UTJECAJ NITRIRANIH MONOAROMATSKIH UGLJIKOVODIKA IZ ATMOSFERSKIH LEBDEĆIH ČESTICA NA RAZLIČITE RAZINE BIOLOŠKE ORGANIZACIJE U VODENIM SUSTAVIMA

Bakija Alempijević, Saranda

Doctoral thesis / Doktorski rad

2025

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:692989

Rights / Prava: Zaštićeno autorskim pravom. / In copyright.

Download date / Datum preuzimanja: **2026-11-17**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb / Repozitorij Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Dabar



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet
Geološki odsjek

Saranda Bakija Alempijević

UTJECAJ NITRIRANIH MONOAROMATSKIH UGLJIKOVODIKA IZ ATMOSFERSKIH LEBDEĆIH ČESTICA NA RAZLIČITE RAZINE BIOLOŠKE ORGANIZACIJE U VODENIM SUSTAVIMA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet
Geološki odsjek

Saranda Bakija Alempijević

UTJECAJ NITRIRANIH MONOAROMATSKIH UGLJIKOVODIKA IZ ATMOSFERSKIH LEBDEĆIH ČESTICA NA RAZLIČITE RAZINE BIOLOŠKE ORGANIZACIJE U VODENIM SUSTAVIMA

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Dr. sc. Slađana Strmečki Kos

Zagreb, 2025.



University of Zagreb

Faculty of Science
Department of Geology

Saranda Bakija Alempijević

THE IMPACT OF NITRATED MONOAROMATIC HYDROCARBONS FROM ATMOSPHERIC AEROSOLS ON DIFFERENT LEVELS OF BIOLOGICAL ORGANISATION IN AQUATIC SYSTEMS

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
Slađana Strmečki Kos, PhD

Zagreb, 2025

Ova doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za biogeokemiju mora i atmosfere i Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju, Zavoda za istraživanje mora i okoliša, Instituta Ruđer Bošković, Zagreb, pod vodstvom dr. sc. Slađane Strmečki Kos u sklopu Poslijediplomskog Interdisciplinarnog doktorskog studija iz oceanologije na Geološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Doktorski rad je izrađen u sklopu istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost „Biokemijski odgovori površinskog sloja oligotrofnog područja Jadranskog mora na atmosfersko taloženje“ (IP-2018-01-3105, BiREADI).

INFORMACIJE O MENTORICI:

Dr. sc. Slađana Strmečki Kos rođena je 1983. g. u Ptuju, Slovenija. Diplomirala je 2006. g. na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta (PMF) Sveučilišta u Zagrebu (SuZ). Zaposlena je od 2007. g. na Institutu Ruđer Bošković (IRB) kao asistent, a doktorsku disertaciju obranila je 2012. g. na Interdisciplinarnom doktorskom studiju iz oceanologije na Geološkom odsjeku PMF SuZ. Od 2013. do 2017. g. zaposlena je na Institutu kao viši asistent, a od 2017. do 2022. g. kao znanstveni suradnik. Od 2022. g. radi kao viši znanstveni suradnik u Laboratoriju za biogeokemiju mora i atmosfere Zavoda za istraživanje mora i okoliša (ZIMO). Znanstveni rad dr. sc. Strmečki Kos usmjeren je na biogeokemijske procese u prirodnim vodama, s naglaskom na ulogu, svojstva i transformaciju organske tvari pod utjecajem klimatskih promjena. Voditeljica je HrZZ projekta IP-2022-10-6348: Pelud u Jadranskom moru: dinamika unosa, kemijska karakterizacija i utjecaj na primarnu produkciju (POLLMAR, 2023.-2027.), bila je voditeljica projekta Zaklade HAZU (2021.), te voditeljica NEWFELPRO Marie Curie COFOUND projekta u sklopu kojega je provela jednogodišnje poslijedoktorsko usavršavanje na Institute of biophysics, Brno (Češka) (2015. – 2016.). Osim poslijedoktorskog usavršavanja, usavršavala je svoje znanje i vještine na međunarodnim treninzima, radionicama i znanstvenim školama. Također, bila je suradnica na tri HrZZ projekta, hrvatsko-slovenskom bilateralnom projektu, NATO projektu, projektu norveške vlade, MZOŠ te DFG projektu. Aktivna je u prijenosu znanja mladima; mentor je doktorandici Sarandi Bakiji Alempijević u okviru HrZZ programa „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti" (2020. – 2025.), bila je mentor tri studentske prakse (2017., 2021., 2023.), četiri diplomska rada (2018., 2021., 2x 2022.), te mentor dviju studentica doktorskih studija iz Češke i Italije tijekom njihovog kratkoročnog boravka na Institutu (2023. odnosno 2024./2025.). Bila je predsjednica Organizacijskog odbora međunarodne konferencije 36th ISE Topical Meeting (Šibenik, 26. – 29.5.2024.) te predsjednica Organizacijskog odbora konferencije 5. Dan Elektrokemije i 8th ISE SSRSE (Zagreb, 2018.). Članstvo i aktivnosti u znanstvenim tijelima uključuju sljedeće: od 2023. do 2027. je član Vijeća ZIMO-a, od 2023. član Etičkog povjerenstva IRB-a, a od 2018. godine član je Marie Curie Alumni Association. Također, od 2017. član je Znanstvenog vijeća struke Interdisciplinarne prirodne znanosti. Član je International Society of Electrochemistry (ISE) od 2012. i Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa od 2007. godine. Dr. Strmečki Kos je objavila 30 znanstvenih radova citiranih u WoS CC, a H-indeks joj je 11. Dobitnica je ZIMO i IRB nagrade za znanstveni rad 2014. i 2013. godine. Majka je troje djece.

Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Slađani Strmečki Kos na vođenju tijekom izrade mog doktorskog rada kao i na prenesenom znanju i uloženom trudu. Hvala na velikoj posvećenosti, usmjeravanju, pomoći i diskusijama koje su nas dovele do uspješnog završetka ovog važnog razdoblja u mom životu.

Zahvaljujem se članovima Povjerenstva, dr. sc. Sunčici Bosak, dr. sc. Sanji Frka Milosavljević i dr. sc. Ivanu Mihaljeviću na svim komentarima, sugestijama i ispravcima kojima su doprinijeli kvaliteti ovog rada.

Hvala kolegama iz Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju što su me primili kao člana svog tima. Hvala dr. sc. Tvrtku Smitalu i dr. sc. Jeleni Dragojević Višević na prenesenom znanju iz područja ekotoksikologije, a posebno dr. sc. Ivanu Mihaljeviću na njegovom doprinosu, kao i na pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada i savjetima tijekom provedbe istraživanja.

Hvala svim članovima „mog" Laboratorija za biogeokemiju mora i atmosfere za protekle godine druženja i podrške, na obveznim i neobveznim razgovorima i svim lijepim trenutcima. Hvala dr. sc. Blaženki Gašparović i dr. sc. Sanji Frka Milosavljević na pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada, ali i razumijevanju te dostupnosti i spremnosti pomoći u svakom trenutku.

Također, zahvaljujem se na pomoći pri analizama i objašnjenju rezultata dr. sc. Petri Vukosav, dr. sc. Frédéricu Nicolasu Gillesu Chauxu, dr. sc. Jeleni Dautović i Zdeslavu Zovku.

Hvala i ostalim članovima Instituta koji su savjetima ili samo podrškom olakšali izradu ove disertacije.

Veliko hvala Sonji što me uvela u svijet statističke obrade podataka.

Hvala mojim curama s Oceanologije, koje su od kolegica postale prijateljice, Andrei, Sarah i Nives, na puno smijeha, podijeljenih briga i savjeta kako ih riješiti.

Hvala svim prijateljima, a posebno Mariji i Lani što su uvijek tu za mene. Naši dugi razgovori uvijek mi ispune srce toplinom i daju mi energiju.

Posebno hvala mojim roditeljima, sestri i baki koji su mi cijeli život velika podrška u svemu.

Neizmjerno hvala mom suprugu i mojoj dječici koji su uvijek moj oslonac. Moje ste veselje i vaša ljubav mi daje snagu u ostvarivanju svih ciljeva. Alene, hvala ti na tvom razumijevanju, podršci i pomoći kroz sve izazove. Hvala ti što si me ohrabrivao. Volim vas!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Geološki odsjek

Doktorska disertacija

UTJECAJ NITRIRANIH MONOAROMATSKIH UGLJIKOVODIKA IZ ATMOSFERSKIH LEBDEĆIH ČESTICA NA RAZLIČITE RAZINE BIOLOŠKE ORGANIZACIJE U VODENIM SUSTAVIMA

SARANDA BAKIJA ALEMPIJEVIĆ

Laboratorij za biogeokemiju mora i atmosfere, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, Zagreb, Republika Hrvatska

Nitrirani monoaromatski ugljikovodici (NMAU) poput nitrofenola, nitrokatehola (NC) i nitrosalicilnih kiselina, atmosferske su organske onečišćujuće tvari koje taloženjem dospijevaju u prirodne vode. Ovim istraživanjem ispitani su: i) ekotoksikološki učinci NMAU identificirani u lebdećim česticama porijeklom iz izgaranja biomase i miješanih antropogenih izvora na različite razine biološke organizacije u vodenim sustavima, ii) utjecaj NMAU na kemijski sastav organske tvari mikroalge vrste *Dunaliella tertiolecta* i embrija ribe zebrice, te iii) utjecaj stvaranja kompleksa Cu(II)-NC na kroničnu toksičnost Cu(II) i NC u smjesi. *In vitro* biotestovi citotoksičnosti na ribljim stanicama, studije interakcija s fazama 0 i I staničnog detoksikacijskog mehanizma te *in vivo* biotestovi provedeni na slatkovodnim mikroalgama *Scenedesmus subspicatus* pokazali su značajan akutni i kronični toksični potencijal NMAU, te interakciju s proteinskim prijenosnicima riba zebrica važnih za fazu 0 stanične detoksikacije. Uz to, NMAU su promijenili lipidni sastav embrija ribe zebrice i inhibirali rast mikroalge *Dunaliella tertiolecta*. Kompleksiranje Cu(II)-NC, ovisno o koncentraciji, pokazuje da su ekotoksični učinci NC uvelike kontrolirani interakcijama s anorganskim komponentama vodenih ekosustava. Ovi rezultati su osobito važni s obzirom na očekivano povećanje atmosferskih koncentracija NMAU uslijed učestalijih šumskih požara izazvanih klimatskim promjenama, što posljedično može dovesti i do porasta njihove koncentracije u vodenim sustavima, čime se povećava prijetnja vodenim ekosustavima.

Ključne riječi: atmosferske lebdeće čestice, nitrirani monoaromatski ugljikovodici, ekotoksikološki učinci, biotestovi, metalni kompleksi, riba zebrica, *Dunaliella tertiolecta*

Rad sadrži: 167 stranica, 53 slike, 13 tablica, 277 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Mentor: dr. sc. Slađana Strmečki Kos, viša znanstvena suradnica, IRB Zagreb

Ocjenjivači: dr. sc. Sunčica Bosak, izvanredni profesor, PMF, Zagreb
dr. sc. Sanja Frka Milosavljević, znanstvena savjetnica, IRB, Zagreb
dr. sc. Ivan Mihaljević, znanstveni suradnik, IRB, Zagreb

Rad je prihvaćen na sjednici Vijeća Geološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu održanoj 11. travnja 2025. godine.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Geology

Doctoral Thesis

THE IMPACT OF NITRATED MONOAROMATIC HYDROCARBONS FROM ATMOSPHERIC AEROSOLS ON DIFFERENT LEVELS OF BIOLOGICAL ORGANISATION IN AQUATIC SYSTEMS

SARANDA BAKIJA ALEMPIJEVIĆ

Laboratory for Marine and Atmospheric Biogeochemistry, Division for Marine and Environmental Research, Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, Zagreb, Croatia

Nitrated monoaromatic hydrocarbons (NMAHs), such as nitrophenols, nitrocatechols (NCs), and nitrosalicylic acids, are atmospheric organic pollutants deposited into natural waters. In this study, we investigated: i) the ecotoxicological effects of NMAHs identified in aerosols from biomass burning and mixed anthropogenic sources at different levels of biological organization in aquatic systems, ii) their effects on the chemical composition of organic matter in the cells of the microalgae *Dunaliella tertiolecta* and in zebrafish embryos, and iii) the influence of Cu(II)-NCs complex formation on the chronic toxicity of Cu(II) and NCs in the mixture. *In vitro* cytotoxicity bioassays on fish cells, studies on interactions with phases 0 and I of the cellular detoxification mechanism, and *in vivo* bioassays using the freshwater microalgae *Scenedesmus subspicatus* revealed a significant acute and chronic toxic potential of NMAHs, including inhibition of zebrafish protein transporters critical for phase 0 cellular detoxification. Additionally, NMAHs altered the lipid composition of zebrafish embryos and inhibited the growth of microalgae *Dunaliella tertiolecta*. The concentration-dependent complexation in the Cu(II)-NC mixtures suggested that the ecotoxic effects of NCs are strongly influenced by interactions with inorganic components in aquatic ecosystems. These findings are particularly important giving the expected increase in atmospheric NMAH concentrations due to more frequent forest fires caused by climate change, which will likely lead to higher levels of these pollutants in aquatic systems, thereby increasing the threat to aquatic ecosystems.

Keywords: atmospheric aerosols, nitrated monoaromatic hydrocarbons, ecotoxicological effects, bioassays, metal complexes, zebrafish, *Dunaliella tertiolecta*

Thesis contains: 167 pages, 53 figures, 13 tables, 277 references

Original in: Croatian

Supervisor: Slađana Strmečki Kos, PhD, senior research associate, RBI, Zagreb

Reviewers: Sunčica Bosak, PhD, associate professor, Faculty of Science, Zagreb
Sanja Frka Milosavljević, PhD, senior scientist , RBI, Zagreb
Ivan Mihaljević, PhD, research associate, RBI, Zagreb

Thesis accepted by the Department of Geology, Faculty of Science, University of Zagreb on April 11, 2025.

Popis kratica i simbola:

a – amplituda napona u ACV i DPV

AA – miješani okolišni atmosferski materijal antropogenog porijekla

ACV – voltametrija izmjenične struje

ADME – apsorpcija, distribucija, metabolizam i izlučivanje endo- i ksenobiotika iz stanice

ALC – alkoholi

AlgaeTox – test ispitivanja kronične toksičnosti

ASP+ – 4-(4-(dimetilamino)stiril)-N-metilpiridinijev jodid, modelni fluorescentni supstrat za Oct1

B – uzorak u inkubacijskom eksperimentu dobiven dodatkom sBB

BaA – benzo(a)antracen

BaP – benzo(a)piren

BB – izgaranje biomase

BC – crni ugljik

BbF – benzo(b)fluoranten

BghiP – benzo(ghi)perilen

BjF – benzo(j)fluoranten

BkF – benzo(k)fluoranten

BrC – smeđi ugljik

BSA – goveđi serum albumin

CAT – katehol

CC – karbonatni ugljik

Chl *a* – klorofil *a*

Chry – krizen

CLIP – stanični lipidi

COH – kolesterol

CPS – kronopotenciometrija s konstantnom pobudnom strujom

CsA – ciklosporin A

[Cu(NC)] – Cu(II) mono-nitrokateholatni kompleksi ([Cu(4NC)], [Cu(3M4NC)], [Cu(3M5NC)], [Cu(4M5NC)])

$[Cu(NC)_2]^{2-}$ – Cu(II) di-nitrokateholatni kompleksi ($[Cu(4NC)_2]^{2-}$, $[Cu(3M4NC)_2]^{2-}$, $[Cu(3M5NC)_2]^{2-}$, $[Cu(4M5NC)_2]^{2-}$)

Cu(II)-NC – svi Cu(II) mono- i dinitrokateholatni kompleksi

Cu(II)/NC – smjesa Cu(II) i NC

CV – ciklička voltametrija

DahA – dibenzo(a,h)antracen

DCM – diklormetan

1,2DG – 1,2-diacilgliceroli

1,3DG – 1,3-diacilgliceroli

DGDG – digalaktozildiacilgliceroli

DMEM – medij za uzgoj stanica (engl. *Dulbecco`s Modified Eagle Medium*)

DMEM/F12 – medij za uzgoj stanica (engl. *Dulbecco`s Modified Eagle Medium, Nutrient Mixture F – 12*)

DMSO – dimetil sulfoksid

4,6DNG – 4,6 dinitrogvajakol

2,4DNP – 2,4-dinitrofenol

2,5DNP – 2,5-dinitrofenol

2,6DNP – 2,6-dinitrofenol

DOC – otopljeni organski ugljik

DPV – diferencijalno pulsna voltametrija

E_a – potencijal akumulacije

EC – elementarni ugljik

EC_{50} – koncentracija spoja koja uzrokuje 50 % maksimalnog promatranog učinka u testiranom organizmu

EDTA – etilendiaminotetraoctena kiselina

E_p – potencijal pika

ΔE_p – katodno-anodno odvajanje pikova u CV

$\Delta E_{p/2}$ – širina pika na polovici visine u SWV

EROD – 7-etoksiresorufin O-deetilaza (test ispitivanja indukcije CYP1A detoksikacijskih enzima faze I stanične detoksikacije)

E_s – korak potencijala

E_{sw} – amplituda u SWV

ETR – relativna stopa prijenosa elektrona

f - frekvencija

F_0 – minimalni intenzitet fluorescencije

FFA – slobodne masne kiseline

FBS – fetalni goveđi serum

Flu – fluoranten

F_v/F_m – maksimalna učinkovitost fotosustava II

GL – glikolipidi

GUA – gvajakol

HEK293 – stanice ljudskog embrionalnog bubrega

Hex – heksan

HTCO – visokotemperaturna katalitička oksidacija

IC_{50} – koncentracija spoja koja uzrokuje 50 % inhibiciju promatranog učinka, npr. rasta

IP – indeno(1,2,3-cd)piren

I_p – vršna struja pika

$I_{p,a}$ – anodna struja pika u CV

$I_{p,c}$ – katodna struja pika u CV

K – kontrolni uzorak u inkubacijskom eksperimentu

L – ligand

LC_{50} – koncentracija spoja koja uzrokuje smrt 50 % testiranih organizama u određenom vremenskom periodu

LC-MS/MS – vezani sustav tekućinska kroamtografija-masena spektrometrija

β – kumulativna konstanta stabilnosti

K – konstanta stabilnosti

LY – modelni fluorescentni supstrat za Oatp1d1 (engl. *Lucifer yellow*)

M – mol/L

MeOH – metanol

MGDG – monogalaktozildiacilgliceroli

MNC – metil-nitrokatehol izomeri (3M4NC, 3M5NC i 4M5NC)

3M4NC – 3-metil-4-nitrokatehol

3M5NC – 3-metil-5-nitrokatehol

4M5NC - 4-metil-5-nitrokatehol

2M4NP – 2-metil-4-nitrofenol

3M4NP – 3-metil-4-nitrofenol

MTT – test ispitivanja akutne toksičnosti

N – uzorak u inkubacijskom eksperimentu dobiven dodatkom modelnih NMAU (4,14 µg/L)

NV – uzorak u inkubacijskom eksperimentu dobiven dodatkom modelnih NMAU (4140 µg/L)

NC – nitrokateholi

4NC – 4-nitrokatehol

NG – nitrogvajakoli

4NG – 4-nitrogvajakol

5NG – 5-nitrogvajakol

6NG – 6-nitrogvajakol

NMAU – nitrirani monoaromatski ugljikovodici

NMVOC – nemetanski hlapljivi organski spojevi

NP – nitrofenoli

2NP – 2-nitrofenol

3NP – 3-nitrofenol

4NP – 4-nitrofenol

NPA – normalizirana površinska aktivnost

NPQ – nefotokemijsko prigušivanje

NS – nitrosiringol

4NS – 4-nitrosiringol

NSA – nitrosalicilne kiseline

3NSA – 3-nitrosalicilna kiselina

5NSA – 5-nitrosalicilna kiselina

OC – organski ugljik

Oct1 – membranski transportni protein - prijenosnik organskih kationa kod zebrice

Oatp1d1 – membranski transportni protein - prijenosnik organskih aniona kod zebrice

PAH – policiklički aromatski ugljikovodici

PAT – površinski aktivne tvari

PBDE – polibromirani difenil-eteri

PBS – sterilni fosfatni pufer

PC – fosfatidilkolini

PCB – poliklorirani bifenili

PCDD – poliklorirani dibenzo-p-dioksini

PCDF – poliklorirani dibenzofurani

PE – fosfatidiletanolamini

PG – fosfatidilgliceroli

PM – atmosferske lebdeće čestice

PL – fosfolipidi

PLIP – ukupni čestični lipidi

POC – čestični organski ugljik

POP – postojane organske onečiščujuće tvari

PPROT – čestični proteini

Pyr – piren

ROS – reaktivne kisikove vrste

sBB – atmosferske čestice nastale izgaranjem biomase tijekom simulacija požarnog događaja

sBB_{H2O} – vodeni ekstrakt uzorka sBB

sBB_{DCM} – ekstrakt uzorka sBB u DCM

sBB_{Hex} – ekstrakt uzorka sBB u Hex

sBB_{MeOH} – ekstrakt uzorka sBB u MeOH

AA_{H2O} – vodeni ekstrakt uzorka AA

SLC – nadobitelj proteinskih prijenosnika odgovornih za unos endo- i ksenobiotika iz stanice

SMDE – statička kapajuća živina elektroda

SOA – sekundarne organske lebdeće čestice

SQDG – sulfokinovozildiacilgliceroli

SWV – pravokutnovalna voltametrija

t_a – vrijeme akumulacije

TCDD – 2,3,7,8 – tetradiklorodibenzodioksin

DTCHO – ukupni otopljeni ugljikohidrati

TG – triacilgliceroli

TLC-FID - tankoslojna kromatografija s plameno ionizacijskim detektorom

PTCHO – ukupni čestični ugljikohidrati

TPSA – topološka polarna površina

WE – esteri voska

WIOC – organski ugljik netopljiv u vodi

WSOC – vodotopljivi organski ugljik

Sadržaj

1. UVOD 1
2. LITERATURNI PREGLED 2
2.1. Atmosferske lebdeće čestice 2
2.1.1. Atmosfersko taloženje čestica u prirodne vode 4
2.2. Nitrirani monoaromatski ugljikovodici (NMAU) kao atmosferske onečišćujuće tvari 6
2.2.1. Štetni učinci NMAU na organizme u okolišu 7
2.3. Metali u tragovima 8
2.3.1. Toksični učinci metala 9
2.4. Utjecaj interakcija na ekotoksičnost organskih onečišćujućih tvari 11
2.5. Testovi toksičnosti 12
2.5.1. Modelni organizmi u testovima toksičnosti 16
3. EKSPERIMENTALNI DIO 19
3.1. Sakupljanje i ekstrakcija iz atmosferskih lebdećih čestica porijeklom iz izgaranja biomase i miješanih antropogenih izvora 19
3.2. Kvantifikacija NMAU 20
3.3. Biotestovi 21
3.3.1. Interakcija s proteinskim prijenosnicima Oct1 i Oatp1d1 faze 0 staničnog detoksikacijskog mehanizma 21
3.3.2. Interakcija s fazom I staničnog detoksikacijskog mehanizma: EROD biotest 23
3.3.3. Određivanje akutne toksičnosti MTT testom 24
3.3.4. Određivanje kronične toksičnosti AlgaeTox testom 25
3.3.5. Ispitivanje embriotoksičnosti NMAU na ribi zebrici (*Danio rerio*) 25
3.4. Utjecaj subletalne koncentracije NMAU na sastav lipida embrija ribe zebrice 26
3.5. Analiza i obrada podataka biotestova i kvantifikacije lipida 27
3.6. Inkubacijski eksperiment sa stanicama mikroalgi 28
3.6.1. Analiza uzoraka u inkubacijskom eksperimentu s mikroalgama 30
3.6.1.1. Brojnost stanica 30
3.6.1.2. Maksimalna učinkovitost fotosustava II (Fv/Fm) 31
3.6.1.3. Organski ugljik 31
3.6.1.4. Klorofil a 32
3.6.1.5. Proteini 33
3.6.1.6. Ugljikohidrati 34
3.6.1.7. Lipidi 35
3.6.1.8. Površinski aktivne tvari (PAT) 36

3.6.1.9. Detekcija NMAU u uzorcima laboratorijskog uzgoja 37
3.6.1.10. Analiza podataka inkubacijskog eksperimenta 38
3.7. Interakcija NMAU i Cu(II) u prirodnim vodama 38
3.7.1. Elektrokemijska karakterizacija kompleksa Cu(II)-NC 38
3.7.2. Toksični učinak smjese Cu(II)/NC 39
4. REZULTATI 40
4.1. Ekotoksikološki učinci ekstrakata atmosferskih lebdećih čestica 40
4.1.1. Interakcija sBB i AA s fazom 0 staničnog detoksikacijskog mehanizma 40
4.1.2. Interakcija sBB i AA s fazom I staničnog detoksikacijskog mehanizma 44
4.1.3. Akutni i kronični toksični učinci sBB i AA 45
4.2. Kvantifikacija NMAU u sBB i AA ekstraktima 48
4.3. Ekotoksikološki učinci modelnih NMAU i njihovih smjesa 52
4.3.1. Interakcija modelnih NMAU s fazom 0 staničnog detoksikacijskog mehanizma .. 53
4.3.2. Interakcija modelnih NMAU s fazom I staničnog detoksikacijskog mehanizma ... 60
4.3.3. Akutni toksični učinci modelnih NMAU 63
4.3.4. Kronični toksični učinci modelnih NMAU 67
4.3.5. Toksični učinci modelnih NMAU na embrije ribe zebrice 71
4.4. Utjecaj modelnih NMAU na biomasu i sastav lipida embrija ribe zebrice 74
4.5. Laboratorijski inkubacijski eksperiment sa mikroalgom *Dunaliella tertiolecta* 76
4.5.1. Utjecaj vodenog ekstrakta sBB i smjesa modelnih NMAU na rast stanica *Dunaliella tertiolecta* 77
4.5.2. Utjecaj ekstrakta sBB i smjesa modelnih NMAU na kemijski sastav stanica *Dunaliella tertiolecta* 79
4.5.2.1. Promjena koncentracije Chl a i fotosintetske učinkovitosti 79
4.5.2.2. Promjena koncentracije organskog ugljika 81
4.5.2.3. Promjena koncentracije proteina, ugljikohidrata i lipida 83
4.5.2.4. Promjena koncentracije površinski aktivnih tvari (PAT) 88
4.5.2.5. Elektrokemijska detekcija NMAU spojeva u inkubacijskim uzorcima 89
4.6. Elektrokemijska karakterizacija Cu(II)-NC kompleksa 92
4.6.1. Utjecaj koncentracije Cu(II) i NC na stvaranje kompleksa 94
4.6.2. Relativna stabilnost Cu(II)-NC kompleksa 95
4.6.3. Mehanizam redoks procesa 96
4.6.4. Učinak promjene pH 99
4.7. Ispitivanje kronične toksičnosti smjesa Cu(II)/NC 102
4.7.1. Voltametrijska karakterizacija Cu(II)/NC smjesa podvrgnutih testovima kronične toksičnosti 106

5. RASPRAVA 113
5.1. NMAU doprinos ekotoksičnosti atmosferskih lebdećih čestica 113
5.1.1. Interakcija NMAU s transmembranskim proteinima 114
5.1.2. Uloga ekstrakata lebdećih čestica u fazi I staničnog detoksikacijskog mehanizma 115
5.1.3. Ekološki učinci izloženosti NMAU 116
5.1.4. Utjecaj NMAU na homeostazu lipida embrija zebrice 117
5.2. Utjecaj NMAU na rast i fiziologiju mikroalge *Dunaliella tertiolecta* 118
5.3. Utjecaj formiranja Cu(II)-NC kompleksa na kroničnu toksičnost Cu(II) i NC 121
6. ZAKLJUČCI 124
7. POPIS LITERATURE 127
8. PRILOZI 158
9. ŽIVOTOPIS 162

1. UVOD

Onečišćenje atmosfere predstavlja lokalni, regionalni i globalni problem današnjice, a ujedno i najveći rizik za zdravlje okoliša. Najznačajnije onečišćujuće tvari u atmosferi čine atmosferske lebdeće čestice (engl. *particulate matter*, PM), koje nastaju kao posljedica prirodnih i/ili antropogenih procesa. Čestice karakteriziraju različiti mehanizmi nastajanja i transformacije u atmosferi, a procesom atmosferskog taloženja dospijevaju u ostale sastavnice okoliša. Nitrirani monoaromatski ugljikovodici (NMAU) su onečišćujuće tvari koje u atmosferu dolaze emitiranjem iz primarnih izvora, poput sagorijevanja fosilnih goriva i izgaranja biomase, ili nastaju sekundarnim procesima foto-oksidacije i nitriranja hlapljivih benzenskih organskih spojeva u atmosferi. Kao vodotopljive organske komponente PM, NMAU mogu utjecati na sve razine vodenih ekosustava, od stanica, preko organizma i populacije, pa sve do zajednica. Kako bismo razumjeli učinke, odgovore i posljedice izloženosti NMAU na navedene razine u ekosustavu, nužno je provesti ekotoksikološka i biokemijska ispitivanja. S obzirom na to da toksičnost tvari ovisi o njihovim fizikalnim i kemijskim svojstvima, koja uvjetuju interakciju s ostalim organskim i anorganskim konstituentima vodenih sustava, istraživanje uvjeta interakcije omogućava nam bolji uvid u njihov realni negativan učinak na vodene organizme.

Ciljevi ovog rada su:

1) ispitati ekotoksikološke učinke NMAU iz atmosferskih lebdećih čestica na različite razine biološke organizacije u vodenim sustavima,

2) ispitati učinke NMAU iz lebdećih čestica na promjene kemijskog sastava stanica mikroalgi i embrija ribe zebrice,

3) istražiti interakciju NMAU s odabranim anorganskim konstituentima prirodnih voda.

U radu su postavljene sljedeće hipoteze:

1) NMAU doprinose ekotoksikološkim učincima lebdećih čestica u vodenim sustavima,

2) stanice mikroalgi i embriji zebrice mijenjaju sastav organske tvari pod utjecajem NMAU,

3) interakcija NMAU s tragovima metala mijenja kemijsku specijaciju NMAU i biodostupnost u prirodnim vodama.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Atmosferske lebdeće čestice

Atmosferske lebdeće čestice (engl. *particulate matter*, PM) su suspenzija krutih tvari i/ili kapljica tekućine u zraku. Prisutnost i koncentracija PM u zraku je od velike važnosti zbog njihova utjecaja na zdravlje živih bića te direktnog i indirektnog utjecaja na klimu. PM raspršivanjem/apsorbiranjem sunčeve svjetlosti utječu na hlađenje/zagrijavanje atmosfere te smanjuju vidljivost, dok se njihov indirektan utjecaj očituje u njhovoj ulozi jezgara kondenzacije formiranja oblaka. Izvori čestica mogu biti prirodni i antropogeni. U prirodne izvore spadaju: vulkanske erupcije, pustinjska prašina, šumski požari, morska površina, biološki materijal poput peludi i spora, gromovi čijim djelovanjem nastaju značajne količine dušikovih oksida (NO_x), vlažna područja poput močvara i malih dubokih jezera koji stvaraju metan (CH_4), te alge u oceanima koje ispuštaju sumporne spojeve (Pénard-Morand i Annesi-Maesano, 2004; Pöschl, 2005; Sonwani i Saxena, 2016). Antropogeni izvori PM su izgaranje fosilnih goriva, izgaranje biomase, elektrane, poljoprivredne aktivnosti, rudarstvo i kućanstva (Popescu i Ionel, 2010; Zhang i sur., 2021). PM se klasificiraju i na primarne i sekundarne. Primarne čestice se emitiraju izravno u atmosferu iz raznih prirodnih i antropogenih izvora. Sekundarne čestice se stvaraju u atmosferi kao rezultat kemijskih ili fotokemijskih reakcija i/ili fizikalnim procesima iz plinovitih kemijskih vrsta (prekursora). Navedene pretvorbe čestica plina uključuju reakcije nukleacije, kondenzacije, kao i heterogene i višefazne kemijske reakcije (Hallquist i sur., 2009). Glavni plinoviti prekursori su sumporov dioksid (SO_2), NO_x, nemetanski hlapljivi organski spojevi (engl. *nonmethane volatile organic carbon*, NMVOC) i NH_3 (Koolen i Rothenberg, 2019). Na njihovo formiranje u atmosferi utječe prisutnost postojećih primarnih čestica, temperatura i vlažnost zraka (Kulmala i sur., 2004).

Prema aerodinamičkom promjeru (d_a) PM dijelimo na: grube (krupne) čestice (PM_{10}, d_a < 10 μm), fine čestice ($PM_{2,5}$, d_a < 2,5 μm) i ultrafine čestice ($PM_{0,1}$, d_a < 0,1 μm) (Rabha i Saikia, 2020). Čestice $PM_{2,5}$ se sastoje uglavnom od anorganskih iona (nitrata, sulfata), elementarnog (engl. *elemental carbon*, EC) ili crnog ugljika (engl. *black carbon*, BC), organskog ugljika (engl. *organic carbon*, OC), metala u tragovima i mikroorganizama (Griffin, 2007; Janssen i sur., 2012; Kim i sur., 2012; Sakunkoo i sur., 2022). PM_{10} se sastoje prvenstveno od geološkog i biološkog (pelud, spore) materijala i čestica koje nastaju kao posljedica mehaničkih procesa u industriji (Balmes i Eisner, 2016). Na vrijeme zadržavanja čestica u atmosferi, kao i na njihov transport utječe veličina čestica i meteorološki uvjeti, pa

one mogu biti suspendirane u zraku od nekoliko sati do nekoliko mjeseci prije taloženja (Raes i sur., 2000). PM_{10} frakcija se zadržava u zraku nekoliko minuta ili sati, dok je $PM_{2,5}$ lakša i ostaje suspendirana u zraku danima ili tjednima te se može transportirati na veće udaljenosti (Zhu i sur., 2002).

Kemijski sastav PM čine sulfat, nitrat i ugljikovi spojevi poput EC, OC i karbonatnog ugljika (engl. *carbonate carbon,* CC) (Rabha i Saikia, 2020). BC nastaje izgaranjem spojeva koji sadrže ugljik i ima svojstvo apsorpcije svjetlosti valnih duljina iz vidljivog, bliskog infracrvenog i ultraljubičastog spektra. OC se smatraju prioritetnim onečišćujućim tvarima zbog svoje postojanosti, sposobnosti bioakumulacije, i štetnih utjecaja na zdravlje ljudi te biljnog i životinjskog svijeta. Dijele se na vodotopljive spojeve organskog ugljika (engl. *water-soluble organic carbon*, WSOC) i spojeve organskog ugljika netopljive u vodi (engl. *water-insoluble organic carbon*, WIOC) (Sullivan i Weber, 2006) pri čemu WSOC čini 30 – 70 % (Chen i sur., 2020; Yang i sur., 2019; Zhang i sur., 2018). U OC spada tzv. smeđi ugljik (engl. *brown carbon*, BrC) (Feng i sur., 2013) koji ima izraženo svojstvo apsorpcije zračenja u blisko ultraljubičastom (300 – 400 nm) i vidljivom dijelu spektra. U OC frakciju PM pripada nekoliko skupina spojeva prema njihovoj globalnoj rasprostranjenosti, toksičnosti, topljivosti u vodi, tlaku para, koeficijentu raspodjele između vodene i čvrste faze i zraka i čvrste ili tekuće faze te vremenu poluraspada u zraku, tlu i vodi (Godec, 2013):

1. Hlapljivi organski spojevi
2. Karbonilni spojevi
3. Postojane organske onečišćujuće tvari (engl. *persistent organic pollutants*, POP):
    a) policiklički aromatski ugljikovodici (engl. *polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAH)
    b) poliklorirani bifenili (engl. *polychlorinated biphenyls*, PCB)
    c) poliklorirani dibenzo-p-dioksini i poliklorirani dibenzofurani (engl. *polychlorinated dibenzo-p-dioxins,* PCDD i *polychlorinated dibenzofurans,* PCDF)
    d) polibromirani difenil-eteri (engl. *polybrominated diphenyl ethers,* PBDE)
    e) različiti organoklorovi pesticidi (DDT i njegovi metaboliti, toksafen, klordan itd)
    f) fenolni spojevi
4. Terpeni

Organska tvar može činiti značajan dio (20 – 90 %) mase $PM_{2,5}$ (Jimenez i sur., 2009; Kanakidou i sur., 2005). Organske onečišćujuće tvari u zraku mogu imati štetne učinke zbog njihove koncentracije prisutne u zraku, dok druge dovode do štetnih učinaka nakon transformacija u atmosferi te njihovog taloženja u kopneni i vodeni ekosustav (Seigneur, 2019). Prema Europskoj agenciji za okoliš PM uz plinove SO_x, NO_x, NH_3 i NMVOC spadaju među glavne onečišćujuće tvari u atmosferi (*Emissions of the Main Air Pollutants in Europe*, 2024). Čestice $PM_{2,5}$ se smatraju vrlo opasnima za zdravlje jer zbog svoje veličine mogu proći kroz nos i grlo te ući duboko u pluća sve do plućnih alveola, a potom i do krvotoka (Brook i sur., 2010; Kim i sur., 2012; Li i sur., 2023; Schulze i sur., 2017). Čestice $PM_{0,1}$ predstavljaju veću opasnost jer mogu prodrijeti dublje u respiratorni sustav te je dokazano da se u plućima duže zadržavaju i da njihova prisutnost uzrokuje jaču upalu (Donaldson i sur., 2002). Izloženost $PM_{0,1}$ može dovesti čak do hipertenzije i dijabetesa (Bai i sur., 2018). Također, dovode do kardiovaskularnih bolesti (Downward i sur., 2018) te olfaktornim živcima mogu dospjeti do mozga i uzrokovati autonomnu disfunkciju kao i ostale neurološke poremećaje (Allen i sur., 2014; Oberdörster i sur., 2004).

Prema izvještaju „Europe's air quality status 2024“ Europske agencije za okoliš o kvaliteti zraka koje se odnosi na praćenje onečišćujućih tvari i njihove koncentracije tijekom 2022. i 2023. godine, 96 % europskog stanovništva je izloženo koncentracijama $PM_{2,5}$ koje prelaze propisanu dozvoljenu granicu Svjetske zdravstvene organizacije (*Europe's Air Quality Keeps Improving but Pollution Levels Are Still Unsafe in Many Areas*, 2024). U istom izvještaju je Hrvatska navedena kao jedna od zemalja u kojima koncentracija $PM_{2,5}$ prelazi granične vrijednosti Europske unije.

2.1.1. Atmosfersko taloženje čestica u prirodne vode

Prilikom razmatranja utjecaja onečišćenja zraka na okoliš i utjecaja na ljudsko zdravlje vrlo je važno razumijevanje mobilnosti onečišćujućih tvari u prirodi. Naime, meteorološki uvjeti poput vjetra, temperature i atmosferskih strujanja imaju veliki utjecaj na distribuciju onečišćujućih tvari, te zračna strujanja mogu prenijeti čestice onečišćujućih tvari na vrlo velike udaljenosti od geografskog položaja samog izvora onečišćenja. Atmosfersko taloženje predstavlja proces kojim se antropogene i prirodne tvari uklanjaju iz atmosfere i prenose s kontinenta na obalne vode, otvorena mora i oceane, a dijeli se na mokro i suho taloženje (Amodio i sur., 2014). Mokro taloženje uključuje uklanjanje onečišćujućih tvari iz atmosfere

kišom, snijegom, susnježicom, tučom, ili maglom, dok se suhim taloženjem one uslijed gravitacije talože na Zemljinoj površini. Na stopu mokrog taloženja najviše utječe svojstvo otapanja pojedine tvari u vodi. Kod određivanja stope suhog taloženja vrlo je bitno da li se tvar nalazi u obliku plina ili čestice (Swackhamer i sur., 2004). Atmosfersko taloženje predstavlja veliki ekološki problem zbog acidifikacije i eutrofikacije prirodnih ekosustava, bioakumulacije toksičnih organskih tvari i metala te utjecaja na biološku raznolikost, ljudsko zdravlje i globalne klimatske promjene. Studije su pokazale kako organske onečišćujuće tvari mogu negativno utjecati na reakcije fotosinteze i smanjiti brojnost fitoplanktonskih zajednica u morskom okolišu (Everaert i sur., 2015; Magnusson i sur., 2008).

Suhim i mokrim taloženjem iz atmosfere u ostale sastavnice okoliša dolaze brojne onečišćujuće tvari poput POP (Corsolini i sur., 2002; Jiménez i sur., 2015; Jurado i sur., 2004), nitriranih monoaromatskih ugljikovodika (NMAU) (Asman i sur., 2005; Jakovljević i sur., 2021; Wang i sur., 2019), metala u tragovima kao što su cink (Zn), kobalt (Co), nikal (Ni), kadmij (Cd), bakar (Cu), olovo (Pb) i mangan (Mn) (Mahowald i sur., 2018; Penezić i sur., 2021), te sumporovih oksida (SO_x), NO_x i amonija (NH_4^+) (Camargo i Alonso, 2006; Doney i sur., 2007; Le Roy i sur., 2021) koji utječu na morske organizme. Atmosfera se smatra najvažnijim i najbržim putem prijenosa hidrofobnih, postojanih i poluhlapljivih onečišćujućih tvari u površinske morske vode. Razlog globalne kontaminacije morskog okoliša POP spojevima je u njihovom prijenosu na velike udaljenosti u atmosferi u kojoj se nalaze u obliku plina ili adsorbirani na atmosferskim česticama. Zbog mogućnosti atmosferskog prijenosa na velike udaljenosti, POP koji primarno nastaju u umjerenim geografskim širinama prenose se u polarna područja, gdje hladni uvjeti smanjuju njihovu hlapljivost (Bigot i sur., 2016) čime dolazi do njihovog taloženja na snijeg, led, tlo, sedimente i morsku vodu. Metali poput Pb, željeza (Fe), žive (Hg), Cd, Zn, arsena (As), Cu i kroma (Cr) vrlo su postojani u okolišu, a ulaze u mora (oceane) putem taloženja iz atmosfere gdje su podložni bioakumulaciji. Atmosfersko taloženje je tako jedan od najvažnijih izvora oceanskog Cu, zajedno s hidrotermalnim izvorima, sedimentima, rijekama i drugim izvorima (Yang i sur., 2019). Azija ima najveću antropogenu emisiju metala u tragovima, što se pripisuje njezinoj sve većoj potražnji za energijom u procesu industrijskog razvoja (Pacyna i Pacyna, 2001). Primjerice, u Kini se primarna godišnja antropogena emisija Cu u 2012. godini udvostručila u odnosu na 2000. godinu, popevši se na 9548 tona po godini što je uglavnom uzrokovano izgaranjem ugljena, trošenjem kočnica i guma, taljenjem metala, itd. (Tian i sur., 2015).

2.2. Nitrirani monoaromatski ugljikovodici (NMAU) kao atmosferske onečišćujuće tvari

U OC frakciju submikronskih atmosferskih lebdećih čestica spadaju NMAU koji se u atmosferu emitiraju primarnim procesima poput sagorijevanja fosilnih goriva, izgaranjem biomase i ugljena te industrijskim emisijama ili se formiraju u plinovitoj i vodenoj fazi sekundarnim procesima foto-oksidacije i nitriranja hlapljivih organskih spojeva koji sadrže benzenski prsten (npr. benzen, toluen, ksilen, katehol) (Frka i sur., 2022; Iinuma i sur., 2010; Jiang i sur., 2024; Kitanovski i sur., 2021; Lu i sur., 2021; Ren i sur., 2022; Wang i sur., 2019). NMAU u svojoj strukturi imaju jednu ili više nitro ($-NO_2$) skupina na benzenskom prstenu i najčešće sadrže hidroksilnu (-OH), metilnu ($-CH_3$), i metoksi skupinu ($-OCH_3$). Primjerice, NMAU čine nitrofenoli (engl. *nitrophenols*, NP), nitrogvajakoli (engl. *nitroguaiacols*, NG), nitrokateholi (engl. *nitrocatechols*, NC) i nitrosalicilne kiseline (engl. *nitrosalicylic acids*, NSA) (Chow i sur., 2015; Kitanovski i sur., 2012). Kao jedna od glavnih komponenata BrC pridonose značajnoj apsorpciji zračenja u UV i vidljivom dijelu spektra čime posljedično imaju negativan utjecaj na klimu i kvalitetu zraka (Mohr i sur., 2013; Teich i sur., 2017). Spojevi 4-nitrokatehol (4NC), 4-nitrofenol (4NP), nitrosiringol (engl. *nitrosyringol*, NS) i NG su glavni organski spojevi u vodotopljivoj frakciji $PM_{2,5}$ čestica koji utječu na apsorpciju sunčevog zračenja, što dokazuje važnost njihovog utjecaja na bilancu zračenja u atmosferi (Bluvshtein i sur., 2017).

Na globalnoj razini izgaranje biomase (engl. *biomass burning*, BB) predstavlja jedan od najvažnijih izvora atmosferskih NMAU (Claeys i sur., 2012; Wang i sur., 2018). Primjerice, poznato je da izgaranjem lignina dolazi do emisije velikih količina fenolnih spojeva u atmosferu (Bruns i sur., 2016). Organski spojevi koji se u atmosferu emitiraju izgaranjem biomase mogu uslijed intenzivnih požara i zagrijavanja dospjeti do visokih slojeva atmosfere gdje se mogu dugo zadržati te tako prenijeti na velike udaljenosti. Također, Shrivastava i sur. (2015) u svojoj studiji predviđaju da će BB biti glavni izvor emisije prekursora za stvaranje sekundarnih organskih čestica (engl. *secundary organic aerosols*, SOA) na globalnoj razini u budućnosti. Spojevi 4NC i metil-nitrokatehol izomeri (MNC) smatraju se indikatorima sekundarno nastalih organskih tvari uslijed izgaranja biomase i antropogenog onečišćenja (Claeys i sur., 2012; Finewax i sur., 2018; Iinuma i sur., 2010). Jakovljević i sur. (2021) su u prvoj studiji istraživanja prisutnosti i koncentracije NMAU na obalnom području srednjeg Jadrana u PM_{10} uzorcima, u uzorcima ukupne taložne tvari, te uzorcima mokrog taloženja dokazali kako su spaljivanje biomase i šumski požari primarni izvori NMAU u atmosferi na tom području. U uzorcima PM_{10}

su kvantificirani spojevi u opadajućoj koncentraciji prema redoslijedu 4NC<MNC<4NP, pri čemu su izomeri MNC, u dominirajućoj prisutnosti 4-metil-5-nitrokatehola (4M5NC), kvantificirani u uzorcima sakupljenima tijekom požara te u uzorcima mokrog taloženja nakon perioda požara uslijed ispiranja čestica iz atmosfere. Pritom je u uzorcima mokrog taloženja izmjerena koncentracija NMAU spojeva bila viša za 90 % od koncentracije izmjerene u uzorcima ukupne taložne tvari, što ukazuje na dominantan utjecaj mokrog taloženja na ispiranje NMAU iz atmosfere i unosu u ostale sastavnice okoliša. Također, koncentracija NMAU je bila znatno viša u odnosu na koncentracije PAH i PCB.

2.2.1. Štetni učinci NMAU na organizme u okolišu

NMAU su onečišćujuće tvari koje čine značajan udio (do 3 %) WSOC (Frka i sur., 2022), te stoga predstavljaju potencijalnu opasnost za vodene organizme. Sveprisutni su u atmosferi, a za neke od njih su dokazana toksična, mutagena i karcinogena svojstva (Kovacic i Somanathan, 2014; Purohit i Basu, 2000).

Ekotoksikološka istraživanja učinaka NMAU na vodene organizme primarno su bila usredotočena na NP, koristeći različite biološke testove s različitim organizmima. Dokazano je da njihova toksičnost ovisi o broju i položaju -NO_2 skupine (Artemenko i sur., 2011; Pflieger i Kroflič, 2017). Istraživanjem je dokazan akutni toksični utjecaj gvajakola (GUA) koji nastaje izgaranjem lignina, te njegovih nitro derivata poput 4-nitrogvajakola (4NG), 6-nitrogvajakola (6NG) i 4,6-dinitrogvajakola (4,6DNG) na morskoj bakteriji *Vibrio fisheri* (Pflieger i Kroflič, 2017). Prema dobivenim EC_{50} vrijednostima (efektivna koncentracija testiranog spoja koja je uzrokovala redukciju luminiscencije za 50 %) koje su bile u rasponu od 16,7 do 102,0 mg/L, toksičnost raste u nizu GUA < 6NG < 4NG < 4,6DNG, ukazujući na veću toksičnost spoja s više nitro skupina u strukturi. Akutna toksičnost NP za vodenbuhu (*Daphnia pulex*) i šarana (*Ciprinus carpio*) ovisi o položaju nitro skupine na benzenskom prstenu: između 2-nitrofenola (2NP), 3-nitrofenola (3NP) i 4NP, najtoksičniji je 4NP, a najmanje toksičan 2NP (Yen i sur., 2002). Nadalje, toksično djelovanje NP na bakteriju *Vibrio fischeri* i trepetljikaša (*Spirostomum ambiguum*) uvelike ovisi o pH medija: smanjenjem pH vrijednosti s 8 na 6, toksičnost 2,4-dinitrofenola (2,4DNP), 2,5-dinitrofenola (2,5DNP) i 2,6-dinitrofenola (2,6DNP) raste za više od 20 puta (Nałęcz-Jawecki i Sawicki, 2003). Na rast i preživljavanje ribe *Cyprinodon variegatus* izložene 2,4DNP nisu značajno utjecali salinitet i temperatura, a na izloženost 4NP

je značajno utjecala temperatura (Linton i sur., 1994). Toksičnost 4NP (i ostalih fenola) je također dokazana za ličinke ribe *Jordanella floridae* (Holdway i sur., 1991).

U odnosu na NP, ekotoksični učinak NC poznat je samo za 4NC. U radu Babić i sur. (2021) ispitan je utjecaj GUA, katehola (CAT), 4NC, 4,6DNG i 5-nitrogvajakola (5NG) na embrije slatkovodne ribe zebrice (*Danio rerio*). Embriji su imali letalne i sub-letalne promjene uz pojavu raznih abnormalnosti u razvoju. Određene su LC_{50} (koncentracija spoja koja uzrokuje smrt 50 % testiranih organizama u određenom vremenskom periodu) i EC_{50} vrijednosti stope smrtnosti prema kojima je toksičnost rasla u nizu GUA < 5NG < 4,6DNG < CAT < 4NC. LC_{50} vrijednosti nakon 96 h izlaganja embrija spojevima 4NC i CAT iznosile su pojedinačno 8,16 mg/L i 10,95 mg/L, dok je EC_{50} vrijednost iznosila 4,95 mg/L za 4NC i 11,49 mg/L za CAT. Svi testirani spojevi pokazali su na embrijima zebrice utjecaj na staničnoj razini (inhibicija enzima), na morfološkoj razini (smanjenje duljine glave i očnog područja), te fiziološkoj razini (područje žumanjčane i perikardijalne vrećice), kao i na redukciju i/ili odsutnost pigmentacije. Toksičan utjecaj spojeva 2NP i 2,4DNP na embrije zebrice također su ispitivali Ceylan i sur. (2016). Nakon 48 h izlaganja embrija navedenim spojevima dobivene LC_{50} vrijednosti iznosile su 18,7 mg/L za 2NP i 9,65 mg/L za 2,4DNP, dok su EC_{50} iznosile 7,9 mg/L za 2NP i 3,05 mg/L za 2,4DNP čime se 2,4 DNP pokazao toksičnijim spojem. U razvoju embrija prilikom izlaganja navedenim spojevima uočen je utjecaj na nepotpuni razvoj očiju i glave, zakrivljenost repa, slabu pigmentaciju, deformaciju žumanjčane vreće te potpuni gubitak pigmentacije. Navedena istraživanja su pokazala nužnost sistematskog ispitivanja toksičnih utjecaja i ostalih NMAU porijeklom iz atmosfere na vodene organizme kao i relevantnih interakcija s organskim i anorganskim konstituentima vodenih sustava koje utječu na njihovu biodostupnost stanicama.

2.3. Metali u tragovima

Metali dospijevaju u atmosferu iz prirodnih izvora poput erozije tla i stijena vjetrom, vulkanskih aktivnosti, morske vode te šumskih požara. Najčešće antropogene aktivnosti kojima metali dospijevaju u atmosferu su izgaranje fosilnih goriva, metalurška industrija, kao i industrije u kojima se provode visokotemperaturni procesi izgaranja, promet, obrada otpada u koju spada i spaljivanje otpada iz kućanstava, miniranje, rudarstvo i poljoprivreda (Pacyna i Pacyna, 2001). Od puteva prijenosa onečišćujućih tvari (tlo, voda, biota), najznačajnijim se smatra prijenos atmosferskim česticama zbog brzine prijenosa, udaljenosti na koje se mogu prenositi te veličine zračnog prostora kojim se mogu širiti (Csavina i sur., 2012).

Značajni udio $PM_{2,5}$ čine Cr, Mn, Zn, Fe, Cd, Cu, As, Hg, barij (Ba), Pb, aluminij (Al) i Ni (Alves i sur., 2015; Juda-Rezler i sur., 2020; Liu i sur., 2018). Ovisno o izvoru nastanka i okolišnim uvjetima, metali adsorbirani na PM mogu biti u rasponu koncentracija od 30 do 35 $\mu g/m^3$ zraka (Popoola i sur., 2018). Istraživanje provedeno u obalnom Jadranskom moru pokazalo je da na povećane atmosferske koncentracije Zn, Cd i Pb u hladnije doba godine utječu lokalni te regionalni izvori povezani s grijanjem kućanstava kao i dominantni dalekosežni prijenos antropogenih tvari iz kontinentalne Europe, dok tijekom toplijeg dijela godine i turističke sezone povećane emisije iz prometa utječu na atmosferske koncentracije Ni, Co i Cu (Penezić i sur., 2021). Intenzivni požari i donos mineralne prašine iz Sahare također utječu na povećanje koncentracija metala u tragovima u česticama te na njihovo taloženje i razdiobu u plitkom priobalnom području srednjeg Jadrana (Penezić i sur., 2021). Atmosfersko taloženje metala utječe na biogeokemijske procese u vodenim ekosustavima, inhibiciju ili povećanje brojnosti fitoplanktona te posljedično na primarnu produkciju. Topljivost metala u vodenim ekosustavima ovisi o izvoru emisija i njihovoj specijaciji (Chester i sur., 1993), a pojavljuju se u obliku slobodnih iona, anorganskih i organskih vrsta ili su adsorbirani na različitim površinama/međufazama.

Mnogi metali imaju važnu ulogu u biološkim procesima organizama, poput Cu, molibdena (Mo), Co, Fe, Mn i Zn, koji se nazivaju esencijalnim elementima jer su nužni za rast i razvoj organizama, vežu se na organske molekule na različitim biokemijskim mjestima, gdje uglavnom funkcioniraju kao katalizatori za induciranje ili pojačavanje enzimske aktivnosti (Regan, 1993). Međutim, ukoliko su prisutni u višim koncentracijama ovi metali mogu izazvati toksične učinke na organizme (Rainbow, 2007). Metali poput Pb, Hg i Cd, s druge strane, nisu esencijalni nego vrlo toksični za organizme već pri niskim koncentracijama.

2.3.1. Toksični učinci metala

Onečišćenje vodenih ekosustava metalima predstavlja globalni problem. Toksičnim djelovanjem metali mogu oštetiti stanične membrane, promijeniti specifičnost enzima, poremetiti stanične funkcije i oštetiti strukturu DNA (Turpeinen, 2002). Potrebe različitih organizama za esencijalnim metalima značajno variraju, ali optimalni rasponi koncentracija su uski i često pod pažljivom homeostatskom kontrolom (Chapman i sur., 1996; Rand i Petrocelli, 1985).

Na unos metala u organizme i njihovu toksičnost utječe specijacija metala, prisutnost drugih metala i onečišćujućih tvari, fizikalno-kemijski uvjeti medija (temperatura, pH, svjetlost, salinitet, otopljeni kisik), fiziologija organizma, životni stadij organizma, veličina i spol, te adaptacija na prisutnost metala (Salomons i Forstner, 1984). Metali se iz otopine najefikasnije mogu unijeti u organizam kao slobodni (hidratizirani) ioni ili kao labilni anorganski kompleksi. Za razliku od organskih onečišćujućih tvari, metali se ne mogu razgraditi, već se raspodijele u stupcu vode, akumuliraju u sedimentu ili u živim organizmima. Metale u vodenom okolišu organizmi akumuliraju direktnim unosom kroz površinu tijela, kroz respiratorne strukture (pluća ili škrge), kroz epitel probavnog trakta, putem hrane ili kombinacijom navedenih puteva unosa. Opseg bioakumulacije metala ovisi o ukupnoj količini, bioraspoloživosti pojedinog metala u okolišnom mediju i načinu unosa, pohrane i mehanizama izlučivanja iz organizma. U biološkim sustavima metali mogu postati kancerogeni uslijed stvaranja slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species,* ROS*)* oksido-redukcijom metalnih iona koji oštećuju DNA i enzime (Bal i Kasprzak, 2002; Chang, 2023). Molekularni mehanizmi citotoksičnosti metala uključuju oštećenje membrane plazme nakon vezanja na proteine i fosfolipide, inhibiciju natrij-kalij ATP-aze, inhibiciju transmembranskog transporta aminokiselina, inhibiciju enzima, peroksidaciju lipida, oksidativno oštećenje DNA i inhibiciju antioksidativnih enzima (kao što je glutation) kroz stvaranje ROS (Leonard i sur., 2004).

Iako je Cu esencijalni metal za rast fitoplanktona, postoji uska granica između esencijalne i toksične koncentracije Cu specifična za pojedinu vrstu fitoplanktona. Fitoplankton može izravno apsorbirati slobodne (hidratizirane) Cu(II) ione, ali su lipofilne organske te anorganske vrste Cu niske molekularne mase također vrlo dostupne za fitoplanktonske stanice. Pragovi toksičnosti Cu mijenjaju se u ovisnosti o vrstama fitoplanktona i kemijskom sastavu morske vode. Brand i sur. (1986) su dokazali da su cijanobakterije najosjetljivije na promjenu Cu(II) koncentracije te da koncentracija Cu(II) iona $>10^{-12}$ M smanjuje stopu njihove reprodukcije, dok eukariotske mikroalge poput kokolitoforida, dinoflagelata i dijatomeja imaju maksimalnu stopu reprodukcije na 10^{-11} M. Time je ukazano da povišena koncentracija Cu(II) može promijeniti strukturu zajednice fitoplanktona u određenom morskom ekosustavu. Navedeno je potvrđeno i inkubacijskim eksperimentima na populacijama pikoeukariota i *Synechococcus*-a u Crvenom moru (Paytan i sur., 2009) gdje je nakon dodatka PM s Cu premašen njihov prag toksičnosti te je došlo do smanjenja populacije. U Južnom kineskom moru su se populacije *Prochlorococcus*-a i *Synechococcus*-a smanjile zbog povećanog atmosferskog taloženja Cu (Liao i sur., 2017). Na toksičnost Cu za morski

fitoplankton može utjecati prisutnost i ostalih metala poput Fe, kao i prisutnost/odsutnost hranjivih tvari, npr. ograničenje dostupnosti dušika. Kod dijatomeje (*Thalassiosira*) je dokazano povećanje potražnje za Cu kod smanjene koncentracije dostupnog Fe, kao i povećana osjetljivost na Cu u uvjetima nedostatka fosfora u odnosu na uvjete nedostaka dušika (Hall i sur., 1989). Negativan učinak PM koji sadrži koncentracije Cu iznad 5,23 ng/m^3 vidljiv je i u smanjenju biomase fitoplanktona u zapadnom dijelu Sredozemnog mora (Jordi i sur., 2012).

2.4. Utjecaj interakcija na ekotoksičnost organskih onečišćujućih tvari

Negativan učinak organskih onečišćujućih tvari na vodene organizme ovisi o njihovoj kemijskoj specijaciji koja je uvjetovana interakcijama s drugim organskim i anorganskim konstituentima u prirodnim vodenim sustavima. Interakcija organskih onečišćujućih tvari s česticama, koloidima te organskim makromolekulama u prirodnim vodama utječe na njihovu „slobodnu“ biodostupnu frakciju (Rogers, 1993). Poznato je da interakcija organskih onečišćujućih tvari i različitih anorganskih iona poput iona metala ili hranjivih soli utječe na njihovu interakciju sa stanicama mikroalgi (Tao i sur., 2012, 2013).

Cu u formi Cu(II) je jedan od glavnih metala u tragovima uključenih u organske interakcije i kemijske procese u atmosferskoj vodenoj fazi i u morskoj vodi. U prirodnim vodama koegzistira u otopljenim i čestičnim frakcijama koje obuhvaćaju više kemijskih oblika kao što su slobodni (hidratizirani) ioni, anorganske i organske vrste, ili se adsorbira na različitim površinama i međufazama. Prema Irving-Williamsovom nizu relativne stabilnosti kompleksa formiranih od iona dvovalentnih metala, Cu(II) tvori najstabilnije organske komplekse među prijelaznim metalima bez obzira na tip organskog liganda (Mn(II)<Fe(II)<Co(II)<Ni(II)<Cu(II)>Zn(II)) (Dalal, 2017; Stumm i Morgan, 1981). Stoga je većina otopljenog Cu(II) u vodenim sustavima vezana u inertne organske komplekse. Ovisno o specifičnim regionalnim ili globalnim biogeokemijskim procesima ugljika u vodama (Richon i Tagliabue, 2019), prisutnost otopljenog Cu(II) u obliku inertnih kompleksa iznosi u oceanu 94 ± 5 % (Whitby i sur., 2018), a u estuarijima ~55 – 90 % (Pađan i sur., 2021). Organsko kompleksiranje Cu(II) je ključni proces koji upravlja njegovim biogeokemijskim procesima u kišnici (Spokes i sur., 1996; Witt i sur., 2007). Štoviše, riječni ispusti, atmosfersko taloženje, unos fitoplanktona i reverzibilno uklanjanje su istaknuti kao glavni procesi koji utječu na koncentraciju i specijaciju Cu(II) u morskoj vodi (Richon i Tagliabue, 2019), potičući proizvodnju različitih autohtonih organskih liganda koji vežu Cu(II). Organski kompleksi

Cu(II) su slabo biodostupni te je organsko kompleksiranje vrlo važno pri povišenim koncentracijama u okolišu jer smanjuje staničnu apsorpciju Cu(II) i održava homeostazu u stanicama (Pontoni i sur., 2021). Skupina organskih liganada koji vežu Cu(II) u morskoj vodi (Leal i sur., 1999; Plavšić i Strmečki, 2016; Ruacho i sur., 2022; Whitby i sur., 2018), u rijekama (Pađan i sur., 2021; Takamura-Enya i Tokutake, 2016) i u atmosferi (Okochi i Brimblecombe, 2002; Witt i Jickells, 2005) je složena smjesa spojeva različitih struktura koji imaju različiti afinitet vezanja, u kojima atomi S, N i/ili O obično koordiniraju Cu(II) (Zhang i sur., 2019). U atmosferi, organski ligandi mogu biti morskog, kopnenog i/ili miješanog podrijetla, što dovodi do stvaranja kompleksa s različitim konstantama uvjetne stabilnosti (Karavoltsos i sur., 2013; Nimmo i sur., 1998; Plavšić i sur., 2008; Spokes i sur., 1996; Witt i sur., 2007; Witt i Jickells, 2005). Sukladno tome, organski ligandi koji vežu Cu(II) tipično se dijele u dvije skupine: L_1, koji tvore inertne komplekse s Cu(II) (s uvjetnom konstantom stabilnosti, log K > 13,5), koje obično izlučuju fitoplankton i bakterije u fotičkoj zoni (Moffett i Brand, 1996), i skupinu L_2, kao što su terestrijarne humusne tvari, koje tvore slabe Cu(II) komplekse (log K < 13,5) (Whitby i sur., 2018).

Poznata je interakcija Cu(II) i 4NC koji u vodenoj otopini (0,1 M KNO_3) stvaraju mono-nitrokateholatne komplekse [Cu(4NC)] i di-nitrokateholatne komplekse $[Cu(4NC)_2]^{2-}$ s kumulativnim konstantama stabilnosti log β_1 = 11,7, odnosno log β_2 = 21,1 (Gavazov, 2012). Kompleks $[Cu(4NC)_2]^{2-}$ je karakteriziran potenciometrijom i spektrofotometrijom (Gavazov, 2012; Jameson i Wilson, 1972). Interakcija Cu(II) s ostalim atmosferskim NC, poput MNC, u različitim prirodnim vodenim sustavima nije istražena kao niti utjecaj kompleksiranja na njihovu toksičnost.

2.5. Testovi toksičnosti

Prema definiciji Truhaut-a (1977) ekotoksikologija je dio toksikologije koji se bavi istraživanjem toksičnih učinaka koji su uzrokovani toksičnim tvarima prirodnog i antropogenog porijekla na sastavne dijelove ekosustava, biljke, životinje, čovjeka i mikrobe u integriranom kontekstu. Ciljevi ekotoksikologije su na temelju stečenog znanja o sudbini i učincima toksičnih tvari, razviti metode kojima bi se njihov učinak u biosferi mogao predvidjeti i pratiti, kako bi se moglo pravovremeno poduzeti mjere kojima bi se spriječilo zagađenje. Testovi toksičnosti, odnosno biotestovi, koriste se za izlaganje testnih bioloških organizama ili stanica okolišnom mediju (zrak, voda, sediment, tlo) ili određenom spoju u kontroliranim uvjetima (laboratorij),

te procjenu učinaka na preživljavanje, rast, razmnožavanje i ponašanje tih organizama. Koja će se vrsta biotesta koristiti ovisi o vrsti testnog organizma i toksičnosti koju želimo odrediti pri čemu se prate različiti biomarkeri učinka, izlaganja i osjetljivosti. Biomarkeri su rane promjene na biokemijskoj, fiziološkoj, histološkoj, morfološkoj i razini ponašanja, na razini jedinke ili niže, uzrokovane fizikalnom ili kemijskom onečišćujućom tvari. Biomarkeri ekspozicije ukazuju na izloženost organizma zagađenju, ali ne i na stupanj pritom izazvanih negativnih učinaka. U biomarkere ekspozicije spada indukcija detoksikacijskih enzima. Biomarkeri učinka ukazuju na negativan učinak izazvan u organizmu, poput primjerice oštećenja DNA. Pokazatelji nasljedne ili stečene sposobnosti organizma na reakciju uslijed izloženosti ksenobiotiku nazivaju se biomarkeri osjetljivosti. Parametri ponašanja i fiziologije jedinke uključuju smrtnost, promjene u ponašanju, patološke promjene, sposobnost razmnožavanja, te nastanak tumora. Učinci onečišćujućih tvari na biokemijskoj razini mogu imati zaštitnu funkciju poput indukcije detoksikacijskih enzima čime nastaju vodotopljivi spojevi koji se mogu izlučiti iz organizma, indukcije metalotioneina čime se smanjuje bioraspoloživost toksičnih metala, indukcije proteina toplotnog šoka uzrokovane naglom razlikom u temperaturi čime se sprječavaju oštećenja proteina, te aktivacije enzima DNA popravka, ali i nezaštitnu funkciju poput modifikacije DNA i inhibicije acetilkolinesteraze (Benfeito i sur., 2014; Faverney i sur., 2000; García-Gómez i sur., 2012; Hu i sur., 2022; Jeyachandran i sur., 2023).

U testovima toksičnosti određuje se koncentracija onečišćujućih tvari koja dovodi do smrtonosnih, subletalnih i općenito štetnih učinaka na organizme. Subletalni učinci se odnose na učinke do kojih dolazi pri koncentracijama ispod onih koje uzrokuju izravnu smrt. Odnose se na smanjeni rast, oslabljenu reprodukciju, promjene u ponašanju, smanjenje veličine organizama na razini zajednica te poremećaje funkcija među vrstama zajednice, kao i na razini ekosustava. Akutni toksični učinci javljaju se vrlo brzo nakon kratkotrajne izloženosti organizma toksičnoj tvari, a najčešće mjeren akutni učinak u vodenim organizmima je stupanj mortaliteta. S druge strane kronični toksični učinci nastaju kada toksična tvar proizvede štetne učinke kao rezultat dugotrajne izloženosti, pri čemu izloženost treba trajati barem dvije generacije pokusnih organizama, prilikom čega može doći do negativnog utjecaja na rast, reprodukciju, metabolizam ili smanjenu stopu preživljavanja. Utjecaji onečišćujućih tvari kojima su izloženi vodeni organizmi mogu se očitovati na više razina ekosustava odnosno na biokemijskoj i staničnoj razini (npr. toksičnost, metabolički poremećaji, oštećenje stanica i detoksikacija), na razini organizama (npr. fiziološke promjene, smanjeni rast uslijed energije potrošene na detoksikaciju i obnavljanje tkiva, promjene ponašanja, osjetljivost na bolesti,

reproduktivne učinke, održivost ličinki i imunološki odgovor), zatim na razini populacije (npr. dobna/veličinska struktura, mortalitet i reproduktivni učinci) te na razini zajednice (npr. brojnost i distribucija vrsta i utjecaji na hranidbeni lanac) (Smith i Immig, 2018).

Testovi toksičnosti se mogu provoditi *in vitro* i *in vivo*. *In vitro* ispitivanja se provode na molekulama (npr. enzimi) ili stanicama, dok se *in vivo* provode na organizmima poput mikroalgi, riba, račića, štakora (Blaise i Férard, 2005). Uz *in vitro* testove koji pružaju važne informacije o mehanizmima toksičnog djelovanja posredovanog receptorima, provođenje *in vivo* testiranja je nužno u određivanju stvarnog efekta i koncentracije potencijalno toksične tvari ili smjese tvari obzirom da organizmi posjeduju detoksikacijski mehanizam kojim se toksičnost tvari može smanjiti, ali se tvar može pokazati i toksičnijom u odnosu na *in vitro* ispitivanje (Leusch, 2013). Među najzastupljenije testove u studijama određivanja akutne toksičnosti *in vitro* mjerenjem citotoksičnosti spojeva na stanicama spada kolorimetrijski test stanične metaboličke aktivnosti pod nazivom MTT test (Mosmann, 1983). Princip testa se sastoji u izlaganju stanica testnim spojevima u trajanju od 72 h nakon čega se na stanice dodaje MTT reagens (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolij bromid). Test se temelji na razgradnji žuto obojenog MTT reagensa u kristale formazana. Kako se navedena razgradnja reagensa odvija samo u živim stanicama pomoću mitohondrijskog enzima sukcinat-dehidrogenaze, spektrofotometrijskim mjerenjem otopljenog ljubičastog produkta formazana dobiju se podatci o udjelu živih stanica koje mogu metabolizirati MTT (Denizot i Lang, 1986). Za određivanje *in vivo* kronične toksičnosti primjenjuje se standardizirani ISO 8692:2004 test (*Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae*), odnosno AlgaeTox test korištenjem jednostaničnih slatkovodnih zelenih mikroalgi vrste *Scenedesmus subspicatus*. Metoda se temelji na izlaganju mikroalgi testnim spojevima za vrijeme eksponencijalne faze rasta te praćenju inhibicije rasta u periodu od 96 h, a koji uključuje nekoliko završenih životnih ciklusa. Gustoća mikroalgi se određuje na početku i na kraju inkubacije mjerenjem fluorescencije pigmenta klorofila *a*, a rezultat se izražava kao postotak preživljavanja stanica mikroalgi. Test predstavlja praktičnu metodu analize toksičnosti jer je kultura mikroalgi sustav sa visokom stopom rasta koji u kratkom vremenu izlaganja daje pouzdane rezulate. Rezultati MTT i AlgaeTox testova se izražavaju kao IC_{50} vrijednosti (engl. *half-maximal inhibitory concentration*) koja predstavlja koncentraciju spoja koja uzrokuje 50 % inhibiciju rasta stanica ili mikroalgi.

Stanični detoksikacijski mehanizam poznat je pod akronimom ADME (engl. *Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion*) što označava apsorpciju, distribuciju, metabolizam i izlučivanje endo- i ksenobiotika iz stanica. U ADME proces su uljučeni proteinski prijenosnici i enzimi detoksikacijskog sustava. ADME proces uključuje fazu 0 u kojoj ključnu ulogu imaju tzv. *uptake* proteinski prijenosnici na membrani stanice koji su odgovorni za unos spojeva u stanicu. Za ovaj proces odgovorni su polispecifični proteini koji pripadaju u *Solute Carrier Class* (SLC) nadobitelj. Unutar SLC nadobitelji postoje prijenosnici organskih kationa (engl. *Organic Cation Transporters*, OCT) iz obitelji SLC22A i prijenosnici organskih aniona iz obitelji SLC21 (engl. *Organic Anion-Transporting Polypeptides*, OATP) i SLC22 (engl. *Organic Anion Transporters*, OAT) (Shin i sur., 2015). Njihova uloga u transportu fizioloških spojeva i ksenobiotika je vrlo bitna jer oni ubacuju u stanice potencijalno toksične tvari koje se zatim metaboliziraju enzimima faze I i faze II, s ciljem biotransformacije u hidrofilnu molekulu kako bi se mogla izlučiti iz stanice. Enzimi koji kataliziraju reakcije biotransformacije uglavnom su smješteni u endoplazmatskom retikulumu u citosolu, dok se manje količine enzima nalaze u mitohondrijima, jezgri i lizosomima (Parkinson i sur., 2013). Faza I biotransformacije uključuje procese oksidacije, redukcije, hidrolize i acetilacije spoja i posredovana je skupinom enzima citokrom P450 (CYP) monooksigenaze. U fazi II se konjugacijom sa različitim funkcionalnim polarnim skupinama povećava topljivost potencijalno toksičnog spoja. To su obično reakcije glukuronidacije, sulfonacije i konjugacije glutationom, a enzimi koji ih kataliziraju su: UDP-glukuronozil transferaza (UGT), sulfotransferaze (SULT) i glutation S-transferaze (GST) (Hodgson, 2010). U fazi III se hidrofilni spoj izlučuje iz stanice putem tzv. *efflux transportera*, odnosno transportnih proteina u koje spadaju *ATP-binding Cassette superfamily* (ABC) i *Multidrug and Toxic compound Extrusion* (MATE) nadobitelji.

Obzirom na važnu ulogu transportnih proteina i enzima u ADME procesima važno je istražiti njihovu interakciju s ksenobioticima provođenjem *in vitro* testova. Interakcija s fazom 0 stanične detoksikacije može se odrediti mjerenjem inhibicije transportne aktivnosti *uptake* proteinskih prijenosnika organskih kationa, Oct1 i organskih aniona, Oatp1d1 ribe zebrice (*Danio rerio*). Oct1 imaju najveću ekspresiju u jetri i bubrezima dok su Oatp1d1 proteini najviše eksprimirani u jetri i mozgu. Određivanje inhibicije transportne aktivnosti i jednog i drugog prijenosnika određuje se mjerenjem inhibicije unosa modelnog supstrata, odnosno spoja kojeg protein unosi u stanicu. Rezultati se izražavaju preko IC_{50} vrijednosti koja predstavlja koncentraciju spoja koja uzrokuje 50 % inhibiciju unosa modelnog supstrata.

Interakcija s fazom I određuje se mjerenjem indukcije CYP1A1 ovisnih detoksikacijskih enzima EROD biotestom. Osnovno svojstvo CYP1A1 enzima je indukcija prilikom izlaganja organskim onečišćujućim tvarima, a tipični induceri su aromatski spojevi iz skupine PAH. Pritom dolazi do vezanja liganda na citosolni Ah-receptor, koji tako vezani odlaze u jezgru stanice gdje dolazi do pojačane transkripcije CYP1A1 gena. Indukcija aktivnosti CYP1A1 enzima određuje se mjerenjem aktivnosti supstrata 7-etoksiresorufin O-deetilaze (EROD) nakon njegovog dodatka na stanice izložene testnim spojevima jer se reakcijom dealkilacije koju katalizira CYP1A1 supstrat prevodi u fluorescentni resorufin. Intenzitet fluorescencije koji se mjeri je proporcionalan indukciji CYP1A1 enzima. Za provedbu EROD biotesta najčešće se koriste *Poeciliopsis lucida hepatocellular carcinoma* (PLHC-1) riblje stanice obzirom da su one zadržale mehanizam indukcije CYP1A enzima. Naknadno se u uzorcima izmjeri sadržaj proteina jer se aktivnost CYP1A1 enzima izražava prema masi proteina (pmol resorufina/min/mg proteina). Rezultati se izražavaju preko EC_{50} vrijednosti odnosno koncentracije spoja koja uzrokuje 50 % maksimalnog promatranog učinka.

2.5.1. Modelni organizmi u testovima toksičnosti

Mikroalge se vrlo često koriste kao modelni organizmi, odnosno bioindikatori procjene stanja vodenih ekosustava kao i prilikom laboratorijskih ispitivanja stresnih utjecaja zbog njihove osjetljivosti na promjene, sposobnosti reagiranja i adaptacije prilikom utjecaja onečišćujućih tvari. Utjecaj na mikroalge se može pratiti analiziranjem promjena u biokemijskom sastavu, brojnosti, ponašanju, fiziologiji (Castro-Bugallo i sur., 2014; Martínez-Ruiz i Martínez-Jerónimo, 2015; Novosel i sur., 2022). Na rast i biokemijski sastav mikroalgi utječu promjena temperature, promjena intenziteta svjetlosti, salinitet, pH, dostupnost nutrijenata, faza rasta kao i prisutnost onečiščujućih tvari poput primjerice organskih spojeva (Belghith i sur., 2016; Khatoon i sur., 2017). Mikroalge su važni modelni organizmi jer su osnova hranidbenog lanca u vodenim ekosustavima, a toksični učinak neke tvari može utjecati na promjenu strukture zajednice, primarnu produkciju, kruženje nutrijenata, što posljedično može imati učinke na potrošače na višem stupnju, od smanjene dostupnosti hrane, promjene strukture, ali i mogućnosti bioakumulacije toksične tvari (Lyubenova i Boteva, 2016).

Mikroalge *Scenedesmus subspicatus* i *Dunaliella tertiolecta* su uobičajeni standardni modelni organizmi u testovima toksičnosti različitih onečišćujućih tvari na vodene ekosustave.

Obje vrste spadaju u grupu zelenih alga (*Chlorophyta*) i razred *Chlorophyceae*. Pogodne su za testiranje toksičnosti zbog jednostavnosti uzgoja u laboratorijskim kulturama, brzog rasta, veličine i morfologije. *Scenedesmus subspicatus* je slatkovodna mikroalga za koju je visoka stopa rasta iznimno važna zbog praćenja broja stanica, odnosno preživljavanja u periodu od 96 h (AlgaeTox test). Karakterizira ju i sposobnost uspješnog rasta i razmnožavanja pri različitim uvjetima hranjivih tvari. Stanice su obično cilindrične ili izdužene te ih nalazimo kao jednostanične ili kolonijalne oblike. *Dunaliella tertiolecta* je biflagelatna mikroalga koju karakterizira odsustvo čvrste stanične stijenke zbog čega je idealan model za praćenje utjecaja okolišnih uvjeta i onečišćujućih tvari na rast i promjene unutar stanice (Borowitzka i Siva, 2007). Stanice su elipsoidnog ili ovalnog oblika obavijene elastičnom membranom, odnosno glikoproteinskim omotačem i zbog tog su pogodne za ispitivanje osmotskih promjena u okolišu pošto stanica zbog odsustva čvrste stijenke može vrlo brzo promijeniti volumen uslijed promjene u osmotskom tlaku. Rasprostranjena je u raznim vodenim ekosustavima (obalnim morskim staništima, rijekama, deltama) zbog svojstva visoke tolerancije na širok raspon saliniteta (Vrana i sur., 2022), intenziteta svjetlosti (Minhas i sur., 2023) i relativno visoke temperature (Rukminasari, 2013).

Riba zebrica (*Danio rerio* Hamilton, 1822) je tropska slatkovodna riba iz porodice *Cyprinidae* (šarani) koja živi u malim rijekama, potocima i rižinim poljima na području sjeverne Indije, sjevernog Pakistana, Nepala i Butana. Istraživanja na zebricama rezultirala su bazom podataka u kojoj su opisani razvojni stadiji zebrice (Kimmel i sur., 1995), a sekvenciranjem genoma je utvrđeno da zebrice i ljudi dijele i do 70 % zajedničkih gena (Howe i sur., 2013). Zbog genetske sličnosti sa sisavcima i čovjekom te očuvanih fizioloških mehanizama, rezultate istraživanja na zebrici je moguće primijeniti na ljude i ostale sisavce čime je zebrica postala jedan od najpopularnijih i najčešće korištenih standardnih modelnih organizama u području biomedicine, razvojne biologije, genetike, farmakologije i (eko)toksikologije. Zebrice su vrlo praktične kao modelni organizam zbog jednostavnog laboratorijskog održavanja, male veličine, malih troškova održavanja, mogućnosti dobivanja stotina embrija (oko 200) na dnevnoj bazi, prozirnosti embrija i brzog ranog razvoja. U laboratoriju se uzgajaju u akvarijima s temperaturom vode 26±1°C. Embriji zebrice gotovo su prozirni (do 5 dpf) i tako istraživačima omogućuju praćenje razvoja organa. U prva 24 h nakon oplodnje formiraju se svi glavni organi zebrice, dok se unutar 72 h počnu samostalno hraniti. Spolno sazrijevanje postiže se nakon 3 – 4 mjeseca kada zebrice mogu dati novo potomstvo. Zebrica se koristi kao modelni organizam

kralježnjaka najviše u istraživanju uloga specifičnih gena te omogućuje praćenje fenotipskih promjena kao odgovor na genetske mutacije (Davis, 2020; Lieschke i Currie, 2007).

Zebrica ima vrlo važnu ulogu u (eko)toksikološkim istraživanjima utjecaja toksičnosti različitih spojeva ili okolišnih uzoraka na njezin razvoj i ponašanje zbog osjetljivosti na toksikante i mogućnosti praćenja razvoja organa tijekom embrionalnog stadija. Na njoj su provedena brojna istraživanja, poput utjecaja endokrinih disruptora na reprodukciju (Huang i sur., 2015; Versonnen i sur., 2004), pesticida na malformacije i smrtnost (Pamanji i sur., 2015), teških metala na akutnu toksičnost i oksidativni stres (Jijie i sur., 2020; Singh i Ansari, 2017), industrijskih spojeva na genotoksičnost (Derikvandy i sur., 2020; Sposito i sur., 2018), itd. Riba zebrica ima ključnu ulogu u razumijevanju ADME procesa jer služi i kao model identifikacije i proučavanja uloge proteinskih prijenosnika unosa (SLC) (Dragojević i sur., 2020; Mihaljević i sur., 2017; Popović i sur., 2014; Vujica i sur., 2024) i eliminacije (ABC i MATE) (Lončar i Smital, 2018; Thomas i sur., 2024; Vujica i sur., 2023) endo- i ksenobiotika iz stanice. Također, uveden je međunarodni standardizirani test utjecaja akutne toksičnosti kemikalija na embrije ribe zebrice pod nazivom Fish Embryo Acute Toxicity (FET) test (OECD 236:2013) prema kojem se embriji smiju izlagati kemikaliji u periodu od 96 h. Tijekom tog perioda kao krajnje točke koje upućuju na akutni učinak i posljedično na smrt embrija smatraju se koagulacija embrija, izostanak formiranja somita, neodvajanje repa iz žumanjčane vreće i prestanak rada srca. U testu se promatraju i subletalni učinci poput nastanka edema, skolioze kralježnice, malformacija u razvoju, itd.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Sakupljanje i ekstrakcija iz atmosferskih lebdećih čestica porijeklom iz izgaranja biomase i miješanih antropogenih izvora

Za potrebe ekotoksikoloških i inkubacijskih eksperimenata sakupljene su atmosferske lebdeće čestice različitog porijekla. Prvi tip uzoraka bio je atmosferski materijal nastao izgaranjem biomase kao simulacija požarnog događaja (engl. *simulated biomass burning*, sBB), a drugi tip je bio okolišni atmosferski materijal miješanog antropogenog porijekla (engl. *antropogenic aerosols*, AA).

Atmosferske lebdeće čestice PM_{10} (d_a < 10 µm) emitirane prilikom simuliranog gorenja suhog hrastovog drva za ogrjev (sBB) sakupljene su na filterima od kvarcnih vlakana (Whatman, UK, izložena površina 154 cm^2, prethodno žareni 4 h na 450 °C) korištenjem uzorkivača čestica velikog volumena (Kalman System, Budimpešta, Mađarska) pri protoku zraka od 32 m^3/h. Filteri sa uzorkovanim česticama su zatim pohranjeni u prethodno žarenu Al foliju i čuvani na -20 °C. Za potrebe eksperimenata odabrana su četiri sBB filtera (uzorci označeni kao AH–4, AH–6, AH–14, i AH–29) od kojih su izrezani dijelovi s ukupnom masom čestica 17,66 mg koji su potom zajednički ekstrahirani po tri puta u 15 mL jednog od otapala: Milli-Q voda, heksan (Hex), diklorometan (DCM) i metanol (MeOH). Ekstrakcija je provedena ultrazvučnim miješanjem tijekom 15 min te čuvanjem na +4 °C tijekom 24 h. Dobivene otopine su filtrirane kroz filtere veličine pora 0,7 µm (GF/F, Whatman) da se uklone suspendirane netopljive čestice i ostaci filtera. Vodeni ekstrakti su liofilizirani (5,5 Pa, -48 °C) upotrebom liofilizatora (Labconco, SAD), dok su organska otapala najprije uparena rotacijskim uparivačem (Rotavapor® R-100, Buchi Labortechnik, Švicarska), a zatim propuhivanjem dušika.

PM_{10} frakcija AA čestica (14 filtera) prikupljena je u kontinentalnom dijelu Hrvatske na prethodno žarenim (450 °C, 4 h) filterima od kvarcnih vlakana (d = 47 mm; Pall Life Sciences, Port Washington, New York). Za tu svrhu koristio se automatski sekvencijalni uzorkivač malog volumena PNS 18T-DM-3.1 (prema EN 12341:2014, Comde-Derenda, Stahnsdorf, Njemačka) s protokom zraka od 2,3 m^3/h. Filteri s ukupnom masom čestica 66,24 mg su spojeni, usitnjeni i ekstrahirani 15 min u 0,8 L Milli-Q vode uz pomoć ultrazvuka i držanjem na +4 °C 24 h. Otopina je zatim profiltrirana (GF/F, Whatman, veličina pora od 0,7 µm), odvojeno je 30 mL (s 2,5 mg PM) u koju je dodano 100 ng pikrinske kiseline (interni standard) te je takva otopina liofilizirana.

Jedan sBB (H_2O, MeOH, Hex i DCM) i AA (H_2O) suhi ekstrakt korišten je za kvantifikaciju 12 NMAU analitičkom tehnikom koja spaja tekućinsku kromatografiju i masenu spektrometriju (engl. *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS), dok su druga dva slična ekstrakta pripremljena za biološke testove i inkubacijski eksperiment.

3.2. Kvantifikacija NMAU

Korištene kemikalije su kupljene od proizvođača Sigma-Aldrich osim ako nije drugačije navedeno. Kao standardi su korišteni: 4NC, 4M5NC (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, SAD), 3-metil-5-nitrokatehol (3M5NC, Atomax Chemicals, Shenzhen, Kina), 4NP, 2-metil-4-nitrofenol (2M4NP), 3-metil-4-nitrofenol (3M4NP), 2,4DNP, 4NG, 4-nitrosiringol (4NS), 3-nitrosalicilna kiselina (3NSA) i 5-nitrosalicilna kiselina (5NSA), kao i sintetizirani 3-metil-4-nitrokatehol (3M4NC, pročišćen i identificiran u (Frka i sur., 2016). Sve kalibracijske krivulje konstruirane su sa šest kalibracijskih točaka (R^2 = 0,9948-1,0). Ekstrakti koji sadrže vrlo visoku koncentraciju NMAU su razrijeđeni prije analize.

LC-MS/MS metoda korištena je za kvantificiranje 12 NMAU u sBB i AA uzorcima. Tijekom pripreme uzoraka čestica, setu od četiri sBB filterske sekcije dodano je 100 ng pikrinske kiseline (interni standard) te su filteri usitnjeni i ekstrahirani kako je ranije opisano. Različiti sBB (H_2O, MeOH, Hex, DCM) i AA (H_2O) ekstrakti, kao i odgovarajući NMAU standardi su otopljeni u 500 µL otapala i zatim filtrirani kroz 0,22 µm filtere (Whatman; GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Otopina za injektiranje se sastojala od 7,15 mM pufera amonijevog formata pH 3 (napravljenog od amonijevog formata i mravlje kiseline, Fluka) i 285 µM etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA; 99,995 %).

LC-MS/MS analiza provedena je pomoću trostrukog kvadrupola LC/MS-MS (Agilent Technologies, SAD) u kombinaciji sa sustavom UltiMate 3000 UHPLC (Thermo Scientific, SAD). Korištene su HPLC kolona Atlantis T3 (3,0 x 150 mm^2, veličina čestica 3 µm; Waters) i zaštitna kolona Atlantis T3 (3,0 x 10 mm^2, veličina čestica 3 µm; Waters) s brzinom protoka od 0,3 mL/min. Smjesa tetrahidrofurana (THF, Chromasolv Plus, HPLC stupanj, 99,9 %, Fluka), MeOH (Chromasolv LC-MS stupanj, 99,9 %, Fluka) i vode (30/15/55, V/V/V, redom) korištena je kao mobilna faza. Injektirani volumen bio je 10 µL, a temperatura kolone 30 °C. Gradijentno ispiranje napravljeno je prema Frka i sur. (2016.).

3.3. Biotestovi

Za biološke testove, suhi ekstrakti sBB i AA ili praškasti modelni NMAU su otopljeni u dimetil sulfoksidu (DMSO, Kemika, Zagreb). Koncentracije ekstrakata čestica temelje se na masi čestica prikupljenih na dijelovima filtera koji su ekstrahirani. Iako 2,4DNP nije kvantificiran u ekstraktima, uključen je u daljnja istraživanja jer je prema US EPA svrstan među prioritetne onečišćujuće tvari SAD-a, a otkriven je diljem Europe u podzemnim vodama (Loos i sur., 2010). Svaki od 12 NMAU korišten je u biotestovima u odgovarajućem rasponu koncentracija, od koncentracije koja nije pokazala toksični učinak do koncentracije s maksimalnim toksičnim učinkom koji su bili vidljivi u koncentracija-odgovor krivuljama. Odgovarajući raspon definiran je prema preliminarnim testovima sa širim rasponom koncentracija NMAU. Masa NMAU kvantificirana u sBB_{H2O} (25,8 mg/L) korištena je za pripremu modelne smjese od 10 identificiranih NMAU (Σ_{10}NMAU). Smjesa 5 NMAU (Σ_5NMAU) sastojala se od 5 spojeva koji su činili 96,5 % mase NMAU u koncentraciji od 24,9 mg/L. Za svaki biotest izvedena su dva do tri neovisna seta inkubacije u duplikatu ili triplikatu. Fluorescencija je izmjerena pomoću čitača mikroploča (Infinite M200, Tecan, Salzburg, Austrija). U testovima ispitivanja embriotoksičnosti ribe zebrice te utjecaja na biomasu i promjenu u sastavu lipida embrija testirano je pet strukturno različitih NMAU.

3.3.1. Interakcija s proteinskim prijenosnicima Oct1 i Oatp1d1 faze 0 staničnog detoksikacijskog mehanizma

Za proučavanje interakcija s fazom 0 staničnog detoksikacijskog mehanizma odredili smo potencijalne učinke inhibicije ekstrakata čestica, modelnih NMAU te njihovih smjesa na transportnu aktivnost dvaju različitih transmembranskih proteina ribe zebrice (*Danio rerio*), prijenosnika organskih kationa, Oct1 i polipeptidnog prijenosnika organskih aniona, Oatp1d1. Provedba testova sa navedenim prijenosnicima provedena je korištenjem stanica ljudskog embrionalnog bubrega (engl. *Human Embryonic Kidney*, HEK293) s prekomjernom ekspresijom Oct1, odnosno Oatp1d1 proteina. Određivanje inhibicije transportne aktivnosti Oct1 provedeno je na stabilnoj staničnoj liniji Flp-In293-drOct1 mjerenjem inhibicije unosa modelnog fluorescentnog supstrata (boje) 4-(4-(dimetilamino)stiril)-N-metilpiridinijeva jodida (ASP+), dok je inhibicija transportne aktivnosti Oatp1d1 provedena na staničnoj liniji Flp-In-293-drOatp1d1 mjerenjem inhibicije unosa modelnog fluorescentnog supstrata *Lucifer yellow*

(LY). Načelo testova inhibicije temeljilo se na zajedničkom izlaganju transficiranih stanica i stanica koje nisu transficirane proteinima (Mock stanice), koje su služile kao kontrola, s modelnim supstratom i ispitivanim spojevima. Reakcijska smjesa bez testiranih ekstrakata ili modelnih spojeva bila je negativna kontrola. Stanične linije su održavane u Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka) uz dodatak 10 % fetalnog goveđeg seruma (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS) (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka) u bočicama za uzgoj staničnih kultura, u inkubatoru na 37 °C te 5 % CO_2. Stanice su presađivane (pasažirane) dva puta tjedno, odnosno kada je pokrivenost površine bočice bila 95 – 100 %, na način da bi se medij iz bočice izlio, potom stanice isprale sa 10 mL sterilnog fosfatnog pufera (engl. *Phosphate Buffered Saline*, PBS) te zatim odvojile od podloge dodatkom 333 µL tripsina koji bi djelovao na stanicama 3 min. Tripsinizacija je zaustavljena dodatkom 5 mL medija DMEM-10 % FBS te je uvlačenjem i ispuštanjem medija iz pipete provedeno resuspendiranje nakon čega je dio sadržaja bočice izliven, a na preostali volumen dodan medij DMEM-10 % FBS da završni volumen u bočici iznosi 10 mL. Dan prije početka eksperimenta, nakon postupka pasažiranja, 200 µL stanica je prebačeno u sterilnu tubicu od 1,5 mL u koju je dodano još 800 µL medija DMEM-10 % FBS čime je postignuto razrjeđenje 1:5 iz kojeg su stanice izbrojane pomoću hemocitometra. Iz dobivenog broja izračunat je volumen stanica potreban za postizanje brojnosti stanica za nasađivanje u jažice mikroploča. Eksperimenti su provedeni u mikropločama s 96 jažica pri gustoći od $7x10^5$ ili $8x10^5$ stanica/mL, s konačnim volumenom od 125 µL po jažici. Koncentracije ekstrakata, modelnih spojeva i njihovih smjesa napravljene su prema rasponu koncentracija u Tablicama 1., 3., 4. i 5.

U testu ispitivanja inhibicije transportne aktivnosti Oatp1d1 prijenosnika medij DMEM-10 % FBS je uklonjen nakon što su stanice bile nasađene 24 h. Stanice su potom inkubirane sa 75 µL transportnog medija (145 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 0,5 mM $MgCl_2$, 5 mM D-glukoza i 5 mM HEPES) 10 min na 37 °C. Nakon inkubacije 25 µL ispitivanih spojeva (pet puta koncentriranijih u odnosu na željenu koncentraciju) dodano je u transportni medij. Nakon 40 s dodano je 25 µL modelnog fluorescentnog supstrata LY (pet puta veće koncentracije) i inkubirano 15 min na 37 °C. Finalna koncentracija LY supstrata iznosila je 50 µM. Nakon inkubacije, ispražnjen je sadržaj jažica te su stanice dva puta isprane sa 125 µL hladnog transportnog medija prije nego što su lizirane sa 125 µL 0,1 % natrijevog dodecil sulfata (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka) u trajanju od 25 min na 37 °C. Potom je 100 µL liziranih stanica preneseno u crne mikroploče s 96 jažica te je korištenjem čitača za mikroploče

izmjerena fluorescencija modelnog supstrata LY na valnim duljinama ekscitacije/emisije od 425/540 nm.

U testu ispitivanja inhibicije transportne aktivnosti Oct1 prijenosnika medij DMEM-10 % FBS je također uklonjen nakon što su stanice bile nasađene 24 h te su stanice inkubirane sa 75 µL transportnog medija 5 min na 37 °C. Nakon inkubacije, u jažice je dodano 25 µL ispitivanog spoja, a zatim 25 µL modelnog fluorescentnog supstrata ASP+. Dodane koncentracije spojeva i supstrata bile su pet puta koncentriranije od željenih. Pri određenim višim koncentracijama testiranih NMAU (naznačenih u Tablici 3.), vrijednost pasivne fluorescencije smanjila se u nultoj minuti, što ukazuje na moguću interakciju NMAU s ASP+ fluorescencijskim signalom. Ovo zapažanje je detaljno opisano u Prilogu 1. Posljedično, modelni NMAU su testirani pri nižim koncentracijskim rasponima i fluorescencija je izmjerena na 470/605 nm i 0,5 µM ASP+. Međutim, ekstrakti uzoraka čestica su izmjereni na 450/590 nm i 1 µM ASP+, jer nije primijećeno smanjenje pasivne fluorescencije u nultoj minuti.

U oba testa ispitivanja transportne aktivnosti proteinskih prijenosnika jažice sa Mock stanicama (slijepa kontrola) i stanicama koje su služile kao negativna kontrola (stanice Oatp1d1 ili Oct1 u mediju DMEM-10 % FBS) tretirane su prema opisanim protokolima uz razliku u dodatku transportnog medija koji je dodan u količini od 100 µL i na koje se nije dodavalo 25 µL testnog spoja. Fluorescencija Mock stanica oduzeta je od fluorescencije stanica transficiranih Oct1 i Oatp1d1 proteinima kako bi se dobila konačna fluorescencija.

3.3.2. Interakcija s fazom I staničnog detoksikacijskog mehanizma: EROD biotest

Za provođenje EROD biotesta korištene su PLHC-1 stanice koje su održavane u DMEM/F12 mediju (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka) uz dodatak 5 % FBS, u bočicama za uzgoj staničnih kultura u inkubatoru na 30°C. Pasažiranje i računanje volumena stanica potrebnog za postizanje brojnosti stanica za nasađivanje u jažice mikroploča se provodilo prema postupku opisanom pod 3.3.1. Eksperimenti su provedeni u mikropločama s 96 jažica pri gustoći stanica $5x10^5$ stanica/mL. Prvi i drugi dan su se eksperimenti provodili u sterilnom kabinetu (Heraeus, Njemačka). Prvi dan provedbe biotesta stanice su nasađene u 200 µL DMEM/F12- 5 % FBS i inkubirane 24 h na 30 ºC. Idući dan su u novim mikropločama u mediju DMEM/F12 pripremljena razrjeđenja ekstrakata ili otopine modelnih spojeva u odgovarajućem rasponu koncentracija, ali dvostruko uvećanom od onih koje želimo testirati,

negativna kontrola (medij DMEM/F12) i pozitivna kontrola 2,3,7,8 – tetradiklorodibenzodioksina (TCDD) koja mjeri učinak poznate tvari za koju očekujemo odgovor koji se kasnije može usporediti sa nepoznatim učinkom testiranih uzoraka. Koncentracije ekstrakata, modelnih spojeva i njihovih smjesa napravljene su prema izračunima u Tablicama 1., 6. i 7. Iz mikroploča sa stanicama nasađenima dan prije je 100 µL medija zamijenjeno sa 100 µL pripremljenih otopina prethodno opisanih. Pripremljene mikroploče su potom stavljene u inkubator na 30 ºC iduća 24 h. Nakon 24 h medij sa stanica je uklonjen, stanice su dva puta isprane s 200 µL PBS i u svaku jažicu je dodano 100 µL 2 µM otopine etoksi-rezorufina otopljenog u fosfatnom puferu. Nakon dodavanja, izmjerena je kinetika nastanka resorufina u trajanju od 10 min u ciklusima od minute na čitaču za mikroploče (Infinite M200, Tecan, Salzburg, Austrija) na valnoj duljini 535/590 nm pri 30 ºC. Mjerene ploče su zamrznute (-20 °C) te je u njima idući dan određena koncentracija proteina prema Bradfordovoj metodi. Za određivanje sadržaja proteina mikroploče s uzorcima su nakon vađenja sa -20 °C ostavljene da se temperiraju na sobnu temperaturu. Potom je u svaku jažicu dodano 100 µL otopine fluorescamina (Alfa Aesar, SAD) u acetonitrilu u koncentraciji 0,15 mg/mL. Nakon 5 min inkubacije izvršeno je mjerenje na valnim duljinama 390/465 nm. Proteini su kvantificirani fluorescaminskim testom (Lorenzen i Kennedy, 1993) korištenjem goveđeg serum albumina (engl. *bovine serum albumin*, BSA) kao standarda. Aktivnost enzima izražena je u pmol rezorufina/min/mg proteina.

3.3.3. Određivanje akutne toksičnosti MTT testom

Akutna toksičnost određena je MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolij bromid, 98 % (Alfa Aesar)) testom mjerenjem citotoksičnosti na ribljoj staničnoj liniji PLHC-1. Stanice su nasađene pri gustoći od $25x10^4$ stanica/mL u mikroploču s 96 jažica u mediju DMEM-F12 s 5 % FBS, s konačnim volumenom od 200 µL po jažici. Nakon inkubacije od 24 h na 30 °C 100 µL medija iz jažica je zamijenjeno sa 100 µL pripremljenih otopina ekstrakata ili modelnih spojeva u dvostruko većem koncentracijskom rasponu. Nakon 72 h inkubacije na 30 °C sadržaj iznad stanica je uklonjen i stanice su isprane sa 100 µL PBS. Zatim je PBS uklonjen te je na stanice dodano 100 µL 0,5 mg/mL MTT boje otopljene u DMEM-F12 te je mikroploča ostavljena u inkubatoru iduća 3 sata. Tijekom tog perioda u živim stanicama se žuti tetrazol reducira u ljubičaste kristale formazana. Sadržaj iz svih jažica je uklonjen te je u svaku dodano 100 µL izopropanola. Mikroploča je stavljena na 350 rpm u trajanju od 15 min na

tresilicu za mikroploče (Thermo Shaker, PST-60HL-4, Biosan, Latvija). Apsorbancija dobivene otopine mjerena je na 578 nm s referentnim filterom na 750 nm pomoću čitača mikroploča Tecan. Modelni citotoksični spoj ciklosporin A (CsA) je bio pozitivna kontrola, a kao negativna kontrola je služio sam medij. Koncentracije ekstrakata, modelnih spojeva i njihovih smjesa napravljene su prema izračunima u Tablicama 1., 8. i 9.

3.3.4. Određivanje kronične toksičnosti AlgaeTox testom

Kronična toksičnost otopina ekstrakata lebdećih čestica i modelnih NMAU spojeva ispitana je na jednostaničnoj slatkovodnoj zelenoj mikroalgi *Scenedesmus subspicatus* standardiziranom metodom ISO 8692:2004. Matična kultura mikroalgi uzgajana je u mediju za rast koji se sastoji od makronutrijenata (NH_4^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, K^+, Na^+, Cl^-, PO_4^{3-}), elemenata u tragovima (BO_3^{3-}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{3+}, $[MoO_4]^{2-}$), EDTA i HCO_3^- na 24±2 °C pod kontinuiranim svjetlom intenziteta 60 – 120 µmol/m^2 s. AlgaeTox test je proveden izlaganjem 100 µL inokuluma (10^4 stanica/mL), iz eksponencijalno rastućih stanica mikroalgi, u mikroploči s 96 jažica rasponu koncentracija od 100 µL ekstrakata čestica ili modelnih spojeva tijekom 96 h (Tablice 1., 10. i 11.). Kao pozitivna kontrola korišten je $K_2Cr_2O_7$, dok je negativna kontrola bio medij za rast mikroalgi. Gustoća mikroalgi određena je mjerenjem fluorescencije pigmenta klorofila *a* (Chl *a*) neposredno nakon dodavanja analita i na kraju perioda inkubacije. Mjerenja su napravljena na čitaču za mikroploče pri valnim duljinama ekscitacije/emisije 440/680 nm. Rezultati su izraženi kao postotak preživljavanja stanica u odnosu na testiranu koncentraciju i uspoređeni sa slijepim uzorkom.

3.3.5. Ispitivanje embriotoksičnosti NMAU na ribi zebrici (*Danio rerio*)

ABO linija divljeg tipa ribe zebrice (European Zebrafish Resource Center, Karlsruhe, Njemačka) uzgajana je u akvariju pri standardnim uvjetima, ciklus od 14 sati svjetla i 10 sati mraka u vodi temperature od 27 – 28 °C. Ribe su hranjene posebno formuliranom hranom za razvoj riba zebrica (Gemma Micro, Skretting, Norveška). Za dobivanje embrija, ribe stare 1-1,5 godinu izvađene su ujutro iz akvarija i prebačene u Petrijevu zdjelicu koja je sadržavala E3 medij (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM $CaCl_2$, 0,33 mM $MgSO_4$). Uzgajane su u inkubatoru na 28 °C pod istim ciklusom svjetla i mraka kao i odrasle ribe. Razvoj embrija

praćen je stereomikroskopom (Motic AE31E, Motic, Barcelona, Španjolska) te su im određivani stadiji razvoja prema prethodno opisanim metodama (Kimmel i sur., 1995).

Ispitivanje akutne toksičnosti odabranih modelnih NMAU (2,4DNP, 4NC, 3M5NC, 4NG, 4NS) na embrijima ribe zebrice (*Danio rerio*) (FET test) provedeno je prema modificiranom protokolu OECD (OECD, 2013) u rasponu koncentracija navedenih u Tablici 12. Zdravi i oplođeni embriji zebrice izlagani su od 6 h nakon oplodnje u mikroploča s 24 jažice. Izlaganje je provedeno s rasponom koncentracija (4,6 – 203,0 mg/L) modelnih NMAU razrijeđenih u 0,5 mL E3 medija, u inkubatoru na 28 °C. Svaka koncentracija je testirana u duplikatu i primijenjena na ukupno 20 embrija (10 po jažici). Embriji izloženi najvišoj korištenoj koncentraciji DMSO (<0,1 %) služili su kao negativne kontrole, sa stopom preživljavanja iznad 90 %. Subletalne (morfološke) abnormalnosti praćene su 24, 48 i 72 h nakon oplodnje (hpf) stereomikroskopom (Motic AE31E, Motic, Barcelona, Španjolska) pri povećanju od 10 – 50x.

3.4. Utjecaj subletalne koncentracije NMAU na sastav lipida embrija ribe zebrice

Zdravi i oplođeni embriji zebrice izlagani su od 6 h nakon oplodnje u mikroploča sa subletalnim koncentracijama pet modelnih NMAU: 9,2 mg/L 2,4DNP, 5,0 mg/L 4NS, 42,3 mg/L 4NG i 3M5NC i 38,8 mg/L 4NC tijekom razdoblja od 48 hpf. U jednoj jažici je spoju bilo izloženo 13 – 15 embrija, odnosno ukupno 26 – 30 pošto je svaka koncentracija testirana u duplikatu. Kontrole su bile dvije skupine embrija bez dodanih NMAU. Nakon završenog perioda izlaganja embriji su prebačeni u plastične epruvete od 2 mL i zamrznuti na -80 °C, liofilizirani (5,5 Pa i -48 °C), te izvagani (vaga XS205, Mettler Toledo, Njemačka). Ukupni lipidi ekstrahirani su iz embrija primjenom modificiranog postupka Miyaresa (Miyares i sur., 2014) i Bligha i Dyera (Bligh i Dyer, 1959). Prije samog postupka ekstrakcije svakom uzorku je kao interni standard dodan metilni ester palmitinske kiseline (16 µg) (Honeywell Fluka, SAD). U svaki uzorak je dodano 550 µL smjese vode : MeOH (1:1), uzorci su zatim vorteksirani 30 s te prebačeni u veće epruvete gdje su homogenizirani uređajem Ultra-turrax T25 (IKA, Njemačka). Nakon usitnjavanja homogenati su prebačeni ponovno u plastične epruvete od 2 mL te je u svaku dodano 750 µL kloroform : MeOH (1:2) i zatim 250 µL kloroforma. Nakon svakog dodatka uzorci su vorteksirani 30 s. Uslijedila je inkubacija na 25 °C 10 min (Thermomixer 5436, Eppendorf, Njemačka) i centrifugiranje na 3000 g 5 min (Universal 32 R, Hettich, Njemačka). Organska faza koja je sadržavala lipide je odvojena i odmah uparena pod

strujom dušika. Ekstrahirani lipidi pohranjeni su na -20 °C. Prije analize uzorci su otopljeni u 1 mL DCM.

Nakon što su uzorci (2 µL) spotirani na kromarode (Chromarods SIII) korištenjem mikrodispenzora, klase lipida su odvojene kroz pet koraka eluiranja u otapalima rastućeg polariteta prema protokolu opisanom u Gašparović i sur. (2017) i Gašparović i sur. (2015) i analizirane metodom tankoslojne kromatografije - plameno ionizacijskom detekcijom (engl. *Thin layer chromatography – flame ionization detection*, TLC-FID) na instrumentu Iatroscan MK-VI (Iatron, Japan). Instrument je radio pri protoku zraka od 2000 mL/min i brzini protoka vodika od 160 mL/min. Uzorci su analizirani u duplikatima. Identificirano je trinaest klasa lipida relevantnih za embrije zebrice (Fraher i sur., 2016; Hachicho i sur., 2015), koji čine ukupne lipide: slobodne masne kiseline (FFA), triacilgliceroli (TG), alkoholi (ALC), kolesterol (COH), 1,2-diacilgliceroli (1,2DG), 1,3-diacilgliceroli (1,3DG), esteri voska (WE), glikolipidi (GL, uključujući monogalaktozildiacilglicerole (MGDG), digalaktozildiacilglicerole (DGDG) i sulfokinovozildiacilglicerole (SQDG)) i fosfolipide (PL, uključujući fosfatidilglicerole (PG), fosfatidiletanolamine (PE) i fosfatidilkoline (PC)). Klase lipida kvantificirane su kalibracijom sa standardnom smjesom lipida i izražene kao % suhe težine embrija. Standardna devijacija je bila < 10 %.

3.5. Analiza i obrada podataka biotestova i kvantifikacije lipida

Podatci dobiveni LC-MS/MS analizom, FID analizom lipida i u biološkim testovima obrađeni su pomoću programa *Microsoft Office Professional Plus 2019*. Statistička analiza biotestova provedena je u programu *GraphPad Prism 8*, a svih ostalih u programu *Origin 2018*. Postoci inhibicije unosa ASP+ i LY iz dobivenih duplikata predstavljeni su kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (SE). Postotak inhibicije (I_i) unosa ASP+ i LY za svaku koncentraciju analita (i) izračunat je prema jednadžbi (1):

$$I_i = ((F_i - F_m) / (F_c - F_m)) \times 100 \quad (1)$$

Srednja vrijednost fluorescencije je F_i, srednja vrijednost fluorescencije za Mock stanice je F_m, a srednja vrijednost fluorescencije za kontrolu je F_c. Koncentracija IC_{50} je određena pomoću sigmoidalne krivulje koncentracija-odgovor s četiri parametra (2):

$$y = b + (a - b) / (1 + 10^{((\log IC50 - x)\, h)}) \quad (2)$$

Simbol *y* predstavlja odgovor, *b* predstavlja minimum odgovora, *a* predstavlja maksimum odgovora, *h* je nagib krivulje, IC_{50} je pola maksimalne inhibicijske koncentracije, a *x* je koncentracija testiranog analita (ekstrakti čestica ili modelni NMAU). Rezultati EROD testa izraženi su kao EC_{50} vrijednosti. Testovi MTT i AlgaeTox također su izvedeni u duplikatima ili triplikatima, a rezultati su izraženi vrijednošću IC_{50}, koja u ovim testovima odgovara koncentraciji ekstrakata lebdećih čestica ili modelnih NMAU koji su uzrokovali 50 % inhibiciju rasta ribljih stanica ili mikroalgi. Krivulje koncentracija-odgovor konstruirane su s 95 % intervalom pouzdanosti. Uz IC_{50}, u programu *GraphPad Prism 8* izračunate su i odgovarajuće IC_{10} vrijednosti za interakciju s membranskim prijenosnicima faze 0, te MTT i AlgaeTox biotestove.

Statistička usporedba srednjih vrijednosti suhe mase i koncentracije svake klase lipida dobivenih u embrijima tretiranim NMAU u odnosu na netretirane embrije, odnosno kontrolu, nakon 48 hpf razdoblja učinjena je primjenom Studentovog *t*-testa i one-way ANOVA testom. Razlika je smatrana statistički značajnom ako je $p < 0,05$.

3.6. Inkubacijski eksperiment sa stanicama mikroalgi

Inkubacijski eksperiment je proveden izlaganjem monokulture mikroalgi *Dunaliella tertiolecta* vodenom ekstraktu sBB i smjesama modelnih NMAU različitih koncentracija. Sakupljanje i pohrana sBB uzoraka opisana je u odjeljku 3.1. U uzorcima sBB kvantificirani su NMAU, anioni i kationi, metali u tragovima, PAH, otopljeni organski ugljik (engl. *dissolved organic carbon*, DOC) i površinski aktivne tvari (PAT). Njihov popis i koncentracije dodane ekstraktom u inkubacijske tikvice prikazane su u Tablici 13. i Prilogu 3. Postupak kvantifikacije NMAU opisan je pod 3.2. Anioni i kationi su određeni ionskom kromatografijom s detektorom električne vodljivosti na dvokanalnom instrumentu Dionex ICS-5000 (Thermo Fisher Scientific, SAD). Postupak je opisan u Milinković i sur. (2022). Metali u tragovima su analizirani masenom spektrometrijom induktivno spregnute plazme (ICP-MS 7500cx, Agilent Technologies, Njemačka), a postupak je detaljno opisan u Penezić i sur. (2021). Kvantifikacija PAH je opisana u Prilogu 2. dok je određivanje DOC i PAT opisano pod 3.6.1.3., odnosno 3.6.1.8. Za pripremu smjesa odabrani su modelni NMAU koji su bili najzastupljeniji u vodenom ekstraktu sBB. Svo posuđe i pribor korišteni za vrijeme eksperimenta su prethodno sterilizirani, a GF/F filteri (Whatman, UK), veličine pora 0,7 µm, žareni na 450 °C 4 h kako bi se uklonile organske nečistoće. Eksperiment je proveden u laboratorijskoj komori za uzgoj (Inkolab,

Hrvatska) pri temperaturi od 18 °C i svjetlu 74 µmol fotona/m^2 s (~ 4500 lx; 12 h dan/12 h noć). Morska voda korištena za pripremu f/2 medija uzorkovana je na dubini od 30 m kod otoka Visa u zaljevu Stončica nakon čega je barem tri mjeseca prije provedbe eksperimenta bila pohranjena u mraku na 4 °C. Zatim je voda profiltrirana kroz GF/F filtere (0,7 µm) te sterilizirana gama zračenjem.

Za provedbu eksperimenta korišteno je 13 Erlenmayer tikvica zapremnine 2 L u koje je dan prije inokulacije stanica uliveno 1,7 L sterilne morske vode. Tako pripremljena voda se temperirala na 18 °C u komori za uzgoj do idućeg dana. Sve radnje koje su uključivale manipulaciju sa tikvicama za eksperiment odvijale su se u sterilnom kabinetu (Heraeus, Njemačka). Idući dan su u tikvice dodani nutrijenti (osim Na_2SiO_3 x $9H_2O$) prema protokolu za pripremu f/2 medija (Guillard, 1975; Guillard i Ryther, 1962), te stanice mikroalgi čija je gustoća na početku eksperimenta iznosila $1x10^7$ stanica/L. Iz 13. tikvice su uzorkovani uzorci kako bi se znalo početno stanje svih parametara (navedenih pod 3.6.1.). Preostalih 12 tikvica je stavljeno u komoru za uzgoj i ostavljeno dok stanice nisu dosegle početnu eksponencijalnu fazu rasta. Aluminijska folija je stavljena na otvor svake tikvice kako bi se spriječila kontaminacija, ali nije bila u potpunosti pričvršćena za tikvicu kako bi se omogućila dostupnost ugljikovog dioksida stanicama mikroalgi. Tri dana nakon postavljanja eksperimenta (tj. nakon početnog rasta stanica) u tikvice su dodani sljedeći analiti:

I) vodeni ekstrakt uzoraka atmosferskih lebdećih čestica porijeklom iz izgaranja biomase kojim su u tikvice dodani 4NC, 3M4NC, 3M5NC, 4M5NC i 4NS u ukupnoj koncentraciji od 4,14 µg/L. Uzorak je pripremljen ekstrahiranjem sBB filtera u deioniziranoj Mili-Q vodi nakon čega je pohranjen na +4 °C tijekom 24 h. Nakon 24 h, odnosno na dan inokulacije i postavljanja eksperimenta, ekstrakt je profiltriran u sterilnom kabinetu kroz sterilne filtere veličine pora 0,2 µm (Whatman); uzorci označeni B
II) modelni NMAU spojevi (4NC, 4NS i 4M5NC kao model za sve tri izomere) dodani u tikvice prema omjeru koncentracija kao u vodenom ekstraktu sBB filtera te u ukupnoj koncentraciji od 4,14 µg/L; uzorci označeni N
III) modelni NMAU (4NC, 3M4NC, 3M5NC, 4M5NC i 4NS) dodani u tikvice u 1000x pojedinačno većoj koncentraciji u odnosu na II), odnosno u ukupnoj koncentraciji od 4140 µg/L; uzorci označeni NV

Završni volumen u pripremljenim tikvicama iznosio je 1,8 L. Inkubacije su rađene u triplikatima, a preostale tri tikvice su služile kao kontrola (uzorci označeni K). Uzorci su

uzimani iz inkubacijskih posuda prije samog dodatka navedenih otopina, odmah nakon dodatka te još tri puta tijekom eksponencijalne faze rasta stanica. Tijekom cijelog eksperimenta tikvice su miješane ručno dva puta dnevno te na magnetskoj mješalici 10 min prije svakog uzorkovanja. Tijekom eksperimenta su provedena četiri uzorkovanja. Uzorci su, prema potrebi za svaki pojedini parametar, analizirani odmah ili spremljeni na +4 °C odnosno na -20 °C.

3.6.1. Analiza uzoraka u inkubacijskom eksperimentu s mikroalgama

3.6.1.1. Brojnost stanica

Tijekom inkubacijskog eksperimenta brojnost stanica fitoplanktonske monokulture *Dunaliella tertiolecta* je određivana iz nefiltriranih uzoraka korištenjem mikroskopa Olympus BX51. Uzorci su odmah nakon uzorkovanja konzervirani dodatkom formaldehida i spremljeni u hladnjak na +4 °C. Za potrebe mikoskopiranja pipetirano je 350 mL uzorka u Fuchs-Rosenthaltovu komoricu za brojanje. Specifična brzina rasta stanica je izračunata prema formuli:

$$\mu = (\ln (Nt) - \ln (N0))/t \quad (3)$$

Nt - brojnost stanica zadnjeg proučavanog dana

N0 - brojnost stanica prvog proučavanog dana

t – broj dana

Iz specifičnih brzina rasta je izračunat postotak inhibicije rasta prema formuli:

$$\% I = (\mu_{kontrola} - \mu_B)/\mu_{kontrola}) * 100 \quad (4)$$

$\mu_{kontrola}$ – specifična brzina rasta kontrole

μ_B – specifična brzina rasta uzorka

Iz specifične brzine rasta stanica izračunat je parametar k koji pokazuje koliko se dioba stanica dogodilo po danu u određenom uzorku i to prema formuli:

$$k = \mu/\ln 2 \quad (5)$$

μ– specifična brzina rasta uzorka

3.6.1.2. Maksimalna učinkovitost fotosustava II (Fv/Fm)

Parametri fotosinteze fitoplanktona, uključujući minimalni intenzitet fluorescencije (F_0), maksimalnu učinkovitost fotosustava II (F_v/F_m), relativnu stopu prijenosa elektrona (engl. *electron transfer rate*, ETR) i nefotokemijsko prigušivanje (engl. *nonphotochemical quenching*, NPQ) određeni su u nefiltriranim uzorcima i to neposredno nakon uzorkovanja. Uzorci su pipetirani u plastičnu kivetu volumena 3 mL i mjereni korištenjem Dual-Pam-100 fluorimetra (Walz, Njemačka). Mjerenje fluorescencije je provedeno metodom saturacijskog pulsa (Schreiber, 2004). Na početku svakog mjerenja, nakon što je uzorak bio 20 sekundi u mraku (prije osvjetljenja), izmjerena je fluorescencija prije (F_0–minimalna fluorescencija) i nakon (F_m–maksimalna fluorescencija) kratkotrajnog i intenzivnog svjetlosnog impulsa (saturacijskog pulsa). Iz dobivene minimalne i maksimalne fluorescencije izračunata je maksimalna učinkovitost fotosustava II (PSII), $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$. Nakon toga smo uzorke izložili aktiničnom svjetlu pri čemu se intenzitet svjetlosti postepeno povećavao u nekoliko koraka (4, 19, 56, 111, 207, 361, 573, 898 i 1390 PAR (μmol/m^2 s)), a svaki saturacijski puls je trajao 20 sekundi. Fluorescencije zabilježene prije (F) i nakon ($F_{m'}$) primjene pulsa korištene su za izračun efektivne učinkovitosti PSII, $Y(II) = 1 - (F/F_{m'})$. Za svaki puls su izračunate i vrijednosti za ETR i NPQ prema formulama (Baker, 2008; Genty i sur., 1989):

$$ETR = Y(II) \times PAR \quad (6)$$

$$NPQ = (F_m/F_{m'}) - 1 \quad (7)$$

3.6.1.3. Organski ugljik

U uzorcima je kvantificiran otopljeni organski ugljik (DOC) i čestični organski ugljik (engl. *particulate organic carbon*, POC). Određeni volumen uzorka (100, 80, 40, odnosno 20 mL prema danima uzorkovanja) je nakon uzimanja iz Erlenmayer tikvica filtriran kroz GF/F filtere veličine pora 0,7 μm prethodno žarenim na 450 °C/4 h (Whatman, UK) da se odvoji čestična od otopljene frakcije. Filteri za određivanje POC su pohranjeni u plastične kriotube na -50 °C do analize, a filtrati za DOC u staklene kivete. Filtrati su konzervirani dodatkom živina(II) klorida ($HgCl_2$) konačne koncentracije 10 mg/L i spremljeni u mrak pri sobnoj temperaturi. Oba parametra su određena metodom visokotemperaturne katalitičke oksidacije

(engl. *high temperature catalytic oxidation*, HTCO) i kvantificirana pomoću analizatora ukupnog organskog ugljika (Shimadzu, Japan). DOC je određen analizatorom TOC-V_{CPH} navedenom metodom u struji sintetskog zraka, odnosno kivete sa uzorcima za određivanje DOC stavljene su u ASI-V autosampler i zakiseljene sa 2 mol/L HCl radi uklanjanja anorganskog ugljika i njegovog prevođenja u CO_2, uz Pt/Si katalizator, koji se zatim u struji sintetskog zraka odvodi iz tekuće faze. Nadalje, tekući uzorak sagorijeva u oksidacijskoj komori, odnosno koloni, pri temperaturi od 680 °C pri čemu nastaje CO_2 koji se zatim određuje nedisperzivnom infracrvenom spektroskopijom (NDIR). Kalibracija TOC-V_{CPH} instrumenta provedena je s otopinom kalijevog hidrogenftalata ($C_8H_5KO_4$) u rasponu koncentracija od 0 do 5 mg/L. Koncentracija je izračunata kao prosjek 3 – 5 replika. Granica detekcije metode iznosila je 0,068 mg/L, a granica kvantifikacije 0,228 mg/L. POC je određen u modulu za krute uzorke SSM-5000A gore navedenom metodom u struji ekstra čistog kisika spaljivanjem na 900 °C pri čemu je korištena smjesa CoO i Pt/Si kao katalizator. Anorganski ugljik prethodno je uklonjen zakiseljavanjem 2 M HCl. Instrument je kalibriran uz pomoć glukoze u rasponu koji je odgovarao očekivanim koncentracijama čestičnog organskog ugljika. Granica detekcije metode iznosila je 3 μg org C, a granica kvantifikacije 10 μg org C. Metode određivanja DOC-a i POC-a akreditirane su prema normi HRN EN ISO/IEC 17025:2017.

3.6.1.4. Klorofil a

Za određivanje koncentracije Chl *a* uzorci su filtrirani (100 mL pa tri iduća dana uzorkovanja po 90 mL) kroz GF/F filtere (Whatman, UK, 47 mm) veličina pora 0,7 μm, prethodno žarenima na 450 °C tijekom 4 h. Filteri s uzorkom su potom pohranjeni na -20 °C do analize. Filteri su unutar mjesec dana nakon uzorkovanja ekstrahirani inkubacijom u trajanju od 1 h na 60 °C sa 10 mL 100 % etanola (Kemika, Hrvatska) u plastičnim kivetama za centrifugu prethodno omotanima aluminijskom folijom. Nakon inkubacije uzorci su brzo ohlađeni na ledu i pohranjeni 24 h na 4 °C. Nakon isteka navedena 24 h uzorci su centrifugirani na 4000 rpm/15 min (Rotofix 32A, Hettich, Njemačka) nakon čega je 3 mL supernatanta prebačeno u kvarcnu kivetu poprečnog presjeka od 1 cm te je za svaki uzorak izmjerena apsorbancija na 750 nm i 665 nm prije i nakon zakiseljavanja sa HCl (1M). Apsorbancija slijepe probe, 100 % etanola, je mjerena na isti način uz svaku seriju uzoraka. Mjerenja su provedena spektrofotometrijski, prema metodi HRN ISO 10260:1992, na UV-1280 spektrofotometru (Shimadzu, Japan). Koncentracija Chl *a* izračunata je pomoću formule:

$$\text{Chl } a \text{ (µg/L)} = 29{,}6 * (\text{A1} - \text{A2}) * (\text{Ve/V} * \text{d}) \quad (8)$$

A1 = (A_{665} – A_{B665}) – (A_{750} – A_{B750}) – apsorbancija očitana prije zakiseljavanja

A2 = (A_{K665} – A_{BK665}) – (AK_{750} – A_{BK750}) – apsorbancija očitana nakon zakiseljavanja

Ve = volumen ekstrakta (mL)

V = ukupni volumen filtriranog uzorka (L)

d = poprečni presjek spektrofotometrijske kivete (cm)

3.6.1.5. Proteini

Koncentracija čestičnih proteina (PPROT) u uzorcima je određena modificiranom metodom po Lowryu (Lowry i sur., 1951; Price, 1965). Uzorci su filtrirani (80, 70, 50, odnosno 20 mL prema danima uzorkovanja) kroz GF/F filtere (Whatman, 25 mm) promjera pora 0,7 µm, prethodno žarenima na 450 °C tijekom 4 h. Filteri su potom pohranjeni na -50 °C do analize. Zatim su filteri narezani i inkubirani u epicama sa 1 mL Lowry D reagensa na 55 °C (Corning Dry Bath heater 6876-SB, Corning, SAD) tijekom 2 h. Lowry D reagens je pripravljen prema proceduri opisanoj u Slocombe i sur. (2013). Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani na 15 000 rpm 20 min (Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Njemačka) nakon čega je supernatant prebačen u nove epice. Iz epica je 10 µL svakog uzorka ili standarda prebačeno u jažice mikroploče te je potom u njih dodano 190 µL Lowry D reagensa. Sadržaj mikroploče je zatim izmješan i inkubiran na sobnoj temperaturi 20 min nakon čega je u jažice dodano 20 µL reagensa pripravljenog miješanjem 2N Folin-Ciocalteu fenolnog regensa (Sigma Aldrich, Njemačka) i Mili-Q vode u omjeru 1:1 te ostavljeno 40 min u mraku na sobnoj temperaturi. Mjerenja su provedena korištenjem čitača za mikroploče (Infinite M Nano+, Tecan, Salzburg, Austrija) očitanjem apsorbancije na 600 nm. Uzroci i standardi su mjereni u triplikatu. Kalibracijske krivulje su rađene u svakoj seriji uzoraka sa BSA proteinom (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, Njemačka) iz koncentracije 5 mg/mL, u rasponu koncentracija 0,05 – 1,5 mg/mL. Koncentracija organskog ugljika u PPROT (prikazana dalje u rezultatima) izračunata je prema jednadžbi (Danovaro i sur., 2000):

$$[\text{PPROT}](\text{mgC/L}) = [\text{PPROT}](\text{mg/L}) \text{ x } 0.49 \quad (9)$$

Otopljeni proteinski materijal kvantificiran je elektrokemijskom metodom kronopotenciometrije pri konstantnoj pobudnoj struji (engl. *constant current chronopotentiometric stripping*, CPS). Metoda se temelji na detekciji „pika H“ na potencijalu

oko -1,85 V (prema Ag/AgCl elektrodi) (Strmečki i sur., 2010, 2014, 2024). Pik H se pojavljuje kao rezultat reakcije redukcije vodikovih iona katalizirane adsorbiranim proteinskim materijalom na elektrodu (Strmečki i Pereža, 2021). Ukupna koncentracija proteinskog materijala u uzorku se određuje metodom standardnog dodatka, a izražava se u ekvivalentima modelnog proteina BSA.

3.6.1.6. Ugljikohidrati

U uzorcima su određene koncentracije ukupnih otopljenih ugljikohidrata (engl. *dissolved total carbohydrates*, DTCHO) i ukupnih čestičnih ugljikohidrata (engl. *particulate total carbohydrate*, PTCHO). Određeni volumen uzorka (100, 80, 40 odnosno 20 mL prema danima uzorkovanja) se nakon uzimanja iz Erlenmayer tikvica filtrirao kroz GF/F filtere (Whatman, 25 mm) veličina pora 0,7 µm prethodno žarenim na 450 °C/4 h da se odvoji čestična od otopljene frakcije. Filteri za određivanje PTCHO su pohranjeni u plastične kriotube na -50 °C do analize, a filtrati za DTCHO u staklene kivete. Filtrati su konzervirani $HgCl_2$ konačne koncentracije 20 mg/L i spremljeni na +4 °C do analize. Prilikom određivanja DTCHO je 5 mL filtriranog uzorka, odnosno filter u slučaju određivanja PTCHO stavljeno u staklene kivete prethodno žarene na 450 °C tijekom 4 h. U kivete s filterima je dodano 5 mL Mili-Q vode. Uzorci za određivanje DTCHO i PTCHO su zatim hidrolizirani. U svaku kivetu je dodano 1 mL 30 % HCl konačne koncentracije 1,7 mol/L, a zatim su uzorci stavljeni u termostatirani blok na 100 °C tijekom 3,5 h. Nakon hlađenja hidrolizat je neutraliziran s NaOH (10 mol/L) dok nije postignuta pH vrijednost u rasponu od 10 do 12. Iz neutraliziranih hidrolizata uzeto je 1 mL alikvota za određivanje koncentracije DTCHO. Uzorci za određivanje PTCHO centrifugirani su 6 min pri 3800 rpm (Rotofix 32A; Hettich, Njemačka) te je navedenih 1 mL uzeto iz dobivenog supernatanta. U svaki alikvot je dodano 50 µL otopine kalijevog borhidrida (KBH_4, p.a., Merck, Njemačka) te su uzorci inkubirani 3,5 h na 18 °C. Nakon inkubacije, uzorci su zakiseljeni sa 60 µL HCl koncentracije 1 mol/L i ostavljeni u mraku na sobnoj temperaturi 10 min da bi izreagirao suvišak KBH_4. U uzorke je dodano 100 µL perjodne kiseline (HIO_4, p.a., Merck, Njemačka), nakon 10 min 200 µL otopine natrijevog arsenita ($NaAsO_2$, p.a., Merck, Njemačka), nakon 10 min 200 µL 2 mol/L HCl, te zatim 200 µL svježe pripravljene otopine 3-metil-2-benzotiazolinon hidrazon hidroklorida (MBTH, 97 %, Merck, Njemačka). Kivete su potom grijane u trajanju od 3 min na 100 °C. U ohlađene uzorke je dodano 200 µL hladne otopine željezovog (III) klorida ($FeCl_3$, Merck, Njemačka), nakon čega su inkubirani 30

min na 18 °C. U završnom koraku, u uzorke je dodano 1 mL acetona (p.a., Merck, Njemačka) nakon čega je mjerena apsorbancija na 635 nm koristeći UV-1280 spektrofotometar. Kod visokih koncentracija ugljikohidrata bilo je potrebno prije mjerenja razrijediti uzorke sa acetonom. Uz svaku seriju uzoraka analizirana je i slijepa proba s MQ vodom. Kalibracijske krivulje su napravljene sa standardnim otopinama dekstrana (Dextran 4 for calibration, European Pharmacopoeia Reference Standard; Strasbourg, Francuska), u koncentracijskom rasponu 224,06 – 2240,63 µg C/L.

Dobivene koncentracije su izražene u ekvivalentima koncentracije ugljika. Granica detekcije ove metode, određena na temelju standardnog odstupanja slijepog uzroka, iznosila je 30 µg C/L. Koncentracija DTCHO je izračunata prema formuli:

$$\gamma\ (\mu g\ C/L) = (A-B)/m \qquad (10)$$

u kojoj je:

A – srednja vrijednost apsorbancije uzorka,

B – srednja vrijednost apsorbancije slijepog uzorka

m – nagib kalibracijskog pravca glukoze dekstrana izražen kao µg C/L

Koncentracija PTCHO je izračunata prema formuli:

$$\gamma\ (\mu g\ C/L) = ((A-B)/m) \times k / f \qquad (11)$$

u kojoj je:

A – srednja vrijednost apsorbancije uzorka

B – srednja vrijednost apsorbancije slijepog uzorka

m – nagib kalibracijskog pravca dekstrana izražen kao µg C/L

f – omjer volumena filtriranog uzorka morske vode i volumena hidrolizata

k – koeficijent razrjeđena prije mjerenja spektrofotometrom (za konc. uzorke)

3.6.1.7. Lipidi

Za analizu čestičnih lipida filtrirano je 100 mL uzoraka kroz filtere GF/F veličine pora 0,7 µm (Whatman, UK, 47 mm) prethodno žarenima na 450 °C/4 h koji su potom pohranjeni na -50 °C do analize. Lipidi su ekstrahirani prema modificiranoj metodi (Bligh i Dyer, 1959.).

U svaki uzorak je prije ekstrakcije kao interni standard dodan 2-nonadekanon (14, 20 odnosno 30 μg). Prvi korak ekstrakcije je dodatak tzv. monofazne smjese otapala DCM-MeOH-H_2O (1:2:0,8, v:v:v) na filtere, nakon čega su uzorci stavljeni u ultrazvučnu kupelj na 3 min te na +4 °C preko noći. Idući dan je ekstrakcija nastavljena u lijevku za odjeljivanje u kojem su uzorci ponovno isprani sa monofaznom smjesom te potom sa bifaznom smjesom DCM-0,73 % NaCl (1:1, v:v). Lipidi su sakupljeni u organskoj fazi u donjem dijelu lijevka. Potom je u lijevak dodan DCM te je ponovljeno sakupljanje organske faze. Nakon završene ekstrakcije uzorci su upareni do suhog rotacijskim uparivačem (Rotavapor® R-100, Buchi Labortechnik, Švicarska) u struji dušika i spremljeni na -20 °C. Neposredno prije određivanja lipida u uzorke je dodano 20-40 μl DCM (Supelco, SAD). Lipidne klase su analizirane prema protokolu opisanom u Gašparović i sur. (2015, 2017) TLC-FID metodom korištenjem instrumenta Iatroscan MK-VI (Iatron, Japan). Instrument je radio pri brzini protoka vodika od 160 ml/min i protoku zraka od 2000 ml/min. Svaki uzorak je analiziran u duplikatu. Postupkom su razdvojene sljedeće lipidne klase: ugljikovodici (HC), FFA, TG, ALC, steroli (ST), 1,2 DG, 1,3 DG, sterol esteri (SE), GL (uključujući MGDG, DGDG) i SQDG), monogliceroli (MG), pigmenti (PIG) i PL (uključujući PG, PE) i PC). Koncentracija ukupnih lipida (PLIP) je izračuna kao zbroj svih lipidnih klasa dok je ukupna koncentracija staničnih lipida (CLIP) izračunata kao suma lipidnih klasa: GL, PL, ST, TG, SE i PIG. Koncentracija organskog ugljika u lipidima (prikazana dalje u rezultatima) izračunata je prema jednadžbi (Marić i sur., 2013):

$$[\text{PLIP (ili CLIP)}]\ (\text{mg C/L}) = [\text{PLIP (ili CLIP)}]\ (\text{mg/L}) \times 0{,}7 \qquad (12)$$

3.6.1.8. Površinski aktivne tvari (PAT)

Koncentracija površinski aktivnih organskih tvari (PAT) (Frka i sur., 2009; Gašparović i sur., 2007; Myklestad, 1995; Vojvodić i Ćosović, 1996) je određena korištenjem elektrokemijske metode voltametrije izmjenične struje (engl. *alternating current voltammetry*, ACV) mjerenjima izvan faze (φ = 90°) (Ćosović i Vojvodić, 1998) pri uvjetima potencijala akumulacije E_a -0,4 V, vremena akumulacije t_a 15 s, frekvencije f 77 Hz, amplitude a 10 mV, i koraka potencijala E_s 40 mV. Mjerenja izvan faze u ovoj metodi omogućuju detekciju adsorpcijsko/desorpcijskih procesa na površini elektrode (Strmečki i Paleček, 2018). Mjerenja su provedena na μAutolab potenciostatu/galvanostatu tip III (Eco Chemie B.V., Utrecht, Nizozemska) spojenim s troelektrodnim sustavom 663VA Stand (Metrohm, Herisau, Švicarska) pomoću modula za živinu elektrodu, a kontrolirana su računalom pomoću programa

GPES 4.9. Viseća živina kap (engl. *static mercury drop electrode*, SMDE, površina 0.52 mm^2) je služila kao radna elektroda, Ag/AgCl (3 mol/L KCl) kao referentna elektroda, a štapić od staklastog grafita kao protuelektroda. Metodom se mjeri smanjenje kapacitivne struje odnosno smanjenje kapaciteta dvosloja uz elektrodu zbog adsorpcije PAT na granici faze SMDE-elektrolit. Uzorak je tijekom mjerenja miješan teflonskim mješačem podešen na 3000 rpm. Koncentracija PAT je određena u otopljenoj frakciji inkubacijskih uzoraka u ekvivalentima mg/L modelnog neionskog surfaktanta t-oktilfenoksipolietoksietanol (Triton-X-100, T-X-100, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka) preko kalibracijskog pravca u rasponu koncentracija od 0,0 do 0,869 mg/L T-X-100. Granica detekcije je bila 0,071 mg/L. T-X-100 se pokazao kao vrlo dobra modelna tvar za proučavanje PAT u okolišu zbog svoje stabilnosti, dostupnosti i sličnosti adsorpcije u rasponu potencijala u kojem se adsorbiraju i PAT prisutne u okolišnim uzorcima. Izračun normalizirane površinske aktivnosti (NPA) dobiven je dijeljenjem vrijednosti za PAT sa vrijednostima DOC prema formuli:

$$\text{NPA} = \text{PAT (eq. T-X-100)}/\text{DOC} \tag{13}$$

3.6.1.9. Detekcija NMAU u uzorcima laboratorijskog uzgoja

Elektrokemijska mjerenja detekcije NMAU su provedena korištenjem troelektrodnog sustava 663VA Stand spojenog na analizator μAutolab tipa III preko modula za kapajuću živinu elektrodu te su kontrolirana računalom preko *GPES 4.9*. programa. Statička kapajuća živina elektroda (engl. *static mercury dropping electrode*, SMDE, površine 0,52 mm^2) služila je kao radna elektroda, a štapić od staklastog ugljika (engl. *glassy carbon*, GC) kao pomoćna elektroda. Svi potencijali su izraženi u odnosu na Ag/AgCl (3M KCl) referentnu elektrodu. Otopine su u elektrokemijskoj ćeliji miješane pomoću rotirajućeg teflonskog štapića pri 3000 okretaja/min. Mogućnost detekcije NMAU u otopljenoj frakciji inkubacijskih uzoraka je istražena korištenjem osjetljive elektrokemijske metode diferencijalno pulsne voltametrije (engl. *differential pulse voltammetry*, DPV) pri uvjetima potencijala akumulacije E_a -0,5 V, vremena akumulacije t_a 1 s, frekvencije f 77 Hz, amplitude a 49,95 mV, i koraka potencijala E_s 10 mV. Proizvođači korištenih modelnih spojeva 4NC, 4M5NC i 4NS su navedeni u poglavlju 3.2.

3.6.1.10. Analiza podataka inkubacijskog eksperimenta

Podaci dobiveni analizama obrađeni su u *Microsoft Office Professional Plus 2019*. Prikazani su kao srednje vrijednosti triplikata ± SD ili ± SE. Statistička obrada podataka i izrada grafova je provedena u programima *GraphPad Prism 8 i Origin 2018*. U određivanju statistički značajnih razlika korišteni su One-way ANOVA i Tukey post-hoc test.

3.7. Interakcija NMAU i Cu(II) u prirodnim vodama

3.7.1. Elektrokemijska karakterizacija kompleksa Cu(II)-NC

Svi elektrokemijski eksperimenti su izvedeni korištenjem iste instrumentacije i elektroda navedenih u poglavlju 3.6.1.9. pH otopina je praćen pomoću staklene Ag/AgCl elektrode (Metrohm-Autolab) spojene na stolni pH metar (Hanna Instruments, Hrvatska) i prethodno kalibrirane puferskim standardima (pH 4,01 i 9,01; Kemika, Zagreb, Hrvatska). Elektroda za mjerenje pH je bila uronjena u mjernu otopinu kroz otvor na poklopcu elektrokemijske ćelije. U mjerenjima su korištene pravokutnovalna (engl. *square wave voltammetry*, SWV) i ciklička voltametrija (engl. *cyclic voltammetry*, CV). Obje su metode bitne za ispitivanje mehanizma reakcije na elektrodi, budući da time dobivamo uvid u redoks procese, kinetiku reakcije i reverzibilnost prijenosa elektrona na granici faza elektroda-elektrolit (Elgrishi i sur., 2018; Scholz, 2002). SWV se smatra jednom od najosjetljivijih elektroanalitičkih metoda. Kao tehnika pulsne voltametrije, ona povećava omjer faradejske i kapacitivne struje, čime se poboljšava omjer signala i šuma što je čini vrlo prikladnom za analizu redoks reakcija (Mirčeski i sur., 2007). Osjetljivost metode, u kombinaciji sa mogučnošću istraživanja složenih redoks reakcija, čini SWV neprocjenjivom metodom u proučavanju elektrokemijskih svojstava metalno-organskih kompleksa poput $[Cu(NC)_2]^{2-}$. Mjerni parametri za SWV, osim ako nije drugačije navedeno, bili su: potencijal akumulacije, E_a 0,0 V, vrijeme akumulacije, t_a 60 s, frekvencija, f 50 Hz, amplituda, E_{sw} 25,05 mV, a korak potencijala, E_s 4,05 mV. Brzina skeniranja u CV je bila 50 mV/s. Prije mjerenja u SWV i CV otopine su deaerirane propuhivanjem ekstra čistim dušikom (≥ 99,999 %, Messer, Hrvatska) tijekom 600 s. Tijekom provedbe mjerenja je dušik kontinuirano cirkulirao iznad otopina kako bi se održala inertna atmosfera. Promjene potencijala provedene su u katodnom smjeru, odnosno prema negativnim potencijalima. Kako bismo ispitali svojstva adsorpcije/desorpcije ispitivanih kompleksa na površini radne elektrode, dodatno smo upotrijebili ACV metodu u

načinu mjerenja izvan faze (engl. *out-of-phase)* (fazni kut, ϕ 90°) uz mjerne parametre *f* 77,35 Hz, amplituda, *a* 25,05 mV i korak potencijala, E_s 10,05 mV. Raspodjele kemijskih vrsti Cu(II) i 4NC u ovisnosti o pH vrijednosti u otopini su izračunate pomoću programa HySS (Alderighi i sur., 1999).

Proizvođači korištenih modelnih spojeva 4NC, 3M4NC, 3M5NC i 4M5NC i 4NS su navedeni u poglavlju 3.2. Spojevi katehol (1,2-dihidroksibenzen, CAT) i $CuCl_2$ x $2H_2O$ su nabavljeni od Sigma-Aldrich (Njemačka). Elektrolit u eksperimentu je bio 0,1 M KNO_3 puferiran s 0,05 M HEPES. Koncentrirana otopina 2 M KNO_3 pripremljena je otapanjem izvagane količine krutog KNO_3 (Kemika, Zagreb, Hrvatska), a štok otopina 1,28 M HEPES pripremljena je otapanjem praha HEPES (Sigma-Aldrich, Njemačka). Sve otopine, kao i naknadna razrjeđenja otopine elektrolita, liganda i Cu(II) pripremljene su korištenjem Milli-Q vode (18,2 MΩ cm) i pohranjene na 4°C. pH je podešen dodatkom razrijeđene (1:2) HNO_3 (s.p., Merck, Darmstadt, Njemačka) ili 10.7 M KOH (p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska).

3.7.2. Toksični učinak smjese Cu(II)/NC

Proveden je test kronične *in vivo* toksičnosti s jednostaničnom zelenom mikroalgom *Scenedesmus subspicatus* prema metodi ISO 8692:2004 opisanoj pod 3.3.4. Prilikom izvođenja testa inokulum ($1x10^4$ stanica/mL) eksponencijalno rastućih stanica je u mikroploči s 96 jažica bio izložen otopinama Cu(II), 4NC, 4M5NC ili smjesi Cu/4NC i Cu/4M5NC tijekom 96 h. Svi testovi su izvedeni u triplikatu, a rezultati su izraženi koncentracijom koja je uzrokovala 50 % inhibiciju rasta mikroalgi (IC_{50}) koja je određena prema sigmoidalnom četveroparametarskom modelu koncentracija-odgovor (Mihaljević i sur., 2017) pomoću softvera *GraphPad Prism 8*. Pomoću programa HySS su napravljeni dijagrami raspodjele kemijskih vrsti Cu(II) u ovisnosti o pH u otopini uzimajući u obzir glavne komponente medija, korištenog u AlgaeTox biotestovima, kao moguće Cu(II) ligande.

4. REZULTATI

4.1. Ekotoksikološki učinci ekstrakata atmosferskih lebdećih čestica

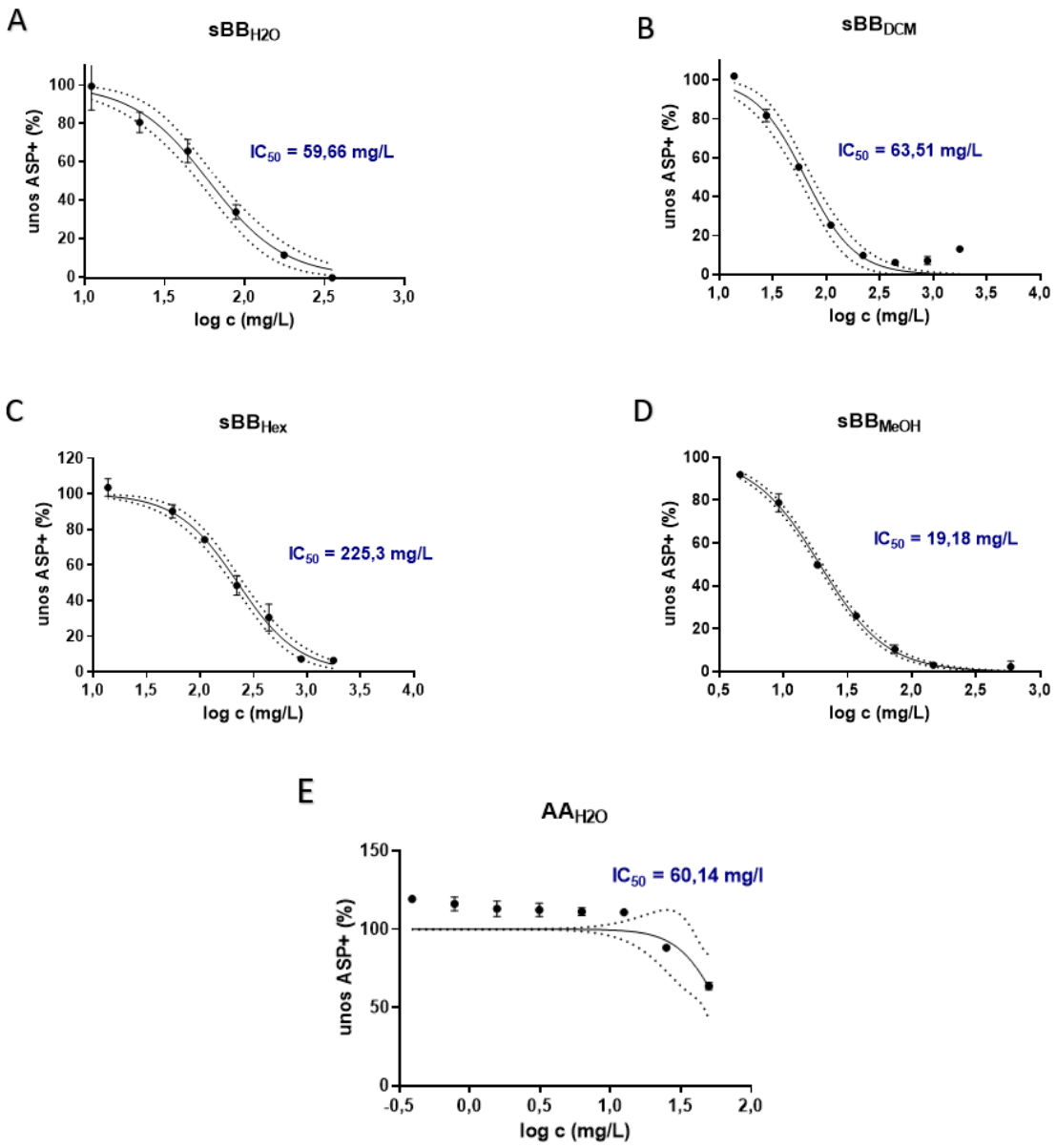
Ekotoksikološki učinci različitih ekstrakata atmosferskih lebdećih čestica (H_2O, MeOH, Hex, DCM) ispitani su u biotestovima s proteinskim prijenosnicima Oct1 i Oatp1d1 faze 0 staničnog detoksikacijskog mehanizma te s fazom I staničnog detoksikacijskog mehanizma (EROD test), njihova akutna toksičnost ispitana je MTT testom, a kronična toksičnost AlgaeTox testom. Raspon masenih koncentracija čestica u ekstraktima sBB i AA u pojedinom testu naveden je u Tablici 1.

Tablica 1. Raspon koncentracija (mg/L) čestica u ekstraktima sBB i AA primijenjenih u biotestovima s proteinskim prijenosnicima faze 0 staničnog detoksikacijskog mehanizma (ukupno osam koncentracija), te u MTT, AlgaeTox i EROD testovima (ukupno šest koncentracija). Koncentracije su izračunate kao masa čestica na sekcijama filtera razrijeđena u odgovarajućem volumenu DMSO.

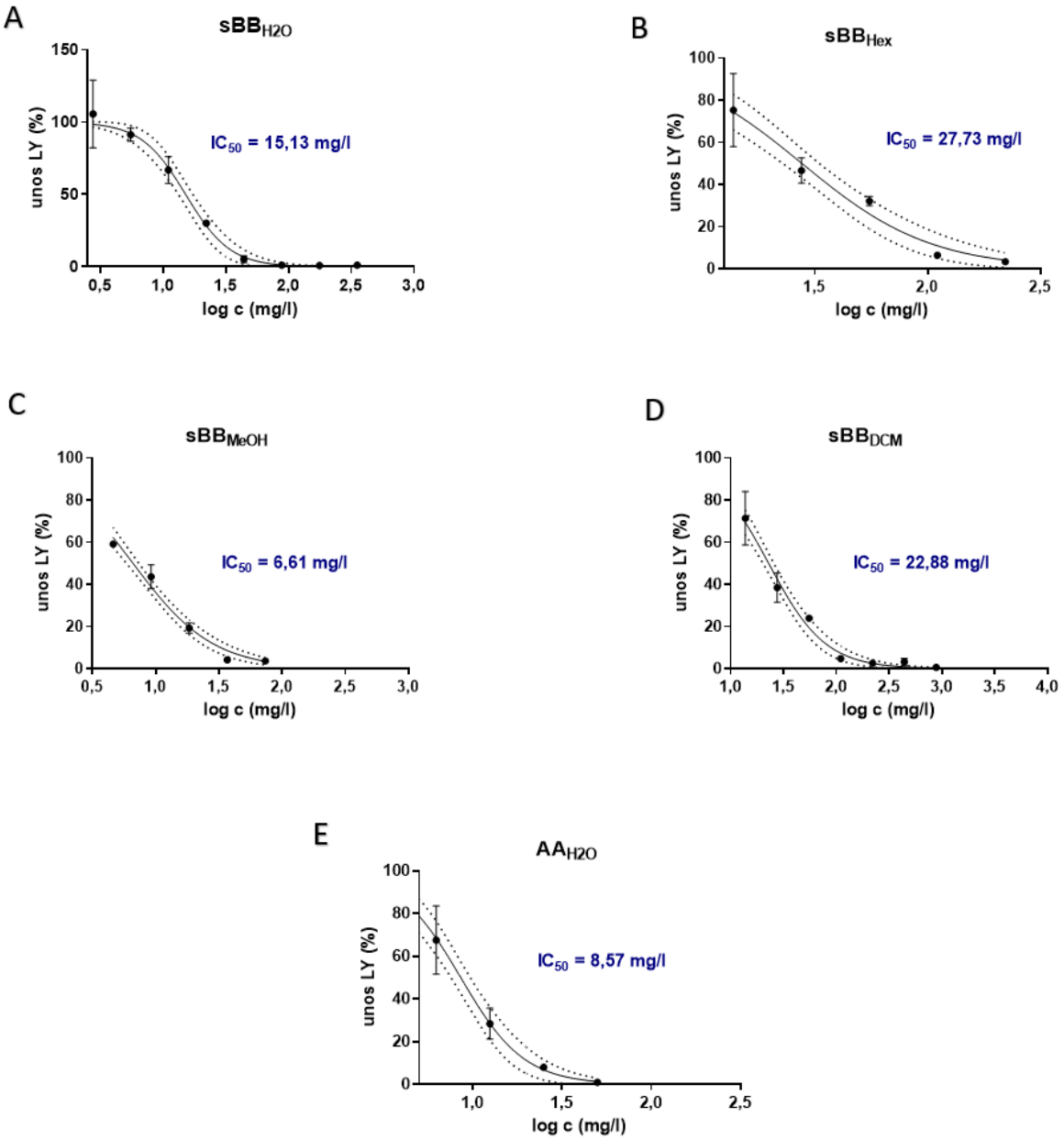
Biotest		sBB_{H2O}	sBB_{MeOH}	sBB_{DCM}	sBB_{Hex}	AA_{H2O}
		mg/L				
Proteinski prijenosnici faze 0 staničnog detoksikacije		2,8	4,6	13,8	13,8	0,4
		5,5	9,2	27,6	27,6	0,8
	EROD, MTT, AlgaeTox	11,0	18,4	55,2	55,2	1,6
		22,1	36,8	110,4	110,4	3,1
		44,1	73,6	220,8	220,8	6,3
		88,3	147,3	441,5	441,5	12,5
		176,5	294,5	883,0	883,0	25,0
		353,0	589,0	1766,0	1766,0	50,0

4.1.1. Interakcija sBB i AA s fazom 0 staničnog detoksikacijskog mehanizma

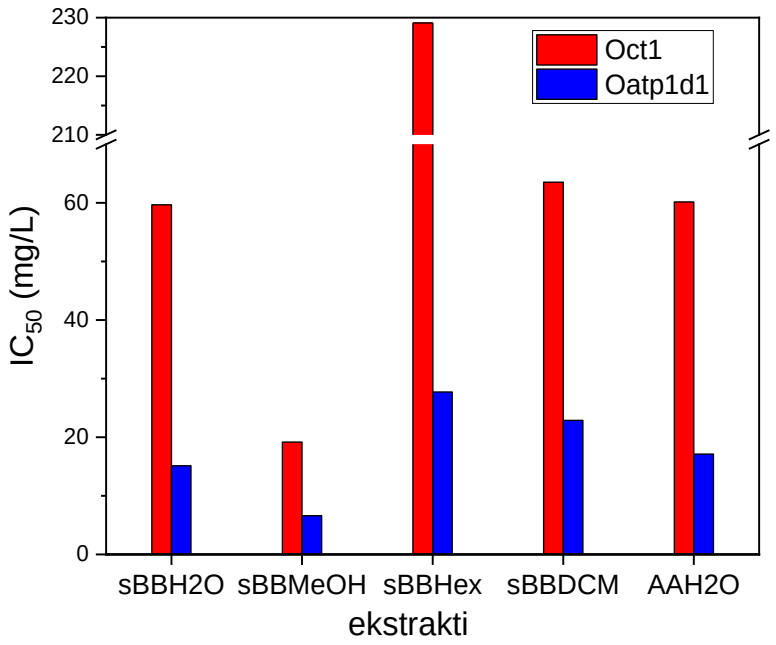
Koncentracija-odgovor krivulje dobivene ispitivanjem učinaka ekstrakata čestica uzoraka sBB i AA na proteinske prijenosnike Oct1 i Oatp1d1 faze 0 staničnog detoksikacijskog mehanizma prikazane su na Slikama 1. i 2. dok su dobivene vrijednosti IC_{50} prikazane na Slici 3.



Slika 1. *In vitro* određivanje inhibicije transportne aktivnosti Oct1 prijenosnika organskih kationa ribe zebrice na staničnoj liniji Flp-In-293-drOct1 mjerenjem inhibicije unosa modelnog supstrata ASP+ (%) nakon istovremene inkubacije s rasponom koncentracija sBB i AA ekstrakata: A) vodenog ekstrakta uzorka sBB, B) ekstrakta uzorka sBB u DCM, C) ekstrakta uzorka sBB u Hex, D) ekstrakta uzorka sBB u MeOH i E) vodenog ekstrakta uzorka AA.



Slika 2. *In vitro* određivanje inhibicije transportne aktivnosti Oatp1d1 prijenosnika organskih aniona ribe zebrice na staničnoj liniji Flp-In-293-drOatp1d1 mjerenjem inhibicije unosa modelnog supstrata LY (%) nakon istovremene inkubacije s rasponom koncentracija sBB i AA ekstrakata: A) vodenog ekstrakta uzorka sBB, B) ekstrakta uzorka sBB u Hex, C) ekstrakta uzorka sBB u MeOH, D) ekstrakta uzorka sBB u DCM i E) vodenog ekstrakta uzorka AA.

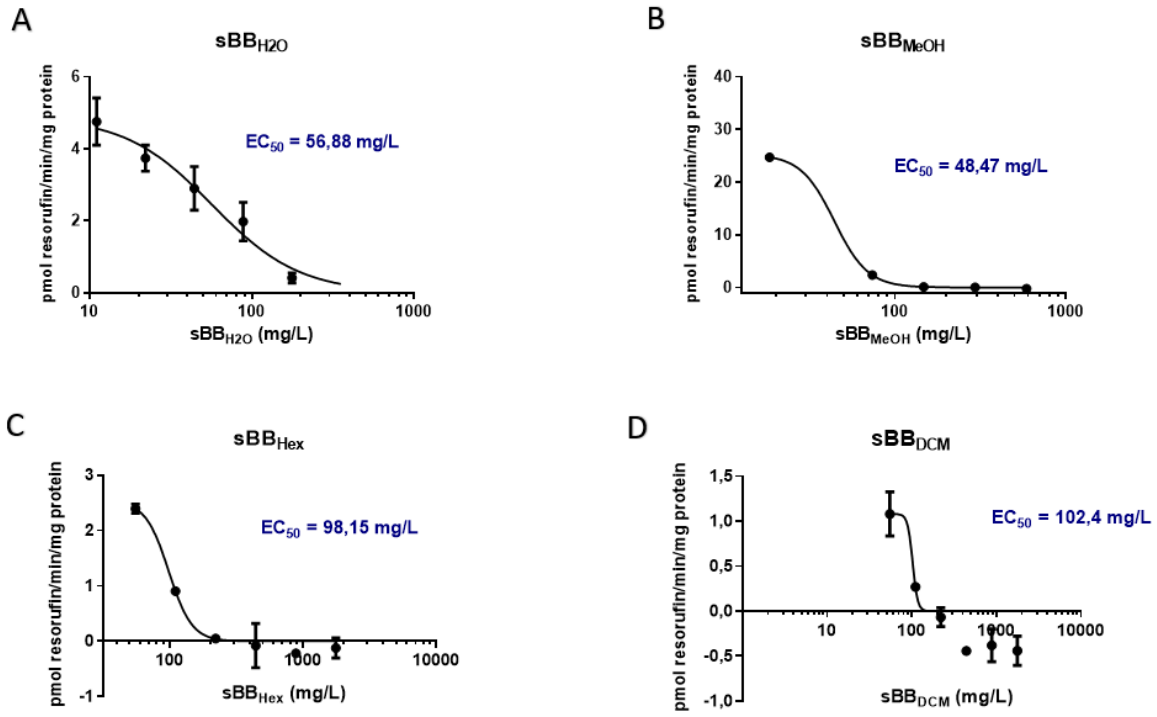


Slika 3. IC_{50} vrijednosti inhibicije unosa modelnog supstrata ASP+ i LY u biotestovima ispitivanja interakcija s Oct1 odnosno Oatp1d1 proteinskim prijenosnicima ribe zebrice nakon inkubacije s rasponom koncentracija sBB i AA ekstrakata.

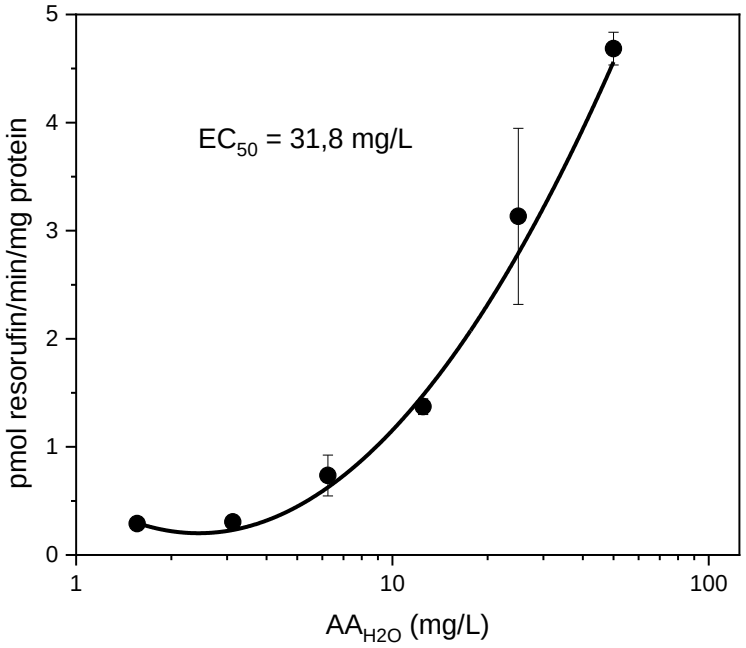
Za sBB ekstrakte, vrijednosti IC_{50} za Oct1 (19,2 – 225,3 mg/L) bile su općenito više nego za Oatp1d1 (6,6 – 27,7 mg/L). Najniže IC_{50} vrijednosti koje su inhibirale transportnu aktivnost anionskog prijenosnika Oatp1d1 utvrđene su za MeOH (6,6 mg/L) i vodeni ekstrakt (15,1 mg/L), a najviše za DCM i Hex ekstrakte (> 22 mg/L). Najniža koncentracija IC_{50} vrijednosti koja je smanjila aktivnost kationskog transportera Oct1 iznosila je 19,2 mg/L za MeOH ekstrakt, a najviša 225,3 mg/L za Hex ekstrakt. Takvi rezultati pokazuju da je polarnim otapalima ekstrahirana veća koncentracija spojeva koji međudjeluju s membranskim prijenosnicima. Kada se uspoređuju okolišno relevantni vodeni ekstrakti uzoraka sBB i AA, oba su ekstrakta pokazala veću moć inhibiranja transportne aktivnosti Oatp1d1 u odnosu na Oct1. Vodeni ekstrakt AA pokazao je 7 puta jaču interakciju s Oatp1d1 nego s Oct1. Ovi rezultati pokazuju da su, u korištenim eksperimentalnim uvjetima, negativno nabijene organske molekule prisutne u oba uzorka PM bile snažnije interaktivne molekule s membranskim prijenosnicima nego pozitivno nabijene molekule.

4.1.2. Interakcija sBB i AA s fazom I staničnog detoksikacijskog mehanizma

Za razliku od ispitanih interakcija svih ekstrakata sBB i AA s fazom 0 staničnog detoksikacijskog mehanizma, prilikom ispitivanja interakcija s fazom I jedino je vodeni ekstrakt AA inducirao CYP1A1 detoksikacijske enzime u EROD biotestu (Slike 4. i 5.). Određena EC_{50} koncentracija je iznosila 31,8 mg/L. Razlog za indukciju može biti različit izvor/kemijski sastav sBB i AA lebdećih čestica, pri čemu AA vjerojatno sadrži specifičnije hidrofobne/lipofilne kemijske spojeve koji su inducirali CYP1A1, kao što je kasnije diskutirano.



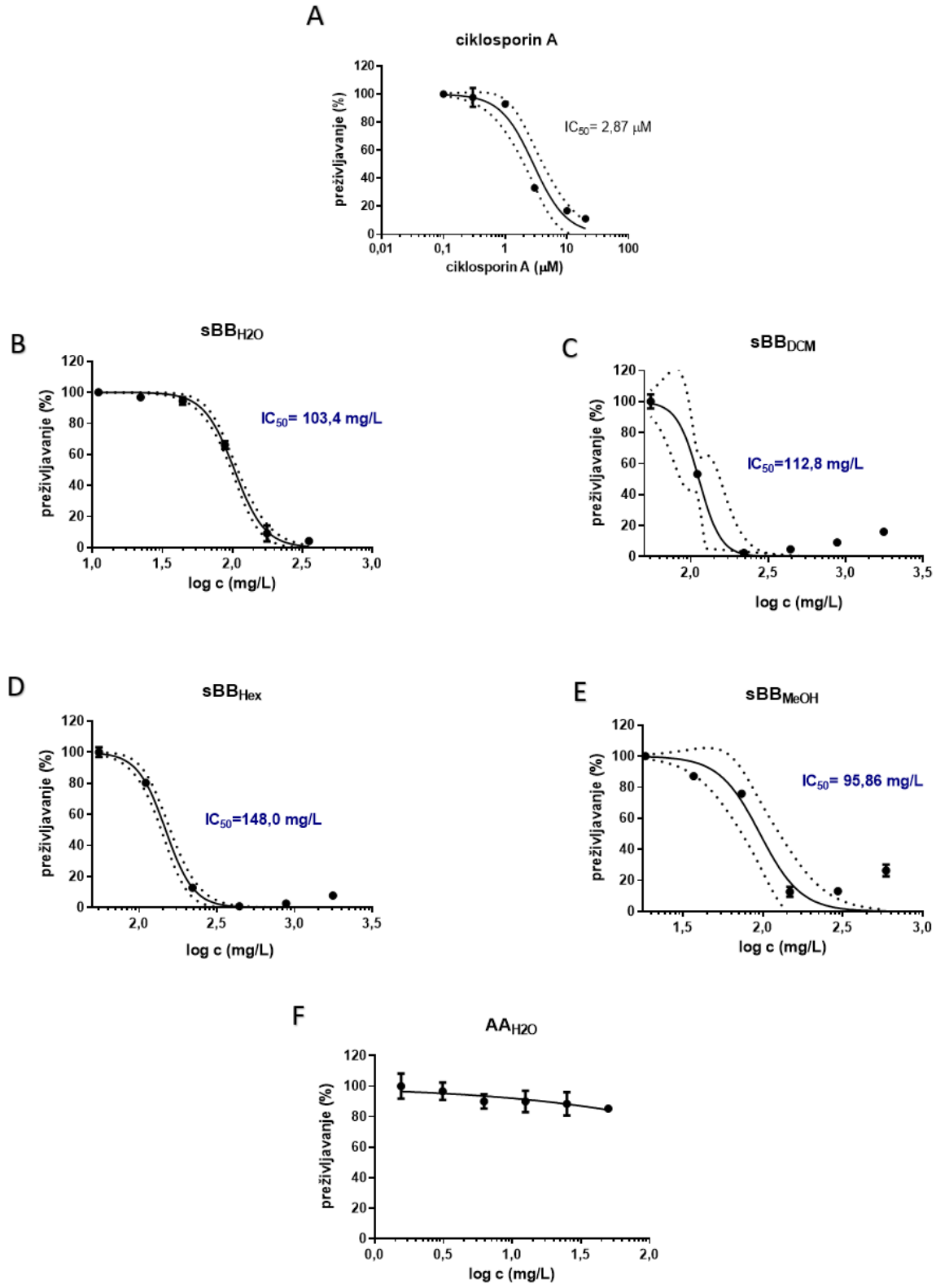
Slika 4. Određivanje indukcije detoksikacijskih enzima faze I (CYP1A1) EROD biotestom nakon izlaganja testiranim sBB ekstraktima: A) vodenom ekstraktu uzorka sBB, B) ekstraktu uzorka sBB u MeOH, C) ekstraktu uzorka sBB u Hex i D) ekstraktu uzorka sBB u DCM.



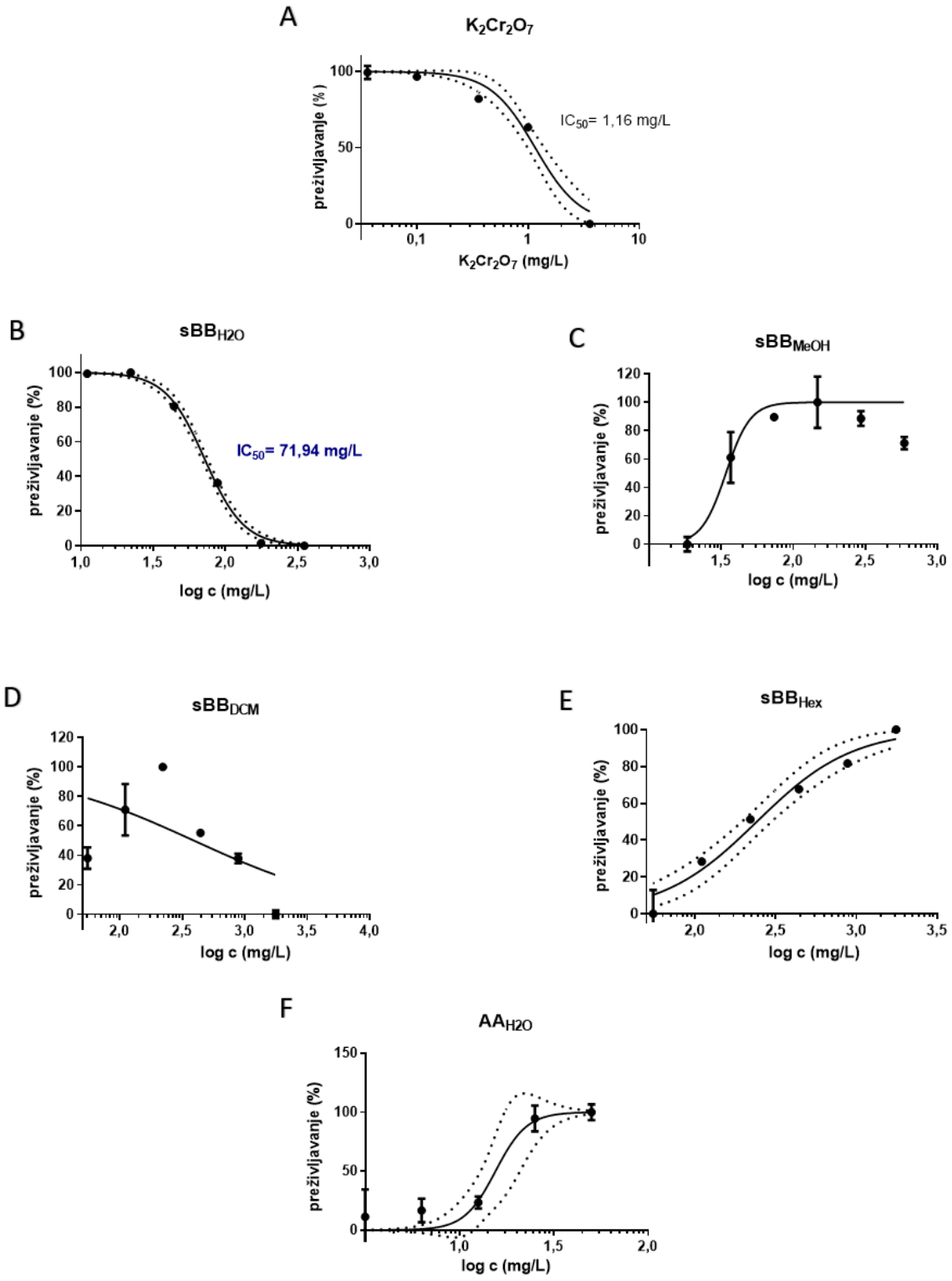
Slika 5. Indukcija enzima CYP1A1 faze I staničnog detoksikacijskog mehanizma EROD biotestom nakon izlaganja vodenom ekstraktu AA lebdećih čestica.

4.1.3. Akutni i kronični toksični učinci sBB i AA

U MTT testu, četiri ekstrakta sBB uzrokovala su smanjenje preživljavanja stanica (Slike 6. i 8.) što ukazuje na akutnu toksičnost testiranog raspona koncentracija. Vrijednosti IC_{50} bile su relativno visoke za sve sBB ekstrakte s najslabijim preživljavanjem stanica uočenim za MeOH (IC_{50} = 95,9 mg/L), a najvećim za Hex ekstrakte (IC_{50} = 148,0 mg/L) što je sugeriralo da su organski spojevi koji su uzrokovali akutnu citotoksičnost specifično ili u većoj mjeri ekstrahirani MeOH u odnosu na Hex. U ispitanom rasponu koncentracija uzorak AA_{H2O} nije imao značajan učinak na preživljavanje PLHC-1 stanica.

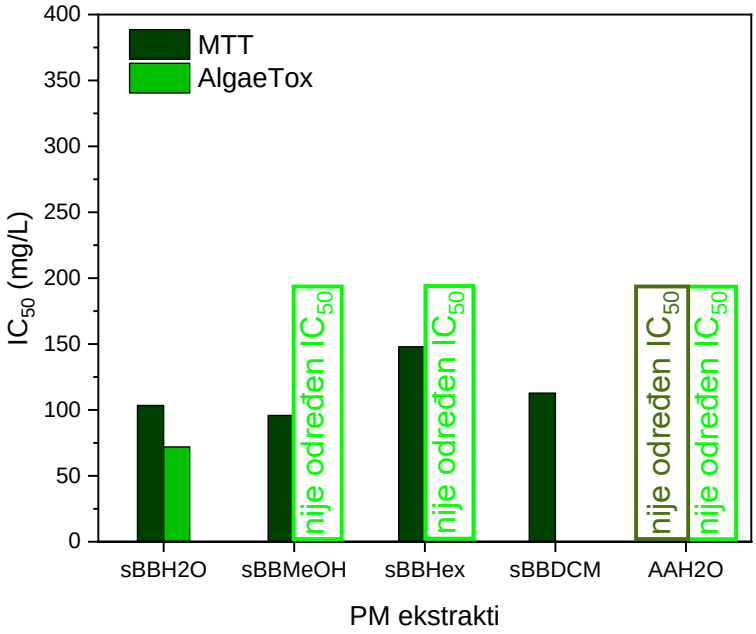


Slika 6. *In vitro* akutni citotoksični učinak nakon 72 h izlaganja ribljih stanica PLHC-1 u MTT testu: A) modelnom citotoksičnom spoju ciklosporin A, te sBB i AA ekstraktima: B) vodenom ekstraktu uzorka sBB, C) ekstraktu uzorka sBB u DCM, D) ekstraktu uzorka sBB u Hex, E) ekstraktu uzorka sBB u MeOH i F) vodenom ekstraktu uzorka AA.



Slika 7. *In vivo* kronični toksični učinak na jednostaničnu zelenu mikroalgu vrste *Scenedesmus subspicatus* nakon 96 h izlaganja u AlgaeTox testu: A) modelnom spoju $K_2Cr_2O_7$, te sBB i AA ekstraktima: B) vodenom ekstraktu uzorka sBB, C) ekstraktu uzorka sBB u MeOH, D) ekstraktu uzorka sBB u DCM, E) ekstraktu uzorka sBB u Hex i F) vodenom ekstraktu uzorka AA.

Prilikom ispitivanja kronične toksičnosti samo je uzorak sBB_{H2O} uzrokovao inhibiciju rasta stanica mikroalge *Scenedesmus subspicatus* (IC_{50} = 71,9 mg/L), dok su ekstrakti sBB_{MeOH} i sBB_{Hex} te AA_{H2O} pokazali stimulirajući učinak na rast mikroalgi (Slike 7. i 8.). Ekstrakt sBB_{DCM} je stimulirao rast mikroalgi do 220,7 mg/L čestica, pri višim koncentracijama je inhibirao rast mikroalgi, a pri 1766,0 mg/L nisu pronađene preživjele stanice (Slika 7.).

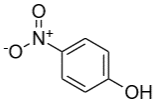
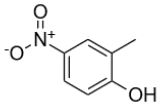
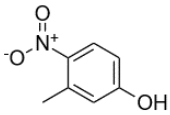
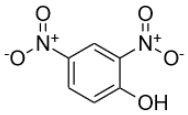
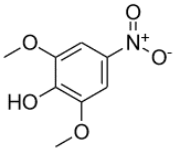
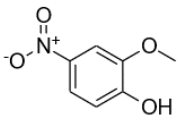
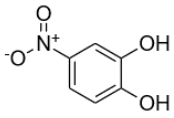


Slika 8. IC_{50} vrijednosti dobivene *in vitro* ispitivanjem akutne toksičnosti na PLHC-1 ribljim stanicama (MTT test) i *in vivo* kronične toksičnosti na slatkovodnoj zelenoj mikroalgi *Scenedesmus subspicatus* (AlgaeTox test) nakon izlaganja sBB i AA ekstraktima.

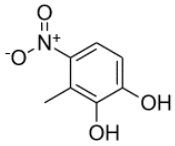
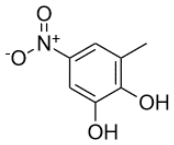
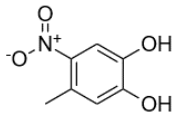
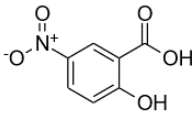
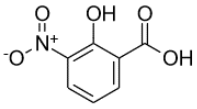
4.2. Kvantifikacija NMAU u sBB i AA ekstraktima

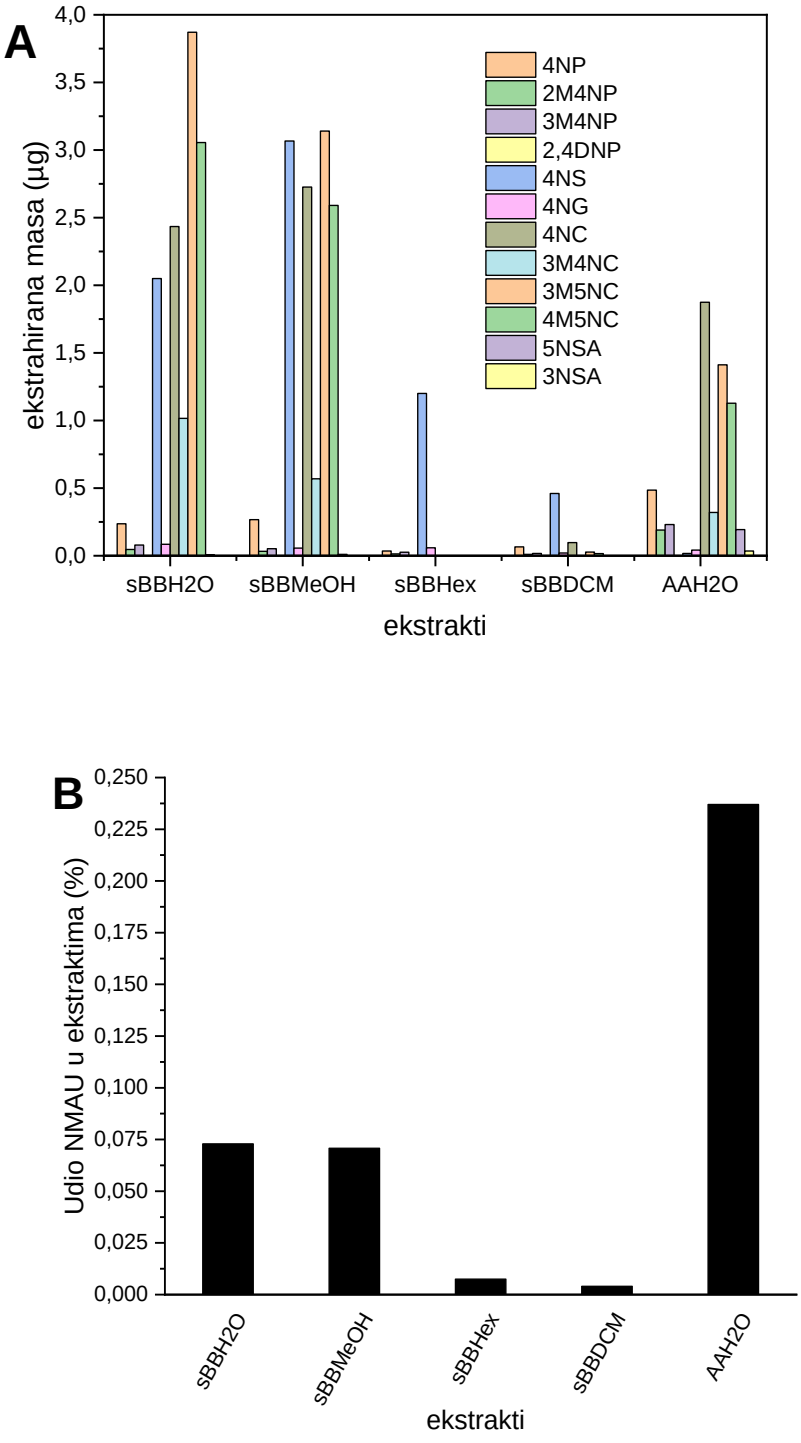
Budući da su vodeni i MeOH ekstrakti čestica pokazali najveći potencijal interakcije s proteinskim prijenosnicima Oct1 i Oatp1d1 faze 0 i da su sBB_{H2O} i sBB_{MeOH} pokazali i najveći akutni citotoksični učinak, dok je sBB_{H2O} dodatno pokazao kronični toksični učinak, navedeno je upućivalo da su ekstrahirane polarne hidrofilne molekule potencijalno toksični organski spojevi prisutni u lebdećim česticama. Jedna od mogućih skupina takvih spojeva su vodotopljivi NMAU, koji su dodatno kvantificirani u svakom od ekstrakata. Rezultati kvantitativne LC-MS/MS analize 12 NMAU (Tablica 2.) u četiri različita ekstrakta sBB i AA_{H2O} prikazani su na Slici 9.

Tablica 2. NMAU spojevi, njihove strukture, molarna masa (Mw), koeficijent raspodjele oktanol-voda (K_{ow}) (EPI SuiteTM v4.11, U. S. EPA (2023), topološka polarna površina (TPSA, izračunata pomoću Cactvs 3.4.8.18 (PubChem, 2021.05.07), National Library of Medicine) i konstante disocijacije (pK_i). nd - podaci nisu pronađeni.

NMAU	Struktura	Mw	log K_{ow}	TPSA /Å^2	pK_1	pK_2
4-nitrofenol (4NP)		139,11	1,9	66	7,1[38]	/
2-metil-4-nitrofenol (2M4NP)		153,14	2,5	66	nd	/
3-metil-4-nitrofenol (3M4NP)		153,14	2,5	66	7,3[39]	/
2,4-dinitrofenol (2,4DNP)		184,11	1,7	112	4,1[40]	/
4-nitrosiringol (4NS)		199,16	nd	84,5	nd	/
4-nitrogvajakol (4NG)		169,13	1,7	75,3	nd	/
4-nitrokatehol (4NC)		155,11	1,7	86,3	6,6[41]	10,8[41]

Tablica 2. Nastavak

NMAU	Struktura	Mw	log K_{ow}	TPSA /Å^2	pK_1	pK_2
3-metil-4-nitrokatehol (3M4NC)		169,13	nd	86,3	nd	nd
3-metil-5-nitrokatehol (3M5NC)		169,13	2,1	86,3	nd	nd
4-metil-5-nitrokatehol (4M5NC)		169,13	1,9	86,3	nd	nd
5-nitrosalicilna kiselina (5NSA)		183,12	2,6	103	8,9[41]	10,9[41]
3-nitrosalicilna kiselina(3NSA)		183,12	2,6	103	nd	nd



Slika 9. A) Koncentracije 12 NMAU u ekstraktima lebdećih čestica sBB i AA. B) Maseni udio Σ_{12}NMAU u različitim PM ekstraktima.

Ukupna masa deset kvantificiranih NMAU u sBB ekstraktima smanjivala se u nizu: 12,9 µg (H_2O), 12,5 µg (MeOH), 1,3 µg (Hex) i 0,7 µg (DCM), što ukazuje na njihovu vrlo dobru

topljivost u visoko polarnim otapalima poput vode i MeOH, te njihovu slabu topljivost u nepolarnom Hex i umjereno polarnom DCM. Štoviše, NC (4NC i tri MNC izomera (3M4NC, 3M5NC, 4M5NC) i NSA nisu kvantificirani u Hex ekstraktu. Najveći udio (96,5 %) ukupne mase NMAU u vodenom ekstraktu sBB činilo je pet spojeva: 3M5NC > 4M5NC > 4NC > 4NS > 3M4NC. Sukladno tome, najveći maseni udio NMAU u ukupnoj masi čestica sBB određen je u ekstraktima vode i MeOH, 0,073 % odnosno 0,071 % (Slika 9.B), što znači da je najveća masa NMAU po mg čestica ekstrahirana u vodi (0,73 µg/mg PM). Stoga su AA filteri ekstrahirani samo vodom. Maseni udio Σ_{12}NMAU u vodenom ekstraktu od 2,5 mg čestica AA bio je 0,24 %, s NC kao najzastupljenijim spojevima (79,8 %), zatim NP (16,3 %) i NSA (3,9 %) (Slika 9.A).

Koncentracija 2,4DNP je bila ispod granice kvantifikacije u svim ekstraktima, dok je 3NSA određen samo u AA ekstraktu. Takav rezultat nije iznenađujući, budući da su u usporedbi s koncentracijom drugih NMAU utvrđenih u uzorcima PM koncentracije 2,4DNP i 3NSA obično niske. Čak i zimi su koncentracije 2,4DNP i 3NSA < 0,14 ng/m^3 i < 0,37 ng/m^3 u PM_{10} odnosno < 0,077 ng/m^3 i < 0,033 ng/m^3 u PM_3 (Kitanovski i sur., 2021), dok je u $PM_{15,6}$ kvantificirano 0,01 ng/m^3 i 0,38 ng/m^3 2,4DNP, odnosno 3NSA (Frka i sur., 2022). Rezultati su pokazali da antropogene emisije i BB predstavljaju značajne izvore atmosferskih NMAU, što je u skladu s prethodnim izvješćima (Claeys i sur., 2012; Finewax i sur., 2018; Iinuma i sur., 2010; Jakovljević i sur., 2021; Salvador i sur., 2021; L. Wang i sur., 2018; Q. Zhang i sur., 2023). Ovo je nedvojbeno važno s obzirom na moguće atmosfersko taloženje NMAU u različitim vodenim sustavima gdje mogu biti dostupni vodenim organizmima.

4.3. Ekotoksikološki učinci modelnih NMAU i njihovih smjesa

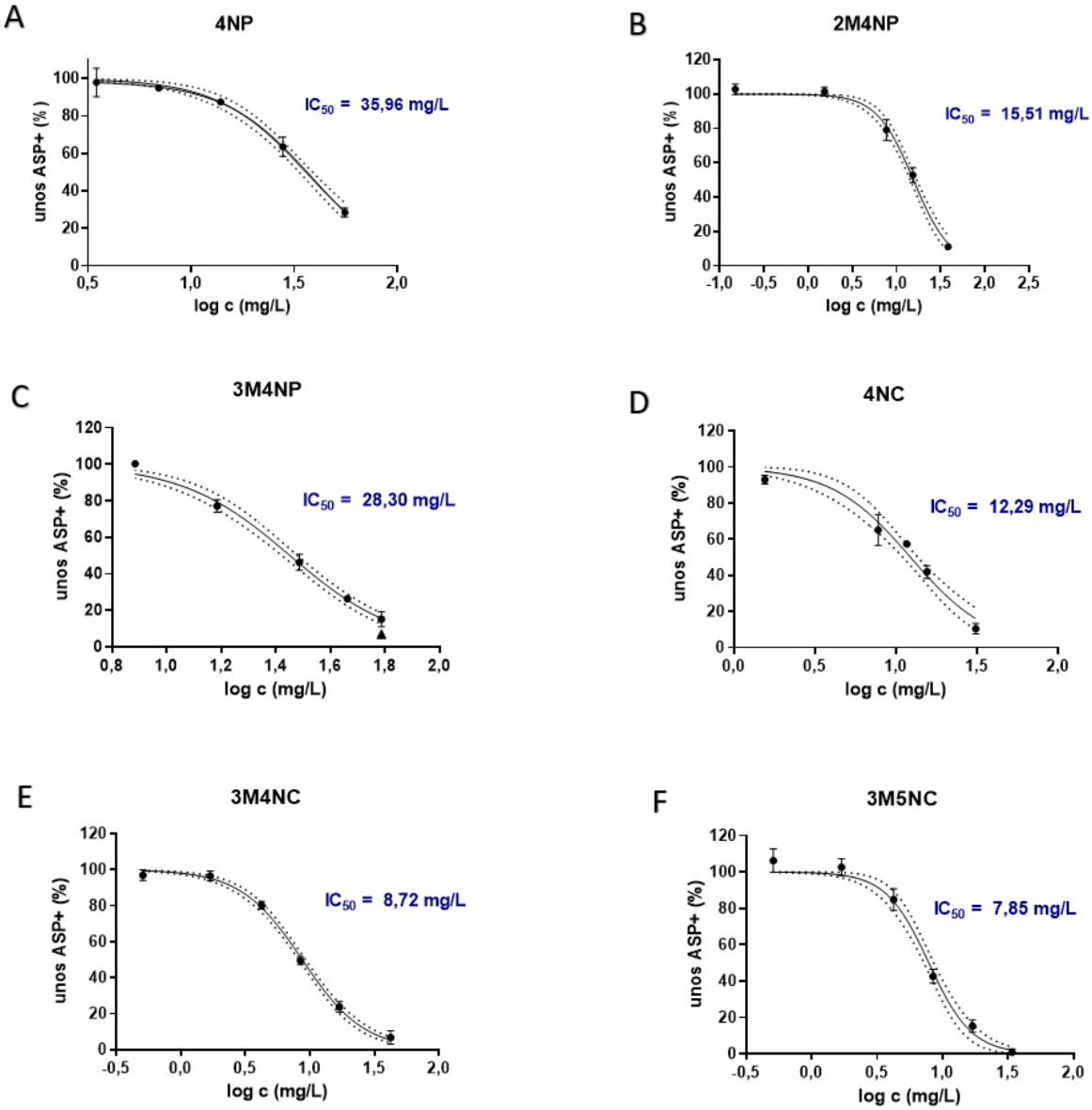
Pojedinačni NMAU i njihove smjese (Σ_{10}NMAU i Σ_5NMAU) testirani su na interakciju s membranskim proteinskim prijenosnicima Oct1 i Oatp1d1 faze 0 i enzimom (CYP1A1) faze I stanične detoksikacije, te na akutnu i kroničnu toksičnost.

4.3.1. Interakcija modelnih NMAU s fazom 0 staničnog detoksikacijskog mehanizma

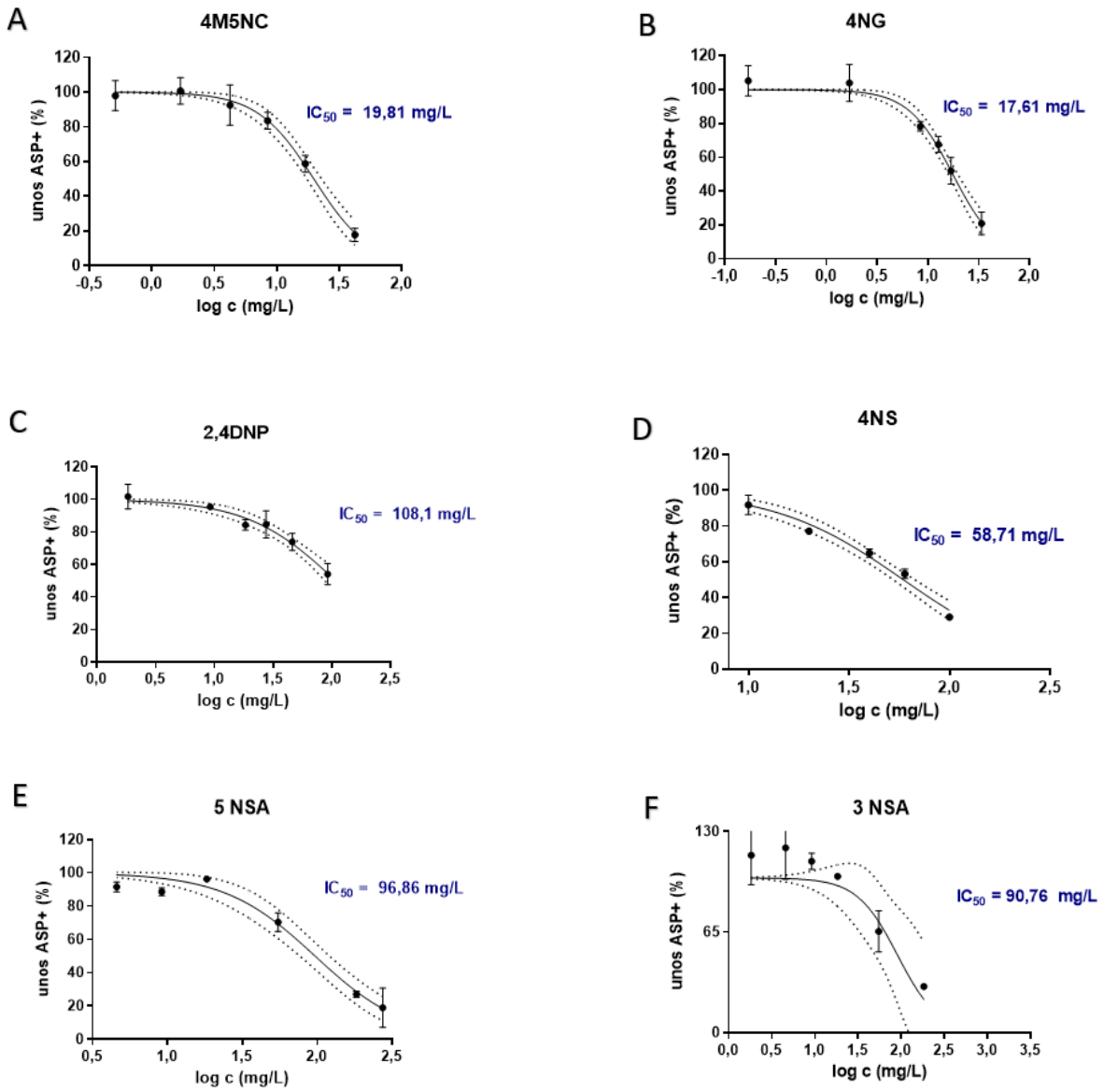
Za određivanje interakcije s membranskim proteinima Oct1 i Oatp1d1 faze 0 staničnog detoksikacijskog mehanizma korišten je raspon koncentracija svakog NMAU do 100 mg/L (Tablice 3. i 4.). Koncentracija-odgovor krivulje dobivene ispitivanjem inhibicije transportne aktivnosti fluorescentnih modelnih supstrata ASP+ i LY modelnim NMAU prikazane su na Slikama 10. i 11., odnosno 12. i 13. Vrijednosti IC_{50} i IC_{10} sažete su na Slici 15. Svi ispitani spojevi pokazali su utjecaj na transport supstrata ASP+. Slično je bilo i s unosom supstrata LY prijenosnikom Oatp1d1, gdje jedino 4NP nije pokazao interakciju s unosom LY. Najjaču interakciju s prijenosnicima kationa Oct1 pokazali su se NC (3M5NC > 3M4NC > 4NC), a najslabiju 3NSA, 5NSA i 2,4DNP (IC_{50} = 90,8 odnosno 96,9 i 108,1 mg/L) (Slike 10., 11. i 15.A). S druge strane, 5NSA i 2,4DNP bili su najjače interaktorske molekule anionskog transportera Oatp1d1 s IC_{50} od 2,6 mg/L odnosno 3,1 mg/L (Slike 13. i 15.B). Vrijednosti IC_{50} svih NMAU, osim 4NG, bile su niže za interakciju s Oatp1d1 nego za Oct1, što može biti posljedica njihovih fizikalno-kemijskih svojstava poput kiselosti (sposobnosti doniranja protona) i polarne površine. Smjese Σ_{10}NMAU i Σ_5NMAU (Tablica 5.) su također inhibirale transportnu aktivnost Oatp1d1 više nego aktivnost Oct1 (Slike 14., 15.A i 15.B), što ukazuje na značajan doprinos spojeva poput 4NS i MNC koji su bili najzastupljeniji u obje smjese.

Tablica 3. Raspon koncentracija modelnih NMAU pripremljen za *in vitro* ispitivanje inhibicije transportne aktivnosti prijenosnika organskih kationa Oct1 ribe zebrice. Sa * je označena koncentracija NMAU kod koje je uočeno smanjenje pasivne fluorescencije u nultoj minuti.

NMAU koncentracije (mg/L)										
4NP	**2M4NP**	**3M4NP**	**4NC**	**4NG**	**3NSA**	**5NSA**	**3M4NC, 4M5NC**	**3M5NC**	**2,4DNP**	**4NS**
1,4	0,2	3,8	0,2	0,2	1,8	4,6	0,5	0,5	1,8	2,0
3,5	0,5	7,7	1,6	1,7	4,6	9,2	1,7	1,7	9,2	10,0
7,0	1,5	15,3	7,8	8,5	9,2	18,3	4,2	4,2	18,4*	19,9
13,9	7,7*	30,6*	11,6*	12,7*	18,3	54,9*	8,5	8,5	27,6	39,8
27,8*	15,3	45,9	15,5	16,9	54,9	183,1	16,9*$^{(3M4NC)}$	16,9*	46,0	59,8
55,6	38,3	61,3	31,0	33,8	183,1	274,7	42,3*$^{(4M5NC)}$	33,8	92,1	99,6



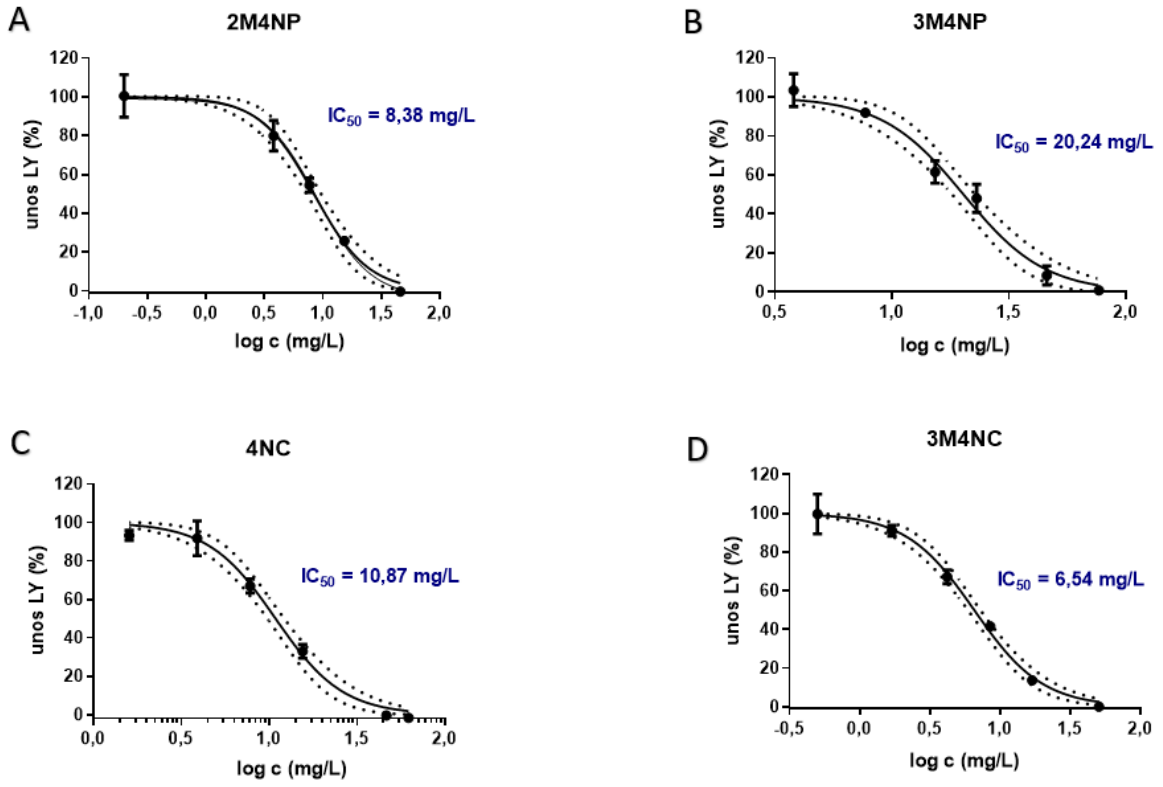
Slika 10. Krivulje koncentracija-odgovor *in vitro* inhibicije transportne aktivnosti Oct1 prijenosnika organskih kationa ribe zebrice na staničnoj liniji Flp-In-293-drOct1 mjerenjem inhibicije unosa modelnog supstrata ASP+ (%) nakon istovremene inkubacije s rasponom koncentracija pojedinačnih modelnih NMAU: A) 4NP, B) 2M4NP, C) 3M4NP, D) 4NC, E) 3M4NC i F) 3M5NC.



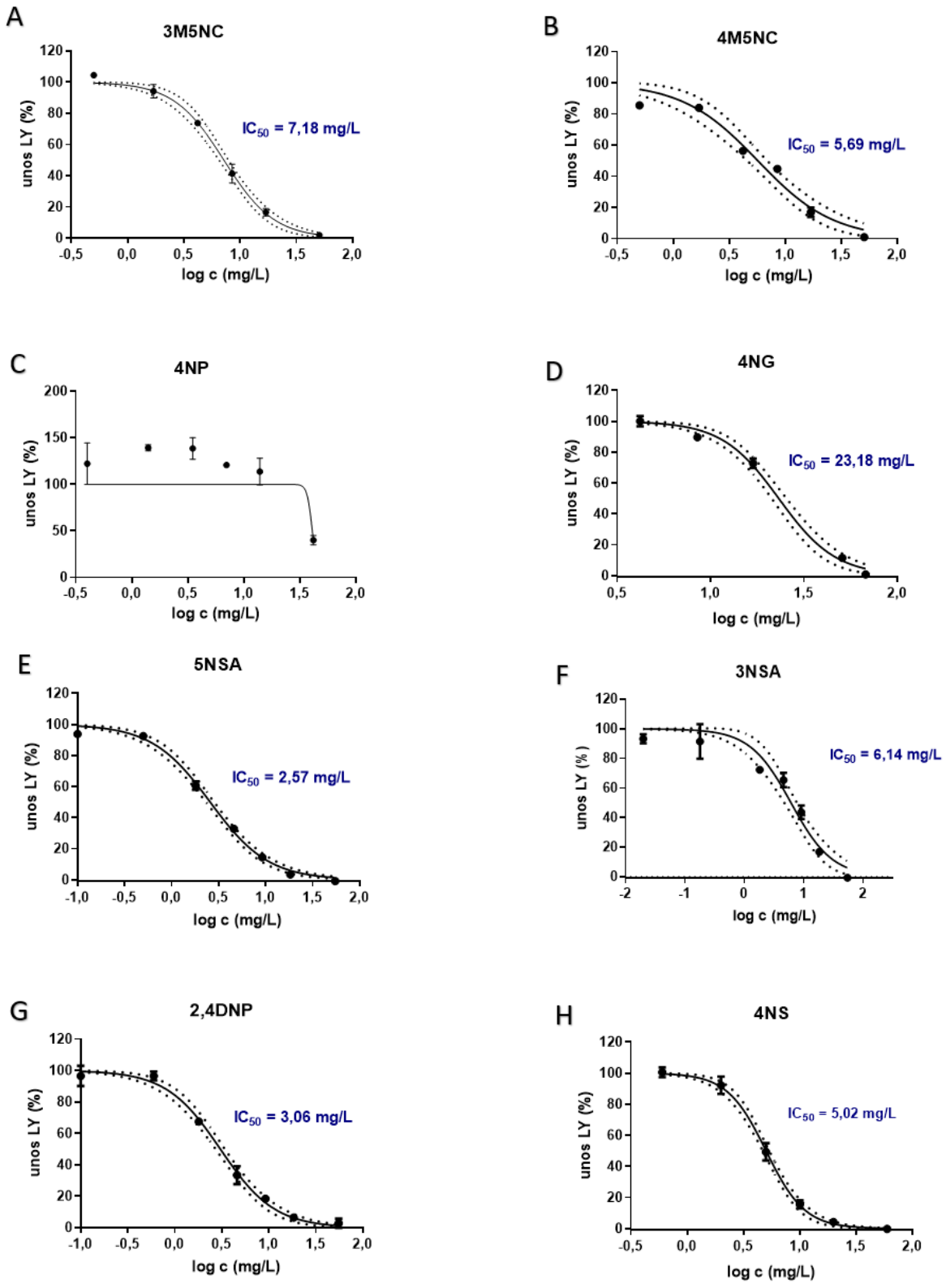
Slika 11. Krivulje koncentracija-odgovor *in vitro* inhibicije transportne aktivnosti Oct1 prijenosnika organskih kationa ribe zebrice na staničnoj liniji Flp-In-293-drOct1 mjerenjem inhibicije unosa modelnog supstrata ASP+ (%) nakon istovremene inkubacije s rasponom koncentracija pojedinačnih modelnih NMAU: A) 4M5NC, B) 4NG, C) 2,4DNP, D) 4NS, E) 5NSA i F) 3NSA.

Tablica 4. Raspon koncentracija modelnih NMAU pripremljen za *in vitro* određivanje inhibicije transportne aktivnosti Oatp1d1 prijenosnika organskih aniona ribe zebrice.

NMAU koncentracije (mg/L)									
5NSA	**2,4DNP**	**3NSA**	**4NP**	**3M4NC, 3M5NC, 4M5NC**	**4NS**	**2M4NP**	**3M4NP**	**4NC**	**4NG**
0,1	0,1	0,02	0,4	0,5	0,6	0,2	3,8	1,6	1,7
0,5	0,6	0,18	1,4	1,7	2,0	1,5	7,7	3,9	4,2
1,8	1,8	1,8	3,5	4,2	5,0	3,8	15,3	7,8	8,5
4,6	4,6	4,6	7,0	8,5	10,0	7,7	23,0	15,5	16,9
9,2	9,2	9,2	13,9	16,9	19,9	15,3	45,9	46,5	50,7
18,3	18,4	18,3	41,7	50,7	59,7	45,9	76,6	62,0	67,7
54,9	55,2	54,9	/	/	/	/	/	/	/



Slika 12. Krivulje koncentracija-odgovor *in vitro* inhibicije transportne aktivnosti Oatp1d1 prijenosnika organskih aniona ribe zebrice na staničnoj liniji Flp-In-293-drOatp1d1 mjerenjem inhibicije unosa modelnog supstrata LY (%) nakon inkubacije s rasponom koncentracija pojedinačnih modelnih NMAU: A) 2M4NP, B) 3M4NP, C) 4NC i D) 3M4NC.

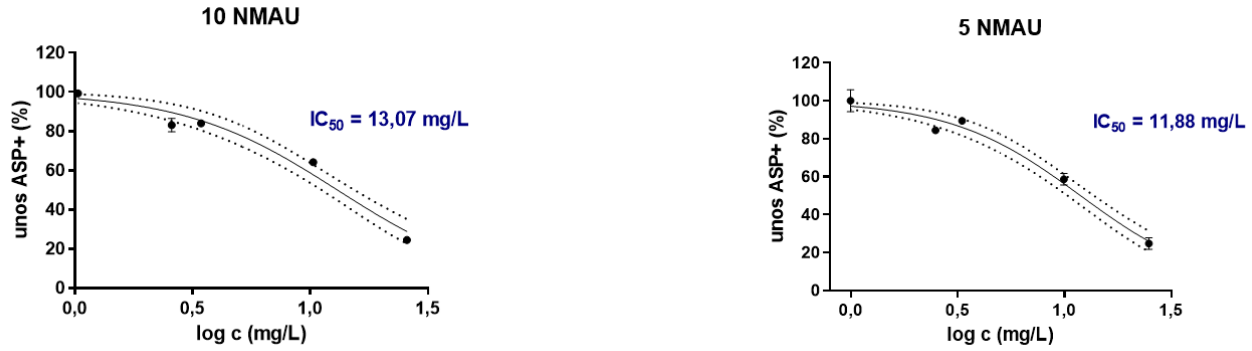


Slika 13. Krivulje koncentracija-odgovor *in vitro* inhibicije transportne aktivnosti Oatp1d1 prijenosnika organskih aniona ribe zebrice na staničnoj liniji Flp-In-293-drOatp1d1 mjerenjem inhibicije unosa modelnog supstrata LY (%) nakon inkubacije s rasponom koncentracija pojedinačnih modelnih NMAU: A) 3M5NC, B) 4M5NC, C) 4NP, D) 4NG, E) 5NSA, F) 3NSA, G) 2,4DNP i H) 4NS.

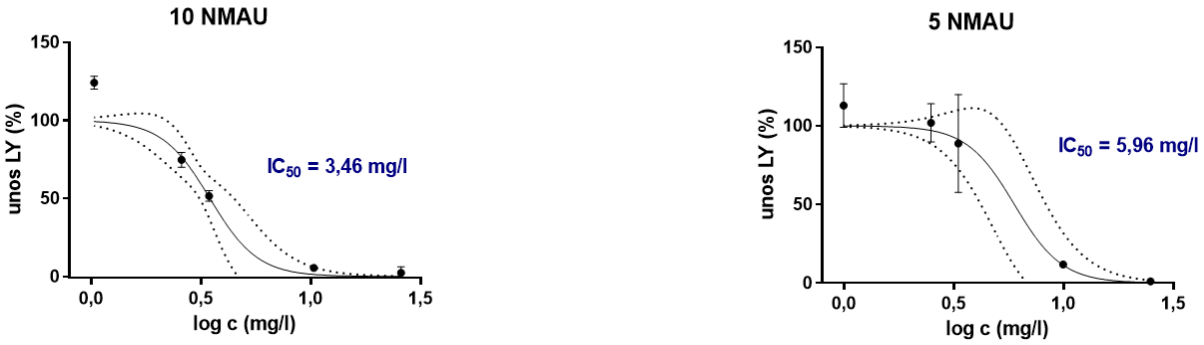
Tablica 5. Raspon koncentracija smjesa modelnih NMAU u *in vitro* ispitivanju inhibicije transportne aktivnosti Oatp1d1 i Oct1 proteinskih prijenosnika ribe zebrice.

Smjese modelnih NMAU (mg/L)	
10 NMAU	**5 NMAU**
0,5	0,5
1,0	1,0
2,6	2,5
3,4	3,3
10,3	9,9
25,8	24,9

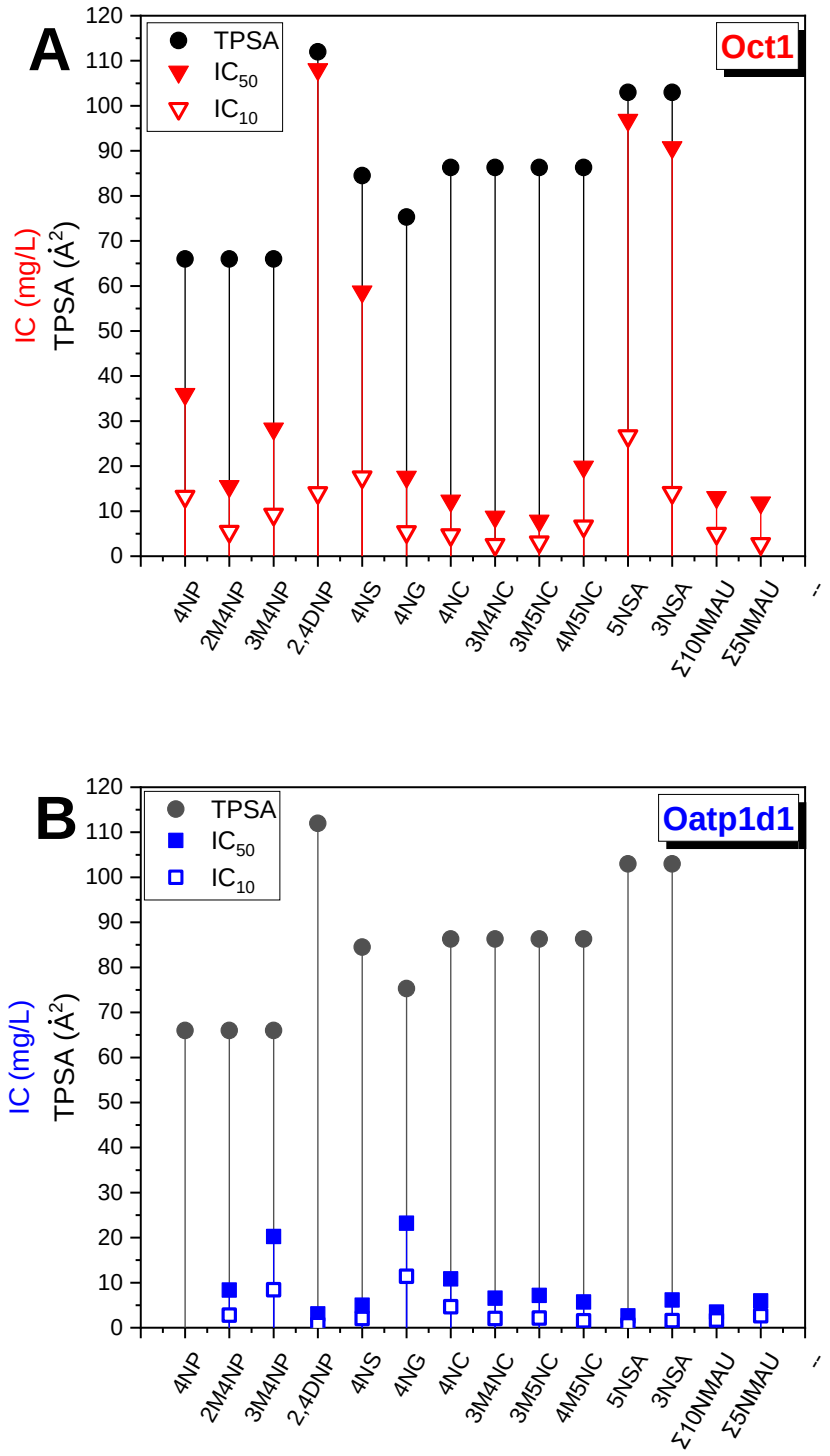
A



B



Slika 14. Krivulje koncentracija-odgovor *in vitro* inhibicije transportne aktivnosti organskog kationskog prijenosnika Oct1 (A) i organskog anionskog prijenosnika Oatp1d1 (B) nakon inkubacije sa smjesama NMAU (10 NMAU i 5 NMAU).



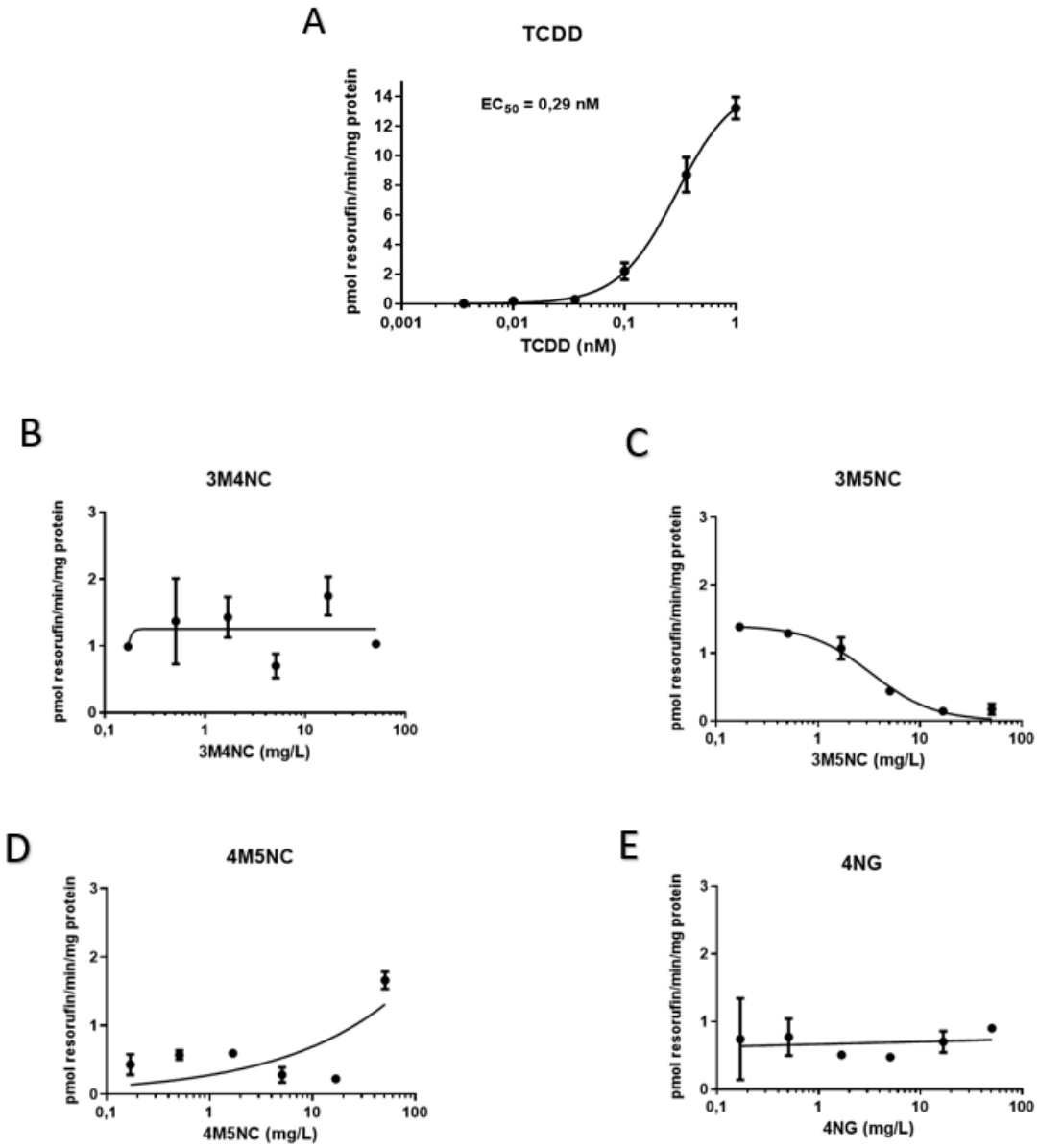
Slika 15. Inhibicijske koncentracije (IC_{50} i IC_{10}) pojedinačnih NMAU i njihovih smjesa ($\sum_{10}$NMAU and $\sum_{5}$NMAU) za: unos modelnog supstrata ASP+ proteinom Oct1 ribe zebrice (crveni trokuti; A) i modelnog supstrata LY proteinom Oatp1d1 ribe zebrice (plavi kvadrati; B) Odgovarajuće topološke polarne površine (TPSA) prikazane su na A i B kao crni krugovi.

4.3.2. Interakcija modelnih NMAU s fazom I staničnog detoksikacijskog mehanizma

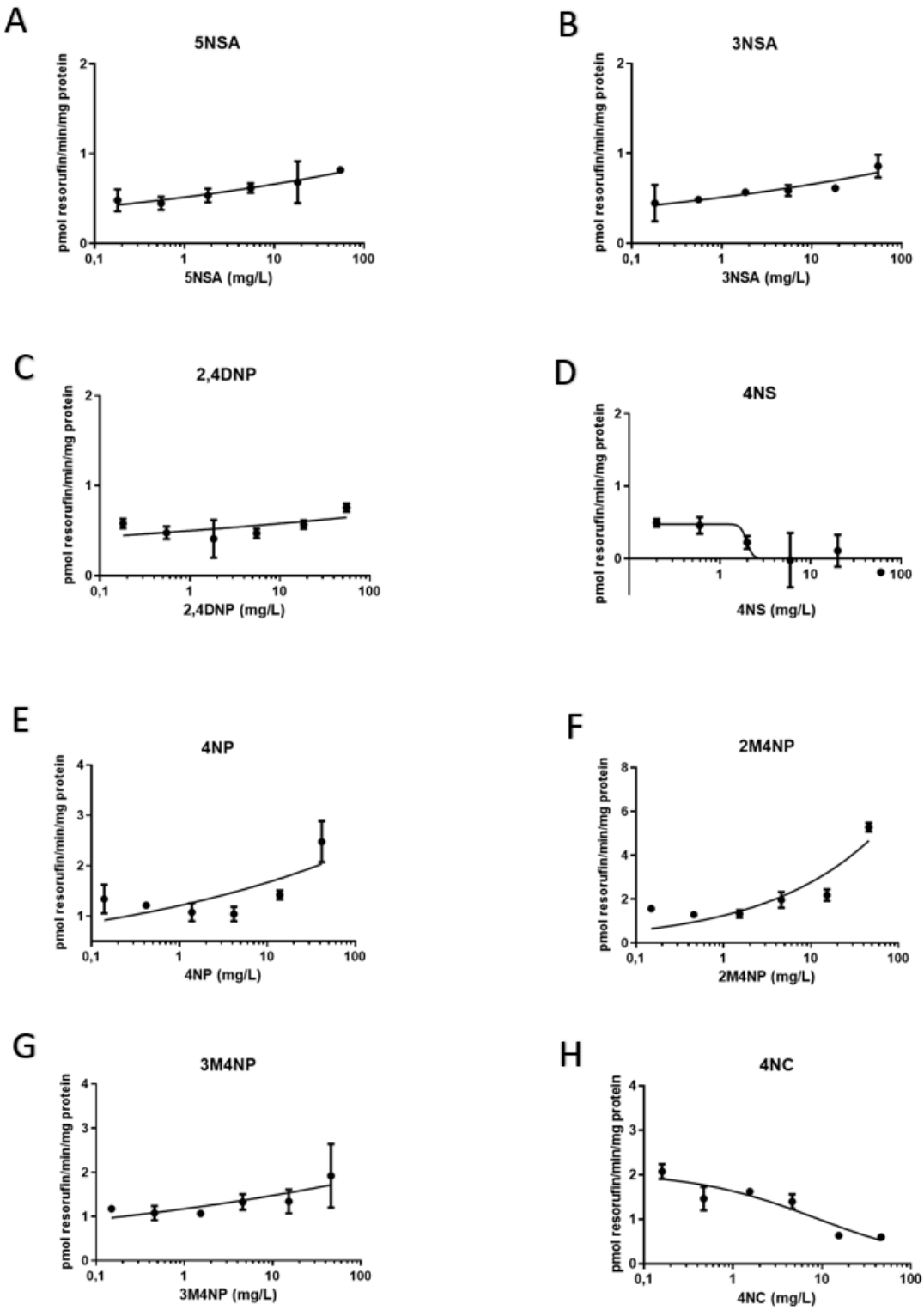
EROD biotest je proveden u rasponu koncentracija pojedinačnih modelnih NMAU i njihovih smjesa prikazanih u Tablicama 6. i 7. Uočeno je da niti pojedinačni NMAU niti njihove smjese nisu induceri enzima CYP1A1 faze I stanične detoksikacije (Slike 16., 17 i 18.).

Tablica 6. Raspon koncentracija modelnih NMAU u *in vitro* određivanju potencijala indukcije detoksikacijskih enzima faze I (CYP1A1) mjerenjem aktivnosti etoksirezorufin-O-deetilaze (EROD) u PLHC-1 ribljim stanicama.

NMAU koncentracije (mg/L)							
4NP	**2M4NP, 3M4NP**	**4NG**	**5NSA, 3NSA**	**2,4DNP**	**3M4NC, 3M5NC, 4M5NC**	**4NS**	**4NC**
0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	0,5	0,6	0,5
1,4	1,5	1,7	1,8	1,8	1,7	2,0	1,6
4,2	4,6	5,1	5,5	5,5	5,1	6,0	4,6
13,9	15,3	16,9	18,3	18,4	16,9	19,9	15,5
41,7	45,9	50,7	54,9	55,2	50,7	59,7	46,5



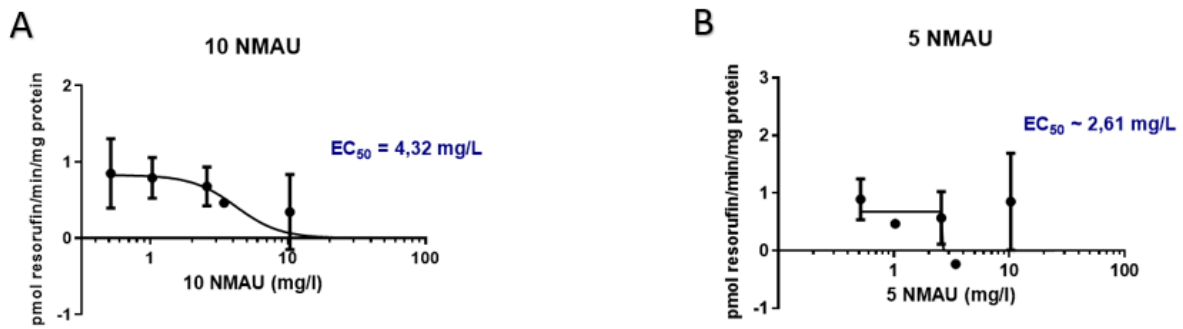
Slika 16. Određivanje indukcije detoksikacijskih enzima faze I (CYP1A1) EROD biotestom nakon izlaganja modelnom induceru TCDD (A) i modelnim NMAU: B) 3M4NC, C) 3M5NC, D) 4M5NC i E) 4NG.



Slika 17. Određivanje indukcije detoksikacijskih enzima faze I (CYP1A1) EROD biotestom nakon izlaganja modelnim NMAU: A) 5NSA, B) 3NSA, C) 2,4DNP, D) 4NS, E) 4NP, F) 2M4NP, G) 3M4NP i H) 4NC.

Tablica 7. Koncentracije smjesa modelnih NMAU za *in vitro* određivanje potencijala indukcije enzima detoksikacije CYP1A1 pomoću EROD biotesta.

Smjese modelnih NMAU (mg/L)	
10 NMAU	**5 NMAU**
0,5	0,5
1,0	1,0
2,6	2,6
3,4	3,4
10,3	10,3
25,8	24,9



Slika 18. Određivanje indukcije detoksikacijskih enzima faze I (CYP1A1) EROD biotestom nakon izlaganja smjesama A) 10 NMAU i B) 5 NMAU.

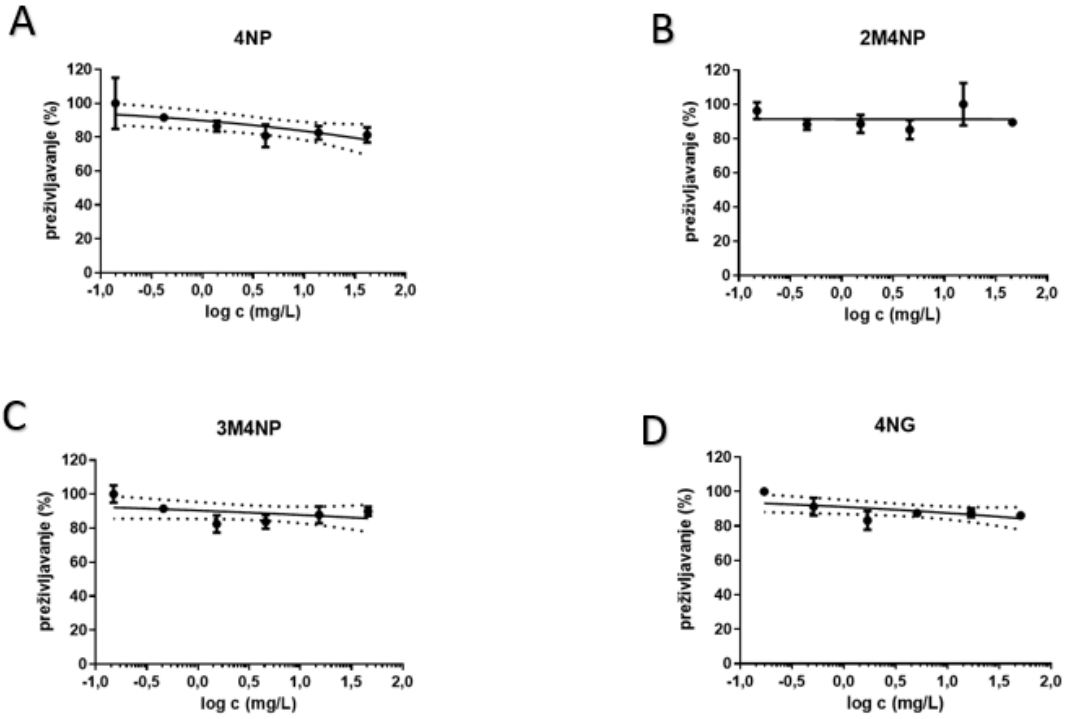
4.3.3. Akutni toksični učinci modelnih NMAU

Krivulje koncentracija-odgovor dobivene ispitivanjem akutne toksičnosti pojedinačnih NMAU i njihovih smjesa (Σ_{10}NMAU i Σ_5NMAU) u rasponu ispitivanih koncentracija (Tablice 8. i 9.) prikazane su na Slikama 19., 20. i 21., dok su dobivene IC_{50} i IC_{10} prikazane na Slici 22. Spojevi 4NP, 2M4NP, 3M4NP, 4NG, 5NSA, 3NSA i 2,4 DNP nisu pokazali citotoksični učinak na PLHC-1 riblje stanice u ispitivanom rasponu koncentracija (0,1-55,2 mg/L, Tablica 8.). Najslabije preživljavanje stanica (najveću citotoksičnost) uzrokovao je 4NS (IC_{50} = 2,03 mg/L), a zatim NC: 4 NC (IC_{50} = 3,07 mg/L) > 4M5NC (IC_{50} = 3,41 mg/L) > 3M4NC (IC_{50} = 3,69

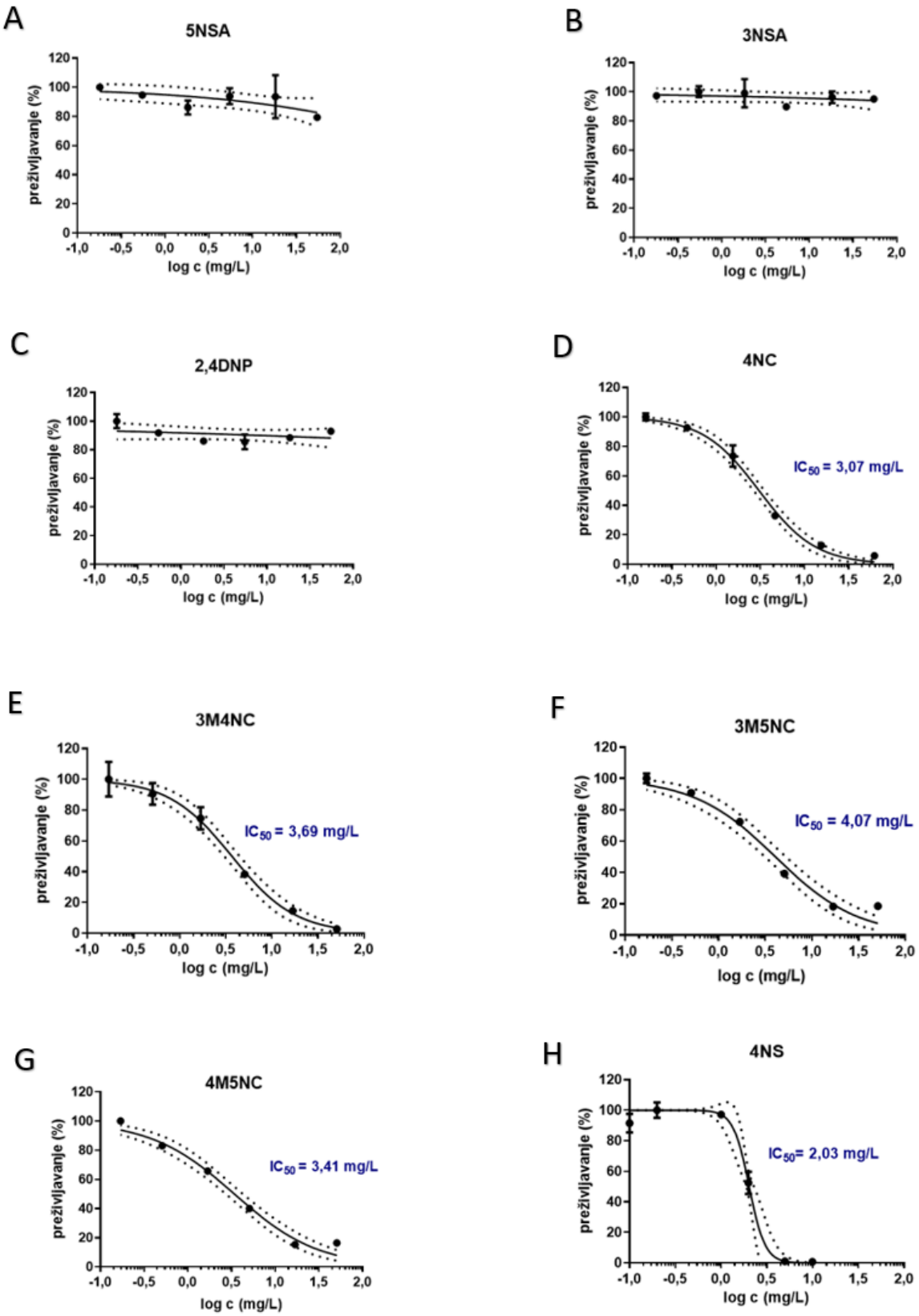
mg/L) > 3M5NC (IC_{50} = 4,07 mg/L). Smjese Σ_{10}NMAU i Σ_5NMAU su također pokazale akutnu toksičnost u rasponu testiranih koncentracija.

Tablica 8. Koncentracijski raspon NMAU u *in vitro* određivanju akutnog citotoksičnog učinka modelnih NMAU MTT testom na PLHC-1 ribljim stanicama.

NMAU koncentracije (mg/L)							
4NP	**2M4NP, 3M4NP**	**4NG**	**5NSA, 3NSA**	**2,4DNP**	**3M4NC, 3M5NC, 4M5NC**	**4NS**	**4NC**
0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2
0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	0,5	0,2	0,5
1,4	1,5	1,7	1,8	1,8	1,7	1,0	1,6
4,2	4,6	5,1	5,5	5,5	5,1	2,0	4,6
13,9	15,3	16,9	18,3	18,4	16,9	5,0	15,5
41,7	45,9	50,7	54,9	55,2	50,7	10,0	62,0



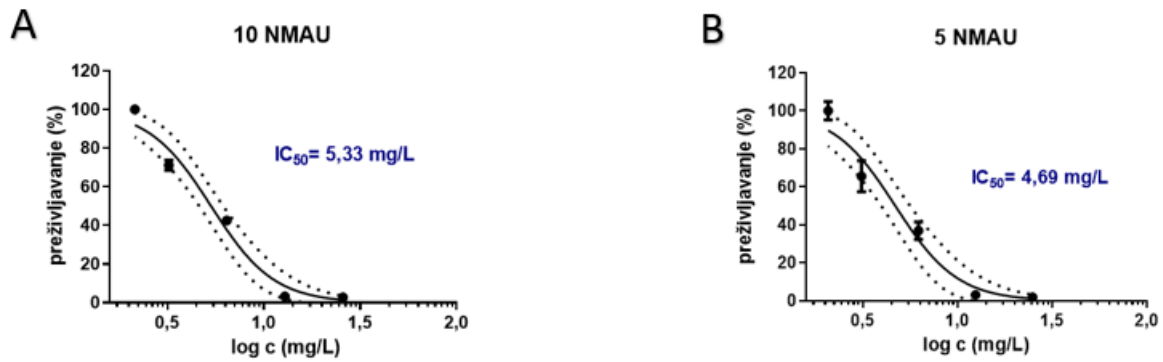
Slika 19. *In vitro* određivanje akutnog citotoksičnog učinka MTT testom na PLHC-1 ribljim stanicama nakon izlaganja od 72 h pojedinačnim modelnim NMAU: A) 4NP, B) 2M4NP, C) 3M4NP i D) 4NG.



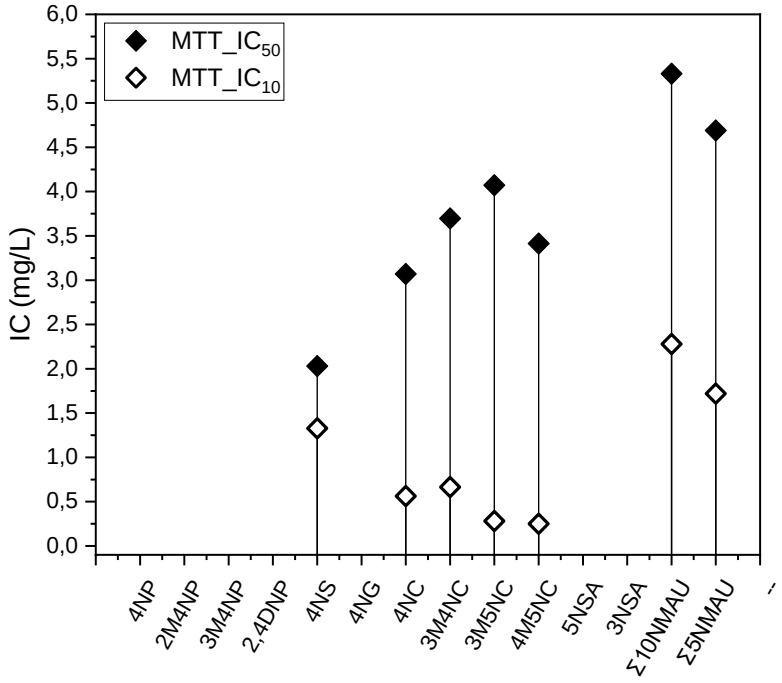
Slika 20. *In vitro* određivanje akutnog citotoksičnog učinka MTT testom na PLHC-1 ribljim stanicama nakon izlaganja od 72 h pojedinačnim modelnim NMAU: A) 5NSA, B) 3NSA, C) 2,4DNP, D) 4NC, E) 3M4NC, F) 3M5NC, G) 4M5NC i H) 4NS.

Tablica 9. Koncentracije smjesa modelnih NMAU za *in vitro* određivanje akutnog citotoksičnog učinka MTT testom na PLHC-1 ribljim stanicama.

Smjese modelnih NMAU (mg/L)	
10 NMAU	**5 NMAU**
2,2	2,1
3,2	3,1
6,4	6,2
12,9	12,4
25,8	24,9



Slika 21. Rezultati određivanja akutnih toksičnih učinaka smjesa A) 10 NMAU i B) 5 NMAU MTT testom.



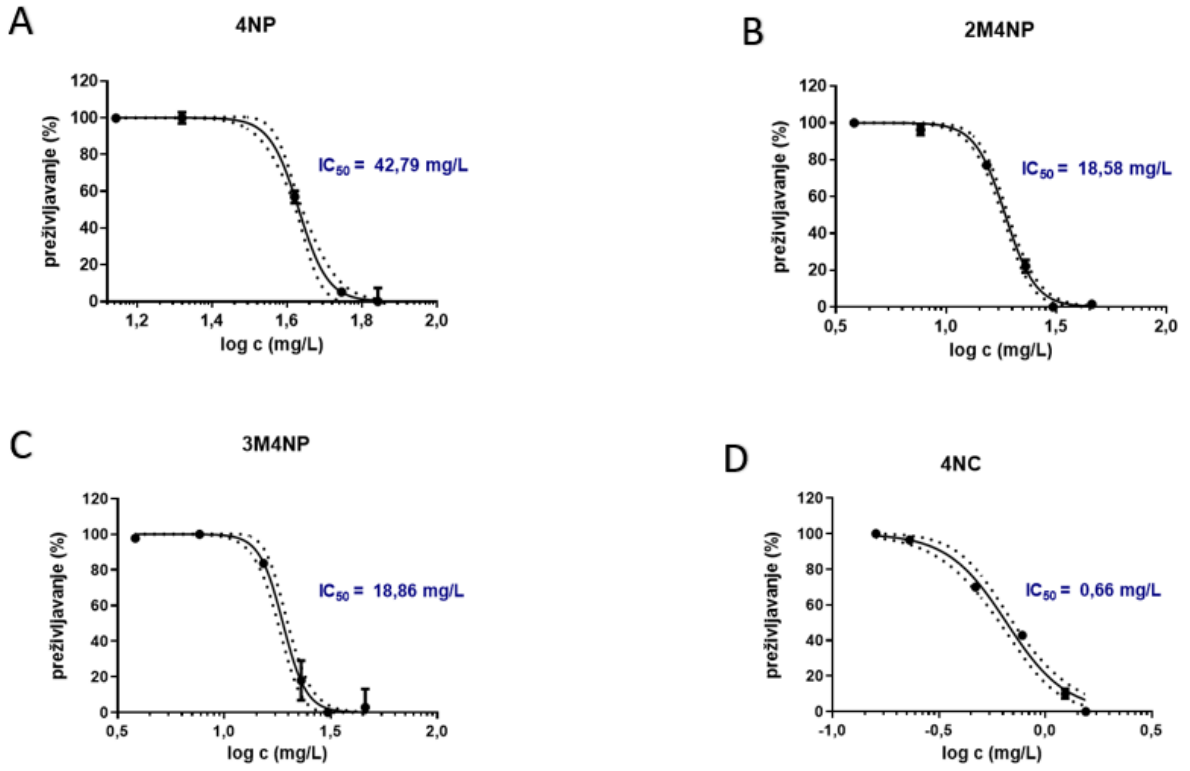
Slika 22. Inhibicijske koncentracije (IC_{50} i IC_{10}) testiranih pojedinačnih NMAU i njihovih smjesa ($\sum_{10}$NMAU and $\sum_{5}$NMAU) za akutnu toksičnost (MTT test) na ribljoj staničnoj liniji PLHC-1.

4.3.4. Kronični toksični učinci modelnih NMAU

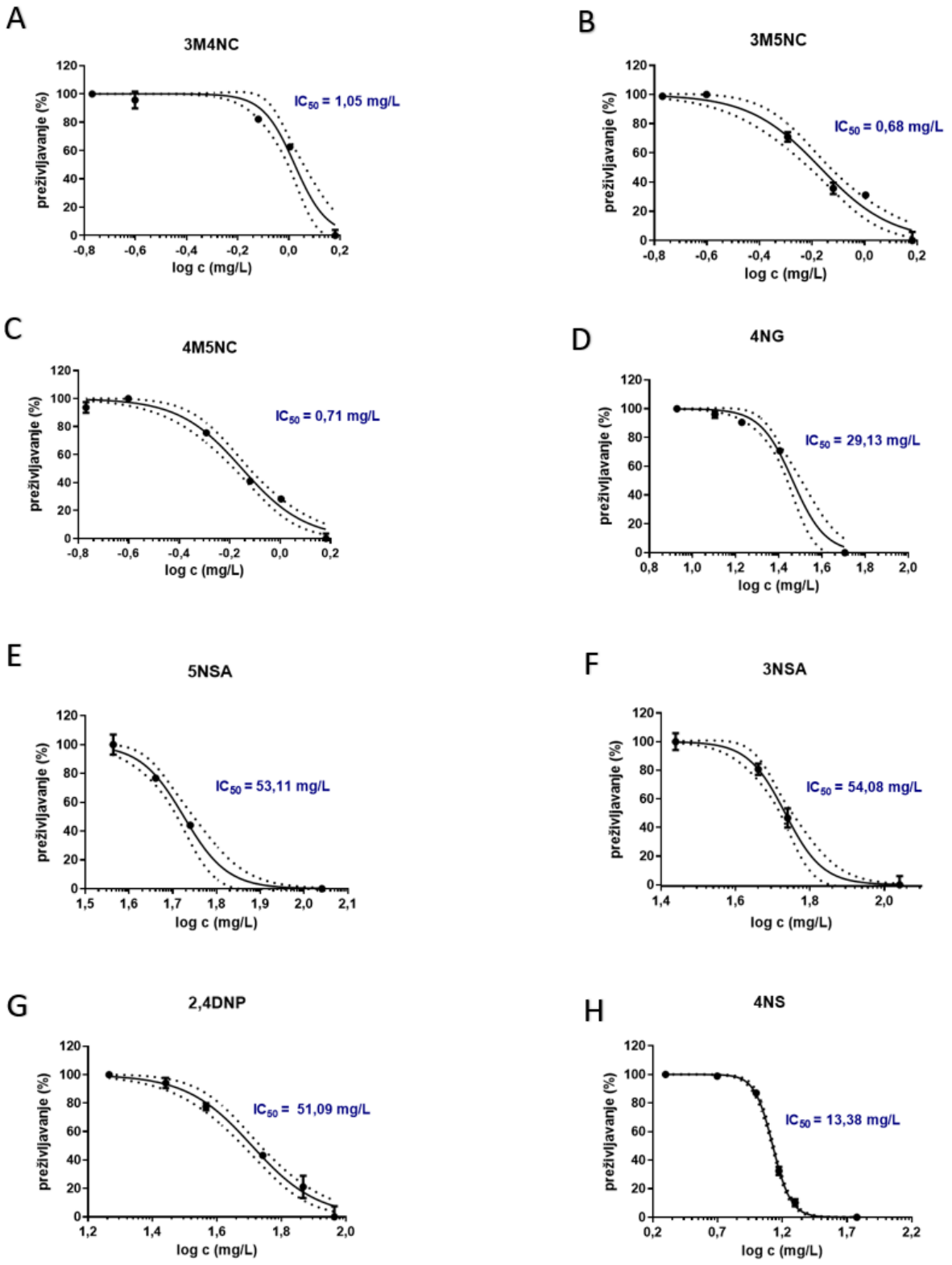
Svi spojevi testirani u rasponu 0,2 – 109,9 mg/L (Tablica 10.) su pokazali kroničnu toksičnost za mikroalge (Slike 23., 24. i 26.). Najtoksičnijim spojevima za preživljavanje mikroalgi su se pokazali NC (4NC > 3M5NC > 4M5NC > 3M4NC), s dobivenim IC_{50} vrijednostima u rasponu od 0,66 – 1,05 mg/L, a zatim 4NS (IC_{50} = 13,38 mg/L). Za ostale NP i NSA dobivene IC_{50} vrijednosti su bile u rasponu 18,58 – 54,08 mg/L, što ih čini najmanje toksičnim od testiranih spojeva. Smjese Σ_{10}NMAU i Σ_{5}NMAU su također pokazale kroničnu toksičnost u rasponu testiranih koncentracija (1,0 – 25,8 mg/L, Tablica 11.; Slike 25. i 26.). Vrijednosti IC_{50} bile su vrlo slične za obje smjese, što implicira da je 5 najzastupljenijih spojeva u sBB_{H2O} (4NC, MNC i 4NS) najviše pridonijelo akutnom i kroničnom toksičnom učinku na stanice riba i preživljavanje mikroalgi.

Tablica 10. Koncentracije modelnih NMAU pripremljene za *in vivo* određivanje kroničnih toksičnih učinaka na slatkovodne zelene mikroalge *Scenedesmus subspicatus* AlgaeTox testom.

NMAU koncentracije (mg/L)							
4NP	**2,4DNP**	**2M4NP, 3M4NP**	**4NC**	**3M4NC, 3M5NC, 4M5NC**	**4NG**	**5NSA, 3NSA**	**4NS**
13,9	18,4	3,8	0,2	0,2	4,2	18,3	2,0
20,9	27,6	7,7	0,3	0,3	8,5	27,5	5,0
27,8	36,8	15,3	0,5	0,5	12,7	36,6	10,0
41,7	55,2	23,0	0,8	0,8	16,9	45,8	14,9
55,6	73,6	30,6	1,2	1,0	25,4	54,9	19,9
69,6	92,1	45,9	1,6	1,5	50,7	109,9	59,8



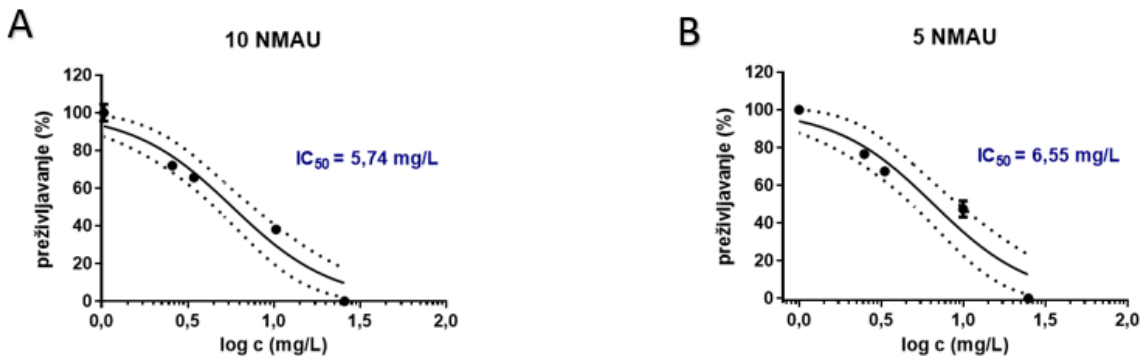
Slika 23. Rezultati *in vivo* određivanja kroničnih toksičnih učinaka AlgaeTox testom nakon 96 h izlaganja određenom rasponu koncentracija pojedinačnih modelnih NMAU: A) 4NP, B) 2M4NP, C) 3M4NP i D) 4NC.



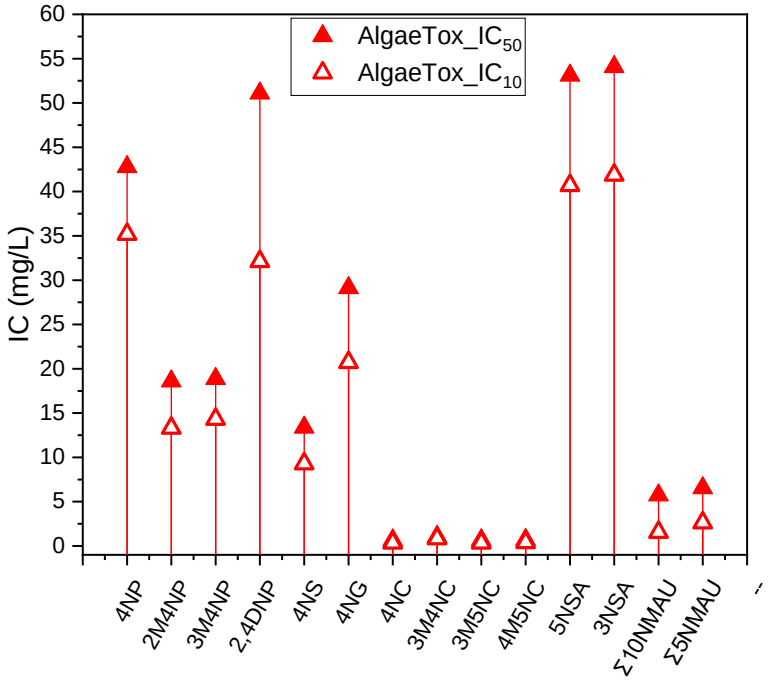
Slika 24. Rezultati *in vivo* određivanja kroničnih toksičnih učinaka AlgaeTox testom nakon 96 h izlaganja određenom rasponu koncentracija pojedinačnih modelnih NMAU: A) 3M4NC, B) 3M5NC, C) 4M5NC, D) 4NG, E) 5NSA, F) 3NSA, G) 2,4DNP i H) 4NS.

Tablica 11. Koncentracije smjesa modelnih NMAU pripremljenih za *in vivo* određivanje kroničnih toksičnih učinaka AlgaeTox testom.

NMAU koncentracija (mg/L)	
10 NMAU	**5 NMAU**
1,0	1,0
2,6	2,5
3,4	3,3
10,3	9,9
25,8	24,9



Slika 25. Rezultati određivanja kroničnih toksičnih učinaka smjesa A) 10 NMAU i B) 5 NMAU AlgaeTox testom.



Slika 26. Inhibicijske koncentracije (IC_{50} i IC_{10}) testiranih pojedinačnih NMAU i njihovih smjesa ($\sum_{10}$NMAU and $\sum_{5}$NMAU) za kroničnu toksičnost slatkovodne zelene mikroalge *Scenedesmus subspicatus* (AlgaeTox test).

4.3.5. Toksični učinci modelnih NMAU na embrije ribe zebrice

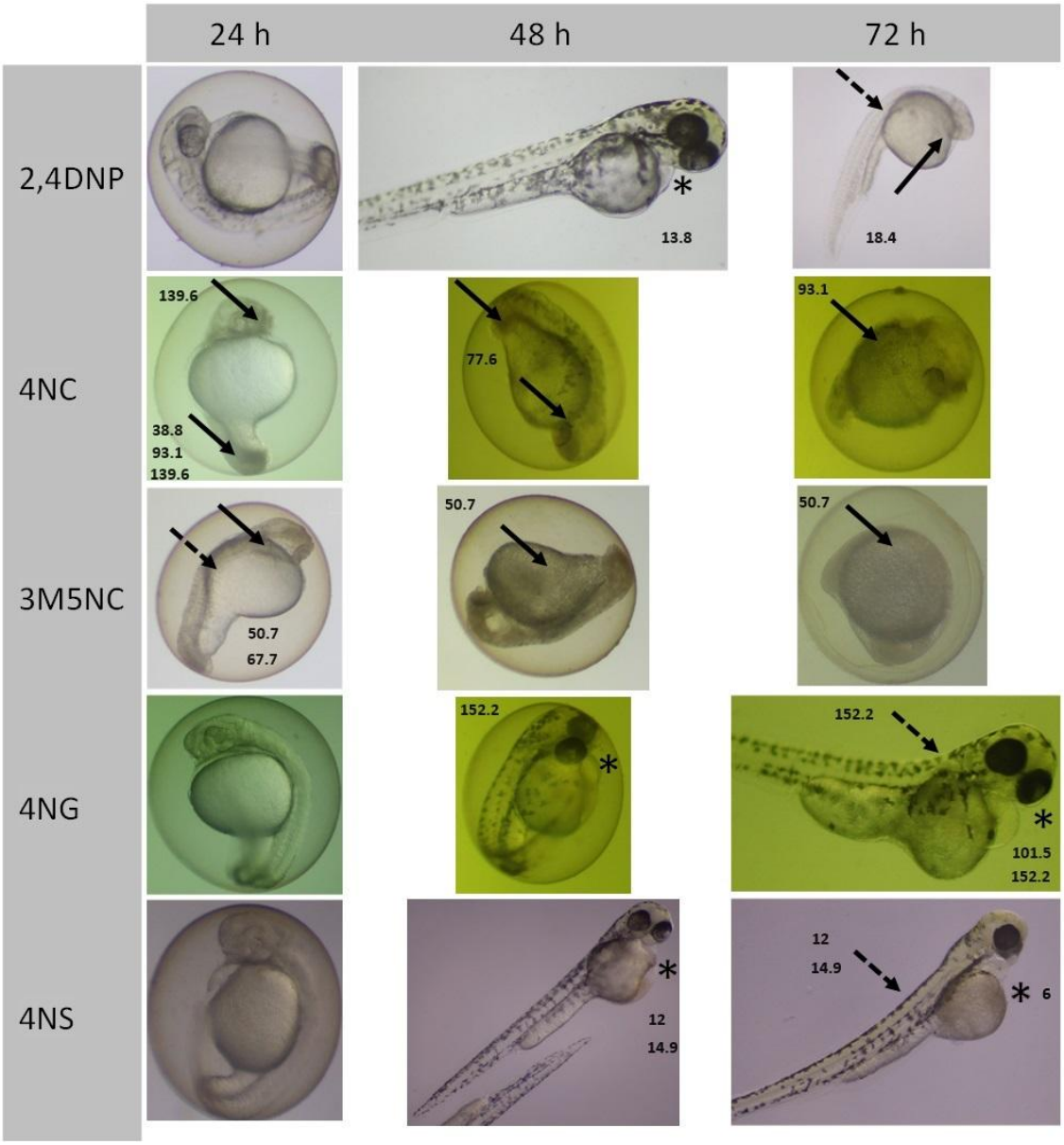
Za provedbu eksperimenta embriotoksičnosti odabrani su NMAU prema njihovim različitim strukturama. 2,4DNP je odabran kao primjer NP, 4NG i 4NS kao primjeri metoksi-NP, 4NC za NC i 3M5NC za MNC. *In vivo* ispitivanje je pokazalo da je izloženost NMAU u rasponu koncentracija 4,6 – 203,0 mg/L rezultiralo značajnim morfološkim promjenama (abnormalnostima) u embrijima zebrice (*Danio rerio*) (Tablica 12). Najtoksičnijim spojem pokazao se 4NS uzrokujući morfološke promjene u embrijima u obliku edema oko srca pri koncentraciji 6,0 mg/L nakon 72 hpf i letalnost pri koncentraciji 29,9 mg/L nakon samo 24 hpf (Tablica 12., Slika 27.). Također, značajne abnormalnosti embrija pokazao je 2,4DNP koji je nakon 24 hpf uzrokovao slabu pigmentaciju ili njen izostanak, zaostajanje u razvoju pri 9,2 mg/L i edem oko srca pri 13,8 mg/L nakon 48 hpf. Malformacije u obliku zakrivljenosti repa i skolioze, kao i letalnost primijećene su pri 18,4 mg/L 2,4DNP nakon 48 hpf, odnosno 72 hpf. Za ostale ispitane spojeve, s obzirom na koncentraciju, toksičnost se smanjivala u nizu 4NC > 3M5NC > 4NG (Tablica 12.).

Tablica 12. Testirani NMAU i njihovi učinci na razvoj i preživljavanje embrija zebrice (*Danio rerio*). Kvačice označavaju koncentracije spojeva bez učinka na razvoj embrija zebrice. Subletalne koncentracije NMAU korištene za proučavanje promjena u sastavu lipida označene su sa ⊦.

NMAU	KONCENTRACIJA (mg/L)	TRAJANJE INKUBACIJE		
		24 h	48 h	72 h
2,4-dinitrofenol (2,4DNP)	4,6	✔	✔	✔
	9,2 ⊦	✔	Zaostajanje u razvoju	Zaostajanje u razvoju
	13,8	Slaba ili potpuno odsutna pigmentacija	Nepravilan oblik žumanjčane vrećice Edem oko srca	Nepravilan oblik žumanjčane vrećice
	18,4	Slaba ili potpuno odsutna pigmentacija	Zakrivljenost repa/skolioza	Zakrivljenost repa/skolioza Letalnost
4-nitrokatehol (4NC)	7,8	✔	✔	✔
	15,5	✔	Zaostajanje u razvoju	✔
	38,8 ⊦	Zakržljala glava Nekroza u repu Slaba pigmentacija	Zaostajanje u razvoju	✔
	77,6	✔	Zaostajanje u razvoju Nekroza u repu Slaba pigmentacija	Zakrivljenost repa
	93,1	Edem oko srca Nekroza u repu Slaba pigmentacija	Zakrivljenost repa	Nekroza
	139,6	Nekroze u glavi i repu	Jake deformacije Letalnost	Jake deformacije Letalnost
	186,1	Jake deformacije Letalnost	Jake deformacije Letalnost	Jake deformacije Letalnost
3-metil-5-nitrokatehol (3M5NC)	8,5	✔	✔	✔
	16,9	✔	✔	✔
	42,3 ⊦	✔	✔	✔
	50,7	Nekroze u glavi i repu Nepravilan oblik žumanjčane vrećice	Zaostajanje u razvoju Nekroze	Jake deformacije i letalnost
	67,7	Nekroze u glavi i repu	Nekroza i deformacije	Jake deformacije i letalnost
	84,6	Jake deformacije i letalnost	Jake deformacije i letalnost	Jake deformacije i letalnost
	101,5	Jake deformacije i letalnost	Jake deformacije i letalnost	Jake deformacije i letalnost
	152,2	Jake deformacije i letalnost	Jake deformacije i letalnost	Jake deformacije i letalnost

Tablica 12. Nastavak

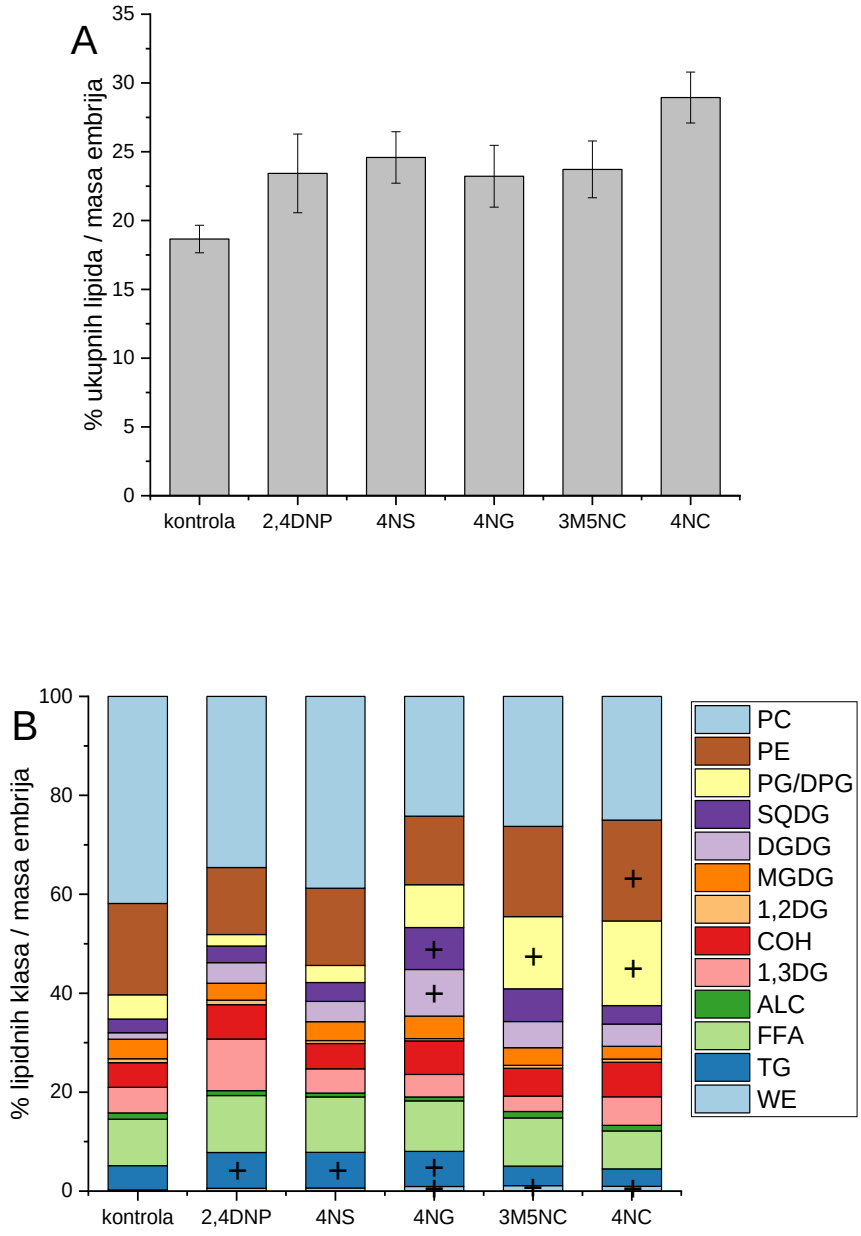
NMAU	KONCENTRACIJA (mg/L)	TRAJANJE INKUBACIJE		
		24 h	48 h	72 h
4-nitrogvajakol (4NG)	**8,5**	✔	Zaostajanje u razvoju	✔
	16,9	✔	Zaostajanje u razvoju	✔
	42,3 ⊦	Slaba pigmentacija	Zaostajanje u razvoju	✔
	84,6	Nekroze u glavi i repu Jake deformacije i letalnost	Zaostajanje u razvoju	✔
	101,5	Nekroza	Zaostajanje u razvoju	Zaostajanje u razvoju Edem oko srca
	152,2	Nekroza	Zaostajanje u razvoju Edem oko srca	Edem oko srca Zakrivljenost kralježnice
	203,0	Nekroza i deformacije	Zaostajanje u razvoju Edem oko srca	Deformacije
4-nitrosiringol (4NS)	**5,0** ⊦	✔	✔	✔
	6,0	✔	✔	Edem oko srca
	10,0	✔	✔	Edem oko srca
	12,0	Nekroza Nekroza	Edem oko srca	Nekroza Zakrivljenost kralježnice Nekroza
	14,9		Edem oko srca	Zakrivljenost kralježnice
	29,9	Letalnost	Letalnost	Letalnost
	44,8	Letalnost	Letalnost	Letalnost
	59,8	Letalnost	Letalnost	Letalnost



Slika 27. Morfološke promjene u embrijima zebrica uzrokovane izlaganjem testiranim NMAU. Morfološke deformacije pojavile su se u obliku edema srca (zvjezdica), zakrivljenosti kralježnice (isprekidana strelica) i nekroze glave i repa (puna strelica).

4.4. Utjecaj modelnih NMAU na biomasu i sastav lipida embrija ribe zebrice

Kao mjera ukupne biomase embrija izloženih tijekom razdoblja od 48 hpf subletalnoj dozi odabranih NMAU određena je prosječna suha masa koja je iznosila 52,2 ± 5,9 (SD) µg/jedinki (raspon 42,8 – 59,5 µg), što je bilo značajno niže (t-test , $p < 0,05$) u usporedbi s neizloženim, kontrolnim, embrijima (70, 8 ± 3,6 µg). Ove su vrijednosti usporedive s poznatom težinom embrija od 58 – 79 µg u razdoblju do 96 hpf (Hachicho i sur., 2015).



Slika 28. Postotak ukupnih lipida (A) i klasa lipida (B) u masi suhih embrija zebrice neizloženih (kontrola) i izloženih strukturno različitim NMAU (9,2 mg/L 2,4DNP, 5,0 mg/L 4NS, 42,3 mg/L 4NG, 42,3 mg/L 3M5NC, 38,8 mg/L 4NC) tijekom 48 hpf. Statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje % klase lipida u težini embrija označeno je +.

Prosječni ukupni analizirani sadržaj lipida embrija izloženih NMAU tijekom 48 hpf bio je od 23,2 % (4NG) do 28,9 % (4NC) težine suhog embrija (Slika 28.A), što je statistički značajno povećano u usporedbi s kontrolom (18,7 %, t-test, $p < 0,05$). Statistički značajan porast bio je u sadržaju TG embrija izloženih 2,4DNP, 4NS i 4NG (Slika 28.B), ali ne i kod onih koji

su bili izloženi 3M5NC ili 4NC. Statistički je potvrđeno povećanje i za sadržaj PE u embrijima inkubiranim s 4NC, za sadržaj WE u embrijima inkubiranim s 3M5NC, 4NC i 4NG, za sadržaj PG/DPG u embrijima izloženim 3M5NC i 4NC, te za DGDG i SQDG embrija izloženih 4NG.

4.5. Laboratorijski inkubacijski eksperiment sa mikroalgom *Dunaliella tertiolecta*

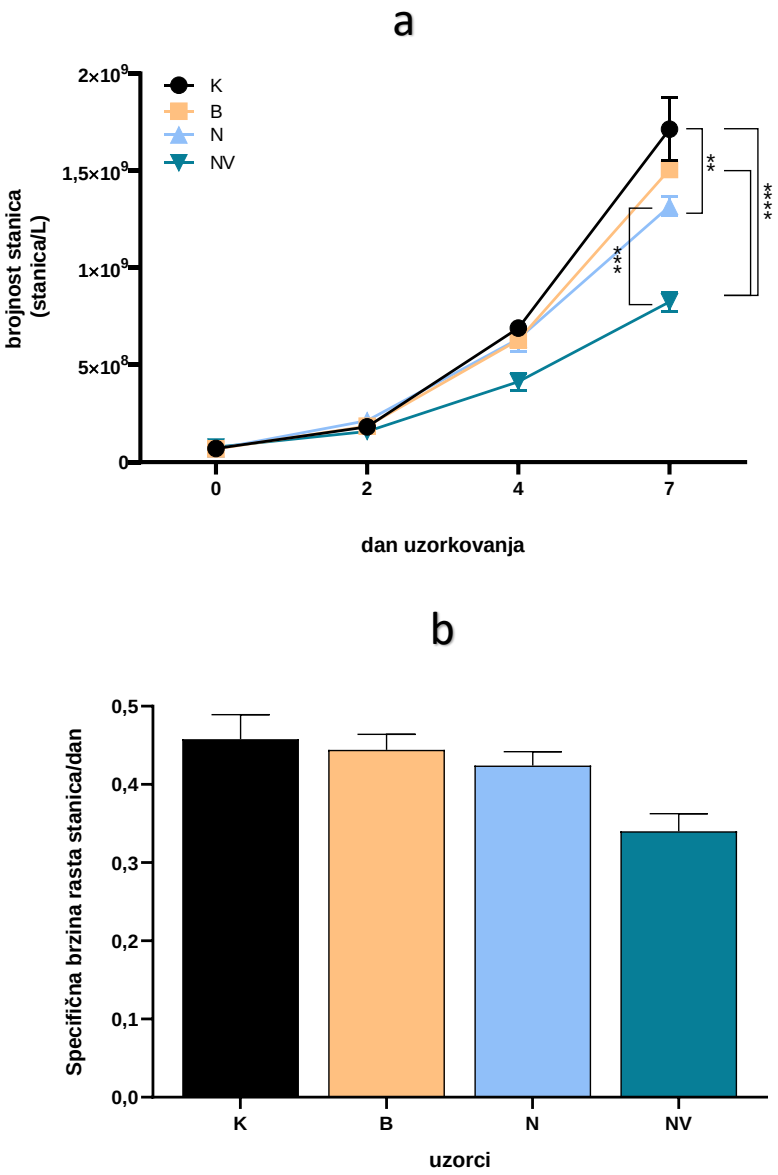
U eksperimentu je promatran utjecaj NMAU na promjenu u kemijskom sastavu organske tvari populacije mikroalgi *Dunaliella tertiolecta*. Nulti dan uzorkovanja je dan dodatka analita (B, N, NV) u tikvice (opisano u 3.6.). U Tablici 13. su prikazane koncentracije NMAU dodanih sa otopinom uzorka B. Koncentracije ostalih komponenata otopine dodane mikroalgama prikazane su u Prilogu 3. Uzorci su uzeti odmah nakon dodatka analita, te drugi, četvrti i sedmi dan nakon dodatka. Uzorkovanje se svaki put provodilo istim redoslijedom. Uzorci su odmah obrađeni prema protokolu za svaki parametar koji se određivao u njima. Prilikom prikazivanja rezultata statistički značajne razlike među uzorcima su označene samo za zadnji dan eksperimenta.

Tablica 13. Koncentracije NMAU dodanih vodenim ekstraktom uzoraka atmosferskih lebdećih čestica porijeklom iz izgaranja biomase (uzorci B) u tikvice sa stanicama mikroalgi *Dunaliella tertiolecta*. Za tumačenje oznaka vidjeti Popis kratica i simbola.

NMAU	Koncentracija / µg/L
4NP	0,079
2M4NP	0,015
3M4NP	0,026
4NC	0,811
3M4NC	0,339
3M5NC	1,290
4M5NC	1,019
5NSA	0,003
4NS	0,683
4NG	0,028

4.5.1. Utjecaj vodenog ekstrakta sBB i smjesa modelnih NMAU na rast stanica *Dunaliella tertiolecta*

Tijekom praćenja rasta stanica *Dunaliella tertiolecta* brojnost se povećala u svim uzorcima. Najniža brojnost je iznosila $6,77 \times 10^7$ stanica/L u uzorcima B i N nulti dan dok je maksimalna iznosila $1,72 \times 10^9$ stanica/L u kontrolnom uzorku zadnji dan uzorkovanja (Slika 29.a). U nultom i drugom danu uzorkovanja uzorci NV, odnosno N su imali neznantno višu brojnost u odnosu na kontrolu, a od četvrtog dana uzorkovanja do kraja eksperimenta brojnost stanica je bila najveća u kontrolnim uzorcima. Također, od tog dana se u odnosu na kontrolu brojnost smanjivala u uzorcima u nizu B, N i NV. Statistički značajna razlika u brojnosti stanica između kontrolnih uzoraka i NV se pokazala četvrti dan eksperimenta te zadnji dan između uzoraka N i NV u odnosu na kontrolu. Prosječna specifična brzina rasta stanica u uzorcima kontrole, B, N i NV je iznosila 0,457; 0,443; 0,424 i 0,338, prema redoslijedu (Slika 29.b). Broj dioba stanice po danu, odnosno parametar k, je u kontrolnim uzorcima iznosio 0,659, u uzorcima B 0,640, u uzorcima N 0,612 te u uzorcima NV 0,488. U uzorku NV rast stanica je inhibiran 26,04 % dok je u uzorcima N i B inhibiran 7,22 %, odnosno 3,06 %.

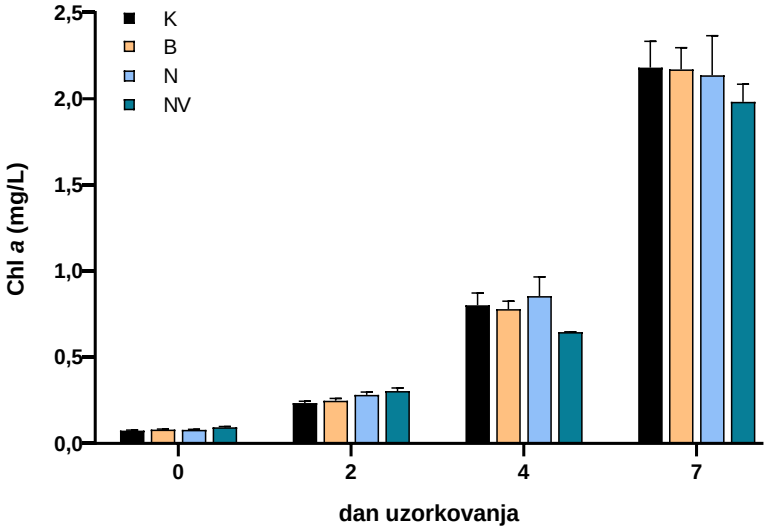


Slika 29. Krivulje rasta stanica *Dunaliella tertiolecta* (a) i specifična brzina rasta stanica (b) u uzorcima kontrole (K), u uzorcima vodenog ekstrakta sBB, u uzorcima smjese modelnih NMAU u koncentraciji 4,14 µg/L (N) i 4140 µg/L (NV). Podaci su srednje vrijednosti (± SD) od triplikata i statističke značajnosti pri ∗p < 0,05, ∗∗p < 0,01, ∗∗∗p < 0,001, ∗∗∗∗p < 0,0001 prema One-way ANOVA testu.

4.5.2. Utjecaj ekstrakta sBB i smjesa modelnih NMAU na kemijski sastav stanica *Dunaliella tertiolecta*

4.5.2.1. Promjena koncentracije Chl a i fotosintetske učinkovitosti

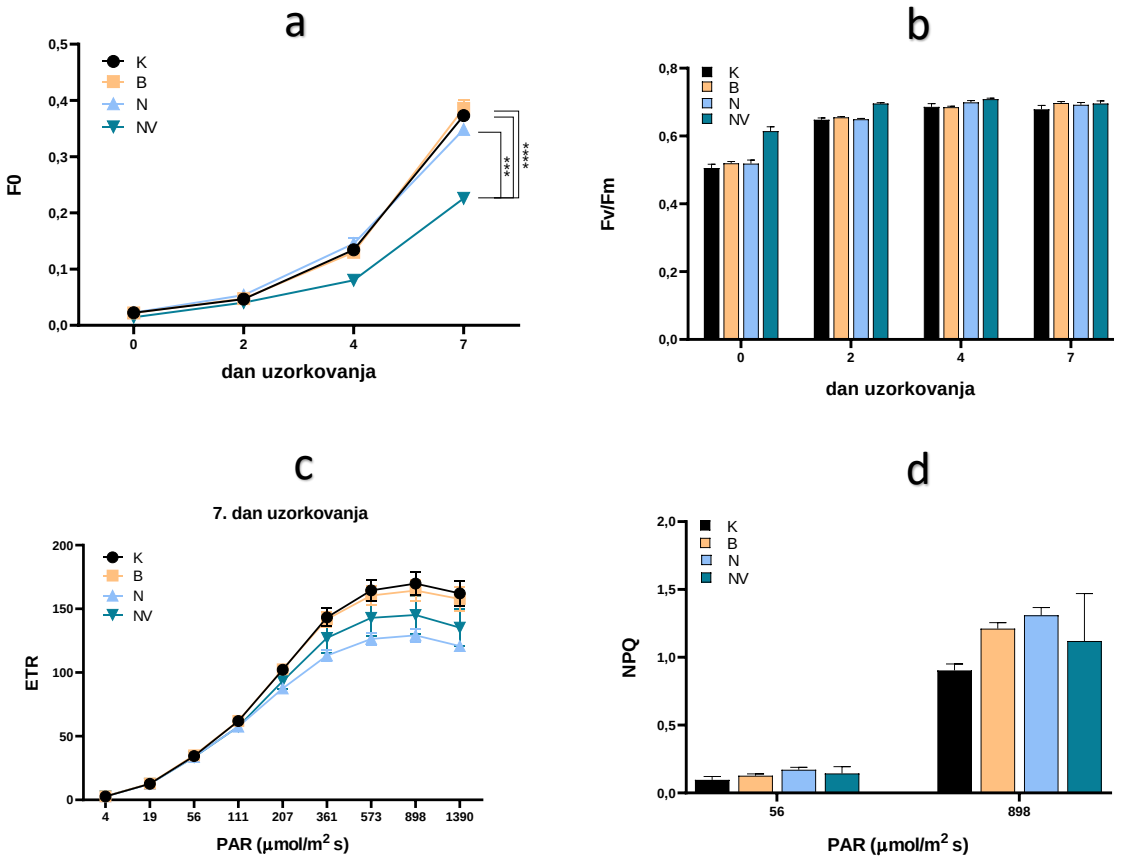
Na Slici 30. se može vidjeti da se koncentracija Chl *a* tijekom trajanja eksperimenta povećavala u svim uzorcima. Najniža koncentracija je izmjerena nulti dan u kontrolnim uzorcima te je iznosila 0,075 ± 0,004 mg/L, dok je najveća bila zadnji dan eksperimenta također u uzorcima kontrole (2,181 ± 0,153 mg/L). Između kontrolnih uzoraka i B su vrijednosti koncentracija Chl *a* tijekom trajanja eksperimenta imale neznantne razlike. Statistički značajna razlika između uzoraka kontrole i NV pokazala se u uzorcima nultog i drugog dana te između kontrolnih uzoraka i N drugog dana, ali četvrtog i sedmog dana eksperimenta više nije bilo statistički značajnih razlika u izmjerenim koncentracijama Chl *a* među uzorcima. Zadnji dan su najnižu koncentraciju Chl *a* imali uzorci NV (1,983 ± 0,102 mg/L).



Slika 30. Promjena koncentracije klorofila *a* (Chl *a*) u uzorcima kontrole (K), u uzorcima vodenog ekstrakta sBB (B), u uzorcima smjese modelnih NMAU u koncentraciji 4,14 µg/L (N) i 4140 µg/L (NV) tijekom inkubacijskog eksperimenta sa monokulturom mikroalge *Dunaliella tertiolecta.* Podatci su srednje vrijednosti (± SD) od triplikata.

Mjerenja minimalnog intenziteta fluorescencije (F0) su pokazala usklađenost sa koncentracijom Chl *a*, odnosno sa krivuljom rasta *Dunaliella tertiolecta* (Slika 31.a). Najniža vrijednost određena je nulti dan u uzorku NV dok je najveća vrijednost određena sedmi dan u uzorku B i iznosile su 0,0143, odnosno 0,3859. U NV uzorcima su u svim danima uzorkovanja

izmjerene najniže vrijednosti. Između kontrolnih uzoraka i B tijekom trajanja eksperimenta nije bilo statistički značajnih razlika, te su oba zadnji dan pokazali istu statistički značajnu razliku u odnosu na uzorak NV ($p < 0,0001$). Praćenje maksimalne učinkovitosti fotosustava II (F_v/F_m) (Slika 31.b) populacije mikroalgi je pokazalo da na kraju eksperimenta nije bilo statistički značajne razlike između kontrolnih uzoraka i uzoraka B, N i NV. Isto tako, rezultati dobiveni za ETR (Slika 31.c) u rasponu intenziteta svjetlosti 4 – 1390 PAR (µmol/m^2 s) su pokazali da nije bilo značajne razlike između tretiranih uzoraka u odnosu na kontrolne. Također, rezultati praćenja NPQ pri niskom (56 PAR) i visokom intenzitetu svjetlosti (898 PAR) nisu pokazali statistički značajne razlike između kontrolnih uzoraka i uzoraka B, N i NV (Slika 31.d).

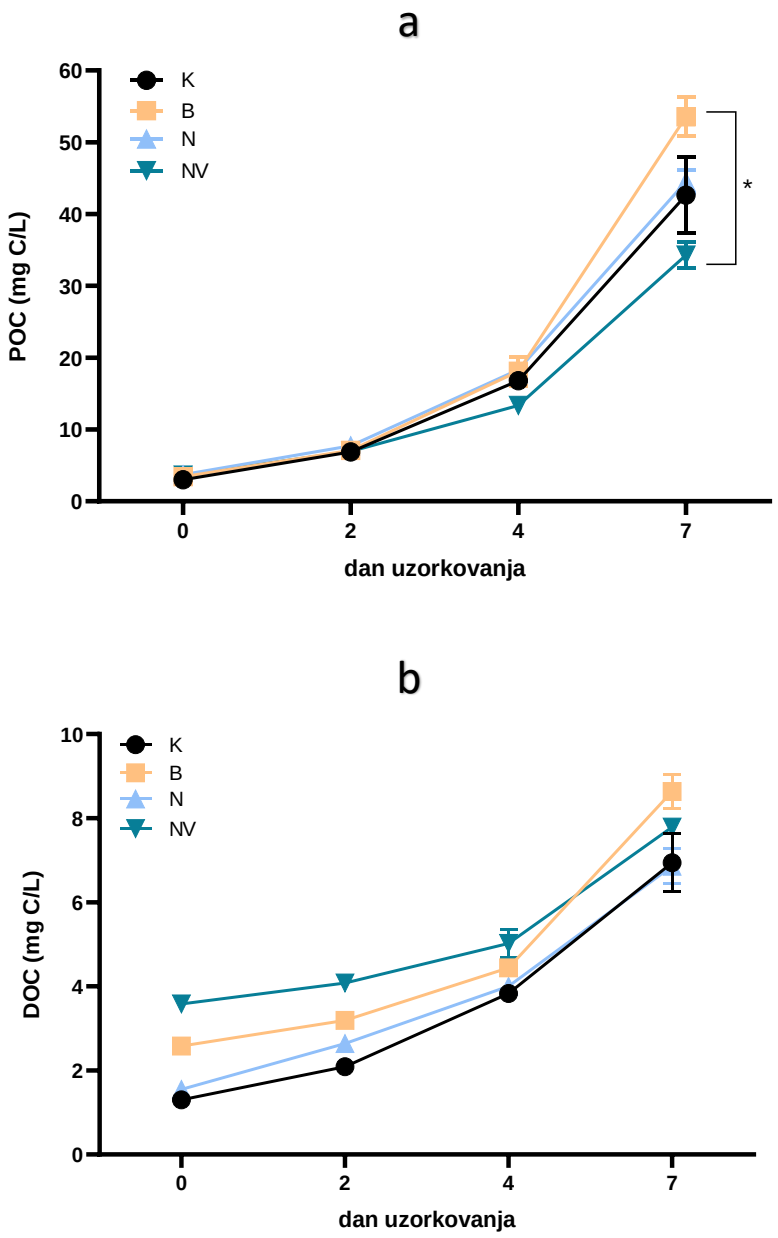


Slika 31. Promjena minimalnog intenziteta fluorescencije (F0) (a), maksimalne učinkovitosti fotosustava II (F_v/F_m) (b), relativne stope prijenosa elektrona (ETR) (c) i nefotokemijskog prigušivanja svjetlosti (NPQ) (d) u uzorcima kontrole (K), u uzorcima vodenog ekstrakta sBB (B), u uzorcima smjese modelnih NMAU u koncentraciji 4,14 µg/L (N) i 4140 µg/L (NV) tijekom inkubacijskog eksperimenta sa monokulturom mikroalgi *Dunaliella tertiolecta*. Podatci su srednje vrijednosti (± SD) od triplikata.

4.5.2.2. Promjena koncentracije organskog ugljika

Tijekom trajanja eksperimenta koncentracija POC se povećavala u svim uzorcima (Slika 32.a). Najniža koncentracija je izmjerena u uzorcima kontrole nulti dan i iznosila je 2,986 ± 0,078 mg C/L, a najveća u uzorcima B zadnji dan uzorkovanja, 53,560 ± 2,750 mg C/L. U nultom danu, odnosno u uzorcima uzorkovanima odmah nakon dodatka analita su se vrijednosti POC u svim tretiranim uzorcima statistički značajno razlikovale od kontrolnog uzorka. U svim preostalim uzorkovanjima se vrijednosti više nisu statistički značajno razlikovale od kontrole.

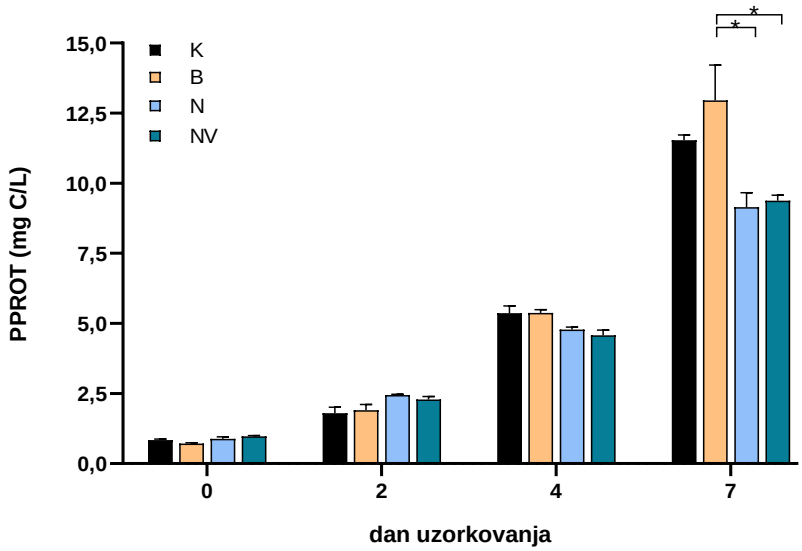
Vrijednosti DOC koncentracija su također rasle u svim uzorcima tijekom sedmodnevne inkubacije (Slika 32.b). Prema dobivenim vrijednostima za DOC u uzorcima nultog dana eksperimenta, odnosno, u uzorcima uzorkovanima odmah nakon dodatka analita uočeno je da su B, N i NV utjecali na povećanje DOC u odnosu na uzorke kontrole. Najniža koncentracija DOC je izmjerena nulti dan u uzorcima kontrole i iznosila je 1,302 ± 0,005 mg C/L, a najveća u uzorcima B zadnji dan uzorkovanja, 8,636 ± 0,404 mg C/L. Zadnji dan eksperimenta se izmjerene vrijednosti tretiranih uzoraka više nisu značajno razlikovale u odnosu na kontrolu.



Slika 32. Koncentracije čestičnog organskog ugljika (POC) (a) i otopljenog organskog ugljika (DOC) (b) u uzorcima kontrole (K), u uzorcima vodenog ekstrakta sBB (B), u uzorcima smjese modelnih NMAU u koncentraciji 4,14 µg/L (N) i 4140 µg/L (NV) tijekom inkubacijskog eksperimenta sa monokulturom mikroalge *Dunaliella tertiolecta.* Podaci su srednje vrijednosti (± SEM) od triplikata i statističke značajnosti pri $p < 0,05$ (*) prema One-way ANOVA testu.

4.5.2.3. Promjena koncentracije proteina, ugljikohidrata i lipida

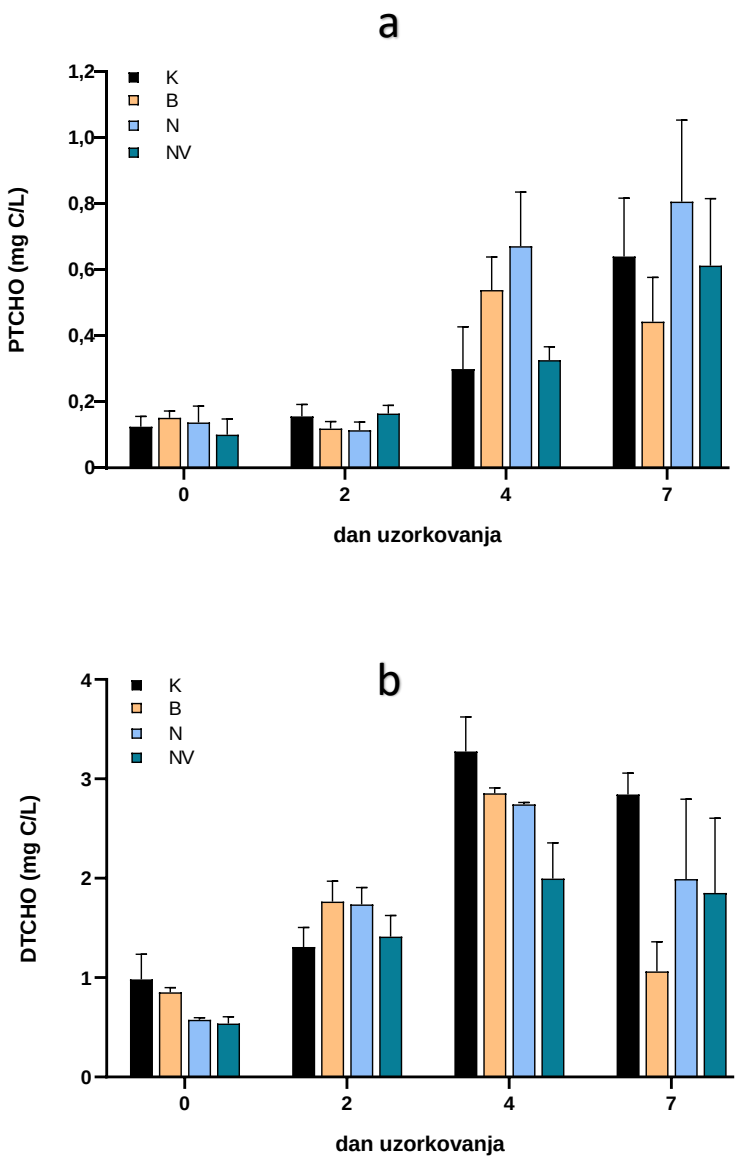
Koncentracije čestičnih proteina (PPROT) su od nultog do sedmog dana rasle u svim uzorcima (Slika 33.). Najniža koncentracija je bila nulti dan u uzorku B i iznosila je 0,711 ± 0,032 mg C/L dok je u istim uzorcima izmjerena i najveća vrijednost zadnji dan eksperimenta i iznosila je 12,954 ± 1,259 mg C/L. Zadnji dan eksperimenta vrijednosti uzoraka B, N i NV se nisu statistički značajno razlikovale u odnosu na kontrolu. Ipak, koncentracija proteina u N i NV uzorcima bila je četvrti i sedmi dan manja nego u uzorcima kontrole i B.



Slika 33. Promjena koncentracije čestičnih proteina (PPROT) u uzorcima kontrole (K), u uzorcima vodenog ekstrakta sBB (B), u uzorcima smjese modelnih NMAU u koncentraciji 4,14 µg/L (N) i 4140 µg/L (NV) tijekom inkubacijskog eksperimenta sa monokulturom mikroalge *Dunaliella tertiolecta.* Podaci su srednje vrijednosti (± SEM) od triplikata i statističke značajnosti pri $p < 0,05$ (*) prema One-way ANOVA testu.

Prilikom mjerenja otopljenog proteinskog materijala CPS metodom dobiveni su veliki pikovi te je radi gornjeg limita detekcije uzorke bilo potrebno razrjeđivati kao i prilagođavati t_a i *stripping* struju za svaki uzorak (Strmečki i sur., 2024). Optimiziranje struje i vremena akumulacije je provedeno obzirom da je pri nižoj jakosti struje metoda osjetljivija, ali je ponekad dobiveni pik prevelik i ne može se detektirati jer izlazi iz područja mjerenih potencijala, dok je kod viših struja metoda manje osjetljiva te se t_a treba povećati da bi se pik mogao detektirati. Unatoč provedenim postupcima pokušaja detektiranja pika H, zbog velike količine proteinskog materijala u uzorcima, njihova se količina nije mogla kvantificirati.

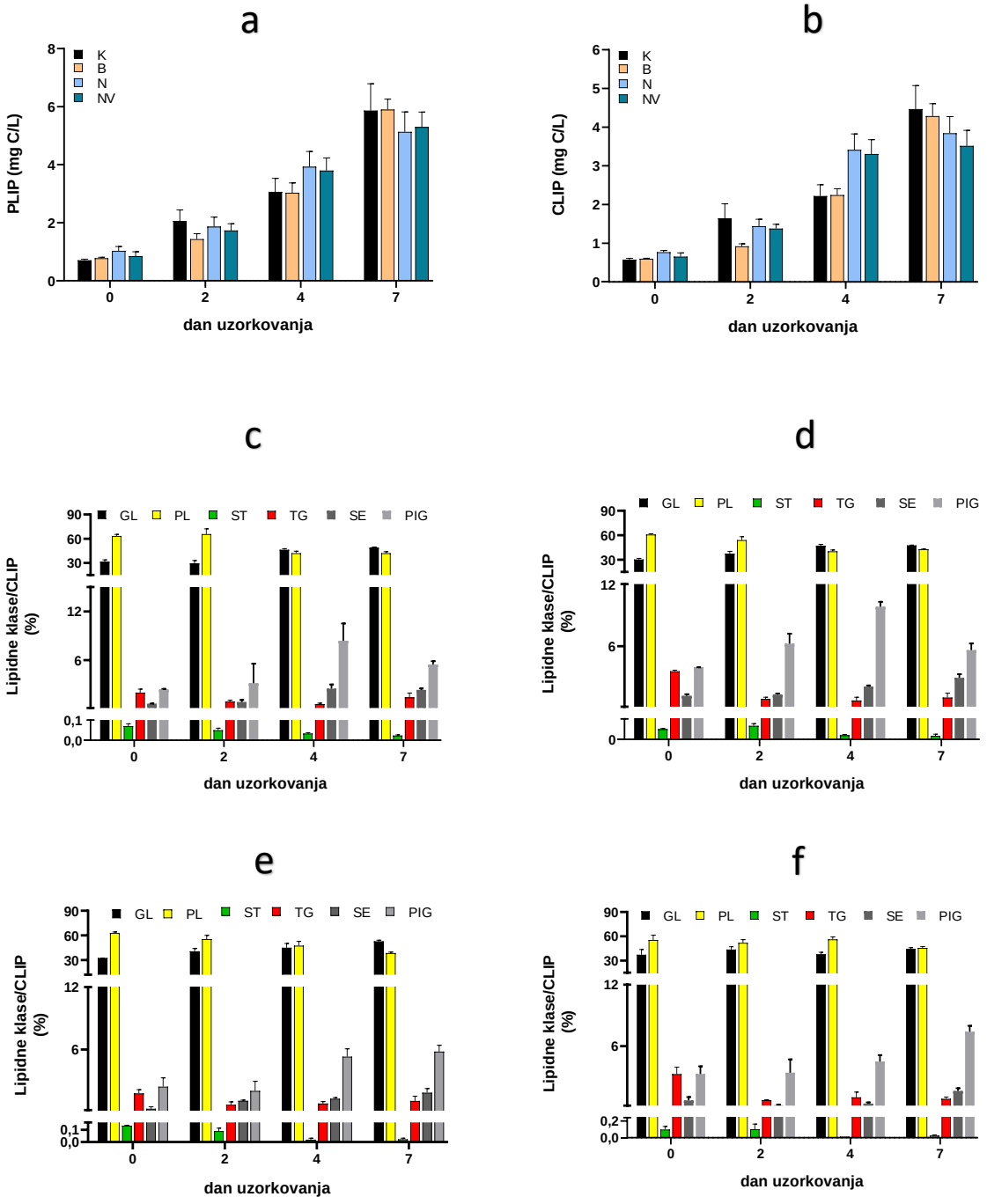
Koncentracije PTCHO su u svim uzorcima, osim u uzorcima B, rasle do završetka eksperimenta (Slika 34.a). Koncentracije u uzorcima B su se u odnosu na četvrti dan smanjile, ali niti jedan dan nisu pokazane statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu. Koncentracije DTCHO su u svim uzorcima rasle do četvrtog dana eksperimenta. Zadnji dan su u svim uzorcima izmjerene niže vrijednosti u odnosu na četvrti dan, ali tijekom cijelog eksperimenta nisu izmjerene statistički značajne razlike u vrijednostima DTCHO u odnosu na kontrolne uzorke (Slika 34.b).



Slika 34. Promjena koncentracije ukupnih čestičnih ugljikohidrata (PTCHO) (a) i ukupnih otopljenih ugljikohidrata (DTCHO) (b) u uzorcima kontrole (K), u uzorcima vodenog ekstrakta sBB (B), u uzorcima smjese modelnih NMAU u koncentraciji 4,14 µg/L (N) i 4140 µg/L (NV) tijekom inkubacijskog eksperimenta sa monokulturom mikroalge *Dunaliella tertiolecta.* Podaci su srednje vrijednosti (± SEM) od triplikata.

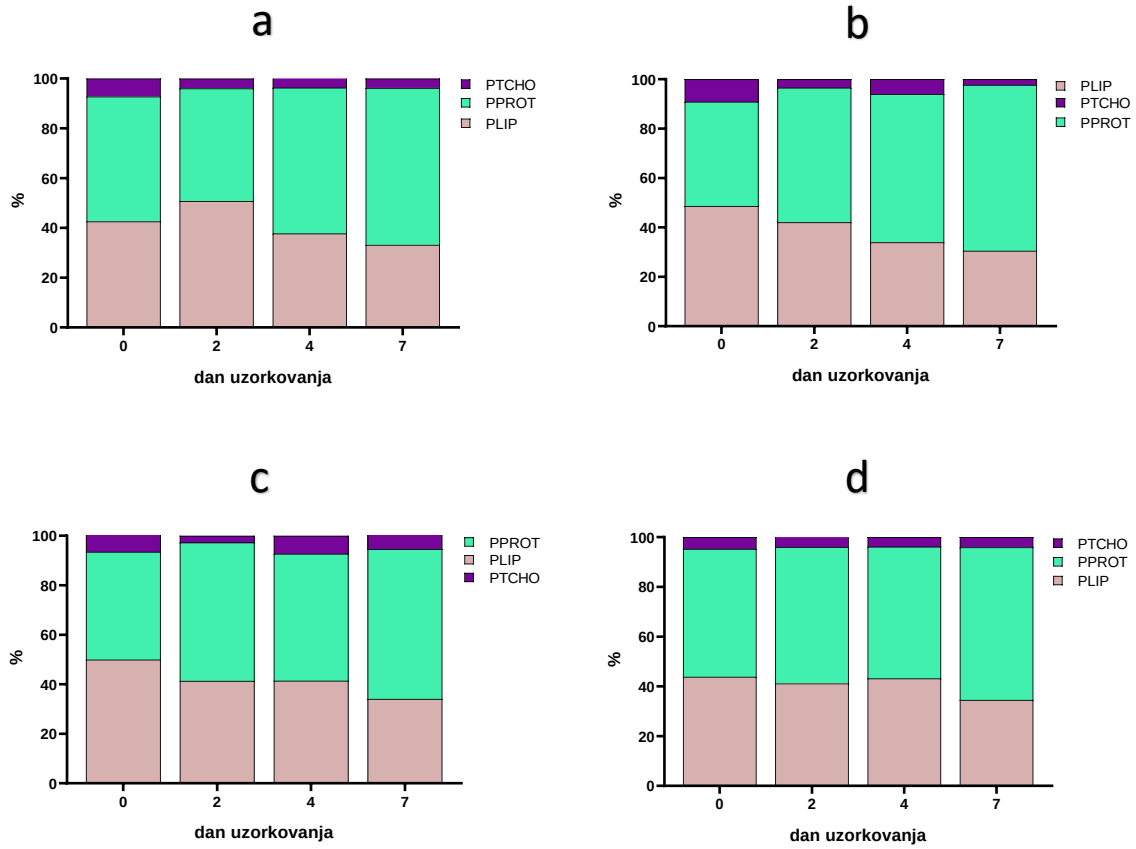
Koncentracije ukupnih čestičnih lipida (PLIP) su od nultog do sedmog dana rasle u svim uzorcima (Slika 35.a). Najniža koncentracija je izmjerena nulti dan u kontrolnim uzorcima i iznosila je 0,707 ± 0,039 mg C/L, a najviša posljednji dan eksperimenta u uzorcima B (5,900 ± 0,361 mg C/L). Isti trend porasta koncentracije prema završetku eksperimenta su pokazali rezultati koncentracije staničnih lipida (CLIP) u koje spadaju membranski (GL, PL, ST i PIG) i skladišni (SE i TG) lipidi (Slika 35.b). Najniža koncentracija je izmjerena nulti dan u kontrolnim uzorcima i iznosila je 0,573 ± 0,035 mg C/L, a najviša posljednji dan eksperimenta također u kontronim uzorcima (4,470 ± 0,607 mg C/L). Tijekom cijelog eksperimenta nisu izmjerene statistički značajne razlike u koncentraciji PLIP i CLIP u uzorcima B, N i NV u odnosu na kontrolne uzorke.

Udio lipidnih klasa u CLIP za kontrolne uzorke, B, N i NV prikazan je na Slici 35.c, d, e i f, redoslijedom kako su navedeni. U svim uzorcima su u nultom danu bili najviši udjeli PL (PG + PE + PC), od 55,4 ± 5,9 do 63,5 ± 1,9 %, dok je u zadnjem uzorkovanju njihov udio bio niži te je iznosio od 38,5 ± 1,1 do 45,7 ± 1,6 %. Udio GL (MGDG+DGDG+SQDG) je porastao tijekom eksperimenta. U nultom danu je iznosio od 30,3 ± 1,3 do 37,3 ± 6,4 %, dok je u zadnjem danu bio od 44,4 ±1,5 do 52,8 ±1,4 %. Udjeli lipidnih klasa u uzorcima B, N i NV se nisu statistički značajno razlikovali od kontrolnih uzoraka.



Slika 35. Promjena koncentracije ukupnih čestičnih lipida (PLIP) (a), staničnih čestičnih lipida (CLIP) (b) u uzorcima kontrole (K), u uzorcima vodenog ekstrakta sBB (B), u uzorcima smjese modelnih NMAU u koncentraciji 4,14 µg/L (N) i 4140 µg/L (NV) tijekom inkubacijskog eksperimenta sa monokulturom mikroalge *Dunaliella tertiolecta* te udjela klasa lipida u CLIP u K (c), u B (d), u N (e) i u NV (f). Podaci su srednje vrijednosti (± SEM) od triplikata.

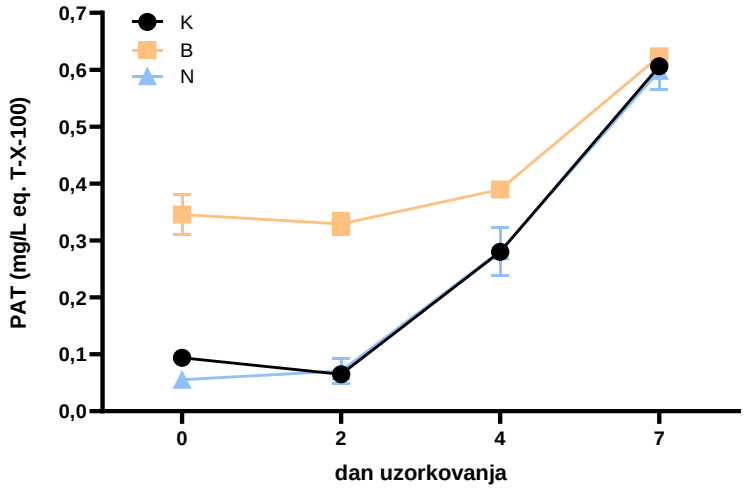
Na Slici 36. su prikazani udjeli PPROT, PTCHO i PLIP u stanicama i vidi se da su u nultom danu eksperimenta PLIP predstavljali najveći udio u svim uzorcima, te da se prema kraju eksperimenta njihova količina smanjila. Slično je i kod PPROT koji su unatoč smanjenju na kraju eksperimenta imali veći udio od PLIP, odnosno najveći udio u čestičnoj tvari od svih uzoraka. Na početku eksperimenta količine PLIP i PPROT su u uzorcima bile u rasponu 10,2 – 15,1 pg C/stanica, odnosno 10,7 – 13,2 pg C/stanica. Zadnji dan eksperimenta količina PLIP bila je u rasponu 3,4 – 6,4 pg C/stanica (30 – 50 %), dok je količina PPROT bila u rasponu 6,4 – 11,4 pg C/stanica (42 – 67 %). Udio PTCHO je tijekom cijelog eksperimenta bio najmanji u odnosu na udjele PLIP i PPROT te se također, tijekom eksperimenta smanjio. Raspon koncentracija PTCHO je bio od 0,29 do 2,3 pg C/stanica (2 – 9 %).



Slika 36. Udio čestičnih proteina (PPROT), ukupnih čestičnih lipida (PLIP) i ukupnih čestičnih ugljikohidrata (PTCHO) u stanicama u uzorcima kontrole (K) (a), u uzorcima vodenog ekstrakta sBB (B) (b), u uzorcima smjese modelnih NMAU u koncentraciji 4,14 µg/L (N) (c) i 4140 µg/L (NV) (d) tijekom inkubacijskog eksperimenta sa monokulturom mikroalgi *Dunaliella tertiolecta*. Podaci su srednje vrijednosti od triplikata.

4.5.2.4. Promjena koncentracije površinski aktivnih tvari (PAT)

Koncentracije PAT praćene tijekom inkubacijskog eksperimenta s mikroalgom *Dunaliella tertiolecta* su prikazane na Slici 37. Vrijednosti PAT za uzorak NV nisu prikazane jer je visoka koncentracija dodanih NMAU (4140 µg/L) uzrokovala vrlo velik desorpcijski pik u ACV zbog poznatog faradejskog procesa redukcije nitro skupine u amino skupinu na istom potencijalu (oko E_p -0,6 V) (Fischer i sur., 2007; Vidović i sur., 2019). Stoga je dobiven širok pik onemogućavao mjerenje stvarne vrijednosti kapacitivne struje kao posljedice adsorpcije organske tvari u NV uzorcima, dok je u ostalim inkubacijskim uzorcima određena koncentracija PAT. Najniža koncentracija PAT je izmjerena u uzorcima N nulti dan, a najveća u uzorcima B, zadnji, sedmi dan uzorkovanja te su iznosile 0,056 ± 0,013 mg/L eq. T-X-100, odnosno 0,624 ± 0,004 mg/L eq. T-X-100. U kontrolnim uzorcima i uzorcima N dobivene vrijednosti za koncentraciju PAT su rasle tijekom inkubacije te su bile gotovo identične za sva četiri uzorkovanja. Vrijednosti dobivene za uzorak B nulti dan bile su više od ostalih jer je samim dodatkom analita dodan i PAT koji nije oduzet u prikazu rezultata. U navedenom uzorku su tijekom eksperimenta vrijednosti također rasle. Zadnji dan eksperimenta nije bilo statistički značajne razlike među uzorcima u odnosu na kontrolne uzorke.

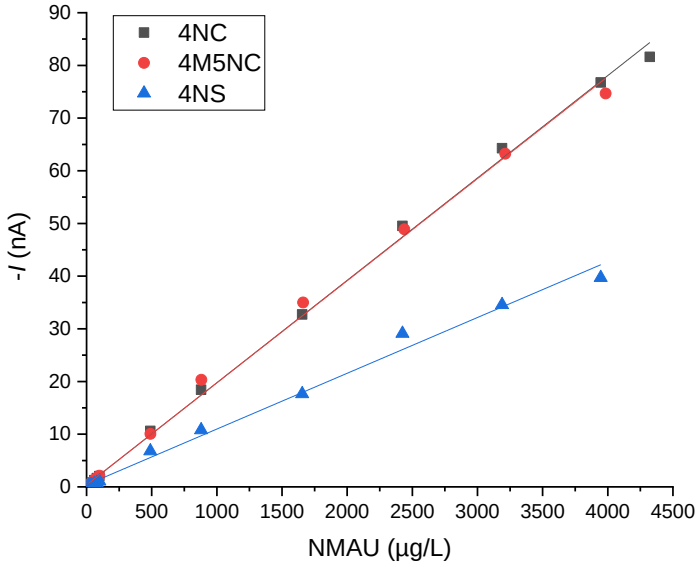


Slika 37. Promjena koncentracije površinski aktivnih tvari (PAT) u uzorcima kontrole (K), u uzorcima vodenog ekstrakta sBB (B) i u uzorku smjese modelnih NMAU u koncentraciji 4,14 µg/L (N) tijekom inkubacijskog eksperimenta sa monokulturom mikroalgi *Dunaliella tertiolecta*. Podaci su srednje vrijednosti (± SEM) od triplikata.

Dobivena je statistički značajna pozitivna korelacija koncentracija DOC i PAT ($r = 0,98$, $p < 0,05$). Izračunata NPA je zadnji dan eksperimenta u uzorcima K, B i N bila u rasponu od 0,07 do 0,09.

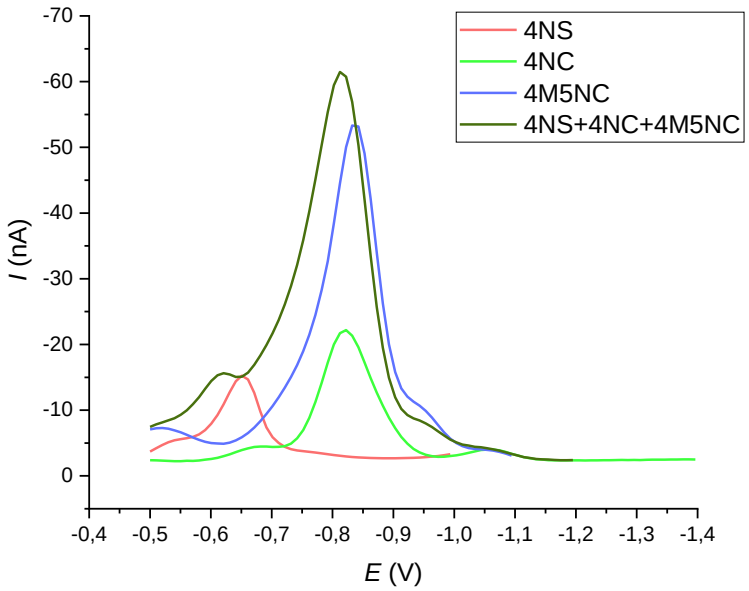
4.5.2.5. Elektrokemijska detekcija NMAU spojeva u inkubacijskim uzorcima

Obzirom da je dokazano da redukcija nitro skupina na aromatskom prstenu omogućava elektrokemijsku detekciju različitih nitro-aromatskih spojeva kao što su µM koncentracije nitrofenola (Fischer i sur., 2007) i tragovi nitriranih PAH (Vyskočil i Barek, 2011), istraženo je elektrokemijsko praćenje koncentracije NMAU u uzorcima inkubacije. Za ispitivanje detekcije NMAU rađeni su kalibracijski pravci modelnih spojeva 4NC, 4M5NC i 4NS (Slika 38.). Pri tome je kao elektrolit korišteno 25 mL mora (prethodno profiltrirano i UV zračeno da se ukloni sva organska komponenta) u koji je dodavana određena koncentracija modelnog spoja. Kalibracija je napravljena u rasponu od 0,25 µg/L do 4322,68 µg/L za 4NC, odnosno 3984,37 µg/L za 4M5NC te 3946,03 µg/L za 4NS. Iz Slike 38. se može vidjeti linearni porast struje sa koncentracijom pojedinog analita s faktorom linearnosti $R^2 = 0,99$. Obzirom da se kalibracijski pravci dobiveni za 4NC i 4M5NC podudaraju (Slika 38.) pokazano je da se u njihovoj smjesi ne može kvantificirati pojedini spoj.



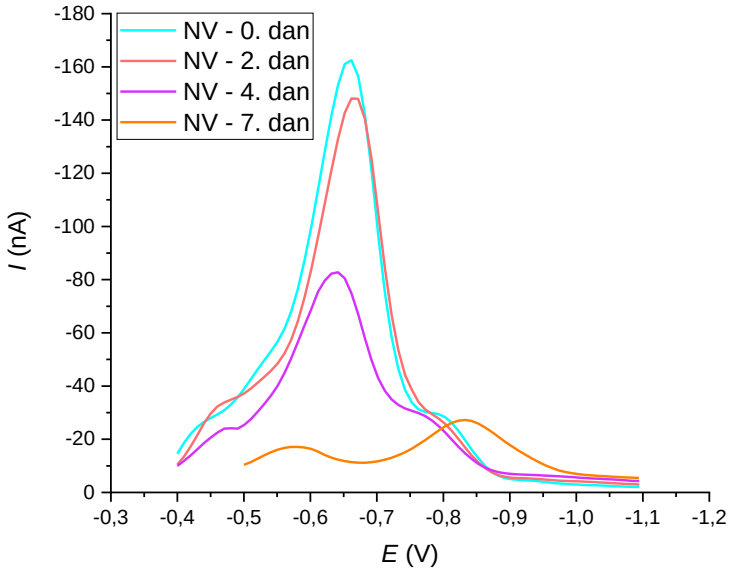
Slika 38. Kalibracijski pravci ovisnosti vršne struje pika o koncentraciji 4NC, 4M5NC i 4NS. Uvjeti mjerenja: potencijal akumulacije E_a -0,5 V, vrijeme akumulacije t_a 1 s, frekvencija f 77 Hz, amplituda a 49,95 mV, i korak potencijala E_s 10 mV.

Na Slici 39. su prikazani voltamogrami pojedinačnih spojeva koje smo koristili u inkubacijskom eksperimentu i njihove smjese u koncentraciji u kojoj su dodani u uzorak NV (2,5 mg/L 4M5NC, 0,8 mg/L 4NC i 0,6 mg/L 4NS). Pikovi su posljedica redukcije nitro skupine što je objašnjeno u 4.6. Pikovi dobiveni za spojeve 4NC i 4M5NC se pojavljuju na istom potencijalu (E_p ~ -0,85 V) što onemogućuje njihovu pojedinačnu detekciju u smjesi dok se pik za 4NS pojavljuje na E_p ~ -0,6 V. Redukcija nitro skupine smjese tih NMAU daje dva pika koji se poklapaju sa pikovima dobivenima za pojedinačne spojeve.



Slika 39. DP voltamogrami 4NS, 4NC, 4M5NC i njihove smjese u modelnom elektrolitu, morskoj vodi. Uvjeti mjerenja u DP: E_a -0,5 V, t_a 1 s, f 77 Hz, a 49,95 mV, i E_s 10 mV.

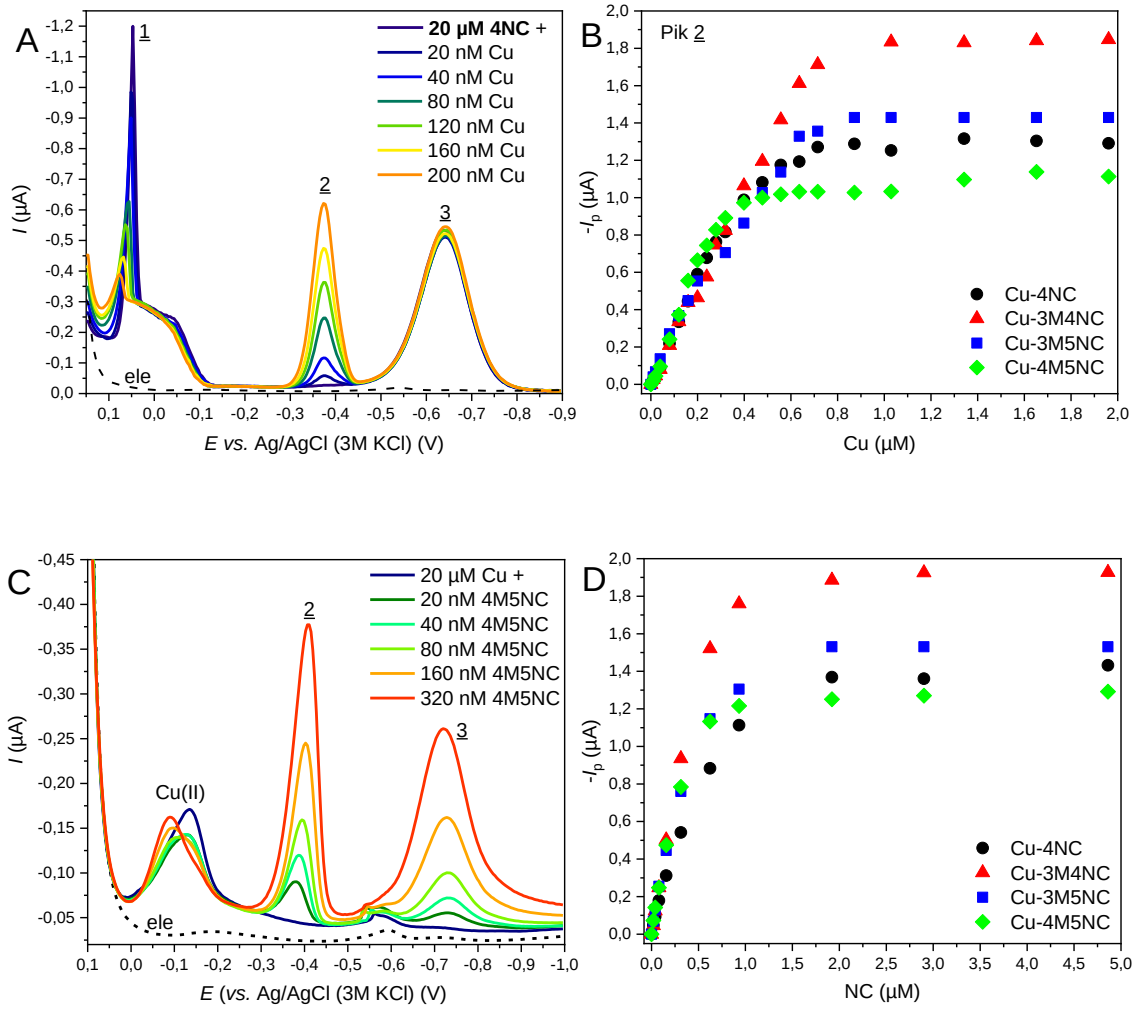
Mjerenjem uzoraka NV tijekom svakog uzorkovanja, odnosno 0., 2., 4. i 7. dan uočeno je smanjenje visine pika redukcije (Slika 40.) te njegovo pomicanje prema negativnijem potencijalu. Smanjenje vršne struje pikova dokazuje da se njihova koncentracija smanjivala. To je u skladu sa uočenim smanjenjem intenziteta boje NV uzoraka od početka do kraja inkubacije. Dodatno je ispitan sedmodnevni utjecaj svjetla u komori za uzgoj na promjenu boje NMAU prisutnih u otopini u koncentracijama kao i u NV uzorcima, ali bez prisustva stanica tijekom čega nije došlo do promjene intenziteta boje otopine.



Slika 40. DP voltamogrami uzoraka NV nulti, drugi, četvrti i sedmi dan uzorkovanja. Uvjeti mjerenja u DP: E_a -0,5 V, t_a 1 s, f 77 Hz, a 49,95 mV, i E_s 10 mV.

4.6. Elektrokemijska karakterizacija Cu(II)-NC kompleksa

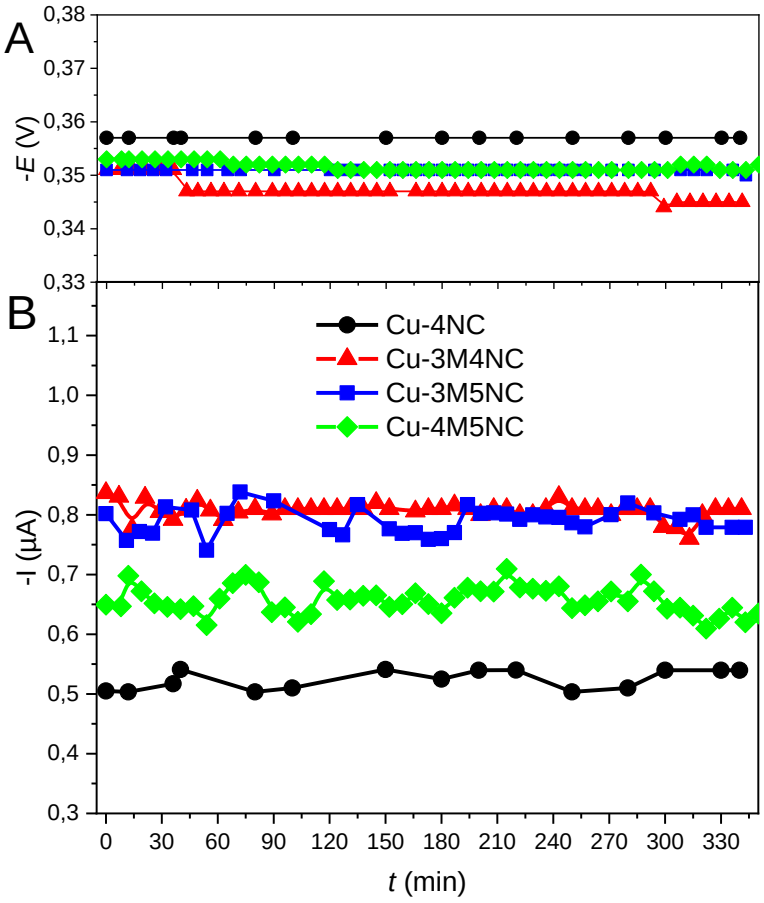
SW voltamogrami snimljeni u samom elektrolitu (0,1 M KNO_3, 0,05 M pufer HEPES, pH 8,2) pokazali su da je on u ispitivanom rasponu potencijala (+0,05 V do -1,0 V) bio elektrokemijski neaktivan (Slika 41.A, C). Zatim smo testirali redukcijske procese samih analita. Mjerenjem NC dobivena su dva različita pika: pik 1 (E_p ~ 0,0 V) koji odgovara redukciji adsorbiranih Hg-NC kompleksa (Vukosav i sur., 2012) i pik 3 (E_p ~ -0,6 V) koji odgovara redukciji nitro skupine (Fischer i sur., 2007; Vidović i sur., 2019) (Slika 41.A, C). Pri snimanju voltamograma u otopini koja je sadržavala samo Cu(II) (do 20 μM) dobiven je jedan pik na E_p ~ -0,1 V koji odgovara redukciji slobodnih Cu(II) iona (Slika 41.C).



Slika 41. A) SW voltamogrami 20 μM 4NC (tamnoplava linija) s rastućim koncentracijama Cu(II). Isprekidana linija predstavlja elektrolit (0,1 M KNO_3, 0,05 M HEPES, pH 8,2). B) Visina SW pika 2 za Cu(II)-NC komplekse (20 μM NC) kao funkcija koncentracije Cu(II). C) SW voltamogrami 20 μM Cu(II) (tamnoplava linija) s rastućim koncentracijama 4M5NC. D) Ovisnost visine pika 2 (20 μM Cu(II)) o koncentraciji NC. Uvjeti mjerenja u SW: E_a 0,0 V, t_a 60 s, f 50 Hz, E_{sw} 25 mV i E_s 4 mV.

4.6.1. Utjecaj koncentracije Cu(II) i NC na stvaranje kompleksa

Dodatkom 0,01 – 2,00 µM Cu(II) u otopinu koja sadrži 20 µM 4NC, 3M4NC, 3M5NC ili 4M5NC pri pH 8,2 (E_a 0,0 V, t_a 60 s), SW voltamogrami su pokazali smanjenje pika 1, nepromijenjen pik 3 te pojavu novog pika (pika 2) (Slika 41.A). Pojava pika 2 se može pripisati redukciji kompleksa $[Cu(NC)_2]^{2-}$ jer je u literaturi za smjesu Cu(II)-4NC opisan nastanak kompleksa $[Cu(4NC)_2]^{2-}$ u vodenoj otopini 0,1 M KNO_3 pri blago alkalnom pH (An i sur., 2022; Sever i Wilker, 2004). Pik 2 je bio na potencijalu E_p -0,357 V za $[Cu(4NC)_2]^{2-}$, -0,351 V za $[Cu(3M4NC)_2]^{2-}$ i $[Cu(3M5NC)_2]^{2-}$ te -0,352 V za $[Cu(4M5NC)_2]^{2-}$ (Slika 42.).



Slika 42. Stabilnost Cu(II)-NC kompleksa (20 µM NC, 0,2 µM Cu(II)) u uzastopnim mjerenjima tijekom perioda od šesti sati u SWV pri uvjetima E_a 0,0 V, t_a 60 s, f 50 Hz, E_{sw} 25 mV, E_s 4 mV, pH 8.2.

Nepromijenjeni pik 3 ukazuje na to da Cu(II) nije interagirao s nitro skupinom. Ovisnost vršne struje (I_p) pika 2 o koncentraciji Cu(II) je bila linearna pri nižim koncentracijama Cu(II), odnosno do 0,40 µM Cu(II) za $[Cu(4NC)_2]^{2-}$, 0,64 µM za [$Cu(3M4NC)_2]^{2-}$ i $[Cu(3M5NC)_2]^{2-}$ te 0,32 µM za $[Cu(4M5NC)_2]^{2-}$ (Slika 41.A i B). Pri višim koncentracijama Cu(II) došlo je do maksimalne pokrivenosti površine elektrode nastalim kompleksima što je dovelo do zasićenja elektrode te se visina pikova više nije mijenjala (Dalal, 2017). Graf linearne ovisnosti visine pika 2 o koncentraciji Cu(II) prolazi kroz ishodište što pokazuje da su se $[Cu(NC)_2]^{2-}$ kompleksi formirali u otopini, a ne na površini elektrode. Također, nepromjenjivost potencijala pika 2 povećanjem koncentracije Cu(II) ukazuje na stvaranje stabilnog kompleksa, bez promjena u koordinacijskoj sferi Cu(II).

U drugom eksperimentu, u otopinu koja je sadržavala koncentraciju Cu(II) od 20 µM postupno su dodavani pojedinačni NC u rasponu koncentracija od 0,02 do 5 µM. Ovisnost I_p o koncentraciji NC pika 2 (Slika 41.C i D) pokazuje linearnu ovisnost do 0,31 µM 4NC ili 3M4NC i do 0,16 µM 3M5NC ili 4M5NC što je praćeno pomakom pika za ~30 mV prema negativnijim potencijalima. Pri višim koncentracijama NC, visina i potencijal pika 2 su dosegnuli plato, što ukazuje na zasićenje površine elektrode akumuliranim kompleksom. Odsutnost dodatnih pikova ukazuje da nijedna polinuklearna vrsta nije nastala pri uvjetima u kojima je [Cu] >> [NC], što je u skladu s prethodnim istraživanjima za Cu(II)-4NC kompleks (Jameson i Wilson, 1972).

4.6.2. Relativna stabilnost Cu(II)-NC kompleksa

Kinetička stabilnost $[Cu(NC)_2]^{2-}$ kompleksa ispitivana je pri pH 8,2 uzastopnim snimanjem SWV pika 2 otopine koja je sadržavala 0,2 µM Cu(II) i 20 µM NC (4NC, 3M4NC, 3M5NC ili 4M5NC) tijekom razdoblja od šest sati. Tijekom tog perioda uočene su minimalne promjene potencijala pika (Slika 42.), što ukazuje da su kompleksi $[Cu(NC)_2]^{2-}$ kinetički stabilni tijekom ispitivanog razdoblja te da su vjerojatno stabilni i tijekom duljeg perioda od ispitivanog.

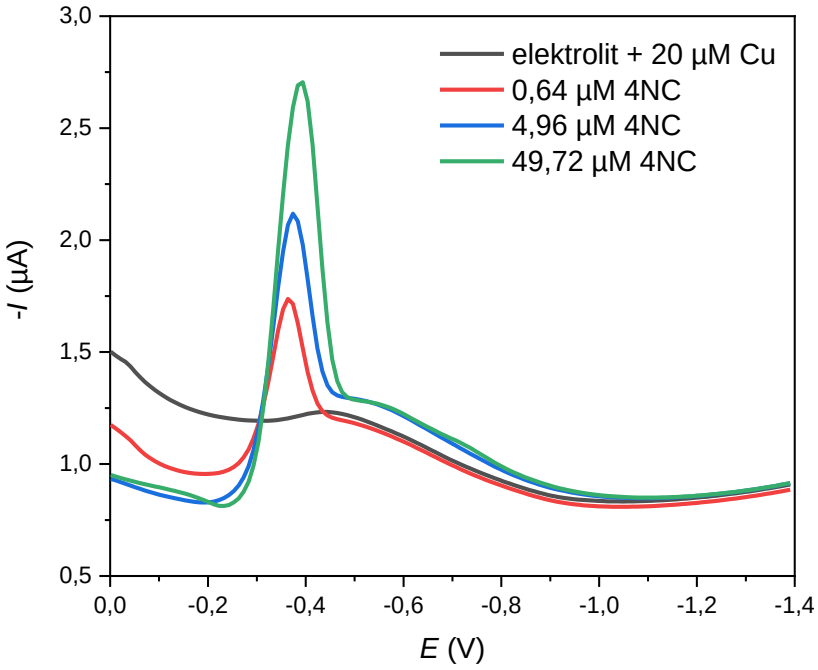
Nadalje, kako bi se ispitao utjecaj nitro skupine na kateholnom prstenu na stabilnost kompleksa uspoređena je relativna stabilnost kompleksa Cu(II)-NC i Cu(II)-CAT. Otprije je poznato da Cu(II) ioni u vodenoj otopini vežu jednu ili dvije molekule CAT tvoreći planarne kvadratne četverokoordinacijske Cu(II) komplekse: mono-kateholate [Cu(CAT)] i di-kateholate $[Cu(CAT)_2]^{2-}$, gdje je CAT prisutan kao dianion ($(CAT)^{2-}$) (An i sur., 2022; Sever i

Wilker, 2004). Određene su njihove konstante stabilnosti koje iznose log K_1 = 10,9 za [Cu(CAT)] i log K_2 = 13,8 za $[Cu(CAT)_2]^{2-}$ (Jameson i Wilson, 1972b, 1972a). U našim eksperimentima pik 2 dobiven za Cu(II)-CAT predstavlja formiranje $[Cu(CAT)_2]^{2-}$ kompleksa. Pojava pika 2 Cu(II)-NC kompleksa na negativnijem potencijalu od pika kompleksa Cu(II)-CAT ukazuje da su Cu(II)-NC stabilniji kompleksi jer zahtijevaju veću energiju za elektrokemijsku redukciju. Utvrđeno je da je stabilnost $[Cu(NC)_2]^{2-}$ kompleksa slična među testiranim NC spojevima i viša od stabilnosti Cu(II)-CAT kompleksa s redoslijedom stabilnosti ovisno o ligandu: 4M5NC ≈ 3M5NC ≈ 3M4NC ≈ 4NC (E_p u rasponu od -0,351 do -0,357 V) > CAT (E_p = -0,266 V). Veća stabilnost $[Cu(NC)_2]^{2-}$ u usporedbi s $[Cu(CAT)_2]^{2-}$ se može pripisati jakom učinku privlačenja elektrona nitro skupine što povećava kiselost 1,2-dihidroksi skupina slabljenjem O–H veza (Cornard i sur., 2005). Iako metilna skupina može donirati elektrone i povećati gustoću elektrona na benzenskom prstenu suprotstavljajući se učinku privlačenja elektrona nitro skupine, uočene su zanemarive razlike u stabilnosti između Cu(II)-MNC i Cu(II)-4NC kompleksa. To je vjerojatno posljedica dominantnog učinka nitro skupine na privlačenje elektrona.

4.6.3. Mehanizam redoks procesa

Redoks mehanizam kompleksa $[Cu(NC)_2]^{2-}$ nastalih u otopini 20 µM NC i 0,2 µM Cu, pri pH 8,2, ispitan je SWV i CV metodama. Praćena je ovisnost I_p, E_p i širine pika na polovici njegove visine ($\Delta E_{p/2}$) o frekvenciji (8 – 1000 Hz) i amplitudi (5 – 200 mV) u SWV te o brzini skeniranja (10 – 150 mV) u CV. Redukcijski pik 2 je za sve komplekse $[Cu(NC)_2]^{2-}$ pokazao linearni porast s povećanjem frekvencije: Cu(II)-4NC je imao nagib 11,6 nA s, Cu(II)-3M4NC 6,6 nA s, Cu(II)-3M5NC 5,9 nA s, a Cu(II)-4M5NC od 16,7 nA s. Ovi rezultati sugeriraju da je redukcija slijedila nakon procesa adsorpcije (Mirčeski i sur., 2007; Mirčeski i Lovrić, 1999). Akumulacija koja prethodi redukciji ima ključnu ulogu $[Cu(NC)_2]^{2-}$ u adsorpciji kompleksa na površinu SMDE, a odvija se procesom konvekcije koji je potpomognut miješanjem otopine. Vršna struja pika 2 je iznosila nekoliko nA pri t_a = 1 s, ali je s duljom akumulacijom postupno rasla te je pri t_a = 300 s dostigla vrijednost do µA. Značajno proširenje pika za sve $[Cu(NC)_2]^{2-}$ komplekse, od $\Delta E_{p/2}$ = ~43 mV pri t_a = 1 s do ~100 mV pri t_a = 300 s), zajedno s malim pomakom potencijala pika (4 – 12 mV) prema manje negativnim vrijednostima ukazuje da se duljom akumulacijom akumulira više elektroaktivnih $[Cu(NC)_2]^{2-}$ kompleksa na elektrodi. U frekvencijskom rasponu od 8 – 1000 Hz pik 2 svih $[Cu(NC)_2]^{2-}$ kompleksa se pomaknuo za 53

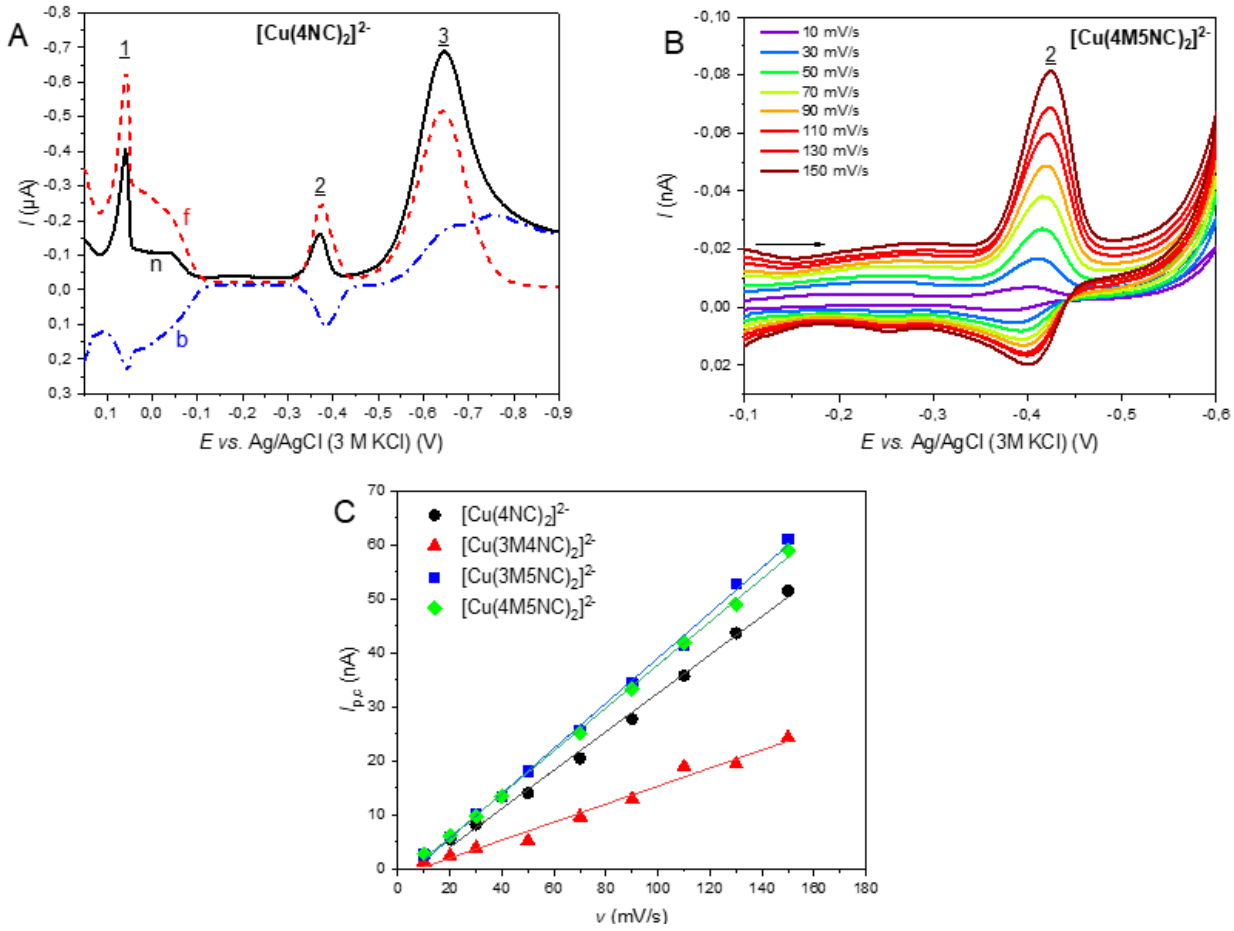
mV prema negativnijim potencijalima, odražavajući kompeticiju/neusklađenost između brzine prijenosa elektrona i brzine skeniranja u SWV (koja je proporcionalna frekvenciji). Ovisnost E_p i log f je pokazala linearni odnos s nagibima od -27,1 mV/dekadska jedinica (d.u.) za $[Cu(4NC)_2]^{2-}$, -23,2 mV/d.u. za $[Cu(3M4NC)_2]^{2-}$, -23,5 mV/d.u. za $[Cu(3M5NC)_2]^{2-}$, i -29,3 mV/d.u. za $[Cu(4M5NC)_2]^{2-}$, što ukazuje da elektrokemijska redukcija nije potpuno reverzibilna, vjerojatno zbog slabe adsorpcije produkta (Mirčeski i sur., 2007). ACV metoda izvan faze je potvrdila da nijedna organska vrsta nije adsorbirana na elektrodi pri potencijalima koji su negativniji od pika 2 jer pri tim potencijalima izostaje smanjenje kapacitivne struje u odnosu na struju osnovnog elektrolita (Slika 43.). Pik koji se uočava na potencijalu -0,4 V posljedica je desorpcije kompleksa prilikom njegove redukcije.



Slika 43. AC voltamogrami za 20 µM Cu(II) i 0,64, 4,96 i 49,72 µM 4NC u 0,1 M KNO_3, 0,05 M pufer HEPES, pH 8,2. Uvjeti mjerenja: E_a 0,0 V, t_a 60 s, fazni kut ϕ 90°, f 77,35 Hz, a 25 mV i E_s 10,05 mV.

U ovisnosti I_p/f *vs*. log f je dobiven kvazireverzibilni maksimum (Mirčeski i sur., 2007.) pri 400 Hz za $[Cu(4NC)_2]^{2-}$, 100 Hz za [$Cu(3M4NC)_2]^{2-}$, 200 Hz za $[Cu(3M5NC)_2]^{2-}$ i 600 Hz za $[Cu(4M5NC)_2]^{2-}$. Pojava kvazireverzibilnog maksimuma ukazuje na to da je strujni odziv maksimalan kada frekvencija primijenjenog pravokutnovalnog signala odgovara brzini reakcije prijenosa naboja. To omogućuje da se adsorbirani kompleks podvrgne ponovljenom i

učinkovitom korištenju, što rezultira pojačanim odgovorom odnosno izraženim maksimumom u SWV (Mirčeski i sur., 2007; Mirčeski i Lovrić, 1999). Nadalje, viša *forward* nego *backward* SW strujna komponenta pika 2 sugerira kvazireverzibilni proces redukcije za sve komplekse (Slika 44.A) (Mirčeski i sur., 2007).



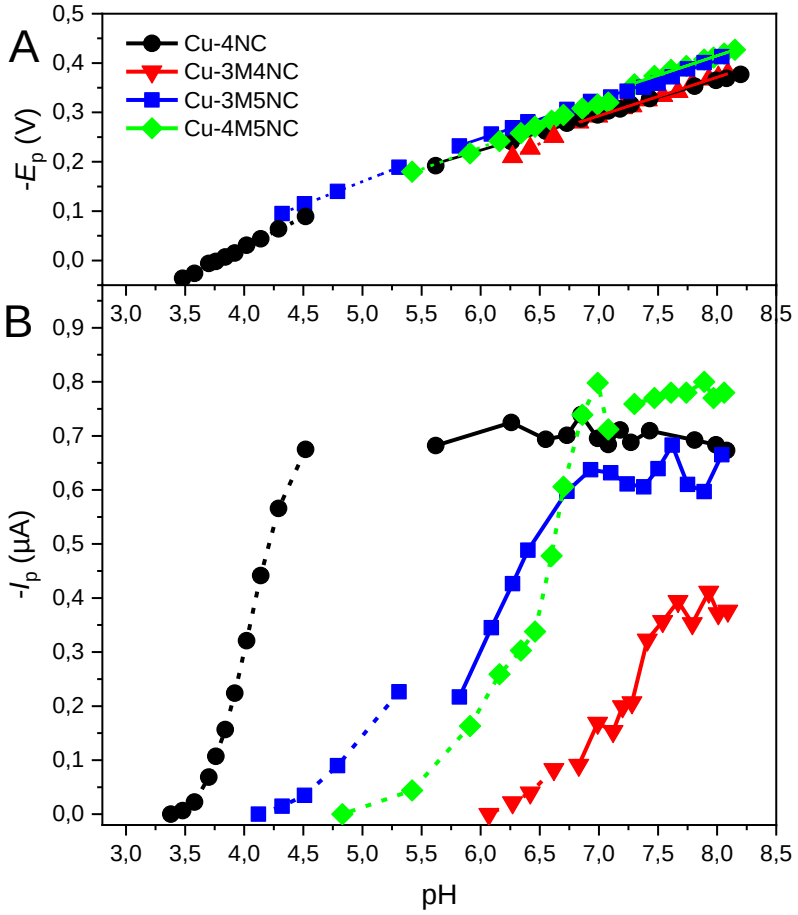
Slika 44. A) SW voltamogram (n; puna crna linija) zajedno s *forward* (f; crvena iscrtkana linija) i *backward* (b: plava iscrtkana crta) komponentama struje za 20 μM 4NC i 0,08 μM Cu (II), pH 8,2. Uvjeti mjerenja u SWV su bili: E_a 0,0 V, t_a 60 s, f 50 Hz, E_{sw} 25 mV, E_s 4 mV. B) Ciklički voltamogram kompleksa $[Cu(4M5NC)_2]^{2-}$ (20 μM 4M5NC, 0,2 μM Cu(II)) pri različitim brzinama skeniranja. C) Linearna ovisnost visine katodnog pika o brzini promjene potencijala u CV.

Na struju pika 2 je također značajno utjecala amplituda SWV. Ona se povećanjem amplitude povećala, dosegnuvši konstantnu vrijednost pri $E_{sw} \geq 25$ mV. Pik 2 se pomaknuo linearno prema manje negativnim potencijalima za 181 – 185 mV, s nagibom od 0,9 za sve komplekse. $\Delta E_{p/2}$ pika 2 je pokazao sličan trend kao i vršna struja, dodatno podupirući karakteristike katodne reakcije redukcije nakon adsorpcije reaktanta (Mirčeski i Lovrić, 1999.).

Mjerenjima u CV je također potvrđen kvazireverzibilni mehanizam redukcije $[Cu(NC)_2]^{2-}$ kompleksa (Scholz, 2002). Omjer katodne i anodne vršne struje, $I_{p,c}/I_{p,a}$ za reverzibilni voltametrijski odziv idealno iznosi 1,0. Međutim, dobivene vrijendosti za $I_{p,c}/I_{p,a}$ u rasponu od 2,1 za $[Cu(3M5NC)_2]^{2-}$ do 2,9 za $[Cu(3M4NC)_2]^{2-}$ ukazuju na određena ograničenja u reverznoj anodnoj reakciji. Ovo odstupanje obično rezultira promjenama u obliku pika kao funkciji brzine skeniranja. Za sve komplekse smo uočili šire anodne pikove u usporedbi s katodnim (Slika 44.B). Navedeni anodni pikovi su za $[Cu(4NC)_2]^{2-}$, $[Cu(3M4NC)_2]^{2-}$, $[Cu(3M5NC)_2]^{2-}$ i $[Cu(4M5NC)_2]^{2-}$ bili širi za 40 mV, 36 mV, 38 mV, odnosno 28 mV. Za reverzibilni proces bi potencijal od redukcijskog pika do oksidacijskog pika (ΔE_p) idealno trebalo iznositi blizu teoretski očekivane vrijednosti od 57/n mV, pri čemu je n broj elektrona. Međutim, za komplekse $[Cu(NC)_2]^{2-}$ su dobivene ΔE_p vrijednosti u rasponu od 20 do 24 mV, što za dvoelektronsku redukciju $[Cu(NC)_2]^{2-}$ kompleksa ukazuje na odstupanje od teoretske vrijednosti 28,5 mV. Uz navedeno, katodna struja pika 2 se linearno povećavala s brzinom promjene potencijala u CV za sve $[Cu(NC)_2]^{2-}$ komplekse (Slika 44.C), s nagibima od 355 nA s/V za $[Cu(4NC)_2]^{2-}$, 165 nA s/V za $[Cu(3M4NC)_2]^{2-}$, 417 nA s/V za $[Cu(3M5NC)_2]^{2-}$, i 398 nA s/V za $[Cu(4M5NC)_2]^{2-}$ što potvrđuje redukciju kompleksa nakon adsorpcije na površini elektrode (Komorsky-Lovrić, 2000; Scholz, 2002).

4.6.4. Učinak promjene pH

Disocijacija hidroksilnih skupina u NC ligandima i specijacija Cu(II) u vodenim sustavima ovise o promjenama pH vrijednosti. Čak i male varijacije pH vrijednosti mogu značajno utjecati na aktivnost vodikovih iona, što zauzvrat određuje sposobnost organskih molekula za interakciju s Cu(II) kroz izmjenu vodikovih iona na veznim mjestima liganda. Obzirom na navedeno, važno je poznavati pH atmosferskih lebdećih čestica. Ovisno o smjesi atmosferski relevantnih anorganskih i organskih kiselinsko-baznih ravnoteža (HNO_3/NO_3^-, $HC_2O_4/C_2O_4^{2-}$, CH_3COOH/CH_3COO^- i HCO_3^-/CO_3^{2-}) i anorgansko-organskih sustava (poput sulfat-oksalata) pH lebdećih čestica pokriva širok raspon od -2 do 12 (Craig i sur., 2017). U provedenim eksperimentima proučavana je stabilnost Cu(II)-NC kompleksa u rasponu pH od 8,2 do 3,0 praćenjem karakteristika pika 2.

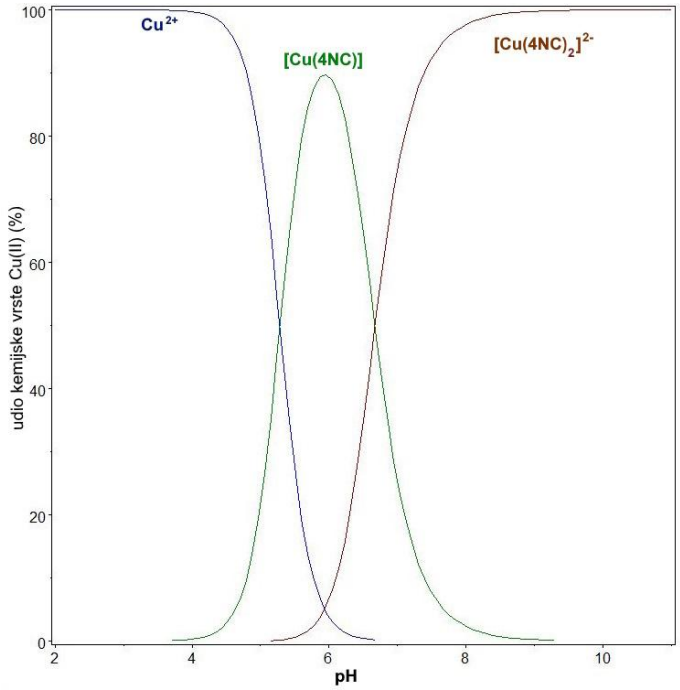


Slika 45. Promjena A) potencijala (E_p) i B) struje (I_p) pika 2 u ovisnosti o snižavanju pH dodatkom HNO_3 u otopinu koja sadrži 20 µM NC i 0,2 µM Cu(II). Ostali SWV uvjeti bili su isti kao na Slici 41.

U ovisnosti E_p, I_p i $\Delta E_{p/2}$ o pH za sve Cu-NC komplekse su uočena dva različita područja (Slika 45.). U oba područja je primijećen linearni odnos između E_p i pH, s pomakom pika 2 prema manje negativnim potencijalima pri nižim pH vrijednostima. Pomaci pika 2 su iznosili 413 mV za $[Cu(4NC)_2]^{2-}$, 181 mV za $[Cu(3M4NC)_2]^{2-}$, 318 mV za $[Cu(3M5NC)_2]^{2-}$ i 247 mV za $[Cu(4M5NC)_2]^{2-}$. Najveću stabilnost je pokazao pik $[Cu(4NC)_2]^{2-}$ i to u širokom pH rasponu od pH 8,2 do 4,5, sa malom promjenom vršne struje pika. Međutim, to je bilo popraćeno povećanjem od 38 % u površini i širini pika, što ukazuje na povećanje ukupnog naboja povezanog s redukcijskim procesom i brojem kompleksa koji su bili reducirani. Pri nižim pH vrijednostima, od 4,3 do 3,7, struja pika 2 se naglo i linearno smanjila, dok se pik suzio (manji $\Delta E_{p/2}$), što ukazuje na značajno smanjenje koncentracije kompleksa. Pri pH vrijednosti ispod 3,4 pik više nije bio detektiran. Vršne struje pika 2 su se za komplekse $[Cu(3M4NC)_2]^{2-}$,

$[Cu(3M5NC)_2]^{2-}$ i $[Cu(4M5NC)_2]^{2-}$ neznatno mijenjale do pH vrijednosti 7,7, 6,8, odnosno 7,0, što ukazuje na njihovu stabilnost u navedenom pH području. Međutim, pri nižim pH vrijednostima došlo je do smanjenja vršne struje, te je u konačnici pik nestao pri pH vrijednostima 5,1, 4,3, odnosno 4,8 (Slika 45.). Ukratko, otpornost ovih kompleksa na disocijaciju pri kiselijim pH vrijednostima smanjivala se u nizu: $[Cu(4NC)_2]^{2-}$ > $[Cu(3M5NC)_2]^{2-}$ > $[Cu(4M5NC)_2]^{2-}$ > [$Cu(3M4NC)_2]^{2-}$.

Raznim spektrofotometrijskim, kolorimetrijskim i potenciometrijskim eksperimentima identificirani su kompleksi Cu(II) di-kateholata (1:2) pri višim pH vrijednostima i kompleksi Cu(II) mono-kateholata (1:1) pri nižim vrijednostima pH (Jameson i Wilson, 1972a; Sever i Wilker, 2004; Tyson i Martell, 1968) čime je potvrđeno da disocijacija NC određuje njihovu sposobnost stvaranja kompleksa s Cu(II). Uočene promjene u karakteristikama pika 2 za Cu(II)-NC komplekse u slabo alkalnim do vrlo kiselim otopinama pokazuju da su di-nitrokateholatni kompleksi destabilizirani zbog prijelaza iz deprotoniranih NC u mono- i di-protonirane 1,2-dihidroksi spojeve. Prema tome, dva opažena različita područja u ovisnostima E_p, I_p i $\Delta E_{p/2}$ o pH odražavaju destabilizaciju $[Cu(NC)_2]^{2-}$ kompleksa induciranu protonima, nakon koje slijedi ravnoteža s [Cu(NC)]. Pri nižim pH vrijednostima, [Cu(NC)] se također destabilizira, postižući ravnotežu sa slobodnim Cu(II) ionima koji prevladavaju pri vrlo niskim pH vrijednostima pri kojima pik 2 više ne postoji. Rapodjela kemijskih vrsti Cu(II) u ovisnosti o pH vrijednosti u otopini 0,2 μM Cu(II) i 20 μM 4NC je izračunata pomoću programa HySS. U ispitivanom pH području 3,0 – 9,0 u programu je potvrđena prisutnost tri Cu(II) vrste (Slika 46.).



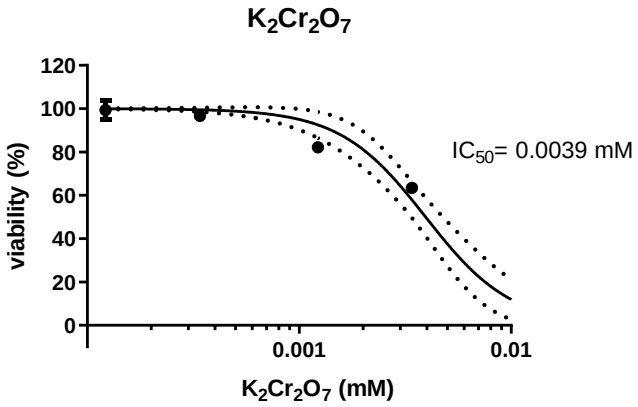
Slika 46. Rapodjele kemijskih vrsti Cu(II) u vodenoj otopini 0,2 µM Cu(II) i 20 µM 4NC u HySS programu. Za potrebe izračuna su konstante stabilnosti za [Cu(4NC)] i $[Cu(4NC)_2]^{2-}$ komplekse log β_1 = 11,7, odnosno log β_2 = 21,1 preuzete iz Gavazov (2012).

Budući da je stvaranje i destabilizacija Cu(II)-NC kompleksa pri različitim pH vrijednostima ključno pri promjenjivim uvjetima atmosferske vodene faze, istražen je i učinak porasta pH od ~3,4 do ~8,2 postupnim dodavanjem otopine KOH u otopinu Cu(II)-NC. Povećanje struje pika 2 i njegov pomak prema negativnijim potencijalima ukazuje na uzastopni pomak ravnoteže sa slobodnih Cu(II) iona na Cu(II)/[Cu(NC)], a zatim na [Cu(NC)]/$[Cu(NC)_2]^{2-}$ i $[Cu(NC)_2]^{2-}$ čime su potvrđeni voltametrijski rezultati (objašnjeni iznad).

4.7. Ispitivanje kronične toksičnosti smjesa Cu(II)/NC

Provedenim AlgaeTox biotestovima na zelenoj mikroalgi *Scenedesmus subspicatus* pokazano je da 4NC, 3M4NC, 3M5NC i 4M5NC pokazuju vrlo sličnu kroničnu toksičnost s dobivenim IC_{50} vrijednostima od 4,2, 6,3, 4,0, odnosno 4,2 µM (poglavlje 4.3.4.). Obzirom na to da se 4M5NC često pojavljuje kao dominantan MNC, uz 4NC, u lebdećim česticama u urbanim i ruralnim područjima kroz različita godišnja doba (Frka i sur., 2022; Kitanovski i sur., 2021), odabran je kao predstavnik MNC izomera u ovom eksperimentu. Kronična toksičnost binarnih sustava Cu(II)-4NC i Cu(II)-4M5NC uspoređena je s pojedinačnom kroničnom

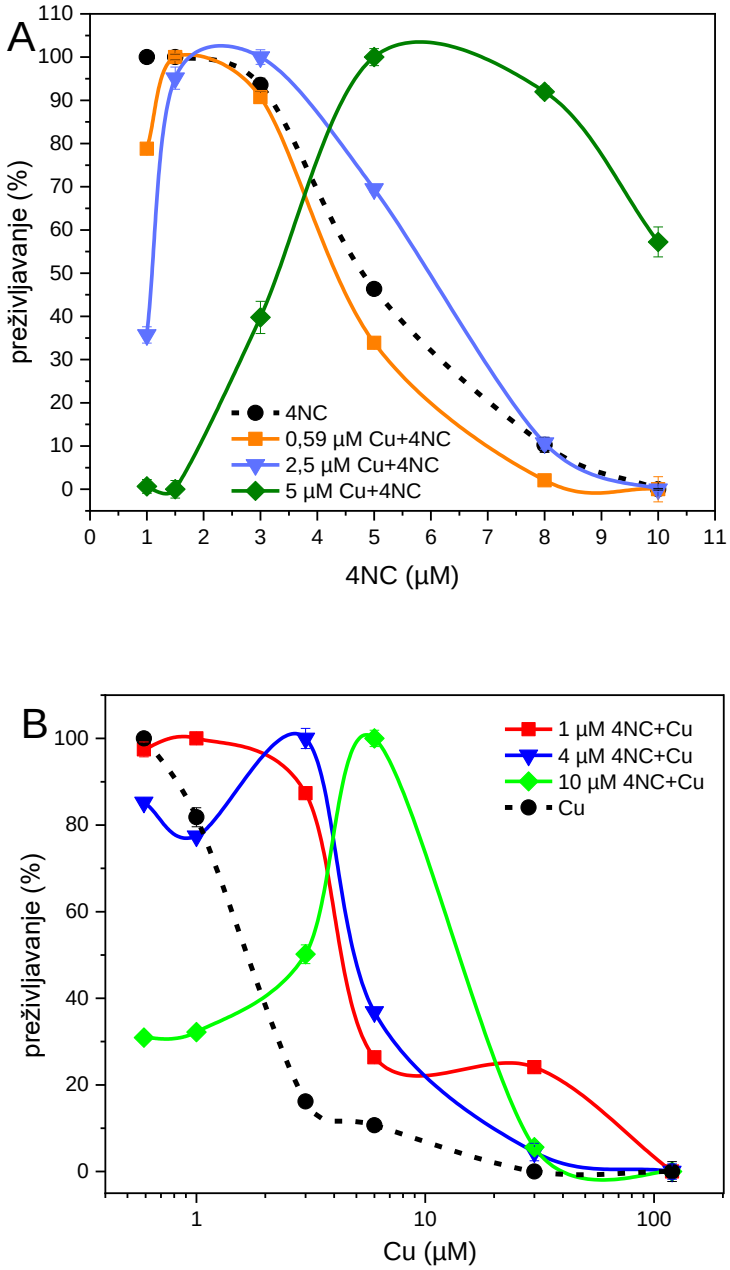
toksičnošću 4NC, 4M5NC i Cu(II) na *Scenedesmus subspicatus*. Koncentracija-odgovor krivulja pozitivne kontrole $K_2Cr_2O_7$ prikazana je na Slici 47.



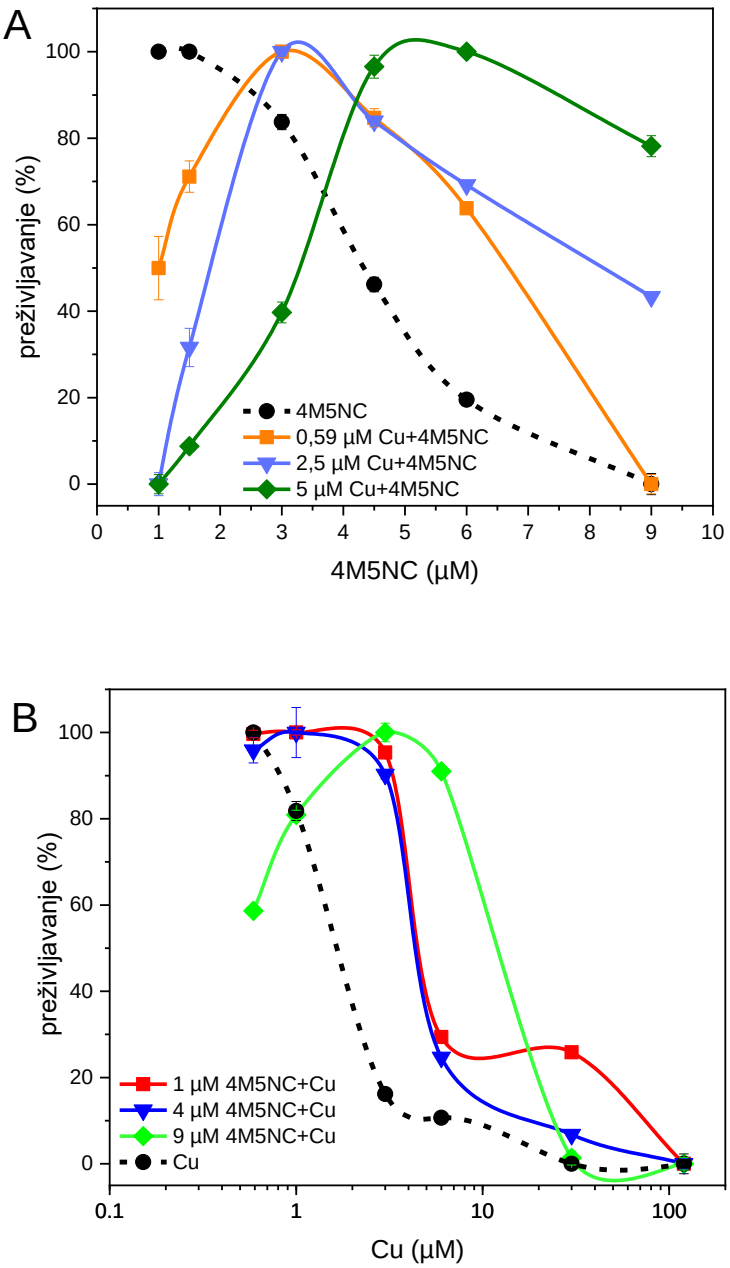
Slika 47. *In vivo* određivanje kroničnih toksičnih učinaka AlgaeTox biotestom nakon 96 h izlaganja mikroalgi *Scenedesmus subspicatus* pozitivnoj kontroli $K_2Cr_2O_7$. Svaka točka predstavlja prosječnu vrijednost triplikata ± SE.

Ispitani su toksični učinci binarnih smjesa koje sadrže raspon koncentracija 4NC (1 – 10 µM, Slika 48.A) ili 4M5NC (1 – 9 µM, Slika 49.A) u kombinaciji s 0,59, 2,5 i 5 µM Cu(II). Ove koncentracije Cu(II) su u testovima toksičnosti provedenim sa samim Cu(II) u rasponu koncentracija 0,59 – 120 µM pokazale približno 100 %, ~50 %, odnosno 20 % preživljavanje mikroalgi (Slika 48.B). Pri netoksičnoj koncentraciji od 1 µM 4NC, preživljavanje mikroalgi se smanjivalo s povećanjem koncentracije Cu(II) i iznosilo je: 79 % pri 0,59 µM Cu(II), 36 % pri 2,5 µM Cu(II) i samo 1 % pri 5 µM Cu(II), što ukazuje da je Cu(II) bio primarni toksični agens (Slika 48.A). Također, u prisutnosti netoksične koncentracije 1 µM 4M5NC i 0,59 µM Cu(II), preživljavanje mikroalgi je palo na 50 %, dok nijedna živa mikroalga nije identificirana pri 2,5 i 5 µM Cu(II) (Slika 49.A). Pri dodatcima Cu(II) u više koncentracije NC značajno se povećalo preživljavanje mikroalgi. Tako je pri 1,5 µM 4NC ili 3 µM 4M5NC uz dodatak 0,59 µM Cu(II), preživljavanje bilo 100 %. Preživljavanje je bilo 100 % pri 2,5 µM Cu(II) s 3 µM 4NC ili 4M5NC, dok je za 5 µM Cu(II) bilo potrebno 5 µM 4NC ili 6 µM 4M5NC (Slike 48.A i 49.A). Općenito su dobivene više IC_{50} vrijednosti za smjese nego za pojedinačne analite. Tako je za smjesu 2,5 µM Cu(II) s rasponom koncentracija 4NC (1 – 10 µM) dobivena IC_{50} = 5,7 µM dok je za sam 4NC iznosila IC_{50} = 4,2 µM. Za smjesu 0,59 µM Cu(II) sa rasponom koncentracija 4M5NC (1 – 9 µM) je dobivena IC_{50} = 6,3 µM dok je za sam 4M5NC iznosila IC_{50} = 4,2 µM. Ovi rezultati sugeriraju da su ključni čimbenici koji utječu na toksičnost smjesa

omjer koncentracija reaktanata i njihove međusobne interakcije stvaranja kompleksa. Pri visokim koncentracijama, sami NC su značajno pridonijeli toksičnosti smjesa.



Slika 48. *In vivo* određivanje kroničnih toksičnih učinaka AlgaeTox biotestom nakon 96 h izlaganja *Scenedesmus subspicatus* smjesi: A) raspona koncentracija 4NC (1 – 10 µM) i 0,59 µM Cu(II) (narančasti kvadrati), 2,5 µM Cu(II) (plavi trokuti) i 5 µM Cu(II) (tamnozeleni dijamanti) i B) raspona koncentracija Cu(II) (0,59, 1, 3, 6, 30, 120 µM) i 1 µM 4NC (crveni kvadrati), 4 µM 4NC (plavi trokuti) i 10 µM 4NC (zeleni dijamanti). Svaka točka predstavlja prosječnu vrijednost triplikata ± SE.

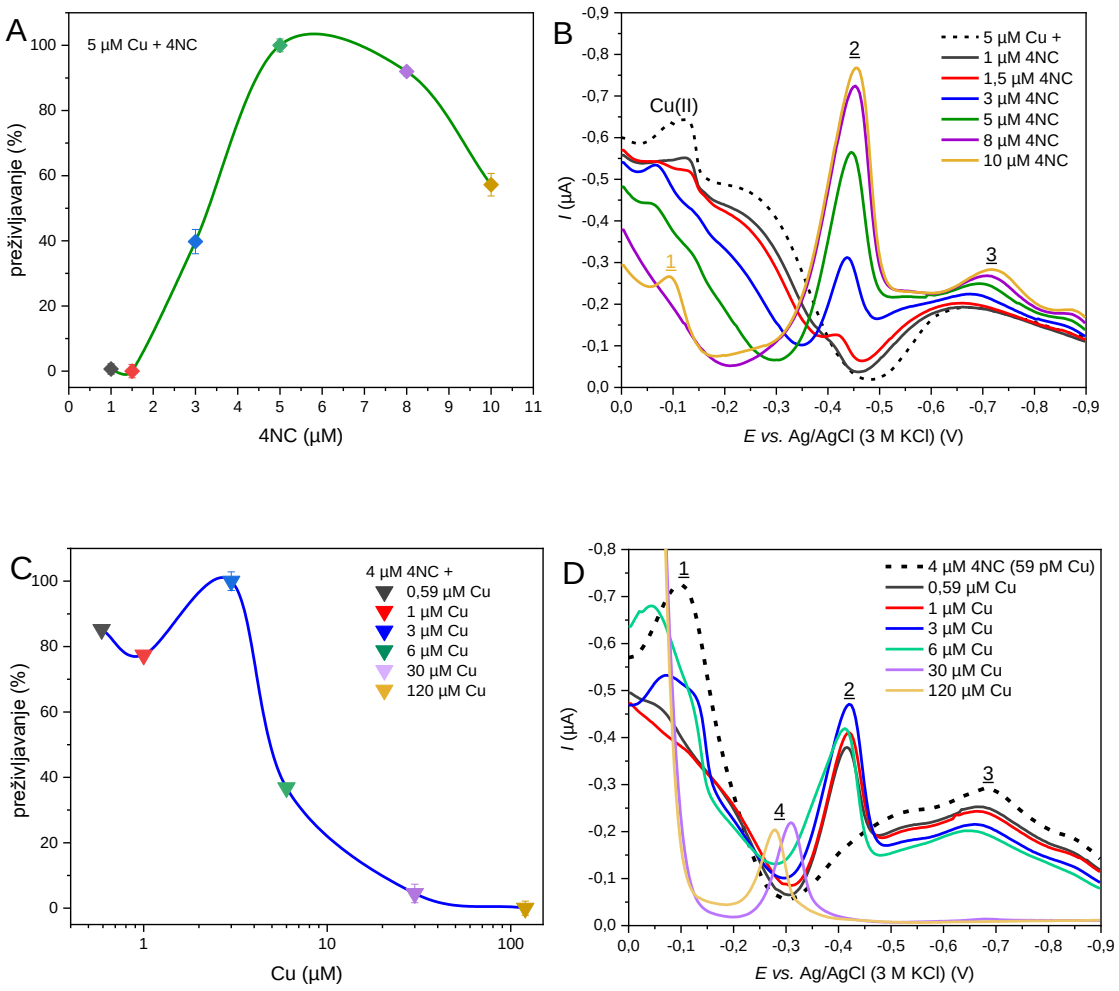


Slika 49. *In vivo* određivanje kroničnih toksičnih učinaka AlgaeTox biotestom nakon 96 h izlaganja *Scenedesmus subspicatus* smjesi: A) raspona koncentracija 4M5NC (1 – 9 µM) i 0,59 µM Cu(II) (narančasti kvadrati), 2,5 µM Cu(II) (plavi trokuti) i 5 µM Cu(II) (tamnozeleni dijamanti) i B) raspona koncentracija Cu(II) (0,59, 1, 3, 6, 30, 120 µM) i 1 µM 4M5NC (crveni kvadrati), 4 µM 4M5NC (plavi trokuti) i 9 µM 4M5NC (zeleni dijamanti). Svaka točka predstavlja prosječnu vrijednost triplikata ± SE.

Binarna toksičnost Cu(II)-NC sustava je ispitana i praćenjem preživljavanja mikroalgi izloženih smjesi 1, 4 i 10 µM 4NC ili 9 µM 4M5NC (što predstavlja 100 %, ~ 40-50 % i 0 % preživljavanja mikroalgi za pojedinačni NC, redom kako su navedeni) u kombinaciji s rasponom koncentracije 0,59 – 120 µM Cu(II) (Slike 48.B i 49.B). Uočeno je značajno povećanje IC_{50} smjesa u usporedbi sa samim Cu(II) (IC_{50} = 2,0 µM). Konkretno, za tri prethodno navedene koncentracije 4NC (1, 4 i 10 µM) u smjesi s Cu(II), IC_{50} vrijednosti su bile 5,1, 5,9, i 25,2 µM, dok su za 4M5NC (1, 4 i 9 µM) u kombinaciji s Cu(II), IC_{50} vrijednosti iznosile 6,4, 4,8 i 10,6 µM što ukazuje da binarne smjese imaju manju toksičnost od samog Cu(II). U skladu s tim, toksične koncentracije od 10 µM 4NC i 9 µM 4M5NC (prema pojedinačnim koncentracija-odgovor krivuljama) postale su netoksične u kombinaciji sa 6 µM Cu(II) (Slika 48.B) odnosno 3 µM Cu(II) (Slika 49.B). Dobiveni rezultati naglašavaju važnost interakcija ovisnih o koncentraciji na toksičnost NC u prirodnim vodama. U provedenim eksperimentima je toksičnost smjesa bila određena djelovanjem NC pri niskim, netoksičnim koncentracijama Cu(II) (≤ 1 µM), dok je Cu(II) dominantno utjecao na toksičnost pri visokim, toksičnim koncentracijama (≥ 10 µM). Međutim, za koncentracije Cu(II) između prethodno navedenih, interakcije između NC i Cu(II) su bile ključne za netoksičnost/toksičnost smjesa.

4.7.1. Voltametrijska karakterizacija Cu(II)/NC smjesa podvrgnutih testovima kronične toksičnosti

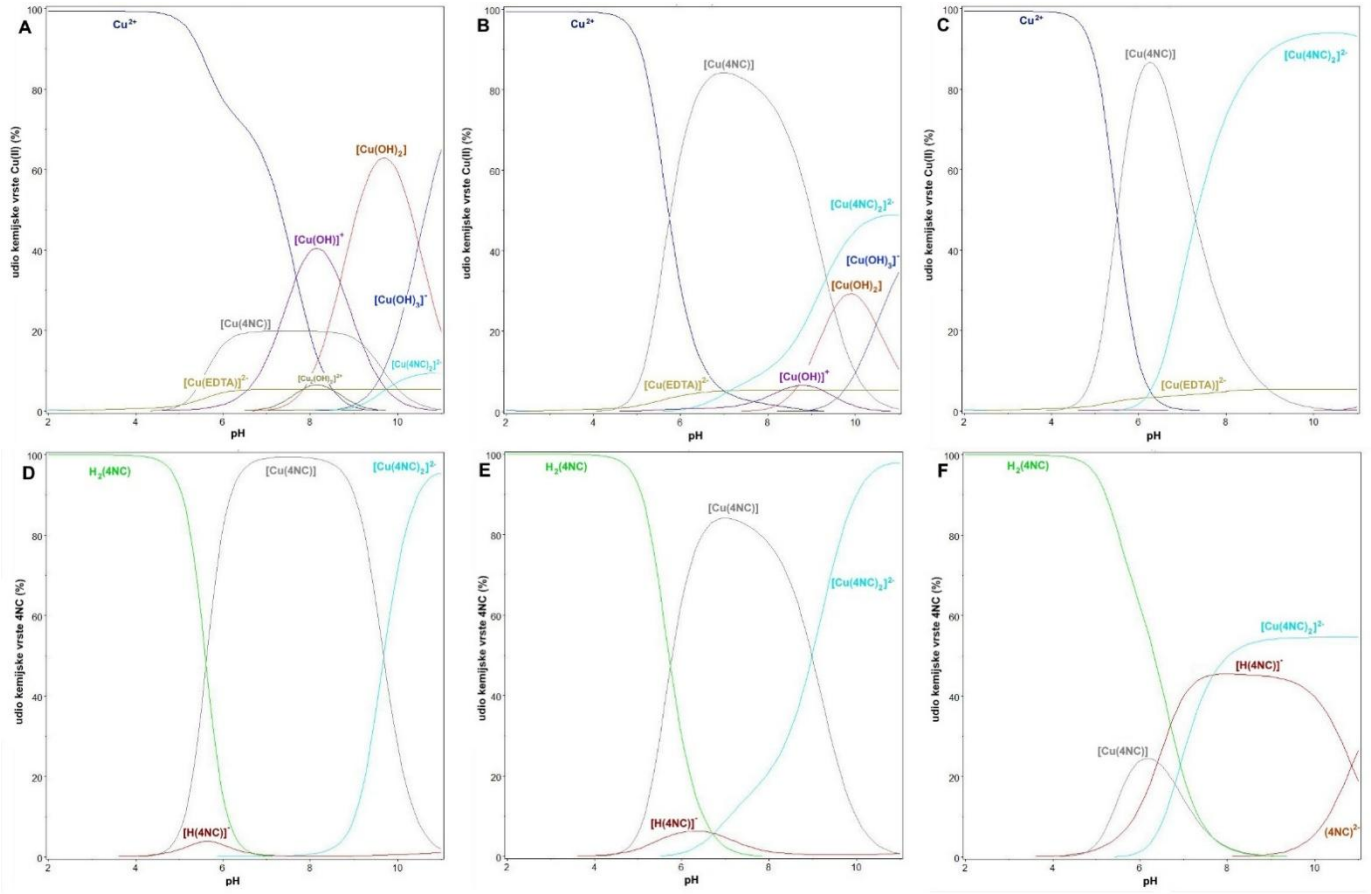
U biotestovima u kojima su mikroalge bile izložene 5 µM Cu(II) i rasponu koncentracija 4NC (1 – 10 µM; Slika 50.A), mikroalge nisu preživjele pri 1 i 1,5 µM 4NC. Međutim, rast mikroalgi je stimuliran pri 3 – 5 µM 4NC, što je rezultiralo njihovim preživljavanjem od 40 – 100 %. Pri višim koncentracijama 4NC, 8 – 10 µM, njihov rast je bio inhibiran, s preživljavanjem od 57 %. Kako bi se potvrdio utjecaj interakcija Cu(II) i NC na opažene toksične i netoksične učinke, provedena su elektrokemijska mjerenja SWV metodom u mediju u kojem su provedeni i AlgaeTox biotestovi pri pH = 8,1. Također, analizirali smo i dijagrame raspodjele kemijskih vrsti Cu(II) uzimajući u obzir sve glavne sastojke otopine kao moguće Cu(II) ligande (4NC, OH^-, Cl^-, HCO_3^-, CO_3^{2-}, EDTA; ISO 8692:2004).



Slika 50. A) Koncentracija-odgovor krivulja 4NC (1 – 10 µM) uz dodatak 5 µM Cu(II) dobivena AlgaeTox testom sa mikroalgom *Scenedesmus subspicatus* i B) odgovarajući SW voltamogrami (pH = 8,1); C) Koncentracija-odgovor krivulja Cu(II) (0,59 – 120 µM) uz dodatak 4 µM 4NC dobivena AlgaeTox testom i D) odgovarajući SW voltamogrami (pH = 8,1). Svaka točka na krivuljama predstavlja srednju vrijednost triplikata ± SE. Uvjeti mjerenja u SWV bili su kao što je napisano na Slici 41.

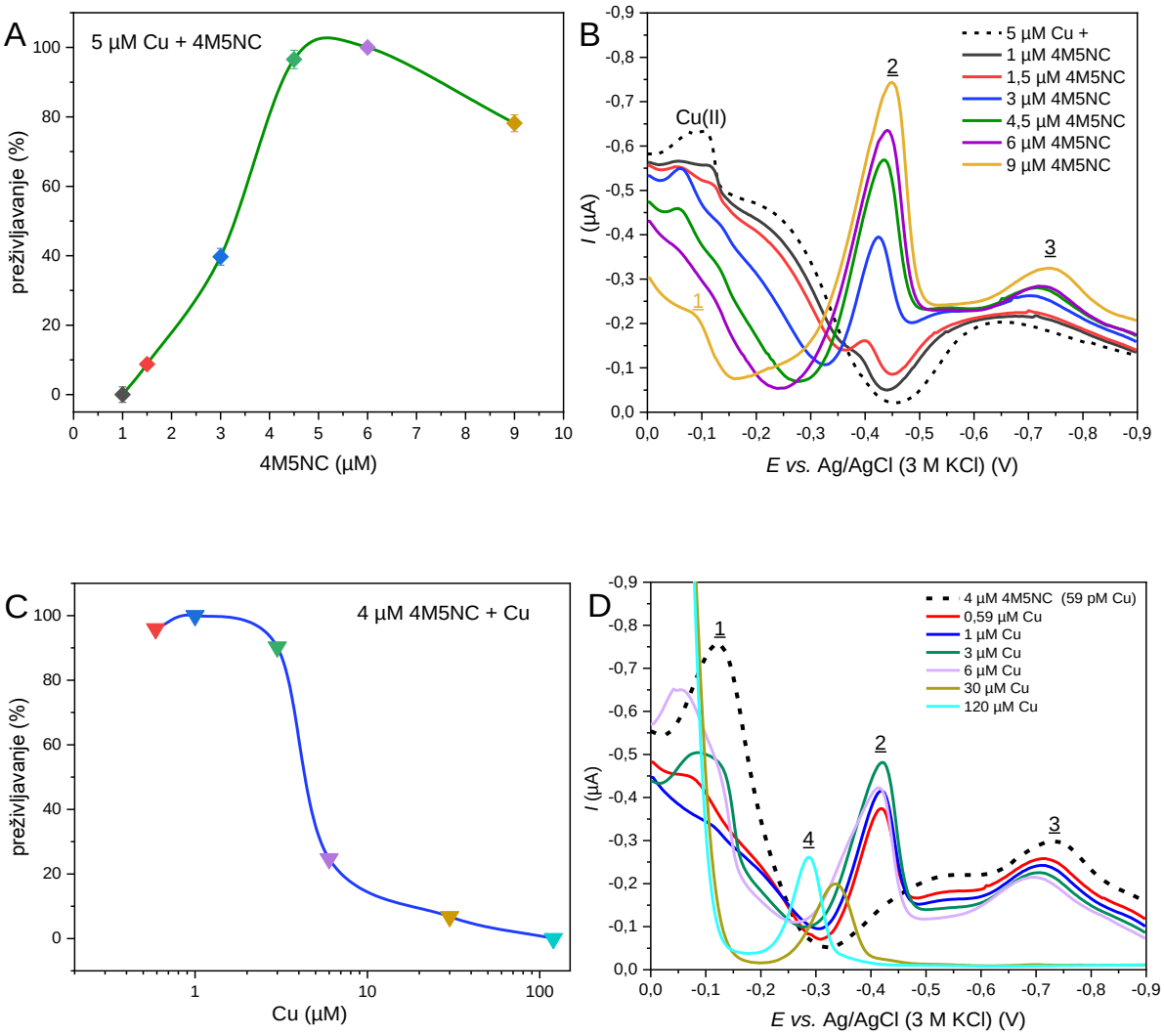
Na voltamogramu za 5 µM Cu(II) dobiven je pik na E_p = -0,1 V koji odgovara redukciji slobodnog/labilnog Cu(II) (Slike 50.B i 41.C). Kako se koncentracija 4NC povećavala, novi pik (pik 2) se pojavio i povećavao, potvrđujući stvaranje kompleksa $[Cu(4NC)_2]^{2-}$, što je u skladu s dijagramima raspodjele na Slici 51.(A-C) koji pokazuju dominaciju kompleksa [Cu(4NC)] i $[Cu(4NC)_2]^{2-}$ povećanjem koncentracije 4NC pri pH 8.1. Pri 5 µM Cu(II) i 1 µM 4NC, Cu(II) je prisutan u obliku slobodnih iona ili labilnih hidroksidnih vrsta (Slika 51.A), što je rezultiralo toksičnim učinkom na stanice mikroalgi (0 % preživljavanje, Slika 50.A). Povećanjem koncentracije 4NC udio slobodnih Cu(II) iona i hidroksidnih vrsti se smanjivao

uslijed kompleksiranja Cu(II) s 4NC (Slika 52.B i C). Ispitivanje slobodnog (nekompleksiranog) 4NC (Slika 51.(D-F)) je pokazalo pomak od zanemarive količine prisutne pri koncentraciji od 1 µM 4NC (Slika 51.D) do gotovo 50 % ukupnog 4NC pri 10 µM (Slika 51.F). Slobodni 4NC je vjerojatno uzrokovao smanjeno preživljavanje mikroalgi pri 10 µM 4NC (Slika 50.A). Kod 10 µM 4NC, voltamogrami su također pokazali dodatni pik (pik 1) koji se pripisuje redukciji Hg(II)-4NC kompleksa (Slika 41.A) čime je potvrđena prisutnost slobodnog 4NC u otopini koji je kompleksirao s Hg(II) na površini elektrode. Treći pik (pik 3, redukcija nitro skupine; Slika 41.C) je detektiran pri koncentracijama ≥ 3 µM 4NC.



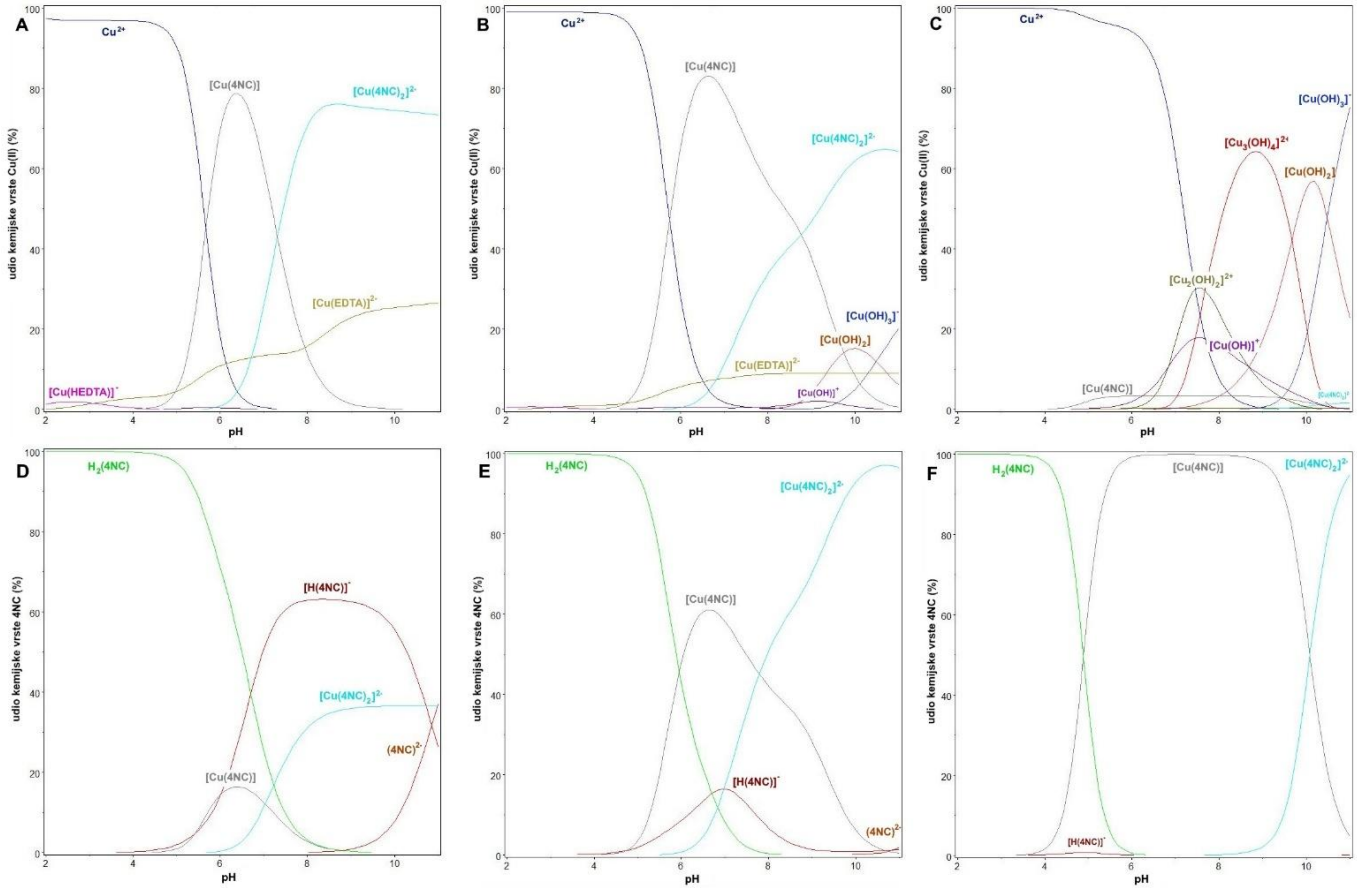
Slika 51. Distribucija kemijskih vrsta Cu(II) (A, B, C) i 4NC (D, E, F) u ovisnosti o pH u otopini s glavnim relevantnim komponentama kao u mediju za AlgaeTox biotest (5 µM Cu(II); 0,237 µM Fe^{3+}; 0,269 µM EDTA; 0,595 mM $HCO3^-$; 0,472 mM Cl^-) pri različitim koncentracijama 4NC: 1 uM (A, D); 5 µM (B, E) i 10 µM (C, F). Konstante stabilnosti kompleksa [Cu(4NC)] i $[Cu(4NC)_2]^{2-}$ (log β_1 = 11,7 odnosno log β_2 = 21,1) i Fe-4NC preuzete su iz (Gavazov, 2012), konstante stabilnosti različitih vrsta Cu(II)-hidroksida, -klorida i -EDTA preuzete su iz (Smith i Martell, 1976), a Cu(II)-HCO_3 i Cu(II)-CO_3 vrsta iz (Fouillac i Criaud, 1984).

Usporedno rađeni testovi toksičnosti i dobiveni SWV pikovi (1, 2 i 3) za smjese Cu(II) i 4M5NC (Slika 52.(A, B)) su pokazali vrlo slične rezultate To je sugeriralo da slični mehanizmi kompleksiranja i interakcije upravljaju toksičnošću u oba sustava.



Slika 52. A) Koncentracija-odgovor krivulja 4M5NC (1 – 9 µM) uz dodatak 5 µM Cu(II) dobivena AlgaeTox testom sa mikroalgom *Scenedesmus subspicatus* i B) odgovarajući SW voltamogrami (pH = 8,1); C) Koncentracija-odgovor krivulja Cu(II) (0,59 – 120 µM) uz dodatak 4 µM 4M5NC dobivena AlgaeTox testom i D) odgovarajući SW voltamogrami (pH = 8,1). Svaka točka na krivuljama predstavlja srednju vrijednost triplikata ± SE. Uvjeti mjerenja u SWV bili su kao što je napisano na Slici 41.

Ispitivanja kronične toksičnosti u rasponu koncentracija Cu(II), pri toksičnoj koncentraciji od 4 μM 4NC ili 4M5NC su pokazala 100 % preživljavanje mikroalgi pri koncentraciji od 3 μM Cu(II). Međutim, pri većim koncentracijama Cu(II) je rast mikroalgi bio inhibiran te je pri 30 ili 120 μM Cu(II) preživljavanje bilo 0 % (Slike 50.C i 52.C). SW voltamogrami smjesa koje sadrže 4 μM 4NC ili 4M5NC i 0,59 – 6 μM Cu(II) pokazuju pojavu pika 2 na E_p ~0,4 V, što ukazuje na formiranje $[Cu(NC)_2]^{2-}$ kompleksa (Slike 50.D i 52.D). Međutim, pri 30 ili 120 μM Cu(II), pik 2 je nestao i pojavio se novi pik (pik 4) na E_p ~0,3 V (Slike 50.D i 52.D) koji odgovara redukciji polinuklearnih hidroksidnih vrsta Cu(II) koje imaju veće konstante stabilnosti te time negativniji redukcijski potencijal od jednostavnih mononuklearnih vrsti Cu(II) (Ambrosi i sur., 2008), ali još uvijek pozitivniji od redukcijskog potencijala kompleksa $[Cu(4NC)_2]^{2-}$. Dijagrami raspodjele kemijskih vrsta (Slika 53.(A-F)) podupiru voltametrijske i ekotoksikološke rezultate, tj. s 1 μM Cu(II) u testiranoj otopini (4 μM 4NC i pH 8,1) je preživljavanje mikroalgi bilo manje (oko 80 %, Slike 50.C i 53.D) u usporedbi s otopinom s 3 μM Cu(II) u kojoj je preživljavanje bilo 100 % (Slika 50.C) budući da je sav Cu(II) bio vezan s 4NC (Slika 53.B) i nije bilo nekompleksiranog 4NC (Slika 53.E) koji bi mogao djelovati toksično na mikroalge. Pri visokim koncentracijama Cu(II) (30 i 120 μM) u otopini prevladavaju labilne polinuklearne hidroksidne vrste Cu(II) (Slika 53.C) (Jameson i Wilson, 1972b; Paulson i Kester, 1980), što je smanjilo preživljavanje mikroalgi na manje od 5 % (Slika 50.C). Za usporedno provedena ispitivanja smjesa Cu(II) i 4M5NC ponovno je primijećen sličan obrazac toksičnosti i podudarnih SWV pikova (Slika 52.(C, D)).



Slika 53. Distribucija kemijskih vrsta Cu(II) (A, B, C) i 4NC (D, E, F) u ovisnosti o pH u otopini s glavnim relevantnim komponentama kao u mediju za AlgaeTox biotest (4 µM 4NC; 0.269 µM EDTA; 0,595 mM HCO_3^-; 0,468 mM Cl^- (A, D), 0,470 µM Cl^- (B, E), 0,587 µM Cl^- (C, F)) pri različitim koncentracijama Cu(II): 1 µM (A, D); 3 µM (B, E), and 120 µM (C, F). Konstante stabilnosti kompleksa [Cu(4NC)] i $[Cu(4NC)_2]^{2-}$ (log β_1 = 11,7 odnosno log β_2 = 21,1) i Fe-4NC preuzete su iz (Gavazov, 2012), konstante stabilnosti različitih vrsta Cu(II)-hidroksida, -klorida i -EDTA preuzete su iz (Smith i Martell, 1976), a Cu(II)-HCO_3 i Cu(II)-CO_3 vrsta iz (Fouillac i Criaud, 1984)

5. RASPRAVA

5.1. NMAU doprinos ekotoksičnosti atmosferskih lebdećih čestica

Postoji jasna povezanost između kemijskog sastava lebdećih čestica i njihove ekotoksičnosti, osobito za najmanje veličinske frakcije (Pintér i sur., 2017). Jedna od metoda fizikalno-kemijske karakterizacije toksične organske tvari je usporedba različitih ekstrakata jednakih dijelova filtera (Roper i sur., 2019). Tako su uzorci čestica sBB ekstrahirani otapalima s različitim Rohrschneiderovim parametrom polariteta, P: Milli-Q voda (P = 10,2), MeOH (P = 5,1), DCM (P = 3,1) i Hex (P = 0,1) (Snyder, 1974). Prvo je proveden test interakcije ekstrakata s fazom 0 staničnog detoksikacijskog mehanizma jer je ovaj korak kritičan za unos ksenobiotika i njegovu daljnju biotransformaciju. Svi ekstrakti sBB sudjelovali su u interakciji s membranskim prijenosnicima Oct1 i Oatp1d1 ribe zebrice. Ekstrakti sBB_{H2O} i sBB_{MeOH} pokazali su jaču interakciju nego ekstrakti sBB_{Hex} i sBB_{DCM} (Slika 3.), što ukazuje na prisutnost veće koncentracije specifičnih organskih molekula koje sadržavaju polarne skupine. NMAU su molekule lako topljive u vodi, a identificirani su i kvantificirani u različitim atmosferskim lebdećim česticama (Frka i sur., 2022; Kitanovski i sur., 2020). Kvantifikacija odabranih 12 NMAU u vodenom i organskim ekstraktima sBB pokazala je najveću količinu u vodenom i MeOH ekstraktima (Slika 9.). Ekstrakti sBB i AA (Slika 3.), smjese Σ_{10}NMAU i Σ_5NMAU i svaki ispitani modelni NMAU (osim 4NG) (Slika 15.) su imali jaču interakciju s anionskim nego s kationskim prijenosnicima. Uočena sličnost u toksičnom djelovanju ekstrakata PM i modelnih NMAU sugerira da NMAU doprinose interakciji ekstrakata sBB i AA_{H2O} s membranskim prijenosnicima, iako u njima čine relativno mali maseni udio: 0,073 % u sBB_{H2O} i 0,24 % u AA_{H2O} (Slika 9.).

Nakon toga su provedena *in vitro* i *in vivo* ispitivanja kako bi se procijenili i usporedili akutni i kronični učinci sBB, AA i modelnih NMAU. Svi sBB ekstrakti negativno su utjecali na preživljavanje PLHC-1 ribljih stanica (Slike 6. i 8.), ali s relativno visokim IC_{50} vrijednostima u rasponu od 95,9 mg/L (sBB_{MeOH}) do 148,0 mg/L (sBB_{Hex}). Od pojedinačnih NMAU, samo su 4NS, 4NC i MNC pokazali akutnu citotoksičnost s IC_{50} vrijednostima u rasponu od 2,0 mg/L za 4NS do 4,1 mg/L za 3M5NC (Slike 20. i 22.). Vrijednosti IC_{50} za smjese Σ_{10}NMAU i Σ_5NMAU bile su vrlo slične za obje, akutnu (5,3 odnosno 4,7 mg/L, Slike 21. i 22.) i kroničnu toksičnost (5,7 odnosno 6,6 mg/L, Slike 25. i 26.). Prema tim rezultatima, pet NMAU daju glavni doprinos akutnim i kroničnim toksičnim učincima sBB_{H2O} (Slike 22. i

26.), budući da je upravo njihova koncentracija u sBB_{H2O} bila najviša (Slika 9.). Budući da je koncentracija pet NMAU bila niža u drugim ekstraktima (Slika 9.), oni su vjerojatno manje pridonijeli akutnoj toksičnosti ovih ekstrakata na ribljim stanicama, a gotovo su zanemarivo utjecali na mikroalge.

Za razliku od ribljih stanica, sBB_{MeOH}, sBB_{Hex}, sBB_{DCM} i AA_{H2O} su pokazali djelomičnu ili vrlo značajnu korist za preživljavanje mikroalgi u testiranim rasponima koncentracija (Slike 7. i 8.). Ekstrakti sBB_{MeOH} i sBB_{DCM} su bili štetni za mikroalge samo u koncentracijama iznad 800 mg/L, odnosno 220 mg/L, dok su niže koncentracije stimulirale rast mikroalgi. Mikroalge inkubirane sa sBB ekstraktima najvjerojatnije su bile izložene istodobnom djelovanju različitih spojeva, kako štetnih tako i hranjivih, ekstrahiranih u različitim omjerima. Posljedično, polarni spojevi ekstrahirani u MeOH, ali i nepolarni u Hex, mogli su pridonijeti pozitivnom odgovoru mikroalgi koji se očitovao u njihovom preživljavanju, odnosno porastu s rastućom koncentracijom ekstrakata. AA_{H2O} također nije inducirao citotoksični učinak, no vjerojatnije je da bi imao toksični učinak na riblje stanice pri koncentracijama čestica višim od ovdje primijenjenih (> 50 mg/L). Za detaljniju interpretaciju negativnih i pozitivnih učinaka ekstrakata PM potrebna je njihova detaljnija kemijska analiza.

5.1.1. Interakcija NMAU s transmembranskim proteinima

Ispitivanje interakcija pokazalo je da su oba membranska prijenosnika, Oct1 i Oatp1d1, polispecifični jer oba stupaju u interakciju sa širokim rasponom endogenih i ekološki relevantnih ksenobiotika (Mihaljević i sur., 2017; Popović i sur., 2014). Ipak, naši su rezultati pokazali znatno jaču interakciju ekstrakata PM i pojedinačnih NMAU s Oatp1d1. Razlog tome bi mogla biti struktura NMAU kao i drugih organskih molekula prisutnih u ekstraktima PM. Naime, prema poznatim konstantama disocijacije za 2,4DNP (pK_a = 4,1) (Robinson, 1967), 4NC (pK_a = 6,6) (Aydin i sur., 1997) i 4NP (pK_a = 7,1) (Robinson i Biggs, 1955) (Tablica 2.), NMAU su, pri korištenim eksperimentalnim uvjetima, negativno nabijene molekule i stoga sklone interakciji s anionskim prijenosnicima poput Oatp1d1. Razlog tome je njihova struktura s jednom ili dvije nitro skupine vezane na benzenski prsten, koje imaju svojstvo jakog privlačenja elektrona čime dolazi do deaktivacije aromatskog prstena i uslijed toga do povećanja njegove ionizacije i interakcijskog potencijala.

Također, ispitan je odnos između topološke polarne površine (TPSA) i IC_{50} modelnih NMAU određenih za interakciju s proteinskim prijenosnicima, Oct1 i Oatp1d1. TPSA molekule je zbroj površina svih polarnih atoma u molekuli, prvenstveno kisika i dušika, ali i njihovih vezanih atoma vodika (Ertl i sur., 2000). Korelacije TPSA i IC_{50} (Oct1) te TPSA i IC_{50} (Oatp1d1) bile su statistički značajne ($p < 0,05$). Koeficijent korelacije (r) je pokazao vrlo dobru pozitivnu korelaciju između TPSA i IC_{50} (Oct1, $r = 0,737$) i vrlo dobru negativnu korelaciju između TPSA i IC_{50} (Oatp1d1, $r = -0,697$). Suprotna korelacija mogla bi se povezati sa strukturnim razlikama aktivnog područja u transporterima. Oatp1d1 ima samo jedno aktivno vezno mjesto (Popović i sur., 2013) koje može preferencijalno interagirati s polarnijim molekulama zbog komplementarnih elektrostatskih interakcija ili interakcija s vodikom, dok Oct1 ima složenu regiju s više aktivnih mjesta (Mihaljević i sur., 2017) gdje bi molekule s višim TPSA mogle spriječiti optimalnu steričku interakciju ili pristup što bi moglo smanjiti učinkovitost interakcije. Ovi rezultati upućuju na to da na interakciju NMAU s membranskim prijenosnicima utječu polarnost molekule i struktura prijenosnika, te o njima ovise i toksikološki efekti.

5.1.2. Uloga ekstrakata lebdećih čestica u fazi I staničnog detoksikacijskog mehanizma

U ovoj studiji ni sBB ekstrakti ni pojedinačni NMAU, kao ni njihove smjese nisu inducirali fazu I stanične detoksikacije (Slike 4., 16., 17. i 18.), dok je AA_{H2O} bio tipični inducer (Slika 5.). Pošto se EROD test obično koristi za procjenu izloženosti PAH, PCDD i PCB (Bosveld i sur., 2002), u sBB i AA je identificirano i kvantificirano 11 PAH: fluoranten (Flu), piren (Pyr), benzo(a)antracen (BaA), krizen (Chry), benzo(b)fluoranten (BbF), benzo(k)fluoranten (BkF), benzo(j)fluoranten (BjF), benzo(a)piren (BaP), dibenzo(a,h)antracen (DahA), benzo(ghi)perilen (BghiP) i indeno(1,2,3-cd)piren (IP) identificiranih i kvantificiranih u PM (Prilog 2.). Ukupna masa PAH bila je 215,9 µg u sBB i 388,0 µg u AA , što čini 1,2 % mase sBB i 15,5 % mase AA. Viši sadržaj PAH u AA vjerojatno objašnjava indukciju enzima faze I u tom uzorku s vrijednosti EC_{50} = 31,8 mg/L (Slika 5.). Spojevi Pyr i Flu bili su najzastupljeniji u sBB, dok su u AA prevladavali BbF, IP, BaP, BghiP i Chry. Ovih pet PAH značajno pridonosi masi PM_{10} u tipičnim urbanim antropogenim lebdećim česticama (Jakovljević i sur., 2020). Zbog različitih otapala korištenih u biološkim testovima u usporedbi sa standardnim postupkom ekstrakcije PAH gdje se koristi smjesa otapala kako bi se osigurala visoka učinkovitost ekstrakcije (Jakovljević i sur., 2020.),

vjerojatno su manje količine PAH ekstrahirane iz sBB i AA uzoraka (Roper i sur., 2019.) objašnjavajući nedostatak učinka ekstrakata sBB i relativno slab učinak ekstrakta AA u EROD biotestu.

5.1.3. Ekološki učinci izloženosti NMAU

Osim izravnih kopnenih izvora (Heberer i sur., 1998; Ramos i sur., 2021; Wennrich i sur., 1995), NMAU su kvantificirani u različitim odjeljcima atmosfere kao komponente primarno emitiranih i/ili sekundarno formiranih organskih čestica (Li i sur., 2020). Uglavnom su u plinskoj fazi, oblacima, magli i kišnici detektirani NP i NC (Harrison i sur., 2005) kao i u PM diljem Europe (Claeys i sur., 2012; Frka i sur., 2022; Iinuma i sur., 2010; Jakovljević i sur., 2021; Kitanovski i sur., 2021), u Južnoj Americi (Claeys i sur., 2012.) i Aziji (Chow i sur., 2015) u koncentracijama od 0,3 – 520,0 ng/m^3. Nekoliko NMAU kao što su 3-metil-4- i 3-hidroksi-4-nitrobenzojeva kiselina (3M4NBA, 3H4NBA), 3-metoksi-4-nitrofenol (3MeO4NP), 4-etil-5- i 3-etil-5-nitrokatehol (4Et5NC, 3Et5NC) i 3-metoksi-5-nitrokatehol (3MeO5NC) nedavno su prvi put identificirani u ambijentalnim lebdećim česticama u Ljubljani (Slovenija) (Frka i sur., 2022.). Količina NMAU u PM varira sezonski, s višim koncentracijama u jesen i zimu uslijed grijanja na drva (Frka i sur., 2022.) i industrijskih aktivnosti u urbanim sredinama (Claeys i sur., 2012.). Dokazano je da 74 % ukupne količine NMAU detektiranih u $PM_{15.6}$ pripada submikronskoj frakciji veličine čestica < 1,01 μm (Frka i sur., 2022), što predstavlja opasnost zbog mogućeg prodiranja u plućne alveole. Najučinkovitiji put uklanjanja NMAU iz atmosfere je putem mokrog taloženja, do 76 μg NMAU/L po danu (Jakovljević i sur., 2021), čime pridonose ukupnim NMAU u kopnenom i vodenom okolišu. Razine 4NP u tragovima (8 – 13 ng/L) otkrivene su u slatkoj vodi i snijegu na Antarktici (Vanni i sur., 2001), što ukazuje na njihovu veliku prostornu distribuciju zrakom. Osim u atmosferi, neki nitroaromatski spojevi kao što je 2,4DNP se mogu formirati *in situ* u morskoj vodi kao sekundarne onečišćujuće tvari kroz transformaciju fenola posredovanu prirodnim fotosenzibilizatorima (Calza i sur., 2008).

In vitro i *in vivo* ekotoksikološkim analizama modelnih NMAU i njihovih relevantnih vodenih smjesa (Σ_{10}NMAU i Σ_5NMAU) dobivene su IC_{50} vrijednosti u mg/L. Konkretno, IC_{50} vrijednosti za interakciju NMAU s transmembranskim proteinima bile su u rasponu od 2,6 mg/L (5NSA, Oatp1d1) do 108,1 mg/L (2,4DNP, Oct1). Za akutnu toksičnost za riblje stanice, vrijednosti IC_{50} bile su između 2,0 mg/L (4NS) i 4,1 mg/L (3M5NC). Kronična toksičnost za

mikroalge pokazala je IC_{50} od 0,66 do 1,1 mg/L (NC) i 13,4 do 54,1 mg/L (NP, NSA). Ove vrijednosti su u skladu s toksičnim vrijednostima za neke NMAU određene za druge vodene organizme. Na primjer, EC_{50} vrijednosti za toksičnost GUA, 6NG, 4NG i 4,6DNG na morske luminiscentne bakterije *Vibrio fisheri* bile su u rasponu od 16,7 do 102 mg/L (Pflieger i Kroflič, 2017). Organizmi na višim razinama biološke organizacije također pokazuju negativne učinke nakon izlaganja NMAU. U našim pokusima embriji zebrice pokazali su značajne negativne razvojne/morfološke učinke (Tablica 12., Slika 27.), popraćene smanjenom biomasom i promijenjenim sastavom lipida (Slika 28.). Dodatno, vrijednosti LC_{50} (smrtna koncentracija za 50 % organizama) od 18,7 mg/L i 9,7 mg/L i EC_{50} vrijednosti od 7,9 mg/L i 3,1 mg/L dobivene su nakon 48 h izlaganja embrija zebrice 2NP odnosno 2,4DNP (Ceylan i sur., 2016), slično nedavno objavljenim vrijednostima za određene NMAU (Babić i sur., 2021). Također je značajno smanjenje rasta i biomase te slaba fotokemijska učinkovitost fotosustava II primijećena kod kopnenih biljaka tijekom dvotjedne izloženosti korijena spoju 4NG (Adamek i sur., 2024).

Uspoređujući koncentracije NMAU otkrivene u površinskim vodama, uključujući kanalizaciju, s IC_{50} vrijednostima dobivenim u ovom radu, one su dva do tri reda veličine veće od NMAU koncentracija u površinskim vodama, općenito ukazujući na relativno malu opasnost NMAU na mikroalge i ribe. Međutim, rani negativni učinci izloženosti NMAU mogu se primijetiti već na vrijednostima IC_{10}, što bi moglo postati relevantno nakon ekstremnih događaja poput dugotrajnih i/ili velikih šumskih požara, za koje se predviđa da će se događati sve češće zbog globalnog zatopljenja i suša povezanih s klimatskim promjenama (Seager i sur., 2019). Izračunate vrijednosti IC_{10} za MTT test bile su u rasponu od 0,25 mg/L (4M5NC) do 1,3 mg/L (4NS), s prosječnom vrijednošću od 0,62 mg/L (Slika 22.). Za test kronične toksičnosti mikroalgi, vrijednosti IC_{10} bile su u rasponu od 0,34 mg/L (3M5NC) do 41,9 mg/L (3NSA), s prosjekom od 17,5 mg/L (Slika 26.). Za biotest interakcije s transmembranskim proteinima, vrijednosti IC_{10} bile su od 0,6 mg/L (5NSA) do 11,4 mg/L (4NG) za Oatp1d1, i od 2,5 mg/L (3M4NC) do 26,7 mg/L (5NSA) za Oct1 (Slika 15.A i B).

5.1.4. Utjecaj NMAU na homeostazu lipida embrija zebrice

Lipidi su biološki važne molekule koje osiguravaju energiju tijekom embriogeneze i metaboličkih funkcija zebrice. Na početku embriogeneze najzastupljeniji lipidi u embriju su COH (40 %), PL (35 %) i TG (9 %) (Fraher i sur., 2016). Dominantni lipidi u embrijima zebrica

na koje utječe subletalna koncentracija (2,6 mg/L) 2,4DNP su PL, zatim neutralni lipidi i GL (Hachicho i sur., 2015). Djelomično lipofilne molekule poput 2,4DNP nakupljaju se u staničnoj membrani povećavajući njezinu fluidnost. Kao odgovor, embriji zebrice prolaze kroz "homeoviskoznu prilagodbu", mijenjajući svoj fosfolipidni sastav masnih kiselina iz nezasićenih i razgranatih lanaca u zasićene ravne lance, čime se povećava viskoznost stanične membrane (Hachicho i sur., 2015.). Uz 2,4DNP (9,2 mg/L), istraživali smo subakutne učinke drugih NMAU povezanih s PM (5,0 mg/L 4NS, 42,3 mg/L 4NG i 3M5NC, 38,8 mg/L 4NC) na zastupljenost specifičnih lipidnih klasa u embrijima zebrica nakon 48 hpf izlaganja. Uočili smo statistički značajan porast sadržaja TG, PL, GL i WE u embrijima zebrica, što ukazuje na poremećaj homeostaze lipida. U skladu s brojem zahvaćenih lipidnih skupina, učinak se smanjivao u nizu 4NG > 4NC > 3M5NC > 2,4DNP, 4NS (Slika 28.). Budući da se rezultati FET testa mogu ekstrapolirati za predviđanje akutne toksičnosti u odraslih zebrica (Belanger i sur., 2013), očekivane su promjene i u lipidima zebrica zbog izlaganja NMAU. Štoviše, poznato je da je odrasla riba zebrica izložena 6 i 12 mg/L 2,4DNP povećala TG u cijelom tijelu zbog izravnog utjecaja 2,4DNP na katabolizam lipida ili stresa uzrokovanog istovremenoj izloženosti toksičnoj tvari i obavljanja aktivnosti poput plivanja (Marit i Weber, 2011).

5.2. Utjecaj NMAU na rast i fiziologiju mikroalge *Dunaliella tertiolecta*

Mikroalge su ključni sastavni dio ekosustava jer prozvode kisik, vrše apsorpciju CO_2 te održavaju biološku ravnotežu. Izloženost različitim polutantima, poput organskih onečišćujućih tvari može negativno utjecati na ove organizme, te posljedično na cijeli vodeni ekosustav. Stoga je u ovom radu ispitan utjecaj vodenog ekstrakta atmosferskih lebdećih čestica nastalih uslijed izgaranja biomase (B) i smjesa modelnih NMAU (najzastupljenijim u lebdećim česticama izgaranja biomase) različitih koncentracija (N i NV) na populaciju mikroalgi *Dunaliella tertiolecta* tijekom sedam dana.

Dobiveni rezultati ukazuju da smjese N (4,14 µg/L NMAU) i NV (4140 µg/L NMAU) značajno inhibiraju rast stanica u odnosu na kontrolu pri čemu je u uzorcima N rast stanica inhibiran ~7 %, a u uzorcima NV ~26 % (Slika 29.). Uzorci B nisu pokazali značajan utjecaj na inhibiciju rasta stanica iako je koncentracija odabranih modelnih NMAU spojeva u njima bila ista kao u uzorcima N. Ovi rezultati upućuju na moguću interakciju drugih komponenti B smjese (Prilog 3.), koje su mogle umanjiti učinak NMAU spojeva, čime su se smanjile njihove

inhibicijske aktivnosti na rast stanica. Koncentracije Chl *a*, F_v/F_m, ETR i NPQ su tijekom cijelog eksperimenta rasle u svim uzorcima (Slike 30. i 31.) te nije bilo statistički značajne razlike između B, N i NV u odnosu na kontrolne uzorke (K). Navedeno upućuje da analiti nisu uzrokovali oštećenje fotosintetskog sustava, odnosno smanjenje fotosintetske aktivnosti. Vrijednosti POC i DOC su također rasle do kraja eksperimenta u svim uzorcima (Slika 32.) bez razlike između dodanih analita i K. Povećanje koncentracije POC i DOC pokazuje da su mikroalge konstantno proizvodile organsku tvar prilikom čega je dio ugljika ugrađen u povećanje biomase (POC), a dio izlučen u medij kao DOC. U eksperimentu je analiziran utjecaj analita B, N i NV na promjene u sastavu čestičnih proteina, lipida i ugljikohidrata kao ključnih organskih spojeva u mikroalgama proizvedenim procesom fotosinteze, od kojih svaki ima ulogu u fiziološkim procesima. Proteini su sastavni dio stanične membrane gdje sudjeluju u prijenosu molekula, strukturni proteini održavaju oblik stanice dok enzimi kataliziraju biokemijske reakcije neophodne za metaboličke procese. Ugljikohidrati djeluju kao izvor energije i bitan su element stanične strukture, dok lipidi imaju dvostruku funkciju – kao skladište energije te kao ključna komponenta staničnih membrana, čime pridonose stabilnosti i funkcionalnosti stanične barijere. Udio proteina, lipida i ugljikohidrata koje stanica sintetizira ovisi o vrsti mikroalge (Torres i sur., 2008). Obzirom na visoku osjetljivost, mikroalge karakterizira brza fiziološka prilagodba na promjene u okolišu, a promjena sastava i sinteza navedenih biomolekula ukazuje na njihovu izloženost stresnim uvjetima (Flanjak i sur., 2022; Jiang i sur., 2013; Oren, 2014; Smith i sur., 2007; Vrana i sur., 2022). Rezultati eksperimenta izloženosti populacije mikroalgi *Dunaliella tertiolecta* u ovom radu su pokazali da prisutnost dodanih NMAU nije uzrokovala statistički značajne promjene u sastavu biomolekula (Slike 33., 34. i 35.). Analiza udjela pojedinih biomolekula po stanici pokazala je smanjenje ukupne količine čestične tvari tijekom trajanja eksperimenta. Na početku eksperimenta, najveći je bio udio PLIP u svim uzorcima, dok je na kraju eksperimenta najizraženiji bio udio PPROT (Slika 36.). Niski udio PTCHO može ukazivati na tendenciju stanica za skladištenjem energije, odnosno pohranom ugljika u lipidima, a ne u ugljikohidratima (Gharajeh i sur., 2020). Dobivene niske vrijednosti omjera PAT/DOC ukazuju na prevladavanje hidrofilnih molekula poput polisaharida koje pokazuju svojstva površinske aktivnosti na granici faza (Ćosović i Vojvodić, 1998; Gašparović i sur., 2007). PAT obuhvaća organsku tvar koja zbog svojstva akumulacije na granici faza morska voda-atmosfera (Frka i sur., 2009, 2012; Gašparović i sur., 2007) utječe na promjenu fizikalno-kemijskih svojstava na navedenoj granici faza te time na prijenos mase i energije (Frew, 1997). Glavni izvori PAT su izlučevine fitoplanktona i produkti njihove razgradnje (Žutić i sur., 1981). Dokazano je da stresori poput promjene saliniteta i taloženja

alohtonog materijala putem lebdećih čestica (Ivošević DeNardis i sur., 2024; Milinković i sur., 2022) utječu na njihovo izlučivanje. Dodatak N ili B analita u odnosu na kontrolu u našem eksperimentu nije statistički značajno utjecao na produkciju i izlučivanje organske tvari koja ima svojstvo površinske aktivnosti.

Toksičnost spojeva na mikroalge ovisi o sastavu medija, svojstvima medija, veličini stanice, osjetljivosti pojedine vrste, odnosno njenom mehanizmu obrane, mehanizmu djelovanja spoja u stanicama mikroalgi, kao i koncentraciji te vremenu izloženosti onečišćujućoj tvari (Machado i Soares, 2019; Duan i sur., 2017; El Agawany i sur., 2021; Ertürk i Saçan, 2012; Fu i sur., 2015; Kaamoush, 2018; Murphy i sur., 2003). Smjesa istih pet NMAU spojeva koja je dodana u ovom eksperimentu je u eksperimentu određivanja kronične toksičnosti (AlgaeTox test) sa mikroalgom *Scenedesmus subspicatus* uzrokovala 50 % inhibiciju rasta stanica pri koncentraciji 6,55 mg/L (Slika 25.) Brojna istraživanja su pokazala visoku sposobnost preživljavanja zelenih mikroalgi roda *Dunaliella* u ekstremnim uvjetima saliniteta, temperature i pH (Pick, 1998; Vrana i sur., 2022) te značajnu otpornost na različite stresne faktore poput prisutnosti teških metala, pesticida kao i organskih onečišćujućih tvari. Primjerice, Parsy i sur. (2022) su proveli istraživanje s ciljem procjene utjecaja saliniteta, različitih metala i organskih spojeva, poput fenola, koji su prisutni u otpadnim vodama industrije fosilnih goriva. Ispitivanje je provedeno u f mediju pri čemu su praćeni uvjeti rasta pet različitih vrsta morskih mikroalgi i jedne vrste cijanobakterije. Rezultati su pokazali da *Dunaliella salina* ima najveću otpornost, odnosno najveću stopu rasta u uvjetima visokog saliniteta, visokih koncentracija metala i fenola. Chen i Jiang (2011), Chen i sur. (2007) te Zhu i Jiang (2008) su dokazali da pri izlaganju različitim organskim polutantima, poput homologa fenola, pesticida i ugljikovog tetraklorida, mikroalge vrste *Dunaliella* imaju sposobnost preživljavanja. Navedena istraživanja odnosila su se primarno na praćenje inhibicije rasta, morfologije stanica, ali i na praćenje aktivnosti enzima superoksid dismutaze i katalaze. Zhu i Jiang (2008) su pokazali da izloženost mikroalgi visokim koncentracijama organskog spoja dovodi do početnog smanjenja broja stanica, što ukazuje na toksičan učinak spoja na staničnu proliferaciju. Međutim, nakon određenog vremena, zabilježen je ponovni rast populacije mikroalgi koji je bio sličan onome u kontrolnim uzorcima. Izlaganjem mikroalgi pesticidu triklofonu u rasponu koncentracija 75 – 100 mg/L Chen i Jiang (2011) su uočili povišene koncentracije antioksidanata β karotena, superoksid dismutaze i katalaze. Sličan učinak aktivacije antioksidanata imao je akrilamid (Ling i sur., 2019) kao i izloženost stanica *Dunaliella salina* i *Dunaliella tertiolecta* bakru (Nikookar i sur., 2005) i željezu (López i sur.,

2015). Ovi rezultati sugeriraju da mikroalga posjeduje sposobnost prilagodbe na toksične koncentracije spojeva, što implicira potencijalne mehanizme tolerancije na stresne uvjete, uključujući mogućnost modifikacije metaboličkih puteva ili povećanja aktivnosti zaštitnih enzima. Izlaganjem mikroalga dvama različitim PAH Sajadinasab i sur. (2024) su pokazali da vrsta *Dunaliella tertiolecta* posjeduje veću otpornost u odnosu na vrstu *Dunaliella salina*. Pritom su kao ključni mehanizmi otpornosti vrste istaknuti sposobnost metaboliziranja spojeva, te snažna aktivnost antioksidativnih molekula koje neutraliziraju ROS nastale uslijed oksidativnog stresa izazvanog polutantima.

Obzirom na navedeno, unatoč nedostatka toksičnog utjecaja u okviru ovog rada, ne smije se zanemariti mogućnost mehanizma unutar stanica *Dunaliella tertiolecta* koji omogućuju preživljavanje u prisutnosti NMAU bez izraženih promjena u fiziološkim funkcijama koje bi ukazivale na toksične efekte. Pošto se koncentracija (i boja) NMAU smanjivala tijekom inkubacijskog eksperimenta, a dokazali smo da fotokemijske reakcije nisu utjecale na to, moguće je da su spojevi ipak na neki način iskorišteni/transformirani od strane mikroalgi, što bi trebalo potvrditi/opovrgnuti daljnjim eksperimentima.

Također, postoji mogućnost toksičnog utjecaja ispitivanih analita u stvarnim uvjetima u prirodnim vodenim sustavima gdje brojni faktori mogu povećati toksičnost i negativne ekološke učinke NMAU, uključujući niže koncentracije hranjivih tvari dostupne mikroalgama, u odnosu na f/2 medij, kao i potencijalni sinergistički toksični učinak s ostalim komponentama vodenih ekosustava.

Iako su analiti u ovom eksperimentu imali učinak na inhibiciju rasta *Dunaliella tertiolecta*, njihova niska toksičnost i odsutnost značajnih promjena u sastavu biomolekula sugeriraju da NMAU djeluju kao stresori koji ne uzrokuju ozbiljne i dugoročne promjene na staničnoj razini, ali ometaju normalnu dinamiku rasta mikroalge u uvjetima korištenog f/2 medija.

5.3. Utjecaj formiranja Cu(II)-NC kompleksa na kroničnu toksičnost Cu(II) i NC

Iako su u sastavu medija za provođenje biotestova kronične toksičnosti prisutni razni anorganski spojevi i EDTA koji su nužni za rast mikroalgi, u SW voltamogramima su dobiveni redukcijski pikovi Cu(II), NC i Cu(II)-NC kompleksa (Slike 50. i 52.) slični onima prilikom

mjerenja u modelnom elektrolitu (KNO_3, HEPES; Slika 41.). Nadalje, nakon uključivanja koncentracija i konstanti stabilnosti svih relevantnih komponenti tog medija (Fe^{3+}, EDTA, Cl^-, OH^-, HCO_3^-; Slike 51. i 53.) u izračune, dijagrami raspodjele vrsta za Cu(II) i 4NC su također pokazali njihove nekompleksirane (slobodne)/labilne vrste naspram kompleksiranih vrsta. Ovo podupire voltametrijsko tumačenje (ne)toksičnosti u Cu(II)/NC smjesi pri pH = 8,1, ali također naglašava ključnu ulogu pH u regulaciji specijacije anorganskih i organskih onečišćujućih tvari u širokom rasponu pH od 2,0 – 11,0. Predviđeno smanjenje pH u vodenim sustavima zbog povećanja atmosferskih razina CO_2 značajno utječe na specijaciju Cu(II) i organskih liganda (Millero i sur., 2009).

Iako je istaknuta važnost utjecaja Cu(II) iona na toksičnost NC, evidentno je da je kompleksiranje s NC također snažno utjecalo na toksičnost Cu(II) (Slike 50. i 52). Dok su naši rezultati o ekotoksičnosti prvi takvi vezani za istraživanje interakcija Cu(II) s NC, sličan učinak kompleksiranja je prethodno primijećen za smjese Cu(II)-fenola (Kim i sur., 2006) i Cu(II)-nitrofenola (Su i sur., 2012), gdje su fenoli utjecali na koncentraciju slobodnog (toksičnog) Cu(II) za *Daphnia magna*, odnosno *Photobacterium phosphoreum*. Istraživanje sa mikroalgom *Scenedesmus subspicatus* je pokazalo da prisutnost veće koncentracije sintetskog liganda, EDTA (17 i 34 µM) ili prirodnog liganda, fulvinske kiseline (1 – 5 mg/L) povećava rast mikroalgi zbog sprječavanja adsorpcije Cu na staničnu stijenku (Ma i sur., 2003). Pokazano je i da povećanje tvrdoće i alkalnosti vode smanjuju toksičnost Cu na *Scenedesmus subspicatus* (Fawaz i sur., 2018). Budući da je *Scenedesmus subspicatus* mikroalga za koju se zna da ima sposobnost akumulacije Cu i prilagođavanja bioraspoloživom Cu (Knauer i sur., 1997), relativno visoke IC_{50} vrijednosti dobivene u biološkim testovima AlgaeTox bile su očekivani rezultat.

Kako je prag toksičnosti onečišćujućih tvari specifičan za pojedinačne mikroalge, tako bi se slični biotestovi trebali provesti za različite mikroalge. S druge strane, postoji nekoliko mehanizama koje su razvile mikroalge za smanjenje unosa štetnih iona metala. Jedan od njih je izlučivanje specifičnih organskih liganada (L_1 skupina) koji vežu ione metala u inertne komplekse, čineći ih nedostupnima za unos (Sunda, 2012). Osim izlučivanja organske tvari, ovdje smo pokazali da toksičnost Cu(II) u prirodnim vodama također snažno ovisi o formiranju kompleksa s onečišćujućim tvarima poput NC. Ovo je osobito važno za Cu(II), čiji je učinak na mikroalge ili koristan ili štetan, ovisno o biodostupnoj koncentraciji. Konačno, kompleksiranje s organskim ligandima je proces koji djeluje kao pufer u regulaciji malih fluktuacija u koncentraciji slobodnih (toksičnih) Cu(II) iona (Buck i sur., 2007). Razumijevanje

svojstava ovih kompleksa kao što je njihova kinetika formiranja i stabilnost u promjenjivim kemijskim uvjetima okoliša, ključno je za predviđanje i upravljanje toksičnošću onečišćujućih tvari u vodenom okolišu. Prema dobivenim rezultatima, voltametrija se potvrdila kao vrlo korisna metoda za istraživanje i detekciju organskih onečišćujućih tvari i iona metala, kao i njihovih specifičnih interakcija kompleksiranja u slatkovodnom mediju.

6. ZAKLJUČCI

- Klimatske mjere usmjerene na ciljeve Pariškog sporazuma iz 2016. godine, usporedno s rastućim cijenama fosilnih goriva, doprinose povećanju korištenja biomase kao izvora energije. Istodobno, toplija i sušnija klima dovodi do učestalijih i razornijih šumskih požara koji značajno doprinose emisijama BB čestica u cijelom svijetu. Ovi trendovi upućuju na porast koncentracija čestica dima prilikom izgaranja drvne mase, kao i drugih onečišćujućih tvari u zraku, uključujući NMAU, naglašavajući nužnost hitne i sveobuhvatne procjene njihovih utjecaja na okoliš. Prema predviđanjima, razine $PM_{2,5}$ u regijama s visokim antropogenim zagađenjem neće se značajno smanjiti (Bhattarai i sur., 2024), što dodatno povećava zabrinutost zbog taloženja PM u vodenim sustavima gdje postaju bioraspoložive za različite organizme. Stoga provedene studije pružaju kritične uvide u ekološke opasnosti koje predstavljaju atmosferske lebdeće čestice, s posebnim naglaskom na njihov specifičan kemijski sastav i toksičnost. Korištenjem različitih *in vivo* i *in vitro* biotestova, povezali smo toksičnost ekstrakata sBB i AA i njihov sadržaj NMAU. Među testiranim spojevima, najzastupljeniji NMAU (3M5NC, 4M5NC, 3M4NC, 4NC i 4NS u sBB; 4NC, 3M5NC, 4M5NC i 3M4NC u AA) pokazali su značajne ekotoksične učinke na vodene organizme. Pokazalo se da smjese navedenih NMAU u sBB izazivaju akutnu toksičnost ribljih stanica (IC_{50} = 4,7 mg/L) i kroničnu toksičnost mikroalgi (IC_{50} = 6,6 mg/L), odražavajući toksične učinke pojedinih NMAU. Nadalje, 4NS se pokazao kao najpotentniji spoj u izazivanju morfoloških promjena tijekom razvoja embrija ribe zebrice, a slijedili su ga 2,4DNP > 4NC > 3M5NC > 4NG, dok su subletalne koncentracije promijenile homeostazu lipida u nizu 4NG > 4NC > 3M5NC > 2,4DNP, 4NS. Ovi rezultati naglašavaju hitnu potrebu za kontinuiranim praćenjem atmosferskih NMAU, posebno NC kao toksičnih spojeva BB emisija.
- Rezultati inkubacijskog eksperimenta s mikroalgom vrste *Dunaliella tertiolecta* ukazuju da njihova izloženost atmosferskim lebdećim česticama nastalim izgaranjem biomase i smjesama modelnih NMAU, u koncentracijama koje odgovaraju onima u lebdećim česticama (4 µg/L) i 1000 puta većim koncentracijama (4000 µg/L), nije izazvala značajne promjene u biokemijskom sastavu stanica niti ozbiljne toksične efekte na fiziološke funkcije. Iako je došlo do statistički značajne inhibicije rasta stanica u uzorcima sa smjesama NMAU, promjene u sastavu proteina, lipida i ugljikohidrata nisu bile statistički značajne. Ovi rezultati sugeriraju da *Dunaliella tertiolecta* posjeduje mehanizme prilagodbe koji omogućuju preživljavanje u stresnim uvjetima poput izloženosti polutantima, bez izraženih negativnih posljedica na metaboličke procese u stanicama. Unatoč niskim toksičnim učincima u kontroliranim uvjetima

ovog eksperimenta, potrebno je uzeti u obzir potencijalne ekološke posljedice u prirodnim uvjetima, gdje bi složeniji okolišni faktori mogli utjecati na njihovu toksičnost i posljedično na dinamiku ekosustava.

- Nitrokateholi poput 4NC, 3M4NC, 3M5NC, i 4M5NC, među ispitivanim toksičnim učincima NP, NC i NSA, pokazali su najizraženiji toksični učinak. S obzirom na to da prirodne vode predstavljaju složen sustav koji se sastoji od različitih organskih i anorganskih tvari, biotestovi provedeni s pojedinačnim spojevima u laboratorijski kontroliranim uvjetima bi mogli precijeniti ili podcijeniti stvarni toksični učinak NC u prirodnim vodama zbog mogućih interakcija. Stoga je cilj ovog istraživanja bio pokazati kako interakcije s Cu(II) ionima, koji su anorganska komponenta prirodnih voda i ekotoksični u povišenim koncentracijama, mogu utjecati na toksičnost NC stvaranjem Cu(II)-NC kompleksa. Prvo smo istražili voltametrijske značajke di-nitrokateholatnih $[Cu(NC)_2]^{2-}$ kompleksa u vodenoj otopini (pH 8,2). U SW voltamogramima uočen je pik 2 na $E_p \sim 0{,}35$ V zbog kvazireverzibilne dvoelektronske redukcije kompleksa prethodno adsorbiranih na površini elektrode. Stabilnost $[Cu(NC_2)]^{2-}$ kompleksa bila je znatno smanjena sniženjem pH, pri čemu su mono-nitrokateholatni kompleksi [Cu(NC)] bili zastupljeniji od di-nitrokateholatnih $[Cu(NC)_2]^{2-}$. Di-nitrokateholatni kompleksi su se ponovno formirali povećanjem pH vrijednosti prema alkalnim uvjetima (od pH 3,4 do 8,2), a takva promjena u broju NC molekula koje kompleksiraju Cu(II) može se očekivati u vodenim okolišima u kojima dolazi do promjena u pH.
- Provedeni testovi ekotoksičnosti s mikroalgom *Scenedesmus subspicatus* izloženoj različitim toksičnim i netoksičnim koncentracijama Cu(II) i 4NC ili 4M5NC, pokazali su da binarne smjese Cu(II)-NC uzrokuju veće preživljavanje mikroalgi u odnosu na pojedinačne Cu(II) ili NC spojeve, što upućuje na njihov antagonistički učinak. Integracijom voltametrije u ekotoksikologiju pokazali smo da stvaranje $[Cu(NC)_2]^{2-}$ kompleksa smanjuje toksičnost, dok disocijacija kompleksa, praćena porastom slobodnih/labilnih anorganskih vrsti Cu(II) ili slobodnog NC, te formiranje polinuklearnih Cu(II) vrsta, povećava toksičnost Cu(II)-NC smjesa. Naši rezultati naglašavaju da kompleksiranje s metalnim ionima poput Cu(II), zajedno s okolišnim čimbenicima kao što je pH, značajno utječe na ponašanje i ekološke rizike NC spojeva koji interagiraju s Cu(II) ionima stvarajući komplekse u različitim vodenim sustavima. Utjecaj onečišćujućih tvari kao što su NC i Cu(II) na vodene sustave postaje sve zabrinjavajući zbog predviđanja budućih klimatskih i antropogenih promjena za koje se očekuje da će povećati njihove koncentracije. Predviđanja sugeriraju da će globalno zatopljenje povećati učestalost i raširenost šumskih požara, glavnog izvora atmosferskih NC, čime će se povećati njihova koncentracija u okolišu. Istovremeno, rastuća globalna potražnja za bakrom, potaknuta širenjem

tehnoloških i industrijskih sektora, vjerojatno će rezultirati povećanim antropogenim emisijama bakra u ekosustave. Stoga je ključno razumijeti interakcije između Cu(II) i organskih onećišćujućih tvari poput NC u promjenjivim uvjetima okoliša.

7. POPIS LITERATURE

Adamek, M., Kavčič, A., Debeljak, M., Šala, M., Grdadolnik, J., Vogel-Mikuš, K., & Kroflič, A. (2024). Toxicity of nitrophenolic pollutant 4-nitroguaiacol to terrestrial plants and comparison with its non-nitro analogue guaiacol (2-methoxyphenol). *Scientific Reports*, *14*(1), 2198. https://doi.org/10.1038/s41598-024-52610-6

Alderighi, L., Gans, P., Ienco, A., Peters, D., Sabatini, A., & Vacca, A. (1999). Hyperquad simulation and speciation (HySS): A utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species. *Coordination Chemistry Reviews*, *184*(1), 311–318. https://doi.org/10.1016/S0010-8545(98)00260-4

Allen, J., Liu, X., Weston, D., Prince, L., Oberdörster, G., Finkelstein, J., Johnston, C., & Cory-Slechta, D. (2014). Developmental Exposure to Concentrated Ambient Ultrafine Particulate Matter Air Pollution in Mice Results in Persistent and Sex-Dependent Behavioral Neurotoxicity and Glial Activation. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, *140*. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu059

Alves, D., Migliavacca, D., Rodrigues, M. A., Illi, J., Bianchin, L., & Benvenuti, T. (2015). Concentrations of PM2.5-10 and PM2.5 and metallic elements around the Schmidt Stream area, in the Sinos River Basin, southern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, *75*. https://doi.org/10.1590/1519-6984.00113suppl

Ambrosi, G., Formica, M., Fusi, V., Giorgi, L., & Micheloni, M. (2008). Polynuclear metal complexes of ligands containing phenolic units. *Coordination Chemistry Reviews*, *252*(10), 1121–1152. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.09.027

Amodio, M., Catino, S., Dambruoso, P. R., De Gennaro, G., Di Gilio, A., Giungato, P., Laiola, E., Marzocca, A., Mazzone, A., Sardaro, A., & Tutino, M. (2014). Atmospheric Deposition: Sampling Procedures, Analytical Methods, and Main Recent Findings from the Scientific Literature. *Advances in Meteorology*, *2014*, 1–27. https://doi.org/10.1155/2014/161730

An, Z., Sun, J., Mei, Q., Wei, B., Li, M., Xie, J., He, M., & Wang, Q. (2022). Unravelling the effects of complexation of transition metal ions on the hydroxylation of catechol over the whole pH region. *Journal of Environmental Sciences (China)*, *115*, 392–402. https://doi.org/10.1016/j.jes.2021.08.011

Artemenko, A. G., Muratov, E. N., Kuz'min, V. E., Muratov, N. N., Varlamova, E. V., Kuz'mina, A. V., Gorb, L. G., Golius, A., Hill, F. C., Leszczynski, J., & Tropsha, A. (2011). QSAR analysis of the toxicity of nitroaromatics in *Tetrahymena pyriformis*:

Structural factors and possible modes of action. *SAR and QSAR in Environmental Research*, *22*(5–6), 575–601. https://doi.org/10.1080/1062936X.2011.569950

Asman, W. A., Jørgensen, A., Bossi, R., Vejrup, K. V., Mogensen, B. B., & Glasius, M. (2005). Wet deposition of pesticides and nitrophenols at two sites in Denmark: Measurements and contributions from regional sources. *Chemosphere*, *59*(7), 1023–1031. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.048

Aydin, R., U, O., & N, T. (1997). Potentiometric and spectroscopic determinaton of acid dissociation constants of some phenols and salicylic acids. *Turkish Journal of Chemistry*, *21*, 428–436.

Babić, S., Čižmek, L., Maršavelski, A., Malev, O., Pflieger, M., Strunjak-Perović, I., Popović, N. T., Čož-Rakovac, R., & Trebše, P. (2021). Utilization of the zebrafish model to unravel the harmful effects of biomass burning during Amazonian wildfires. *Scientific Reports*, *11*(1), 2527. https://doi.org/10.1038/s41598-021-81789-1

Bai, L., Chen, H., Hatzopoulou, M., Jerrett, M., Kwong, J. C., Burnett, R. T., van Donkelaar, A., Copes, R., Martin, R. V., Van Ryswyk, K., Lu, H., Kopp, A., & Weichenthal, S. (2018). Exposure to Ambient Ultrafine Particles and Nitrogen Dioxide and Incident Hypertension and Diabetes. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, *29*(3), 323–332. https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000798

Baker, N. R. (2008). Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual Review of Plant Biology*, *59*(1), 89–113. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759

Bal, W., & Kasprzak, K. S. (2002). Induction of oxidative DNA damage by carcinogenic metals. *Toxicology letters*, *127*(1–3), 55–62. https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00483-0

Balmes, J., & Eisner, M. (2016). *Indoor and Outdoor Air Pollution* (str. 1331-1342.e5). https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3383-5.00074-9

Belanger, S. E., Rawlings, J. M., & Carr, G. J. (2013). Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *32*(8), 1768–1783. https://doi.org/10.1002/etc.2244

Belghith, T., Athmouni, K., Bellassoued, K., El Feki, A., & Ayadi, H. (2016). Physiological and biochemical response of Dunaliella salina to cadmium pollution. *Journal of applied phycology*, *28*, 991–999. https://doi.org/10.1007/s10811-015-0630-5

Benfeito, S., Silva, T., Garrido, J., Andrade, P. B., Sottomayor, M. J., Borges, F., & Garrido, E. M. (2014). Effects of chlorophenoxy herbicides and their main transformation

products on DNA damage and acetylcholinesterase activity. *BioMed Research International*, *2014*, 709036. https://doi.org/10.1155/2014/709036

Bhattarai, H., Tai, A. P. K., Val Martin, M., & Yung, D. H. Y. (2024). Responses of fine particulate matter (PM2.5) air quality to future climate, land use, and emission changes: Insights from modeling across shared socioeconomic pathways. *The Science of the Total Environment*, *948*, 174611. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.174611

Bigot, M., Muir, D. C. G., Hawker, D. W., Cropp, R., Dachs, J., Teixeira, C. F., & Bengtson Nash, S. (2016). Air–Seawater Exchange of Organochlorine Pesticides in the Southern Ocean between Australia and Antarctica. *Environmental Science & Technology*, *50*(15), 8001–8009. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01970

Blaise, C., & Férard, J.-F. (2005). *Small-scale freshwater toxicity investigations: Volume 2 - Hazard assessment schemes* (str. 422). https://doi.org/10.1007/1-4020-3553-5

Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *37*(8), 911–917. https://doi.org/10.1139/o59-099

Bluvshtein, N., Lin, P., Flores, J. M., Segev, L., Mazar, Y., Tas, E., Snider, G., Weagle, C., Brown, S. S., Laskin, A., & Rudich, Y. (2017). Broadband optical properties of biomass-burning aerosol and identification of brown carbon chromophores. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, *122*(10), 5441–5456. https://doi.org/10.1002/2016JD026230

Borowitzka, M., & Siva, C. (2007). The taxonomy of the genus Dunaliella (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *Journal of Applied Phycology*, *19*, 567–590. https://doi.org/10.1007/s10811-007-9171-x

Bosveld, A. T. C., de Bie, P. A. F., van den Brink, N. W., Jongepier, H., & Klomp, A. V. (2002). In vitro EROD induction equivalency factors for the 10 PAHs generally monitored in risk assessment studies in The Netherlands. *Chemosphere*, *49*(1), 75–83. https://doi.org/10.1016/s0045-6535(02)00161-3

Brand, L. E., Sunda, W. G., & Guillard, R. R. (1986). Reduction of marine phytoplankton reproduction rates by copper and cadmium. *Journal of experimental marine biology and ecology*, *96*(3), 225–250. https://doi.org/10.1016/0022-0981(86)90205-4

Brook, R. D., Rajagopalan, S., Pope, C. A., Brook, J. R., Bhatnagar, A., Diez-Roux, A. V., Holguin, F., Hong, Y., Luepker, R. V., Mittleman, M. A., Peters, A., Siscovick, D., Smith, S. C., Whitsel, L., Kaufman, J. D., & American Heart Association Council on

Epidemiology and Prevention, Council on the Kidney in Cardiovascular Disease, and Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism. (2010). Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, *121*(21), 2331–2378. https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e3181dbece1

Bruns, E. A., El Haddad, I., Slowik, J. G., Kilic, D., Klein, F., Baltensperger, U., & Prévôt, A. S. H. (2016). Identification of significant precursor gases of secondary organic aerosols from residential wood combustion. *Scientific Reports*, *6*(1), 27881. https://doi.org/10.1038/srep27881

Buck, K. N., Ross, J. R. M., Russell Flegal, A., & Bruland, K. W. (2007). A review of total dissolved copper and its chemical speciation in San Francisco Bay, California. *Environmental Research*, *105*(1), 5–19. https://doi.org/10.1016/j.envres.2006.07.006

Calza, P., Massolino, C., Pelizzetti, E., & Minero, C. (2008). Solar driven production of toxic halogenated and nitroaromatic compounds in natural seawater. *Science of The Total Environment*, *398*(1), 196–202. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.03.023

Camargo, J. A., & Alonso, Á. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment international*, *32*(6), 831–849. https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.05.002

Castro-Bugallo, A., González-Fernández, Á., Guisande, C., & Barreiro, A. (2014). Comparative responses to metal oxide nanoparticles in marine phytoplankton. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *67*(4), 483–493. https://doi.org/10.1007/s00244-014-0044-4

Ceylan, Z., Şişman, T., Yazıcı, Z., & Altıkat, A. Ö. (2016). Embryotoxicity of nitrophenols to the early life stages of zebrafish (Danio rerio). *Toxicology and Industrial Health*, *32*(8), 1414–1422. https://doi.org/10.1177/0748233714562444

Chang, L. W. (2023). *Toxicology of Metals, Volume I*. CRC Press.

Chapman, P. M., Allen, H. E., Godtfredsen, K., & Z'Graggen, M. N. (1996). Policy Analysis, Peer Reviewed: Evaluation of Bioaccumulation Factors in Regulating Metals. *Environmental Science & Technology*, *30*(10), 448A-452A. https://doi.org/10.1021/es962436d

Chen, H., & Jiang, J.-G. (2011). Toxic effects of chemical pesticides (trichlorfon and dimehypo) on Dunaliella salina. *Chemosphere*, *84*(5), 664–670. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.032

Chen, J., Jiang, J. G., & Lin, Q. S. (2007). Toxicity tests of typical mutagenic phenols on Dunaliella salina. *Transactions of the ASABE*, *50*(2), 685–688. https://doi.org/10.13031/2013.22657

Chen, P., Kang, S., Tripathee, L., Ram, K., Rupakheti, M., Panday, A. K., Zhang, Q., Guo, J., Wang, X., Pu, T., & Li, C. (2020). Light absorption properties of elemental carbon (EC) and water-soluble brown carbon (WS–BrC) in the Kathmandu Valley, Nepal: A 5-year study. *Environmental Pollution*, *261*, 114239. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114239

Chester, R., Murphy, K. J. T., Lin, F. J., Berry, A. S., Bradshaw, G. A., & Corcoran, P. A. (1993). Factors controlling the solubilities of trace metals from non-remote aerosols deposited to the sea surface by the 'dry' deposition mode. *Marine Chemistry*, *42*(2), 107–126. https://doi.org/10.1016/0304-4203(93)90241-F

Chow, K. S., Huang, X. H. H., & Yu, J. (2015). Quantification of nitroaromatic compounds in atmospheric fine particulate matter in Hong Kong over 3 years: Field measurement evidence for secondary formation derived from biomass burning emissions. *Environmental Chemistry*, *13*, 665–673. https://doi.org/10.1071/EN15174

Claeys, M., Vermeylen, R., Yasmeen, F., Gómez-González, Y., Chi, X., Maenhaut, W., Mészáros, T., & Salma, I. (2012). Chemical characterisation of humic-like substances from urban, rural and tropical biomass burning environments using liquid chromatography with UV/vis photodiode array detection and electrospray ionisation mass spectrometry. *Environmental Chemistry*, *9*, 273–284. https://doi.org/10.1071/EN11163

Cornard, J.-P., Rasmiwetti, & Merlin, J.-C. (2005). Molecular structure and spectroscopic properties of 4-nitrocatechol at different pH: UV–visible, Raman, DFT and TD-DFT calculations. *Chemical Physics*, *309*(2), 239–249. https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2004.09.020

Corsolini, S., Romeo, T., Ademollo, N., Greco, S., & Focardi, S. (2002). POPs in key species of marine Antarctic ecosystem. *Microchemical journal*, *73*(1–2), 187–193. https://doi.org/10.1016/S0026-265X(02)00063-2

Craig, R. L., Nandy, L., Axson, J. L., Dutcher, C. S., & Ault, A. P. (2017). Spectroscopic Determination of Aerosol pH from Acid-Base Equilibria in Inorganic, Organic, and Mixed Systems. *The Journal of Physical Chemistry. A*, *121*(30), 5690–5699. https://doi.org/10.1021/acs.jpca.7b05261

Csavina, J., Field, J., Taylor, M. P., Gao, S., Landázuri, A., Betterton, E. A., & Sáez, A. E. (2012). A review on the importance of metals and metalloids in atmospheric dust and aerosol from mining operations. *Science of The Total Environment*, *433*, 58–73. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.013

Ćosović, B., & Vojvodić, V. (1998). Voltammetric Analysis of Surface Active Substances in Natural Seawater. *Electroanalysis*, *10*(6), 429–434. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4109(199805)10:6<429::AID-ELAN429>3.0.CO;2-7

Dalal, M. (2017). *A Textbook of Inorganic Chemistry—Volume 1*.

Danovaro, R., Della Croce, N., Dell'Anno, A., Fabiano, M., Marrale, D., & Martorano, D. (2000). Seasonal changes and biochemical composition of the labile organic matter flux in the Cretan Sea. *Progress in oceanography*, *46*(2–4), 259–278. https://doi.org/10.1016/S0079-6611(00)00022-7

Davis, A. (2020). Gene expression pattern analysis of anterior Hox genes during zebrafish (Danio rerio) embryonic development reveals divergent expression patterns from other teleosts. *Georgia Journal of Science*, *78*(2), 1.

Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, *89*(2), 271–277. https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6

Derikvandy, A., Pourkhabbaz, H. R., Banaee, M., Sureda, A., Haghi, N., & Pourkhabbaz, A. R. (2020). Genotoxicity and oxidative damage in zebrafish (Danio rerio) after exposure to effluent from ethyl alcohol industry. *Chemosphere*, *251*, 126609. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126609

Donaldson, K., Brown, D., Clouter, A., Duffin, R., MacNee, W., Renwick, L., Tran, L., & Stone, V. (2002). The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *Journal of Aerosol Medicine: The Official Journal of the International Society for Aerosols in Medicine*, *15*(2), 213–220. https://doi.org/10.1089/089426802320282338

Doney, S. C., Mahowald, N., Lima, I., Feely, R. A., Mackenzie, F. T., Lamarque, J.-F., & Rasch, P. J. (2007). Impact of anthropogenic atmospheric nitrogen and sulfur deposition on ocean acidification and the inorganic carbon system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(37), 14580–14585. https://doi.org/10.1073/pnas.0702218104

Dong, W. J., Song, J. P., Dong, C., & Choi, M. M. F. (2010). Fluorescence quenching method for the determination of catechol with gold nanoparticles and tyrosinase hybrid system. *Chinese Chemical Letters*, *21*(3), 346–348. https://doi.org/10.1016/j.cclet.2009.11.043

Downward, G., Nunen, E., Kerckhoffs, J., Vineis, P., Brunekreef, B., Boer, J., Messier, K., Roy, A., Verschuren, W., Schouw, Y., Sluijs, I., Gulliver, J., Hoek, G., & Vermeulen, R. (2018). Long-Term Exposure to Ultrafine Particles and Incidence of Cardiovascular and Cerebrovascular Disease in a Prospective Study of a Dutch Cohort. *Environmental Health Perspectives*, *126*, 127007. https://doi.org/10.1289/EHP3047

Dragojević, J., Marić, P., Lončar, J., Popović, M., Mihaljević, I., & Smital, T. (2020). Environmental contaminants modulate transport activity of zebrafish organic anion transporters Oat1 and Oat3. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *231*, 108742. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108742

Duan, W., Meng, F., Lin, Y., & Wang, G. (2017). Toxicological effects of phenol on four marine microalgae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *52*, 170–176. https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.04.006

El Agawany, N., Kaamoush, M., El-Zeiny, A., & Ahmed, M. (2021). Effect of heavy metals on protein content of marine unicellular green alga Dunaliella tertiolecta. *Environmental Monitoring and Assessment*, *193*(9), 584. https://doi.org/10.1007/s10661-021-09353-y

Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., & Dempsey, J. L. (2018). A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, *95*(2), 197–206. https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361

Emissions of the main air pollutants in Europe. (2024), raspoloživo na: https://www.eea.europa.eu/en/analysis/indicators/emissions-of-the-main-air [6.10.2024.]

Ertl, P., Rohde, B., & Selzer, P. (2000). Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, *43*(20), 3714–3717. https://doi.org/10.1021/jm000942e

Ertürk, M. D., & Saçan, M. T. (2012). First toxicity data of chlorophenols on marine alga Dunaliella tertiolecta: Correlation of marine algal toxicity with hydrophobicity and

interspecies toxicity relationships. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *31*(5), 1113–1120. https://doi.org/10.1002/etc.1782

Europe's air quality keeps improving but pollution levels are still unsafe in many areas. (2024.), raspoloživo na: https://www.eea.europa.eu/en/newsroom/news/europes-air-quality-keeps-improving [4.10.2024.]

Everaert, G., De Laender, F., Goethals, P. L. M., & Janssen, C. R. (2015). Relative contribution of persistent organic pollutants to marine phytoplankton biomass dynamics in the North Sea and the Kattegat. *Chemosphere*, *134*, 76–83. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.084

Faverney, C. R., Lafaurie, M., Girard, J., & Rahmani, R. (2000). Effects of heavy metals and 3-methylcholanthrene on expression and induction of CYP1A1 and metallothionein levels in trout (Oncorhynchus mykiss) hepatocyte cultures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *19*(9), 2239–2248. https://doi.org/10.1002/etc.5620190914

Fawaz, E. G., Salam, D. A., & Kamareddine, L. (2018). Evaluation of copper toxicity using site specific algae and water chemistry: Field validation of laboratory bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *155*, 59–65. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.054

Feng, Y., Ramanathan, V., & Kotamarthi, V. R. (2013). Brown carbon: A significant atmospheric absorber of solar radiation? *Atmospheric Chemistry and Physics*, *13*(17), 8607–8621. https://doi.org/10.5194/acp-13-8607-2013

Finewax, Z., de Gouw, J. A., & Ziemann, P. J. (2018). Identification and Quantification of 4-Nitrocatechol Formed from OH and NO3 Radical-Initiated Reactions of Catechol in Air in the Presence of NOx: Implications for Secondary Organic Aerosol Formation from Biomass Burning. *Environmental Science & Technology*, *52*(4), 1981–1989. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05864

Fischer, J., Vaňourková, L., Danhel, A., Vyskočil, V., Čížek, K., Barek, J., Peckova, K., Josypcuk, B., & Navrátil, T. (2007). Voltammetric Determination of Nitrophenols at a Silver Solid Amalgam Electrode. *International Journal of Electrochemical Science*, *2*, 226–234. https://doi.org/10.1016/S1452-3981(23)17068-4

Flanjak, L., Vrana, I., Cvitešić Kušan, A., Godrijan, J., Novak, T., Penezić, A., & Gašparović, B. (2022). Effects of high temperatures and nitrogen availability on the growth and composition of the marine diatom Chaetoceros pseudocurvisetus. *Journal of Experimental Botany*, *73*. https://doi.org/10.1093/jxb/erac145

Fouillac, C., & Criaud, A. (1984). Carbonate and bicarbonate trace metal complexes: Critical reevaluation of stability constants. *Geochemical Journal*, *18*(6), 297–303. https://doi.org/10.2343/geochemj.18.297

Fraher, D., Sanigorski, A., Mellett, N. A., Meikle, P. J., Sinclair, A. J., & Gibert, Y. (2016). Zebrafish Embryonic Lipidomic Analysis Reveals that the Yolk Cell Is Metabolically Active in Processing Lipid. *Cell Reports*, *14*(6), 1317–1329. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.016

Frew, N. M. (1997). The role of organic films in air–sea gas exchange. U P. S. Liss & R. A. Duce (Ur.), *The Sea Surface and Global Change* (str. 121–172). Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/CBO9780511525025.006

Frka, S., Dautović, J., Kozarac, Z., Ćosović, B., Hoffer, A., & Kiss, G. (2012). Surface-active substances in atmospheric aerosol: An electrochemical approach. *Tellus B: Chemical and Physical Meteorology*, *64*(1), 18490. https://doi.org/10.3402/tellusb.v64i0.18490

Frka, S., Kozarac, Z., & Ćosović, B. (2009). Characterization and seasonal variations of surface active substances in the natural sea surface micro-layers of the coastal Middle Adriatic stations. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *85*(4), 555–564. https://doi.org/10.1016/j.ecss.2009.09.023

Frka, S., Šala, M., Brodnik, H., Štefane, B., Kroflič, A., & Grgić, I. (2022). Seasonal variability of nitroaromatic compounds in ambient aerosols: Mass size distribution, possible sources and contribution to water-soluble brown carbon light absorption. *Chemosphere*, *299*, 134381. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134381

Frka, S., Šala, M., Kroflič, A., Huš, M., Čusak, A., & Grgić, I. (2016). Quantum Chemical Calculations Resolved Identification of Methylnitrocatechols in Atmospheric Aerosols. *Environmental Science & Technology*, *50*(11), 5526–5535. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00823

Fu, L., Li, J., Wang, Y., Wang, X., Wen, Y., Qin, W., Su, L., & Zhao, Y. (2015). Evaluation of toxicity data to green algae and relationship with hydrophobicity. *Chemosphere*, *120*, 16–22. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.05.040

García-Gómez, C., Parages, M. L., Jiménez, C., Palma, A., Mata, M. T., & Segovia, M. (2012). Cell survival after UV radiation stress in the unicellular chlorophyte Dunaliella tertiolecta is mediated by DNA repair and MAPK phosphorylation. *Journal of Experimental Botany*, *63*(14), 5259–5274. https://doi.org/10.1093/jxb/ers185

Gašparović, B., Kazazić, S., Cvitešić Kušan, A., Penezić, A., & Frka, S. (2017). Corrigendum to "Improved separation and analysis of glycolipids by Iatroscan thin-layer

chromatography–flame ionization detection" [J. Chromatogr. A 1409 (2015) 259–267]. *Journal of Chromatography A, 1521*. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.038

Gašparović, B., Kazazić, S. P., Cvitešić, A., Penezić, A., & Frka, S. (2015). Improved separation and analysis of glycolipids by Iatroscan thin-layer chromatography–flame ionization detection. *Journal of Chromatography A, 1409*, 259–267. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.047

Gašparović, B., Plavšić, M., Ćosović, B., & Saliot, A. (2007). Organic matter characterization in the sea surface microlayers in the subarctic Norwegian fjords region. *Marine Chemistry*, *105*, 1–14. https://doi.org/10.1016/j.marchem.2006.12.010

Gavazov, K. B. (2012). Nitroderivatives of catechol: From synthesis to application. *Acta Chimica Slovenica*, *59*(1), 1–17.

Genty, B., Briantais, J.-M., & Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *990*(1), 87–92. https://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9

Gharajeh, N.H., Valizadeh, M., Dorani, E., & Hejazi, M. A. (2020). Biochemical profiling of three indigenous *Dunaliella* isolates with main focus on fatty acid composition towards potential biotechnological application. *Biotechnology Reports*, *26*, e00479. https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00479

Godec, R. (2013). *Vremenska i prostorna razdioba ugljika u lebdećim česticama u zraku: Doktorski rad = Temporal and spatial distribution of carbon in airborne particulates : doctoral thesis*.

Griffin, D. W. (2007). Atmospheric Movement of Microorganisms in Clouds of Desert Dust and Implications for Human Health. *Clinical Microbiology Reviews*, *20*(3), 459–477. https://doi.org/10.1128/CMR.00039-06

Guillard, R. R. L. (1975). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. U W. L. Smith & M. H. Chanley (Ur.), *Culture of Marine Invertebrate Animals* (str. 29–60). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3

Guillard, R. R. L., & Ryther, J. H. (1962). STUDIES OF MARINE PLANKTONIC DIATOMS: I. CYCLOTELLA NANA HUSTEDT, AND DETONULA CONFERVACEA (CLEVE) GRAN. *Canadian Journal of Microbiology*, *8*(2), 229–239. https://doi.org/10.1139/m62-029

Hachicho, N., Reithel, S., Miltner, A., Heipieper, H. J., Küster, E., & Luckenbach, T. (2015). Body Mass Parameters, Lipid Profiles and Protein Contents of Zebrafish Embryos and Effects of 2,4-Dinitrophenol Exposure. *PLOS ONE*, *10*(8), e0134755. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134755

Haeseler, G., Piepenbrink, A., Bufler, J., Dengler, R., Aronson, J. K., Piepenbrock, S., & Leuwer, M. (2001). Structural requirements for voltage-dependent block of muscle sodium channels by phenol derivatives. *British Journal of Pharmacology*, *132*(8), 1916–1924. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704024

Hall, J., Healey, F. P., & Robinson, G. G. C. (1989). The interaction of chronic copper toxicity with nutrient limitation in chemostat cultures of Chlorella. *Aquatic toxicology*, *14*(1), 15–26. https://doi.org/10.1016/0166-445X(89)90052-0

Hallquist, M., Wenger, J. C., Baltensperger, U., Rudich, Y., Simpson, D., Claeys, M., Dommen, J., Donahue, N. M., George, C., Goldstein, A. H., Hamilton, J. F., Herrmann, H., Hoffmann, T., Iinuma, Y., Jang, M., Jenkin, M. E., Jimenez, J. L., Kiendler-Scharr, A., Maenhaut, W., … Wildt, J. (2009). The formation, properties and impact of secondary organic aerosol: Current and emerging issues. *Atmospheric Chemistry and Physics*, *9*(14), 5155–5236. https://doi.org/10.5194/acp-9-5155-2009

Harrison, M. A. J., Barra, S., Borghesi, D., Vione, D., Arsene, C., & Iulian Olariu, R. (2005). Nitrated phenols in the atmosphere: A review. *Atmospheric Environment*, *39*(2), 231–248. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2004.09.044

Heberer, Th., Schmidt-Bäumler, K., & Stan, H.-J. (1998). Occurrence and Distribution of Organic Contaminants in the Aquatic System in Berlin. Part I: Drug Residues and other Polar Contaminants in Berlin Surface and Groundwater. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, *26*(5), 272–278. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-401X(199809)26:5<272::AID-AHEH272>3.0.CO;2-O

Hodgson, E. (2010). Introduction to Biotransformation (Metabolism). U *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (str. 865–875). https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00036-7

Holdway, D. A., Dixon, D. G., & Kaiser, K. L. E. (1991). The acute toxicity of pulse-dosed, para-substituted phenols to larval American flagfish (Jordanella floridae): A comparison with toxicity to photoluminescent bacteria and predicted toxicity using log Kow. *Science of the total environment*, *104*(3), 229–237. https://doi.org/10.1016/0048-9697(91)90074-O

Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G.-J., White, S., … Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, *496*(7446), 498–503. https://doi.org/10.1038/nature12111

Hu, C., Yang, J., Qi, Z., Wu, H., Wang, B., Zou, F., Mei, H., Liu, J., Wang, W., & Liu, Q. (2022). Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm*, *3*(3), e161. https://doi.org/10.1002/mco2.161

Huang, Y., Wang, X. L., Zhang, J. W., & Wu, K. S. (2015). Impact of endocrine-disrupting chemicals on reproductive function in zebrafish (Danio rerio). *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, *50*(1), 1–6. https://doi.org/10.1111/rda.12468

Iinuma, Y., Böge, O., Gräfe, R., & Herrmann, H. (2010). Methyl-nitrocatechols: Atmospheric tracer compounds for biomass burning secondary organic aerosols. *Environmental Science & Technology*, *44*(22), 8453–8459. https://doi.org/10.1021/es102938a

Inokuchi, H., McLachlan, E. M., & Meckler, R. L. (1997). The effects of catechol on various membrane conductances in lumbar sympathetic postganglionic neurones of the guinea-pig. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *355*(5), 609–618. https://doi.org/10.1007/PL00004991

Ivošević DeNardis, N., Novosel Vlašić, N., Mišić Radić, T., Zemła, J., Lekka, M., Demir-Yilmaz, I., Formosa-Dague, C., Levak Zorinc, M., Vrana, I., Juraić, K., Horvat, L., Žutinić, P., Gligora Udovič, M., & Gašparović, B. (2024). Behavior and surface properties of microalgae indicate environmental changes. *Journal of Applied Phycology*, *36*(1), 113–128. https://doi.org/10.1007/s10811-023-03105-w

Jakovljević, I., Sever Štrukil, Z., Pehnec, G., Bešlić, I., Milinković, A., Bakija Alempijević, S., & Frka, S. (2020). Comparison of PAH Mass Concentrations in Aerosols of the Middle Adriatic Coast Area and Central Croatia. *Kemija u industriji*, *69*. https://doi.org/10.15255/KUI.2020.028

Jakovljević, I., Šimić, I., Mendaš, G., Sever Štrukil, Z., Žužul, S., Gluščić, V., Godec, R., Pehnec, G., Bešlić, I., Milinković, A., Bakija Alempijević, S., Šala, M., Ogrizek, M., & Frka, S. (2021). Pollution levels and deposition processes of airborne organic pollutants over the central Adriatic area: Temporal variabilities and source identification. *Marine Pollution Bulletin*, *172*, 112873. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112873

Jameson, R. F., & Wilson, M. F. (1972a). Thermodynamics of the interactions of catechol with transition metals. Part II. Copper and nickel complexes of catechol. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, *23*, 2614–2616. https://doi.org/10.1039/DT9720002614

Jameson, R. F., & Wilson, M. F. (1972b). Thermodynamics of the interactions of catechol with transition metals. Part III. The effect of 4-chloro- and 4-nitro-substitution on proton and metal catechol complex formation. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, *23*, 2617–2621. https://doi.org/10.1039/DT9720002617

Janssen, N. A., Gerlofs-Nijland, M. E., Lanki, T., Salonen, R. O., Cassee, F., Hoek, G., Fischer, P., Brunekreef, B., & Krzyzanowski, M. (2012). Health effects of black carbon. U *Health effects of black carbon*.

Jeyachandran, S., Chellapandian, H., Park, K., & Kwak, I.-S. (2023). A Review on the Involvement of Heat Shock Proteins (Extrinsic Chaperones) in Response to Stress Conditions in Aquatic Organisms. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *12*(7), 1444. https://doi.org/10.3390/antiox12071444

Jiang, Y., Laverty, K., Brown, J., Nunez, M., Brown, L., Chagoya, J., Burow, M., & Quigg, A. (2013). Effects of fluctuating temperature and silicate supply on the growth, biochemical composition and lipid accumulation of Nitzschia sp. *Bioresource technology*, *154C*, 336–344. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.068

Jiang, Y., Wang, X., Li, M., Liang, Y., Liu, Z., Chen, J., Guan, T., Mu, J., Zhu, Y., Meng, H., Zhou, Y., Yao, L., Xue, L., & Wang, W. (2024). Comprehensive understanding on sources of high levels of fine particulate nitro-aromatic compounds at a coastal rural area in northern China. *Journal of Environmental Sciences (China)*, *135*, 483–494. https://doi.org/10.1016/j.jes.2022.09.033

Jijie, R., Solcan, G., Nicoara, M., Micu, D., & Strungaru, S.-A. (2020). Antagonistic effects in zebrafish (Danio rerio) behavior and oxidative stress induced by toxic metals and deltamethrin acute exposure. *The Science of the Total Environment*, *698*, 134299. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134299

Jiménez, J. C., Dachs, J., & Eisenreich, S. J. (2015). Atmospheric deposition of POPs: Implications for the chemical pollution of aquatic environments. U *Comprehensive analytical chemistry* (Sv. 67, str. 295–322). Elsevier.

Jimenez, J. L., Canagaratna, M. R., Donahue, N. M., Prevot, A. S. H., Zhang, Q., Kroll, J. H., DeCarlo, P. F., Allan, J. D., Coe, H., Ng, N. L., Aiken, A. C., Docherty, K. S., Ulbrich, I. M., Grieshop, A. P., Robinson, A. L., Duplissy, J., Smith, J. D., Wilson, K.

R., Lanz, V. A., … Worsnop, D. R. (2009). Evolution of organic aerosols in the atmosphere. *Science (New York, N.Y.)*, *326*(5959), 1525–1529. https://doi.org/10.1126/science.1180353

Jordi, A., Basterretxea, G., Tovar-Sánchez, A., Alastuey, A., & Querol, X. (2012). Copper aerosols inhibit phytoplankton growth in the Mediterranean Sea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(52), 21246–21249. https://doi.org/10.1073/pnas.1207567110

Juda-Rezler, K., Reizer, M., Maciejewska, K., Błaszczak, B., & Klejnowski, K. (2020). Characterization of atmospheric PM2.5 sources at a Central European urban background site. *Science of The Total Environment*, *713*, 136729. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136729

Jurado, E., Jaward, F. M., Lohmann, R., Jones, K. C., Simó, R., & Dachs, J. (2004). Atmospheric Dry Deposition of Persistent Organic Pollutants to the Atlantic and Inferences for the Global Oceans. *Environmental Science & Technology*, *38*(21), 5505–5513. https://doi.org/10.1021/es049240v

Kaamoush, M. (2018). Metabolic Response of the Two Marine Unicellular Algae Chlorella salina and Dunaliella bardawil to Toxicity of the Antifouling Agent Irgarol 1051. *Journal of Environmental Protection*, *9*(9), Article 9. https://doi.org/10.4236/jep.2018.99056

Kanakidou, M., Seinfeld, J. H., Pandis, S. N., Barnes, I., Dentener, F. J., Facchini, M. C., Van Dingenen, R., Ervens, B., Nenes, A., Nielsen, C. J., Swietlicki, E., Putaud, J. P., Balkanski, Y., Fuzzi, S., Horth, J., Moortgat, G. K., Winterhalter, R., Myhre, C. E. L., Tsigaridis, K., … Wilson, J. (2005). Organic aerosol and global climate modelling: A review. *Atmospheric Chemistry and Physics*, *5*(4), 1053–1123. https://doi.org/10.5194/acp-5-1053-2005

Karavoltsos, S., Sakellari, A., Makarona, A., Plavšić, M., Ampatzoglou, D., Bakeas, E., Dassenakis, M., & Scoullos, M. (2013). Copper complexation in wet precipitation: Impact of different ligand sources. *Atmospheric Environment*, *80*, 13–19. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.07.068

Khatoon, H., Haris, N., Banerjee, S., Rahman, N. A., Begum, H., Mian, S., Abol-Munafi, A. B., & Endut, A. (2017). Effects of different salinities on the growth and proximate composition of *Dunaliella* sp. Isolated from South China Sea at different growth phases. *Process Safety and Environmental Protection*, *112*, 280–287. https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.04.010

Kim, K. T., Lee, Y. G., & Kim, S. D. (2006). Combined toxicity of copper and phenol derivatives to Daphnia magna: Effect of complexation reaction. *Environment International*, *32*(4), 487–492. https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.11.002

Kim, S.-Y., Peel, J. L., Hannigan, M. P., Dutton, S. J., Sheppard, L., Clark, M. L., & Vedal, S. (2012). The Temporal Lag Structure of Short-term Associations of Fine Particulate Matter Chemical Constituents and Cardiovascular and Respiratory Hospitalizations. *Environmental Health Perspectives*, *120*(8), 1094–1099. https://doi.org/10.1289/ehp.1104721

Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *203*(3), 253–310. https://doi.org/10.1002/aja.1002030302

Kitanovski, Z., Grgić, I., Vermeylen, R., Claeys, M., & Maenhaut, W. (2012). Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for characterization of monoaromatic nitro-compounds in atmospheric particulate matter. *Journal of Chromatography A*, *1268*, 35–43. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.10.021

Kitanovski, Z., Hovorka, J., Kuta, J., Leoni, C., Prokeš, R., Sáňka, O., Shahpoury, P., & Lammel, G. (2021). Nitrated monoaromatic hydrocarbons (nitrophenols, nitrocatechols, nitrosalicylic acids) in ambient air: Levels, mass size distributions and inhalation bioaccessibility. *Environmental Science and Pollution Research*, *28*(42), 59131–59140. https://doi.org/10.1007/s11356-020-09540-3

Kitanovski, Z., Shahpoury, P., Samara, C., Voliotis, A., & Lammel, G. (2020). Composition and mass size distribution of nitrated and oxygenated aromatic compounds in ambient particulate matter from southern and central Europe – implications for the origin. *Atmospheric Chemistry and Physics*, *20*(4), 2471–2487. https://doi.org/10.5194/acp-20-2471-2020

Knauer, K., Behra, R., & Sigg, L. (1997). ADSORPTION AND UPTAKE OF COPPER BY THE GREEN ALGA *SCENEDESMUS SUBSPICATUS* (CHLOROPHYTA)[1]. *Journal of Phycology*, *33*(4), 596–601. https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1997.00596.x

Komorsky-Lovrić, Š. (2000). Adsorption and Reduction of Berberine at a Mercury Electrode. *Electroanalysis*, *12*(8), 599–604. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4109(200005)12:8<599::AID-ELAN599>3.0.CO;2-U

Koolen, C. D., & Rothenberg, G. (2019). Air Pollution in Europe. *ChemSusChem*, *12*(1), 164–172. https://doi.org/10.1002/cssc.201802292

Kovacic, P., & Somanathan, R. (2014). Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, *34*(8), 810–824. https://doi.org/10.1002/jat.2980

Kulmala, M., Vehkamäki, H., Petäjä, T., Dal Maso, M., Lauri, A., Kerminen, V. M., Birmili, W., & McMurry, P. H. (2004). Formation and growth rates of ultrafine atmospheric particles: A review of observations. *Journal of Aerosol Science*, *35*(2), 143–176. https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2003.10.003

Le Roy, E., Walters, W. W., Joyce, E. E., & Hastings, M. G. (2021). Sources of ammonium in seasonal wet deposition at a coastal New England city. *Atmospheric Environment*, *260*, 118557. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2021.118557

Leal, M. F. C., Vasconcelos, M. T. S. D., & van den Berg, C. M. G. (1999). Copper-induced release of complexing ligands similar to thiols by Emiliania huxleyi in seawater cultures. *Limnology and Oceanography*, *44*(7), 1750–1762. https://doi.org/10.4319/lo.1999.44.7.1750

Leonard, S. S., Harris, G. K., & Shi, X. (2004). Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine*, *37*(12), 1921–1942. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.09.010

Leusch, F. (2013). *The role of toxicity testing in identifying toxic substances: A framework for identification of suspected toxic compounds in water*. Department of Health and Ageing.

Li, B., Ma, Y., Zhou, Y., & Chai, E. (2023). Research progress of different components of PM2.5 and ischemic stroke. *Scientific Reports*, *13*(1), 15965. https://doi.org/10.1038/s41598-023-43119-5

Li, J., Li, J., Wang, G., Zhang, T., Dai, W., Ho, K. F., Wang, Q., Shao, Y., Wu, C., & Li, L. (2020). Molecular characteristics of organic compositions in fresh and aged biomass burning aerosols. *The Science of the Total Environment*, *741*, 140247. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140247

Liao, W., Yang, S., & Ho, T. (2017). Trace metal composition of size-fractionated plankton in the Western Philippine Sea: The impact of anthropogenic aerosol deposition. *Limnology and Oceanography*, *62*(5), 2243–2259. https://doi.org/10.1002/lno.10564

Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. *Nature Reviews. Genetics*, *8*(5), 353–367. https://doi.org/10.1038/nrg2091

Ling, N., Li, H.-X., Guo, H.-S., Cao, X.-M., & Liu, X.-R. (2019). Physiological and biochemical responses of Dunaliella salina exposed to acrylamide. *Biologia*, *74*, 1045–1053. https://doi.org/10.2478/s11756-019-00260-9

Linton, T. K., Mayer, F. L., Simon, T. L., Malone, J. A., & Marking, L. L. (1994). Salinity and temperature effects on chronic toxicity of 2, 4-dinitrophenol and 4-nitrophenol to sheepshead minnows (Cyprinodon variegatus). *Environmental toxicology and chemistry*, *13*(1), 85–92. https://doi.org/10.1002/etc.5620130112

Liu, Y., Li, S., Sun, C., Qi, M., Yu, X., Zhao, W., & Li, X. (2018). Pollution Level and Health Risk Assessment of PM2.5-Bound Metals in Baoding City Before and After the Heating Period. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *15*(10), Article 10. https://doi.org/10.3390/ijerph15102286

Lončar, J., & Smital, T. (2018). Interaction of environmental contaminants with zebrafish (*Danio rerio*) multidrug and toxin extrusion protein 7 (Mate7/Slc47a7). *Aquatic Toxicology*, *205*, 193–203. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.10.016

Loos, R., Locoro, G., Comero, S., Contini, S., Schwesig, D., Werres, F., Balsaa, P., Gans, O., Weiss, S., Blaha, L., Bolchi, M., & Gawlik, B. M. (2010). Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Research*, *44*(14), 4115–4126. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.05.032

López, A., Rico, M., Santana-Casiano, J. M., González, A. G., & González-Dávila, M. (2015). Phenolic profile of Dunaliella tertiolecta growing under high levels of copper and iron. *Environmental Science and Pollution Research International*, *22*(19), 14820–14828. https://doi.org/10.1007/s11356-015-4717-y

Lorenzen, A., & Kennedy, S. W. (1993). A fluorescence-based protein assay for use with a microplate reader. *Analytical Biochemistry*, *214*(1), 346–348. https://doi.org/10.1006/abio.1993.1504

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). *Protein measurement with the Folin phenol reagent.*

Lu, C., Wang, X., Zhang, J., Liu, Z., Liang, Y., Dong, S., Li, M., Chen, J., Chen, H., Xie, H., Xue, L., & Wang, W. (2021). Substantial emissions of nitrated aromatic compounds in the particle and gas phases in the waste gases from eight industries. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, *283*, 117132. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117132

Lyubenova, M., & Boteva, S. (2016). *Biotests in Ecotoxicology: Current Practice and Problems*. https://doi.org/10.5772/64776

Ma, M., Zhu, W., Wang, Z., & Witkamp, G. J. (2003). Accumulation, assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (Scenedesmus subspicatus 86.81 SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, *63*(3), 221–228. https://doi.org/10.1016/s0166-445x(02)00179-0

Machado, M., & Soares, E. (2019). Sensitivity of freshwater and marine green algae to three compounds of emerging concern. *Journal of Applied Phycology*, *31*. https://doi.org/10.1007/s10811-018-1511-5

Magnusson, M., Heimann, K., & Negri, A. P. (2008). Comparative effects of herbicides on photosynthesis and growth of tropical estuarine microalgae. *Marine Pollution Bulletin*, *56*(9), 1545–1552. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.05.023

Mahowald, N. M., Hamilton, D. S., Mackey, K. R., Moore, J. K., Baker, A. R., Scanza, R. A., & Zhang, Y. (2018). Aerosol trace metal leaching and impacts on marine microorganisms. *Nature communications*, *9*(1), 2614. https://doi.org/10.1038/s41467-018-04970-7

Marić, D., Frka, S., Godrijan, J., Tomažić, I., Penezić, A., Djakovac, T., Vojvodić, V., Precali, R., & Gašparović, B. (2013). Organic matter production during late summer–winter period in a temperate sea. *Continental shelf research*, *55*, 52–65. https://doi.org/10.1016/j.csr.2013.01.008

Marit, J. S., & Weber, L. P. (2011). Acute exposure to 2,4-dinitrophenol alters zebrafish swimming performance and whole body triglyceride levels. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, *154*(1), 14–18. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.03.001

Martínez-Ruiz, E. B., & Martínez-Jerónimo, F. (2015). Nickel has biochemical, physiological, and structural effects on the green microalga Ankistrodesmus falcatus: An integrative study. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, *169*, 27–36. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.10.007

Mihaljević, I., Popović, M., Žaja, R., Maraković, N., Šinko, G., & Smital, T. (2017). Interaction between the zebrafish (Danio rerio) organic cation transporter 1 (Oct1) and endo- and xenobiotics. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, *187*, 18–28. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.03.012

Milinković, A., Penezić, A., Kušan, A. C., Gluščić, V., Žužul, S., Skejić, S., Šantić, D., Godec, R., Pehnec, G., Omanović, D., Engel, A., & Frka, S. (2022). Variabilities of biochemical properties of the sea surface microlayer: Insights to the atmospheric

deposition impacts. *Science of The Total Environment*, *838*, 156440. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156440

Millero, F., Woosley, R., DiTrolio, B., & Waters, J. (2009). Effect of Ocean Acidification on the Speciation of Metals in Seawater. *Oceanography*, *22*(4), 72–85. https://doi.org/10.5670/oceanog.2009.98

Minhas, A. K., Gaur, S., & Adholeya, A. (2023). Influence of light intensity and photoperiod on the pigment and, lipid production of *Dunaliella tertiolecta* and *Nannochloropsis oculata* under three different culture medium. *Heliyon*, *9*(2), e12801. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e12801

Mirčeski, V., Komorsky-Lovrić, S., & Lovrić, M. (2007). *Square-Wave Voltammetry: Theory and Application*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-73740-7

Mirčeski, V., & Lovrić, M. (1999). Square-wave voltammetry of a cathodic stripping reaction complicated by adsorption of the reacting ligand. *Analytica Chimica Acta*, *386*(1), 47–62. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00019-7

Miyares, R. L., de Rezende, V. B., & Farber, S. A. (2014). Zebrafish yolk lipid processing: A tractable tool for the study of vertebrate lipid transport and metabolism. *Disease Models & Mechanisms*, *7*(7), 915–927. https://doi.org/10.1242/dmm.015800

Moffett, J. W., & Brand, L. E. (1996). Production of strong, extracellular Cu chelators by marine cyanobacteria in response to Cu stress. *Limnology and Oceanography*, *41*(3), 388–395. https://doi.org/10.4319/lo.1996.41.3.0388

Mohr, C., Lopez-Hilfiker, F. D., Zotter, P., Prévôt, A. S. H., Xu, L., Ng, N. L., Herndon, S. C., Williams, L. R., Franklin, J. P., Zahniser, M. S., Worsnop, D. R., Knighton, W. B., Aiken, A. C., Gorkowski, K. J., Dubey, M. K., Allan, J. D., & Thornton, J. A. (2013). Contribution of nitrated phenols to wood burning brown carbon light absorption in Detling, United Kingdom during winter time. *Environmental Science & Technology*, *47*(12), 6316–6324. https://doi.org/10.1021/es400683v

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, *65*(1–2), 55–63. https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4

Murphy, L., Kinsey, S., & Durako, M. (2003). Physiological effects of short-term salinity changes on Ruppia maritima. *Aquatic Botany*, *75*, 293–309. https://doi.org/10.1016/S0304-3770(02)00206-1

Myklestad, S. M. (1995). Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *Science of The Total Environment*, *165*(1), 155–164. https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)04549-G

Nałęcz-Jawecki, G., & Sawicki, J. (2003). Influence of pH on the toxicity of nitrophenols to Microtox® and Spirotox tests. *Chemosphere*, *52*(1), 249–252. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00865-2

Nikookar, K., Moradshahi, A., & Hosseini, L. (2005). Physiological responses of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* to copper toxicity. *Biomolecular Engineering*, *22*(4), 141–146. https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2005.07.001

Nimmo, M., Fones, G. R., & Chester, R. (1998). Atmospheric Deposition: A Potential Source of Trace Metal Organic Complexing Ligands to the Marine Environment. *Croatica Chemica Acta*, *71*(2), 323–341.

Novosel, N., Mišić Radić, T., Levak Zorinc, M., Zemla, J., Lekka, M., Vrana, I., Gašparović, B., Horvat, L., Kasum, D., Legović, T., Žutinić, P., Gligora Udovič, M., & Ivošević DeNardis, N. (2022). Salinity-induced chemical, mechanical, and behavioral changes in marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, *34*(3), 1293–1309. https://doi.org/10.1007/s10811-022-02734-x

Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Kreyling, W., & Cox, C. (2004). Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhalation Toxicology*, *16*(6–7), 437–445. https://doi.org/10.1080/08958370490439597

Okochi, H., & Brimblecombe, P. (2002). Potential Trace Metal–Organic Complexation in the Atmosphere. *The Scientific World Journal*, *2*(1), 356173. https://doi.org/10.1100/tsw.2002.132

Oren, A. (2014). The ecology of Dunaliella in high-salt environments. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, *21*. https://doi.org/10.1186/s40709-014-0023-y

Pacyna, J. M., & Pacyna, E. G. (2001). An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide. *Environmental Reviews*, *9*(4), 269–298. https://doi.org/10.1139/a01-012

Pađan, J., Marcinek, S., Cindrić, A.-M., Santinelli, C., Retelletti Brogi, S., Radakovitch, O., Garnier, C., & Omanović, D. (2021). Organic Copper Speciation by Anodic Stripping Voltammetry in Estuarine Waters With High Dissolved Organic Matter. *Frontiers in Chemistry*, *8*. https://doi.org/10.3389/fchem.2020.628749

Pamanji, R., Bethu, M. S., Yashwanth, B., Leelavathi, S., & Venkateswara Rao, J. (2015). Developmental toxic effects of monocrotophos, an organophosphorous pesticide, on

zebrafish (Danio rerio) embryos. *Environmental Science and Pollution Research International*, *22*(10), 7744–7753. https://doi.org/10.1007/s11356-015-4120-8

Parkinson, A., Ogilvie, B., Buckley, D., Kazmi, F., Czerwinski, M., & Parkinson, O. (2013). *Biotransformation of Xenobiotics* (str. 185–367).

Parsy, A., Guyoneaud, R., Baldoni-Andrey, P., Perie, F., & Sambusiti, C. (2022). Impact of salinities, metals and organic compounds found in saline oil & gas produced water on microalgae and cyanobacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *234*, 113351. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113351

Paulson, A. J., & Kester, D. R. (1980). Copper(II) ion hydrolysis in aqueous solution. *Journal of Solution Chemistry*, *9*(4), 269–277. https://doi.org/10.1007/BF00644552

Paytan, A., Mackey, K. R. M., Chen, Y., Lima, I. D., Doney, S. C., Mahowald, N., Labiosa, R., & Post, A. F. (2009). Toxicity of atmospheric aerosols on marine phytoplankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(12), 4601–4605. https://doi.org/10.1073/pnas.0811486106

Pénard-Morand, C., & Annesi-Maesano, I. (2004). Air pollution: From sources of emissions to health effects. *Breathe*, *1*(2), 108–119. https://doi.org/10.1183/18106838.0102.108

Penezić, A., Milinković, A., Bakija Alempijević, S., Žužul, S., & Frka, S. (2021). Atmospheric deposition of biologically relevant trace metals in the eastern Adriatic coastal area. *Chemosphere*, *283*, 131178. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131178

Pflieger, M., & Kroflič, A. (2017). Acute toxicity of emerging atmospheric pollutants from wood lignin due to biomass burning. *Journal of Hazardous Materials*, *338*, 132–139. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.05.023

Pick, U. (1998). Dunaliella—A Model Extremophilic Alga. *Israel Journal of Plant Sciences*, *46*(2), 131–139. https://doi.org/10.1080/07929978.1998.10676720

Pintér, M., Utry, N., Ajtai, T., Kiss-Albert, G., Jancsek-Turóczi, B., Imre, K., Palágyi, A., Manczinger, L., Vágvölgyi, C., Horváth, E., Kováts, N., Gelencsér, A., Szabó, G., & Bozóki, Z. (2017). Optical Properties, Chemical Composition and the Toxicological Potential of Urban Particulate Matter. *Aerosol and Air Quality Research*, *17*(6), 1515–1526. https://doi.org/10.4209/aaqr.2016.09.0395

Plavšić, M., Orlović-Leko, P., Kozarac, Z., Bura-Nakić, E., Strmečki, S., & Ćosović, B. (2008). Complexation of copper ions in atmospheric precipitation in Croatia. *Atmospheric Research*, *87*(1), 80–87. https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2007.09.001

Plavšić, M., & Strmečki, S. (2016). Carbohydrate polymers as constituents of exopolymer substances in seawater, their complexing properties towards copper ions, surface and catalytic activity determined by electrochemical methods. *Carbohydrate Polymers*, *135*, 48–56. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.071

Pontoni, L., La Vecchia, C., Boguta, P., Sirakov, M., D'Aniello, E., Fabbricino, M., & Locascio, A. (2021). Natural organic matter controls metal speciation and toxicity for marine organisms: A review. *Environmental Chemistry Letters*, *20*. https://doi.org/10.1007/s10311-021-01310-y

Popescu, F., & Ionel, I. (2010). *Anthropogenic Air Pollution Sources*. https://doi.org/10.5772/9751

Popoola, L. T., Adebanjo, S. A., & Adeoye, B. K. (2018). Assessment of atmospheric particulate matter and heavy metals: A critical review. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *15*(5), 935–948. https://doi.org/10.1007/s13762-017-1454-4

Popović, M., Žaja, R., Fent, K., & Smital, T. (2013). Molecular Characterization of Zebrafish Oatp1d1 (Slco1d1), a Novel Organic Anion-transporting Polypeptide. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(47), 33894–33911. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.518506

Popović, M., Žaja, R., Fent, K., & Smital, T. (2014). Interaction of environmental contaminants with zebrafish organic anion transporting polypeptide, Oatp1d1 (Slco1d1). *Toxicology and Applied Pharmacology*, *280*(1), 149–158. https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.07.015

Pöschl, U. (2005). Atmospheric Aerosols: Composition, Transformation, Climate and Health Effects. *Angewandte Chemie International Edition*, *44*(46), 7520–7540. https://doi.org/10.1002/anie.200501122

Price, C. A. (1965). A membrane method for determination of total protein in dilute algal suspensions. *Analytical biochemistry*, *12*(2), 213–218. https://doi.org/10.1016/0003-2697(65)90084-9

Purohit, V., & Basu, A. K. (2000). Mutagenicity of nitroaromatic compounds. *Chemical Research in Toxicology*, *13*(8), 673–692. https://doi.org/10.1021/tx000002x

Rabha, S., & Saikia, B. K. (2020). 18—Advanced micro- and nanoscale characterization techniques for carbonaceous aerosols. U C. Mustansar Hussain (Ur.), *Handbook of Nanomaterials in Analytical Chemistry* (str. 449–472). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816699-4.00018-9

Raes, F., Dingenen, R. V., Vignati, E., Wilson, J., Putaud, J.-P., Seinfeld, J. H., & Adams, P. (2000). Formation and cycling of aerosols in the global troposphere. *Atmospheric Environment*, *34*(25), 4215–4240. https://doi.org/10.1016/S1352-2310(00)00239-9

Rainbow, P. S. (2007). Trace metal bioaccumulation: Models, metabolic availability and toxicity. *Environment International*, *33*(4), 576–582. https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.05.007

Ramos, R. L., Moreira, V. R., Lebron, Y. A. R., Santos, A. V., Santos, L. V. S., & Amaral, M. C. S. (2021). Phenolic compounds seasonal occurrence and risk assessment in surface and treated waters in Minas Gerais-Brazil. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, *268*(Pt A), 115782. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115782

Rand, G. M., & Petrocelli, S. R. (1985). *Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications*. FMC Corp., Princeton, NJ.

Ren, Y., Wei, J., Wang, G., Wu, Z., Ji, Y., & Li, H. (2022). Evolution of aerosol chemistry in Beijing under strong influence of anthropogenic pollutants: Composition, sources, and secondary formation of fine particulate nitrated aromatic compounds. *Environmental Research*, *204*(Pt A), 111982. https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111982

Richon, C., & Tagliabue, A. (2019). Insights Into the Major Processes Driving the Global Distribution of Copper in the Ocean From a Global Model. *Global Biogeochemical Cycles*, *33*(12), 1594–1610. https://doi.org/10.1029/2019GB006280

Robinson, R. A. (1967). Dissociation constants of some substituted nitrophenols in aqueous solution at 25 C. *Journal of Research of the National Bureau of Standards Section A: Physics and Chemistry*, *71A*(5), 385. https://doi.org/10.6028/jres.071A.044

Robinson, R. A., & Biggs, A. I. (1955). The thermodynamic ionization constant of p-nitrophenol from spectrophotometric measurements. *Transactions of the Faraday Society*, *51*(0), 901–903. https://doi.org/10.1039/TF9555100901

Rogers, H. R. (1993). Speciation and partitioning of priority organic contaminants in estuarine waters. U Th. F. Tadros & J. Gregory (Ur.), *Colloids in the Aquatic Environment* (str. 229–235). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-1-85861-038-2.50019-X

Roper, C., Delgado, L. S., Barrett, D., Massey Simonich, S. L., & Tanguay, R. L. (2019). PM2.5 Filter Extraction Methods: Implications for Chemical and Toxicological Analyses. *Environmental Science & Technology*, *53*(1), 434–442. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04308

Ruacho, A., Richon, C., Whitby, H., & Bundy, R. M. (2022). Sources, sinks, and cycling of dissolved organic copper binding ligands in the ocean. *Communications Earth & Environment*, *3*(1), 1–19. https://doi.org/10.1038/s43247-022-00597-1

Rukminasari, N. (2013). Effect of Temperature and Nutrient Limitation on the Growth and Lipid Content of Three Selected Microalgae (*Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis* sp. And *Scenedesmus* sp.) for Biodiesel Production. *International Journal of Marine Science*. https://doi.org/10.5376/ijms.2013.03.0017

Sajadinasab, J., Manaffar, R., Askarizadeh, M., Hosseini, S., Dehghani, I., & Pourakbar, L. (2024). *Enzymatic and non-enzymatic antioxidants in Dunaliella microalgae can diminish toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in favor of valuable metabolites production*. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-5426946/v1

Sakunkoo, P., Thonglua, T., Sangkham, S., Jirapornkul, C., Limmongkon, Y., Daduang, S., Tessiri, T., Rayubkul, J., Thongtip, S., Maneenin, N., & Pimonsree, S. (2022). Human health risk assessment of PM2.5-bound heavy metal of anthropogenic sources in the Khon Kaen Province of Northeast Thailand. *Heliyon*, *8*(6), e09572. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09572

Salomons, W., & Forstner, U. (1984). Metals in the hydrocycle–Springer-Verlag. *Berlin. Heidelberg New York*, *349*.

Salvador, C. M. G., Tang, R., Priestley, M., Li, L., Tsiligiannis, E., Le Breton, M., Zhu, W., Zeng, L., Wang, H., Yu, Y., Hu, M., Guo, S., & Hallquist, M. (2021). Ambient nitro-aromatic compounds – biomass burning versus secondary formation in rural China. *Atmospheric Chemistry and Physics*, *21*(3), 1389–1406. https://doi.org/10.5194/acp-21-1389-2021

Scholz, F. (2002). *Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications*. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04757-6

Schreiber, U. (2004). Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and Saturation Pulse Method: An Overview. U G. C. Papageorgiou & Govindjee (Ur.), *Chlorophyll a Fluorescence* (Sv. 19, str. 279–319). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_11

Schulze, F., Gao, X., Virzonis, D., Damiati, S., Schneider, M. R., & Kodzius, R. (2017). Air Quality Effects on Human Health and Approaches for Its Assessment through Microfluidic Chips. *Genes*, *8*(10), 244. https://doi.org/10.3390/genes8100244

Seager, R., Osborn, T. J., Kushnir, Y., Simpson, I. R., Nakamura, J., & Liu, H. (2019). Climate Variability and Change of Mediterranean-Type Climates. *Journal of Climate*, *32*(10), 2887–2915. https://doi.org/10.1175/JCLI-D-18-0472.1

Seigneur, C. (2019). *Air Pollution: Concepts, Theory, and Applications*. Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/9781108674614

Sever, M. J., & Wilker, J. J. (2004). Visible absorption spectra of metal–catecholate and metal–tironate complexes. *Dalton Transactions*, *7*, 1061–1072. https://doi.org/10.1039/B315811J

Shin, N., Oh, J. H., & Lee, Y. J. (2015). Role of drug transporters: An overview based on knockout animal model studies. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, *45*(2), 101–114. https://doi.org/10.1007/s40005-015-0178-z

Shrivastava, M., Easter, R. C., Liu, X., Zelenyuk, A., Singh, B., Zhang, K., Ma, P.-L., Chand, D., Ghan, S., Jimenez, J. L., Zhang, Q., Fast, J., Rasch, P. J., & Tiitta, P. (2015). Global transformation and fate of SOA: Implications of low-volatility SOA and gas-phase fragmentation reactions. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, *120*(9), 4169–4195. https://doi.org/10.1002/2014JD022563

Singh, C., & Ansari, B. (2017). *Toxicity of two heavy metals Lead and Cobalt on Zebrafish , Danio rerio*.

Slocombe, S. P., Ross, M., Thomas, N., McNeill, S., & Stanley, M. S. (2013). A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. *Bioresource technology*, *129*, 51–57. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.163

Smith, M. L., & Immig, J. (2018). Ocean Pollutants Guide: Toxic Threats to Human Health and Marine Life. *Retrieved from IPEN and the National Toxics Network (NTN), Government of Germany, Government of Switzerland*.

Smith, R., Gosselin, M., Kattner, G., Legendre, L., & Pesant, S. (2007). Biosynthesis of macromolecular and lipid classes by phytoplankton in the Northeast Water Polynya. *Marine Ecology Progress Series*, *147*, 231–242. https://doi.org/10.3354/meps147231

Smith, R. M., & Martell, A. E. (1976). *Critical Stability Constants*. Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-5506-0

Snyder, L. R. (1974). Classification of the solvent properties of common liquids. *Journal of Chromatography A*, *92*(2), 223–230. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)85732-5

Sonwani, S., & Saxena, P. (2016). Identifying the Sources of Primary Air Pollutants and Environmental Health: A Review. *International Journal of Engineering and Technical Research (IJETR)*, *6*, 111–130.

Spokes, L. J., Lucia, M., Campos, A. M., & Jickells, T. D. (1996). The role of organic matter in controlling copper speciation in precipitation. *Atmospheric Environment*, *30*(23), 3959–3966. https://doi.org/10.1016/1352-2310(96)00125-2

Sposito, J. C. V., Montagner, C. C., Casado, M., Navarro-Martín, L., Jut Solórzano, J. C., Piña, B., & Grisolia, A. B. (2018). Emerging contaminants in Brazilian rivers: Occurrence and effects on gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Chemosphere*, *209*, 696–704. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.046

Strmečki, S., Dautović, J., & Plavšić, M. (2014). Constant current chronopotentiometric stripping characterisation of organic matter in seawater from the northern Adriatic, Croatia. *Environmental chemistry*, *11*(2), 158–166. https://doi.org/10.1071/EN13122

Strmečki, S., Dešpoja, I., Penezić, A., Milinković, A., Alempijević, S. B., Kiss, G., Hoffer, A., Mitić, B., Hruševar, D., & Frka, S. (2024). How do certain atmospheric aerosols affect Cu-binding organic ligands in the oligotrophic coastal sea surface microlayer? *Environmental Science: Processes & Impacts*, *26*(1), 119–135. https://doi.org/10.1039/D3EM00415E

Strmečki, S., & Paleček, E. (2018). Adsorption/desorption of biomacromolecules involved in catalytic hydrogen evolution. *Bioelectrochemistry*, *120*, 87–93. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.11.013

Strmečki, S., & Pereža, L. (2021). Electrochemistry of chitosan amino-glycan and BSA protein mixture under seawater conditions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *898*, 115630. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115630

Strmečki, S., Plavšić, M., & Ćosović, B. (2010). Constant Current Chronopotentiometric Stripping Analysis of 'N-Catalyst' in Sodium Chloride Solution and Seawater. *Electroanalysis*, *22*, 91–98. https://doi.org/10.1002/elan.200900233

Stumm, W., & Morgan, J. J. (1981). *Aquatic Chemistry: An Introduction Emphasizing Chemical Equilibria in Natural Waters*. Wiley.

Su, L., Zhang, X., Yuan, X., Zhao, Y., Zhang, D., & Qin, W. (2012). Evaluation of joint toxicity of nitroaromatic compounds and copper to Photobacterium phosphoreum and QSAR analysis. *Journal of Hazardous Materials*, *241–242*, 450–455. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.09.065

Sullivan, A. P., & Weber, R. J. (2006). Chemical characterization of the ambient organic aerosol soluble in water: 2. Isolation of acid, neutral, and basic fractions by modified size-exclusion chromatography. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, *111*(D5). https://doi.org/10.1029/2005JD006486

Sunda, W. G. (2012). Feedback Interactions between Trace Metal Nutrients and Phytoplankton in the Ocean. *Frontiers in Microbiology*, *3*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00204

Swackhamer, D., Paerl, H. W., Eisenreich, S., Hurley, J., Hornbuckle, K., McLachlan, M., Mount, D., Muir, D., & Schindler, D. (2004). Impacts of atmospheric pollutants on aquatic ecosystems. *Issues in Ecology*, *12*, 2–23.

Takamura-Enya, T., & Tokutake, M. (2016). Novel speciation analysis of copper in river water: Observation of soluble anionic copper–ligand complexes. *Limnology*, *17*(2), 117–125. https://doi.org/10.1007/s10201-015-0468-1

Tao, Y., Li, W., Xue, B., Zhong, J., Yao, S., & Wu, Q. (2013). Different effects of copper (II), cadmium (II) and phosphate on the sorption of phenanthrene on the biomass of cyanobacteria. *Journal of Hazardous Materials*, *261*, 21–28. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.06.062

Tao, Y., Xue, B., Zhong, J., Yao, S., & Wu, Q. (2012). Influences of pH, heavy metals and phosphate and their co-influences on the sorption of pentachlorophenol on cyanobacterial biomass. *Water Research*, *46*(11), 3585–3594. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.04.003

Teich, M., van Pinxteren, D., Wang, M., Kecorius, S., Wang, Z., Müller, T., Močnik, G., & Herrmann, H. (2017). Contributions of nitrated aromatic compounds to the light absorption of water-soluble and particulate brown carbon in different atmospheric environments in Germany and China. *Atmospheric Chemistry and Physics*, *17*(3), 1653–1672. https://doi.org/10.5194/acp-17-1653-2017

Thomas, J. R., Frye, W. J. E., Robey, R. W., & Gottesman, M. M. (2024). Progress in characterizing ABC multidrug transporters in zebrafish. *Drug Resistance Updates*, *72*, 101035. https://doi.org/10.1016/j.drup.2023.101035

Tian, H. Z., Zhu, C. Y., Gao, J. J., Cheng, K., Hao, J. M., Wang, K., Hua, S. B., Wang, Y., & Zhou, J. R. (2015). Quantitative assessment of atmospheric emissions of toxic heavy metals from anthropogenic sources in China: Historical trend, spatial distribution, uncertainties, and control policies. *Atmospheric Chemistry and Physics*, *15*(17), 10127–10147. https://doi.org/10.5194/acp-15-10127-2015

Torres, M. A., Barros, M. P., Campos, S. C. G., Pinto, E., Rajamani, S., Sayre, R. T., & Colepicolo, P. (2008). Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *71*(1), 1–15. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.05.009

Truhaut, R. (1977). Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *1*(2), 151–173. https://doi.org/10.1016/0147-6513(77)90033-1

Turpeinen, R. (2002). *Interactions between metals, microbes and plants-Bioremediation of arsenic and lead contaminated soils* [PhD Thesis, Helsingin yliopisto].

Tyson, C. A., & Martell, A. E. (1968). Equilibriums of metal ions with pyrocatechol and 3,5-di-tert-butylpyrocatechol. *Journal of the American Chemical Society*, *90*(13), 3379–3386. https://doi.org/10.1021/ja01015a015

Vanni, A., Pellegrino, V., Gamberini, R., & Calabria, A. (2001). An Evidence for Nitrophenols Contamination in Antarctic Fresh-Water and Snow. Simultaneous Determination of Nitrophenols and Nitroarenes at ng/L Levels. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, *79*(4), 349–365. https://doi.org/10.1080/03067310108044394

Versonnen, B. J., Roose, P., Monteyne, E. M., & Janssen, C. R. (2004). Estrogenic and toxic effects of methoxychlor on zebrafish (Danio rerio). *Environmental Toxicology and Chemistry*, *23*(9), 2194–2201. https://doi.org/10.1897/03-228

Vidović, K., Kroflič, A., Jovanovič, P., Šala, M., & Grgić, I. (2019). Electrochemistry as a Tool for Studies of Complex Reaction Mechanisms: The Case of the Atmospheric Aqueous-Phase Aging of Catechols. *Environmental Science & Technology*, *53*(19), 11195–11203. https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02456

Vojvodić, V., & Ćosović, B. (1996). Fractionation of surface active substances on the XAD-8 resin: Adriatic Sea samples and phytoplankton culture media. *Marine Chemistry*, *54*(1), 119–133. https://doi.org/10.1016/0304-4203(96)00026-6

Vrana, I., Bakija Alempijević, S., Novosel, N., Ivošević DeNardis, N., Žigon, D., Ogrinc, N., & Gašparović, B. (2022). Hyposalinity induces significant polar lipid remodeling in the marine microalga Dunaliella tertiolecta (Chlorophyceae). *Journal of Applied Phycology*, *34*(3), 1457–1470. https://doi.org/10.1007/s10811-022-02745-8

Vujica, L., Lončar, J., Mišić, L., Lučić, B., Radman, K., Mihaljević, I., Bertoša, B., Mesarić, J., Horvat, M., & Smital, T. (2023). Environmental contaminants modulate transport activity of zebrafish (*Danio rerio*) multidrug and toxin extrusion protein 3 (Mate3/Slc47a2.1). *Science of The Total Environment*, *901*, 165956. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165956

Vujica, L., Mihaljević, I., Dragojević, J., Lončar, J., Karaica, D., Dananić, A., Bošnjak, A., & Smital, T. (2024). Functional knockout of the Oatp1d1 membrane transporter affects

toxicity of diclofenac in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, *273*, 107031. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2024.107031

Vukosav, P., Frkanec, L., & Mlakar, M. (2012). Voltammetric investigation of iron(III) complexes with siderophore chrysobactin in aqueous solution. *Electrochimica Acta*, *59*, 479–484. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.11.031

Vyskočil, V., & Barek, J. (2011). Electroanalysis of Nitro and Amino Derivatives of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Current Organic Chemistry*, *15*, 3059–3076. https://doi.org/10.2174/138527211798357209

Wang, L., Wang, X., Gu, R., Wang, H., Yao, L., Wen, L., Zhu, F., Wang, W., Xue, L., Yang, L., Lu, K., Chen, J., Wang, T., Zhang, Y., & Wang, W. (2018). Observations of fine particulate nitrated phenols in four sites in northern China: Concentrations, source apportionment, and secondary formation. *Atmospheric Chemistry and Physics*, *18*(6), 4349–4359. https://doi.org/10.5194/acp-18-4349-2018

Wang, Y., Hu, M., Wang, Y., Zheng, J., Shang, D., Yang, Y., Liu, Y., Li, X., Tang, R., Zhu, W., Du, Z., Wu, Y., Guo, S., Wu, Z., Lou, S., Hallquist, M., & Yu, J. Z. (2019). The formation of nitro-aromatic compounds under high NO_x and anthropogenic VOC conditions in urban Beijing, China. *Atmospheric Chemistry and Physics*, *19*(11), 7649–7665. https://doi.org/10.5194/acp-19-7649-2019

Wennrich, L., Efer, J., & Engewald, W. (1995). Gas chromatographic trace analysis of underivatized nitrophenols. *Chromatographia*, *41*(5), 361–366. https://doi.org/10.1007/BF02688052

Whitby, H., Posacka, A. M., Maldonado, M. T., & van den Berg, C. M. G. (2018). Copper-binding ligands in the NE Pacific. *Marine Chemistry*, *204*, 36–48. https://doi.org/10.1016/j.marchem.2018.05.008

Witt, M., & Jickells, T. (2005). Copper complexation in marine and terrestrial rain water. *Atmospheric Environment*, *39*(40), 7657–7666. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2005.01.035

Witt, M., Skrabal, S., Kieber, R., & Willey, J. (2007). Copper complexation in coastal rainwater, southeastern USA. *Atmospheric Environment*, *41*(17), 3619–3630. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2006.12.038

Yang, S., Duan, F., Ma, Y., He, K., Zhu, L., Ma, T., Ye, S., Li, H., Huang, T., & Kimoto, T. (2019). Haze formation indicator based on observation of critical carbonaceous species in the atmosphere. *Environmental Pollution*, *244*, 84–92. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.006

Yang, T., Chen, Y., Zhou, S., & Li, H. (2019). Impacts of Aerosol Copper on Marine Phytoplankton: A Review. *Atmosphere*, *10*(7), Article 7. https://doi.org/10.3390/atmos10070414

Yen, J.-H., Lin, K.-H., & Wang, Y.-S. (2002). Acute lethal toxicity of environmental pollutants to aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *52*(2), 113–116. https://doi.org/10.1006/eesa.2002.2167

Zhang, J., Kattner, G., & Koch, B. P. (2019). Interactions of trace elements and organic ligands in seawater and implications for quantifying biogeochemical dynamics: A review. *Earth-Science Reviews*, *192*, 631–649. https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2019.03.007

Zhang, L., Ou, C., Magana-Arachchi, D., Vithanage, M., Vanka, K. S., Palanisami, T., Masakorala, K., Wijesekara, H., Yan, Y., Bolan, N., & Kirkham, M. B. (2021). Indoor Particulate Matter in Urban Households: Sources, Pathways, Characteristics, Health Effects, and Exposure Mitigation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(21), 11055. https://doi.org/10.3390/ijerph182111055

Zhang, Q., Ma, H., Li, J., Jiang, H., Chen, W., Wan, C., Jiang, B., Dong, G., Zeng, X., Chen, D., Lu, S., You, J., Yu, Z., Wang, X., & Zhang, G. (2023). Nitroaromatic Compounds from Secondary Nitrate Formation and Biomass Burning Are Major Proinflammatory Components in Organic Aerosols in Guangzhou: A Bioassay Combining High-Resolution Mass Spectrometry Analysis. *Environmental Science & Technology*, *57*(51), 21570–21580. https://doi.org/10.1021/acs.est.3c04983

Zhang, Y.-L., El-Haddad, I., Huang, R.-J., Ho, K.-F., Cao, J.-J., Han, Y., Zotter, P., Bozzetti, C., Daellenbach, K. R., Slowik, J. G., Salazar, G., Prévôt, A. S. H., & Szidat, S. (2018). Large contribution of fossil fuel derived secondary organic carbon to water soluble organic aerosols in winter haze in China. *Atmospheric Chemistry and Physics*, *18*(6), 4005–4017. https://doi.org/10.5194/acp-18-4005-2018

Zhu, Y., Hinds, W. C., Kim, S., & Sioutas, C. (2002). Concentration and size distribution of ultrafine particles near a major highway. *Journal of the Air & Waste Management Association (1995)*, *52*(9), 1032–1042. https://doi.org/10.1080/10473289.2002.10470842

Zhu, Y.-H., & Jiang, J.-G. (2008). Toxicity of carbon tetrachloride to Dunaliella salina, an environmentally tolerant alga. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, *71*(8), 474–477. https://doi.org/10.1080/15287390801907533

Žutić, V., Ćosović, B., Marčenko, E., Bihari, N., & Kršinić, F. (1981). Surfactant production by marine phytoplankton. *Marine Chemistry*, *10*, 505–520. https://doi.org/10.1016/0304-4203(81)90004-9

8. PRILOZI

Prilog 1.

Problem fluorescencije pri provedbi biotestova s Oct1 proteinskim prijenosnikom

Prilikom provođenja testova kinetike sa kationskim membranskim prijenosnikom Oct1 uočeno je da pri određenim koncentracijama spojeva u nultoj minuti opada vrijednost fluorescencije što znači da NMAU ometaju fluorescencijski signal supstrata ASP+ ili svojom vlastitom fluorescencijom ili reagiraju sa ASP+. Testovi u kojima je navedeni problem uočen su izvođeni pri valnoj duljini 450/590 nm i 1 µM ASP+. Da bi istražili i rješili navedeni problem proveden je Oct 1 endpoint test prema protokolu testa sa Oatp1d1 proteinskim prijenosnikom (test u kojem dolazi do liziranja stanica opisan pod 3.3.1.), pri 450/590 nm, uz promjenu vremena inkubacije nakon dodatka boje i promjenu koncentracije supstrata ASP+ u završnoj otopini. Vrijeme inkubacije je iznosilo 5 min dok je koncentracija ASP+ bila 5 µM. Testovi su provedeni u mikropločama s 96 jažica. Kako navedenim testom nije dobivena značajnija razlika u fluorescenciji između izloženih stanica transficiranih proteinom Oct1 i Mock stanica, produženo je vrijeme inkubacije na 10 min i koncentracija ASP+ na 20 µM. Nakon provedenog testa pri navedenim uvjetima došlo je do ispiranja stanica u jažicama. Zatim je proveden endpoint test u mikroploči s 48 jažica uz duplo veći volumen prilikom nasađivanja stanica u odnosu na prošle testove, odnosno, 250 µl. Test je proveden pri 24 h i 48 h, a koncentracija ASP+ i vrijeme inkubacije nakon dodatka boje su iznosili 20 µM i 10 min. Dobiveni rezultati nisu bili dobri. Zatim smo napravili testove sa medijem bez stanica s proteinom Oct1, u jednom je bila promjenjiva koncentracija testiranih spojeva (određeni raspon koncentracija) uz fiksnu koncentracija ASP+ supstrata koja je iznosila 25 µM, a u drugom testu je bila fiksna koncentracija određenog spoja pri kojoj je primjećen pad fluorescencije u nultoj minuti i dodatak ASP+ supstrata u određenom rasponu koncentracija. Mjerenja su provedena pri valnoj duljini 470/605 nm. Napravljene su kalibracijske krivulje koje ne odstupaju od kalibracije samog ASP+ pri čemu zaključujemo da testirani spojevi ne reagiraju sa ASP+. Nadalje, proveden je test, ponovno kao kinetički, prema protokolu opisanom pod 3.3.1., ali se na stanice prvo dodavao supstrat, a tek onda spoj koji se testirao. Prema dobivenim rezultatima nisu uočene promjene u dobivenim vrijednostima fluorescencije u odnosu na protokol prema kojem se prvo dodaje spoj, a zatim supstrat. Moguće je da NMAU u višim koncentracijama induciraju depolarizaciju stanične membrane jer se sastoje od fenola ili katekola za koje je poznato da smanjuju pasivni stanični unos (Haeseler i sur., 2001; Inokuchi i sur., 1997). Poznato je također

da kateholi u nekim eksperimentalnim uvjetima mogu potaknuti gašenje fluorescencije (Dong i sur., 2010). Međutim, ako se gašenje fluorescencije dogodilo tijekom eksperimenata, dobiveni toksični učinci su podcijenjeni. Potrebno je provesti daljnje pokuse kako bi se razjasnio uočeni efekt. Konačno, provedeni su testovi na valnoj duljini od 470/605 nm i 0,5 µM ASP+ jer su pod tim uvjetima dobivene krivulje koncentracija-odgovor s manje odstupanja. Prilikom provođenja testova s ekstraktima čestica nismo primijetili smanjenje fluorescencije u nultoj minuti pri višim koncentracijama i valnoj duljini od 450/590 nm te koncentraciji ASP+ 1 µM.

Prilog 2.

Analiza PAH vezanih za PM_{10}

Ekstrakcija PAH iz uzoraka PM opisana je u Jakovljević i sur. (2020). Ukratko, sBB i AA filteri ekstrahirani su ultrazvukom sa smjesom otapala (cikloheksan : toluen = 3 : 7), centrifugirani i upareni do suhog. Zatim su ponovno otopljeni u acetonitrilu. Analiza je provedena pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (engl., *high performance liquid chromatography*, HPLC) na instrumentu Agilent Infinity 1260 s fluorescentnim detektorom. Za odvajanje PAH korištene su kolone od nehrđajućeg čelika Eclipse PAH (100 × 4,6 mm), postavljene na 20 ºC. Mobilna faza bila je smjesa vode i acetonitrila (40 : 60), a brzina protoka bila je 1 mL/min. U uzorcima je analizirano 11 PAH: Flu, Pyr, BaA, Chry, BbF, BkF, BjF, BaP, DahA, BghiP i IP. Granice kvantifikacije metode (QL) izračunate su kao koncentracijski ekvivalent deseterostrukom omjeru signala i šuma. QL je bio u rasponu od 0,002 ng/m^3 za BaA do 0,1 ng/m^3 za BjF, dok je QL za BaP bio 0,003 ng/m^3. Točnost metode bila je između 88 % za Flu i 109 % za BkF.

Koncentracije PAH u vodenim ekstraktima sBB i AA.

PAH	**µg/mg sBB čestica**	**µg u 17.66 mg sBB**	**µg/mg AA čestica**	**µg u 2.5 mg AA**
BaP	0,9	16,0	20,8	52,1
Flu	2,9	52,1	8,7	21,8
Pyr	3,3	58,6	8,2	20,4
BjF	0,4	6,9	12,0	30,0
BbF	0,8	13,8	23,3	58,2
BkF	0,3	4,8	8,8	22,0
DahA	0,1	1,2	2,9	7,2
BghiP	0,9	15,4	19,6	49,0
IP	0,8	13,6	21,1	52,8
BaA	0,8	13,6	11,5	28,9
Chry	1,1	20,0	18,3	45,7
Σ_{11}PAH	12,2	215,9	155,2	388,0

Prilog 3.

Koncentracije komponenata dodanih vodenim ekstraktom uzoraka atmosferskih lebdećih čestica porijeklom iz izgaranja biomase (uzorci sBB) u tikvice sa stanicama mikroalgi *Dunaliella tertiolecta*. Za tumačenje oznaka vidjeti Popis kratica i simbola.

PAH	Jedinica						**µg/L**									
	Parametar	**BaP**	**Flu**	**Pyr**	**BjF**	**BbF**	**BkF**	**DahA**	**BghiP**	**IP**	**BaA**	**Chry**				
	Koncentracija	5,330	17,375	19,531	2,309	4,595	1,585	0,399	5,142	4,529	4,517	6,651				
Anioni i kationi	Jedinica						**µg/L**									
	Parametar	**N-$NO3^-$**	**N-$NO2^-$**	**N-$NH4^+$**	**DIN**	**P-$PO4^{3-}$**	**Cl**	**$SO4^{2-}$**	**Na**	**K**	**Mg**					
	Koncentracija	0,571	9,532	1,968	12,071	0,755	48,014	259,694	4,432	529,346	0,137					
Metali u tragovima	Jedinica								**ng/L**							
	Parametar	**V**	**Mn**	**Ni**	**Cu**	**Zn**	**As**	**Rb**	**Sr**	**Mo**	**Cd**	**Sb**	**Cs**	**Ba**	**Tl**	**Pb**
	Koncentracija	0,429	71,493	6,732	11,636	51,491	4,204	979,946	5,702	2,411	3,436	83,843	9,990	17,786	2,280	59,872
DOC i PAT	Jedinica	**mg/L**	**mg/L T-X-100**													
	Parametar	**DOC**	**PAT**													
	Koncentracija	1,830	1,060													

9. ŽIVOTOPIS

Saranda Bakija Alempijević rođena je 10. lipnja 1983. godine u Senju, gdje je završila Osnovnu školu Silvija Strahimira Kranjčevića i opću gimnaziju Pavla Rittera Vitezovića. Diplomski studij Kemijskog inženjerstva i tehnologije smjer Procesi i proizvodi završila je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu 2007. godine te je stekla zvanje diplomirani kemijski inženjer.

2008. godine zaposlila se kao samostalni analitičar u laboratoriju PRJ Vodovod tvrtke KD Vodovod i kanalizacija d.o.o. u Rijeci gdje je 2012. godine napredovala na mjesto Voditelja Odjela kontrole kvalitete vode unutar Službe kontrole kvalitete vode i sanitarnog nadzora te je navedenu funkciju obnašala do 2018. godine.

Preseljenjem u Zagreb, 2019. godine zaposlila se na Institutu Ruđer Bošković u Zavodu za istraživanje mora i okoliša, Laboratoriju za biogeokemiju mora i atmosfere na radno mjesto stručnog suradnika. Intredisciplinarni doktorski studij iz oceanologije na Geološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu upisala je 2020. godine te je iste godine zaposlena na radno mjesto asistenta u Laboratoriju za biogeokemiju mora i atmosfere, Zavoda za istraživanje mora i okoliša na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu.

Udana je i majka dvoje djece.

Objavljeni znanstveni radovi:

1. Bakija Alempijević, Saranda; Vidović, Kristijan; Vukosav, Petra; Frka, Sanja; Kroflič, Ana; Mihaljević, Ivan; Grgić, Irena; Strmečki, Slađana Integrating voltammetry in ecotoxicology: Cu(II)-nitrocatechol complexes formation as a driver of Cu(II) and nitrocatechol toxicity in aquatic systems // Electrochimica Acta (2025); 145938, doi.org/10.1016/j.electacta.2025.145938

2. Strmečki, Slađana; Dešpoja, Iva; Penezić, Abra; Milinković, Andrea; Bakija Alempijević, Saranda; Kiss, Gyula; Hoffer, András; Mitić, Božena; Hruševar, Dario; Frka, Sanja How do certain atmospheric aerosols affect Cu-binding organic ligands in the oligotrophic coastal sea surface microlayer? // Environmental Science-Processes & Impacts, 26 (2024), 119-135. doi: 10.1039/d3em00415e

3. Gluščić, Valentina ; Žužul, Silva ; Pehnec, Gordana ; Jakovljević, Ivana ; Smoljo, Iva ; Godec, Ranka ; Bešlić, Ivan ; Milinković, Andrea ; Bakija Alempijević, Saranda ; Frka, Sanja Sources, Ionic Composition and Acidic Properties of Bulk and Wet Atmospheric Deposition in the Eastern Middle Adriatic Region // Toxics, 11 (2023), 551; 1-26. doi: 10.3390/toxics11070551

4. Vrana, Ivna ; Bakija Alempijević, Saranda ; Novosel, Nives ; Ivošević DeNardis, Nadica ; Žigon, Dušan ; Ogrinc, Nives ; Gašparović, Blaženka Hyposalinity induces significant polar lipid remodeling in the marine microalga Dunaliella tertiolecta (Chlorophyceae) // Journal of applied phycology, 34 (2022), 1457-1470. doi: 10.1007/s10811-022-02745-8

5. Milinković, Andrea ; Gregorič, Asta ; Džaja Grgičin, Vedrana ; Vidič, Sonja ; Penezić, Abra ; Cvitešić Kušan, Ana ; Bakija Alempijević, Saranda ; Kasper- Giebl, Anne ; Frka, Sanja Variability of black carbon aerosol concentrations and sources at a Mediterranean coastal region // Atmospheric Pollution Research, 12 (2021), 11; 101221, 13. doi: 10.1016/j.apr.2021.101221

6. Jakovljević, Ivana ; Šimić, Iva ; Mendaš, Gordana ; Sever Štrukil, Zdravka ; Žužul, Silva ; Gluščić, Valentina ; Godec, Ranka ; Pehnec, Gordana ; Bešlić, Ivan ; Milinković, Andrea ; Bakija Alempijević, Saranda ; Šala, Martin ; Ogrizek, Monika ; Frka, Sanja Pollution levels and deposition processes of airborne organic pollutants over the central Adriatic area: Temporal variabilities and source identification // Marine pollution bulletin, (2021), 172; 112873, 18. doi: 10.1016/j.marpolbul.2021.112873

7. Penezić, Abra ; Milinković, Andrea ; Bakija Alempijević, Saranda ; Žužul, Silva ; Frka, Sanja Atmospheric deposition of biologically relevant trace metals in the eastern Adriatic coastal area // Chemosphere, 283 (2021), 131178, 14. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.131178

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima:

1. Bakija Alempijević, Saranda; Frka, Sanja; Gašparović, Blaženka; Strmečki, Slađana Effects of nitrated monoaromatic hydrocarbons from biomass burning aerosols on chemical composition of the marine microalgae Dunaliella tertiolecta // Book of abstracts - 24th European Meeting on Environmental Chemistry / Marco, Andrea; Rubio, Ivan; Saez, Carmen et al. (ur.). Alicante: University of Alicante, Association of Chemistry and the Environment (ACE), 2024, 107, 236

2. Bakija Alempijević, Saranda; Mihaljević, Ivan; Frka, Sanja; Strmečki Kos, Slađana Copper-nitrocatechol interactions govern their toxic effects to microalgae // Book of abstracts: 10th Regional Biophysics Conference & 15th International Summer School of Biophysics / Dolanski Babić, Sanja; Dutour Sikirić, Maja; Stepanić, Višnja et al. (ur.). Split: Hrvatsko Biofizičko Društvo, 2024. str. 82-82

3. Bakija Alempijević, Saranda; Mihaljević, Ivan; Frka, Sanja; Strmečki Kos, Slađana Voltammetry of Copper-Nitrocatechol Interactions Explains Their Binary Toxic Effects to Microalgae // 36th Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry Šibenik / Šibenik, Hrvatska, 26.05.2024-29.05.2024

4. Bakija Alempijević, Saranda ; Mihaljević, Ivan ; Dragojević, Jelena ; Strmečki Kos, Slađana ; Frka, Sanja ; Smital, Tvrtko Ecotoxicological Effects of Methylnitrocatechols // 21st European Meeting on Environmental Chemistry : Book of Abstracts. Beograd: Serbian Chemical Society, 2021. str. 161-161

5. Bakija Alempijević, Saranda; Strmečki Kos, Slađana Voltammetry of atmospherically important Cu(II)-catechol complexes in aqueous phase // 12th ISE Satellite Student Regional Symposium on Electrochemistry: book of abstracts / Kapitanović, Angela; Bakija Alempijević, Saranda (ur.). Zagreb: Croatian Society of Chemical Engineers (CSCE), 2023. str. 1-1

6. Bakija Alempijević, Saranda ; Mihaljević, Ivan ; Frka, Sanja ; Smital, Tvrtko ; Strmečki Kos, Slađana Kvantifikacija i ekotoksikologija nitro-monoaromatskih ugljikovodika u atmosferskim lebdećim česticama PM10 izgaranja biomase // Znanstvena škola o okolišu 2022: Multidisciplinarni pristup istraživanju mikro- i nano- čestica u prirodnim sustavima : knjiga sažetaka. Zagreb, 2022. str. 6-6

7. Bakija Alempijević, Saranda ; Mihaljević, Ivan ; Dragojević, Jelena ; Strmečki Kos, Slađana ; Frka, Sanja ; Smital, Tvrtko Ekotoksični učinci metil-nitrokatehola // Znanstvena škola o okolišu 2021: Sveobuhvatni pristup istraživanju antropogenih pritisaka na okoliš : knjiga sažetaka. Zagreb, 2022. str. 9-9

8. Bakija Alempijević, Saranda; Mihaljević, Ivan; Dragojević, Jelena; Smital, Tvrtko; Frka, Sanja; Strmečki Kos, Slađana The impact of nitrated monoaromatic hydrocarbons from atmospheric aerosols on different levels of biological organisation in aquatic systems // 8th Faculty of Science PhD Student Symposium: Book of Abstracts / Posarić, Laura; Gmižić,

Daria; Ostojić, Tea et al. (ur.). Zagreb: Faculty of Science, University of Zagreb, Zagreb, Croatia, 2024. str. 48-48

9. Bakija Alempijević, Saranda ; Mihaljević, Ivan ; Dragojević, Jelena ; Frka, Sanja ; Smital, Tvrtko ; Strmečki Kos, Slađana Exploring ecotoxicological effects of nitromonoaromatic compounds by in vitro and in vivo bioassays / Ispitivanje ekotoksičnih učinaka nitromonoaromatskih spojeva in vitro i in vivo biotestovima // 6. Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a : Knjiga sažetaka = 6th Faculty of Science PhD Student Syposium : Book of Abstracts. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2022. str. 300-301

10. Strmečki, Slađana ; Dešpoja, Iva ; Penezić, Abra ; Milinković, Andrea ; Bakija Alempijević, Saranda ; Kiss, G. ; Hoffer , A. ; Mitić, B. ; Hruševar, D. ; Frka, Sanja The impact of pollen, biomass burning, and Saharan dust aerosols on Cu organic complexation in the oligotrophic Adriatic coastal area// EAC 2024 - The European Aerosol Conference 2024, Tampere, Finland (25. – 30.8.2024.)

11. Vrana, Ivna ; Bakija Alempijević, Saranda ; Novosel, Nives ; Ivošević DeNardis, Nadica ; Žigon, Dušan ; Ogrinc, Nives ; Gašparović, Blaženka Effect of hyposalinity on polar lipid remodeling in microalga Dunaliella tertiolecta (Chlorophyceae) // Book of Abstracts of 15th International Symposium on the Interactions between Sediment and Water. Piran: National Institute of Biology, Marine Biology Station (NIB), 2022. str. 39-39

12. Cvitešić Kušan, Ana; Milinković, Andrea; Penezić, Abra; Bakija Alempijević, Saranda; Godrijan, Jelena; Gašparović, Blaženka; Šantić, Danijela; Ribas Ribas, Mariana; Wurl, Oliver; Striebel, Maren et al. Diurnal dynamics at the sea-atmosphere interface: The Central Adriatic campaign // EGU General Assembly 2022, Beč, Austrija, 2022. str. 1-2

13. Strmečki Kos, Slađana ; Dešpoja, Iva ; Bakija Alempijević, Saranda Impact of specific atmospheric depositions on Cu-organic matter interaction in the sea- surface microlayer of the Middle Adriatic // EGU General Assembly 2021. Copernicus Publications, 2021, 4052, 1. doi: 10.5194/egusphere-egu21-4052

14. Penezić, Abra; Milinković, Andrea; Bakija Alempijević, Saranda; Žužul, Silva; Frka, Sanja. Atmospheric Deposition of Biologically Relevant Trace Metals in an Oligotrophic Adriatic Sea Area // AMOS 2021 Science for Impact : Abstract book, online, Australija, 2021. str. 68-69

15. Milinković, Andrea; Penezić, Abra; Cvitešić Kušan, Ana; Bakija Alempijević, Saranda; Gluščić, Valentina; Žužul, Silva; Jakovljević, Ivana; Skejić, Sanda; Šantić, Danijela; Godec, Ranka et al. Insights to the short-term atmospheric deposition impacts on the biology and chemistry of the sea surface microlayer in the Adriatic Sea coastal region. // The European Geosciences Union 2023 (EGU23) General Assembly, Beč, Austrija, 2023. doi:10.5194/egusphere-egu23-14624

16. Penezić, Abra; Milinković, Andrea; Bakija Alempijević, Saranda; Žužul, Silva; Frka, Sanja. Atmospheric deposition impacts on the sea surface microlayer in the coastal environment // ASLO 2021 Aquatic Sciences Meeting, online, SAD, 2021.

17. Milinković, Andrea; Gregorič, Asta; Džaja Grgičin, Vedrana; Vidič, Sonja; Penezić, Abra; Bakija Alempijević, Saranda; Kasper-Giebl, Anne; Frka, Sanja. Combining light-absorption observation and source-oriented modelling for characterization and source apportionment of black carbon aerosol pollution in a typical Mediterranean coastal area // Abstract Booklet and IGAC2021 Conference brochure, online, 2021. str. 468-468

18. Strmečki Kos, Slađana ; Dešpoja, Iva ; Penezić, Abra ; Bakija Alempijević, Saranda ; Frka, Sanja Copper Speciation by Anodic Stripping Voltammetry in the Surface Layers of the Oligotrophic Sea Influenced by Atmospheric Deposition. 72nd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2021, s01-010, 1

19. Dešpoja, Iva ; Strmečki Kos, Slađana ; Penezić, Abra ; Bakija Alempijević, Saranda ; Frka, Sanja Electrochemical determination of copper complexing capacity in the surface layer of the coastal central Adriatic Sea // 10th ISE Satellite Student Regional Symposium on Electrochemistry : Book of Abstracts. Zagreb: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa (HDKI), 2021. str. 19-19

20. Milinković, Andrea; Penezić, Abra; Cvitešić Kušan, Ana; Gluščić, Valentina; Žužul, Silva; Bakija Alempijević, Saranda; Godec, Ranka; Frka, Sanja. Sezonske promjene atmosferskog taloženja dušika i fosfora na području srednjeg Jadrana i biogeokemijske posljedice // Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a : knjiga sažetaka = PhD student symposium 2021 : book of abstracts / Barišić, Dajana (ur.). Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2021. str. 416-417

21. Milinković, Andrea: Gregorič, Asta: Džaja Grgičin, Vedrana: Vidič, Sonja: Penezić, Abra: Cvitešić Kušan, Ana: Bakija Alempijević, Saranda: Kasper- Giebl, Anne: Frka, Sanja:

Variability of black carbon aerosol concentrations and sources at the Central Adriatic coastal zone: light-absorption observation and source-oriented modelling // 11th International Aerosol Conference (IAC 2022), Atena, Grčka, 2022.

22. Milinković, Andrea ; Penezić, Abra ; Bakija Alempijević, Saranda ; Cvitešić Kušan, Ana ; Skejić, Sanda ; Šantić, Danijela ; Lehners, Carola ; Striebel, Maren ; Niggemann, Jutta ; Žužul, Silva et al. Impacts of biomass burning versus anthropogenic aerosol deposition on the surface layers in the central Adriatic Sea: A mesocosm study // SOLAS Open Science Conference 2022 Kaapstad, Južnoafrička Republika, 25.09.2022-29.09.2022

23. Milinković, Andrea; Gregorič, Asta; Džaja Grgičin, Vedrana; Vidič, Sonja; Penezić, Abra; Bakija Alempijević, Saranda; Kasper-Giebl, Anne; Frka, Sanja. Light-absorption observation and source-oriented modelling for characterization and source apportionment of black carbon aerosol pollution in a typical Mediterranean coastal area // Sveobuhvatni pristup istraživanju antropogenih pritisaka na okoliš, Zagreb, Hrvatska, 2021.