622. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1155622>
- Amiard, J.-C. & Amiard-Triquet, C. (2015) Conventional Risk Assessment of Environmental Contaminants. In: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C. & Mouneyrac, C. eds. *Aquatic Ecotoxicology*. Elsevier Inc. 25–49. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800949-9.00002-4>
- Anderson, A.M., Stur, E. & Ekrem, T. (2013) Molecular and morphological methods reveal cryptic diversity and three new species of Nearctic Micropsectra (Diptera:Chironomidae). *Freshwater Science*, 32(3):892-921. doi: <http://dx.doi.org/10.1899/12-026.1>
- Andreeva, L.I., Kozhemiakin, L.A. & Kishkun, A.A. (1988) Modification of the method of determining lipid peroxidation in a test using thiobarbituric acid. *Laboratornoe Delo*, (11):41-3.
- Ardila, A. (2016) The Evolutionary Concept of "Preadaptation" Applied to Cognitive Neurosciences. *Frontiers in Neuroscience*, 10:103. doi: <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00103>
- Armitage, P.D., Cranston, P.S. & Pinder, L.C.V. (1995) *The Chironomidae* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-94-011-0715-0> [Accessed 12 Sep 2023]
- Arnold, M.C., Badireddy, A.R., Wiesner, M.R., Di Giulio, R.T. & Meyer, J.N. (2013) Cerium oxide nanoparticles are more toxic than equimolar bulk cerium oxide in *Caenorhabditis elegans*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 65(2):224-233. doi: <https://doi.org/10.1007/s00244-013-9905-5>
- Arts, J.H., Hadi, M., Irfan, M.A., Keene, A.M., Kreiling, R., Lyon, D., Maier, M., Michel, K., Petry, T., Sauer, U.G., Warheit, D., Wiench, K., Wohlleben, W. & Landsiedel, R. (2015)

- A decision-making framework for the grouping and testing of nanomaterials (DF4nanoGrouping). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 71(2):S1-27. doi: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.03.007>
- Ates, M., Demir, V., Arslan, Z., Kaya, H., Yilmaz, S. & Camas, M. (2016) Chronic exposure of tilapia (*Oreochromis niloticus*) to iron oxide nanoparticles: Effects of particle morphology on accumulation, elimination, hematology and immune responses. *Aquatic Toxicology* 177:22-32. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.05.005>
- Bae, Y.J., Ryoo, K.S., Cho, K. & Baek, M.J. (2014) A study on biosorptive removal of Cd from wastewater using Chironomid larvae (Diptera: Chironomidae). *Journal of Advances in Chemistry*, 10:2415–2425. doi: <https://doi.org/10.24297/jac.v10i3.2272>.
- Bahadar, H., Maqbool, F., Niaz, K. & Abdollahi, M. (2016) Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. *Iranian Biomedical Journal*, 20(1):1-11. doi: <https://doi.org/10.7508/ibj.2016.01.001>
- Baldirim, V., Bedioui, F., Mignet, N., Margaille, I. & Berret, J.-F. (2018) The enzyme-like catalytic activity of cerium oxide nanoparticles and its dependency on Ce³⁺ surface area concentration. *Nanoscale*. 10(15):6971-6980. DOI: <https://doi.org/10.1039/C8NR00325D>
- Barber, L.B. (2014) 1.13 - Emerging Contaminants. In: Ahuja, S. ed. *Comprehensive Water Quality and Purification* [online]. Waltham: Elsevier, pp. 245–266. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012382182900015>
- Barmo, C., Ciacci, C., Canonico, B., Fabbri, R., Cortese, K., Balbi, T., Marcomini, A., Pojana, G., Gallo, G. & Canesi, L. (2013) *In vivo* effects of n-TiO₂ on digestive gland and immune function of the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 132-133:9-18. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.014>
- Bashir, I., Lone, F.A., Bhat, R.A., Mir, S.A., Dar, Z.A., & Dar, S.A. (2020) Concerns and threats of contamination on aquatic ecosystems. In: Hakeem, K.R., Bhat, R.A. & Qadri, H. (eds.) *Bioremediation and Biotechnology*. Cham, Switzerland: Springer, pp. 1–26. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-35691-0_1

- Beliaeff, B. & Burgeot, T. (2002) Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21:1316–1322. doi: <https://doi.org/10.1002/etc.5620210629>
- Beneberu, G. & Mengistou, S. (2014) Head capsule deformities in *Chironomus* spp. (Diptera: Chironomidae) as indicator of environmental stress in Sebeta River, Ethiopia. *African Journal of Ecology*, 53(3):268-277. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/aje.12175>
- Bernet, D., Schmidt-Posthaus, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P. & Wahli, T. (2001) Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *The Journal of Fish Disease*, 22:25–34. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>
- Berry, C.C., Wells, S., Charles, S. & Curtis, A.S. (2003) Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: Influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 24:4551–4557. doi: [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00237-0](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00237-0)
- Besseling, E., Foekema, E.M., van den Heuvel-Greve, M.J. & Koelmans, A.A. (2017) The Effect of Microplastic on the Uptake of Chemicals by the Lugworm *Arenicola marina* (L.) under Environmentally Relevant Exposure Conditions. *Environmental Science & Technology*, 51(15):8795-8804. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02286>
- Boros, B.V. & Ostafe, V. (2020) Evaluation of Ecotoxicology Assessment Methods of Nanomaterials and Their Effects. *Nanomaterials (Basel)*, 10(4):610. doi: <https://doi.org/10.3390/nano10040610>
- Bouchard, R.W., Carrillo, M.A., Kells, S.A. & Ferrington Jr, L.C. (2006) Freeze tolerance in larvae of the winter-active *Diamesa mendotae* Muttkowski (Diptera: Chironomidae): a contrast to adult strategy for survival at low temperatures. *Hydrobiologia*, 568:403–416. doi: <https://doi.org/10.1007/s10750-006-0200-6>
- Boudou, A. & Ribeyre, F. (1997) Aquatic ecotoxicology: from the ecosystem to the cellular and molecular levels. *Environmental Health Perspectives*, 105(1):21-35. doi: <https://doi.org/10.1289/ehp.97105s121>
- Boudou, A. & Ribeyre, F. (1989) Fundamental concepts in aquatic Ecotoxicology. In: Boudou, A., Ribeyre, F. eds. *Aquatic Ecotoxicology: Fundamental Concepts and Methodologies*. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 35-75.

- Boverhof, D.R., Bramante, C.M., Butala, J.H., Clancy, S.F., Lafranconi, M., West, J. & Gordon, S.C. (2015) Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(1):137-50. doi: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.06.001>
- Bowmer, T., Jenner, H.A., Foekema, E. & van der Meer, M. (1994) The detection of chronic biological effects in the marine intertidal bivalve *Cerastoderma edule*, in model ecosystem studies with pulverised fuel ash: reproduction and histopathology. *Environmental Pollution*, 85:191–204. doi: [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(94\)90086-8](https://doi.org/10.1016/0269-7491(94)90086-8)
- Boxall, A. (2010) Impacts of emerging contaminants on the environment. In: Batty, L.C. & Hallberg, K.B. (eds). *Ecology of Industrial Pollution*. Cambridge: Cambridge University Press (Ecological Reviews). pp. 101–125. doi: <https://doi.org/10.1017/CBO9780511805561>
- Brodin, Y. & Andersson, M.H. (2008) The marine splash midge *Telmatogon japonicus* (Diptera; Chironomidae)—extreme and alien? *Biological Invasions*, 11(6):1311-1317. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10530-008-9338-7>
- Bruno, J.F. & Selig, E.R. (2007) Regional Decline of Coral Cover in the Indo-Pacific: Timing, Extent, and Subregional Comparisons. *PLoS One*, 2(8):e711. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000711>
- Burt, E.T., Perry, R.J.O. & McLachlan, A.J. (1986) Feeding and sexual dimorphism in adult midges (Diptera: Chironomidae). *Holarctic Ecology*, 9(1):27-32. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.1986.tb01188.x>
- Butler, M.G. (1982) A 7-year life cycle for two Chironomus species in arctic Alaskan tundra ponds (Diptera: Chironomidae). *Canadian Journal of Zoology*, 60:58–70. doi: <https://doi.org/10.1139/z82-008>
- Caccia, S., Casartelli, M. & Tettamanti, G. (2019) The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. *Cell and Tissue Research*, 377:505–525. doi: <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03076-w>
- Campanale, C., Massarelli, C., Savino, I., Locaputo, V. & Uricchio, V.F. (2020) A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on

- Human Health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(4):1212. doi: <https://doi.org/10.3390%2Fijerph17041212>
- Carrillo, M.A., Canon, C.A. & Ferrington, L.C. (2004) Effect of Sex and Age on the Supercooling Point of the Winter-Active *Diamesa mendotae* Muttkowski (Diptera: Chironomidae), *International Journal of Freshwater Entomology*, 26(3-4):243-251. doi: <https://doi.org/10.1080/0165-0420400000320>
- Castagnola, A. & Jurat-Fuentes, J.L. (2016) Intestinal regeneration as an insect resistance mechanism to entomopathogenic bacteria. *Current Research in Insect Science*, 15:104-110. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.04.008>
- Cau, A., Avio, C.G., Dessì, C., Moccia, D., Pusceddu, A., Regoli, F., Cannas, R. & Follesa, M.C. (2020) Benthic Crustacean Digestion Can Modulate the Environmental Fate of Microplastics in the Deep Sea. *Environmental Science & Technology*, 54(8):4886-4892. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07705>
- Chaika, V., Pikula, K., Vshivkova, T., Zakharenko, A., Reva, G. & Drozdov, K. (2020) The toxic influence and biodegradation of carbon nanofibers in freshwater invertebrates of the families Gammaridae, Ephemerellidae, and Chironomidae. *Toxicology Reports*, 7:947-54. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.07.011>
- Chaitanya, R.K., Shashank, K. & Sridevi, P. (2016) Oxidative Stress in Invertebrate Systems. In: Ahmad, R. (ed), *Free Radicals and Diseases*. IntechOpen. doi: <https://doi.org/10.5772/64573>
- Chakraborty, P., Bharat, G.K., Gaonkar, O., Mukhopadhyay, M., Chandra, S., Steindal, E.H. & Nizzetto, L. (2022) Endocrine-disrupting chemicals used as common plastic additives: Levels, profiles, and human dietary exposure from the Indian food basket. *Science of The Total Environment*, 810:152200. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152200>
- Chaukura, N., Muzawazi, E.S., Katengeza, G. & Mahmoud, A.E.D. (2022) Chapter 20 - Remediation technologies for contaminated soil systems, In: Gwenzi, W. (ed), *Emerging Contaminants in the Terrestrial-Aquatic-Atmosphere Continuum: Occurrence, Health Risks and Mitigation*. Germany: Elsevier. pp. 353-365. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90051-5.00019-5>

- Chellaney, B. (2013) *Water, Peace, and War: Confronting the Global Water Crisis*. United Kingdom: Rowman & Littlefield Publishers, Inc.
- Chen, B.H. & Inbaraj B.S. (2018) Various physicochemical and surface properties controlling the bioactivity of cerium oxide nanoparticles. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(7):1003-1024. doi: <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1426555>
- Chen, J., Liu, G., Kang, Y., Wu, B., Sun, R., Zhou, C. & Wu, D. (2014) Coal utilization in China: environmental impacts and human health. *Environmental Geochemistry and Health*, 36(4):735-753. doi: <https://doi.org/10.1007/s10653-013-9592-1>
- Cherry, D.S., Guthrie, R.K., Sherberger, F.F. & Larrick, S.R. (1979) The influence of coal ash and thermal discharges upon the distribution and bioaccumulation of aquatic invertebrates. *Hydrobiologia*, 62:257–267. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00043543>.
- Choi, J. & Roche, H. (2004) Effect of potassium dichromate and fenitrothion on hemoglobins of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) larvae: potential biomarker of environmental monitoring. *Environmental Monitoring and Assessment*, 92:229–239. doi: <https://doi.org/10.1023/b:emas.0000014503.23761.77>
- Chou, M.M. (2012) Fly Ash. In: Meyers, R.A. (eds), *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology*. Springer. New York, NY. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0851-3_121
- Cintra-Socolowski, P., Nocelli, R., Roat, T., Silva-Zacarin, E. & Malaspina, O. (2016) Comparative physiology of Malpighian tubules: form and function. *Open Access Insect Physiology*, 6:13-23. doi: <https://doi.org/10.2147/oaip.s72060>
- Clough, S.J. & Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(6):735–743. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.1998.00343.x>
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C. & Galloway, T.S. (2015) The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*. *Environmental Science & Technology*, 49(2):1130-1137. doi: <https://doi.org/10.1021/es504525u>
- Colin, N., Porte, C., Fernandes, D., Barata, C., Padrós, F., Carrassón, M., Monroy, M., Cano-Rocabayera, O., de Sostoa, A., Piña, B. & Maceda-Veiga A. (2016) Ecological

- relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers. *Science of the Total Environment*, 540:307–323. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.099>
- Correia, A.T., Rebelo, D., Marques, J. & Nunes, B. (2019) Effects of the chronic exposure to cerium dioxide nanoparticles in *Oncorhynchus mykiss*: Assessment of oxidative stress, neurotoxicity and histological alterations. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 68:27–36. doi: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.02.012>
- Cossu-Leguille, C. & Vasseur, P. (2013) Aquatic Biomarkers. In: Férard, J.-F. & Blaise, C. (eds), *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer Reference. pp. 49–66. doi: https://doi.org/10.1007/978-94-007-5704-2_6
- Costa, M.S., Cossolin, J.F.S., Pereira, M.J.B., Sant’ana, A.E.G., Lima, M.D., Zanuncio, J.C. & Serrão, J.E. (2014) Larvicidal and Cytotoxic Potential of Squamocin on the Midgut of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Toxins (Basel)*, 6:1169-1176. doi: <https://doi.org/10.3390/toxins6041169>
- Costa, P. M. (2018) *The Handbook of Histopathological Practices in Aquatic Environments*. Elsevier Inc. pp. 1–20. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812032-3.00001-0>
- Costa, S. 3rd & Paulo Teixeira, J. (2014) Comet Assay. In: Wexler, P. (ed), *Encyclopedia of Toxicology*. Academic Press, Oxford. pp. 1020–1023. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.01072-1>
- Croom, E.L. (2016) The Role of Toxicokinetics and Toxicodynamics in Developmental and Translational Toxicology. In: Hughes, C.L. & Waters, M.D. (eds), *Translational Toxicology*. Switzerland: Humana Cham. pp. 45–81.
- Cross, R.K., Tyler, C.R. & Galloway, T.S. (2019) The fate of cerium oxide nanoparticles in sediments and their routes of uptake in a freshwater worm. *Nanotoxicology*, 13(7):894-908. doi: <https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1593540>
- da Silva Costa, M., de Paula, S.O., Martins, G.F., Zanuncio, J.C., Santana, A.E.G. & Serrão, J.E. (2016) Multiple Modes of Action of the Squamocin in the Midgut Cells of *Aedes aegypti* Larvae. *PLoS One*, 11(8):e0160928. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160928>

- Dalai, S., Pakrashi, S., Chandrasekaran, N. & Mukherjee, A. (2013) Acute Toxicity of TiO₂ Nanoparticles to *Ceriodaphnia dubia* under Visible Light and Dark Conditions in a Freshwater System. *PLoS One*, 8(4):e62970. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062970>
- Damasceno, K.C., Cavalcante, A.K., Maziero, J. da S., Martini, G. de A., Ormenio, M.B., Mamede, F.C. da S., Miranda, C. da S., Campello, F.A., Izidoro, J. de C., Rogero, S.O., Fungaro, D.A., Lopes-Ferreira, M.V. dos A. & Rogero, J.R. (2019) *In vitro* and *in vivo* toxicity of coal fly Ash Lechate. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 13(1):73–78. doi: <https://doi.org/10.5132/eec.2018.01.08>
- de Almeida Rossi, C., Roat, T.C., Tavares, D.A., Cintra-Socolowski, P. & Malaspina, O. (2013) Effects of sublethal doses of imidacloprid in malpighian tubules of africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Microscopy Research and Technique*, 76(5):552-558. doi: <https://doi.org/10.1002/jemt.22199>
- Denton, D., Shrivage, B., Simin, R., Mills, K., Berry, D. L., Baehrecke, E. H. & Kumar, S. (2009) Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Current Biology*, 19(20):1741-1746. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.08.042>
- Depledge, M.H. & Fossi, M.C. (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Invertebrates. Ecotoxicology*, 3:61–172. doi: <https://doi.org/10.1007/bf00117081>
- Dogra, Y., Arkill, K.P., Elgy, C., Stolpe, B., Lead, J., Valsami-Jones, E., Tyler, C.R. & Galloway, T.S. (2016) Cerium Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress in the Sediment Dwelling Amphipod *Corophium volutator*.” *Nanotoxicology*, 10(4):480–487. doi: <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1088587>
- Domingues, I., Guilhermino, L., Soares, A.M. & Nogueira, A.J. (2007) Assessing dimethoate contamination in temperate and tropical climates: potential use of biomarkers in bioassays with two chironomid species. *Chemosphere*, 69(1):145-54. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.013>
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M.C., Babut, M. & Vasseur, P. (1997) Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic Toxicology*, 39:93–110. doi: [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(97\)00024-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(97)00024-6)

- Duan, J., Bolan, N., Li, Y., Ding, S., Atugoda, T., Vithanage, M., Sarkar, B., Tsang, D.C.W. & Kirkham, M.B. (2021) Weathering of microplastics and interaction with other coexisting constituents in terrestrial and aquatic environments. *Water Research*, 196:117011. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117011>
- Duis, K. & Coors, A. (2016) Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. *Environmental Sciences Europe* 28(1):2. doi: <https://doi.org/10.1186%2Fs12302-015-0069-y>
- Đurđević, A., Medeiros, A., Žikić, V., Milosavljević, A., Savić-Zdravković, D., Lazarević, M. & Milošević, Đ. (2023) Mandibular shape as a proxy for the identification of functional feeding traits of midge larvae (Diptera: Chironomidae). *Ecological Indicators*, 147: 109908. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2023.109908>
- EC (Environment Canada) (2005) Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests. EPS 1/RM/46 with June 2007 amendments http://publications.gc.ca/collections/collection_2012/ec/En49-7-1-46-eng.pdf
- El-Saad, A.M.A., Kheirallah, D.A. & El-Samad, L.M. (2017) Biochemical and histological biomarkers in the midgut of *Apis mellifera* from polluted environment at Beheira governorate, Egypt. *Environmental Science and Pollution Research*, 24:3181–3193. doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8059-1>
- Enfrin, M., Lee, J., Giber, Y., Basheer, F., Kong, L. & Dumée, L.F. (2020) Release of hazardous nanoplastic contaminants due to microplastics fragmentation under shear stress forces. *Journal of Hazardous Materials*, 384:121393. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121393>
- Englande, A.J., Krenkel, P. & Shamas, J. (2015) Wastewater Treatment & Water Reclamation. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*, 2015:B978-0-12-409548-9.09508-7. doi: <https://doi.org/10.1016%2FB978-0-12-409548-9.09508-7>
- Even, N., Devaud, J.M. & Barron, A.B. (2012) General stress responses in the honey bee. *Insects*, 3(4):1271-1298. doi: <https://doi.org/10.3390/insects3041271>
- Epler, J.H. (2001) Identification manual for the larval Chironomidae (Diptera) of North and South Carolina. North Carolina Department of Environmental and Natural Resources; Division of Water Quality, Special Publication SJ2001-SP13.

- Farrell, P. & Nelson, K. (2013) Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environmental Pollution*, 177:1-3. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.01.046>
- Federici, G., Shaw, B.J. & Handy, R.D. (2007) Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 84:415–430. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.009>
- Ferrington, L.C. (2008) Global diversity of non-biting midges (Chironomidae; Insecta-Diptera) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595:447-455. doi: <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9130-1>
- Forbes, T.L. (1994) *Ecotoxicology in Theory and Practice*. Ecotoxicology Series. Springer Dordrecht. p. 248.
- Foucault, Q., Wieser, A., Waldvogel, A.-M. & Pfenninger, M. (2018) Establishing laboratory cultures and performing ecological and evolutionary experiments with the emerging model species *Chironomus riparius*. *Journal of Applied Entomology*, 143(5):584-592. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/jen.12606>
- Frias, J. & Nash, R. (2019) Microplastics: Finding a consensus on the definition. *Marine Pollution Bulletin*, 138:145–147. doi: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.11.022>
- Friederich, E. & Louvard, D. (2006) Microvilli. In: Ganten, D. & Ruckpaul, K. (ed), *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine*. Berlin: Springer. pp. 1116-1121. doi: https://doi.org/10.1007/3-540-29623-9_4120
- Fruttero, L.L., Leyria, J., Moyetta, N.R., Ramos, F.O., Settembrini, B.P. & Canavoso, L.E. (2019) The fat body of the hematophagous insect, *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): Histological features and participation of the β -chain of ATP synthase in the lipophorin-mediated lipid transfer. *Journal of Insect Science*, 19(4):16. doi: <https://doi.org/10.1093/jisesa/iez078>
- Gaharwar, U.S., Meena, R. & Rajamani, P. (2017) Iron oxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in lymphocytes. *Journal of Applied Toxicology*, 37(10):1232-1244. doi: <https://doi.org/10.1002/jat.3485>

- Galloway, T., Lewis, C., Dolciotti, I., Johnston, B.D., Moger, J. & Regoli, F. (2010) Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. *Environmental Pollution*, 158:1748–1755. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.11.013>
- Gardner, T.A., Côté, I.M., Gill, J.A., Grant, A. & Watkinson, A.R. (2003) Long-term region-wide declines in Caribbean corals. *Science*, 301(5635):958-960. doi: <https://doi.org/10.1126/science.1086050>
- Gomes, I.B., Simões, L.C. & Simões, M. (2018) The effects of emerging environmental contaminants on *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from drinking water in planktonic and sessile states. *Science of The Total Environment*, 643:1348–1356. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.263>
- Góth, L. (1991) A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*, 196(2-3):143–151. doi: [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(91\)90067-M](https://doi.org/10.1016/0009-8981(91)90067-M)
- Goushbolagh, N.A., Farhood, B., Astani, A., Nikfarjam, A., Kalantari, M. & Zare, M.H. (2018) Quantitative Cytotoxicity, Cellular Uptake and Radioprotection Effect of Cerium Oxide Nanoparticles in MRC-5 Normal Cells and MCF-7 Cancerous Cells. *Bionanoscience*, 8(3):769-777. doi: <https://doi.org/10.1007/s12668-018-0538-z>
- Grande, F. & Tucci, P. (2016) Titanium Dioxide Nanoparticles: a Risk for Human Health? *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 16(9):762-769. doi: <https://doi.org/10.2174/1389557516666160321114341>
- Grazioli, V., Rossaro, B., Parenti, P., Giacchini, R. & Lencioni, V. (2016) Hypoxia and anoxic effects on alcohol dehydrogenase activity and hemoglobin content in *Chironomus riparius* Meigen, 1804. *Journal of Limnology*, 75:347-354. doi: <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2016.1377>
- Green, D.S., Colgan, T.J., Thompson, R.C. & Carolan, J.C. (2019) Exposure to microplastics reduces attachment strength and alters the haemolymph proteome of blue mussels (*Mytilus edulis*). *Environmental Pollution*, 246:423-434. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.017>

- Griffin, S., Masood, M.I., Nasim, M.J., Sarfraz, M., Ebokaiwe, A.P., Schäfer, K.H., Keck, C.M. & Jacob, C. (2017) Natural Nanoparticles: A Particular Matter Inspired by Nature. *Antioxidants (Basel)*, 7(1):3. doi: <https://doi.org/10.3390%2Fantiox7010003>
- Grooten, M. & Almond, R.E.A. (2018) Living planet report-2018: aiming higher. Gland, Switzerland: WWF International.
- Grueso-Gilaberth, R.N., Jaramillo-Timarán, K.S., Ospina-Pérez, E.M., Richardi, V.S., Ossa-López, P.A. & RiveraPáez, F.A. (2020) Histological Description and Histopathology in *Polypedilum* sp. (Diptera: Chironomidae): A Potential Biomarker for the Impact of Mining on Tributaries. *Annals of the Entomological Society of America*, 113(5):359-72. doi: <https://doi.org/10.1093/aesa/saaa008>
- Gupta, R. & Xie, H. (2018) Nanoparticles in Daily Life: Applications, Toxicity and Regulations. *The Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology*, 37(3):209-230. doi: <https://doi.org/10.1615%2FJEnvironPatholToxicolOncol.2018026009>
- Gurcan, M.N., Boucheron, L.E., Can, A., Madabhushi, A., Rajpoot, N.M. & Yener, B. (2009) Histopathological Image Analysis: A Review. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, 2:147-171. doi: <https://doi.org/10.1109/rbme.2009.2034865>
- Gusso-Choueri, P.K., Choueri, R.B., de Araújo, G.S., Cruz, A.C.F., Stremel, T., Campos, S., de Sousa Abessa, D.M. & Ribeiro, C.A.O. (2015) Assessing pollution in marine protected areas: the role of a multi-biomarker and multi-organ approach. *Environmental Science and Pollution Research*, 22:18047–18065. doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4911-y>
- Gysin, U., Rast, S., Aste, A., Speliotis, T., Werle, C. & Meyer, E. (2011) Magnetic properties of nanomagnetic and biomagnetic systems analyzed using cantilever magnetometry. *Nanotechnology*, 22:285715. doi: <https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/28/285715>
- Ha, M.-H. & Choi, J. (2008) Effects of environmental contaminants on hemoglobin of larvae of aquatic midge, *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae): A potential biomarker for ecotoxicity monitoring. *Chemosphere*, 71:1928–1936. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.01.018>

- Hamer, D.H. (1986) Metallothioneins. *Annual Review of Biochemistry*, 55:913–951. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.004405>
- Harris, D., Heidrich, C. & Feuerborn, J. (2019) Global aspects on coal combustion products. Paper presented at the World of Coal Ash Conference; May 13-16; St Louis: USA.
- Hasan, M.K., Shahriar, A. & Jim, K.U. (2019) Water pollution in Bangladesh and its impact on public health. *Heliyon*, 5(8):e02145. doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02145>
- Hayford, B.L., Sublette, J.E. & Herrmann, S.J. (1995) Distribution of chironomids (Diptera: Chironomidae) and ceratopogonids (Diptera: Ceratopogonidae) along a Colorado thermal spring effluent. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 68(2):77–92.
- Heckert, E.G., Seal, S. & Self, W.T. (2008) Fenton-Like Reaction Catalyzed by the Rare Earth Inner Transition Metal Cerium. *Environmental Science & Technology*, 42(13):5014–5019. doi: <https://doi.org/10.1021/es8001508>
- Heckl, C., Lang, A., Rühm, A., Sroka, R., Duffield, T., Vogeser, M. & Paal, M. (2021) Spectrophotometric evaluation of hemolysis in plasma by quantification of free oxyhemoglobin, methemoglobin, and methemalbumin in presence of bilirubin. *Journal of Biophotonics*, 14(5):e202000461. doi: <https://doi.org/10.1002/jbio.202000461>
- Hochella, M.F., Spencer, M.G. & Jones, K.L. (2015) Nanotechnology: nature's gift or scientists' brainchild? *Environmental Science: Nano*, 2:114–119. doi: <https://doi.org/10.1039/C4EN00145A>
- Holtof, M., Lenaerts, C., Cullen, D. & Broeck, J.V. (2019) Extracellular nutrient digestion and absorption in the insect gut. *Cell and Tissue Research*, 377(3):397-414. doi: <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03031-9>
- Hooper, H.L., Sibly, R.M., Hutchinson, T.H. & Maund, S.J. (2003) The influence of larval density, food availability and habitat longevity on the life history and population growth rate of the midge *Chironomus riparius*. *Oikos*, 102(3):515-524. doi: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2003.12536.x>
- Hotze, E.M., Phenrat, T. & Lowry, G.V. (2010) Nanoparticle aggregation: challenges to understanding transport and reactivity in the environment. *Journal of Environmental Quality*, 39(6):1909-1924. doi: <https://doi.org/10.2134/jeq2009.0462>

- Hou, J., Wang, L., Wang, C., Zhang, S., Liu, H., Li, S. & Wang, X. (2019) Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms. *Journal of Environmental Sciences*, 75:40–53. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.06.010>
- Hu, M. & Palić, D. (2020) Micro- and nano-plastics activation of oxidative and inflammatory adverse outcome pathways. *Redox Biology*, 37:101620. doi: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101620>
- Huang, J.H., Jing, X. & Douglas, A.E. (2015) The multi-tasking gut epithelium of insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology Education*, 67:15-20. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.05.004>
- Huang, Y., Zhang, M., Jin, M., Ma, T., Guo, J. & Zhai, X. (2023) Recent Advances on Cerium Oxide-Based Biomaterials: Toward the Next Generation of Intelligent Theranostics Platforms. *Advanced Healthcare Materials*, 14:e2300748. doi: <https://doi.org/10.1002/adhm.202300748>
- Hunter, P. (2008) The paradox of model organisms. The use of model organisms in research will continue despite their shortcomings. *EMBO Reports*, 9(8):717-20. doi: <https://doi.org/10.1038/s41561-018-0080-1>
- Hurley, R., Woodward, J. & Rothwell, J.J. (2018) Microplastic contamination of river beds significantly reduced by catchment-wide flooding. *Nature Geoscience*, 11(4):251–257. doi: <https://doi.org/10.1038/s41561-018-0080-1>
- ILSI Risk Science Institute (2000) The relevance of the rat lung response to particle overload for human risk assessment: a workshop consensus report. *Inhalation Toxicology*, 12(1-2):1-17. doi: <https://doi.org/10.1080/08958370050029725>
- Issac, M.N. & Kandasubramanian, B. (2021) Effect of microplastics in water and aquatic systems. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(16):19544-19562. doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13184-2>
- Jacquin, J., Cheng, J., Odobel, C., Pandin, C., Conan, P., Pujo-Pay, M., Barbe, V., Meistertzheim, A.L. & Ghiglione, J-F. (2019) Microbial Ecotoxicology of Marine Plastic Debris: A Review on Colonization and Biodegradation by the “Plastisphere”. *Frontiers in Microbiology*, 10:865. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00865>

- Jakubowska, M., Białowas, M., Stankevičiūtė, M., Chomiczewska, A., Pažusienė, J., Jonko-Sobuś, K., Hallmann, A., Urban-Malinga, B. (2020) Effects of chronic exposure to microplastics of different polymer types on early life stages of sea trout *Salmo trutta*. *Science of The Total Environment*, 740:139922. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139922>
- Jambhulkar, H.P., Shaikh, S.M.S. & Kumar, M.S. (2018) Fly ash toxicity, emerging issues and possible implications for its exploitation in agriculture; Indian scenario: A review. *Chemosphere*, 213:333-344. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.045>
- Jayakumar, O.D., Ganguly, R., Tyagi, A.K., Chandrasekharan, D.K. & Nair, C.K. (2009) Water dispersible Fe₃O₄ nanoparticles carrying doxorubicin for cancer therapy. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9(11):6344-6348. doi: <https://doi.org/10.1166/jnn.2009.1369>
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y.S., Dufresne, A. & Danquah, M.K. (2018) Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9:1050-1074. doi: <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>
- Jernelöv, A., Nagell, B. & Svenson, A. (1981) Adaptation to an acid environment in *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) from Smoking Hills, NWT, Canada. *Ecography*, 4:116-119. doi: <https://doi.org/10.1111/J.1600-0587.1981.TB00987.X>
- Jovanović, B., Bezirci, G., Çağan, A.S., Coppens, J., Levi, E.E., Oluz, Z. & Beklioğlu, M. (2016b) Food web effects of titanium dioxide nanoparticles in an outdoor freshwater mesocosm experiment. *Nanotoxicology*, 10(7):902-912. doi: <https://doi.org/10.3109/17435390.2016.1140242>
- Jovanović, B., Gökdağ, K., Güven, O., Emre, Y., Whitley, E.M. & Kideys, A.E. (2018) Virgin microplastics are not causing imminent harm to fish after dietary exposure. *Marine Pollution Bulletin*, 130:123–131. doi: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.03.016>
- Jovanović, B., Milošević, D., Piperac, M.S. & Savić, A. (2016a) In situ effects of titanium dioxide nanoparticles on community structure of freshwater benthic macroinvertebrates. *Environmental Pollution*, 213:278-282. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.02.024>

- Karima, Z. (2021) Chironomidae: Biology, Ecology and Systematics. In: Perveen, F.K. (ed), *The Wonders of Diptera* [online]. Rijeka: IntechOpen. doi: <https://doi.org/10.5772/intechopen.95577>
- Kay, P., Hiscoe, R., Moberley, I., Bajic, L. & McKenna, N. (2018). Wastewater treatment plants as a source of microplastics in river catchments. *Environmental Science and Pollution Research* 25(20):20264-20267. doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2070-7>
- Kelly, J.R. & Harwell, M.A. (1989) Indicators of Ecosystem Response and Recovery. In: Levin, S.A., Kelly, J.R., Harwell, M.A. & Kimball, K.K. (eds), *Ecotoxicology: Problems and Approaches*. Springer-Verlag. pp. 9–35 doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3520-0_2
- Khan, S., Naushad, M., Govarthanan, M., Iqbal, J. & Alfadul, S.M. (2022) Emerging contaminants of high concern for the environment: Current trends and future research. *Environmental Research* 207:112609. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112609>
- Kholodovych, V. & Welsh, W.J. (2007) Thermal-Oxidative Stability and Degradation of Polymers. In: Mark, J.E. (ed), *Physical Properties of Polymers Handbook*. Springer, New York, NY. doi: https://doi.org/10.1007/978-0-387-69002-5_54
- Koehlé-Divo, V., Cossu-Leguille, C., Pain-Devin, S., Simonin, C., Bertrand, C., Sohm, B., Mouneyrac, C., Devin, S. & Giambérini, L. (2018) Genotoxicity and physiological effects of CeO₂ NPs on a freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*). *Aquatic Toxicology*, 198:141-148. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.020>
- Koshima, S. (1984) A novel cold-tolerant insect found in a Himalayan glacier. *Nature*, 310(5974):225–227. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/310225a0>
- Kozbek, A.Y., Sahin, K., Sari, E., Bedir, E., Yüce, F.G., Çitoglu, S. & Duran, H. (2022) Evaluation of amine functionalized thermal power plant solid waste for industrial wastewater remediation. *Adsorption Science & Technology*, 2022(12006):1–14. doi: <https://doi.org/10.1155/2022/8335566>

- Kukla, S., Slobodskova, V., Mazur, A., Chelomin, V. & Kamenev, Y. (2021) Genotoxic Testing of Titanium Dioxide Nanoparticles in Far Eastern Mussels, *Mytilus Trossulus*. *Pollution*, 7(1):129-140. doi: <https://doi.org/10.22059/poll.2020.308128.871>
- Kumar, N. & Kumbhat, S. (2016) Essentials in Nanoscience and Nanotechnology. In: Hoboken, N.J. (ed), *Carbon-Based Nanomaterials*. U.S.A.: John Wiley & Sons, Inc.: pp. 189–236.
- Kumar, V., Sharma, N. & Maitra, S.S. (2017) In vitro and in vivo toxicity assessment of nanoparticles. *International Nano Letters*, 7(4):243-256. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s40089-017-0221-3>
- Kümmerer, K. 2011. 3.04 - Emerging Contaminants. In: Wilderer, P. (ed), *Treatise on Water Science* [online]. Oxford: Elsevier. pp. 69–87. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978044453199500052X>
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (1997) Biomarqueurs en e'cotoxicologie. Paris: Masson: p. 419.
- Landsiedel, R., Ma-Hock, L., Wiench, K., Wohlleben, W. & Sauer, U.G. (2017) Safety assessment of nanomaterials using an advanced decision-making framework, the DF4nanoGrouping. *Journal of Nanoparticle Research*, 19(5):171. doi: <https://doi.org/10.1007/s11051-017-3850-6>
- Lavarías, S., Arrighetti, F. & Siri, A. (2017) Histopathological effects of cypermethrin and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on midgut of *Chironomus calligraphus* larvae (Diptera: Chironomidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 139:9-16. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.04.002>
- Lee, B. C., Kim, K. T., Cho, J. G., Lee, J. W., Ryu, T. K., Yoon, J. H., Lee, S.H., Duong, C.N., Eom, I.C., Kim, P.J. & Choiet, K.H. (2012) Oxidative stress in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to TiO₂ nanoparticles. *Molecular & Cellular Toxicology*, 8:357–366. doi: <https://doi.org/10.1007/s13273-012-0044-2>
- Lee, K.P., Trochimowicz, H.J. & Reinhardt, C.F. (1985) Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 79:179–192. doi: [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(85\)90339-4](https://doi.org/10.1016/0041-008x(85)90339-4)

- Lee, S.W., Kim, S.M. & Choi, J. (2009) Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28(1):86-91. doi: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.03.001>
- Lee, Y., Cho, J., Sohn, J. & Kim, C. (2023) Health Effects of Microplastic Exposures: Current Issues and Perspectives in South Korea. *Yonsei Medical Journal*, 64(5):301-308. doi: <https://doi.org/10.3349%2Fymj.2023.0048>
- Leonelli, S. & Ankeny, R.A. (2013) What makes a model organism? *Endeavour*, 37(4):209–212. doi: <https://doi.org/10.1016/j.endeavour.2013.06.001>
- Li, T., Huang, J., Du, H., Liu, X., Zhong, C., Lin, S. (2022) Coral bleaching from a nutrient perspective is understudied: A bibliometric survey. *Frontiers in Marine Science*, 9:926783. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fmars.2022.926783>
- Li-Byarlay, H., Pittendrigh, B.R. & Murdock, L.L. (2016) Plant Defense Inhibitors Affect the Structures of Midgut Cells in *Drosophila melanogaster* and *Callosobruchus maculatus*. *International Journal of Insect Science*, 8(8):71-79. doi: <https://doi.org/10.4137/ijis.s28595>
- Linevich, A.A. (1971) The Chironomidae of Lake Baikal. *Limnologica (Berlin)*, 8:51–52.
- Linhua, H., Zhenyu, W. & Baoshan, X. (2009) Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Environmental Sciences*, 21:1459–1466. doi: [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(08\)62440-7](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(08)62440-7)
- Lithner, D., Larsson, Å. & Dave, G. (2011) Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. *Science of The Total Environment*, 409:3309–3324. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.04.038>
- Liu, G., Gao, J., Ai, H., Chen, X. (2013) Applications and potential toxicity of magnetic iron oxide nanoparticles. *Small*, 9(9-10):1533-1545. doi: <https://doi.org/10.1002/sml.201201531>

- Liu, P., Zhan, X., Wu, X., Li, J., Wang, H. & Gao, S. (2020) Effect of weathering on environmental behavior of microplastics: Properties, sorption and potential risks. *Chemosphere*, 242:125193. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125193>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193:265–275.
- Lu, F.C. (1985) *Basic Toxicology: Fundamentals, Target Organs and Risk Assessment*. Washington: Hemisphere Publishing Corporation.
- Lu, K., Zhang, Z., He, X., Ma, Y., Zhou, K. & Zhang, H. (2010) Bioavailability and distribution and of ceria nanoparticles in simulated aquatic ecosystems, quantification with a radiotracer technique. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10(12):8658-8662. doi: <https://doi.org/10.1166/jnn.2010.2494>
- Maher, B. (2009) Evolution: Biology's next top model? *Nature*, 458(7239):695-698. doi: <https://doi.org/10.1038/458695a>
- Majumdar, T.N. & Gupta, A. (2012) Acute and chronic toxicity of copper on aquatic insect *Chironomus ramosus* from Assam, India. *Journal of Environmental Biology*, 33:139–142.
- Malhotra, N., Chen, J.-R., Sarasamma, S., Audira, G., Siregar, P., Liang, S.-T., Lai, Y.-H., Lin, G.-M., Ger, T.-R. & Hsiao, C.-D. (2019) Ecotoxicity Assessment of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticle Exposure in Adult Zebrafish at an Environmental Pertinent Concentration by Behavioral and Biochemical Testing. *Nanomaterials*, 9:873. doi: <https://doi.org/10.3390/nano9060873>
- Manerikar, R.S., Apte, A.A. & Ghole, V.S. (2008) In vitro genotoxicity of fly ash leachate in earthworm coelomocytes. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 90:293–300. doi: <https://doi.org/10.1080/02772240701458451>
- Matthews, B.J. & Voss hall, L.B. (2020) How to turn an organism into a model organism in 10 'easy' steps. *Journal of Experimental Biology*, 223(1):jeb218198. doi: <https://doi.org/10.1242/jeb.218198>
- Maynard, A.D. & Kuempel, E.D. (2005) Airborne nanostructured particles and occupational health. *Journal of Nanoparticle Research*, 6:587–614. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-005-6770-9>

- Millican J.M. & Agarwal S. (2021) Plastic Pollution: A Material Problem? *Macromolecules*, 54:4455–4469. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.0c02814> .
- Minami, M., Yoshikawa, H. (1979) A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. *Clinica Chimica Acta*, 92:337–342. doi: [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(79\)90211-0](https://doi.org/10.1016/0009-8981(79)90211-0)
- Mittal, S. & Pandey, A.K. (2014) Cerium oxide nanoparticles induced toxicity in human lung cells: Role of ROS mediated DNA damage and apoptosis. *BioMed Research International*, 2014:891934. doi: <https://doi.org/10.1155/2014/891934>
- Moiseenko, T.I. (2008) Aquatic ecotoxicology: Theoretical principles and practical application. *Water Resources*, 35(5):530–541. doi: <https://doi.org/10.1134/S0097807808050047>
- Müller, B. & Grossniklaus, U. (2010) Model organisms — A historical perspective. *Journal of Proteomics*, 73(11):2054–2063. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.08.002>
- Muñiz-González, A.-B., Silva, C.J.M., Patricio Silva, A.L., Campos, D., Pestana, J.L.T., Martínez-Guitarte, J.-L. (2021) Suborganismal responses of the aquatic midge *Chironomus riparius* to polyethylene microplastics. *Science of The Total Environment*, 783:146981. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146981>
- Nelliot, A., Bond, N. & Hoshizaki, D.K. (2006) Fat-body remodeling in *Drosophila melanogaster*. *Genesis*, 44(8):396-400. doi: <https://doi.org/10.1002/dvg.20229>
- Nelson, B.C., Johnson, M.E., Walker, M.L., Riley, K.R. & Sims, C.M. (2016) Antioxidant Cerium Oxide Nanoparticles in Biology and Medicine. *Antioxidants (Basel)*, 5(2):15. doi: <https://doi.org/10.3390/antiox5020015>
- Newman, M.C. (1995) Quantitative Methods in Aquatic Ecotoxicology. Boca Raton, Ann Arbor, London; Tokyo: Lewis Publishers Ltd.
- Nikitchenko, Y.V., Klochkov, V.K., Kavok, N.S., Karpenko, N.A., Yefimova, S.L., Semynozhenko, V.P., Nikitchenko, I.V. & Bozhkov, A.I. (2023) CeO₂ nanoparticles improve prooxidant/antioxidant balance, life quality and survival of old male rats. *Biogerontology*, 24(1):47-66. doi: <https://doi.org/10.1007/s10522-022-09987-6>
- Noletto, K.S., de Oliveira, S.R.S., Lima, I.M.A., de Jesus, W.B., da Silva Castro, J., de Santana, T.C., Cardoso, R.L., Jorge, M.B., Santos, D.M.S., de Souza Torres-Júnior, J.R. & Neta, R.N.F.C. (2021) Biochemical and Histological Biomarkers in *Crassostrea* sp.

- (Bivalvia, Ostreidae) for Environmental Monitoring of a Neotropical Estuarine Area (São José Bay, Northeastern Brazil). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 106:614–621. doi: <https://doi.org/10.1007/s00128-021-03149-z>
- Nolte, U. (1996) From egg to adult in less than seven days: *Apedilum elachistus* Chironomidae. In: Cranston, P. (ed), *Chironomids: From Genes to Ecosystems*. East Melbourne, Australia: CSIRO Publications. pp. 177–184. doi: <https://doi.org/10.1007/s10750-006-0200-6>
- NRC (National Research Council) (1987) Biological markers in environmental health research. *Environmental Health Perspectives*, 74:3–9. doi: <https://doi.org/10.1289%2Fehp.74-1474499>
- O'Brien, N.J. & Cummins, E.J. (2011) A Risk Assessment Framework for Assessing Metallic Nanomaterials of Environmental Concern: Aquatic Exposure and Behavior. *Risk Analysis*, 31(5):706–726. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1539-6924.2010.01540.x>
- O'Regan, B. & Grätzel, M. (1991) A low-cost, high-efficiency solar cell based on dye-sensitized colloidal TiO₂ films. *Nature*, 353:737–740. doi: <https://doi.org/10.1038/353737a0>
- OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development (2010a) List of manufactured nanomaterials and list of endpoints for phase one of the sponsorship programme for the testing of manufactured nanomaterials: revision. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 27. Environment Directorate. Paris, France: OECD.
- OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development (2010b) Test No. 233: Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. doi: <https://doi.org/10.1787/9789264090910-en>
- OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development (2012) Guidance on sample preparation and dosimetry for the safety testing of manufactured nanomaterials. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials, vol. 36, ENV/JM/MONO.

- OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development (2011) Test No. 235: Chironomus sp., Acute Immobilisation Test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. doi: <https://doi.org/10.1787/9789264122383-en>
- OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development (2014) Ecotoxicology and environmental fate of manufactured nanomaterials: test guidelines expert meeting report. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials, vol. 40, ENV/JM/MONO.
- OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development (2023a) Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. doi: <https://doi.org/10.1787/9789264070264-en>
- OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development (2023b) Test No. 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. doi: <https://doi.org/10.1787/9789264070288-en>
- Oki, T. & Kanae, S. (2006) Global Hydrological Cycles and World Water Resources. *Science*, 313(5790):1068-1072. doi: <https://doi.org/10.1126/science.1128845>
- Olin, S.S. (2000) The relevance of the rat lung response to particle overload for human risk assessment: A Workshop Consensus Report. *Inhalation Toxicology*, 12(1-2), 1–17. doi: <https://doi.org/10.1080/08958370050029725>
- Ospina-Pérez, E.M., Campeón-Morales, O.I., Richardi, V.S. & Rivera-Páez, F.A. (2019) Histological description of immature *Chironomus columbiensis* (Diptera: Chironomidae): A potential contribution to environmental monitoring. *Microscopy Research and Technique*, 82(8):1277-1289. doi: <https://doi.org/10.1002/jemt.23278>
- Petersen, E.J., Diamond, S.A., Kennedy, A.J., Goss, G.G., Ho, K., Lead, J., Hanna, S.K., Hartmann, N.B., Hund-Rinke, K., Mader, B., Manier, N., Pandard, P., Salinas, E.R. & Sayre, P. (2015) Adapting OECD Aquatic Toxicity Tests for Use with Manufactured Nanomaterials: Key Issues and Consensus Recommendations. *Environmental Science & Technology*, 49(16):9532-9547. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00997>
- Pikula, K., Chaika, V., Zakharenko, A., Savelyeva, A., Kirsanova, I., Anisimova, A. & Golokhvast, K. (2020) Toxicity of Carbon, Silicon, and Metal-Based Nanoparticles to

- the Hemocytes of Three Marine Bivalves. *Animals*, 10(5):827. doi: <https://doi.org/10.3390/ani10050827>
- Pillot, H.K.M. (2014) Chironomidae Larvae, Vol. 2: Chironomini: Biology and Ecology of the Chironomini. Brill.
- Pintong, A., Ampawong, S., Komalamisra, N., Sriwichai, P., Popruk, S. & Ruangsittichai, J. (2020) Insecticidal and Histopathological Effects of *Ageratum conyzoides* Weed Extracts against Dengue Vector, *Aedes aegypti*. *Insects*, 11(4):224. doi: <https://doi.org/10.3390/insects11040224>
- Pisanic, T.R. 2nd, Blackwell, J.D., Shubayev, V.I., Fiñones, R.R. & Jin, S. (2007) Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. *Biomaterials*, 28(16):2572-2581. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.01.043>
- Pradeau, D. (2006) Migration dans les aliments de composants des matériaux plastiques. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64:350–357. doi: [https://doi.org/10.1016/s0003-4509\(06\)75328-7](https://doi.org/10.1016/s0003-4509(06)75328-7)
- Pulido-Reyes, G., Rodea-Palomares, I., Das, S., Sakthivel, T.S., Leganes, F., Rosal, R., Seal, S. & Fernández-Piñas, F. (2015) Untangling the biological effects of cerium oxide nanoparticles: the role of surface valence states. *Scientific Reports*, 5:15613. doi: <https://doi.org/10.1038/srep15613>
- Qiao, R., Sheng, C., Lu, Y., Zhang, Y., Ren, H. & Lemos, B. (2019) Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish. *Science of The Total Environment*, 662:246–253. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.245>
- Qualhato, G., Rocha, T. L., de Oliveira Lima, E.C., e Silva, D.M., Cardoso, J. R. Grisolia, C.K., de Sabóia-Morais, S.M.T. (2017) Genotoxic and mutagenic assessment of iron oxide (maghemite- γ -Fe₂O₃) nanoparticle in the guppy *Poecilia reticulata*. *Chemosphere*, 183:305-314. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.061>
- Quik, J.T.K., Stuart, M.C., Wouterse, M., Peijnenburg, W., Hendriks, A.J. & van de Meent, D. (2012) Natural Colloids Are the Dominant Factor in the Sedimentation of Nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(5):1019–1022. doi: <https://doi.org/10.1002/etc.1783>

- Quik, J.T.K., van De Meent, D. & Koelmans, A.A. (2014) Simplifying Modeling of Nanoparticle Aggregation Sedimentation Behavior in Environmental Systems: A Theoretical Analysis. *Water Research*, 62:193–201. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.05.048>
- Raies, A.B. & Bajic, V.B. (2016) In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 6(2):147-172. doi: <https://doi.org/10.1002/wcms.1240>
- Ramade, F., Lagadic, L., Caquet, T. & Amiard, J.C. (1997) Biomarqueurs en écotoxicologie. Paris, France: Masson. p. 419.
- Rasheed, T., Bilal, M., Nabeel, F., Adeel, M. & Iqbal, H.M.N. (2019) Environmentally-related contaminants of high concern: Potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment. *Environment International*, 122:52-66. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.11.038>
- Rashid, M.M., Tavčer, P.F. & Tomšič, B. (2021) Influence of Titanium Dioxide Nanoparticles on Human Health and the Environment. *Nanomaterials (Basel)*, 11(9):2354. doi: <https://doi.org/10.3390/nano11092354>
- Rebechi-Baggio, D., Richardi, V.S., Vicentini, M., Guiloski, I.C., Assis, H.C.S. & de Navarro-Silva, M.A. (2016) Factors that alter the biochemical biomarkers of environmental contamination in *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 60(4):341–346. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2016.07.002>
- Regoli, F., Giuliani, M.E., Benedetti, M. & Arukwe, A. (2011) Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. *Aquatic Toxicology, Jubileum*, 105:56–66. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.014>
- Rezende, K. F. O., Bergami, E., Alves, K. V. B., Corsi, I. & Barbieri, E. (2018) Titanium dioxide nanoparticles alters routine metabolism and causes histopathological alterations in *Oreochromis niloticus*. *Boletim do Instituto de Pesca*, 44(2):1678-2305. doi: <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2018.343>

- Ribeiro, F., Garcia, A.R., Pereira, B.P., Fonseca, M., Mestre, N.C., Fonseca, T.G., Ilharco, L.M. & Bebianno, M.J. (2017) Microplastics effects in *Scrobicularia plana*. *Marine Pollution Bulletin*, 122:379–391. doi: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.078>
- Richardi, V.S., Vicentini, M., Morais, G.S., Rebechi, D., da Silva, T.A. & Fávoro, L.F. (2018) Effects of phenanthrene on different levels of biological organization in larvae of the sediment-dwelling invertebrate *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). *Environmental Pollution*, 242:277-287. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.091>
- Richardi, V.S., Vicentini, M., Rebechi, D., Fávoro, L.F. & Navarro-Silva, M.A. (2015) Morpho-histological characterization of immature of the bioindicator midge *Chironomus sancticaroli* Strixino and Strixino (Diptera, Chironomidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 59(3):240-250. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2015.07.003>
- Rodrigues, P., Silvestre, J.D., Flores-Colen, I., Viegas, C.A., Ahmed, H.H., Kurda, R. & de Brito, J. (2020) Evaluation of the Ecotoxicological Potential of Fly Ash and Recycled Concrete Aggregates Use in Concrete. *Applied Sciences*, 10:351. doi: <https://doi.org/10.3390/app10010351>
- Rogers, F., Arnott, P., Zielinska, B., Sagebiel, J., Kelly, K.E., Wagner, D., Lighty, J.S. & Sarofim, A.F. (2005) Real-Time Measurements of Jet Aircraft Engine Exhaust. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 55:583–593. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/10473289.2005.10464651>
- Romero, A., Estévez-Calvar, N., Dios, S., Figueras, A. & Novoa, B. (2011) New Insights into the Apoptotic Process in Mollusks: Characterization of Caspase Genes in *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS ONE*, 6(2):e17003. doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0017003>
- Rosenfeld, P.E. & Feng, L.G.H. (2011) 16 - Emerging Contaminants. In: Andrew, W. (ed), *Risks of Hazardous Wastes*. Elsevier Inc. p. 215-222.
- Rosenkranz, P., Chaudhry, Q., Stone, V. & Fernandes, T.F. (2009) A comparison of nanoparticle and fine particle uptake by *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(10):2142-2149. doi: <https://doi.org/10.1897/08-559.1>

- Ruiz, A., Gutiérrez, L., Cáceres-Vélez, P.R., Santos, D., Chaves, S.B. & Fascineli, M.L. (2015) Biotransformation of magnetic nanoparticles as a function of coating in a rat model. *Nanoscale*, 7(39):16321-16329. doi: <https://doi.org/10.1039/c5nr03780h>
- Sánchez-Bayo, F. & Tennekes, H.A. (2020) Time-Cumulative Toxicity of Neonicotinoids: Experimental Evidence and Implications for Environmental Risk Assessments. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(5):1629. doi: <https://doi.org/10.3390/ijerph17051629>
- Savić-Zdravković, D., Jovanović, B., Đurđević, A., Stojković-Piperac, M., Savić, A., Vidmar, J. & Milošević, Đ. (2018) An environmentally relevant concentration of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles induces morphological changes in the mouthparts of *Chironomus tentans*. *Chemosphere*, 211:489-499. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.139>
- Savić-Zdravković, D., Milošević, D., Uluer, E., Duran, H., Matic, S., Stanić, S., Vidmar, J., Ščančar, J., Dikić, D. & Jovanović, B. (2019) A multiparametric approach to cerium oxide nanoparticle toxicity assessment in non-biting midges. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39:131–140. doi: <https://doi.org/10.1002/etc.4605>
- Schneider, C.A., Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W. (2012) "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". *Nature methods*, 9(7):671-675. doi: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schuijt, L.M., Peng, F.-J., van den Berg, S.J.P., Dingemans, M.M.L. & Van den Brink, P.J. (2021) (Eco)toxicological tests for assessing impacts of chemical stress to aquatic ecosystems: Facts, challenges, and future. *Science of The Total Environment*, 795:148776. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148776>
- Schulze, E. (1994) A Key to the Larval Chironomidae and their Instars from Austrian Danube Region Streams and Rivers with Particular Reference to a Numerical Taxonomic Approach. Part I. In: Wasser und Abwasser, Supplementband 3/93. Hrsg.: Bundesamt für Wassergüte, Wien-Kaisermühlen. Schriftenleitung: Werner Kohl. Selbstverlag, 1993, 514 S., oS " 562,—.
- Scown, T.M., van Aerle, R., Johnston, B.D., Cumberland, S., Lead, J.R., Owen, R. & Tyler C.R. (2009) High Doses of Intravenously Administered Titanium Dioxide Nanoparticles Accumulate in the Kidneys of Rainbow Trout but with no Observable

- Impairment of Renal Function. *Toxicological Sciences*, 109:372–380. doi: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp064>
- Seabra, A.B., Pelegrino, M.T. & Haddad, P.S. (2017) Chapter 24 - Antimicrobial Applications of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Perspectives and Challenges. In: Fikai, A. & Grumezescu, A.M. (eds) *Nanostructures for Antimicrobial Therapy* [online]. Elsevier. pp. 531–550. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46152-8.00024-X>
- Seitz, A. (1994) The concept of ecological stability applied to aquatic ecosystems. In: Hill, R., Heimbach, F., Leeuwangh. P. & Matthiessen, P. (eds) *Freshwater Field Tests for Hazard Assessment of Chemicals*. BocaRaton, FL: Lewis Publishers. pp. 3-18.
- Servia, M.J., Péry, A.R.R., Heydorff, M., Garric, J. & Lagadic, L. (2006) Effects of copper on energy metabolism and larval development in the midge *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology (Lond., Engl.)*, 15:229–240. doi: <https://doi.org/10.1007/s10646-005-0054-0>
- Shah, Z.U. & Parveen, S. (2022) Oxidative, biochemical and histopathological alterations in fishes from pesticide contaminated river Ganga, India. *Scientific Reports*, 12:3628. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07506-8>
- Shahzad, K.B. & Yousaf, M. (2017) Coal fired power plants: emissions problems and controlling techniques. *Journal of Earth Science & Climatic Change*, 8:404. doi: <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7617.1000404>
- Sharifian, M.F., Pasmans, F., Adriaensen, C., Du Laing, G., Janssens, G.P.J. & Martel, A. (2014) Chironomidae Bloodworms Larvae as Aquatic Amphibian Food. *Zoo Biology*, 33(3):1-7. doi: <https://doi.org/10.1002/zoo.21122>
- Sharma, V.K., Alipour, A., Soran-Erdem, Z., Aykut, Z.G. & Demir, H.V. (2015) Highly monodisperse low-magnetization magnetite nanocubes as simultaneous T 1–T 2 MRI contrast agents. *Nanoscale*, 7(23):10519-10526. doi: <http://dx.doi.org/10.1039/c5nr00752f>
- Sherrard, R.M., Carriker, N.E. & Greeley Jr., M.S. (2015) How toxic is coal ash? A laboratory toxicity case study. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 11:5–9. doi: <https://doi.org/10.1002/ieam.1587>

- Shi, H., Magaye, R., Castranova, V. & Zhao, J. (2013) Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology*, 10:15. doi: <https://doi.org/10.1186%2F1743-8977-10-15>
- Silva, C.J.M., Patrício Silva, A.L., Campos, D., Machado, A.L., Pestana, J.L.T. & Gravato, C. (2021) Oxidative damage and decreased aerobic energy production due to ingestion of polyethylene microplastics by *Chironomus riparius* (Diptera) larvae. *Journal of Hazardous Materials*, 402:123775. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123775>
- Singh, N., Jenkins, G.J.S., Asadi, R. & Doak, S.H. (2010) Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Reviews & Experiments*, 1:10.3402/nano.v1i0.5358. doi: <https://doi.org/10.3402/nano.v1i0.5358>
- Singh, N.P. (2016). The comet assay: Reflections on its development, evolution and applications. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 767:23–30. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.05.004>
- Skocaj, M., Filipic, M., Petkovic, J. & Novak, S. (2011) Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? *Radiology and Oncology*, 45(4):227 – 247. doi: <https://doi.org/10.2478/v10019-011-0037-0>
- Sørensen, F.B., Sasaki, M., Fukuzawa, S., Yamabe, H., Olsen, S. & Yoshida, O. (1994) Qualitative and quantitative histopathology in transitional cell carcinomas of the urinary bladder. An international investigation of intra- and interobserver reproducibility. *Laboratory Investigation*, 70(2):242-54.
- Sorour, J. (2001) Ultrastructural variations in *Lethocerus niloticum* (Insecta: Hemiptera) caused by pollution in Lake Mariut, Alexandria, Egypt. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48(3):268-274. doi: <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.2003>
- Spies, M. & Sæther, O.A. (2004) Notes and recommendations on taxonomy and nomenclature of Chironomidae (Diptera). Auckland, New Zealand: Magnolia Press. p. 90. doi: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.752.1>
- Stanković, J., Milošević, D., Jovanović, B., Savić-Zdravković, D., Petrović, A., Raković, M., Stanković, N. & Piperac, M.S. (2022) In Situ Effects of a Microplastic Mixture on the Community Structure of Benthic Macroinvertebrates in a Freshwater Pond.

Environmental Toxicology and Chemistry, 41:888-895. doi:
<https://doi.org/10.1002/etc.5119>

Stanković, J., Milošević, D., Savić-Zdraković, D., Yalçın, G., Yildiz, D., Beklioğlu, M. & Jovanović, B. (2020a) Exposure to a microplastic mixture is altering the life traits and is causing deformities in the non-biting midge *Chironomus riparius* Meigen (1804). *Environmental Pollution*, 262:114248. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114248>

Stanković, N., Kostić, I., Jovanović, B., Savić-Zdravković, D., Matic, S., Bašić, J., Cvetković, T., Simeunović, J. & Milošević, Đ. (2020b) Can phytoplankton blooming be harmful to benthic organisms? The toxic influence of *Anabaena* sp. and *Chlorella* sp. on *Chironomus riparius* larvae. *Science of The Total Environment*, 729:138666. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138666>

Stentiford, G.D., Longshaw, M., Lyons, B.P., Jones, G., Green, M. & Feist, S.W. (2003) Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Marine Environmental Research*, 55(2):137-159. doi:
[https://doi.org/10.1016/s0141-1136\(02\)00212-x](https://doi.org/10.1016/s0141-1136(02)00212-x)

Stojanović, J., Savić-Zdravković, D., Jovanović, B., Vitorović, J., Bašić, J., Stojanović, I., Popović, A.Ž., Duran, H., Kolarević, M.K. & Milošević, Đ. (2023) Histopathology of chironomids exposed to fly ash and microplastics as a new biomarker of ecotoxicological assessment. *Science of The Total Environment*, 903:166042. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166042>

Stojanović, J.S., Milošević, Đ.D., Vitorović, J.S., Zdravković, D.N.S., Stanković, N.R., Stanković, J.B., Vasiljević, P. (2021) Histopathology of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) exposed to metal oxide nanoparticles. *Archives of Biological Sciences*, 73:319–329. doi: <https://doi.org/10.2298/ABS210515025S>

Sun, H.W., Zhang, X.Z., Niu, Q., Chen, Y.S. & Crittenden, J.C. (2007) Enhanced accumulation of arsenate in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. *Water, Air, & Soil Pollution*, 178:245–254. doi: <https://doi.org/10.1007/s11270-006-9194-y>

Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M.E. Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M.E.J., Le Goïc, N., Quillien, V., Mingant, C., Epelboin, Y., Corporeau, C., Guyomarch, J., Robbens, J., Paul-Pont, I.,

- Soudant, P. & Huvet, A. (2016) Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113:2430–2435. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1519019113>
- Syberg, K., Khan, F.R., Selck, H., Palmqvist, A., Banta, G.T., Daley, J., Sano, L. & Duhaime, M.B. (2015) Microplastics: addressing ecological risk through lessons learned. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(5):945–953. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2914>
- Szczerkowska-Majchrzak, E. & Jarosiewicz, M. (2020) A comparative study of the oxidative system in Chironomidae larvae with contrasting feeding strategies. *The European Zoological Journal*, 87(1):463-474. doi: <https://doi.org/10.1080/24750263.2020.1810336>
- Teodorović, I. & Kaišarević, S. (2015) Ekotoksikologija. Novi Sad, Srbija: Departman za Biologiju i Ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Ternes, T.A., Joss, A. & Siegrist H. (2004) Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environmental Science & Technology*, 38(20):392A-399A. doi: <https://doi.org/10.1021/es040639t>
- Tettamanti, G., Grimaldi, A., Casartelli, M., Ambrosetti, E., Ponti, B., Congiu, T., Ferrarese, R., Rivas-Pena, M. L., Pennacchio, F. & de Eguileor, M. (2007) Programmed cell death and stem cell differentiation are responsible for midgut replacement in *Heliothis virescens* during prepupal instar. *Cell and Tissue Research*, 330:345–359. doi: <https://doi.org/10.1007/s00441-007-0449-8>
- Thienemann, A. (1954) Chironomus. Leben, Verbreitung und wirtschaftliche Bedeutung der Chironomiden. Stuttgart: Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. pp. 834.
- Tickner, D., Opperman, J.J., Abell, R., Acreman, M., Arthington, A.H., Bunn, S.E., Cooke, S.J., Dalton, J., Darwall, W., Edwards, G., Harrison, I., Hughes, K., Jones, T., Leclère, D., Lynch, A.J., Leonard, P., McClain, M.E., Muruven, D., Olden, J.D., Ormerod, S.J., Robinson, J., Tharme, R.E., Thieme, M., Tockner, K., Wright, M. & Young, L. (2020) Bending the Curve of Global Freshwater Biodiversity Loss: An Emergency Recovery Plan. *Bioscience*, 70(4):330-342. doi: <https://doi.org/10.1093%2Fbiosci%2Fbiaa002>

- Tiseo, L. (2021) Global plastic production 1950–2018. Statista. Available from: <https://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950/>
- Tokiwa, Y., Calabia, B.P., Ugwu, C.U. & Aiba, S. (2009) Biodegradability of plastics. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9):3722-3742. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms10093722>
- Touart, L.W. (1988) Aquatic Mesocosm Test to Support Pesticide Registrations. EPA 540/09-88-035. Washington: U.S. Environmental Protection Agency.
- Tran, T.A., Hesler, M., Moriones, O.H., Jimeno-Romero, A., Fischer, B., Bastús, N.G., Puentes, V., Wagner, S., Kohl, J.L. & Gentile, L. (2019) Assessment of iron oxide nanoparticle ecotoxicity on regeneration and homeostasis in the replacement model system *Schmidtea mediterranea*. *ALTEX - Alternatives to animal experimentation*, 36(4):583-596. doi: <https://doi.org/10.14573/altex.1902061>
- Tsiridis V., Petala M., Samaras, P., Kungolos, A. & Sakellaropoulos, G.P. (2012) Environmental hazard assessment of coal fly ashes using leaching and ecotoxicity tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 84:212-220. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.07.011>
- Tsiridis, V., Samaras, P., Kungolos, A. & Sakellaropoulos, G.P. (2006) Application of leaching tests for toxicity evaluation of coal fly ash. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 21(4):409-416. doi: <https://doi.org/10.1002/tox.20187>
- Ullah, S., Ahmad, S., Guo, X., Ullah, S., Ullah, S., Nabi, G. & Wanghe, K. (2023) A review of the endocrine disrupting effects of micro and nano plastic and their associated chemicals in mammals. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 13:1084236. doi: <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1084236>
- Upadhyay, S.K. & Edrisi, S.A. (2021) Developing sustainable measures to restore fly-ash contaminated lands: current challenges and future prospects. *Land Degradation & Development*, 32:4817–4831. doi: <https://doi.org/10.1002/ldr.4090>.
- Valdiglesias, V., Fernández-Bertólez, N., Kiliç, G., Costa, C., Costa, S., Fraga, S., Bessa, M.J. Pásaro, E., Teixeira, J.P. & Laffon, B. (2016) Are iron oxide nanoparticles safe? Current knowledge and future perspectives. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 38:53-63. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.03.017>

- Vallenduuk, H.J. & Pillot, H.K.M. (2007) Chironomidae Larvae, Vol. 1: Tanypodinae: General Ecology and Tanypodinae. Brill.
- Van der Oost, R., Beyer, J. & Vermeulen, N.P. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2):57–149. doi: [https://doi.org/10.1016/s1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/s1382-6689(02)00126-6)
- Van Gastel, C.A.M. & Brummelen, T.C. (1996) Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*, 5:217–225. doi: <https://doi.org/10.1007/bf00118992>
- Vranković, J., Božanić, M., Živić, M., Marković, Z., Marjanović, S., Golubović, V. & Živić, I. (2022) Antioxidant biomarker profile of chironomid larvae from carp ponds: Evaluation of the effects of different fish feeding patterns. *Aquaculture Reports*, 27:101387. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101387>
- Wagner, S., Gondikas, A., Neubauer, E., Hofmann, T. & von der Kammer, F. (2014) Spot the Difference: Engineered and Natural Nanoparticles in the Environment—Release, Behavior, and Fate. *Angewandte Chemie International Edition*, 53:12398–12419. doi: <https://doi.org/10.1002/anie.201405050>
- Wagner, S., Klöckner, P., Stier, B., Römer, M., Seiwert, B., Reemtsma, T. & Schmidt, C. (2019) Relationship between Discharge and River Plastic Concentrations in a Rural and an Urban Catchment. *Environmental Science & Technology*, 53(17):10082-10091. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03048>
- Wallyn, J., Anton, N. & Vandamme, T.F. (2019) Synthesis, Principles, and Properties of Magnetite Nanoparticles for In Vivo Imaging Applications-A Review. *Pharmaceutics*, 11(11):601. doi: <https://doi.org/10.3390%2Fpharmaceutics11110601>
- Warrin, E., Din, Z.B. & Che Salmah, M.R. (2008) Use of Tropical Chironomid Larvae (Diptera: Chironomidae) as Indicator Organism for Aquatic and Sediment Toxicity Tests. Proceedings International Conference on Environmental Research and Technology. 25:14-19.
- Weinbren, M. (2019) Water, life and death. *Infection Prevention and Practice*, 1(1):100001. doi: <https://doi.org/10.1016%2Fj.infpip.2019.02.001>

- Welden, N.A.C. & Cowie, P.R. (2016) Long-term microplastic retention causes reduced body condition in the langoustine, *Nephrops norvegicus*. *Environmental Pollution*, 218:895-900. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.020>
- Weltje, L. & Bruns, E. (2009) The chironomid full life-cycle test. Validation report. Germany. <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/44082677.pdf>
- Wester, P.W. & Vos, J.G. (1994) Toxicological pathology in laboratory fish: an evaluation with two species and various environmental contaminants. *Ecotoxicology*, 3(1):21-44. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00121386>
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P. & Escamps-Latscha, B. (1996) Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International*, 49:1304–1313. doi: <https://doi.org/10.1038/ki.1996.186>
- Wojciechowska, M., Stepnowski, P. & Gołębiowski, M. (2019) Cyfluthrin and Deltamethrin Induce Changes in the Fat Body Composition of *Tenebrio molitor* Larvae, Males and Females. *Chemistry & Biodiversity*, 16(5):e1800515. doi: <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800515>
- Wu, L., Wen, W., Wang, X., Huang, D., Cao, J., Qi, X. & Shen, S. (2022) Ultrasmall iron oxide nanoparticles cause significant toxicity by specifically inducing acute oxidative stress to multiple organs. *Particle and Fibre Toxicology*, 19(1):24. doi: <https://doi.org/10.1186/s12989-022-00465-y>
- Wu, Y., Parthasarathy, R., Bai, H. & Palli, S.R. (2006) Mechanisms of midgut remodeling: Juvenile hormone analog methoprene blocks midgut metamorphosis by modulating ecdysone action. *Mechanisms of Development*, 123(7):530-547. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mod.2006.05.005>
- Xia, T., Kovoichich, M., Liang, M., Mädler, L., Gilbert, B., Shi, H., Yeh, J.I., Zink, J.I. & Nel, A.E. (2008) Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties. *ACS Nano*, 2(10):2121–2134. doi: <https://doi.org/10.1021/nm800511k>
- Yancheva, V., Velcheva, I., Stoyanova, S. & Georgieva, E. (2015) Histological biomarkers in fish as a tool in ecological risk assessment and monitoring programs: a review. *Applied*

ecology and environmental research, 14(1):47-75. doi:
http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1401_047075

Zdravković, S.D. (2020) Ekotoksičnost nanočestica oksida metala i potencijalne metode za njihov biomonitoring u akvatičnim ekosistemima [disertacija]. Srbija: Univerzitet u Nišu. p. 362.

Zhai, X., Zhang, X.-H. & Yu, M. (2023) Microbial colonization and degradation of marine microplastics in the plastisphere: A review. *Frontiers in Microbiology*, 14:1127308. doi:
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1127308>

Zhang, H., He, X., Zhang, Z., Zhang, P., Li, Y., Ma, Y., Kuang, Y., Zhao, Y & Chai, Z. (2011) Nano-CeO₂ Exhibits Adverse Effects at Environmental Relevant Concentrations. *Environmental Science & Technology*, 45(8):3725-3730. doi:
<https://doi.org/10.1021/es103309n>

Zhang, P., He, X., Ma, Y., Lu, K., Zhao, Y. & Zhang, Z. (2012) Distribution and bioavailability of ceria nanoparticles in an aquatic ecosystem model. *Chemosphere*, 89(5):530-535. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.044>

Zhang, W., Pu, Z., Du, S., Chen, Y. & Jiang, L. (2016) Fate of engineered cerium oxide nanoparticles in an aquatic environment and their toxicity toward 14 ciliated protist species. *Environmental Pollution*, 212:584-591. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.011>

Zhang, X.Z., Sun, H.W., Zhang, Z.Y., Niu, Q., Chen, Y.S. & Crittenden, J.C. (2007) Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nano-particles. *Chemosphere*, 67:160–166. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.09.003>

Zhao, X., Yu, M., Xu, D., Liu, A., Hou, X. & Hao, F. (2017) Distribution, Bioaccumulation, Trophic Transfer, and Influences of CeO₂ Nanoparticles in a Constructed Aquatic Food Web. *Environmental Science & Technology*, 51(9):5205-5214. doi:
<https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05875>

Zhu, S., Xue, M.Y., Luo, F., Chen, W.C., Zhu, B. & Wang, G.X. (2017) Developmental toxicity of Fe₃O₄ nanoparticles on cysts and three larval stages of *Artemia salina*. *Environmental Pollution*, 230:683-691. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.065>

- Zhu, X., Chang, Y. & Chen, Y. (2010a) Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 78:209–215. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.013>
- Zhu, X., Tian, S. & Cai, Z. (2012) Toxicity assessment of iron oxide nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *PLoS One*, 7(9):e46286. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046286>
- Zhu, X., Wang, J., Zhang, X., Chang, Y. & Chen, Y. (2010b) Trophic transfer of TiO₂ nanoparticles from *Daphnia* to zebrafish in a simplified freshwater food chain. *Chemosphere*, 79:928–933. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.03.022>
- Zhu, X., Zhou, J. & Cai, Z., (2011) The toxicity and oxidative stress of TiO₂ nanoparticles in marine abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Marine Pollution Bulletin*, 63(5-12):334-338. doi: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.03.006>
- Zhu, X., Zhu, L., Duan, Z., Qi, R., Li, Y. & Lang, Y. (2008) Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. *Journal of Environmental Science and Health. Part A. Toxic/hazardous substances and environmental engineering*, 433:278–284. doi: <https://doi.org/10.1080/10934520701792779>
- Ziajahromi, S., Kumar, A., Neale, P.A. & Leusch, F.D.L. (2018) Environmentally relevant concentrations of polyethylene microplastics negatively impact the survival, growth and emergence of sediment-dwelling invertebrates. *Environmental Pollution*, 236:425–431. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.094>
- Ziani, K., Ioniță-Mîndrican, C.B., Mititelu, M., Neacșu, S.M., Negrei, C., Moroșan, E., Drăgănescu, D. & Preda, O.-T. (2023) Microplastics: A Real Global Threat for Environment and Food Safety: A State of the Art Review. *Nutrients*. 15(3):617. <https://doi.org/10.3390/n15030617>
- Ziental, D., Czarczynska-Goslinska, B., Mlynarczyk, D.T., Glowacka-Sobotta, A., Stanisiz, B., Goslinski, T. & Sobotta, L. (2020) Titanium Dioxide Nanoparticles: Prospects and Applications in Medicine. *Nanomaterials (Basel)*, 10(2):387. doi: <https://doi.org/10.3390/nano10020387>

- Zierold, M.K. & Odoh, C. (2020) A review on fly ash from coal-fired power plants: chemical composition, regulations, and health evidence. *Reviews on Environmental Health*, 35(4):401-418. doi: <https://doi.org/10.1515/reveh-2019-0039>
- Zoroddu, M., Medici, S., Ledda, A., Nurchi, V., Lachowicz, J. & Peana, M. (2014) Toxicity of Nanoparticles. *Current Medicinal Chemistry*, 21(33):3837-3853. doi: <https://doi.org/10.2174/0929867321666140601162314>
- Tsiridis, V., Petala, M., Samaras, P., Kungolos, A. & Sakellaropoulos, G.P. (2012) Environmental hazard assessment of coal fly ashes using leaching and ecotoxicity tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 84:212-220. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.07.011>

Поглавље 8

Прилози

Прилог 1 - Методологија коришћена за одређивање карактеризације наночестица TiO₂

BET

За карактеризацију нано-TiO₂ честица коришћена је метода Brunauer-Emmett-Teller (BET) анализа специфичне површине која је изведена уз помоћ „Autosorb iQ Station 1“ у N₂ атмосфери. Овом методом добија се укупна површина честица која, осим спољашње површине колектива честица, укључује и површину пора на самим честицама које се анализирају.

TEM

Трансмисионом електронском микроскопијом (TEM) добијене су фотомикрографије при чему је коришћен „FEI Tecnai G2 F30“. Припрема узорака обухватала је наношеће 1 - 2 капи дисперзије наночестица у етанолу на мрежу од бакра која је обложена угљеником.

AFM

Atomic Force Microscopy (AFM) анализа изведена је уз помоћ PSIA XE-100E спектроскопије са конзолом пресвученом силиконом (Olympus OMCL-AC160TS-W2). Константа опруге била је 40 N/mm у динамичком резоновању.

XRD

Мерење дифракције извршено је уз помоћ „Pananalytical X'pert Pro“ вишенаменског рендгенског дифрактометра у рефлексној геометрији. Као извор зрака служио је CuK α ($\lambda = 0,154$ nm), јачине 40 mA и енергије 40 kV.

XPS

За X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) анализу коришћен је „Thermo Scientific K-Alpha“. Као извор зрака коришћен је Mg K α (1253,6 eV) са снагом од 300W. Испитивање спектра извршено је енергијом проласка електрона од 117,40 eV а за његово читавање коришћен је почетни угао од 60° у односу на нормалну површину.

DLS и зета потенцијал

За мерење хидродинамичког потенцијала коришћена је Dynamic Light Scattering (DLS) метода. Хидродинамички радијус и зета потенцијал измерени су уз помоћ „Malvern ZetaNano ZS“ на 25°C. За само мерење коришћена је капиларна ћелија облика

слова „U“ (DTS1060) и He-Ne ласерски извор зрака јачине 5 mW и таласне дужине 633 nm. Узорци су припремљени у концентрацијама од 25 µg/l и 250 µg/l у дејонизованој води и просечан хидродинамички радијус мерен је на сваких 5 min у току првих 60 min од припреме самог узорка, као и након 24 h. Зета потенцијал је измерен 15 min након припреме узорка.

Прилог 2 - Методологија коришћена за одређивање карактеризације наночестица CeO₂

ВЕТ

Површинска анализа изведена је на „Autosorb-iQ Station 1“ у N₂ атмосфери. Тестом адсорбције и десорбције на 77 K (-196,15°C) добијене су специфичне површине наночестица CeO₂. Пре почетка мерења, вршена је дегасификација узорка на 120°, у трајању од 15 h.

ТЕМ

ТЕМ фотомикрографије добијене су коришћењем „FEI Tecnai G2 F30“. Узорци су припремљени на исти начин као и за анализу наночестица TiO₂, односно наношењем 1 - 2 капи дисперзије наночестица у етанолу на бакарну мрежу пресвучену угљеником.

SEM

Како би се утврдила морфологија наночестица CeO₂, агрегационо стање и њихова величина коришћен је „FEI Nova Nano SEM 430“ микроскоп са средњим напонем електронског снопа (10 – 20 kV). Како би се анализирале наночестице под високом резолуцијом у вакууму, оне су прекривене танким слојем злата (10 nm) прскањем. За прецизно лоцирање нано-CeO₂ на површини седимента, паралелно са SEM методом урађена је EDAX (енг. *Energy-dispersive X-ray spectroscopy*) спектроскопија.

XRD

Дифракционе мере X-зрака добијене су уз помоћ вишенаменског „Pananalytical X'pert Pro“ рендгенског дифрактометра у рефлексној геометрији. Коришћени су бакарни Kα зраци, таласне дужине 0,154 nm, напона од 40 kV и јачине 40 mA. Мерења су извршена у 2θ опсегу од 1° до 90° са корацима од 0,5°.

XPS

За ову анализу коришћен је Mg K α (1253,6 eV) извор зрака снаге 300 W. За испитивање спектра употребљена је енергија проласка електрона од од 117,40 eV, а за његово снимање коришћен је угао од 60° у односу на нормалну површину. За ову методу коришћен је апарат „Thermo Scientific K-Alpha“.

DLS и зета потенцијал

Хидродинамички радиус и зета потенцијал су мерени на „Malvern ZetaNano ZS“ на 25 °C. Коришћен је He-Ne ласерски извор зрака јачине 5 mW на 633 nm. Суспензија наночестица припремљена је у дејонизованој води у концентрацији 0,1 mg/mL без сонификације. Просечни хидродинамички радијус мерен је на сваких 5 min у току 60 min.

Прилог 3 – Методе за синтезу и карактеризацију наночестица Fe₃O₄

Синтеза наночестица Fe₃O₄ урађена је према методи Шарма и сар. (Sharma и сар., 2015). На самом почетку, гас је извођен из грла волуметријске бочице 20-30 минута. Затим је FeO(OH) самлевен и профилиран кроз филтер са дијаметром пора од 125 nm. Овако припремљен FeO(OH) пребачен је у бочицу и додате су олеинска киселина (собне температуре) и 1-oktadecen. Раствор је затим мешан брзином од 500 rpm (обртаја у минути) и температура повећана са собне на 320°C брзином од 10°/min. Након 1 h, раствор је склоњен са грејача и охлађен, а затим пребачен у центрифугу где је 20 min испиран heksan-acetonom (1:2) на 6000 обртаја у минути четири пута. На овај начин добијен је прах наночестица Fe₃O₄ који је коришћен за даље експерименте.

ТЕМ

Фотомикрографије направљене су снимањем на „FEI Tecnai G2 F30“, а узорци су припремљени на исти начин као и за наночестице TiO₂ и CeO₂.

SEM

Анализа наночестица Fe₃O₄ вршена је под истим условима као и за наночестице CeO₂. Уз помоћ „FEI Nova Nano SEM 430“ микроскопа са средњим напоном електронског снопа (10 – 20 kV) испитана је морфологија, агрегатно стање и величина нано-Fe₃O₄ честица. Како би се наночестице анализирале под високом резолуцијом у вакууму, оне су прекривене танким слојем злата (10 nm). EDAX спектроскопија урађена је паралелно са SEM, како би се наночестице прецизније лоцирале на површини седимента.

XRD

Структурна мерења рендгендске дифракције вршена су на вишенаменском „Pananalytical X’pert Pro“ рендгенском дифрактометру у рефлексној геометрији при чему је коришћен Cu снап зрака, линије K α ($\lambda = 0,154$ nm), јачине 40 mA и енергије од 40 kV. Употребљен је интервал углова 2θ од 1° до 80° са корацима од по $0,05^\circ$.

XPS

За рендгенску фотоелектронску спектроскопију коришћен је Mg K α (1253,6 eV) извор зрака снаге 300 W. Анализа спектра урађена је енергијом проласка електрона од 117,40 eV. Снимање је извршено под углом од 60° у односу на нормалну површину. За дату анализу коришћен је „Thermo Scientific K-Alpha“.

Магнетна својства

Магнетна својства наночестица Fe₃O₄ испитане су уз помоћ криогеног уређаја „Physical Property Measurement System“ који користи 12 T магнет.

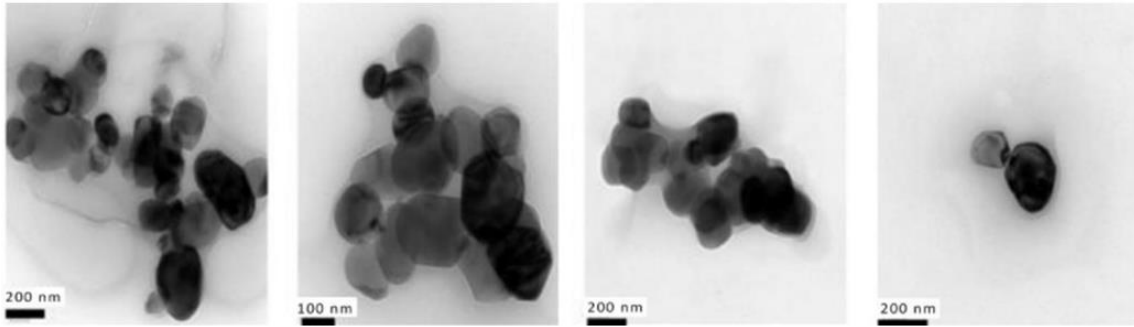
Прилог 4- Карактеризација полимера микропластике

Димензије честица сваког полимера појединачно одређене су микроскопски. За сваки полимер насумично је изабрано 100 честица које су измерене под микроскопом Leica MZ16A на окуларном увећању од 10 X/21 B, објективном увећању 50 X. Све честице имале су ирегуларни облик.

Прилог 5 – Резултати карактеризације наночестица TiO₂

ВЕТ анализом детектована је специфична површина наночестица од $6,137$ m² g⁻¹, док је запремина пора износила $0,123$ cc g⁻¹, а дијаметар пора $2,968$ nm.

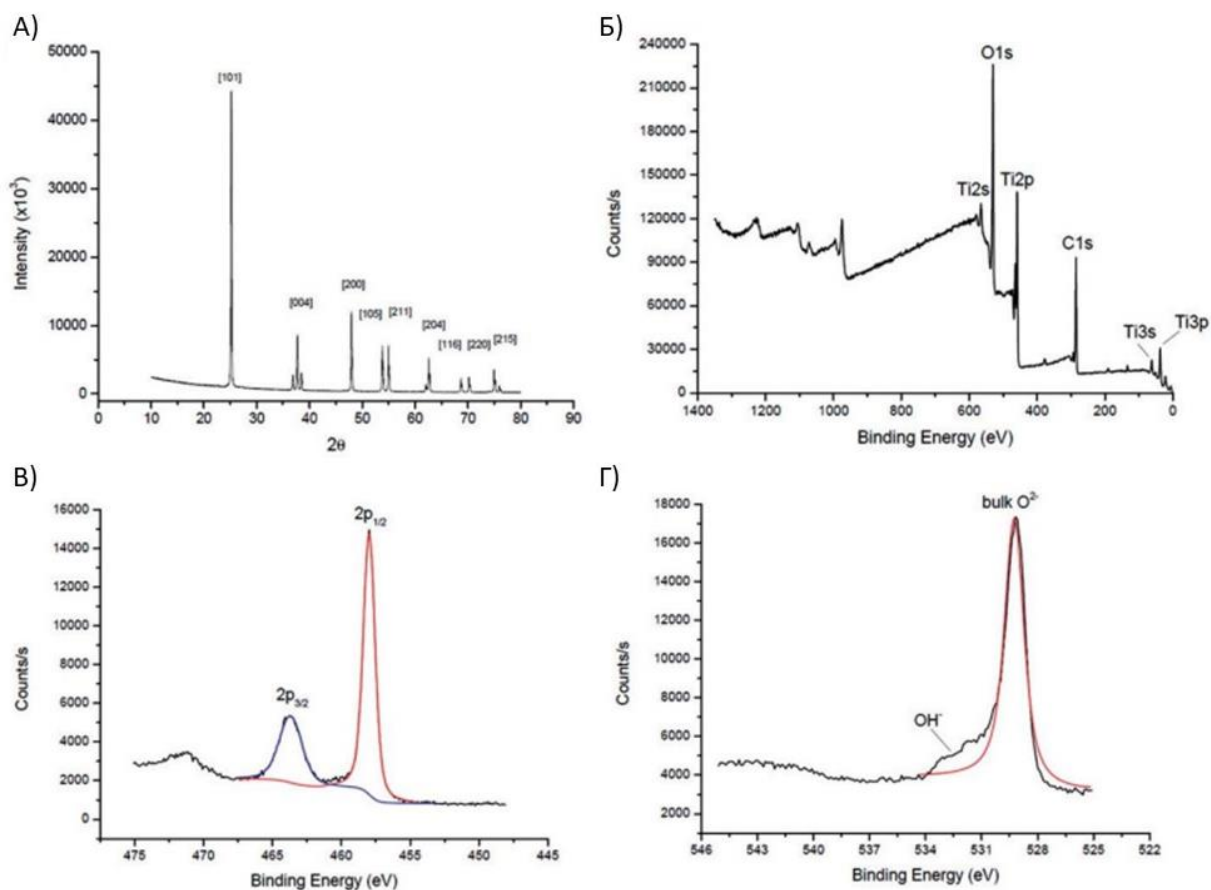
ТЕМ анализом показано је да наночестице TiO₂ широку дистрибуцију величине честица које поседују јасно дефинисане ивице (Слика 1). Величина честица варирала је између 50 и 300 nm, при чему су оне агрегирале у етанолу. Захваљујући АФМ анализи, величина самих честица дефинисана је прецизније и добијена је вредност од 167 ± 50 nm (средња вредност \pm стандардна девијација).



Слика 1. ТЕМ фотомикрографије наночестица TiO₂. Слика преузета из Јовановић и сар., 2016а.

Све дифракционе фотоелектронске линије у XRD анализи су биле лепо дефинисане и показале су да ове честице имају анатас кристалну форму, што је касније и подржано XPS анализом и односом титанијума и кисеоника у узорку. Карактеристичне фотоелектронске линије које би указивале на другу кристалну форму нису детектоване (слика 2А).

Резултати XPS анализе приказани су у спектрограму на слици 2Б-Д. Детектоване фотоелектронске линије у Ti2p спектру су карактеристичне за TiO₂ и износиле су 463,8 eV за Ti2p_{3/2} линију и 458,0 eV за Ti2p_{1/2} линију (слика 2В). Када се посматра O1s спектар, може се детектовати главна фотоелектронска линија на 529,2 eV која указује на присуство кисеоника везаног за тетравалентне јоне Ti. Такође, на ~532,5 eV детектовано је „раме“ које имплицира да је површина делимично покривена и хидроксилиним групама (OH) (слика 2Г).



Слика 2. Карактеризација наночестица TiO_2 . А) XRD šema kristalne strukture; Б) XPS спектар целог узорка; В) XPS спектар $\text{Ti}2p$ фотоелектронске линије; Г) XPS спектар $\text{O}1s$ фотоелектронске линије. График преузет из Јовановић и сар., 2016а.

На основу DLS мерења добијено је да је пречник честица испод 100 nm за отприлике 30% наночестица TiO_2 у чистој води. Примећено је да наночестице TiO_2 имају потенцијал да формирају агрегате у дестилованој води која зависи од концентрације. Средњи хидродинамички пречник (енг. *hydrodynamic diameter*, dH) приказан је у табели 1.

ζ потенцијал у дејонизованој води био је нестабилан и саме вредности ζ потенцијала биле су изнад -30 mV и испод +30 mV што се сматра доњом и горњом границом за стабилне колоидалне дисперзије. Како је хидродинамични дијаметар агрегата био висок, закључено је да агрегати брзо тону на дно у првих сат времена што је утицало на смањење средњег хидродинамичког дијаметра осталих агрегата у суспензији.

Табела 1. Средњи хидродинамички пречник TiO_2 у току времена. Табела преузета из Јовановић и сар., 2016а.

Време	TiO_2 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ dH (nm) (СВ ± СД)	TiO_2 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ dH (nm) (СВ ± СД)
-------	---	--

0 мин	2494 ± 5	5540 ± 4
5 мин	1796 ± 6	3622 ± 3
10 мин	1635 ± 15	2991 ± 8
15 мин	1513 ± 17	1744 ± 11
20 мин	1441 ± 11	3058 ± 2
25 мин	1150 ± 19	2791 ± 3
30 мин	1320 ± 20	3974 ± 4
35 мин	1545 ± 11	4168 ± 4
40 мин	1457 ± 21	1943 ± 10
45 мин	1112 ± 15	2135 ± 9
50 мин	-	3817 ± 2
55 мин	1282 ± 22	-
60 мин	1296 ± 10	-
24 ч	437 ± 54	1148 ± 63

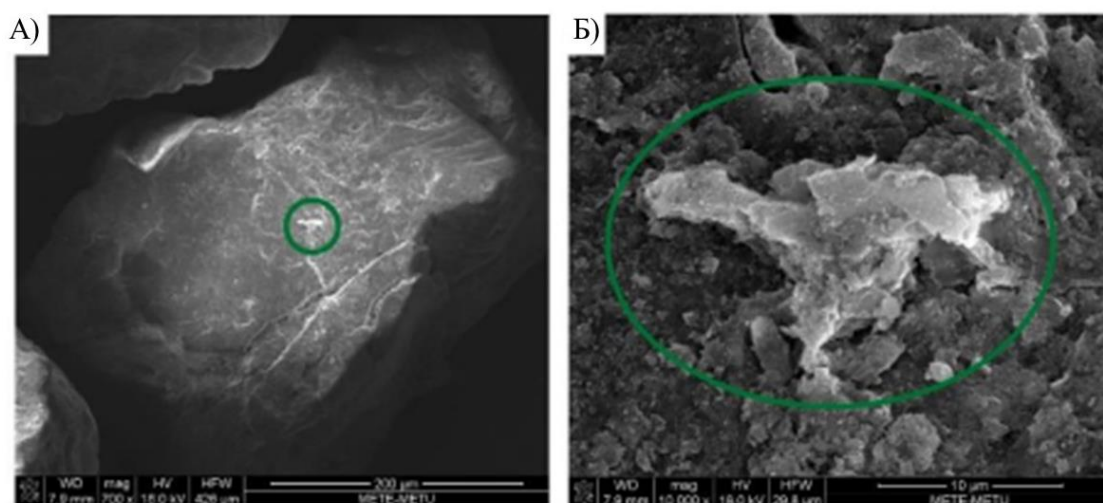
СВ – средња вредност

СД – стандардна девијација

Прилог 6 - Резултати карактеризације наночестица CeO_2

Према ВЕТ анализи, специфична површина наночестица CeO_2 износила је $42,602 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, док је запремина пора био $1,172 \text{ cc g}^{-1}$, а њихов радијус $1075,761 \text{ \AA}$.

Резултати ТЕМ анализе показали су да ове наночестице имају широку дистрибуцију величине честица која је износила $25 \pm 1,8 \text{ nm}$ (средња вредност \pm стандардна девијација). Облик честица је био угласт и примећен је њихов потенцијал да формирају агрегате у етанолу (слика 3).

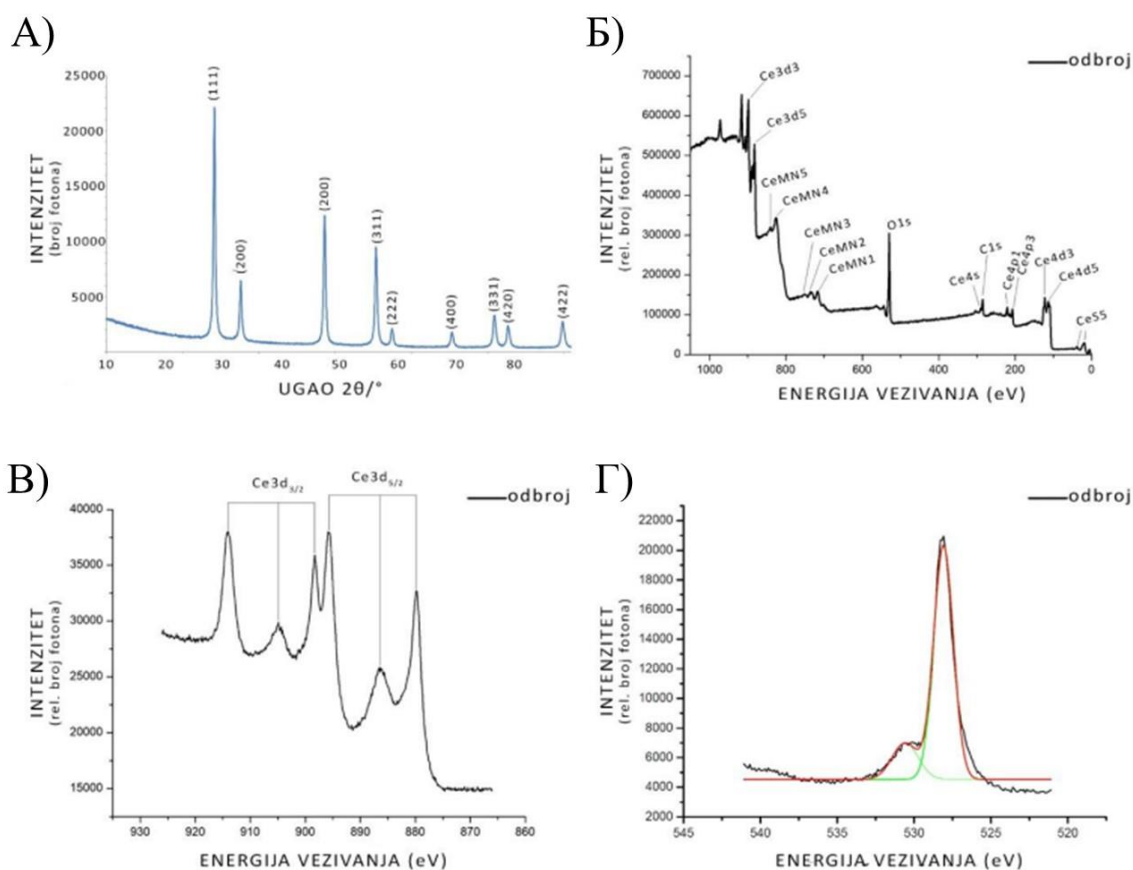


Слика 3. ТЕМ фотомикрографије наночестица CeO_2 . Слика преузета из Савић-Здравковић и сар., 2020.

Агрегације наночестица CeO₂ имају тенденцију да се везују за честице силицијум диоксида (SiO₂) у седименту, што је утврђено СЕМ микроскопијом. Примећено је да агрегати имају широку дистрибуцију величине и у самом узорку није постојао агрегат који није био везан за честице SiO₂.

На основу дифракционих фотоспектријских линија XRD анализом показано је да ове наночестице могу имати кристалну структуру флуорита, односно површински центриране решетке, што је касније и подржано XPS анализом и односом церијума и кисеоника у узорку. Карактеристичне фотоелектронске линије које би указивале на другу кристалну форму нису детектоване.

Резултати XPS анализе приказани су у спектрограму на слици 4. Детектоване фотоелектронске линије у Ce3d спектру су карактеристичне за CeO₂ и износиле су између 915 и 900 eV за Ce_{3/2} линију и између 895 и 875 eV за Ce_{5/2} линију (слика 4B). Када се посматра O1s спектар, може се детектовати главна фотоелектронска линија на 529,2 eV која указује на присуство кисеоника везаног за тетравалентне јоне Се (слика 4Г). Такође, на ~532,5 eV детектовано је „раме“ које имплицира да је површина делимично покривена и хидроксилним групама (OH).



Слика 4. Карактеризација наночестица CeO_2 . А) XRD *šema* kristalne strukture; Б) XPS спектар целог узорка; В) XPS спектар $\text{Ce}3d$ фотоелектронске линије; Г) XPS спектар $\text{O}1s$ фотоелектронске линије. График преузет из Савић-Здравковић и сар., 2020.

На основу DLS анализе, одређен је средњи хидродинамички пречник који је износио $671 \pm 112 \text{ nm}$ (табела 2).

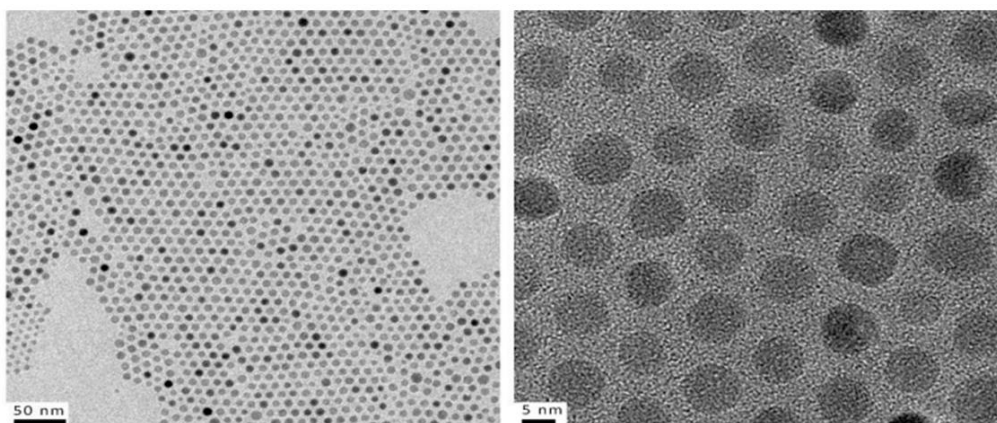
ζ потенцијал у дејонизованој води износио је 28 mV што указује на то да су наночестице CeO_2 умерено стабилне у дејонизованој води.

Табела 2. Средњи хидродинамички пречник CeO_2 у току времена. Вредности преузете из Савић-Здравковић и сар., 2020.

<i>Време</i>	<i>CeO_2 dH (nm)</i>
5 мин	1068
10 мин	803,2
15 мин	687,7
20 мин	716,1
25 мин	552,3
30 мин	513,3
35 мин	477,2
40 мин	558,2
45 мин	580,9
50 мин	817,9
55 мин	642,8
60 мин	639,9

Прилог 7 - Резултати карактеризације наночестица Fe_3O_4

Према TEM микроскопији дистрибуција величине честица наночестица Fe_3O_4 је уска и креће се између 4,4 и 10,1 nm. Просечан пречник износио је 7,5 nm, при чему се униформна расподела величине нано- Fe_3O_4 постиже при пречнику од $7,5 \pm 0,78 \text{ nm}$ (СВ \pm СД). Облик честица био је сферичан (слика 5).

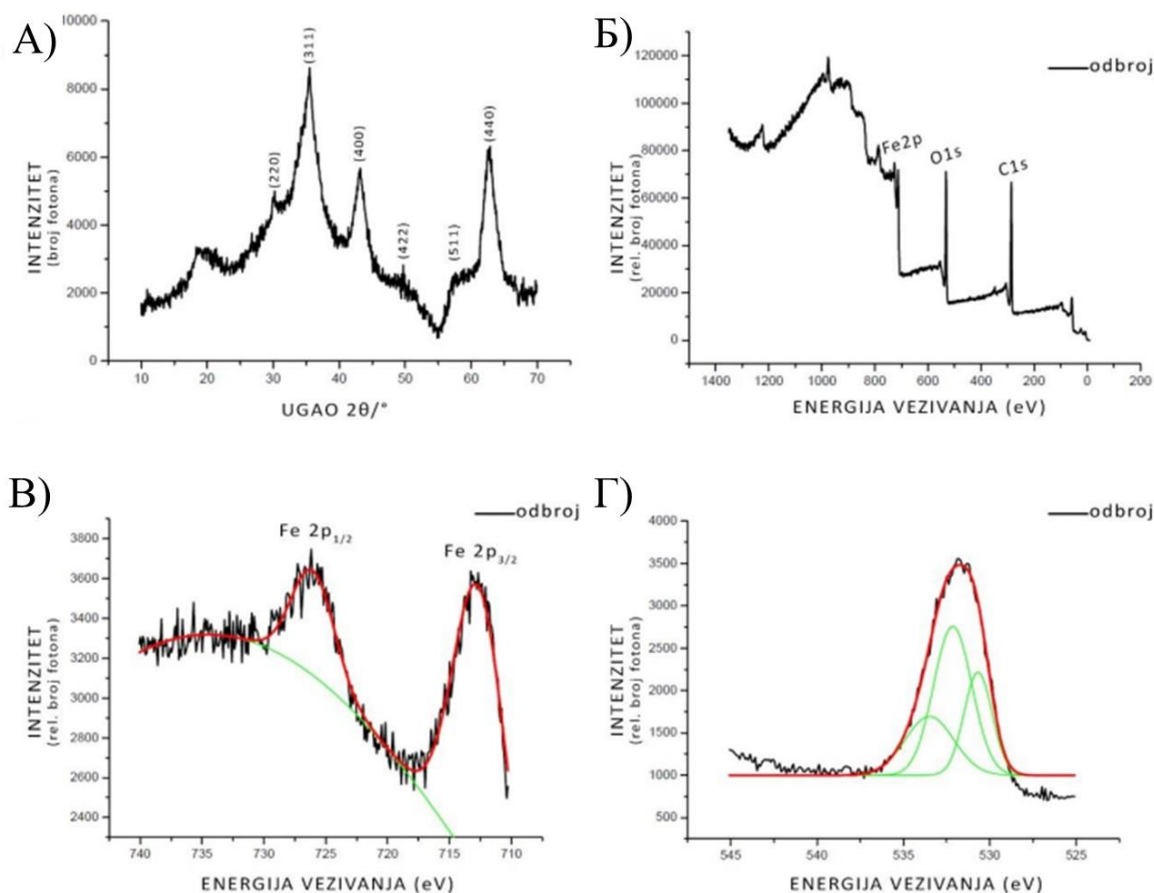


Слика 5. ТЕМ фотомикрографије наночестица Fe_3O_4 , на два различита увећања. Слика преузета из Савић-Здравковић, 2020.

СЕМ анализом уочено је да наночестице Fe_3O_4 имају потенцијал да агрегирају и да се код ових агрегатата са повећањем концентарције честица, повећава и њихова тенденција интеракције са честицама песка.

На основу дифракционих фотоспектријских линија XRD анализом показано је да код нано- Fe_3O_4 коегзистирају кристална и аморфна структура. Карактеристичне фотоелектронске линије које би указивале на другу кристалну форму нису детектоване.

Резултати XPS анализе приказани су у спектрограму на слици 6. Детектоване фотоелектронске линије у $\text{Fe}2p$ спектру су карактеристичне за Fe_3O_4 и износиле су 726,28 eV за $\text{Fe}_{1/2}$ линију и 712,92 eV за $\text{Fe}_{3/2}$ линију (слика 6B)



Слика 6. Карактеризација наночестица Fe_3O_4 . А) XRD šema kristalne strukture; Б) XPS спектар целог узорка; В) XPS спектар Fe2p фотоелектронске линије; Г) XPS спектар O1s фотоелектронске линије. График преузет из Савић-Здравковић, 2020.

Уз помоћ система за мерење физичких особина (енг. *Physical Property Measurement System*, PPMS), закључено је да наночестице Fe_3O_4 имају суперпарамагнетна својства која су карактеристична за ове честице.

Прилог 8 – Резултати карактеризације полимера микропластике

У табели 3, приказана је дистрибуција величине и релативна густина сваког полимера коришћеног у експерименту.

Табела 3. Димензије честица микропластике и њихова релативна густина за појединачне полимере. Преузето из Станковић и сар. (2021).

Тип полимера	Дужина ($CV \pm CD$ (μm))	Ширина ($CV \pm CD$ (μm))	Релативна густина ($g\ cm^{-3}$)
PE	22 ± 30	15 ± 11	0,94
PVC	110 ± 27	18 ± 21	1,4

<i>PA</i>	99 ± 36	71 ± 25	1,08
-----------	-------------	-------------	------

СВ – средња вредност

СД – стандардна девијација

Извод

Акватичне средине су највећи сакупљачи отпада који ту доспева директно бацањем и отпуштањем отпада или индиректно, спирањем земљишта, наношењем путем ветра итд. Овакво стање повлачи за собом и потребу за истраживањима која би допринела бољем разумевању токсичности појединачних загађивача али и осмишљавању најбољих механизма за процену ризика и дефинисању смерница и закона о управљању отпадом.

Као модел организам у овој дисертацији коришћен је *Chironomus riparius*, код кога је хистолошком анализом најпре описана нормална морфологија ткива дигестивног и екскреторног система, као и масног ткива.

За испитивање токсичности наночестица оксида метала (TiO_2 , CeO_2 , Fe_3O_4), LCFA и МП коришћен је мулти-биомаркер приступ. Најпре је урађена карактеризација свих испитиваних честица како би се добило више информација о њима. Наночестице оксида метала и МП су већ описане у претходним истраживањима па је овде оригинално урађена карактеризација честица LCFA.

У акутном тесту са наночестицама оксида метала највећи токсични потенцијал поседовао је нано- Fe_3O_4 који је изазвао интензивну вакуолизацију региона I средњег црева и Малпигијевих цевчица. Нано- CeO_2 изазвао је благу вакуолизацију Малпигијевих цевчица. Нано- TiO_2 довео је до ремоделације масног ткива и епитела црева. Анализом суб-индивидуалних биомаркера у хроничном тесту уочено је да наночестице оксида метала и МП могу утицати на ензиме оксидативног стреса, док су се нано- CeO_2 и нано- Fe_3O_4 показале и као генотоксичне. LCFA честице су утицале на скоро све испитиване параметре.

Дужина микровила се показала као параметар који има снажан потенцијал да постане хистопатолошки биомаркер који се може у будућности користити у екотоксиколошким студијама.

SUMMARY

Aquatic environments serve as a sink for waste, which can reach it through various ways such as direct throwing, release, precipitation, or wind. This implies the need for detailed research that would contribute to a better understanding of individual pollutant toxicity as well as designing the best mechanisms for risk assessment and defining guidelines and laws on waste management.

In this dissertation, *Chironomus riparius* was used as a model organism, where histological analysis was first used to describe the normal morphology of the digestive and excretory systems, as well as adipose tissue.

A multi-biomarker approach was used for detecting the toxicity of metal-oxide nanoparticles (TiO_2 , CeO_2 , Fe_3O_4), LCFA, and MP. First, the characterization of the tested particles was done in order to get more information about them. Metal-oxide nanoparticles and MP were described in previous studies, so the original characterization of LCFA particles was done here.

An acute test with metal-oxide nanoparticles revealed the high toxicity of nano- Fe_3O_4 that caused intensive vacuolization of the midgut region I and Malphigian tubules. Nano- CeO_2 caused mild vacuolization of Malphigian tubules. Nano- TiO_2 provoked remodeling of fat body and gut epithelium. By analyzing sub-organismal biomarkers in chronic tests, it was revealed that metal oxide nanoparticles and MP have the potential to affect oxidative stress enzymes, while nano- CeO_2 and nano- Fe_3O_4 have also been shown to be genotoxic. LCFA particles affected almost all analyzed parameters.

Microvilli length has been shown to be a parameter that has a strong potential to become a histopathological biomarker that can be used in ecotoxicological studies in the future.

Биографија и Библиографија аутора

Биографија

Јелена Стојановић је рођена 26. јула 1991. године у Нишу. Основну школу „Радоје Домановић“ завршава 2006. године са одличним успехом и добија диплому „Вука Караџића“. Гимназију „Бора Станковић“ у Нишу завршава 2010. године, такође са одличним успехом и исте године уписује основне академске студије на Департману за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Нишу. Одмах након завршетка основних академских студија, 2013. године, уписује мастер академске студије на истом департману, смер-Биолог. Мастер академске студије завршава 2015. године са просечном оценом 9,47, и добија звање мастер биолог одбраном мастер тезе „Утицај воденог екстракта *Hypericum rumeliacum* Boiss. на ћелије костне сржи и еритроците пацова Wistar у *in vitro* условима“ са оценом 10. Исте године уписује докторске академске студије на Природно-математичком факултету у Нишу.

Дана 22.2.2016. године добија звање истраживач-приправник, а 18.4.2018. године бива ангажована на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја, бр. ИИИИ41017, под називом „Испитивање биоактивних материјала и биоактивних супстанци на регенерацију кости на *in vivo* моделима“, као истраживач.

Члан је управног одбора биолошког друштва „Др Сава Петровић“ од 2016. године. Учествовала је у програму Биоekoцена у коме је вршила микробиолошко испитивање квалитета воде. Поседује сертификат за рад са лабораторијским животињама који је добила у оквиру програма за континуирану едукацију „Рад на експерименталним животињама у биомедицинским истраживањима“ на Медицинском факултету. Учествовала је 2024. године на напредним курсевима изолације и детекције микропластике у различитим медијумима који су изведени у оквиру пројекта „101072777 – PlasticUnderground HORIZON – MSCA – 2021– DN“ који су се одржали у Великој Британији.

Члан је европског удружења токсиколога SETAC, међународног удружења лимнолога SIL и Ентомолошког друштва Србије. Члан је организационог одбора 22. Међународног Симпозијума Хирономида ISC22.

Библиографија

Радови у часописима од међународног значаја:

Stojanović, J., Savić-Zdravković, D., Jovanović, B., Vitorović, J., Bašić, J., Stojanović, I., Žabar-Popović, A., Duranm H., Kračun Kolarević, M. & Milošević, Đ. (2023) Histopathology of chironomids exposed to fly ash and microplastics as a new biomarker of ecotoxicological assessment. *Science of the Total Environment*, 903:166042. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166042> (M21a)

Stojanović, J., Nikolić, M., Savić-Zdravković, D., Žabar-Popović, A., Milovanović, A., Stojadinović, D. & Crnobrnja-Isailović, J. (2023) Blood cell morphology of *Testudo hermanni boettgeri* Mojsisovics 1889 wild populations from Serbia. *North-Western Journal of Zoology*, 19 (2):147-154. (M23)

Savić-Zdravković, D., Milošević, D., **Conić, J.**, Marković, K., Ščančar, J., Miliša, M. & Jovanović, B., (2021) Revealing the effects of cerium dioxide nanoparticles through the analysis of morphological changes in *Chironomus riparius*. *Science of The Total Environment*, 786:147439. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147439> (M21a)

Stojanović, J., Milošević, Đ., Vitorović, J., Zdravković, D., Stanković, N., Stanković, J. & Vasiljević, P. (2021) Histopathology of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) exposed to metal oxide nanoparticles. *Archives of Biological Sciences*, 73(3):319-329. doi: <https://doi.org/10.2298/ABS210515025S> (M23)

Радови у часописима од националног значаја:

Stojanović, J., Savić-Zdravković, D., Žabar-Popović, A., Milovanović, A. & Milošević, Đ. (2023) Midgut remodeling during the metamorphosis of *Chironomus riparius*, Meigen (1804). *Chemia Naissensis*, 5(2):22-31. doi: <http://dx.doi.org/10.46793/ChemN5.2.22S> (M53)

Конгресна саопштења на међународним скуповима штампана у изводу:

Stojanović, J., Vasiljević, P., Vitorović, J., Savić-Zdravković, D., Stanković, N. & Milosević, Dj. (2022) Implementation of novel methods in ecotoxicology assessment of nanoparticle

toxicity to aquatic model organisms (*Chironomus riparius*). *SETAC Europe 32nd Annual Meeting*. Copenhagen, Denmark. 15.-19. May. p. 134. **(M34)**

Savić-Zdravković, D., Milošević, Dj., **Stojanović, J.**, Stanković, J. & Stanković, N. (2022) Structural changes in *Chironomus riparius* exposed to iron oxide nanoparticles. *SETAC Europe 32nd Annual Meeting*. Copenhagen, Denmark. 15.-19. May. p. 431. **(M34)**

Stojanovic, J., Savić-Zdravkovic, D., Stankovic, N., Zabar-Popovic, A., Milovanovic, A. & Milosevic, Dj. (2022) Histological characterization of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) larvae. *The 21st International Symposium on Chironomidae*. Tskuba, Japan (online). 4.-7. July. pp. **(M34)**

Stojanovic, J., Savic-Zdravkovic, D., Stankovic, N., Zabar-Popovic, A., Jovanovic, B., Milovanovic, A. & Milosevic Dj. (2022) Chironomid Eating Disorder - alteration in digestive system of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) exposed to magnetic nanoparticles. *The 21st International Symposium on Chironomidae*. Tskuba, Japan (online). 4.-7. July. p. 45. **(M34)**

Žabar-Popović, A., Veljković, N., Madić, V., Aleksić, M., **Conić, J.**, Popović, P. & Vasiljević, P. (2018) Populaciono genetička analiza prisustva 20 homozigotnih recesivnih osobina kod ljudi sa melanomom. 55. *Kongres Antropološkog Društva Srbije, Zbornik apstrakata*. Zlatibor, Srbija. 23.-26. Maj. p. 112. **(M34)**

Nikolić, M., Aleksić, M., Žabar-Popović, A., **Conić, J.** & Vasiljević, P. (2016) The fungicide pyrimethanil causes testicular alterations and spermatotoxicity in adult male Sprague-Dawley rats. *The international Bioscience Conference and the 6th International PSU-UNS Bioscience Conference – IBSC 2016*. University of Novi Sad, Serbia. 19.-21. Sep. pp. 93-93. **(M34)**

Конгресна саопштења на националним скуповима штампана у изводу:

Stojanović, J., Savić-Zdravković, D., Jovanović, B., Vitorović, J., Bašić, J., Stojanović, I., Žabar-Popović, A., Duran, H., Kračun-Kolarević, M. & Milošević, Đ. (2023) Uticaj mikroplastike na suborganizmalne biomarkere kod vrste *Chironomus riparius* Meigen 1804 (Diptera, Chironomidae). *XIV Symposium of entomologists of Serbia with international participation*. Novi Sad, Serbia, 13.-16. Sep. pp. 98-99. **(M64)**

Savić-Zdravković, D., Stanković, N., **Stojanović, J.**, Žabar-Popović, A., Milosavljević, A. & Milošević, Dj. (2022) Potencijal ispitivanja hemoglobina vrste *chironomus riparius* u ekotoksikološkim studijama. *XIII Symposium of entomologists of Serbia with international participation*. Pirot, Serbia. 14.-16. Jun. pp. 59-60. **(M64)**

Žabar-Popović, A., Aleksić, M., Aleksić, A., Madić, V., **Stojanović, J.**, Stojanović-Radić, Z. & Vasiljević, P. (2019) Antioxidant and antimicrobial potential of *Gleditsia triacanthos* L. pods. *13th Symposium on the flora of southeastern Serbia and neighboring regions*. Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš, Serbia. 20.-23. Jun. p. 184. **(M64)**

Aleksić, M., Žabar-Popović, A., **Stojanović, J.**, Madić, V. & Vasiljević, P. (2019) Antiradical properties of homemade wines: white vs. red wine. *13th Symposium on the flora of southeastern Serbia and neighboring regions*. Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš, Serbia. 20.-23. Jun. p. 185. **(M64)**

Nikolić, M., Cvetković, J., Savić-Zdravković, D., **Conić, J.**, Ilić, M., Marković, S., Vučković, A., Macura, B. & Crnobrnja-Isailović, J. (2019) Wildlife conservation and local folklore. *13th Symposium on the flora of southeastern Serbia and neighboring regions*. Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš, Serbia. 20.-23. Jun. p. 101. **(M64)**

Aleksić, M., Vasiljević, P., Žabar Popović, A. & **Conić, J.** (2018) Skrining toksičnosti fungicida na bazi pirimetanila. *Drugi Kongres Biologa Srbije, Knjiga sažetaka*. Kladovo, Srbija. 25.-30. Sep. p. 162. **(M64)**

Žabar-Popović, A., **Conić, J.**, Aleksić, M., Madić, V., Jušković, M. (2018) Vasiljević, P. Biološka aktivnost različitih ekstrakata mahune vrste *Gleditsia triacanthos* L. *Drugi Kongres Biologa Srbije, Knjiga sažetaka*. Kladovo, Srbija. 25.-30. Sep. p. 132. **(M64)**

Conić, J., Vukelić-Nikolić, M., Aleksić, M., Žabar-Popović, A., Stojadinović, D., Crnobrnja-Isailović, J. & Vasiljević, P. (2018) Ispitivanje morfometrijskih parametara ćelija krvi i prisustva hemoparazita kod šumskih kornjača vrste *Testudo hermanni* Gmelin 1789. *Drugi Kongres Biologa Srbije, Knjiga sažetaka*. Kladovo, Srbija. 25.-30. Sep. p. 159. **(M64)**

Aleksić, M., Vasiljević, P., Žabar-Popović, A., **Conić, J.** & Pešić, T. (2018) Ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakta korena biljke *Inula helenium*. *Drugi Kongres Biologa Srbije, Knjiga sažetaka*. Kladovo, Srbija. 25.-30. Sep. p. 163. **(M64)**

Žabar-Popović A., Nikolić M., Stanković S., Đorđević D., Aleksić M., **Conić J.** & Vasiljević P. (2016) The cytotoxic and hemolytic properties of a stevia sweetener. *12th Symposium on the flora of southeastern Serbia and neighboring regions*. Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš, Serbia. 16.-19. Jun. p. 83. **(M64)**

Conić, J., Žabar-Popović, A., Nikolić, M., Jušković, M., Zlatković, B. & Vasiljević, P. (2016) Antihemolytic effects of water extract of *Hypericum rumeliacum* Boiss. on rat erythrocytes. *12th Symposium on the flora of southeastern Serbia and neighboring regions*. Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš, Serbia. 16.-19. Jun. p. 130. **(M64)**

Изјаве аутора

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Примена хистопатолошких промена као потенцијалних биомаркера у акватичној екотоксикологији за процену токсичног ефекта наночестица на модел организму *Chironomus riparius*

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)¹

У Нишу, 27.2.2024.

Потпис аутора дисертације:


Јелена С. Стојановић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

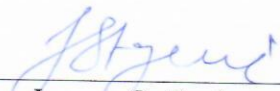
Наслов дисертације:

**Примена хистопатолошких промена као потенцијалних биомаркера у акватичној
екотоксикологији за процену токсичног ефекта наночестица на модел организму
*Chironomus riparius***

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла
за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном
облику.

У Нишу, 27.2.2024.

Потпис аутора дисертације:



Јелена С. Стојановић

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Примена хистопатолошких промена као потенцијалних биомаркера у акватичној екотоксикологији за процену токсичног ефекта наночестица на модел организму *Chironomus riparius*

која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 27. 2. 2024.

Потпис аутора дисертације:



Јелена С. Стојановић