

Učinak glukoze na oksidacijski stres i fotosintezu u mikroalgi *Chlorella vulgaris* izloženoj nanočesticama srebra

Gilman, Kristina

Master's thesis / Diplomski 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:671282>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-15**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Kristina Gilman

**Učinak glukoze na oksidacijski stres i
fotosintezu u mikroalgi *Chlorella vulgaris*
izloženoj nanočesticama srebra**

Diplomski rad

Zagreb, 2025.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Kristina Gilman

**The effect of glucose on oxidative stress and
photosynthesis in the microalga *Chlorella
vulgaris* exposed to silver nanoparticles**

Master Thesis

Zagreb, 2025.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za elektronsku mikroskopiju i Laboratoriju za biljnu proteomiku na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Petre Peharec Štefanić, te komentorstvom dr. sc. Brune Komazeca. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Neizmjerne hvala mentorici, izv. prof. dr. sc. Petri Peharec Štefanić na prilici za pisanje ovog diplomskog rada, kao i na svim savjetima, strpljenju, neizmjenoj podršci i stručnom vođenju tijekom njegove izrade.

Veliko hvala komentoru, dr. sc. Bruni Komazecu, na uvijek ugodnom radnom okruženju u laboratoriju, nesebičnoj pomoći i svim dobronamjernim savjetima vezanim uz eksperimentalni dio istraživanja, kao i uz pisanje diplomskog rada. Posebno zahvaljujem na svim malim trikovima, protokolima i primjerima koji su mi uvelike olakšali njegovu izradu.

Hvala i svim ostalim profesorima, asistentima, kolegama i kolegicama u laboratoriju na prijateljskoj atmosferi i pomoći kada god je to bilo potrebno.

Također, zahvaljujem svojim roditeljima i bratu na ljubavi, brizi i svojoj podršci tijekom studiranja. Bez vas ne bi bilo ni ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem Lauri, Luki i svim svojim prijateljima koji su bili uz mene od početka do kraja studija, kao i svima onima koje sam stekla putem, na strpljivom slušanju mojih jadikovanja i dijeljenju savjeta kada god je to bilo potrebno. Zahvaljujući svima vama, ovih pet godina bilo je jedno prekrasno iskustvo.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Učinak glukoze na oksidacijski stres i fotosintezu u mikroalgi *Chlorella vulgaris* izloženoj nanočesticama srebra

Kristina Gilman

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Nanočestice srebra (AgNP) se zbog svojih specifičnih kemijskih i fizikalnih svojstava danas sve više koriste u raznim granama industrije. Zbog svoje toksičnosti i ispuštanja u otpadne vode predstavljaju opasnost za vodene ekosustave. Mikroalga *Chlorella vulgaris* se zbog brzog rasta i prilagodbe vanjskim uvjetima koristi kao modelni organizam u mnogim istraživanjima. Fitotoksičan utjecaj AgNP na mikroalgu je poznat, a s obzirom da ova mikroalga može prijeći s autotrofnog na miksotrofni način života, u ovom radu istražila sam kakav utjecaj ima glukoza, kao dodatan izvor energije, na fitotoksičnost AgNP-citrata, prateći parametre oksidacijskog stresa i fotosinteze. Alge sam uzgajala na hranjivim podlogama s dodatkom i bez dodatka glukoze i tretirala ih s koncentracijom AgNP-citrat koja omogućuje preživljenje 60% stanica. U svim tretmanima s glukozom došlo je do smanjenja koncentracije reaktivnih oblika kisika i lipidne peroksidacije te povećanja aktivnosti antioksidacijskih enzima katalaze, askorbat peroksidaze i pirogalol peroksidaze u odnosu na tretmane bez glukoze. U tretiranim algama uzgajanim na podlogama s dodatkom glukoze izmjerena je viša stopa fotosinteze, viši maksimalni kvantni prinos fotosustava II, veći indeks učinkovitosti fotosinteze te niža aktivnost klorofila *a* i *b* te karotenoida u usporedbi s tretmanom bez glukoze. Svi izmjereni parametri ukazuju na ublažavajući učinak glukoze na fitotoksičnost AgNP-citrata.

Ključne riječi: slatkovodna alga, miksotrofija, reaktivni oblici kisika, antioksidacijski enzimi, fotosintetski pigmenti, fotosustav II

(54 stranica, 14 slika, 2 tablice, 80 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Petra Peharec Štefanić

Komentor: Dr. sc. Bruno Komazec

Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Petra Peharec Štefanić

Prof. dr. sc. Biljana Balen

Izv. prof. dr. sc. Tomislav Ivanković

Rad prihvaćen: 6. veljače 2025.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

The effect of glucose on oxidative stress and photosynthesis in the microalga *Chlorella vulgaris* exposed to silver nanoparticles

Kristina Gilman

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Silver nanoparticles (AgNPs) are increasingly used in various industries due to their specific chemical and physical properties. However, their toxicity and release into wastewater pose a threat to aquatic ecosystems. Microalga *Chlorella vulgaris* is commonly used as a model organism in research due to its rapid growth and adaptability to external conditions. The phytotoxic effects of AgNPs on this microalga are well known. Since *C. vulgaris* can switch from an autotrophic to a mixotrophic mode of life, this study investigated the influence of glucose, as an additional energy source, on the phytotoxicity of AgNP-citrate by monitoring oxidative stress and photosynthesis parameters. The algae were cultivated in nutrient media with and without glucose supplementation and treated with a concentration of AgNP-citrate that allows 60% cell survival. In all treatments with glucose, there was a decrease in reactive oxygen species concentration and lipid peroxidation, as well as an increase in the activity of antioxidant enzymes, including catalase, ascorbate peroxidase, and pyrogallol peroxidase, compared to treatments without glucose. Algae grown in glucose-supplemented media showed a higher photosynthetic rate, a higher maximum quantum yield of photosystem II, a greater photosynthetic efficiency index, and lower chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and carotenoid activity compared to the treatment without glucose. All measured parameters indicate a mitigating effect of glucose on the phytotoxicity of AgNP-citrate.

Keywords: freshwater alga, mixotrophy, reactive oxygen species, antioxidant enzymes, photosynthetic pigments, photosystem II

(54 pages, 14 figures, 2 tables, 80 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Assoc. Prof. Petra Peharec Štefanić, PhD

Co-mentor: Bruno Komazec, PhD

Reviewers: Assoc. Prof. Petra Peharec Štefanić, PhD

Prof. Biljana Balen, PhD

Assoc. Prof. Tomislav Ivanković, PhD

Thesis accepted: February 6, 2025

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Mikroalge.....	1
1.1.1. Alga <i>Chlorella vulgaris</i> kao modelni organizam.....	1
1.2. Glukoza.....	3
1.2.1. Uzgoj alga u miksotrofnim uvjetima.....	3
1.3. Nanotehnologija i nanomaterijali.....	4
1.3.1. Nanočestice srebra.....	5
1.3.2. Utjecaj nanočestica na okoliš	6
1.4. Fitotoksični utjecaj nanočestica srebra na mikroalge.....	7
1.4.1. Oksidacijski stres.....	8
1.4.2. Lipidna peroksidacija.....	10
1.5. Antioksidacijski sustav algi.....	11
1.6. Fotosintetski aparat algi.....	13
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	15
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. Materijali.....	16
3.1.1. Fikološki materijal.....	16
3.1.2. Nanočestice srebra.....	16
3.2. Metode.....	16
3.2.1. Kultura alge <i>Chlorella vulgaris</i>	16
3.2.1.1. Uvjeti uzgoja kulture stanica.....	16
3.2.1.2. Izrada krivulja rasta kulture alge <i>Chlorella vulgaris</i>	18
3.2.1.3. Izlaganje kulture alge <i>Chlorella vulgaris</i> tretmanu AgNP-citrat.....	19
3.2.2. Određivanje sadržaja ROS.....	19
3.2.2.1. Fluorimetrijsko određivanje ukupnog sadržaja ROS.....	19
3.2.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja H ₂ O ₂	20
3.2.3. Određivanje stupnja lipidne peroksidacije.....	20
3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima.....	21
3.2.4.1. Ekstrakcija ukupnih topivih proteina.....	21
3.2.4.2. Određivanje aktivnosti CAT.....	22
3.2.4.3. Određivanje aktivnosti APX.....	23
3.2.4.4. Određivanje aktivnosti PPX.....	23
3.2.5. Učinak na mehanizme fotosinteze.....	24

3.2.5.1.	Određivanje stope fotosinteze.....	24
3.2.5.2.	Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja fotosintetskih pigmenta klorofila <i>a</i> i <i>b</i> te karotenoida.....	25
3.2.5.3.	Određivanje parametara fluorescencije klorofila <i>a</i>	26
4.	REZULTATI	27
4.1.	Krivulje rasta kulture alge <i>Chlorella vulgaris</i> s i bez dodatka glukoze.....	27
4.2.	ROS.....	27
4.2.1.	Sadržaj ukupnog ROS.....	27
4.2.2.	Sadržaj H ₂ O ₂	29
4.3.	Stupanj lipidne peroksidacije.....	30
4.4.	Aktivnost antioksidacijskih enzima.....	31
4.4.1.	Aktivnost CAT.....	31
4.4.2.	Aktivnost APX.....	32
4.4.3.	Aktivnost PPX.....	33
4.5.	Učinak na mehanizme fotosinteze.....	34
4.5.1.	Stopa fotosinteze.....	34
4.5.2.	Sadržaj fotosintetskih pigmenta klorofila <i>a</i> i <i>b</i>	34
4.5.3.	Sadržaj karotenoida.....	35
4.5.4.	Fluorescencija klorofila <i>a</i>	36
5.	RASPRAVA	38
6.	ZAKLJUČAK	45
7.	LITERATURA	46
8.	ŽIVOTOPIS	54

KRATICE

AgNP	nanočestice srebra (engl. <i>silver (Ag) nanoparticles</i>)
APX	askorbat peroksidaza (engl. <i>ascorbate peroxidase</i>)
ATP	adenozin trifosfat (engl. <i>adenosine triphosphate</i>)
BBM	tekuća hranjiva podloga korištena za uzgoj algi, tzv. Boldova osnovna podloga (engl. <i>Bold's Basal Medium</i>)
BBM+	oznaka za tekuću hranjivu podlogu BBM s dodatkom glukoze
BBM-	oznaka za tekuću hranjivu podlogu BBM bez dodatka glukoze
CAT	katalaza (engl. <i>catalase</i>)
DHE	dihidroetidij (engl. <i>dihydroethidium</i>)
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetid acid</i>)
FOX	reagens za određivanje sadržaja vodikovog peroksida (engl. <i>ferrous oxidation-xyleneol orange</i>)
H ₂ DCFDA	2',7'- diklorohidrofluorescein diacetat (engl. <i>2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate</i>)
MDA	malondialdehid (engl. <i>malondialdehyde</i>)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NP	nanočestice (engl. <i>nanoparticles</i>)
PPX	pirogalol peroksidaza (engl. <i>pyrogalol peroxidase</i>)
PSII	fotosustav II (engl. <i>photosystem II</i>)
PUFA	polinezasićene masne kiseline (engl. <i>polyunsaturated fatty acid</i>)
ROS	reaktivni oblici kisika (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
TBA	tiobarbituratna kiselina (engl. <i>thiobarbituric acid</i>)
TCA	trikloroactena kiselina (engl. <i>trichloroacetic acid</i>)

1. UVOD

1.1. Mikroalge

Mikroalge su raznolika skupina jednostaničnih autotrofnih organizama koji su većinom fotosintetski (Ru i sur. 2020). Mikroalge imaju dugu evolucijsku povijest od 3,4 milijarde godina, a i dalje predstavljaju izuzetno raznolike i prilagodljive oblike života. Kao i drugi fitoplanktoni, mikroalge imaju određenu nutritivnu vrijednost, zbog čega se još od Asteka koriste u prehrani (Safi i sur. 2014). Danas ih ljudi najviše konzumiraju kao dodatke prehrani, a njihovi produkti koriste se i u proizvodnji boja i farmaceutskih proizvoda, kao hrana za životinje, ali i u akvakulturi i kozmetici. Osim toga, obećavajući su izvor održive energije zbog sposobnosti akumuliranja velike količine lipida potrebnih za proizvodnju biodizela s obzirom na smanjenje zaliha fosilnih goriva. Također su izvor proteina, ugljikohidrata, pigmenata, vitamina i minerala. Mikroalge apsorbiraju sunčevu svjetlost, a procesom fotosinteze, zajedno s cijanobakterijama, proizvode otprilike 50% atmosferskog kisika (O₂) te apsorbiraju velike količine ugljikovog dioksida (CO₂) (Safi i sur, 2014; Ma i sur. 2023). Osim toga, pokazale su se iznimno učinkovitima za uklanjanje dušika, fosfora, CO₂, teških metala i patogena iz otpadnih voda (Safi i sur. 2014). Kultivacija mikroalgi za komercijalne svrhe je započela 1970-ih godina s uzgojem algi rodova *Arthrospira* i *Chlorella*, a razlog je primarno bila jako visoka proizvodnja biomase u odnosu na kopnene biljke. Biomasa algi se može skoro u potpunosti iskoristiti s obzirom da ima vrlo nizak sadržaj vlakana, ali je bogata proteinima, lipidima i lako dostupnim ugljikohidratima kao što je škrob. U usporedbi sa sojom, alge proizvode oko 10 puta više proteina po jednom hektaru zemlje (Thoré i sur. 2022).

Biotehnologija mikroalgi je dobila veliki značaj posljednjih nekoliko desetljeća. Primjene mikroalgi su vrlo različite, od jednostavne proizvodnje biomase za hranu i stočnu hranu do vrijednih proizvoda za ekološku primjenu. Većina ovih primjena se još razvija, kao i tržište za iste, ali biotehnološka primjena mikroalgi sve više dobiva na značenju (Pulz i Gross 2004).

1.1.1. Alga *Chlorella vulgaris*

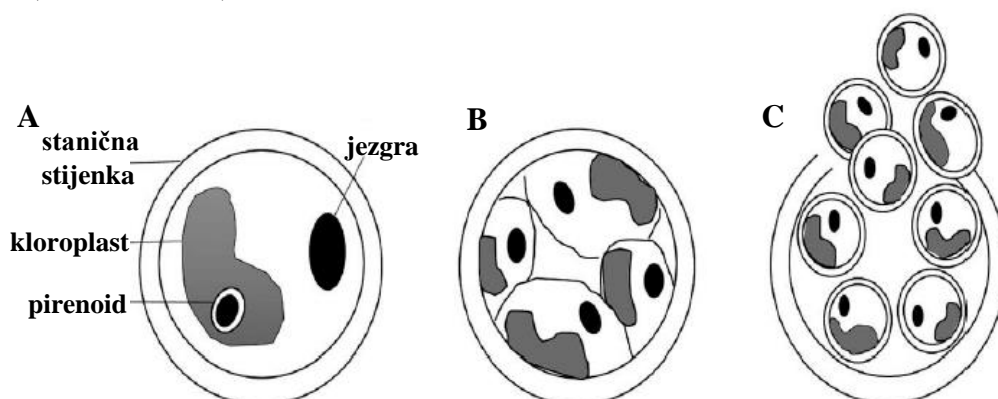
Zelena alga *Chlorella vulgaris* pripada porodici Chlorellaceae koju je prvi opisao danski mikrobiolog Dr. Martinus Willem Beijerinck 1890. godine iz svoje prve čiste kulture eukariotskih mikroalgi. Široko je rasprostranjena u slatkovodnim i morskim vodama kao i na kopnu. Ova alga pokazuje visoku stopu fotosinteze te vrlo brzi rast pod autotrofnim, miksotrofnim i heterotrofnim uvjetima zbog čega je jedna od prvih mikroalgi korištenih za kultivaciju u širokim razmjerima te za komercijalnu proizvodnju (Ru i sur. 2020). Naziv

Chlorella dolazi iz grčke riječi *chloros*, što znači zeleno, te latinskog sufiksa *ella* koji označava mikroskopsku veličinu same alge.

Mikroalga *C. vulgaris* je mikroskopska elipsoidna ili okruglasta alga promjera 2-10 μm , koja nema bič (Safi i sur. 2014). U prirodi se pojavljuje kao jednostanična, samostalna alga, ali može formirati kolonije od najviše 64 stanice. Sastoji se od jednog kloroplasta, koji može sadržavati pirenoid, te rigidne stanične stijenke koja ju štiti od vanjskih uvjeta i nametnika. Citoplazma je želatinozna te se sastoji od vode, topivih proteina i minerala. Razmnožava se aseksualno proizvodnjom autospora, pri čemu se majčinska stanica dijeli na 2-32 autospore ili stanice kćeri (Slika 1). Nakon toga, majčinska stanica puca, a njeni ostaci služe kao hrana stanicama kćeri u procesu zvanom autosporulacija (Ru i sur. 2020).

Zelena alga *C. vulgaris* je bogata proteinima (oko 61,6%), mastima (oko 12,5%) i ugljikohidratima (oko 13,7%). Osim toga sadrži visok postotak nutrijenata kao što su vitamini (folna kiselina, vitamin C, kompleks vitamina B, biotin, vitamin B1, vitamin D i menadion), minerali (željezo, kalij, kalcij, natrij, fosfor i magnezij), pigmenti (lutein, karotenoidi, astaksantin, klorofil *a* i *b*), polisaharidi i faktori rasta (Abdel-Latif i sur. 2022). Ove komponente se mogu dalje podijeliti na primarne i sekundarne metabolite. Primarni metaboliti ključni su za rast i osnovne metaboličke procese poput fotosinteze i staničnog disanja, dok su sekundarni metaboliti molekule nastale iz primarnih metabolita kada je alga izložena nepovoljnim uvjetima u okolišu (Ru i sur. 2020).

Visoka stopa rasta, sposobnost prilagodbe organizma na okolišni stres te veliki broj biokemijskih spojeva koje ove alge proizvode ukazuju na njihov veliki potencijal za različite primjene (Ru i sur. 2020).



Slika 1. Prikaz procesa autosporulacije alge *C. vulgaris*. Majčinska stanica (A) dijeli se na 2-32 autospore (B). Nakon što autospore sazriju majčinska stanica puca i postaje izvor hrane za stanice kćeri (C). Preuzeto i prilagođeno prema Ru i sur. (2020).

1.2. Glukoza

Glukoza, poznata kao i dekstroza, pripada skupini ugljikohidrata nazvanih jednostavni šećeri ili monosaharidi. Monosaharidi su molekule ugljikohidrata koje se ne mogu hidrolizom rastaviti na manje podjedinice, odnosno jednostavnije ugljikohidrate, ali se mogu i spajati u veće strukture kao što su oligosaharidi i polisaharidi. Termin glukoza je izveden iz grčke riječi *gleukos*, što znači slatko vino. Prvi ga je upotrijebio André Dumas 1838. godine kako bi opisao slatku tvar dobivenu iz meda i grožđa. Molekulska formula glukoze je $C_6H_{12}O_6$, a sintetizira se u biljkama i algama procesom fotosinteze, gdje se najčešće pohranjuje u obliku polisaharida. Skladišti se u obliku glikogena u jetri ili mišićima životinjskih organizama te u obliku škroba ili celuloze u biljaka i algi (Sreeranjit i Laj, 2003).

1.2.1. Uzgoj alga u miksotrofnim uvjetima

Mikroalge su fotosintetski organizmi koji sadrže klorofil *a* te se najčešće uzgajaju u autotrofnim kulturama, gdje pretvaraju CO_2 u vodu i biomasu procesom fotosinteze. No, iako su to autotrofni organizmi, mnoge vrste mogu živjeti i u heterotrofnim ili miksotrofnim uvjetima. Takvi uvjeti omogućuju algi korištenje organskih spojeva kao dodatnih izvora energije (El Semary i sur. 2023). Uzgoj algi u autotrofnim uvjetima ima nekoliko nedostataka, poput smanjene koncentracije biomase i dugog perioda kultivacije. Miksotrofija, odnosno, dodavanje izvora ugljika u hranjive podloge, predstavlja obećavajuće rješenje za navedene probleme. U takvim uvjetima zabilježeni su brži rast algi i veća biomasa u usporedbi s autotrofijom ili heterotrofijom, budući da su svjetlo i šećeri istovremeno dostupni algama (Deng i sur. 2018). Mnoge alge mogu prelaziti s autotrofije na miksotrofiju ili heterotrofiju prema potrebi, koristeći metaboličke procese poput autotrofije ili miksotrofije za rast. Pri tome mogu provoditi fotosintezu ili koristiti dostupni organski materijal. Sposobnost miksotrofije, kojom iskorištavaju organski supstrat, ukazuje na to da alge nisu strogo ovisne o fotosintezi te da svjetlost nije nužan faktor rasta. Biomasa i koncentracija lipida u algama mogu se povećati mijenjanjem parametara uzgoja, poput fiksacije CO_2 , temperature i koncentracije hranjivih tvari u podlozi (Kong i sur. 2012).

Uzgoj alge *C. vulgaris* zahtijeva pažljiv odabir izvora dušika, budući da je on ključan za optimalan rast stanica i proizvodnju lipida. Alge mogu koristiti različite izvore dušika, poput nitrata, uree, amonijaka ili kvasca. Druga bitna stavka je svjetlost, koja je bitna za proces fotosinteze, ali i za kemijski sastav alge. Također je potrebno odrediti optimalnu pH vrijednost kako bi se izbjegao dodatni stres koji bi mogao negativno utjecati na apsorpciju nutrijenata te

produkciji metabolita. Za najbrži rast, temperatura treba biti između 15 i 26 °C. Temperature ispod 15 °C ograničavaju rast algi, dok više temperature inhibiraju rast stanica. Bitna stavka je i aeracija ili lagano miješanje kulture algi tokom rasta bez oštećenja staničnih membrana. Naime, aeracija sprječava precipitaciju stanica algi, dok istovremeno omogućuje homogenizaciju temperature i hranjivih tvari, ali i koncentracije O₂ u kulturi (Ru i sur. 2020). U miksotrofnim kulturama, glukoza se najčešće koristi kao izvor ugljika jer sadrži više energije po molu u usporedbi s drugim supstratima. U različitim istraživanjima utjecaja glukoze na rast i fotosintetsku aktivnost mikroalgi, pokazano je da glukoza potiskuje sintezu ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza oksigenaze (Rubisco), što smanjuje njegov afinitet prema CO₂. Time Rubisco postaje manje učinkovit u fiksaciji CO₂ tijekom fotosinteze, što može utjecati na učinkovitost cijelog fotosintetskog procesa. Osim toga, glukoza smanjuje sadržaj proteina Rubisco i razinu proteina D1 fotosustava II (PSII), a također potiskuje sintezu fikocijanina i alofikocijanina. Nadalje, dodatak glukoze izaziva i promjene u respiracijskom i fotosintetskom aparatu stanica algi u miksotrofnim kulturama (Deng i sur. 2018). Također, u slatkovodnoj algi *C. vulgaris*, jedan od ključnih sustava za iskorištavanje ugljikohidrata je inducibilni transportni sustav heksoze, koji omogućuje korištenje glukoze kao izvora ugljika (Cheirsilp i Torpee 2012).

1.3. Nanotehnologija i nanomaterijali

Richard Feynman smatra se ocem nanotehnologije, koja obuhvaća tehnologije na tzv. nanorazini. Nanotehnologija se definira kao kontrola ili rekonstrukcija tvari na atomskoj i molekularnoj razini, u rasponu od 0 do 100 nanometara. Kada se dimenzije materijala smanjuju, njihova svojstva počinju se mijenjati, a kada dimenzije padnu ispod 100 nanometara, fizička i kemijska svojstva materijala značajno se mijenjaju, što se može iskoristiti u različite svrhe (Suryawanshi i sur. 2022). Nanotehnologija obuhvaća nanoprodukciju, razvoj nanomaterijala te primjenu fizičkih, kemijskih i bioloških sustava na različitim razinama, od pojedinačnih atoma i molekula do submikronskih dimenzija, kao i integraciju nastalih nanostrukture u veće sustave (Bhushan 2017). Danas je nanotehnologija postala jedna od ključnih istraživačkih aktivnosti 21. stoljeća, jer znanstvenici koriste jedinstvena svojstva atomske i molekularne strukture materijala izrađenih na nanometarskoj skali. Sposobnost manipulacije fizičkim, kemijskim i biološkim svojstvima ovih čestica omogućava istraživačima dizajniranje i primjenu nanočestica u različitim područjima, poput isporuke lijekova, kontrastnih sredstava za snimanje ili dijagnostičkih svrha. Kombinacija tih mogućnosti, zajedno s napretkom u snimanju,

bioinformatičari i sustavnoj biologiji, nosi veliki potencijal za rješavanje složenih biokemijskih i genetskih izazova (McNeil i sur. 2005).

Nanočestice (NP) su mikroskopske čestice s promjerom od 1 do 100 nanometara. Zbog velike površine u odnosu na mali volumen, one pokazuju posebna fizička i kemijska svojstva te se dijele u dvije glavne skupine: organske i anorganske nanočestice. Organske nanočestice sastoje se od organskih materijala, dok su anorganske građene od metala ili metalnih oksida. Anorganske nanočestice dalje se dijele u tri podskupine: metalne nanočestice, nanočestice metalnih oksida i nanočestice na bazi ugljika. Metalne nanočestice imaju jedinstvena svojstva, poput optičke polarnosti, antimikrobne aktivnosti, električne vodljivosti i biokompatibilnosti, zbog čega se koriste u različitim primjenama. Iako nanočestice pokazuju veliki potencijal, njihova upotreba u obliku praha može biti opasna, budući da su toksične za žive stanice (Suryawanshi i sur. 2022). Zbog svojih antibakterijskih, antitumorskih i antioksidacijskih svojstava, nanočestice danas nalaze primjenu u mnogim industrijama, uključujući zdravstvo, poljoprivredu i prehrambenu industriju. Osim toga, koriste se u raznim područjima kao što su senzori za plinove, upravljanje otpadom, očuvanje hrane, visokotemperaturni superprovodiči i prerada hrane. Ovaj sektor nastavlja bilježiti dinamičan razvoj iz godine u godinu (Srinivasan i Rana 2024).

1.3.1. Nanočestice srebra

Nanočestice srebra (AgNP) jedan su od najvažnijih i najzanimljivijih nanomaterijala među metalnim nanočesticama, posebno u biomedicinskim primjenama. Zbog svojih jedinstvenih fizičkih i kemijskih svojstava, AgNP se sve više koriste u industrijama poput medicine, prehrambene industrije, zdravstva, kao i u potrošačkim i industrijskim proizvodima. Ova svojstva obuhvaćaju optička, električna i toplinska svojstva, visoku električnu vodljivost, kao i biološke osobitosti. AgNP su posebno korisne kao antibakterijska sredstva, a primjenjuju se u premazima medicinskih uređaja, optičkim sensorima te u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Osim toga, imaju ključnu ulogu u dijagnostici, isporuci lijekova i kao antikancerogena sredstva (Zhang i sur. 2016). Zabilježeno je da AgNP pokazuju biocidno djelovanje putem sporog oslobađanja iona srebra (Ag^+) kroz različite mehanizme, uključujući interakciju s tiolnim skupinama proteina i enzima, inhibiciju replikacije DNA te indukciju oksidacijskog stresa, što bakterijama otežava stvaranje otpornijih sojeva (Yu i sur. 2013). Toksičnost AgNP često ovisi o kemijskim i biološkim molekulama na površini čestica, koje putem elektrostatskog i elektrosteričnog odbijanja sprječavaju aglomeraciju čestica, čime

djeluju kao stabilizatori. Najčešće korišteni stabilizator je citrat, koji može djelovati i kao redukcijsko i kao koordinirajuće sredstvo (Sharma i sur. 2014). Slobodni elektronski parovi u karbonilnim skupinama citrata mogu elektrostatički stabilizirati nanočestice i omogućiti stvaranje spojeva s atomima metala koji imaju slobodne orbitale (Ranoszek-Soliwoda i sur. 2017).

1.3.2. Utjecaj nanočestica na okoliš

Detekcija i kontrola nanočestica ključni su za sprječavanje njihovog neželjenog otpuštanja u okoliš. Nanočestice mogu biti izravno emitirane tijekom procesa izgaranja ili nastati u atmosferi nukleacijom pare prekursora, kao i radioaktivnim raspadom, a često se proizvode i u raznim industrijskim uvjetima (Biswas i Wu, 2005). One mogu ući u okoliš tijekom cijelog svog životnog ciklusa: od proizvodnje sirovina, preko uporabe, pa sve do odlaganja proizvoda koji ih sadrže. Globalna procjena emisije nanočestica pokazuje da najveći udio otpada završava na odlagalištima (63–91%) i u tlu (8–28%), dok manji postotak dopijeva u vodeni okoliš (7%) i zrak (1,5%). U vodenom okolišu, nanočestice su izrazito nestabilne, što može dovesti do njihove agregacije i raspadanja (Bundschuh i sur., 2018). Ovi procesi uvelike ovise o karakteristikama vodenog medija, poput pH vrijednosti, koncentracije i sastava organskih tvari (Oukarroum i sur., 2011).

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organisation*, WHO) koncentracija srebra u prirodnim vodama varira između 0,2 i 0,3 mg L⁻¹, dok u vodi za piće može biti između nezapažene razine i 5 mg L⁻¹ (WHO, 2003). Glavni izvori onečišćenja vodenih ekosustava potiču iz gradskih otpadnih voda i poljoprivrede, pri čemu se svake godine u okoliš otpusti više od 2 milijuna kilograma srebra (Domingo i sur., 2019).

Biološka aktivnost AgNP ovisi o čimbenicima kao što su kemijska svojstva površine, veličina, oblik, morfologija čestica, sastav, aglomeracija i brzina otapanja, reaktivnost čestica u otopini, učinkovitost disocijacije, te vrsta stanica. Također, vrsta redukcijskih sredstava korištenih pri sintezi AgNP može utjecati na citotoksičnost. Manja veličina čestica povećava toksičnost zbog veće površine, većeg broja reaktivnih mjesta i lakšeg ulaska u stanice (Zhang i sur., 2016). Toksičnost također ovisi o obliku čestica, jer promjene na njihovoj površini mogu uzrokovati otpuštanje iona Ag⁺ (Domingo i sur., 2019).

1.4. Fitotoksični utjecaj čestica srebra na mikroalge

Mikroalge igraju ključnu ulogu u vodenim ekosustavima kao primarni proizvođači u hranidbenom lancu. Kao takve, one su izuzetno osjetljive na zagađivače, a svaki toksični utjecaj na autotrofe može utjecati na heterotrofe. Time se AgNP mogu prenijeti kroz hranidbeni lanac, što dodatno naglašava potrebu za praćenjem njihovih učinaka na mikroalge (Lekamge i sur., 2020). Zbog ove osjetljivosti, mikroalge se često koriste kao bioindikator za procjenu rizika zagađenja vodenih ekosustava teškim metalima, uključujući nanočestice srebra (Afkar i sur., 2010).

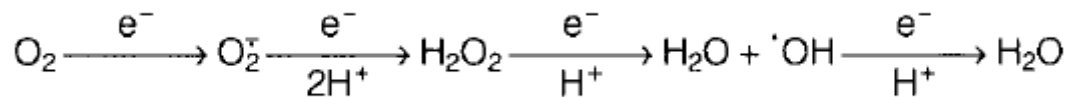
Mikroalge su jednostanični organizmi okruženi plazmatskom membranom i vanjskom polupropusnom staničnom stijenkom, koja je kemijski heterogena i uključuje celulozu, glikoproteine i polisaharide. Ova stanična stijenka stvara kompleksne i teško propusne mreže (Li i sur., 2015). Pore u toj stijenci, promjera 5-10 nanometara, omogućuju prolaz nanočesticama manjih dimenzija, pa se tako nanočestice koje su manjih dimenzija mogu akumulirati unutar stanica algi (Yue i sur., 2017). Iako stanične membrane imaju važnu ulogu u obrani alge od nanočestica, AgNP mogu otpustiti ione Ag^+ sa svoje površine koji također imaju toksični učinak, čime stabilizatori na površini nanočestica imaju veliki značaj (Dorobantu i sur. 2014). Nanočestice mogu uzrokovati različita oštećenja stanica, uključujući oštećenje membrana, povezivanje proteina, gubitak metaboličkih funkcija, mutacije, oštećenja mitohondrija, lizu stanica, inhibiciju rasta, adheziju te promjene u fotosintetskom aparatu. Mikroalge posjeduju različite mehanizme obrane od toksičnih učinaka nanočestica, koji se mogu pratiti na morfološkoj, biokemijskoj i molekularnoj razini. Romero i sur. (2020) proveli su istraživanje u kojem su pratili fiziološke i morfološke odgovore alge *C. vulgaris* na izlaganje AgNP. U okviru morfoloških promjena, stanice *C. vulgaris* smanjile su svoj volumen i promjer pod utjecajem AgNP. Dodatno, uz povećanje koncentracije AgNP-a, boja kulture alge mijenjala se iz zelene u zeleno-žutu, jer izloženost metalnim nanočesticama može izazvati nedostatak dušika, što pokreće kompenzacijski mehanizam u kojem dolazi do razgradnje pigmenata (smanjenje koncentracije klorofila) u cilju opskrbe alge organskim dušikom. Pored morfoloških promjena, stanice algi mogu također promijeniti svoj biokemijski sastav, prilagoditi stanični metabolizam i pohraniti molekule poput proteina i lipida kao odgovor na uklanjanje toksičnih molekula iz glavnih metaboličkih putova. Također, može doći do pucanja vodikovih veza, što može inhibirati daljnju sintezu DNA (Shanab i sur., 2019).

1.4.1. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres definiran je kao neravnoteža između stvaranja reaktivnih oblika kisika (eng. *reactive oxygen species*, ROS) i mogućnosti obrane biološkog sustava i popravka štete nastale djelovanjem ROS, odnosno neravnoteža između oksidanata i antioksidacijskog potencijala (Preiser 2012). Iako su ROS povijesno bili povezivani sa staničnom smrću, danas je poznato da imaju ključnu ulogu u signalizaciji i prilagodbi stanica na stres (Pérez-Pérez i sur. 2012). ROS su međuprodukti aerobnih metabolizama, a uključuju radikalne i neradikalne oblike koji lako reagiraju s organskim molekulama, što dovodi do oštećenja staničnih komponenti. Pretjerano stvaranje ROS često se javlja pod abiotičkim stresnim uvjetima (suša, promjene u temperaturi, UV- zračenje, teški metali) kao rezultat poremećaja metabolizma, što dovodi do oksidacijskog oštećenja organizma (Nowicka 2022).

U algama, ROS se najčešće stvaraju u lancu prijenosa elektrona unutar kloroplasta, tijekom oksidacijske fosforilacije u mitohondrijima, kao i u citosolu i peroksisomima. Oblici ROS nastaju u tilakoidnim membranama kada apsorpcija svjetlosti premaši kapacitet fotosintetskog aparata. Glavni izvori proizvodnje ROS tijekom fotosinteze su Fotosustav I (PSI) i Fotosustav II (PSII). Do stvaranja ROS u PSI može doći zbog nakupljanja elektrona na kraju lanca prijenosa elektrona u tilakoidnim membranama, što ometa njihov daljnji prijenos, čime dolazi do prekomjernog stvaranja oblika ROS (Coulombier i sur. 2021). S druge strane, PSII također može uzrokovati proizvodnju ROS kada je dostava energije do reakcijskog središta PSII ograničena, a lanac prijenosa elektrona između fotosustava nije u potpunosti funkcionalan. U tom slučaju, višak svjetlosti i energije koji nije ispravno prenesen može izazvati pojavu ROS (Rezayian i sur. 2019).

ROS uključuju širok spektar reaktivnih spojeva, kao što su superoksid ($O_2^{\bullet-}$), vodikov peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikal (HO^{\bullet}), singletni kisik (1O_2), peroksilni radikal (LOO^{\bullet}), alkoksilni radikal (LO^{\bullet}), lipidni hidroperoksid (LOOH), peroksinitrit ($ONOO^-$), hipoklorastu kiselinu (HOCl) i ozon (O_3) (Li i sur. 2016) (Slika 2). Reaktivnost ROS ovisi o njegovom tipu i uvjetima reakcije. Na primjer, HO^{\bullet} ima vrlo visoku kemijsku aktivnost i može oksidirati većinu organskih molekula, dok H_2O_2 ima umjerenu reaktivnost. Kemijska aktivnost ROS opada sljedećim redoslijedom: $HO^{\bullet} > ^1O_2 > H_2O_2 > O_2^{\bullet-}$ u biološkom okruženju. Naime, neki ROS sadrže nesparene elektrone, zbog čega su poznati kao slobodni radikali, dok drugi oblici ROS, poput H_2O_2 , peroksinitrita, hipokloraste kiseline i ozona, nisu slobodni radikali, ali mogu uzrokovati oštećenja na stanicama na drugačiji način (Li i sur. 2016).



Slika 2. ROS i njihove pretvorbe. Molekularni kisik (O_2) mora prihvatiti četiri elektrona kako bi proizveo dvije molekule H_2O . Međutim, zbog ograničenja spina, O_2 ne može prihvatiti četiri elektrona odjednom, već ih prihvaća jedan po jedan. Tako se tijekom redukcije O_2 postupno formiraju stabilni međuprodukti postupno. O_2 – molekularni kisik, $\text{O}_2^{\bullet -}$ - superoksidni anion, H_2O_2 – vodikov peroksid, H_2O – molekula vode, HO^{\bullet} - hidroksilni radikal, e^- - elektron, H^+ - ion vodika. Preuzeto i prilagođeno prema Mallick i Mohn (2000).

Singletni kisik ($^1\text{O}_2$) je elektrofilan oblik ROS koji reagira s glavnim biološkim spojevima, poput nezasićenih masnih kiselina membranskih lipida. On nastaje elektronskim pobuđivanjem O_2 te je zato manje stabilan od običnog tripletnog kiska ($^3\text{O}_2$). Naime, O_2 može reagirati sa singletnim ili tripletnim pobuđenim stanjem molekule pigmenta i proizvoditi $^1\text{O}_2$ u uvjetima jakog svjetla u reakcijskom središtu PSII u kloroplastu. $^1\text{O}_2$ odgovoran je za značajna oštećenja stanica, uključujući oksidaciju proteina, lipida i nukleinskih kiselina, oštećenje membrana kloroplasta i tilakoida te fotoinhibiciju. Reakcijski centar PSII posebno je ugrožen zbog mogućeg prekomjernog stvaranja $^1\text{O}_2$, no karotenoidi i tokoferoli djeluju kao zaštita, suzbijajući njegov sadržaj (Nowicka 2022; Rezayian i sur. 2019; Coulombier i sur. 2021)

O_2 može prihvatiti jedan elektron kako bi formirao $\text{O}_2^{\bullet -}$ koji je jedinstven među aktivnim vrstama O_2 jer njegova povoljna termodinamika omogućuje da djeluje i kao oksidans i kao reducens. Sinteza $\text{O}_2^{\bullet -}$ najčešće se odvija u kloroplastima tijekom fotosinteze, dok se u manjim količinama proizvodi i u mitohondrijima tijekom oksidacijske fosforilacije, te u staničnim membranama djelovanjem NADPH-oksidade. $\text{O}_2^{\bullet -}$ je slabo reaktivan jer nije sposoban izravno reagirati s makromolekulama te se brzo pretvara u H_2O_2 . Ipak, može reducirati prijelazne metale (npr. Fe^{3+} , Cu^{2+}) i reagirati s tiolnim skupinama cisteina (Nowicka 2022; Rezayian i sur. 2019; Mallick i Mohn 2000; Coulombier i sur. 2021).

Nadalje, $\text{O}_2^{\bullet -}$ može prihvatiti elektron i dva protona, stvarajući tako H_2O_2 , koji se u algama neutralizira pomoću peroksidaza i katalaze. Iako je H_2O_2 slabo reaktivan, još uvijek je visoko toksičan zbog mogućnosti prolaska kroz membrane, difundiranja kroz stanicu i oksidacije sulfhidrilne skupine, što dovodi do deaktivacije esencijalnih enzima. Također može reagirati s molekulom DNA te, u prisutnosti prijelaznih metala poput željeza i bakra, izazvati stvaranje

visoko reaktivnih hidroksilnih radikala putem Haber-Weissove reakcije (Coulombier i sur. 2021; Rezayian i sur. 2019).

HO• nastaje primarno putem Fentonove reakcije, kada H₂O₂ reagira s prijelaznim metalima poput željeza, razlažući se u HO• i hidroksidni ion (OH⁻), dok HO• mogu dodatno nastati i homolitičkim cijepanjem vode (H₂O → HO• + H•). Ovi radikali se stvaraju u stromi kloroplasta, gdje fotosustavi proizvode H₂O₂. HO• su izuzetno reaktivni i mogu izazvati peroksidaciju lipida, denaturaciju proteina i oštećenje nukleinskih kiselina, čineći ih najreaktivnijim oblikom ROS (Rezayian i sur. 2019; Coulombier i sur. 2021).

Prekomjerne količine oblika ROS narušavaju redoks homeostazu i uzrokuju oštećenja staničnih komponenti. Redoks-aktivni teški metali u stanicama mogu se javljati u različitim oksidacijskim stanjima te izravno reagirati s oblicima ROS, čime dolazi do pretvorbe manje štetnih oblika ROS u opasnije oblike. Indukcija oksidacijskog stresa smatra se glavnim mehanizmom njihove toksičnosti. S druge strane, redoks-neaktivni metali mogu neizravno izazvati oksidacijski stres ometanjem metaboličkih procesa poput disanja i fotosinteze, inhibirajući antioksidacijske enzime i smanjujući sadržaj glutaciona. Dodatno, alge mogu akumulirati Ag⁺ ione otpuštene s površine AgNP uglavnom vezanjem iona na površinu stanica, čime inhibiraju enzime vezanjem na njihove tiolne skupine. Na taj način, AgNP inhibira respiratorni lanac prijenosa elektrona što smanjuje proizvodnju energije u stanicama. Dodatno, AgNP uzrokuju oksidacijski stres koji vodi do peroksidacije lipida, oštećenja DNA i drugih staničnih struktura (Nowicka 2022). Prema istraživanjima Oukarroum i sur. (2011) te Shanab i sur. (2019), izlaganje kultura algi AgNP uzrokuje povećanje sadržaja ukupnog ROS, kao i porast lipidne peroksidacije u stanicama algi *C. vulgaris*, *Dunaliella tertiolecta* i *Dictyochloropsis splendida*.

1.4.2. Lipidna peroksidacija

Lipidi su sastavni dijelovi staničnih membrana koji su velikim dijelom građeni od polinezasićenih masnih kiselina (eng. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) koje su podložne oksidaciji (Nowicka 2022). Određeni oblici ROS mogu izazvati peroksidaciju lipida, odnosno procesa u kojem slobodni radikali oduzimaju elektron s dvostruke veze između dva atoma ugljika u molekuli lipida. Ovaj proces mogu uzrokovati endogeni ili egzogeni čimbenici poput enzima, radikala, metalnih iona, UV-radijacije, prekomjerne topline, različitih kemikalija, droga, oblika ROS i reaktivni oblici dušika (eng. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) (Guéraud i

sur. 2010). Postoje tri različita mehanizma peroksidacije lipida: neenzimska posredovana slobodnim radikalima, neenzimska neovisna o slobodnim radikalima i enzimski. Peroksidacija lipida posredovana slobodnim radikalima može započeti radikalima poput HO^\bullet , $\text{HO}^{2\bullet-}$, ali i radikalima s ugljikovim središtem, poput R^\bullet , RO^\bullet , ROO^\bullet ili $\text{NO}^{2\bullet}$, dok i lipidni radikali, koji su međuprodukti peroksidacije lipida, također mogu reagirati s membranskim proteinima. Neenzimska peroksidacija neovisna o slobodnim radikalima izravna je reakcija $^1\text{O}_2$ s PUFA molekulama, što dovodi do stvaranja lipidnih hidroperoksida i cikličkih peroksida (Nowicka 2022). Mehanizam neenzimske peroksidacije PUFA molekula se događa u tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija. Inicijacija je odvajanje H^\bullet radikala iz lipoidnog lanca kako bi se dobio lipidni radikal. Tokom propagacije, lipidni radikal može reagirati s O_2 i LOO^\bullet , koji zatim reagira s lipidom, stvarajući lipidni radikal i LOOH . LOOH su izrazito nestabilni: generiraju nove peroksilne i alkoksilne radikale te se razgrađuju na sekundarne proizvode. U konačnici, terminacijom se zaustavlja proces lipidne peroksidacije nastajanjem lipidnog peroksida koji ne reagira s drugim PUFA molekulama. (Guéraud i sur. 2010).

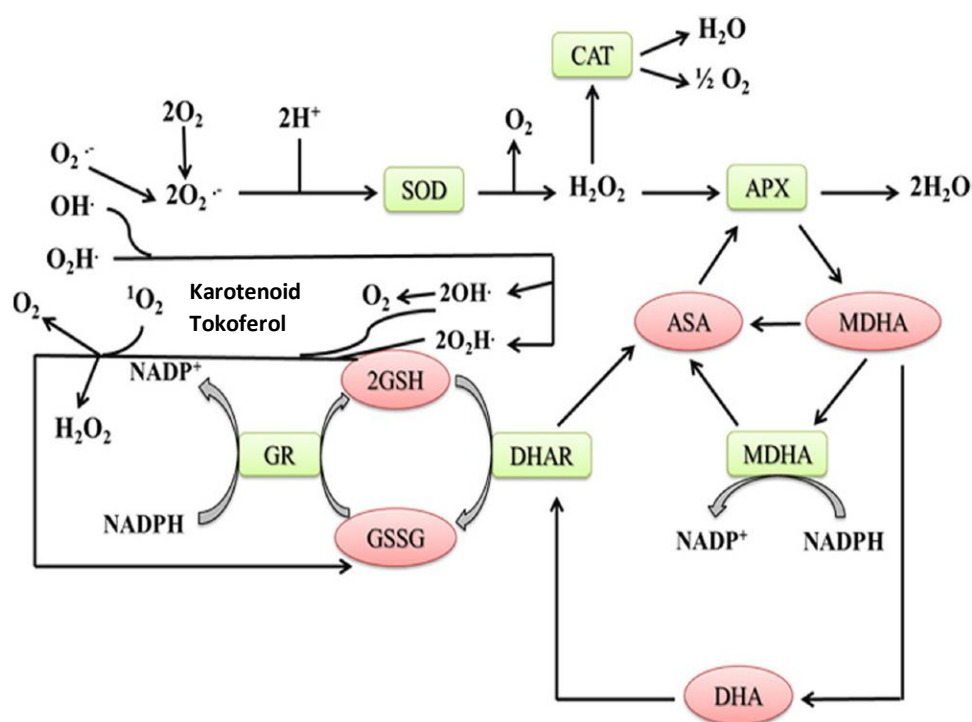
Peroksidacija lipida mijenja svojstva membrana smanjujući njihovu fluidnost i povećavajući njihovu propusnost, što dovodi do poremećaja organizacije i gubitka funkcije membrana. Osim toga, sekundarni proizvodi ovog procesa, poput aldehida, hidroksialdehida, ketona, cikličkih peroksida, epoksida i etera mogu uzrokovati oštećenje proteina ili DNA. Dobro poznati primjer takve reakcije je povezivanje proteina pomoću malondialdehida (MDA), koji se često koristi kao biomarker lipidne peroksidacije (Nowicka 2022).

1.5. Antioksidacijski sustav algi

U uvjetima bez stresa antioksidacijski obrambeni sustav pruža adekvatnu zaštitu od aktivnih vrsta O_2 i slobodnih radikala. Kao odgovor na povećanje oksidacijskog stresa, odnosno povećanje količine ROS, alge nužno povećavaju i kapacitet antioksidacijskog obrambenog sustava koji se sastoji od enzimskog i neenzimskog sustava (Rezayian i sur. 2019). Pojam „antioksidans“ odnosi se na spojeve koji štite stanice od oštećenja izazvanog izlaganjem određenim visoko reaktivnim spojevima, budući da može inhibirati oksidaciju drugih molekula (Bhaduri i Fulekar 2011).

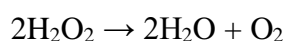
Alge primjenjuju dvije obrambene strategije u cilju smanjivanja oštećenja različitih staničnih komponenata uzrokovanih oblicima ROS (Slika 3). Prvi sustav obuhvaća antioksidacijske enzime, poput superoksid-dismutaze (SOD), glutation-reduktaze (GR), katalaze (engl. *catalase*

CAT), askorbat-peroksidaze (engl. *ascorbate peroxidase* APX) i pirogalol-peroksidaze (engl. *pyrogallol peroxidase* PPX), koji razgrađuju oblike ROS u manje štetne spojeve. SOD pretvara ROS u H₂O₂, dok CAT i GPX uklanjaju H₂O₂ u peroksisomima. Ravnoteža između aktivnosti ovih enzima ključna je za održavanje redoks homeostaze. Drugi sustav obuhvaća neenzimske spojeve niske molekulske mase poput askorbata, flavonoida, karotenoida, glutationa, tokoferola i fenola, koji neutraliziraju slobodne radikale i sprječavaju oksidacijska oštećenja biomolekula. Ovi spojevi djeluju kao dodatna zaštita uz enzimski sustav (Rezayian i sur. 2019).



Slika 3. Dva mehanizma obrane algi od molekula ROS, enzimski i neenzimski antioksidansi. ASC - askorbat, APX - askorbat peroksidaza, CAT - katalaza, DHA - dehidroaskorbat, GSH -glutation, GR - glutation reduktaza, GSSG - glutation disulfid, MDHA - monodehidroaskorbat, SOD - superoksid dismutaza, DHA - dehidroaskorbat reduktaza. Preuzeto i prilagođeno prema Rezayian i sur. (2019).

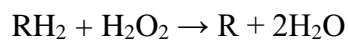
CAT je tetramerna oksidoreduktaza i vrlo važan enzim koji sadrži hem skupinu. CAT katalizira pretvorbu H₂O₂ u H₂O i O₂ prema reakciji:



Lokalizirana je u peroksisomima, a nalazi se u većini biljnih i životinjskih stanica. CAT ima izuzetno visoku katalitičku sposobnost te je posebno važan u uvjetima stresa kada dolazi do pojačanog stvaranja oblika ROS, budući da može razgraditi nekoliko milijuna molekula H₂O₂

u sekundi. Dodatno, CAT je najaktivnija tokom foto-respiracije i oksidacije masnih kiselina, a specifična je po tome što katalizira razgradnju H_2O_2 bez reducensa što znači da pruža stanici energetski učinkovit mehanizam za uklanjanje H_2O_2 (Bhaduri i Fulekar 2011). Kada su stanice pod velikim oksidacijskim stresom i brzo stvaraju H_2O_2 kroz kataboličke procese, ovakav način razgradnje rezultira neto dobitkom stanične energije (Mallick i Mohn 2000; Romero-Cruz i sur. 2024).

APX je hem-enzim prisutan u citosolu i kloroplastima biljaka i algi, gdje ima ključnu ulogu u neutralizaciji H_2O_2 . APX reducira H_2O_2 u H_2O koristeći askorbat kao donor elektrona, prema reakciji:



APX je enzim koji je izuzetno specifičan za H_2O_2 , omogućujući preciznu regulaciju oblika ROS u stanicama. Njegova uloga posebno dolazi do izražaja tijekom stresnih uvjeta, gdje APX osigurava održavanje ravnoteže između stvaranja i uklanjanja ROS, čime sprječava oksidacijska oštećenja staničnih komponenti (Romero-Cruz i sur. 2024; Reazayian i sur. 2019; Bhaduri i Fulekar 2011)

PPX je enzim koji koristi pirogalol kao supstrat za razgradnju H_2O_2 . Djelovanjem PPX smanjuje se razina H_2O_2 u stanici, čime se dodatno sprječavaju štetni učinci oksidacijskog stresa. Pirogalol, kao donor vodika, omogućuje provođenje ove reakcije te ima ključnu ulogu u obrambenim mehanizmima protiv oblika ROS (Keleş 1986).

1.6. Fotosintetski aparat algi

Fotosinteza je biokemijski proces u kojem autotrofni organizmi, poput biljaka i algi, koriste sunčevu svjetlost, vodu i CO_2 za sintezu organskih spojeva, prvenstveno ugljikohidrata. Ovo je temeljni proces za održavanje života na Zemlji jer omogućuje pretvaranje sunčeve energije u kemijsku energiju, pri čemu nastaje O_2 kao nusprodukt. Fotosinteza u eukariotskim organizmima odvija se unutar kloroplasta, specijaliziranih organela koje sadrže pigmentne i proteinske komplekse neophodne za ovaj proces. Fotosinteza se dijeli na dva glavna dijela: reakcije svjetla i Calvin-Bensonov ciklus. Reakcije svjetla odvijaju se u tilakoidnim membranama kloroplasta. U ovom dijelu procesa, svjetlosna energija apsorbira se pomoću fotosintetskih pigmenata, poput klorofila i karotenoida, koji djeluju kao antene za prikupljanje svjetlosti. PSI i PSII sadrže reakcijske centre gdje dolazi do pretvorbe svjetlosne energije u

kemijsku. PSII je prvi u nizu i odgovoran je za fotolizu vode, proces razgradnje molekula vode na elektrone, protone i O_2 . Oslobođeni elektroni ulaze u lanac prijenosa elektrona, dok se protoni koriste za stvaranje protonskog gradijenta. PSI preuzima elektrone iz lanca prijenosa i koristi ih za reduciranje $NADP^+$ u NADPH, molekulu koja skladišti energiju. Osim toga, protonski gradijent stvoren kroz prijenos elektrona koristi se za proizvodnju ATP-a putem ATP sintaze. Ove dvije molekule, NADPH i ATP, ključne su za sljedeći dio fotosinteze – Calvin-Bensonov ciklus. Calvin-Bensonov ciklus, koji se odvija u stromi kloroplasta, ključan je za fiksaciju CO_2 i njegovu pretvorbu u ugljikohidrate. Proces započinje djelovanjem enzima Rubisco, koji katalizira vezanje CO_2 na ribuloza-1,5-bisfosfat (RuBP), čime nastaju nestabilni međuprodukti koji se zatim kemijski preuređuju. U prvoj fazi, nazvanoj faza karboksilacije, CO_2 se veže na RuBP te nastaje 3-fosfoglicerat (3-PGA). Slijedi faza redukcije u kojoj se uz pomoć NADPH i ATP, 3-PGA reducira u gliceraldehid 3-fosfat (G3P). Na kraju dolazi faza regeneracije, tijekom koje se dio molekula G3P obnavlja u RuBP kako bi ciklus mogao započeti ispočetka, dok se ostatak koristi u sintezi ugljikohidrata koji organizmu služe kao izvor energije, ali i kao osnovne građevne jedinice za rast i razvoj (Ma i sur. 2023).

Fluorescencija klorofila predstavlja jednu od najčešće primjenjivanih tehnika u istraživanju fotosintetskih procesa, posebno zbog svoje neinvazivnosti i visoke osjetljivosti. Ova metoda se često koristi za analizu fotosinteze u algi jer omogućuje praćenje učinkovitosti fotokemijskih procesa u PSII. Kada PSII apsorbira svjetlost, molekule klorofila *a* prelaze u pobuđeno stanje. Energija iz tog pobuđenog stanja može se usmjeriti u tri smjera: na reakcijski centar za prijenos elektrona, raspršiti u obliku topline ili emitirati nazad kao fluorescencija. Zbroj energije raspodijeljene na ta tri procesa jednak je energiji apsorbirane svjetlosti.

Svaka promjena u fotokemijskim procesima utječe na fluorescencijski signal, čime se dobiva uvid u energetske dinamiku PSII. U uvjetima mraka, svi reakcijski centri PSII su u otvorenom stanju, što omogućuje maksimalnu fotokemijsku učinkovitost uz minimalan fluorescencijski prinos. Ovo osnovno stanje koristi se za praćenje i analizu promjena u fotosintetskim procesima tijekom izlaganja svjetlu, pružajući vrijedne informacije o adaptaciji i funkciji fotosintetskog aparata (Masojídek i sur. 2004).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Nanočestice srebra se zbog specifičnih kemijskih i fizičkih svojstava danas sve više koriste u raznim proizvodima. Kroz različite procese i direktnim otpuštanjem u okoliš, nanočestice se u sve većim koncentracijama mogu naći u vodenim staništima gdje dolaze u doticaj s algama. *C. vulgaris* je mikroalga koja se zbog velike stope rasta i vrlo dobre prilagodbe na okoliš sve više koristi kao modelni organizam u raznim istraživanjima te se fitotoksičan utjecaj nanočestica srebra na alge iscrpno istražuje zadnjih godina. Ova mikroalga ima i sposobnost prelaska s autotrofije na miksotrofiju koja potiče promjene u metabolizmu i fotosintetskom aparatu algi. Unatoč brojnim podacima o toksičnosti nanočestica srebra na mikroalge, nedostaju informacije o tome kako glukoza, kao izvor organskog ugljika, utječe na tu fitotoksičnost. Stoga je cilj ovog istraživanja odrediti utjecaj glukoze, dodane u hranjivu podlogu kao izvor organskog ugljika, na fitotoksični učinak nanočestica srebra (AgNP-citrat) u mikroalgi *C. vulgaris*. Utjecaj će se pratiti kroz parametre oksidacijskog stresa: određivanje sadržaja ukupnog ROS, koncentracije H₂O₂, stupnja lipidne peroksidacije i određivanje aktivnosti enzimskih sastavnica antioksidacijskog sustava (CAT, APX, PPX), te kroz parametre fotosinteze: određivanje stope fotosinteze, koncentracije fotosintetskih pigmenata (klorofila *a*, *b* i karotenoida), maksimalnog kvantnog prinosa i indeksa učinkovitosti fotosustava II (PSII).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Fikološki materijal

Kultura alge *C. vulgaris*, soj SAG/211-11b, korištena u ovom istraživanju je uzgojena u istraživačkom institutu *Experimentelle Phykologie und Sammlung von Algenkulturen* (EPSAG) Sveučilišta u Göttingenu (*Georg-August-Universität Göttingen*), Njemačka. Kultura je kultivirana na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.2. Nanočestice srebra

Nanočestice srebra dobivene su redukcijom srebrovog nitrata (AgNO_3) pomoću natrijevog citrata. Pripremljena je otopina AgNO_3 otapanjem 0,02 g AgNO_3 u 120 mL ultra-čiste vode. Otopina je zagrijavana do vrenja uz konstantno miješanje te je nakon vrenja u tikvicu dodano 5 mL 1% (*w/v*) otopine natrijeva citrata. Otopina je zagrijavana do promjene boje otopine iz prozirne u žutu kada je reakcija zaustavljena naglim hlađenjem mlazom vode (Komazec 2024). Laboratorijski sintetizirane nanočestice srebra veličine 50 nm pripremio je dr. sc. Bruno Komazec sa Zavoda za molekularnu biologiju, PMF Zagreb.

3.2. Metode

3.1.3. Kultura alge *C. vulgaris*

3.1.3.1. Uvjeti uzgoja kulture stanica

Kulture alge *C. vulgaris* nasadila sam na tekuću hranjivu podlogu BBM (engl. *Bold's Basal Medium*) (Tablica 1. i 2.) s dodatkom 0,5% (*w/v*) glukoze (BBM+) i bez glukoze (BBM-) koje sam koristila kao kontrolne skupine. Hranjive podloge BBM prethodno sam pripremila u autoklaviranim, sterilnim Erlenmeyerovim tikvicama volumena od 200 mL koje sam zatvorila vatom i aluminijskom folijom. Alge su rasle u komori za uzgoj biljaka koja je pod kontroliranim uvjetima dugog dana (16 sati svjetla te 8 sati mraka) na 24°C, pri intenzitetu svjetlosti od $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pri konstantnom miješanju na orbitalnoj miješalici. Kako bi bio osiguran dovoljan broj algi za eksperiment, kultura alge je održavana redovitim presađivanjem u svježoj tekućoj hranjivoj podlozi BBM svakih 14 dana.

Tablica 1. Sastav tekuće hranjive podloge BBM (pH 6,6) za uzgoj kultura alge *C. vulgaris*.

	Sastojak	Koncentracija matične vodene otopine (g L⁻¹)	Priprema matičnih otopina u 500 mL ultra- čiste vode (g)	Volumen matične otopine za 1 L hranjive podloge (mL)
1.	NaNO ₃	25,00	12,5	10
2.	CaCl ₂ (bezvodni)	1,89	0,945	10
3.	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,50	3,75	10
4.	K ₂ HPO ₄	7,50	3,75	10
5.	KH ₂ PO ₄	17,50	8,75	10
6.	NaCl	2,50	1,25	10
7.	otopina EDTA*	*	*	1
8.	otopina zakiseljenog željeza**	**	**	1
9.	H ₃ BO ₃	11,42	5,71	1
10.	metali u tragovima***	***	***	1
Provjeriti pH i po potrebi ga namjestiti na 6,6				

Tablica 2. Detaljan sastav matičnih otopina EDTA, zakiseljenog željeza i metala u tragovima, korištenih za pripremu tekuće hranjive BBM podloge za uzgoj kulture algi *C. vulgaris*

	Sastojak	Masa koju treba dodati u 1 L ultra-čiste vode (g)
Otopina EDTA*	EDTA	50
	KOH	31
Otopina zakiseljenog željeza**	FeSO ₄ x7H ₂ O	4,98
	H ₂ SO ₄ (96%)	1 mL
Otopina metala u tragovima***	ZnSO ₄ x7H ₂ O	8,82
	MnCl ₂ x4H ₂ O	1,44
	MoO ₂	0,71
	CuSO ₄ x5H ₂ O	1,57
	CoCl ₂ x6H ₂ O	0,49

3.1.3.2. Izrada krivulja rasta kulture alge *C. vulgaris*

Krivulju rasta kulture stanica alge *C. vulgaris* pratila sam brojanjem stanica na automatiziranom brojaču stanica (Luna II, Logos Biosystems) svaki dan u isto vrijeme kroz 30 dana kako bih odredila eksponencijalnu fazu rasta stanica u BBM+ i BBM- te prilagodila početne koncentracije algi koje sam stavljala na tekuće hranjive podloge kako bih u obje kontrole imala jednak broj stanica nakon četiri dana uzgoja. Za mjerenje broja stanica pomiješala sam 950 µL ultra-čiste vode i 50 µL kulture algi te korištenjem automatske pipete dodala po 11 µL razrijeđene otopine na predmetno stakalce koje sam nanijela na nosač za automatski brojač stanica Luna II. Kada sam odredila koncentraciju stanica algi u BBM+ i BBM- nakon četiri dana uzgoja (kada su stanice bile u eksponencijalnoj fazi) prilagodila sam početne koncentracije kulture algi koje sam dodavala u BBM+. Time sam osigurala jednak broj stanica nakon četiri dana u obje kontrolne skupine, odnosno jednak broj stanica u tekućoj hranjivoj podlozi BBM- i BBM+ što mi je omogućilo točnije određivanje učinka glukoze na kasniji tretman s AgNP.

3.1.3.3. Izlaganje kulture alge *C. vulgaris* tretmanu AgNP-citrat

Nakon četiri dana rasta kulture alge *C. vulgaris* u prethodno opisanim uvjetima i kada su alge bile u eksponencijalnoj fazi rasta te kada su stanice bile u istim koncentracijama u BBM+ i BBM-, tretirala sam ih nanočesticama srebra stabiliziranim citratom (AgNP-citrat) u koncentraciji koja omogućuju 60% preživljenja populacije tj. 40% smrtnosti (EC_{40} vrijednost). EC_{40} vrijednost je unaprijed određena korištenjem protočne citometrije s fluorescentnom bojom propidij jodid (engl. *propidium iodide*, PI) u eksperimentu koji je proveo komentor dr. sc. Bruno Komazec te je iznosila $0,251 \text{ mg L}^{-1}$. S obzirom da su alge uzgajane u 200 mL tekuće hranjive podloge BBM- kao i BBM+, nakon četiri dana uzgoja algi, u tekuće hranjive podloge dodala sam $504 \text{ }\mu\text{L}$ matične otopine AgNP-citrata. Kontrolne skupine kulture alge *C. vulgaris* sam uzgajala u podlozi BBM- i BBM+ bez dodatka AgNP. Tretman je trajao tri dana, odnosno 72 sata.

3.1.4. Određivanje sadržaja ROS

3.1.4.1. Fluorimetrijsko određivanje ukupnog sadržaja ROS

Za određivanje količine ukupnih različitih molekula ROS koristila sam dvije fluorescentne probe: dihidroetidij (DHE) i 2',7'- diklorohidrofluorescein diacetat (H_2DCFDA). Pripremila sam $20 \text{ }\mu\text{M}$ otopine DHE i H_2DCFDA te crnu mikrotitarsku pločicu i papir na kojem sam označila mjesta na koja sam stavila pojedine uzorke: kontrolne skupine algi tretirane na hranjivim podlogama bez (Kontrola -Glu) i s glukozom (Kontrola +Glu) te tretirane skupine algi na hranjivim podlogama bez (AgNP -Glu) i s glukozom (AgNP +Glu). Na pločicu sam zatim nanijela po $100 \text{ }\mu\text{L}$ stanične suspenzije algi u zadanom redoslijedu, a u prvih šest jažica sam stavila slijepu probu, odnosno $100 \text{ }\mu\text{L}$ ultra-čiste vode. Na uzorke sam zatim dodala po $80 \text{ }\mu\text{L}$ $20 \text{ }\mu\text{M}$ DHE ili $20 \text{ }\mu\text{M}$ H_2DCFDA otopine i promiješala sadržaje svih jažica. Stanice sam prije samog mjerenja inkubirala u mraku 30 minuta. Za pobudu fluorescentnih probi i mjerenje fluorescencije u uzorcima sam koristila čitač mikrotitarskih pločica Glo-Max (Promega, Madison, WI, SAD). DHE sam pobudila svjetlošću valne duljine 520 nm , a fluorescenciju izmjerila na valnoj duljini od 600 nm , dok sam za pobudu i mjerenje fluorescencije H_2DCFDA koristila valne duljine od 504 nm i 550 nm . Rezultate sam prikazala kao postotak sadržaja ROS u kontroli, a prikazani su kao srednja vrijednost šest replika po skupini (Kontrola (-Glu), AgNP (-Glu), Kontrola (+Glu) i AgNP (+Glu)).

3.1.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja H₂O₂

Za određivanje količine sadržaja H₂O₂ koristila sam modificirani protokol (Mátai i Hideg 2017). Prvo sam izmjerila koncentracije stanica u suspenzijama (Kontrola (-Glu), AgNP (-Glu), Kontrola (+Glu) i AgNP (+Glu)), kao što je opisano u poglavlju 3.2.1.2. Zatim sam centrifugirala ukupan volumen od 200 mL suspenzija algi pri 3500 × g na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta. Nakon toga sam isprala talog s ultra-čistom vodom te ga ponovno centrifugirala pri istim uvjetima. Postupak sam ponovila tri puta. Dobiveni talog sam zatim resuspendirala u 500 µL 70%-tnog (v/v) etanola i dodala 0,083 g silika kuglica (veličine 425-600 µm) te sam uzorke homogenizirala u prethodno ohlađenim nosačima na uređaju za homogenizaciju Retsch MM200 na frekvenciji od 30 Hz tri puta po četiri minute. Između homogenizacija sam na jednu minutu stavila uzorke i nosač na -20 °C kako bi uzorci konstantno bili na hladnom. Nakon homogenizacije uzorke sam centrifugirala 10 minuta pri 15000 × g na temperaturi od +4 °C. Prebacila sam supernatant u čiste 1,5 mL epruvete te uzorke držala u mraku na ledu. Prije mjerenja pripremila sam reagens FOX (eng. *ferrous oxidation-xylenol orange*): otopila sam 4,75 mg ksilenol orange-a i 0,9105 g sorbitola u 25 mL ultra-čiste vode. U pripremljenu otopinu dodala sam 0,5 mL amonijeva željezo (II) sulfata sekstahidrata ((NH₄)₂Fe(SO₄)₂ × 6H₂O) otopljenog u 2,5 M sumpornoj kiselini te nadopunila vodom do 50 mL. U 1000 µL reagensa FOX dodala sam 100 µL staničnog ekstrakta te inkubirala sadržaj u kiveti 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon toga, apsorbanciju sam izmjerila na valnoj duljini od 560 nm. Ukupni sadržaj H₂O₂ sam izračunala koristeći baždarnu krivulju otopina poznatih koncentracija H₂O₂ od 1,82 do 72,8 µM. Za slijepu probu sam koristila 1000 µL reagensa FOX i 100 µL 70%-tnog etanola. Rezultate sam izrazila kao µmol H₂O₂ po 10⁶ stanica te sam ih prikazala kao srednju vrijednost 6 replika.

3.1.5. Određivanje stupnja lipidne peroksidacije

Stupanj lipidne peroksidacije u stanicama algi nakon tretmana s AgNP-citrat odredila sam mjerenjem sadržaja MDA korištenjem metode koju su opisali Heath i Packer (1968). Prvo sam izmjerila koncentracije stanica u suspenzijama (Kontrola (-Glu), AgNP (-Glu), Kontrola (+Glu) i AgNP (+Glu)) kao što je opisano u poglavlju 3.2.1.2. Kulture alge uzgajane u 200 mL centrifugirala sam pri 3500 × g na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta. Nakon toga sam ispirala talog tri puta s ultra-čistom vodom, a između svakog ispiranja sam centrifugirala stanice pod istim uvjetima. Dobiveni talog nakon zadnjeg centrifugiranja sam resuspendirala u 700 µL 0,5%-tne (w/v) 2-tiobarbituratne kiseline (engl. *thiobarbituric acid* TBA) pripremljene u 20%-tnoj (w/v) trikloroacetoj kiseline (engl. *trichloroacetic acid* TCA) i dodala 0,083 g

silikatnih kuglica (veličine 425-600 μm). Stanice sam tada homogenizirala u prethodno ohlađenim nosačima na uređaju za homogenizaciju Retsch MM200 na frekvenciji od 30 Hz u trajanju od 12 minuta. Homogenate sam inkubirala 30 minuta na +95 °C. Kao kontrolne uzorke koristila sam dvije slijepe probe (1 mL čiste 0,05%-tne (*w/v*) TBA pripremljene u 20%-tnoj (*w/v*) TCA). Nakon prve inkubacije sve uzorke i slijepe probe sam inkubirala dvije minute na ledu kako bih zaustavila reakcije. Zatim sam uzorke centrifugirala 30 minuta pri $14000 \times g$ na +4 °C. Supernatante sam prebacila u kivete i izmjerila apsorbancije na valnim duljinama 532 nm i 600 nm. Od vrijednosti dobivene na valnoj duljini od 532 nm oduzela sam vrijednost apsorbancije na valnoj duljini od 600 nm kako bih napravila korekciju za nespecifično zamućenje. Stupanj lipidne peroksidacije sam izrazila kao ukupan sadržaj MDA u nmol produkta po broju stanica [$\mu\text{mol}_{\text{MDA}}/\text{broj stanica}$] prema jednadžbi:

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

oznake:

A_{532} – apsorbancija uzorka na valnoj duljini 532 nm

A_{600} – apsorbancija uzorka na valnoj duljini 600 nm

ε – molarni apsorpcijski koeficijent ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

V – volumen uzorka (0,7 mL)

l – duljina optičkog puta zrake svjetlosti (1 cm)

n – koncentracija stanica u suspenziji

Rezultate stupnja lipidne peroksidacije tj. rezultat sadržaja MDA sam izrazila kao postotak kontrolnih stanica gdje je kontrola predstavljala 100%. Rezultate sam izrazila kao srednju vrijednost šest replika po skupini (Kontrola (-Glu), AgNP (-Glu), Kontrola (+Glu) i AgNP (+Glu)).

3.1.6. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima

3.1.6.1. Ekstrakcija ukupnih topivih proteina

Za ekstrakciju ukupnih topivih proteina centrifugirala sam 200 mL suspenzije stanica algi (Kontrola (-Glu), AgNP (-Glu), Kontrola (+Glu) i AgNP (+Glu)) pri $3500 \times g$ na sobnoj temperaturi u trajanju od 7 minuta. Talog sam zatim ispirala tri puta ultra-čistom vodom te sam nakon svakog ispiranja ponovno centrifugirala pod istim uvjetima. Nakon ispiranja sam talog resuspendirala u 500 μL ultra-čiste vode i prebacila ga u nove 1,5 mL epruvete i centrifugirala

pri $3500 \times g$ na sobnoj temperaturi 3 minute. Nakon toga sam uklonila supernatant, a talog sam ponovno resuspendirala u $500 \mu\text{L}$ $0,1 \text{ M}$ kalij-fosfatnog pufera (pH 7) te sam dodala $0,83 \text{ g}$ silikatnih kuglica (veličine $425 - 600 \mu\text{m}$). Suspenziju stanica algi sam zatim homogenizirala u hladnim nosačima pomoću uređaja za homogenizaciju Retsch MM200, na 30 Hz u trajanju od po tri puta po četiri minute na temperaturi od $+4 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon svake tri minute homogenizacije, nosače i uzorke sam hladila na ledu po jednu minutu kako bi uzorci bili konstantno ohlađeni. Nakon homogenizacije, homogenate sam centrifugirala 15 minuta pri $20000 \times g$ na temperaturi od $+4 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon toga sam supernatant prebacila u čiste epruvete od $1,5 \text{ mL}$ te ih ponovno centrifugirala pod istim uvjetima u trajanju od 45 minuta. Nakon centrifugiranja odvojila sam supernatant i uzorke pohranila na temperaturu od -20°C za daljnje analize. Ekstrakte proteina sam koristila za određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima CAT, APX i PPX.

3.1.6.2. Određivanje aktivnosti CAT

Aktivnost enzima CAT sam mjerila spektrofotometrijski prateći brzinu katalitičke razgradnje H_2O_2 , prema unaprijed modificiranom protokolu (Aebi 1984). Prvo sam pripremila reakcijsku smjesu; u 50 mL 50 mM $0,1 \text{ M}$ kalij fosfatnog pufera (pH 7) sam dodala $51 \mu\text{L}$ H_2O_2 . $30 \mu\text{L}$ proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.2.4.2.) sam pomiješala s $970 \mu\text{L}$ reakcijske smjese. Za slijepu probu sam pomiješala $950 \mu\text{L}$ reakcijske smjese s $50 \mu\text{L}$ $0,1 \text{ M}$ kalij fosfatnog pufera (pH 7). Promjenu apsorbancije sam mjerila svakih deset sekundi tijekom jedne minute na valnoj duljini od 240 nm . Zatim sam izračunala aktivnost enzima CAT u proteinskim ekstraktima prema jednadžbi:

$$CAT = \frac{\Delta A \times 6 \times V_{rs} \times F.R.}{V_{uz} \times \varepsilon \times l \times c}$$

oznake:

ΔA – Srednja vrijednost promjene apsorbancije tokom 10 sekundi na valnoj duljini 240 nm

6 – faktor korekcije ΔA za izražavanje rezultata u minuti

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

F.R. – faktor razrjeđenja uzorka (1)

V_{uz} – volumen uzorka ($0,33 \text{ mL}$)

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

l – duljina optičkog puta zrake svjetlosti (1 cm)

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

Rezultate sam prikazala kao μmol utrošenog H_2O_2 po minuti po mg proteina [$\mu\text{mol}_{\text{H}_2\text{O}_2} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{proteina}}$]. Rezultate sam izrazila kao srednju vrijednost šest replika po skupini (Kontrola (-Glu), AgNP (-Glu), Kontrola (+Glu) i AgNP (+Glu)).

3.1.6.3. Određivanje aktivnosti APX

Aktivnost enzima APX sam mjerila prateći smanjenje apsorbancije u reakciji askorbata i H_2O_2 , prema unaprijed modificiranom protokolu (Nakano i Asada 1981). Pripremila sam reakcijsku smjesu koja se sastoji od sljedećih komponenti: 800 μL 50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7) s dodanim 10 mM EDTA, 180 μL proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.2.4.2.), 10 μL 10 mM askorbinske kiseline i 10 μL 12 mM H_2O_2 . Za slijepu probu sam umjesto proteinskog ekstrakta u smjesu dodala 180 μL 0,1 M kalij fosfatnog pufera (pH 7). Apsorbancije sam mjerila svakih 15 sekundi u trajanju od minute na valnoj duljini od 290 nm. Zatim sam aktivnost enzima APX izračunala prema jednadžbi:

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

oznake:

ΔA – Srednja vrijednost promjene apsorbancije tokom 15 sekundi na valnoj duljini 290 nm

4 – faktor korekcije ΔA za izražavanje rezultata u minuti

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

F.R. – faktor razrjeđenja uzorka (1)

V_{uz} – volumen uzorka (0,18 mL)

ε – molarni apsorpcijski koeficijent askorbata ($42,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l – duljina optičkog puta zrake svjetlosti (1 cm)

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

Rezultate sam prikazala kao μmol oksidiranog askorbata po minuti po mg proteina [$\mu\text{mol}_{\text{oksidirani askorbat}} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{proteina}}$]. Rezultate sam izrazila kao srednju vrijednost šest replika po skupini (Kontrola (-Glu), AgNP (-Glu), Kontrola (+Glu) i AgNP (+Glu)).

3.1.6.4. Određivanje aktivnosti PPX

Aktivnost enzima PPX sam mjerila prateći porast apsorbancije zbog oksidacije pirogalola dodatkom H_2O_2 , prema unaprijed modificiranom protokolu (Nakano i Asada 1891). Pripremila sam reakcijsku smjesu; pripremila sam 20 mM pirogalol u 50 mL 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7) te dodala 5,5 μL 30% H_2O_2 . Pirogalol je osjetljiv na svjetlo te sam zbog toga reakcijsku

smjesu držala u mraku obloženu aluminijskom folijom. U 980 μL reakcijske smjese sam dodala 20 μL proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.2.4.2.). Za slijepu probu sam dodala 20 μL 0,1 M kalij fosfatnog pufera (pH 7) umjesto proteinskog ekstrakta. Apsorbancije sam mjerila svakih 15 sekundi u trajanju od jedne minute na valnoj duljini od 430 nm. Zatim sam aktivnost enzima PPX izračunala prema jednadžbi:

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

oznake:

ΔA – Srednja vrijednost promjene apsorbancije tokom 15 sekundi na valnoj duljini 430 nm

4 – faktor korekcije ΔA za izražavanje rezultata u minuti

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

F.R. – faktor razrjeđenja uzorka (1)

V_{uz} – volumen uzorka (0,02 mL)

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

l – duljina optičkog puta zrake svjetlosti (1 cm)

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

Rezultate sam prikazala kao μmol purpurogalina po minuti po mg proteina [$\mu\text{mol}_{\text{purpurogalin}} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}_{\text{proteina}}$]. Rezultate sam izrazila kao srednju vrijednost šest replika po skupini (Kontrola (-Glu), AgNP (-Glu), Kontrola (+Glu) i AgNP (+Glu)).

3.1.7. Učinak na mehanizme fotosinteze

3.1.7.1. Određivanje stope fotosinteze

Za određivanje stope fotosinteze prvo sam izmjerila koncentracije stanica u suspenzijama ((Kontrola (-Glu), AgNP (-Glu), Kontrola (+Glu) i AgNP (+Glu)) kao što je opisano u poglavlju 3.2.1.2. te sam koristila uređaj Chlorolab 2 (Hansatech, UK). 1,5 mL kulture alge sam stavila u reakcijsku posudu u uređaju te sam pratila količinu nastalog O_2 tokom konstantnog miješanja od 30 okretaja u minuti na temperaturi od $+30 \text{ }^\circ\text{C}$ pri intenzitetu svjetlosti od $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Između perioda osvjetljavanja suspenzije algi, inkubirala sam ih u mraku po 5 minuta. Dobiveni podaci su prikazivali količinu oslobođenog O_2 . Izračunala sam vrijednosti stope fotosinteze u sekundi te sam ih izrazila kao nmol O_2 u jednom satu po 10^6 stanica algi [$\text{nmol}_{\text{O}_2} \text{ h}^{-1} (10^6 \text{ stanica})^{-1}$]. Rezultate sam izrazila kao srednju vrijednost šest replika po skupini (Kontrola (-Glu), AgNP (-Glu), Kontrola (+Glu) i AgNP (+Glu)).

3.1.7.2. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja fotosintetskih pigmenata klorofila *a* i *b* te karotenoida

Za određivanje koncentracija fotosintetskih pigmenata klorofila *a* i *b* te karotenoida, prvo sam izmjerila koncentracije stanica u suspenzijama (Kontrola (-Glu), AgNP (-Glu), Kontrola (+Glu) i AgNP (+Glu)) kao što je opisano u poglavlju 3.2.1.2. S obzirom na koncentracije stanica, u čiste epruvete od 1,5 mL sam prebacila potreban volumen staničnih suspenzija koje imaju po $7,5 \times 10^6$ stanica. Izolirala sam pigmente prema unaprijed modificiranom protokolu (Schumann i sur. 2005). Uzorke sam centrifugirala pet minuta pri $3500 \times g$ i uklonila supernatant. Nakon toga sam talog ispirala tri puta ultra-čistom vodom, a između svakog ispiranja sam ponovno centrifugirala stanice pod istim uvjetima. Posljednje dobiveni talog sam resuspendirala u $800 \mu\text{L}$ ohlađenog 90%-tnog acetona te sam dodala 0,083 g silika kuglica (veličine 425 – 600 μm). Stanice sam zatim homogenizirala u prethodno ohlađenim nosačima na uređaju za homogenizaciju Retsch MM200 na frekvenciji od 30 Hz u trajanju od četiri minute. Nakon homogenizacije sam uzorke ponovno centrifugirala 5 minuta pri $3500 \times g$ na temperaturi od $+4 \text{ }^\circ\text{C}$. Supernatant sam odvojila i spremila u zatamnjenu epruvetu od 2,0 mL te ih čuvala na $+4 \text{ }^\circ\text{C}$. Talog sam resuspendirala u $500 \mu\text{L}$ ohlađenog 90%-tnog acetona te ga ponovno homogenizirala i centrifugirala pod istim uvjetima. Supernatante sam spojila, a talog po treći put resuspendirala u $500 \mu\text{L}$ ohlađenog acetona te ih homogenizirala i centrifugirala pod istim uvjetima. Sva tri supernatanta sam spojila te nadopunila epruvetu s ohlađenim 90%-tnim acetonom do 2 mL. Apsorbancije uzoraka sam mjerila na valnim duljinama od 647, 664 i 470 nm. Koncentracije fotosintetskih pigmenata klorofila *a* i *b* te karotenoida sam izračunala prema prethodno opisanim formulama (Jeffrey i Humphrey 1975) (Dere i sur. 1998).

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

$$c(\text{chl } b) = 20,63 \times A_{647} - 5,50 \times A_{664}$$

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

oznake:

A_{470} – vrijednost apsorbancije na 470 nm

A_{664} – vrijednost apsorbancije na 664 nm

A_{647} – vrijednost apsorbancije na 647 nm

Rezultate sam prikazala kao μg klorofila *a* ili *b* (10^6 stanica)⁻¹ ili μg karotenoida (10^6 stanica)⁻¹. Rezultate sam izrazila kao srednju vrijednost šest replika po skupini (Kontrola (-Glu), AgNP (-Glu), Kontrola (+Glu) i AgNP (+Glu)).

3.1.7.3. Određivanje parametara fluorescencije klorofila *a*

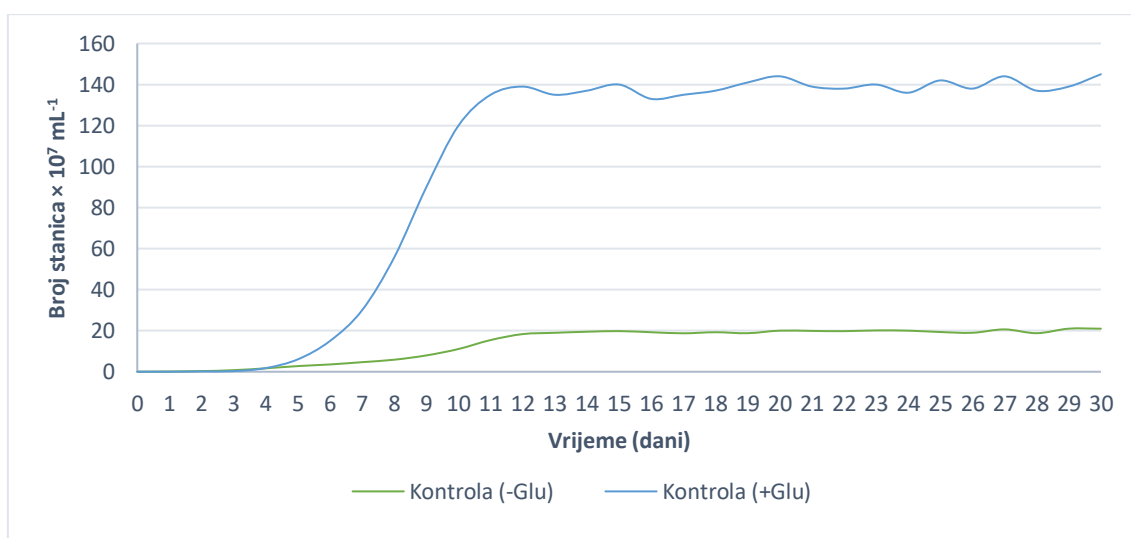
Za određivanje maksimalnog kvantnog prinosa fotosustava II (PSII) (F_v/F_m) i indeksa učinkovitosti PSII (PI_{abs}), prvo sam izmjerila koncentracije stanica u suspenzijama (Kontrola (-Glu), AgNP (-Glu), Kontrola (+Glu) i AgNP (+Glu)) kao što je opisano u poglavlju 3.2.1.2. Nakon toga sam suspenzije algi inkubirala sat vremena u mraku kako bi se PSII oksidirao. U tom vremenu su se i mehanizmi nefotokemijskog gašenja ugasili. Pripremila sam kivetu na uređaju AquaPen (Photon Systems Instruments, Češka) te sam u svaku kivetu dodala po 3 mL suspenzije. Zatim sam pokrenula mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* pri super pulsu jačine 53%, OJIP testom fluorescencije klorofila *a*. Pripremu uzoraka sam izvodila u mraku kako se ne bi mogle pokrenuti reakcije na tilakoidnim membranama algi. Rezultate sam očitala na programu FluorPen ver 1.1.1.3. (Photon System Instruments, Češka). Izrazila sam ih kao omjer varijabilne i maksimalne fluorescencije prilagođene uvjetima tame (F_v/F_m) i kao arbitrarne jedinice učinkovitosti PSII (PI_{abs}). Rezultate sam izrazila kao srednju vrijednost šest replika po skupini (Kontrola (-Glu), AgNP (-Glu), Kontrola (+Glu) i AgNP (+Glu)).

4. REZULTATI

4.1. Krivulje rasta kulture alge *Chlorella vulgaris* sa i bez dodatka glukoze

Za praćenje rasta alge *C. vulgaris* i izrade krivulja rasta alge na tekućoj hranjivoj podlozi BBM- i BBM+, prvo sam inokulirala 1×10^5 stanica mL^{-1} u tekuću hranjivu BBM- podlogu u sterilnim Erlenmeyerovim tikvicama (Slika 4). Nakon tri dana zabilježen je početak eksponencijalnog rasta, a stanice algi su ušle u stacionarnu fazu 12. od dana nasađivanja s koncentracijom od otprilike $1,90 \times 10^7$ stanica mL^{-1} .

Četvrti dan od dana inokulacije, broj stanica algi bio je $1,67 \times 10^6$ stanica mL^{-1} u podlozi BBM-. Kako bi rezultate svih daljnjih testova na podlogama s dodatkom glukoze i bez glukoze mogli međusobno uspoređivati, rast algi na BBM+ podlozi usklađen je s onim na BBM-. Naime, na BBM+ podlogu inokulirala sam $3,35 \times 10^4$ stanica mL^{-1} tako da su četvrtog dana rasta dosegle koncentraciju od otprilike $1,67 \times 10^6$ stanica mL^{-1} , što je jednako koncentraciji stanica u BBM-. Analizom krivulje rasta algi uzgajanih na BBM+ podlozi uočava se da su one također ušle u eksponencijalnu fazu nakon tri dana, koja se nastavlja do 12. dana, kada je koncentracija dosegla otprilike $1,39 \times 10^8$ stanica mL^{-1} . Kulturu stanica algi nakon četiri dana rasta na obje podloge izložila sam tretmanu s AgNP-citrat u konačnoj koncentraciji od $0,251 \text{ mg L}^{-1}$, u trajanju od 72 sata, čime se cijeli tretman odvijao tijekom eksponencijalne faze rasta. Općenito, alge uzgajane na podlozi BBM+ pokazale su brži i intenzivniji rast.

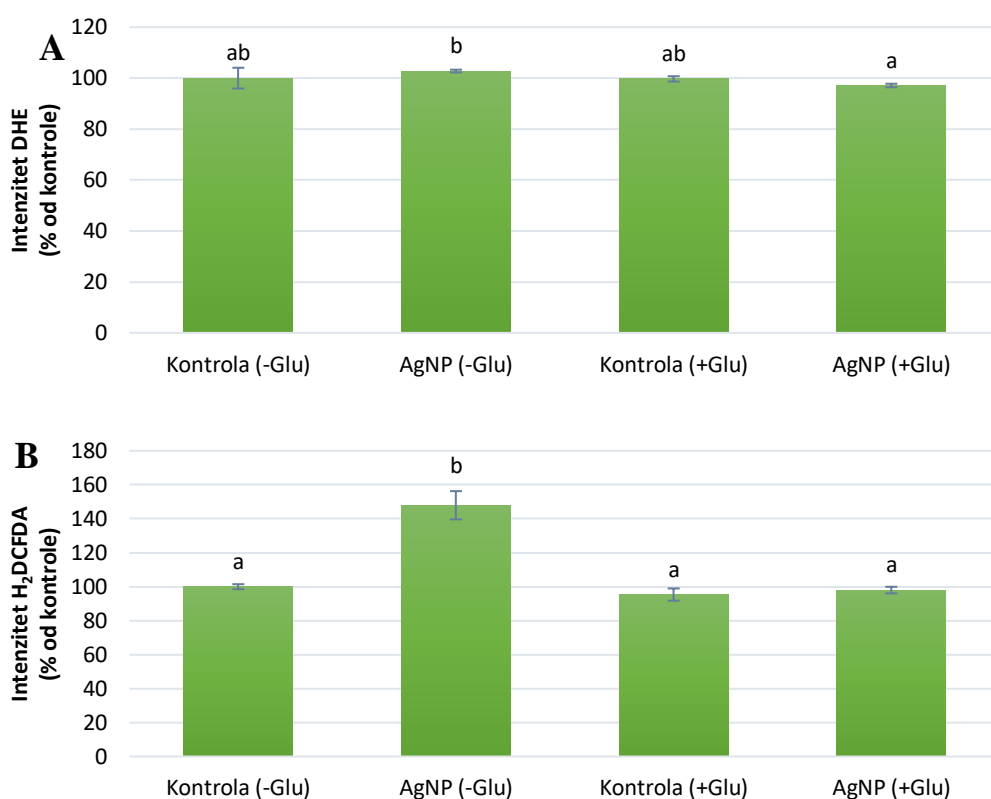


Slika 4. Krivulje rasta slatkovodne alge *C. vulgaris*, na tekućim hranjivim podlogama BBM- i BBM+, dobivene brojanjem stanica pomoću automatiziranog brojača stanica (Luna II, Logos Biosystems) svaki dan u isto vrijeme kroz 30 dana. Broj za svaki dan predstavlja srednju vrijednost broja stanica od tri replike.

4.2. ROS

4.2.1. Sadržaj ukupnog ROS

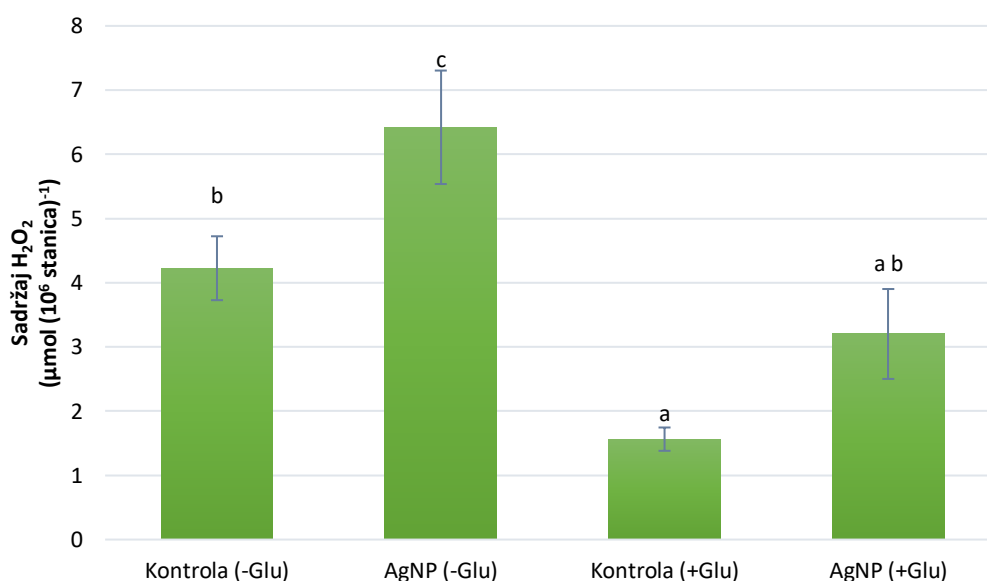
Sadržaj ROS pratila sam pomoću fluorescentnih boja dihidroetidija (DHE) i diacetatnog 2,7-diklorodihidrofluoresceina (H₂DCFDA) (Slika 5). Primjenom probe DHE nije utvrđena značajna razlika u sadržaju ROS nakon AgNP (-Glu) u odnosu na kontrolu (-Glu) te nakon AgNP (+Glu) u odnosu na kontrolu (+Glu). Međutim, tretman AgNP (-Glu) uzrokovao je povećanje sadržaja ROS u odnosu na AgNP (+Glu). Sličan obrazac dobiven je korištenjem probe H₂DCFDA, pri čemu je jedino tretman AgNP (-Glu) uzrokovao značajno povećanje sadržaja ROS u odnosu na kontrolu (-Glu) te u odnosu na ostale tretmane. Svi ostali tretmani pokazali su slične vrijednosti bez značajnih razlika.



Slika 5. Sadržaj ukupnog ROS u kontrolnim stanicama algi *C. vulgaris* uzgojenih na podlogama bez glukoze [kontrola (-Glu)] i s glukozom [kontrola (+Glu)] te u stanicama tretiranih 72 sata s AgNP-citrat (koncentracija 0,251 mg L⁻¹ koja omogućuje preživljenje stanica od 60%) uzgojenih na podlogama bez glukoze [AgNP (-Glu)] i s glukozom [AgNP (+Glu)] određen korištenjem fluorescentnih proba: (A) dihidroetidijem (DHE) i (B) diacetat 2,7-diklorodihidrofluoresceinom (H₂DCFDA). Vrijednosti prikazuju srednju vrijednost ± standardna pogreška iz jednog eksperimenta sa šest replika. Različitim slovima su označeni stupci koji se statistički značajno razlikuju (p ≤ 0.05, jednosmjerni ANOVA test uz Newman–Keuls post hoc test).

4.2.2. Sadržaj H₂O₂

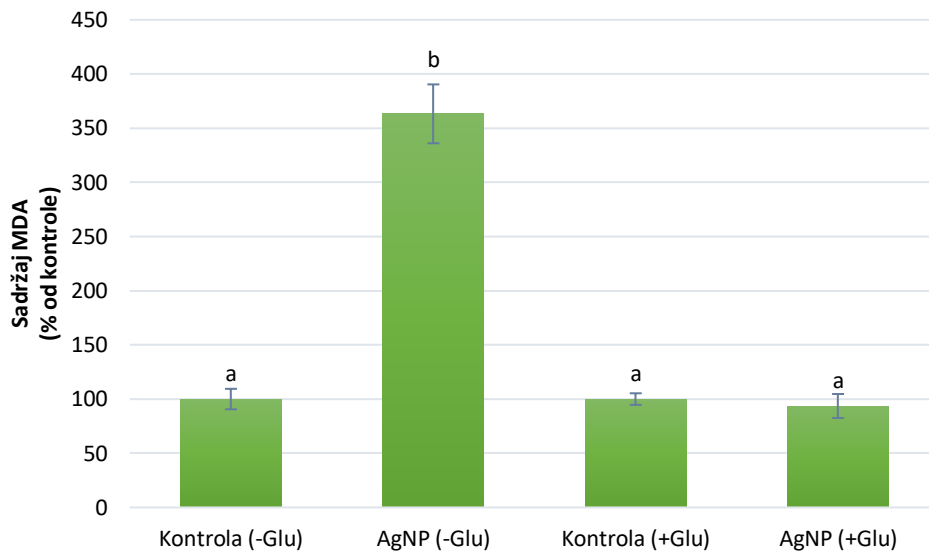
Statistički značajno povećanje količine sadržaja H₂O₂ se vidi nakon AgNP (-Glu) u odnosu na kontrolu (-Glu) (Slika 6). U AgNP (+Glu) se također vidi povećanje sadržaja H₂O₂ u odnosu na kontrolu (+Glu), iako ono nije bilo statistički značajno. U oba slučaja je došlo do povećanja količine ukupnog H₂O₂ nakon tretmana, ali postoji statistički značajna razlika između AgNP (-Glu) i AgNP (+Glu) gdje je nakon AgNP (-Glu) značajno veći porast u količini H₂O₂.



Slika 6. Sadržaj ukupnog H₂O₂ u kontrolnim stanicama algi *C. vulgaris* uzgojenih na podlogama bez glukoze [kontrola (-Glu)] i s glukozom [kontrola (+Glu)] te u stanicama tretiranih 72 sata s AgNP-citrat (koncentracija 0,251 mg L⁻¹ koja omogućuje preživljenje stanica od 60%) uzgojenih na podlogama bez glukoze [AgNP (-Glu)] i s glukozom [AgNP (+Glu)]. Vrijednosti prikazuju srednju vrijednost ± standardna pogreška iz jednog eksperimenta sa šest replika. Različitim slovima su označeni stupci koji se statistički značajno razlikuju ($p \leq 0.05$, jednosmjerni ANOVA test uz Newman–Keuls post hoc test).

4.3. Stupanj lipidne peroksidacije

Nakon tretmana AgNP (-Glu) zabilježen je značajan porast (260%) u sadržaju MDA u odnosu na kontrolu (-Glu) (Slika 7). Nakon AgNP (+Glu) došlo je do blagog smanjenja sadržaja MDA u odnosu na kontrolu (+Glu), iako ono nije bilo statistički značajno. Veći učinak na porast sadržaja MDA u stanicama algi je uzrokovao tretman AgNP (-Glu) u odnosu na tretman AgNP (+Glu).

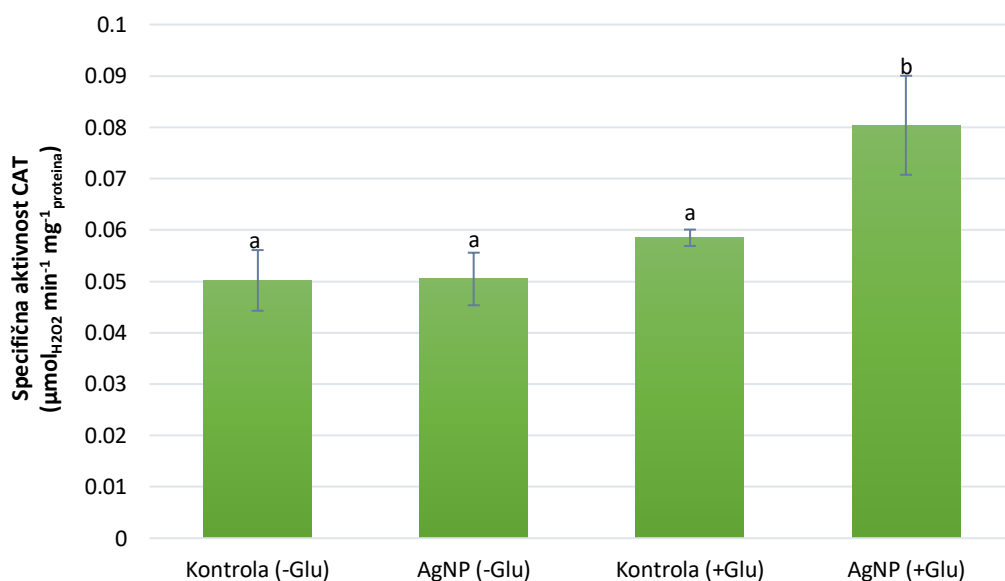


Slika 7. Sadržaj ukupnog malondialdehida (MDA) u kontrolnim stanicama algi *C. vulgaris* uzgojenih na podlogama bez glukoze [kontrola (-Glu)] i s glukozom [kontrola (+Glu)] te u stanicama tretiranih 72 sata s AgNP-citrat (koncentracija 0,251 mg L⁻¹ koja omogućuje preživljenje stanica od 60%) uzgojenih na podlogama bez glukoze [AgNP (-Glu)] i s glukozom [AgNP (+Glu)]. Vrijednosti prikazuju srednju vrijednost ± standardna pogreška iz jednog eksperimenta sa šest replika. Različitim slovima su označeni stupci koji se statistički značajno razlikuju ($p \leq 0.05$, jednosmjerni ANOVA test uz Newman–Keuls post hoc test).

4.4. Aktivnost antioksidacijskih enzima

4.4.1. Aktivnost CAT

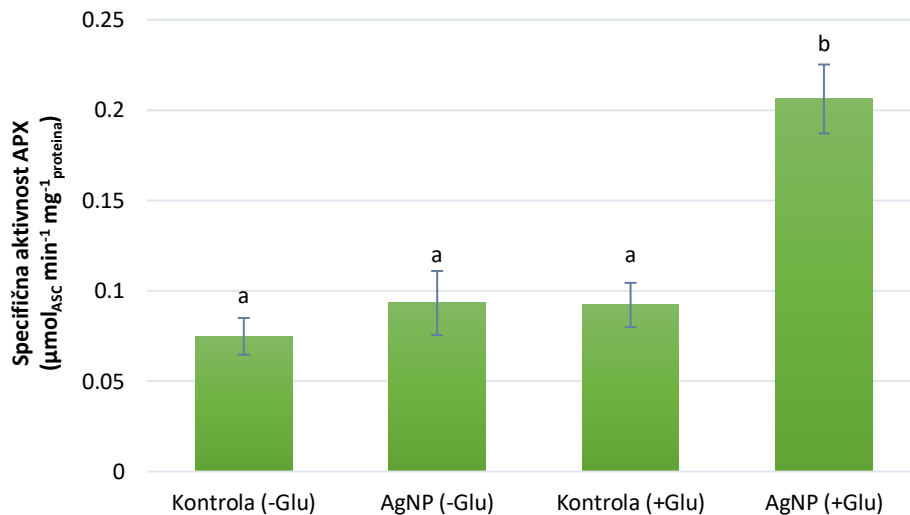
Tretman AgNP (-Glu) nije izazvao statistički značajnu promjenu aktivnosti enzima CAT u odnosu na kontrolu (-Glu) (Slika 8). S druge strane, tretman AgNP (+Glu) je izazvao značajno i najveće povećanje aktivnosti enzima CAT u odnosu na kontrolu (+Glu), ali i na tretman AgNP (-Glu). Blago povećanje aktivnosti se vidi u kontroli (+Glu) u usporedbi s kontrolom (-Glu), iako ono nije bilo statistički značajno.



Slika 8. Aktivnost antioksidacijskog enzima katalaze (CAT) u kontrolnim stanicama algi *C. vulgaris* uzgojenih na podlogama bez glukoze [kontrola (-Glu)] i s glukozom [kontrola (+Glu)] te u stanicama tretiranih 72 sata s AgNP-citrat (koncentracija $0,251 \text{ mg L}^{-1}$ koja omogućuje preživljenje stanica od 60%) uzgojenih na podlogama bez glukoze [AgNP (-Glu)] i s glukozom [AgNP (+Glu)]. Vrijednosti prikazuju srednju vrijednost \pm standardna pogreška iz jednog eksperimenta sa šest replika. Različitim slovima su označeni stupci koji se statistički značajno razlikuju ($p \leq 0.05$, jednosmjerni ANOVA test uz Newman–Keuls post hoc test).

4.4.2. Aktivnost APX

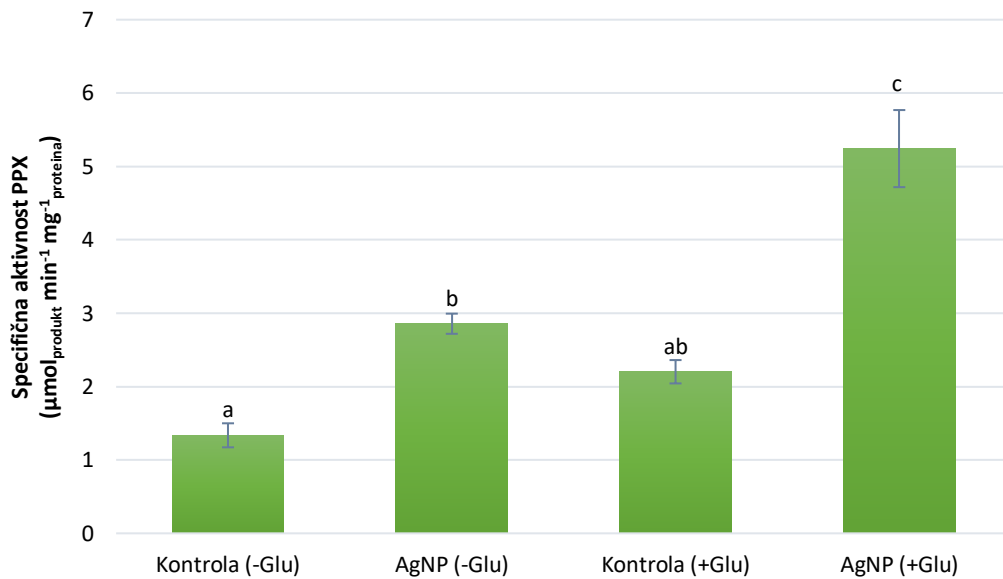
Tretman AgNP (-Glu) je izazvao blago, ali ne statistički značajno povećanje aktivnosti enzima APX u odnosu na kontrolu (-Glu) (Slika 9). S druge strane, tretman AgNP (+Glu) je izazvao značajno i najveće povećanje aktivnosti enzima APX u odnosu na kontrolu (+Glu), ali i na tretman AgNP (-Glu).



Slika 9. Aktivnost antioksidacijskog enzima APX u kontrolnim stanicama algi *C. vulgaris* uzgojenih na podlogama bez glukoze [kontrola (-Glu)] i s glukozom [kontrola (+Glu)] te u stanicama tretiranih 72 sata s AgNP-citrat (koncentracija $0,251 \text{ mg L}^{-1}$ koja omogućuje preživljenje stanica od 60%) uzgojenih na podlogama bez glukoze [AgNP (-Glu)] i s glukozom [AgNP (+Glu)]. Vrijednosti prikazuju srednju vrijednost \pm standardna pogreška iz jednog eksperimenta sa šest replika. Različitim slovima su označeni stupci koji se statistički značajno razlikuju ($p \leq 0.05$, jednosmjerni ANOVA test uz Newman–Keuls post hoc test).

4.4.3. Aktivnost PPX

Statistički značajno povećanje aktivnosti enzima PPX može se uočiti nakon tretmana AgNP (-Glu) u odnosu na kontrolu (-Glu), ali i nakon tretmana AgNP (+Glu) u odnosu na kontrolu (+Glu) (Slika 10). Između oba tretmana, najveće povećanje aktivnosti enzima PPX zabilježeno je nakon tretmana AgNP (+Glu).

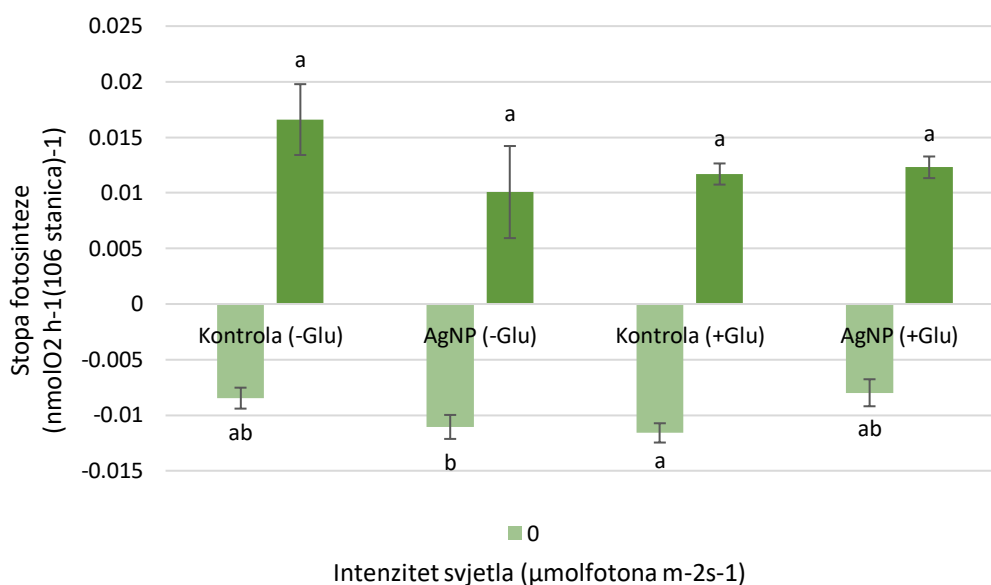


Slika 10. Aktivnost antioksidacijskog enzima PPX u kontrolnim stanicama algi *C. vulgaris* uzgojenih na podlogama bez glukoze [kontrola (-Glu)] i s glukozom [kontrola (+Glu)] te u stanicama tretiranih 72 sata s AgNP-citrat (koncentracija $0,251 \text{ mg L}^{-1}$ koja omogućuje preživljenje stanica od 60%) uzgojenih na podlogama bez glukoze [AgNP (-Glu)] i s glukozom [AgNP (+Glu)]. Vrijednosti prikazuju srednju vrijednost \pm standardna pogreška iz jednog eksperimenta sa šest replika. Različitim slovima su označeni stupci koji se statistički značajno razlikuju ($p \leq 0.05$, jednosmjerni ANOVA test uz Newman–Keuls post hoc test).

4.5. Učinak na mehanizme fotosinteze

4.5.1. Stopa fotosinteze

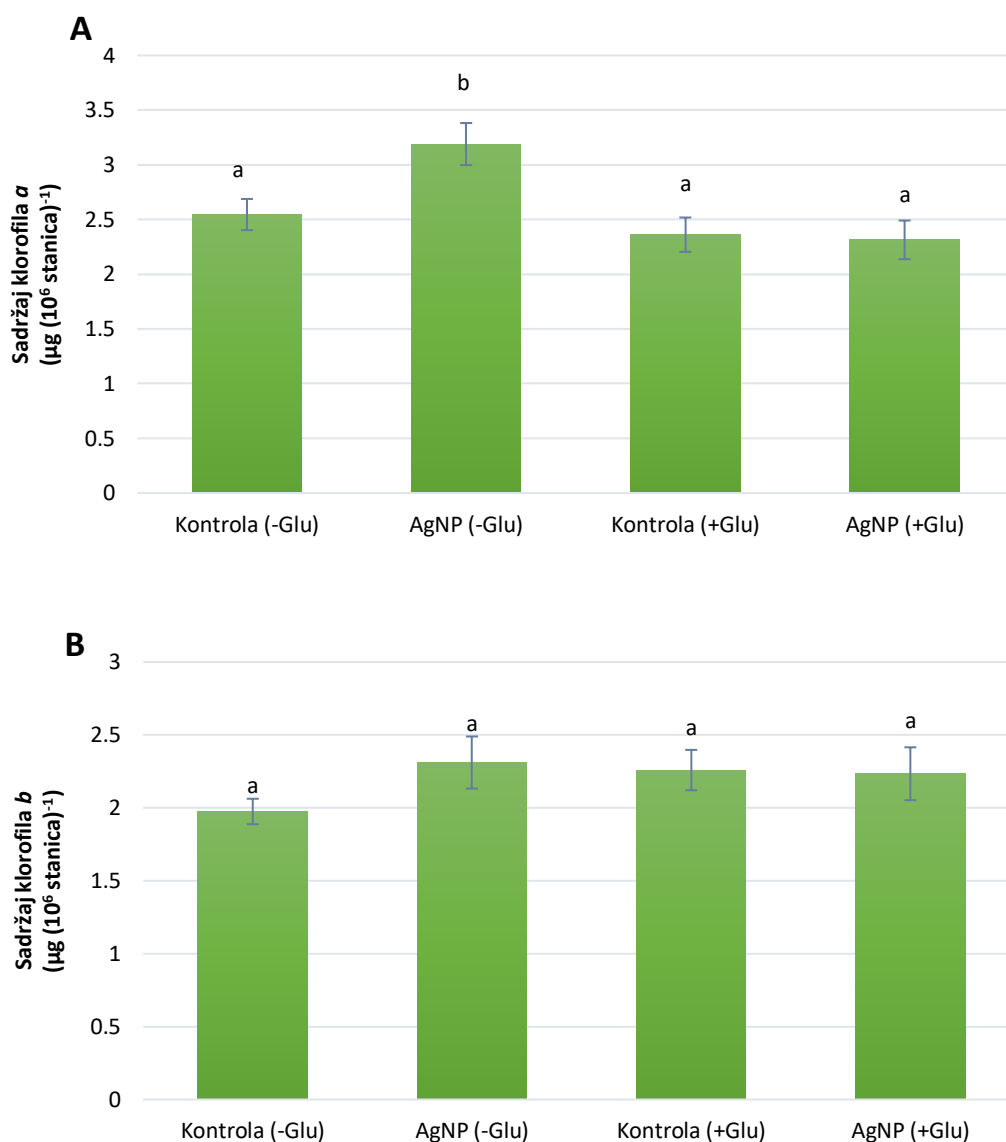
Niti jedan tretman nije izazvao statistički značajnu promjenu u stopi fotosinteze u odnosu na pripadajuće kontrole (Slika 11). Tretman AgNP (-Glu) je izazvao blago smanjenje u odnosu na kontrolu (-Glu) i na tretman AgNP (+Glu).



Slika 11. Stopa fotosinteze u kontrolnim stanicama algi *C. vulgaris* uzgojenih na podlogama bez glukoze [kontrola (-Glu)] i s glukozom [kontrola (+Glu)] te u stanicama tretiranih 72 sata s AgNP-citrat (koncentracija 0,251 mg L⁻¹ koja omogućuje preživljenje stanica od 60%) uzgojenih na podlogama bez glukoze [AgNP (-Glu)] i s glukozom [AgNP(+Glu)]. Vrijednosti prikazuju srednju vrijednost ± standardna pogreška od tri replike. Različitim slovima su označeni stupci koji se statistički značajno razlikuju ($p \leq 0.05$, jednosmjerni ANOVA test uz Newman–Keuls post hoc test).

4.5.2. Sadržaj fotosintetskih pigmenta klorofila *a* i *b*

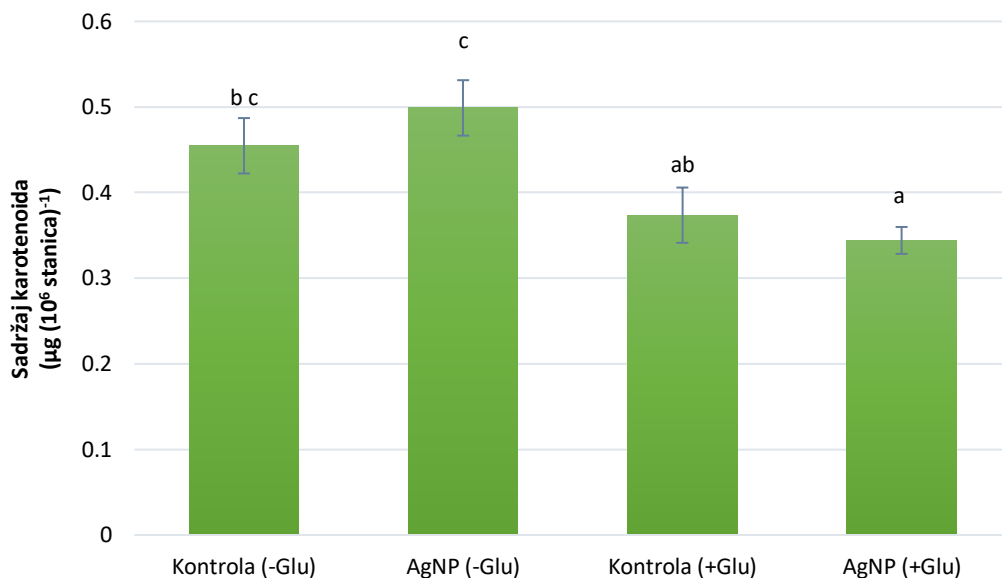
Tretman AgNP (-Glu) je izazvao značajno povećanje sadržaja klorofila *a* u odnosu na kontrolu (-Glu) (Slika 12. A). S druge strane, količina klorofila *a* se nije promijenila nakon tretmana AgNP (+Glu) u odnosu na kontrolu (+Glu). Nakon AgNP (-Glu) došlo je do blagog porasta u sadržaju klorofila *b* u odnosu na kontrolu (-Glu), dok AgNP (+Glu) nije izazvao promjenu u sadržaju klorofila *b* u odnosu na kontrolu (+Glu). Tretman AgNP (-Glu) je izazvao najveće povećanje sadržaja klorofila *a* i *b* u odnosu na AgNP (+Glu) i kontrole (Slika 12. B).



Slika 12. Sadržaj klorofila *a* (A) i *b* (B) u kontrolnim stanicama algi *C. vulgaris* uzgojenih na podlogama bez glukoze [kontrola (-Glu)] i s glukozom [kontrola (+Glu)] te u stanicama tretiranih 72 sata s AgNP-citrat (koncentracija 0,251 mg L⁻¹ koja omogućuje preživljenje stanica od 60%) uzgojenih na podlogama bez glukoze [AgNP(-Glu)] i sa glukozom [AgNP(+Glu)]. Vrijednosti prikazuju srednju vrijednost ± standardna pogreška iz jednog eksperimenta sa šest replika. Različitim slovima su označeni stupci koji se statistički značajno razlikuju ($p \leq 0.05$, jednosmjerni ANOVA test uz Newman–Keuls post hoc test).

4.5.3. Sadržaj karotenoida

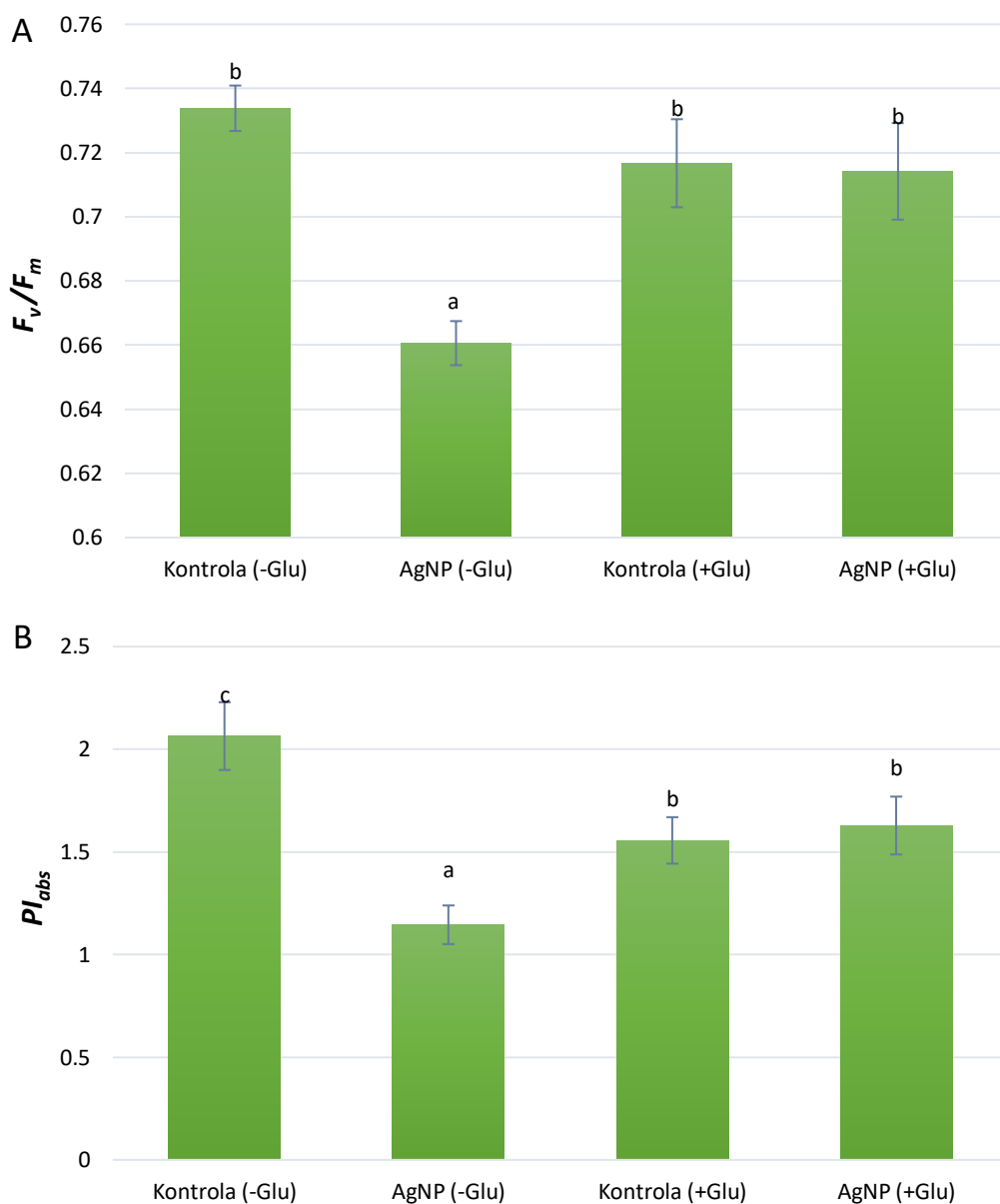
Blagi porast u sadržaju karotenoida se može primijetiti nakon tretmana AgNP (-Glu) u odnosu na kontrolu (-Glu), iako navedeno povećanje nije statistički značajno (Slika 13). S druge strane, tretman AgNP (+Glu) je izazvao blago, iako ne statistički značajno smanjenje sadržaja karotenoida u odnosu na kontrolu (+Glu). U odnosu na AgNP (+Glu), AgNP (-Glu) je izazvao najveću promjenu, odnosno povećanje sadržaja karotenoida.



Slika 13. Sadržaj karotenoida u kontrolnim stanicama algi *C. vulgaris* uzgojenih na podlogama bez glukoze [kontrola(-Glu)] i s glukozom [kontrola (+Glu)] te u stanicama tretiranih 72 sata s AgNP-citrat (koncentracija 0,251 mg L⁻¹ koja omogućuje preživljenje stanica od 60%) uzgojenih na podlogama bez glukoze [AgNP (-Glu)] i s glukozom [AgNP (+Glu)]. Vrijednosti prikazuju srednju vrijednost ± standardna pogreška iz jednog eksperimenta sa šest replika. Različitim slovima su označeni stupci koji se statistički značajno razlikuju ($p \leq 0.05$, jednosmjerni ANOVA test uz Newman–Keuls post hoc test).

4.5.4. Fluorescencija klorofila *a*

Maksimalni kvantni prinos PSII (F_v/F_m) značajno se smanjio nakon AgNP (-Glu) u odnosu na kontrolu (-Glu), ali i u odnosu na AgNP (+Glu) i kontrolu (+Glu). S druge strane, između kontrole (+Glu) i AgNP (+Glu) nema značajne razlike u vrijednosti F_v/F_m (Slika 14. A). Sličan trend je uočen i mjerenjem indeksa učinkovitosti fotosinteze (PI_{abs}), koji se također značajno smanjio nakon AgNP (-Glu) u odnosu na kontrolu (-Glu) i u odnosu na AgNP (+Glu) i kontrolu (+Glu). Tretman AgNP (+Glu) nije izazvao značajne razlike u vrijednosti PI_{abs} u odnosu na kontrolu (+Glu).



Slika 14. Maksimalni kvantni prinos fotosustava II (PSII) (F_v/F_m) (A) i indeksa učinkovitosti PSII (PI_{abs}) (B) u kontrolnim stanicama algi *C. vulgaris* uzgojenih na podlogama bez glukoze [kontrola (-Glu)] i s glukozom [kontrola (+Glu)] te u stanicama tretiranih 72 sata s AgNP-citrat (koncentracija $0,251 \text{ mg L}^{-1}$ koja omogućuje preživljenje stanica od 60%) uzgojenih na podlogama bez glukoze [AgNP (-Glu)] i s glukozom [AgNP(+Glu)]. Vrijednosti prikazuju srednju vrijednost \pm standardna pogreška iz jednog eksperimenta sa šest replika. Različitim slovima su označeni stupci koji se statistički značajno razlikuju ($p \leq 0.05$, jednosmjerni ANOVA test uz Newman–Keuls post hoc test).

5. RASPRAVA

Nanočestice srebra se danas zbog svojih specifičnih fizikalnih i kemijskih svojstava sve više koriste u mnogim proizvodima te se zbog toga njihova koncentracija povećava u vodenim ekosustavima djelujući negativno na organizme koji se tamo nalaze. Takve koncentracije AgNP uzrokuju oksidacijski stres tj. prekomjernu proizvodnju ROS u stanicama vodenih organizama.

Većina istraživanja toksičnosti AgNP na slatkovodne alge do danas se fokusirala na morfološke promjene na algama, promjene u fotosintezi te na akumulaciju samoga srebra u stanicama algi (Romero i sur. 2020; Mariano i sur. 2020; Afkar i sur. 2010; Dash i sur. 2012) međutim, sve je veći broj istraživanja koja se bave stvaranjem prekomjernih količina ROS i antioksidacijskom obranom algi od istih (He i sur. 2012; Lekamge i sur. 2020). U algama, ROS se stvara u kloroplastima, peroksisomima, citosolu i mitohondriju kao nusprodukt reakcija fotosinteze i staničnog disanja. Do povećanja koncentracije ROS u algama dolazi djelovanjem okolišnih stresora, kao što su AgNP (Rezayian i sur. 2019). Kako bih odredila utjecaj glukoze na sadržaj oblika ROS pod utjecajem AgNP na algu *C. vulgaris*, koristila sam dvije fluorescentne probe: DHE i H₂DCFDA koje se koriste kao indikatori za ukupan sadržaj ROS i O₂^{•-}. H₂DCFDA je fluorescentna proba koja se u stanicama deacetilira te u prisutnosti ROS oksidira i prelazi u fluorescentni spoj te tako pokazuje sadržaj ukupnog ROS (Ng i Ooi 2021). Jača fluorescencija znači veći sadržaj ROS. Rezultati ovog istraživanja pokazuju, kao i u prijašnjim istraživanjima na algama, da se sadržaj ukupnog ROS povećao dodatkom AgNP (-Glu) u odnosu na kontrolu (-Glu) (Hazeem i sur. 2019; Lekamge i sur. 2020; Shanab i sur. 2019; Zhao i sur. 2020). Međutim, nakon tretmana s AgNP (+Glu) u odnosu na kontrolu (+Glu) došlo je do blagog smanjenja sadržaja ROS, što upućuje na to da uz dodatan izvor hrane alga može uspješno održavati antioksidacijski sustav aktivan u borbi protiv molekula ROS.

Što se tiče dokazivanja ukupnog sadržaja O₂^{•-}, koristila sam fluorescentnu probu DHE koja oksidira u stanicama i postaje fluorescentna (Ng i Ooi 2021). Koristeći probu DHE izmjerila sam statistički značajno povećanje sadržaja O₂^{•-} nakon tretmana AgNP (-Glu) u odnosu na kontrolu (-Glu), što se slaže sa rezultatima istraživanja Hazeem i sur. (2019) koji su također kao rezultat dobili povišen sadržaj ROS nakon izlaganja alge *C. vulgaris* s AgNP. Dodatno, u mom istraživanju, tretman AgNP (+Glu) je značajno smanjio sadržaj O₂^{•-} u odnosu na AgNP (-Glu), dok su koncentracije O₂^{•-} u kontroli (+Glu) kao i AgNP (+Glu) ostale podjednake, što ponovno ukazuje na mogućnost održavanja antioksidacijskog sustava aktivnim u borbi s povećanjem koncentracije ROS, kada je u podlozi prisutna glukoza. S obzirom da sam uzorke

uzimala treći dan nakon tretmana, postoji mogućnost da je na početku tretmana došlo do značajnijeg povećanja ROS, ali je antioksidacijski sustav brzo počeo djelovati. Rezultati analize ukupnog sadržaja H₂O₂ su u korelaciji su s rezultatima analize ukupnog sadržaja O₂^{•-}.

Nakon AgNP (-Glu) došlo je do porasta koncentracije H₂O₂ u odnosu na AgNP (+Glu) i pripadajuće kontrole, što se ponovno slaže s rezultatima drugih istraživača (Komazec i sur. 2023). Dodatkom glukoze u hranjive podloge smanjila se koncentracija H₂O₂ što se može objasniti time da je glukoza dodatan izvor energije za algu koja tu energiju može koristiti u obrani od oksidacijskog stresa.

Jedan od štetnih učinaka ROS je peroksidacija lipida u staničnim membranama. U algama koje su izložene oksidacijskom stresu, ovaj proces može dovesti do nepovratnih oštećenja. Stupanj lipidne peroksidacije odredila sam spektrofotometrijskim mjerenjem sadržaja MDA, citotoksičnog produkta koji ireverzibilno oštećuje proteine i molekule DNA (Vavilin i sur. 1998; Rezayian i sur. 2019). Budući da ROS oštećuju lipide u različitim staničnim strukturama, dosadašnja istraživanja o utjecaju AgNP na alge pokazala su da povećana razina molekula ROS u stanicama dovodi do većeg stupnja lipidne peroksidacije (Oukarroum i sur., 2012; Rezayian i sur., 2019; Shanab i sur., 2019; Zhao i sur., 2020). Ti rezultati su u skladu s podacima ovog istraživanja, gdje sam nakon izlaganja algi AgNP (-Glu) izmjerila statistički značajno povećanje sadržaja MDA, odnosno peroksidacije lipida u usporedbi s kontrolom (-Glu). Međutim, između kontrole (+Glu) i AgNP (+Glu) nisam zabilježila značajne razlike u koncentraciji MDA u odnosu na kontrolu (-Glu) što ponovno upućuje na moguću ublažavajući učinak glukoze, kao izvora energije u stanicama algi, na oksidacijski stres uzrokovan AgNP.

Kao odgovor na fitotoksičnost AgNP, alge imaju širok spektar strategija obrane, između ostalog aktiviraju antioksidacijski sustav obrane kako bi eliminirale višak nastalih molekula ROS (Romero i sur. 2020). Nakon tretmana AgNP (-Glu) nije zabilježeno povećanje specifične aktivnosti katalaze (CAT) u stanicama algi u odnosu na kontrolu (-Glu). Mogući razlozi za izostanak povećanja aktivnosti enzima uključuju promjene u regulaciji gena za CAT, koje mogu biti posljedica oštećenja DNA (Cameron i sur., 2018) ili vezanje enzima CAT na površinu AgNP, što dovodi do oštećenja jedinice hema unutar enzima i posljedične inhibicije njegove aktivnosti (Liu i sur., 2020b). S druge strane, u kontroli (+Glu) je došlo do blagog porasta aktivnosti CAT u odnosu na kontrolu (-Glu), a u AgNP (+Glu) do statistički značajnog porasta aktivnosti enzima u odnosu na kontrolu (+Glu). Lekamge i sur. (2020) su proveli istraživanje utjecaja AgNP na algu *Raphidocelis subcapitata* te su dobili slične rezultate u kojima je došlo

do povećanja aktivnosti CAT nakon izlaganja alge višim koncentracijama AgNP (0.8 mg L^{-1}), dok pri manjim koncentracijama ($<0,2 \text{ mg L}^{-1}$) nije došlo do značajne promjene aktivnosti u odnosu na kontrolu. Povećanje aktivnosti CAT može se objasniti rezultatima sadržaja ROS, koji pokazuju da je antioksidacijska obrana mikroalgi učinkovitija u prisutnosti glukoze, vjerojatno zbog veće dostupnosti energije. Osim toga, statistički značajan porast aktivnosti CAT u uzorku AgNP (+Glu) sugerira da su AgNP potaknule antioksidacijski odgovor, vjerojatno inducirajući oksidacijski stres koji aktivira obrambene mehanizme stanice.

APX je najzastupljeniji antioksidacijski enzim koji regulira razine ROS u raznim staničnim dijelovima (Kalehjahi i sur. 2023). Dodatkom glukoze u hranjivu podlogu došlo je do blagog povećanja aktivnosti APX u kontroli (+Glu) u odnosu na kontrolu (-Glu). Nadalje, nakon tretmana AgNP (-Glu) došlo je do blagog porasta aktivnosti u odnosu na kontrolu (-Glu) što je u skladu s prijašnjim istraživanjima (Zhao i sur. 2020), dok je nakon tretmana AgNP (+Glu) izmjereno statistički značajno povećanje aktivnosti APX. Što se tiče antioksidacijskog enzima PPX, koji također sudjeluje u suzbijanju H_2O_2 koristeći pirogalol kao supstrat (Keleş 1986), dobila sam vrlo slične rezultate kao i za APX. Nakon tretmana AgNP (-Glu) povećala se aktivnost enzima u odnosu na kontrolu (-Glu) što je vjerojatni rezultat toksičnog učinka AgNP na stanice *C. vulgaris* i povećanja sadržaja ROS (Zhao i sur. 2020; Bahador i sur. 2019). U kontroli (+Glu) je također je uzmjerna blago povećana aktivnost enzima PPX u odnosu na kontrolu (-Glu), a dodatkom AgNP (+Glu) došlo je do statistički značajnog povećanja aktivnosti enzima PPX. S obzirom na to da oba enzima suzbijaju H_2O_2 , rezultati aktivnosti enzima APX i PPX mogu se povezati sa sadržajem H_2O_2 i utjecajem glukoze u hranjivoj podlozi. Nakon tretmana AgNP (+Glu) zabilježeno je značajno smanjenje koncentracije H_2O_2 u odnosu na AgNP (-Glu), što upućuje na učinkovitiju detoksifikaciju peroksida u prisutnosti glukoze. Također, povećana aktivnost antioksidacijskih enzima u kontroli (+Glu) i AgNP (+Glu) u skladu je s rezultatima sadržaja ROS, što sugerira da je obrana od oksidacijskog stresa stabilnija i učinkovitija nakon dodatka glukoze u hranjivu podlogu.

Fotosinteza ima ključnu ulogu u vodenim ekosustavima, budući da mikroalge, zajedno s cijanobakterijama, proizvode oko 50 % ukupnog O_2 u atmosferi, što ih čini neophodnima za globalni ciklus ugljika i održavanje ravnoteže O_2 . Stoga je svako smanjenje fotosintetske aktivnosti mikroalgi potencijalno značajan ekološki problem. U ovom istraživanju izmjeren je pad stope fotosinteze nakon tretmana AgNP (-Glu) u odnosu na kontrolu (-Glu), što je u skladu s prethodnim istraživanjima o učinku nanočestica na fotosintetsku aktivnost algi: *C. vulgaris* (Romero i sur. 2020), *Euglena gracilis* (Li i sur. 2015) i *Chlamydomonas reinhardtii* (Navarro

i sur. 2015; Zhan i sur. 2024). Smanjenje stope fotosinteze i sposobnosti fiksiranja ugljika povezano je s negativnim utjecajem AgNP (Liu i sur., 2020a). Naime, AgNP ometa fotosintetski proces povećanjem ukupnog sadržaja ROS te poticanjem lipidne peroksidacije, koja zahvaća sve stanične membrane, uključujući tilakoidne membrane, gdje se odvija fotosinteza (Dash i sur., 2012; Mariano i sur., 2020; Kalehjahi i sur., 2023). Nadalje, izmjeren je pad stope fotosinteze u kontroli (+Glu) i nakon tretmana AgNP (+Glu) u odnosu na kontrolu (-Glu), no zabilježen je i blagi porast u odnosu na tretman AgNP (-Glu). S obzirom na to da mikroalga u kontroli (-Glu) nije imala dodatak glukoze na hranjivoj podlozi, stopa fotosinteze je ostala visoka, vjerojatno jer je mikroalga koristila fotosintezu za proizvodnju hrane potrebne za preživljavanje. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjima Yan i sur. (2024), koji su istraživali utjecaj natrijevog acetata kao izvora ugljika na mikroalgu *C. vulgaris*, pri čemu je zabilježeno povećanje aktivnosti enzima Rubisco i time povećana asimilacija ugljika u algama na podlogama obogaćenim natrijevim acetatom. Dobiveni rezultati su u skladu s podacima o sadržaju ROS, jer alga na podlozi bez glukoze mora stvarati više hrane kako bi preživjela, a time i usmjeriti više energije na fotosintezu, zbog čega nije u mogućnosti adekvatno se obraniti od negativnih utjecaja oblika ROS. S druge strane, iako je stopa fotosinteze bila viša nakon AgNP(+Glu) u odnosu na AgNP(-Glu) u odnosu na kontrolu (-Glu) je bila niža, što sugerira da mikroalge, uz dodatak glukoze, mogu smanjiti stopu fotosinteze i usmjeriti energiju na obranu od ROS.

Fotosintetski pigmenti su često pouzdani pokazatelji toksičnosti u algama (Kalehjahi i sur. 2023). U ovom istraživanju izmjerila sam porast koncentracije klorofila *a* nakon tretmana AgNP (-Glu) u odnosu na kontrolu (-Glu). Prijašnja istraživanja su pokazala da se sadržaj fotosintetskih pigmenata, poput klorofila *a* i *b* može povećati nakon izlaganja nepovoljnim uvjetima kao što je izlaganje mikroalge AgNP, a razlog tomu je potreba za povećanim stvaranjem energije putem fotosinteze (Hazeem i sur. 2019). Dobiveni rezultat je u skladu s izmjerenim višim sadržajem H_2O_2 i $O_2^{\bullet-}$ na podlozi bez glukoze, jer veći sadržaj oblika ROS može dovesti do smanjenja stope fotosinteze u stanicama algi. Naime, alge u takvim uvjetima mogu kompenzirati smanjenje fotosinteze kao izvora energije povećanjem koncentracije fotosintetskih pigmenata, poput klorofila, što im omogućuje bolje iskorištavanje dostupne svjetlosti i povećanje učinkovitosti fotosintetskog procesa. Budući da povećanje sadržaja pigmenata zahtijeva dodatnu energiju i resurse koje alge možda neće moći osigurati u uvjetima oksidacijskog stresa, ovaj odgovor na stres može biti ograničen. Nadalje, moguće objašnjenje za povećanje koncentracije klorofila *a* se nalazi u tome što je prvi korak u razgradnji klorofila

b njegova pretvorba u klorofil *a*. S obzirom na to da ROS oštećuju klorofil, dio klorofila *b* može se pretvoriti u klorofil *a*, što rezultira povećanjem količine klorofila *a* u stanicama (Romero i sur. 2020). U istraživanju koje su proveli Romero i sur. (2020), zabilježeno je povećanje sadržaja klorofila *a* i *b* u algi *C. vulgaris* pri početnim koncentracijama AgNP od 90 – 720 $\mu\text{g L}^{-1}$. Međutim, s povećanjem koncentracija AgNP i produljenjem vremena tretmana, sadržaj klorofila u stanicama se smanjio, vjerojatno zbog većeg oštećenja pigmenta uzrokovanog višim sadržajem oblika ROS te inhibicije transporta elektrona u reakcijskim središtima. Sličan eksperiment proveli su Sendra i sur. (2017) na algama *C. vulgaris* i *C. reinhardtii*, gdje je također zabilježen gubitak klorofila *a* i *b* nakon izlaganja AgNP. U navedenom istraživanju korištene su AgNP manjeg promjera (<2 nm i <15 nm), čiji toksični učinak može biti jači zbog njihove veće reaktivnosti. Navedeni rezultati upućuju da sadržaj klorofila u stanicama algi ovisi o koncentraciji AgNP i vremenu tretmana. Sadržaji klorofila *a* nakon AgNP (+Glu) i u kontroli (+Glu) su bili podjednaki s kontrolom (-Glu), ali niži od sadržaja nakon AgNP (-Glu). Analizom rezultata sadržaja klorofila *b* dobiveni su slični rezultati kao i za klorofil *a*. Sadržaj klorofila *b* blago se povećao nakon tretmana AgNP (-Glu) u odnosu na kontrolu (-Glu). Ovi rezultati su u skladu s podacima o stopi fotosinteze, gdje je nakon AgNP (-Glu) izmjerena najniža stopa fotosinteze. Povećani sadržaj klorofila *b* mogao bi biti kompenzacija za smanjenje stope fotosinteze, s obzirom na to da pigmenti prikupljaju svjetlost kao izvor energije (Hazeem i sur. 2019). Sadržaj klorofila *b* u kontroli (+Glu) i tretmanu AgNP (+Glu) bio je podjednak, ali za razliku od klorofila *a*, kod klorofila *b* svi su rezultati bili slični te nije došlo do statistički značajnih razlika među sadržajem klorofila između tretmana i kontrola. Moguće objašnjenje leži u tome da dodatak glukoze u hranjivu podlogu osigurava mikroalgi dovoljno energije za borbu protiv ROS i lipidne peroksidacije na tilakoidnim membranama kloroplasta, što smanjuje potrebu za povećanjem koncentracije klorofila kao izvora energije jer je dodatni izvor energije već prisutan.

Osim što imaju ulogu u apsorpciji svjetlosti, karotenoidi su i neenzimski antioksidansi koji održavaju stabilnost fotosintetskog aparata i tilakoidnih membrana inhibirajući lipidnu peroksidaciju, te štite stanice od slobodnih radikala (Rezayian i sur. 2019; Wang i sur. 2023). U ovom istraživanju izmjerila sam porast sadržaja karotenoida nakon tretmana AgNP (-Glu) u odnosu na kontrolu (-Glu), što se poklapa s rezultatima prethodnih istraživanja u kojima je također zabilježen porast koncentracije karotenoida nakon izlaganja stanica AgNP (Romero i sur. 2020; Komazec i sur. 2023; Abdolsamad i sur. 2015; Rudi i sur. 2024). Naime, povećani sadržaj ROS u AgNP (-Glu) tretmanu, zajedno s povećanom antioksidacijskom aktivnošću,

objašnjava povišen sadržaj karotenoida, jer su karotenoidi dio antioksidacijskog sustava koji štiti stanice od oksidacijskog stresa (Fazelian i sur. 2020). U kontroli (+Glu) zabilježila sam smanjeni sadržaj karotenoida u usporedbi s kontrolom (-Glu), dok je najniži sadržaj dobiven nakon tretmana AgNP (+Glu). Moguće objašnjenje smanjenog sadržaj karotenoida u algi koja je rasla na podlozi s glukozom, proizlazi iz činjenice da stanice imaju dodatni izvor energije zbog glukoze u hranjivoj podlozi i samim time bolje podnose oksidacijski stres.

OJIP analiza, koja se koristi za istraživanje promjena u fotokemijskoj učinkovitosti fotosustava II (PSII), predstavlja važan indikator osjetljivosti biljaka na stres. Parametri poput F_0 (početna fluorescencija) i F_m (maksimalna fluorescencija) omogućuju izračun maksimalnog kvantnog prinosa (F_v/F_m) PSII, koji odražava maksimalnu učinkovitost u pretvaranju svjetlosne energije u kemijsku energiju kroz fotosintetske reakcije (Zhan i sur. 2024; Matorin i sur. 2013; Zushi i sur. 2012). U ovom istraživanju, izmjeren je statistički značajan pad maksimalnog kvantnog prinosa PSII u stanicama nakon tretmana AgNP (-Glu) u odnosu na kontrolu (-Glu), što je u skladu s prijašnjim istraživanjima koja pokazuju negativan utjecaj nanočestica teških metala na mikroalge (Liu i sur. 2020a; Matorin i sur. 2013). Zhan i sur. (2024) pratili su fotosintetski odgovor algi *C. reinhardtii* i *Chlamydomonas* sp. na toksični učinak cinka, gdje je također uočeno smanjenje F_v/F_m u tretiranoj skupini u odnosu na kontrolu. S obzirom na to da je F_v/F_m indikator oksidacijskog stresa (Zushi i sur. 2012), u uvjetima oksidacijskog stresa dolazi do razgradnje reakcijskih centara u PSII, što smanjuje prijenos elektrona (Almeida i sur. 2019). Nakon tretmana AgNP (+Glu), kao i u kontroli (+Glu), došlo je do povećanja F_v/F_m u odnosu na AgNP (-Glu), a u kontroli (-Glu) zabilježen je blagi pad u odnosu na prethodne uvjete. Ovi rezultati, u skladu s izmjerenim sadržajem ROS, dodatno potvrđuju ublažavajući učinak glukoze u hranjivoj podlozi na smanjenje fitotoksičnih učinaka AgNP na fotosintetski aparat mikroalge *C. vulgaris*.

PI_{abs} je indeks učinkovitosti PSII koji procjenjuje sposobnost očuvanja energije od fotona apsorbiranih u PSII do redukcije akceptora elektrona unutar fotosintetskog aparata (Zhan i sur. 2024). U ovom istraživanju, nakon tretmana AgNP (-Glu), izmjerila sam značajan pad vrijednosti PI_{abs} u odnosu na kontrolu (-Glu). Slične rezultate zabilježili su Zhan i sur. (2024) u istraživanju utjecaja cinka na PI_{abs} u mikroalgi *C. reinhardtii*, gdje je došlo do značajnog pada vrijednosti PI_{abs} s povećanjem koncentracija cinka. U kontroli (+Glu) i AgNP (+Glu), izmjereno je povećanje PI_{abs} u odnosu na AgNP (-Glu), ali i smanjenje u odnosu na kontrolu (-Glu). Ovi rezultati mogu se povezati s izmjerenim porastom sadržaja klorofila *a* nakon tretmana AgNP (-Glu), što je posljedica smanjenja stope fotosinteze u tim uvjetima. S druge strane, AgNP

(+Glu) i kontrola (+Glu) imali su povećane vrijednosti PI_{ABS} , što je u skladu s većim maksimalnim kvantnim prinosom PSII, budući da stopa fotosinteze u tim uvjetima nije bila smanjena kao nakon tretmana AgNP (-Glu).

ZAKLJUČAK

Iz rezultata dobivenih u ovom istraživanju mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Dodatak glukoze u hranjivu podlogu uzrokovao je znatno povećanje broja stanica u odnosu na podlogu bez glukoze.
- Dodatak glukoze u podlogu smanjio je sadržaj ukupnog ROS, $O_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 , a povećao aktivnost antioksidacijskih enzima (CAT, APX i PPX) nakon dodatka AgNP-citrat. U kontroli (+Glu) sadržaj H_2O_2 se smanjio u odnosu na kontrolu (-Glu).
- Tretman AgNP (-Glu) je doveo do lipidne peroksidacije, dok nakon tretmana AgNP (+Glu) nije došlo do lipidne peroksidacije.
- Tretman AgNP (-Glu) povećao je sadržaj klorofila *a*. Sadržaj karotenida se isto povećao nakon AgNP (-Glu), ali se smanjio nakon AgNP (+Glu). U kontroli (+Glu) je zabilježeno smanjenje sadržaja karotenoida u odnosu na kontrolu (-Glu).
- Dodatak glukoze imao je pozitivan učinak na fotosintetski sustav *C. vulgaris*, jer je nakon tretmana AgNP (+Glu) stopa fotosinteze bila veća, a parametri fluorescencije klorofila bolji u usporedbi s tretmanom AgNP (-Glu). U kontrolnim uzorcima stopa fotosinteze je bila niža u kontroli (+Glu) u odnosu na kontrolu (-Glu).
- Glukoza je imala ublažavajući učinak na citotoksičnost izazvanu izlaganjem AgNP-citrat u *C. vulgaris*, čime je došlo do poboljšanja oksidacijske ravnoteže i povećanja fotosintetske učinkovitosti.

6. LITERATURA

Abdel-Latif, H.M.R., El-Ashram, S., Yilmaz, S., Naiel, M.A.E., Kari, Z.A., Hamid, N.K.A., Dawood, M.A.O., Nowosad, J., Kucharczyk, D. (2022) „The effectiveness of *Arthrospira platensis* and microalgae in relieving stressful conditions affecting finfish and shellfish species: An overview“ *Aquaculture Reports*, 24, 101-135.

Aebi, H. (1984) „Catalase in vitro“ U *Methods in Enzymology* 105, 121-126.

Afkar, E., Ababna, H., Fathi, A.A. (2010) „Toxicological response of the green alga *Chlorella vulgaris*, to some heavy metals“ *American Journal of Environmental Sciences*, 6(3), 230-237

Almeida, A.C., Gomes, T., Langford, K., Thomas, K.V., Tollefsen, K.E. (2019) „Oxidative stress potential of the herbicides bifenoxy and metribuzin in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*“ *Aquatic Toxicology*, 210, 117-128

Bahador, E., Einali, A., Azizan-Shermeh, O., Sangtarash, M.H. (2019) „Metabolic responses of the green microalga *Dunaliella salina* to silver nanoparticles-induced oxidative stress in the presence of salicylic acid treatment“ *Aquatic Toxicology*, 217, 105356

Bhaduri, A.M., Fulekar, M.H. (2012) „Antioxidant enzyme response of plants to heavy metal stress“ *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 11, 55-69

Bhushan, B. (2017) „Introduction to nanotechnology“ *Springer handbook of nanotechnology*, 1, 1-16

Biba, R., Košpić, K., Komazec, B., Markulin, D., Cvjetko, P., Pavoković, D., Peharec Štefanić, P., Tkalec, M., Balen, B. (2022) „Surface coating-modulated phytotoxic response of silver nanoparticles in plants and freshwater green algae“ *Nanomaterials*, 12(1), 1-29

Biswas, P., Wu, C.Y. (2012) „Nanoparticles and environment“ *Journal of the Air and Waste Management Association*, 55(6), 708-746

Bundschuh, M., Filser, J., Lüderwald, S., McKee, M.S., Metreveli, G., Schaumann, G.E., Schulz, R., Wagner, S. (2018) „Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to?“ *Environmental Sciences Europe*, 30(6), 1-17

- Cameron, S.J., Hosseinian, F., Willmore, W.G. (2018) „A current overview of the biological and cellular effects of nanosilver“ *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 2030
- Cheirsilp, B., Torpee, S. (2012) „Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation“ *Bioresource Technology*, 110, 510-516
- Coulombier, N., Jauffrais, T., Labouvier, N. (2012) „Antioxidant compounds from microalgae: a review“ *Marine Drugs*, 19, 549-579
- Dash, A., Singh, A.P., Chaudhary, B.R., Singh, S.K., Dash, D. (2012) „Effect of silver nanoparticles on growth of eukaryotic green algae“ *Nano-Micro*, 4(3), 158-165
- Deng, X.Y., Xue, C-Y., Chen, B., Amoah, P. K., Li, D., Hu, X. L., Gao, K. (2018) „Glucose addition-induced changes in the growth and chemical compositions of a freshwater microalga *Chlorella kessleri*“ *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 94(4), 1202-1209
- Dere, Ş., Güneş, T., Sivaci, R. (1998) „Spectrophotometric determination of chlorophyll-*a*, *b* and total carotenoid contents of some algae species using different solvents“ *Turkish Journal of Botany*, 22, 13-16.
- Domingo, G., Bracale, M., Vannini, C. (2019) „Phytotoxicity of silver nanoparticles to aquatic plants, algae and microorganisms“ *Nanomaterials in Plants, Algae and Microorganisms*, 2, 143-168
- Dorobantu, L.S., Fallone, C., Noble, A.J., Veinot, J., Ma, G., Goss, G.G., Burrell, R.E. (2015) „Toxicity of silver nanoparticles against bacteria, yeast and algae“ *Journal of Nanoparticle Research*, 17(172), 1-13
- El Semary, N., El Sattar, A.M.A., Ahmed, E.Z., Aldayel, M. (2023) „Mixotrophy of algae: more algal biomass and more biofertilization for plants“ *Sustainability*, 15, 5815-5830
- Fazelian, N., Movafeghi, A., Yousefzadi, M., Rahimzadeh, M., Zarei, M. (2020) „Impact of silver nanoparticles on the growth, fatty acid profile, and antioxidative response of *Nannochloropsis oculata*“ *Acta Physiologiae Plantarum*, 42(126), 1-14

- Guéraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Cipak, A., Eckl, P.M., Huc, L., Jouanin, I., Siems, W., Uchida, K. (2010) „Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products“ *Free Radical Research*, 44(10), 1098-1124
- Hazeem, L.J., Kuku, G., Dewailly, E., Slomianny, C., Barras, A., Hamdi, A., Boukherroub, Culha, M., Bououdina, M. (2019) „Toxicity effect of silver nanoparticles on photosynthetic pigment content, growth, ROS production and ultrastructural changes of microalgae *Chlorella vulgaris*“ *Nanomaterials*, 9(7), 907-914
- Häder, D.P. (2022) „Photosynthesis in plants and algae“ *Anticancer Research*, 42, 5035-5041
- Jeffrey, S.W., Humphrey, G.F. (1975) „New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural phytoplankton“ *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 167, 191-194.
- Kalehjahi, H.A., Kosari-Nasab, M., Amini, M., Movafeghi, A. (2023) „Defense responses of the green microalgae *Chlorella vulgaris* to the vanadium pentoxide nanoparticles“ *International Journal of Oceanography and Hydrobiology*, 52, 446-460
- Keleş F. (1986) „Peroxidases in food processing“ *Gida the Journal of Food* 11(2), 66-76
- Komazec, B., Cvjetko, P., Balen, B., Letofsky-Papst, I., Lyons, D.M., Peharec Štefanić, P. (2023) „The occurrence of oxidative stress induced by silver nanoparticles in *Chlorella vulgaris* depends on the surface-stabilizing agent“ *Nanomaterials*, 13, 1967-1989
- Kong, W.B., Yang, H., Cao, Y.T., Song, H., Hua, S.F., Xia, C.G. „Effect of glycerol and glucose on the enhancement of biomass, lipid and soluble carbohydrate production by *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture“ *Food Technology and Biotechnology*, 51, 62-69
- Lekamge, S., Miranda, A.F., Abraham, A., Ball, A.S., Shukla, R., Nuggeoda, D. (2020) „The toxicity of coated silver nanoparticles to the alga *Raphidocelis subcapitata*“ *Springer Nature Journal Applied Sciences*, 2, 596-610
- Li, R., Jia, Z., Trush, M.A. (2016) „Defining ROS in Biology and Medicine“ *Reactive Oxygen Species (Apex)*, 1(1), 9-21

Li, X., Schirmer, K., Bernard, L., Sigg, L., Pillai, S., Behra, R. (2015) „Silver nanoparticle toxicity and association with the alga *Euglena gracilis*“ *Environmental Science: Nano*, 2(6), 259-602

Liu, W., Majumdar, S., Li, W., Keller, A.A., Slaveykova, V.I. (2020)(a) „Metabolomics for early detection of stress in freshwater alga *Poteroochromonas malhamensis* exposed to silver nanoparticles“ *Scientific Reports*, 10 (20563)

Liu, W., Worms, I., Slaveykova, V.I. (2020)(b) „Interaction of silver nanoparticles with antioxidant enzymes“ *Environmental Science: Nano*, 7, 1507-1517

Ma, W., Liu, L.N., Wang, Q., Duanmu, D., Qiu, B.S. (2023) „Editorial: Algal Photosynthesis“ *Frontiers in Microbiology*, 13

Mallick, N., Mohn, F.H. (2000) „Reactive oxygen species: response of algal cells“ *Journal of Plant Physiology*, 157, 183-193

Mariano, S., Panzarini, E., Inverno, M.D., Voulvoulis, N., Dini, L. (2020) „Toxicity, bioaccumulation and biotransformation of glucose-capped silver nanoparticles in green microalgae *Chlorella vulgaris*“ *Nanomaterials*, 10(7), 1377-1385

Masojídek, J., Koblížek, M., Torzillo, G. (2004) „Photosynthesis in microalgae“ *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, 1, 37-56

Matorin, D., Todorenko, D., Zayadan, B. (2013) „Effect of silver nanoparticles on the parameters of chlorophyll fluorescence and P700 reaction in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*“ *Microbiology*, 82(6), 862-867

Mátai, A., Hideg, É. (2017) „A comparison of colorimetric assays detecting hydrogen peroxide in leaf extracts“ *Analytical Methods*, 9(15), 2357-2360.

McNeil, S.E. (2005) „Nanotechnology for the biologist“ *Journal of Leukocyte Biology*, 78, 585-594

Nakano, Y., Asada, K. (1981) „Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts“ *Plant and Cell Physiology*, 22(5), 867-880.

- Navarro, E., Wagner, B., Odzak, N., Sigg, L., Behra, R. (2015) „Effects of differently coated silver nanoparticles on the photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*“ *Environmental Science and Technology*, 49, 13, 8041–8047
- Ng, N.S., Ooi, L. (2021) „A simple microplate assay for reactive oxygen species generation and rapid cellular protein normalization“ *Bio-protocol*, 11(1), 3877- 3887
- Nowicka, B. (2022) „Heavy metal–induced stress in eukaryotic algae—mechanisms of heavy metal toxicity and tolerance with particular emphasis on oxidative stress in exposed cells and the role of antioxidant response“ *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 16860-16911
- Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F., Popovic, R. (2011) „Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*“ *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78, 80-85
- Pérez-Pérez, M., Lemaire, S.D., Crespo, J.L. (2012) „Reactive oxygen species and autophagy in plants and algae“ *Plant Physiology*, 160(1), 156-164
- Preiser, J.C. (2012) „Oxidative stress“ *Journal of Parenteral and Enternal Nutrition*, 36(2), 147-154
- Pulz, O., Gross, W. (2004) „Valuable products from biotechnology of microalgae“ *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 635-648.
- Ranoszek-Soliwoda, K., Tomaszewska, E., Socha, E., Krzyczmonik, P., Ignaczak, A., Orłowski, P., Krzyowska, M., Celichowski, G., Grobelny, J. (2017) „The role of tannic acid and sodium citrate in the synthesis of silver nanoparticles“ *Journal of Nanoparticle Research*, 19, 273-288
- Rezayian, M., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H. (2019) „Oxidative damage and antioxidative system in algae“ *Toxicology Reports*, 6, 1309-1313
- Rohde, M.M., Snyder, C.M., Sloop, J., Solst, S.R., Donati, G.L., Spitz, D.R., Furdui, C.M., Singh, R. (2021) „The mechanism of cell death induced by silver nanoparticles is distinct from silver cations“ *Particle and Fibre Toxicology*, 18(37)

- Romero, N., Visentini, F.F., Márquez, V.E., Santiago, L.G., Castro, G.R., Gagneten, A.M. (2020) „Physiological and morphological responses of green microalgae *Chlorella vulgaris* to silver nanoparticles“ *Environmental Research*, 189, 109857
- Romero-Cruz, M.C., Leon-Vaz, A., Giráldez, I., Vega, J.M., Vígara, H. (2024) „Effect of heavy metals on the antioxidant system of the acid-tolerant microalga *Coccomyxa onubensis*“ *Algal Research*, 77, 10337
- Ru, I.T.K., Yik Sung, Y., Jusoh, M., Effendy, M.A.W., Nagappan, T. (2020) „*Chlorella vulgaris*: a perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts“ *Applied Phycology*, 1(1), 2-11.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.Y., Vaca-Garcia, C. (2019) „Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review“ *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265-278.
- Satpati, G.G., Pal, R. (2020) „Photosynthesis in algae“ *Applied Algal Biotechnology*, 49-68
- Schumann, R., Häubner, N., Klausch, S., Karsten, U. (2005) „Chlorophyll extraction methods for the quantification of green microalgae colonizing building facades“ *International Biodeterioration and Biodegradation*, 55, 213-222.
- Sendra, M., Yeste, M.P., Gatica, J.M., Moreno-Garrido, I., Blasco, J. (2017) „Direct and indirect effects of silver nanoparticles on freshwater and marine microalgae (*Chlamydomonas reinhardtii* and *Phaeodactylum tricorutum*)“ *Chemosphere*, 179, 279-289
- Shanab, S.M.M., Partila, A.M., Ali, H.E.A., Abdullah, M.A. (2019) „Characterization and impact of silver nanoparticles on cell growth, lipid, carbohydrate and fatty acids of *Chlorella vulgaris* and *Dictyochloropsis splendida*“ *Beilstein Archives*, 201991, 1-29
- Sharma, V.K., Siskova, K.M., Zboril, R., Gardea-Torresdey, J.L. (2014) „Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: Fate, stability and toxicity“ *Advances in Colloid and Interface Science*, 204, 15-34
- Siddiqi, K.S., Husen, A. (2022) „Plant response to silver nanoparticles: a critical review“ *Critical Reviews in Biotechnology*, 42(7), 973-990

Sreeranjit, C.V.K., Lal, J.J. (2013) „Glucose: properties and analysis“ *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2, 2898-2903

Srinivasan, L.V., Singh Rana, S. (2024) „A critical review of various synthesis methods of nanoparticles and their applications in biomedical, regenerative medicine, food packaging, and environment“ *Discover Applied Sciences*, 6, 371

Suryawanshi, S.K., Mali, R.V., Patil, R.L., Sevlani, S.T. (2022) „Nanoparticle“ *International Journal of Advanced Research in Science, Communication and Technology (IJARSCT)*, 2(1), 10-12

Thoré, E.S.J., Muylaert, K., Bertram, M.G., Brodin, T. (2022) „Microalgae“ *Current Biology*, 33, 85-97

Tomaselli, L. (2004) „The microalgal cell“ *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, 1, 20-36

Tripathi, D.K., Tripathi, A., Shweta., Singh, S. Y., Vishwakarma, K., Yadav, G., Sharma, S., Singh, V.K., Mishra, R.K., Upadyhay, R.G., Dubey, N.K., Lee, Y., Chauhan, D.K. (2017) „Uptake, accumulation and toxicity of silver nanoparticles in autotrophic plants and heterotrophic microbes: a concentric review“ *Frontiers in Microbiology*, 8 (7)

Yan, A., Chen, Z. (2019) „Impacts of silver nanoparticles on plants: a focus on the phytotoxicity and underlying mechanism“ *International Journal of Molecular Sciences*, 5, 20-26

Yan, X., Shan, S., Li, X., Xu, Q., Yan, X., Ruan R., Cheng, P. (2024) „Carbon and energy metabolism for the mixotrophic culture of *Chlorella vulgaris* using sodium acetate as a carbon source“ *Frontiers in Microbiology*, 15, 1-10

Yang, Y., Li, X., Sigg, L., Suter, M.J.F., Pillai, S., Behra, R., Schirmer, K. (2017) „Interaction of silver nanoparticles with algae and fish cells: a side by side comparison“ *Journal of Nanobiotechnology*, 15(16), 1-11

Yu, S.J., Yin, Y.G., Liu, J.F. (2013) „Silver nanoparticles in the environment“ *Environmental Science: Processes and Impacts*, 15, 78-92

- Yuan, L., Richardson, C.J., Ho, M., Willis, C.W., Colman, B.P., Wiesner, M.R. (2018) „Stress responses of aquatic plants to silver nanoparticles“ *Environmental Sciences & Technology*, 52(5), 2558-2565
- Yun, H.S., Kim, Y.S., Yoon, H.S. (2021) „Effect of different cultivation modes (photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic) on the growth of *Chlorella* sp. And biocompositions“ *Frontiers of Bioengineering and Biotechnology*, 9 (774143)
- Wang, L., Yang, T., Pan, Y., Shi, L., Jin, Y., Huang, X. (2023) „The metabolism of reactive oxygen species and their effects on lipid biosynthesis of microalgae“ *International Journal of Molecular Sciences*, 24
- Vavilin, D.V., Ducret, J.M., Matorin, D.N., Venediktov, P.S., Rubin, A.B. (1998) „Membrane lipid peroxidation, cell viability and Photosystem II activity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions“ *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 42, 233-239
- Zhang, L., Wang, W.X. (2018) „Dominant role of silver ions in silver nanoparticle toxicity to a unicellular alga: evidence from luminogen imaging“ *Environmental science & Technology*, 53(1), 494-502
- Zhan, D., Liu, Y., Yu, N., Hao, C. (2024) „Photosynthetic response of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlamydomonas* sp. 1710 to zinc toxicity“ *Frontiers in Microbiology*, 15
- Zhang, X-F., Liu, Z.G., Shen, W., Gurunathan, S. (2016) „Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches“ *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1530-1534
- Zhao, Z., Xu, L., Wang, Y., Li, B., Zhang, W., Li, X. (2020) „Toxicity mechanism of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*: photosynthesis, oxidative stress, membrane permeability, and ultrastructure analysis“ *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 15032-15042
- Zushi, K., Kajiwara, S., Matsuzoe, N. (2012) „Chlorophyll a fluorescence OJIP transient as a tool to characterize and evaluate response to heat and chilling stress in tomato leaf and fruit“ *Scientia Horticulturae*, 148, 39-46

7. ŽIVOTOPIS

Kristina Gilman rođena je 02. rujna 1999. godine u Osijeku. Od 2006. do 2014. pohađa Osnovnu školu Vladimira Nazora u Đakovu. Od 2014. do 2018. pohađa i završava srednju jezičnu Gimnaziju Antuna Gustava Matoša u Đakovu. Tokom osnovnoškolskog i srednjoškolskog obrazovanja sudjeluje na raznim školskim, županijskim i državnim natjecanjima uključujući biologiju. 2018. godine upisuje preddiplomski studij biologije na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku na Odjelu za biologiju. Preddiplomski studij završava 2022. godine izradom završnog pod naslovom „Otrovi vodozemaca i njihova primjena u farmaceutskoj industriji“ pod mentorstvom doc.dr.sc. Olge Jovanović Glavaš. Diplomski studij upisuje 2022. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, Biološki odsjek, smjer Eksperimentalna biologija-fiziologija i imunobiologija. Kroz godine studiranja sudjeluje na više projekata uključujući projekt „Tjedan mozga“ 2021. godine gdje stječe vještine i znanja vođenja radionica, te obavlja stručnu praksu u sklopu projekta „Alumni mentor“ u Osijeku 2021. godine. Tokom preddiplomskog studija bila je demonstrator na kolegijima „Anatomija bilja“ i „Stablašice“. Bila je dobitnica Državne stipendije u STEM područjima znanosti 2020. i 2021. godine.