

Adhezijska svojstva fitoplanktonske vrste *Dunaliella tertiolecta* Butcher u stresnim uvjetima

Novosel, Nives

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:217:813648>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-03**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Nives Novosel

**Adhezijska svojstva fitoplanktonske vrste *Dunaliella*
tertiolecta Butcher u stresnim uvjetima**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za biogeokemiju mora i atmosfere, Zavoda za istraživanje mora i okoliša, Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Nadice Ivošević DeNardis, viši zn. sur. i izv.prof.dr. sc. Marije Gligore Udovič, s Botaničkog zavoda Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra struke znanosti o okolišu.

Zahvale

Zahvaljujem se Mentorici dr.sc. Nadici Ivošević DeNardis na ukazanom povjerenju, te stručnom i strpljivom vođenju kroz izradu ovog rada. Hvala Vam na nesebičnom dijeljenju znanja i pruženoj prilici za izradu diplomskog rada.

Zahvaljujem se dr.sc. Mariji Gligori Udovič, neposrednoj voditeljici rada, na uloženom trudu, strpljenju i savjetima kojima je pridonijela poboljšanju kvalitete ovog rada.

Zahvaljujem se dr.sc. Tei Mišić Radić na uvijek korisnim savjetima i ugodnoj radnoj atmosferi u laboratoriju.

Diplomski rad izrađen je uz financijsku potporu projekta pod nazivom „Algal cell biophysical properties as markers for environmental stress in aquatic systems” (ID 21720055) financiran od strane International Visegrad Fund.

Hvala svim mojim prijateljima i kolegama, posebice Eni i Nikolini, na podršci i predivnim uspomnama stečenim tijekom studija. Hvala mojim "curama iz osnovne" što ste me nesebično podržavale u i ovom poglavlju života.

Hvala Borni na nesebičnoj ljubavi, podršci, razumijevanju i što je uvijek tu za mene.

Veliko hvala mojim roditeljima, te baki i djedu koji su mi svojim strpljenjem, ljubavlju i bezuvjetnom podrškom uvijek bili oslonac, pa tako i tijekom studiranja. Uz Vaše uvijek prave riječi svi problemi postajali su lakši.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Adhezijska svojstva fitoplanktonske vrste *Dunaliella tertiolecta* Butcher u stresnim uvjetima

Nives Novosel

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U ovom radu ispitan je utjecaj saliniteta i kadmija na brzinu rasta, fiziološki odgovor, oblik stanica i adhezijsko ponašanje na elektrodi, fitoplanktonske morske vrste *Dunaliella tertiolecta* Butcher. Korištene su mikroskopske i elektrokemijske metode polarografije i kronoamperometrije na kapajućoj živinoj elektrodi. *D. tertiolecta* nema čvrstu, celuloznu staničnu stijenku za razliku od ostalih zelenih algi, što je čini osjetljivom na promjene u ekosustavu i zbog čega je često korišten modelni organizam u istraživanjima stresa. Prilagodba stanica *D. tertiolecta* u uvjetima nižeg saliniteta u kulturi ukazuje na nešto veću dimenziju stanice, promjenu u sferični oblik stanice, te nešto brži rast, dok je adhezijsko svojstvo prianjanja u širokom području potencijala ostalo sačuvano. Prilagodba stanica na prisustvo teškog metala kadmija u kulturi rezultirala je smanjenjem gustoće stanica, smanjenjem dimenzije, promijenom oblika, pojavom površinski-aktivnih čestica i mikroagregata u mediju, što ukazuje na promijenjene metaboličke aktivnosti stanica uslijed stresa. Rezultati ovog rada doprinose boljem razumijevanju adhezijskog ponašanja stanica fitoplanktona u stresnim uvjetima *in vitro*, te unaprijeđuju znanje o preživljavanju i prilagodbi fitoplanktonskih organizama na prirodnim međupovršinama u vodenom okolišu u uvjetima opterećenja.

(39 stranica, 21 slika, 64 bibliografskih referenci; izvornik na hrvatskom jeziku)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: adhezija, *Dunaliella tertiolecta*, fitoplankton, kadmij, salinitet, stres

Voditelj: Dr. sc. Nadica Ivošević DeNardis, viši zn. suradnik

Suvoditelj: Dr. sc. Marija Gligora Udovič, izv. prof

Ocjenitelji: Dr. sc. Marija Gligora Udovič, izv. prof

Dr.sc. Jasna Lajtner, izv.prof

Dr. sc. Vlasta Čosović, red.prof

Dr.sc. Nenad Buzjak, izv.prof

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Adhesion properties of phytoplankton specie *Dunaliella tertiolecta* Butcher under stress conditions

Nives Novosel

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

In this Thesis is examined the influence of salinity and presence of heavy metal cadmium in culture on the response of marine phytoplankton *Dunaliella tertiolecta* Butcher in terms of growth rate, physiological activity, cell shape and adhesion behavior on the electrode. Microscopic and electrochemical methods of polarography and chronoamperometry at the dropping mercury electrode were used. *D. tertiolecta* cell has no solid cellular cell wall in contrast to other green algae, which makes it susceptible to changes in the ecosystem and is why a model organism is often used in stress research. Adaptation of *D. tertiolecta* cell culture in lower salinity conditions suggests a slightly larger cell dimension, a change in spherical cell shape, a somewhat faster growth, while the adhesion properties at the broader potentials area remains preserved. Adaptation of phytoplankton to the presence of heavy metal cadmium in culture resulted in decrease of cell density with increasing cadmium concentration, cells are slightly smaller in size and show a deterioration in shape, the occurrence of surface active particles and microaggregates in the culture which could be the result of the changed metabolic activity of cells due to stress. These results contribute to a better understanding of the adhesion behavior of phytoplankton cells in stress conditions *in vitro* and improve knowledge about survival and adaptation of phytoplankton organisms at natural interfaces in the aquatic environment under pressure.

(39 pages, 21 figures, 64 references; original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: adhesion, cadmium, *Dunaliella tertiolecta*, phytoplankton, salinity, stress

Supervisor: Dr. Nadica Ivošević DeNardis, senior research associate

Co-supervisor: Dr. Marija Gligora Udovič, associate professor

Reviewers: Dr. Marija Gligora Udovič, assoc.prof.

Dr. Jasna Lajtner, assoc. prof.

Dr. Vlasta Čosović, prof.

Dr. Nenad Buzjak, assoc.prof.

Thesis accepted:

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Rod <i>Dunaliella</i> Teodoresco.....	2
1.2.	Elektrokemijska metoda.....	5
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	11
3.	MATERIJALI I METODE	12
3.1.	Istraživana vrsta.....	12
3.2.	Stanični uzgoj.....	12
3.3.	Instrumentacija.....	13
3.4.	Mikroskopska mjerenja.....	14
3.4.1.	Određivanje gustoće stanica.....	14
3.4.2.	Bojanje fluorescentnom bojom-Nile Red.....	15
3.4.3.	Karakterizacija oblika stanice pod imerzijskim objektivom.....	15
3.5.	Izolacija stanica.....	15
3.6.	Elektrokemijska mjerenja.....	16
3.6.1.	Ćelija i elektrode.....	16
3.6.2.	Priprema elektrolitne otopine.....	17
3.6.3.	Postupak elektrokemijskog mjerenja.....	17
4.	REZULTATI	18
4.1.	Rast stanica <i>D. tertiolecta</i> u različitim medijima.....	18
4.2.	Mikroskopska karakterizacija stanica <i>D. tertiolecta</i> u suspenziji.....	19
4.2.1.	Karakterizacija stanica pod imerzijskim objektivom.....	19
4.2.2.	Karakterizacija stanica bojanjem fluorescentnom bojom.....	20
4.3.	Elektrokemijska karakterizacija stanica <i>D. tertiolecta</i> u suspenziji.....	21
4.3.1.	U prisustvu kisika.....	21
4.3.2.	Bez prisustva kisika.....	25
5.	RASPRAVA	29
6.	ZAKLJUČAK	34
7.	LITERATURA	35
8.	ŽIVOTOPIS	39

1. UVOD

Fitoplankton (mikroalge) označava raznoliku skupinu jednostaničnih i kolonijalnih, autotrofnih i miksotrofnih organizama koji slobodno lebde u stupcu vode ili su nošeni vodenim strujama. Većina fitoplanktonskih vrsta su mikroskopski jednostanični organizmi, veličine između 0,4 i 200 μm . Stvaraju energiju kroz proces fotosinteze, te zbog toga žive u dobro osvijetljenom površinskom sloju slanih i slatkih voda na Zemlji (Simon i sur. 2009). Najznačajniji su primarni producenti u vodenim ekosustavima, iako biomasom mali, odgovorni su za fiksaciju preko 90% atmosferskog ugljika (Häder i Gao 2015).

Fiziologija fitoplanktona je vrlo dinamična i brzo odgovara na promjene u ekosustavu (Field i sur. 1998; Falkowski i sur. 2004), što ga čini pouzdanim biološkim pokazateljem promjena u vodenim ekosustavima koje mogu biti uzrokovane promjenama sezona, klime ili antropogenim utjecajem (Simon i sur. 2009).

Dugoročna praćenja klimatskih promjena putem abiotičkih okolišnih čimbenika ukazuju na znatna kolebanja u zadnjih nekoliko desetljeća, koja pak utječu na vodeni ekosustav i žive organizme u njemu (Fung i sur. 2005). Temperatura površinskog sloja oceana raste uzrokujući otapanje polarnog leda i smanjenje ukupnog saliniteta. Koncentracija CO_2 u morima i oceanima se povećava, a veće količine otopljenog CO_2 čine ocean kiselijim, što potencijalno ometa produkciju biogenih karbonata od strane jednostaničnih algi (Riebesell i sur. 2000).

Salinitet, pH, temperatura, svjetlost i količina nutrijenata su najviše istraživani okolišni čimbenici u kontekstu rasta, raznolikosti te fizioloških promjena fitoplanktonskih organizama. Smatra se da su salinitet i temperatura glavni čimbenici koji kontroliraju rast mikroalgi (Adenan i sur. 2011, Hemaiswarya i sur. 2011). Varijacije u salinitetu utječu na važne biokemijske i fiziološke mehanizme u stanici, kao što je produkcija lipida i glicerola (Fava i Martini 1988), te mogu dovesti do usporavanja centralnih metaboličkih aktivnosti kao što je fotosinteza (Liska i sur. 2004). Nadalje, svjetlost je najvažniji čimbenik za fotosintezu, no prekomjerna količina svjetlosti i UV zračenje smanjuju stopu fotosinteze. Istovremeno, smanjivanje stratosfernog ozona dovodi do izlaganja fitoplanktona štetnom UV-B zračenju, posebice u polarnom i umjerenom pojasu (McKenzie i sur. 2011).

Različiti antropogeni izvori zagađivanja (industrija, rudarstvo, poljoprivreda, marikultura, turizam) negativno utječu na vodena staništa fitoplanktonskih organizama. Teški metali česti su onečišćivači u prirodnim vodenim ekosustavima, koji se ne razgrađuju već kruže u prirodi u različitim oksidacijskim i kemijskim oblicima (Oberholster i sur. 2010). Vodene i zračne

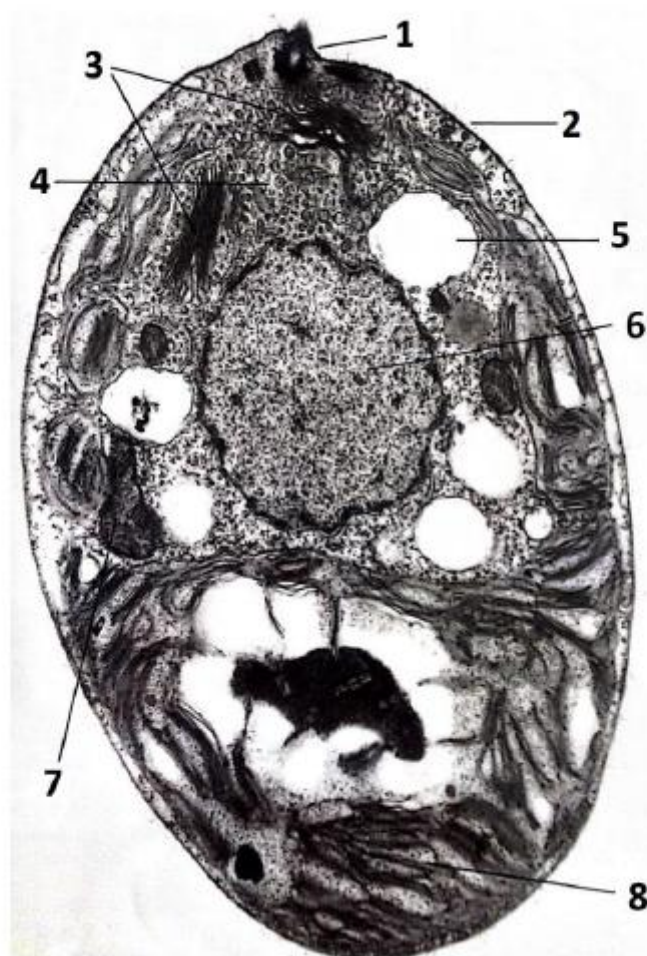
struje prenose ih na velike udaljenosti od izvora onečišćenja, tako dolaze u tlo i biljke, a prehrambenim lancem i u životinje, te u konačnici i čovjeka.

Upravo zato, biogeokemija teških metala ima važnu ulogu u određivanju ekološkog statusa prirodnih voda. Ukupna koncentracija teških metala indikator je onečišćenosti sustava, ali važnije je uzeti u obzir distribuciju različitih ionskih oblika i vrsta metala. Ugradnja metalnih iona od strane živih organizama, kao i njihovo udruživanje s česticama tvari i time uklanjanje iz stupca vode ovise o fizičko-kemijskim svojstvima vodenog sustava (pH, salinitet, redoks potencijal i dr.) (Omanović i sur. 2006).

Kadmij (lat. Cadmium) se prirodno javlja u okolišu u anorganskom obliku kao posljedica vulkanskih emisija i trošenja stijena, a njegovu količinu u tlu, vodi i živim organizmima dodatno povećavaju antropogeni izvori poput izgaranja ugljena, nafte, spaljivanja otpada, izgaranja benzina, proizvodnje i uporabe mineralnih gnojiva i dr. (Keil i sur. 2011).

1.1. Rod *Dunaliella* Teodoresco

Rod *Dunaliella* Teodoresco obuhvaća jednostanične zelene alge. Proučavane još od početka 19. stoljeća, te je od tada opisano 26 vrsta. Vrste roda *Dunaliella* naseljavaju i slatke i slane vode (Lerche 1937), uključujući i Mrtvo More, te slana jezera Antarktika. Specifične su po tome da su eurihaline vrste koje mogu preživjeti unutar širokog raspon saliniteta (Ginzburg 1987). Za istraživanu vrstu, *Dunaliella tertiolecta* Butcher, poznato je da može rasti u rasponu saliniteta od 3,75 do 120 ‰ (McLachlan 1960). Zbog toga su glavni i najmnogobrojniji predstavnici fitoplanktona u hipersalinim ekosustavima u kojima druge fitoplanktonske vrste ne mogu opstati. Osim što toleriraju širok raspon saliniteta, mogu podnijeti i vrlo niske temperature, ekstremne pH vrijednosti, te imaju visok stupanj fotoadaptacije na ekstremne uvjete svjetlosti (Ginzburg i Ginzburg 1981; Polle i sur. 2010). *D. tertiolecta* je pokretna, jednostanična fitoplanktonska vrsta. Građa stanice prikazana je na Slici 1.



Slika 1. Elektronsko-mikroskopska slika prereza kroz stanicu *D. tertiolecta* (povećanje 18000:1); 1-baza biča, 2-plazma membrana, 3-Golgijev aparat, 4-vezikule, 5-vakuola, 6-jezgra, 7-mitohondrij, 8-kloroplast (Svetličić i sur. 2001).

Većinu stanice zauzima pojedinačni kloroplast s centralnim pirenomidom, koji je okružen pričuvnom molekulom škroba. Od ostalih organela vidljivih u stanici nalazimo još očnu pjegu, jezgru s jezgrićom, Golgijev aparat, vakuole, mitohondij i plastide . Posjeduje dva izomorfna i izokontna bića na anteriornom kraju stanice. (Polle i sur. 2010). Za vrste roda *Dunaliella* značajan je izostanak čvrste stanične stijenke (Hamburger 1905), što je karakteristika koja ih odvaja od drugih jednostaničnih zelenih algi. Zbog čega ih se često naziva i „golim bičama“. Upravo nedostatak čvrste stanične stijenke i elastičnost membrane omogućuju brzu promjenu volumena stanica kao odgovor na promjene u osmotskom tlaku, te se zbog toga već dugi niz godina koriste u brojnim istraživanjima (Oliveira i sur. 1980). No,

stanice roda *Dunaliella* sadrže mukoznu, elastičnu staničnu ovojnici od glikoproteina, nazvanu glikokaliks debljine 9 nm (Svetličić i sur., 2001.). Glikokaliks je u tankim presjecima vidljiv kao elektronski gusti materijal koji prekriva plazmalemu (Borowitzka i Borowitzka 1988).

Vrste roda *Dunaliella* uslijed stresa mogu u stanici akumulirati značajnu količinu važnih kemijskih spojeva, karotenoida (Hosseini Tafreshi i Shariati 2006.), glicerola (Hadi i sur. 2008), te vitamina i proteina (Ghoshal i sur. 2002).

Mehanizam koji omogućuje prilagodbu stanice alge na širok raspon saliniteta baziran je na sposobnosti promjene intracelularne koncentracije glicerola (Raja i sur. 2007). Glavna uloga glicerola kao kompatibilnog otapala je da štiti enzime od inaktivacije i inhibicije (Telfer 2002.). Također je pokazano da je sinteza glicerola uslijed hipertoničnih uvjeta, te eliminacija uslijed hipotoničnih uvjeta, neovisna o sintezi proteina, te se odvija i na svjetlu i u tami (Shariati i Lilley 1994). Nadalje, *Dunaliella* ima i sposobnost eliminacije natrijevih iona putem specifične redoks ionske pumpe, što je vrlo bitno za preživljavanje u hipertoničnim uvjetima (Katz i sur. 2010). Osim glicerola, alga *Dunaliella* akumulira i velike količine β -karotena u uvjetima jakog intenziteta svjetlosti (Coesel i sur. 2008), povišene temperature (Ben-Amotz 1996), te manjka nutrijenata kao što su sulfati i nitrati (Marin i sur. 1998). β -karoten dobiven iz alge koristi se u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji kao antioksidans i bojilo.

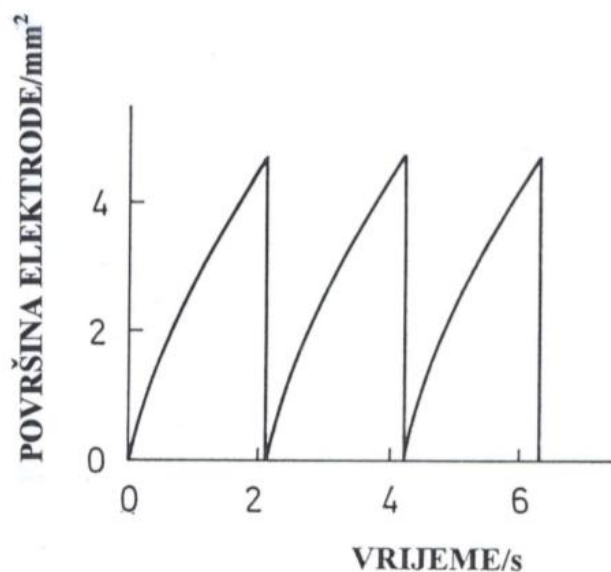
Neke vrste roda *Dunaliella*, kao što je to *D. salina* Teodoresco imaju sposobnost produkcije lipida koji su korisni za proizvodnju biogoriva, ali još nije postignuta ekonomičnost u proizvodnji ovog alternativnog izvora energije (Sheehan i sur. 1998). U uvjetima visokog saliniteta u stanici *D. salina* može doći do povećanja ukupne količine lipida za 70% (Takagi i sur. 2006).

D. tertiolecta često je korišten modelni organizam u istraživanjima ekotoksičnosti u morskim i estuarijskim uvjetima. Svojstva koja *D. tertiolecta* čine idealnim modelnim organizmom u brojnim istraživanjima su: mogućnost jednostavnog uzgoja u laboratoriju, dobra veličina i razlučiva morfologija, brz rast te konzistentan odgovor na okolišne zagađivače. Uključivanje fitoplanktonskih vrsta u istraživanje ekotoksičnosti vrlo je bitno jer daje izravnu procjenu utjecaja na primarnu produkciju i fototrofnu biomasu kao bazu hranidbenog lanca (DeLorenzo 2009.)

1.2. Elektrokemijska metoda

Elektrokemijska metoda polarografije i kronoamperometrije na kapajućoj živinoj elektrodi omogućuje brzu i jednostavnu karakterizaciju površinske aktivnosti organske tvari u uzorcima morske vode (Zvonarić i sur. 1973; Žutić i sur. 1981; Ćosović 1985). Pri tome se pretpostavlja da postoji značajna korelacija između međupovršinskih svojstava organskih čestica u interakciji s elektrodom koje se mjere elektrokemijski i međupovršinskih svojstava koja kontroliraju interakcije u prirodnom vodenom sustavu (Hozić Zimmermann 2007). Metode koje koriste živinu elektrodu su važne za istraživanje membrana zbog jedinstvene prednosti žive kao tekuće i vodljive površine koja idealno oponaša fluidnu međupovršinu poznatih površinskih svojstava (Žutić i sur. 1984). Elektrokemijska detekcija temelji se na međupovršinskim svojstvima, hidrofobnosti i supramolekularnoj organizaciji čestica, a ne na kemijskom sastavu (Žutić i sur. 2004).

Kapajuća živina elektroda (KŽE) ima idealno glatku, homogenu i kemijski inertnu površinu hidrofobnog karaktera. Živina elektroda ima maksimalnu površinu $4,7 \text{ mm}^2$, a vrijeme života kapi iznosi 2 s (Slika 2).

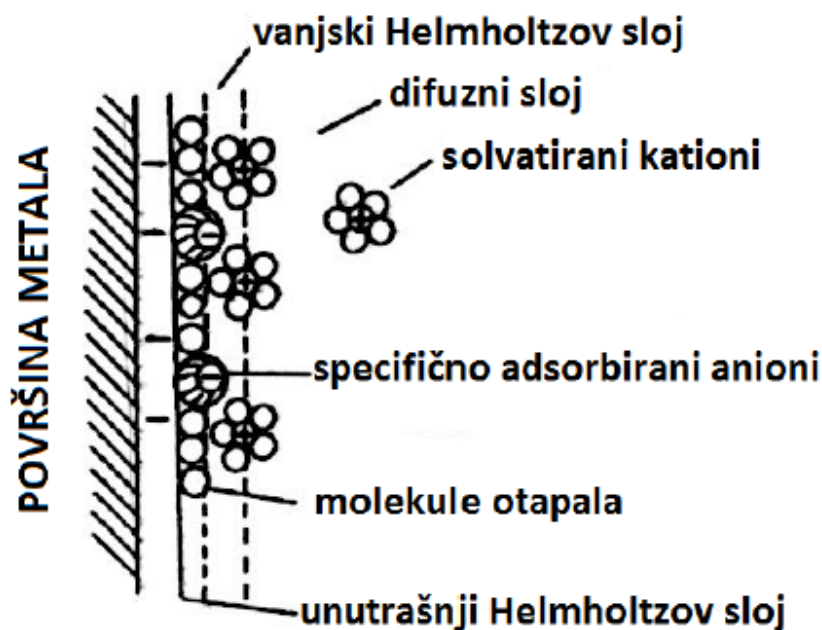


Slika 2. Shematski prikaz periodične promjene KŽE (Kovač i sur. 2000).

Drugim riječima, svake dvije sekunde nova i reproducibilna živina kap je formirana, što omogućuje ponavljanje analize (Ivošević DeNardis i sur. 2017). To je važan aspekt metode

budući da je sudaranje čestica s površinom elektrode stohastični proces, te je potrebna analiza većeg seta podataka analiziranih u istim eksperimentalnim uvjetima (Kovač i sur. 2000).

Primjenom elektrodnog potencijala na KŽE uronjenu u vodenu otopinu elektrolita stvara se nabijena međupovršina elektroda/elektrolit i formira električni dvosloj koji predstavlja uređenje nabijenih iona elektrolita i orijentiranih dipola vode. Električni dvosloj nastaje kao rezultat ravnoteže između sila u električnom polju i nereda uzrokovanog termalnim kretanjem iona. Prema modelu električnog dvosloja naboj po jedinici površine elektrode je kompenziran suviškom jednako velikog naboja suprotnog predznaka od strane otopine. Suvišak naboja suprotnog predznaka od strane otopine podijeljen je na ione koji kompenziraju naboj površine na udaljenosti dimenzije molekule i ione čiji višak postupno opada prema unutrašnjosti otopine (difuzni sloj). Kompaktni sloj specifično adsorbiranih iona osnovnog elektrolita (pr. klorida) i orijentiranih dipola molekula vode nalazi se tik uz elektrodu i predstavlja unutarnju Helmholtzovu ravninu (IHP, Slika 3). Na nju se nadovezuje vanjska Helmholtzova ravnina (OHP) koja se sastoji od hidratiziranih kationa, aniona i molekula vode.



Slika 3. Shematski prikaz modela električnog dvosloja u prisutnosti specifično adsorbiranih aniona (Bard i Faulkner 1980.)

Adsorpcija organskih molekula na površinu KŽE uzrokuje potiskivanje molekula vode iz električnog dvosloja i sniženje međupovršinske napetosti, te smanjenje kapaciteta dvosloja. Elektrokemijski odziv uslijed adsorpcije organskih molekula na međupovršini odgovara sniženju struje redukcije kisika što je proporcionalno koncentraciji organskih molekula u otopini. S druge strane prijanjanjem čestica ili stanica na površinu žive dolazi do potiskivanja naboja s međupovršine elektroda/elektrolit i uspostave kompenzirajuće struje što predstavlja dobro definirani amperometrijski odziv tj. signal prijanjanja.

Struja potiskivanja naboja ovisi o potencijalu primijenjenom na površinu KŽE, a definirana je izrazom :

$$I_D = \frac{dA}{dt} \sigma \epsilon$$

$\frac{dA}{dt}$ - promjena površine živine kapi u vremenskom intervalu

$\sigma \epsilon$ – gustoća površinskog naboja na živinoj elektrodi

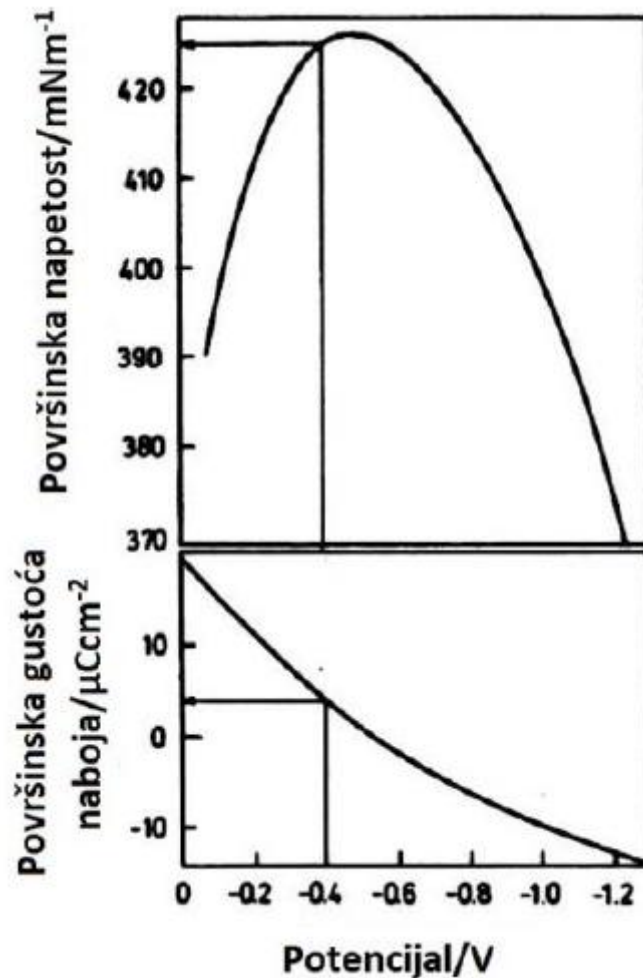
No, svaka interakcija organske kapljice s nabijenom površinom žive neće rezultirati adhezijom i širenjem po površini. Po površini će se razliti samo one kapljice za koje vrijedi da je promjena Gibbsove energije manja od 0 ($\Delta G < 0$). Promjena Gibbsove energije opisana je izrazom izvedenim u skladu s jednažbom Young-Dupré (Israelachvili 1991);

$$-\Delta G = A(\gamma_{12} - \gamma_{13} - \gamma_{23})$$

u kojoj vrijedi da je A specifična površina, γ_{12}, γ_{13} i γ_{23} su međupovršinske napetosti na granicama živa/vodena otopina, živa/nepolarna organska tekućina i nepolarna organska tekućina/vodena otopina. Izraz $A(\gamma_{12} - \gamma_{13} - \gamma_{23})$ predstavlja koeficijent širenja S. Kada je $S > 0$ dolazi do spontanog širenja kapljice po međupovršini, a što je koeficijent veći proces je brži. Kada je $S = 0$ postignuti su kritični uvjeti za adheziju i širenje kapljica, no proces je spor.

Mijenjanjem narinutog potencijala na KŽE dolazi do promjene površinskih svojstava KŽE, odnosno promjene gustoće površinskog naboja i napetosti površine elektroda/elektrolit.

Navedena površinska svojstva elektrode utječu na termodinamiku i kinetiku međupovršinskih procesa (adsorpcije, adhezije) na KŽE. Slika 4 prikazuje elektrokapilarnu krivulju (Heyrovsky i Kuta 1965) paraboličnog oblika koja predstavlja ovisnost napetosti međupovršine elektroda/elektrolit o narinutom potencijalu na KŽE.



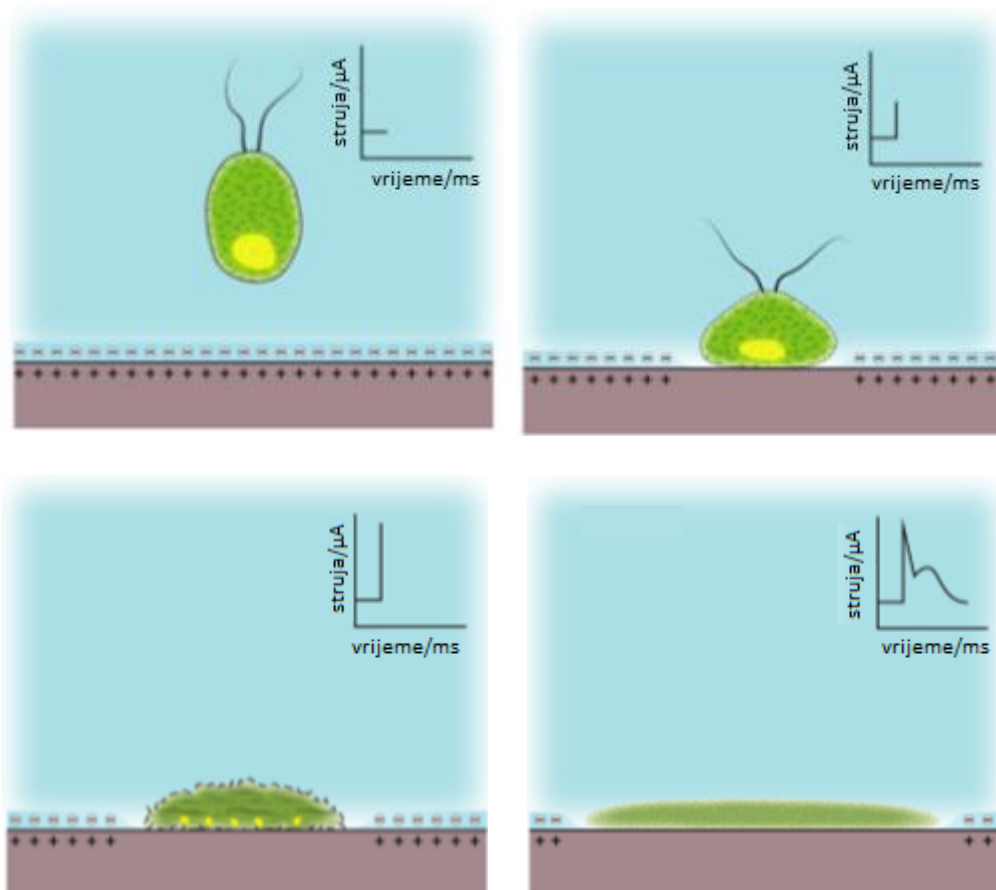
Slika 4. Ovisnost površinske napetosti i gustoće naboja o potencijalu na međupovršini živa/0,1 M NaCl (Hozić Zimmermann 2007.)

Maksimum u elektrokapilarnoj krivulji zove se elektrokapilarni maksimum ili izoelektrična točka jer je kod tog potencijala naboj na površini žive nula i ne dolazi do formiranja dvosloja (Anderson i Parsons 1957).

Slika 5 prikazuje mehanizam privlačne interakcije stanice fitoplanktona s nabijenom međupovršinom elektrode. Fleksibilna vanjska membrana izabrane alge *D. tertiolecta*

omogućuje adheziju i razlijevanje stanica na površini živine elektrode, što rezultira karakterističnim elektrokemijskim signalima na amperometrijskim krivuljama.

Pretpostavlja se da je mehanizam adhezije stanica na površinu KŽE sljedeći (Svetličić i sur.2000; Ivošević DeNardis i sur. 2015): stanica alge dolazi u neposrednu blizinu živine kapi, sudara se s njenom površinom i prijanja na nju. Prilikom uspostave izravnog kontakta s međupovršinom dolazi do deformacije stanice, te kontaktna površina raste. Kada brojnost pora i veličina pora dosegnu kritičnu vrijednost, stanica puca, te dolazi do oslobađanja unutarstaničnog materijala koji se širi po međupovršini. Prianjanje i širenjem stanice po međupovršini dolazi do potiskivanja električnog naboja na međupovršini, što se registrira kao dobro definirani signal prianjanja pojedinačne stanice.

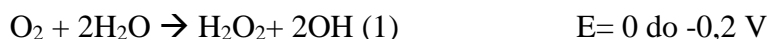


Slika 5. Mehanizam stanične adhezije i širenja na nabijenoj međupovršini KŽE (Ivošević DeNardis i sur. 2015).

Polarografija na KŽE

U polarografskim mjerenjima pobuda na radnu elektrodu (KŽE) je spora linearna promjena potencijala, dok je odziv polarogram tj. krivulja struja-potencijal na velikom broju kapi (Ivošević i Žutić 1997). Polarogram ima izražena dva vala koji su vezani za stupanj redukcije kisika te izrazitih vrtložnih strujanja (Žutić i sur., 1999.)

U prisutnosti elektroaktivne vrste u mjernoj otopini kao npr. otopljenog kisika dolazi do redoks procesa na međupovršini koji je opisan izrazom:



(Potencijali su izraženi prema normalnoj kalomel elektrodi)

Prisutnost površinski aktivnih čestica uzrokuje pojavnost nepravilnih perturbacija na polarogramu kao rezultat slučajnog sudara čestica s površinom KŽE. Pojavnost nepravilnih perturbacija očituju se samo u ograničenom području potencijala ovisno o površinskim svojstvima međupovršina u kontaktu.

Kronoamperometrija na KŽE

Kronoamperometrija je elektrokemijska metoda gdje je pobuda na radnu elektrodu (KŽE) konstantni potencijal, a odziv predstavlja krivulja struja-vrijeme (I-t). Kronoamperometrijska mjerenja na KŽE napravljena su u prisutnosti i odsutnosti kisika. Kada nema elektrodne redoks reakcije otopljenog kisika, primjenom potencijala na elektrodu dolazi do nabijanja površine tj. polarizacije i stvaranja dvosloja. Prianjanjem i širenjem stanica ili organskih kapljica po površini elektrode dolazi do potiskivanja naboja i dipola vode iz dvosloja, što dovodi do nastajanja dobro definiranog električnog signala prianjanja pojedinačne čestice.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati adhezijsko svojstvo stanica fitoplanktonske vrste *Dunaliella tertiolecta* Butcher u uvjetima *in vitro* uz promjenu saliniteta te prisutnost povećane koncentracije kadmija, primjenom elektrokemijske metode polarografije i kronoamperometrije na kapajućoj živinoj elektrodi. U radu je formulirana hipoteza da zbog rasta u različitim uvjetima saliniteta, te prisustva teškog metala kadmija u kulturi, stanica aktivira svoje adaptacijske mehanizme putem složenih biokemijskih procesa, što se manifestira na površinskim svojstvima stanice koja su od važnosti pri adhezijskom procesu i mjerljiva su elektrokemijskim metodama.

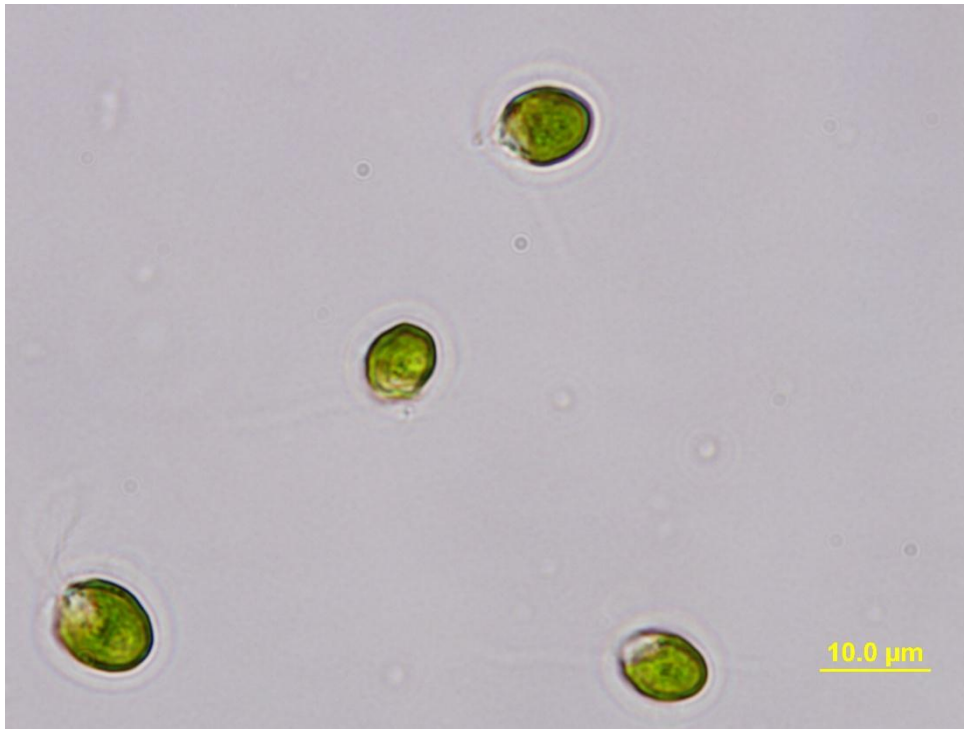
Specifični ciljevi:

- odrediti dinamiku rasta i fiziološku aktivnost stanica fitoplanktonske vrste *D. tertiolecta*
- odrediti područje potencijala adhezije na elektrodi, efikasnosti prijanjanja stanica na pozitivno i negativno nabijenoj elektrodi i odrediti stupanj polidisperznosti uzorka.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Istraživana vrsta

U istraživanju je korištena monokultura stanica *D. tertiolecta* Butcher, (Slika 6) kao modelni organizam.



Slika 6. Kultura stanica *D. tertiolecta* (Butcher) uzgajana u f/2 mediju, snimljeno svjetlosnim mikroskopom Olympus BX51 pod povećanjem 1000x.

Monokultura je nabavljena iz zbirke fitoplanktona od Provasoli-Guillard Center of Marine Phytoplankton, Bigelow Laboratory for Ocean Sciences, West Boothbay Harbour, Maine, USA. Alga je održavana i precjepljivana u sterilnim uvjetima tijekom stacionarne faze rasta.

3.2. Stanični uzgoj

Za uzgoj morskih algi korišten je obogaćeni f/2 medij pripremljen prema recepturi po Guillardu (1975.) čiji su osnovni sastojci morska voda, hranjive soli, metali u tragovima i vitamini. Morska voda uzorkovana je s postaje SJ 105 (sjeverni Jadran), dubine 20 m, 6.3.2018., te je čuvana na hladnom i tamnom mjestu kako bi se usporila aktivnost živih organizama. Prije pripreme samog medija, morska voda je filtrirana Millipore sustavom za

filtraciju kroz membranski filter čija je veličina pora 0,22 μm , u svrhu uklanjanja živih i ne živih čestica. U Erlenmeyerove tikvice od 250 mL stavljeno je 100 mL profiltrirane morske vode, te je dodano 100 μL otopine nitrata i tragova metala. Takve podloge zatim su sterilizirane 3 minute u mikrovalnoj pećnici, te 60 minuta pod UV lampom. Nakon što su ohlađene do sobne temperature, u sterilnim uvjetima dodano je 100 μL otopine fosfata i nekoliko kapi otopine vitamina kroz sterilni akrodisk 0.22 μm , te alikvot kulture stanica *Dunaliella tertiolecta*. Kulture stanica uzgajane su 5 dana u običnom f/2 mediju kako bi dostigle željenu brojnost, a zatim su presađene u modificirane medije, s dodatkom teškog metala kadmija, medij višeg saliniteta 38 ‰ i medij nižeg saliniteta 9 ‰. Kadmij je dodan u kulturu u kao stock otopina soli, kadmijevog nitrata $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$. Modificirani mediji s kadmijem pripremljeni su tako da je nakon opisane pripreme f/2 medija, dodan točno određen alikvot stock otopine $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ kako bi konačne koncentracije kadmija u tikvicama bile 10, 100 i 1000 $\mu\text{g/L}$. Modificirani medij nižeg saliniteta (NS) priređen je tako da je pomiješano 20 mL profiltrirane morske vode s 80 mL miliQ vode, a zatim su dodane ostale komponente hranjive podloge. Nakon pripreme modificiranih medija na opisan način, dodan je točno određen alikvot kulture stanica *D.tertiolecta* kako bi konačna koncentracija stanica u svim ispitivanim iznosila 2×10^4 st/mL. Tikvice su začepljene sterilnim vatenim čepovima kako ne bi došlo do kontaminacije uzoraka i stavljene su u komoru za stanični uzgoj. Stanične kulture su uzgajane u komori za uzgoj (GFL 1086) pri temperaturi od 18 °C, uz 20 okretaja/minuti i ciklusu osvjetljenja dan-noć 12-12 h. Intenzitet osvjetljenja u komori iznosi između 1400 i 1500 luxa. Svaka dva dana položaj tikvica sa staničnim kulturama u komori za uzgoj je promijenjen kako ne bi došlo do zasjenjenja pojedinih uzoraka. Svakih 48 sati mikroskopski je određena brojnost stanica u cilju praćenja dinamike rasta.

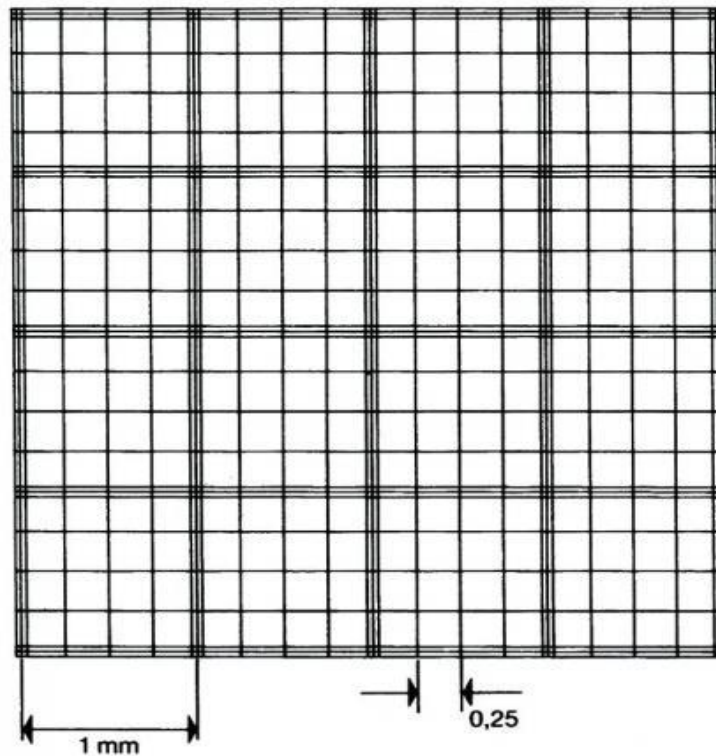
3.3. Instrumentacija

Gustoća stanica određena je pomoću epifluorescencijskog mikroskopa Olympus BX51, te hemocitometra Fuchs-Rosenthal, Fein-Optik Jena, Germany, dubine jažice 0,2 mm. Stanice su odvojene od hranjive podloge centrifugom HiCen 21, Herolab. Elektrokemijska mjerenja napravljena su na polarografskom analizatoru Princeton Applied Research, model 174A povezanim s računalom. Kartica DAQ AI-16-XE-50 (National Instruments) omogućila je prihvatanje analognih podataka, dok su dobiveni podaci analizirani korištenjem aplikacije razvijene u LabView 6. 1 programu.

3.4. Mikroskopska mjerenja

3.4.1. Određivanje gustoće stanica

Mikroskopski je određena brojnost stanica u kulturi. Pipetom je uzet homogeni alikvot uzorka od 995 μL u sterilnim uvjetima, te je dodano 50 μL neutraliziranog 36% formaldehida (neutraliziran dodatkom CaCO_3) za fiksaciju pokretnih stanica. Uzorak se nanosi u komoricu za brojanje (Fuchs-Rosenthalova komora) pomoću pipete i prekrije se pokrovnim staklom, te se stavlja pod svjetlosni mikroskop Olympus BX51. Fuchs-Rosenthalova komora prikazana je na Slici 7., ima površinu od 16 mm^2 (4 x 4), dubinu od 0,2 mm pa ukupni volumen komore iznosi 3,2 mm^3 .



Slika 7. Fuchs-Rosenthalova komora s označenim dimenzijama ćelija (preuzeto iz Electron microscopy sciences- catalog).

Prilikom brojanja uzete su u obzir i stanice koje se nalaze na graničnim linijama. Stanice su brojane metodom nasumično odabranih polja pod povećanjem 40 i 100 x.

3.4.2. Bojanje fluorescentnom bojom Nile Red

Nile Red ili Nilsko crvenilo korištena je lipofilna stanična boja za detekciju staničnih lipidnih dijelova i produkata uz pomoć fluorescencijske mikroskopije (Greenspan i sur. 1985.). Volumen od 0,5 mL uzorka kulture u eksponencijalnoj fazi rasta obojen je Nile Red bojom, te ostavljen da stoji par minuta. Uzorak je zatim stavljen na predmetno stakalce i pokriven pokrovnicom, nakon čega je promatran pod fluorescencijskim filtrima mikroskopa Olympus BX51.

3.4.3. Karakterizacija oblika stanice pod imerzijskim objektivom

U stacionarnoj fazi rasta stanice su promatrane pod imerzijskim objektivom mikroskopa Olympus BX51 u svrhu praćenja promjene oblika. 0,5 mL kulture je prvo koncentrirano centrifugiranjem (1500 g, 3 min) i pažljivim odvajanjem supernatanta. Uzorak stanice zatim je stavljen na predmetno stakalce i pokriven pokrovnicom. Kap imerzionog ulja stavljena je na pokrovnicu, a objektiv je pažljivo uronjen u ulje.

3.5. Izolacija stanica

Fitoplanktonske stanice odvojene su od hranjive podloge centrifugiranjem (1500 g, 3 min, HiCen 21, Herolab). Pipetom je pažljivo odvojen supernatant od stanica, koje su zatim isprane filtriranom morskom vodom i u njoj resuspendirane na uređaju Vortex-u, pa ponovno odvojene centrifugiranjem. Navedeni postupak ponovljen je dva puta.

3.6. Elektrokemijska mjerenja

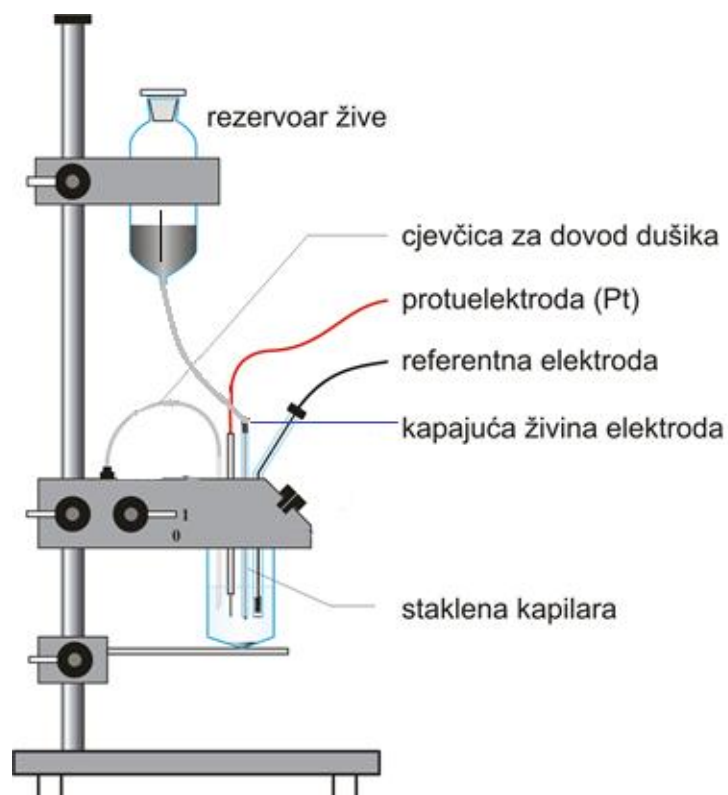
3.6.1. Čelija i elektrode

Elektrokemijska mjerenja napravljena su u standardnoj Methromovoj ćeliji volumena 50 mL.

Elektrokemijski sustav je troelektrodni i sastoji se od:

- Radne elektrode na kojoj se odvija elektrokemijska reakcija – kapajuća živina elektroda (KŽE)
- Referentne elektrode poznatog potencijala prema kojoj se izražava potencijal radne elektrode- Ag/AgCl (0,1M NaCl)
- Protuelektode za zatvaranje strujnog kruga s radnom elektrodom–platinska žica

Slika 8. prikazuje shematski prikaz tro-elektrodnog mjernog sustava.



Slika 8. Shematski prikaz tro-elektrodnog mjernog sustava.

Mjerenja su napravljena na kapajućoj živinoj elektrodi koja se sastoji od staklene kapilare povezane fleksibilnom cijevi s rezervoarom za živu. Na otvoru kapilare stvara se kap koja nakon što dosegne određenu veličinu, pada u otopinu. Vrijeme života živine kapi iznosi 2,0 s kod potencijala $-0,4\text{ V}$, brzina protoka žive kroz kapilaru je $6,1\text{ mg/s}$ uz visinu stupca žive 36

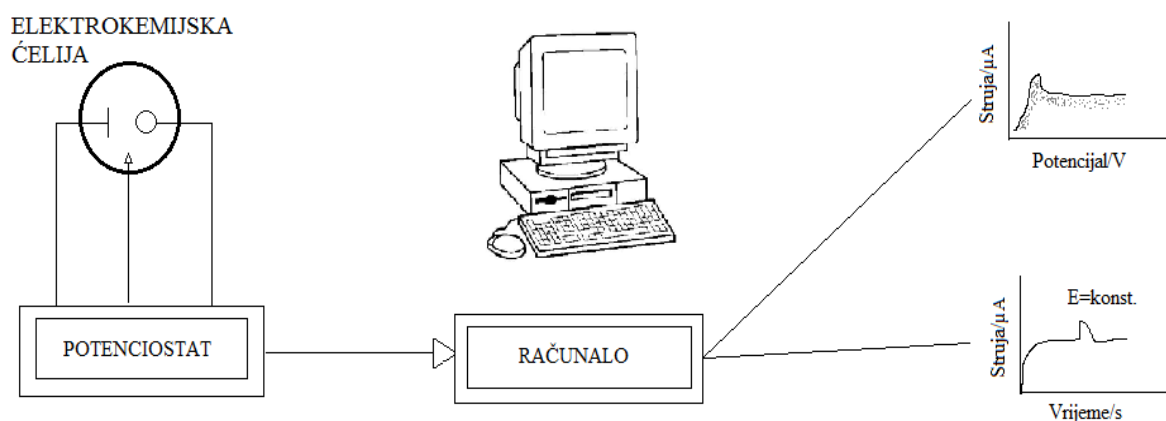
cm, dok je maksimalna površina živine kapi 4,7 mm². Referentna elektroda Ag/AgCl sadržavala je 0,1 M NaCl, a potencijal je izražen s obzirom na referentnu elektrodu-Ag/AgCl (0,1 M NaCl).

3.6.2. Priprema elektrolitne otopine

Osnovni elektrolit u kojem su napravljena mjerenja je 0,1M NaCl priređen razrjeđivanjem zasićene otopine NaCl (5,5 M) s MiliQ H₂O te dodatkom odgovarajućeg volumena puferske otopine 0,5 M NaHCO₃ za održavanje stalnog pH koji odgovara pH mora (8,2).

3.6.3. Postupak elektrokemijskog mjerenja

Prije početka samog elektrokemijskog mjerenja važno je obratiti pažnju na čistoću sistema (voda, ćelija, elektrode, stakleno posuđe). Čistoća cjelokupnog sistema provjerena je snimanjem polarograma redukcije kisika u čistom elektrolitu tako da struja iznosi $23 \pm 1 \mu\text{A}$, te snimanjem kronoamperometrijskih krivulja kod konstantnih potencijala a da na krivuljama ne bude perturbacija koje bi ukazivale na prisutnost mikrometarskih čestica u otopini. Nakon toga pristupilo se elektrokemijskom mjerenju staničnih suspenzija koje su bile izolirane 24. dan rasta (stacionarna faza rasta). U elektrokemijsku ćeliju dodan je alikvot ugušćenih stanica u osnovni elektrolit. Prvotno je snimljen polarogram redukcije kisika i kronoamperometrijske krivulje na 50 uzastopnih kapi u prisutnosti kisika kod konstantnih potencijala. Nakon čega je suspenzija stanica karakterizirana u odsutnosti kisika tako da se kroz elektrokemijsku ćeliju propušta struja dušika nekoliko minuta. Sva mjerenja napravljena su pri 20°C.

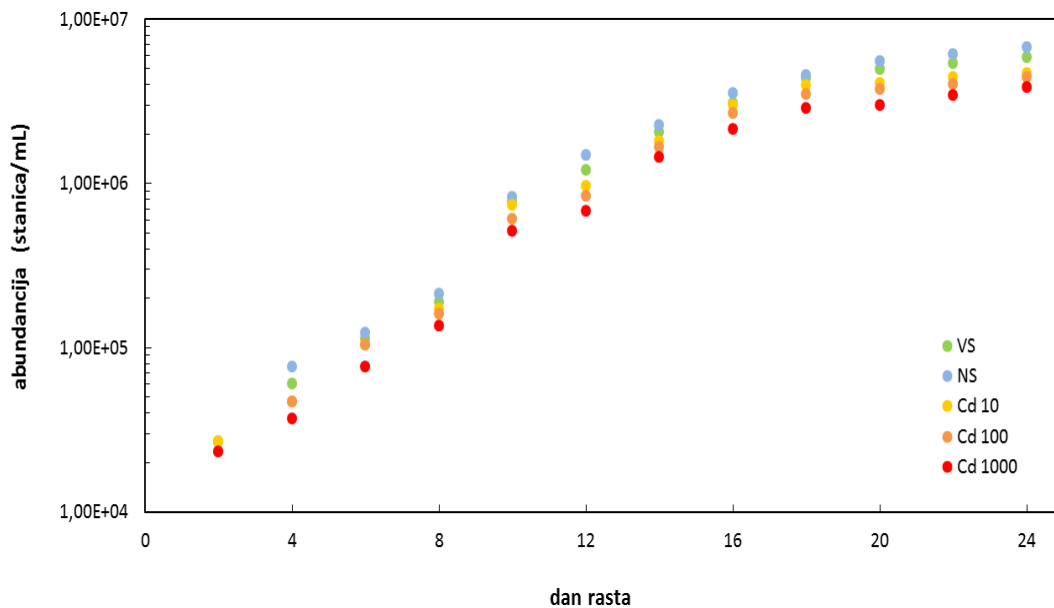


Slika 9. Shematski prikaz elektrokemijskog mjernog sustava.

4. REZULTATI

4.1. Rast stanica *D. tertiolecta* u različitim medijima

Rast stanica alge *Dunaliella tertiolecta* promatran je tijekom 24 dana. Ovisnost gustoće stanica o vremenu praćena je svaka dva dana, te je prikazana na Slici 10.



Slika 10. Krivulja rasta vrste *D. tertiolecta* u kulturama višeg saliniteta, nižeg saliniteta, te uz dodatak $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ u medij višeg saliniteta.

Krivulja rasta sastoji se od tri faze: početne lag faze privikavanja do koje dolazi ubrzo nakon inokulacije stanica, te, logaritamske ili faze eksponencijalnog rasta u kojoj je brzina rasta najveća, te stacionarne faze u kojoj je brzina rasta izjednačena s brzinom ugibanja stanica,. Stanice su do 18. dana rasta bile u eksponencijalnoj fazi, nakon čega je došlo do usporavanja rasta i ulaska u stacionarnu fazu.

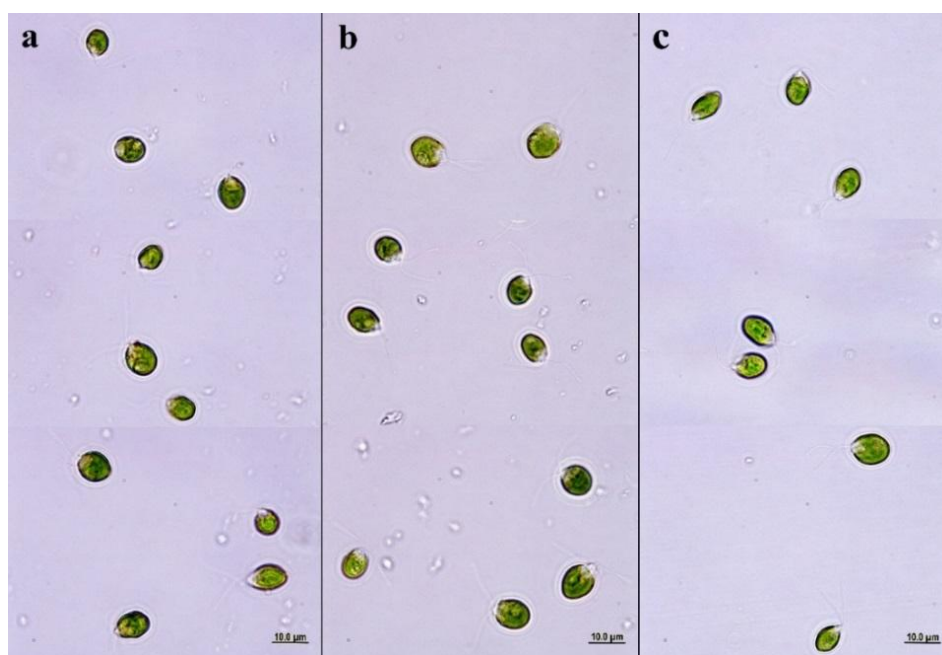
Monokultura stanica *Dunaliella tertiolecta* rasla je u svih pet navedenih medija, a prisustvo teškog metala kadmija u podlozi nije dovelo do potpune inhibicije njena rasta, već samo do smanjena u brojnosti. Najbrži rast i konačna najveća brojnost (koncentracija) stanica alge je u mediju nižeg saliniteta (9‰). U mediju nižeg saliniteta stanice su postigle abundanciju $6,8 \times 10^7$ st/mL u stacionarnoj fazi rasta. U mediju višeg saliniteta koji odgovara standardnom f/2 mediju stanice su rasle sporije nego u mediju nižeg saliniteta, no brže i njihova

abundancija bila je veća nego u modificiranim medijima s dodatkom kadmija. U mediju višeg saliniteta najveća abundancija stanica iznosila je $5,8 \times 10^7$ st/mL. Koncentracija stanica je veća u medijima u kojima je koncentracija kadmija manja. U mediju s najvećom koncentracijom kadmija ($1000 \mu\text{g/L}$) postignuta je najmanja brojnost stanica ($3,8 \times 10^7$ st/mL). U mediju u kojem je koncentracija kadmija bila $100 \mu\text{g/L}$ najveća abundancija stanica iznosila je $4,4 \times 10^7$ st/mL, dok je u mediju s koncentracijom kadmija $10 \mu\text{g/L}$, maksimalna abundancija iznosila $4,7 \times 10^7$ st/mL.

4.2. Mikroskopska karakterizacija stanica *D. tertiolecta* u suspenziji

4.2.1. Karakterizacija stanica pod imerzijskim objektivom

Stanice su karakterizirane pod imerzijskim objektivom svjetlosnog mikroskopa (povećanje 1000 x) u stacionarnoj fazi (slika 11).



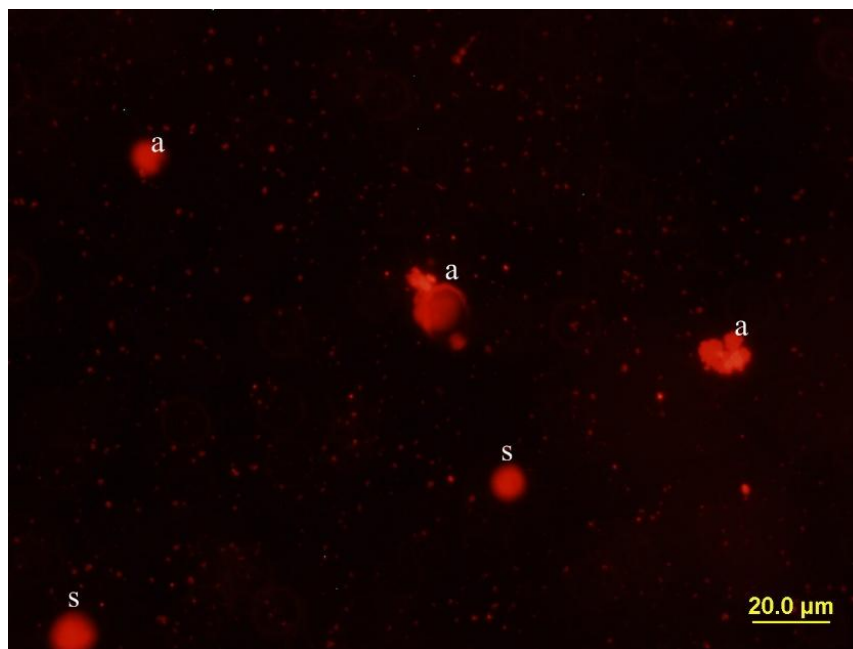
Slika 11. Stanice *Dunaliella tertiolecta* 18. dan rasta a-kontrola, b-niži salinitet, c-medij u kojemu je koncentracija kadmija $1000 \mu\text{g/L}$.

Pregledom preparata zapaženo je da su u mediju nižeg saliniteta (9‰) stanice okruglije i kao posljedica osmolarnosti, odnosno prodiranja vode u stanicu zbog koncentracijskog gradijenta između otopine niže ionske jakosti i stanice više ionske jakosti (Slika 11b). U mediju višeg

saliniteta (38 ‰) (f/2 medij) stanice su ujednačenog i pravilnog oblika (Slika 11a). Stanice u mediju s dodatkom kadmija 1000 mg/L nešto su manje od stanica u mediju višeg saliniteta (Slika 11c).

4.2.2 Karakterizacija stanica bojanjem fluorescentnom bojom

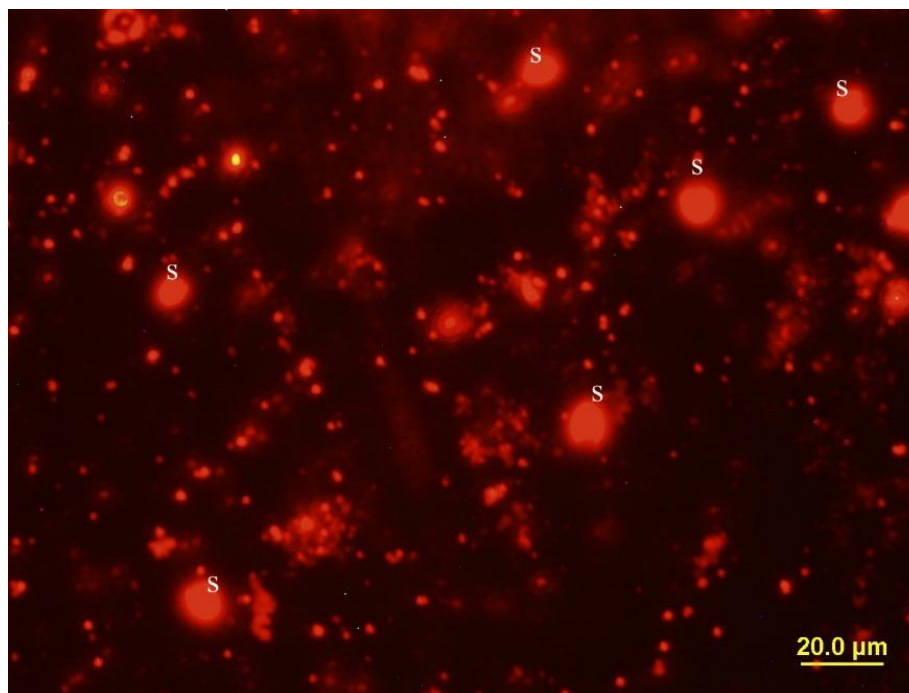
Stanice su obojene lipofilnom fluorescentnom bojom Nile red (Nilsko crvenilo) 24. dan rasta, u svrhu detekcije produkata metabolizma uslijed izlaganja stanica kadmiju kao stresoru. Na Slici 12 prikazana je fluorescentna mikrografija snimljena u kulturi stanica *D. tertiolecta* koje su rasle pod utjecajem kadmija koncentracije 10 µg/L uz Nile Red bojanje. Uz stanice (označene slovom s) vidljivi su novoformirani mikroagregati (označeni slovom a) koji su veći od samih stanica. Zbog specifičnog bojanja lipofilnom bojom možemo zaključiti da mikroagregati imaju lipidnu prirodu.



Slika 12. Fluorescentna mikrografija u kulturi stanica s dodatkom kadmija 10 µg/L, 24. dan uz Nile Red bojanje; a-agregati staničnih produkata, s-stanice *Dunaliella tertiolecta*.

Slika 13 prikazuje fluorescentnu mikrografiju snimljen u kulturi stanica koje su rasle u mediju s dodatkom kadmija 1000 µg/L uz bojanje s Nile Red. Stanice koje su pravilnog oblika (označene sa s), koji ih odvaja od ostatka raspršenih izlučevina vjerojatno produkata

metabolizma koji su lipidne prirode. Pri najvišoj koncentraciji kadmija uočavamo izrazitu pojavu agregata manjih od samih stanica.



Slika 13. Fluorescentna mikrografija u kulturi stanica u prisutnosti kadmija koncentracija $1000\mu\text{g/L}$ te uz Nile Red bojanje. s-stanice.

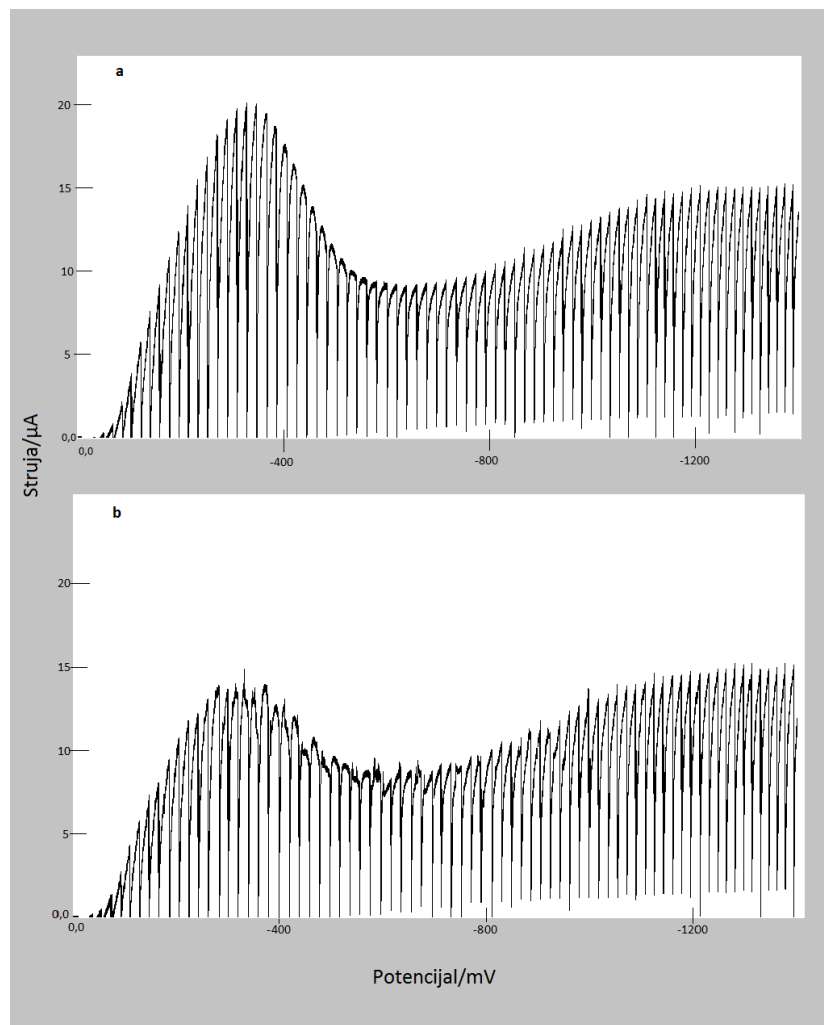
4.3. Elektrokemijska karakterizacija stanica *D. tertiolecta* u suspenziji

4.3.1. U prisustvu kisika

Provedena je elektrokemijska karakterizacija stanica monokulture *D. tertiolecta* 24. dan rasta, odnosno u stacionarnoj fazi, polarografskim i kronoamperometrijskim mjerenjima na KŽE u 0.1 M NaCl. Elektrolitna otopina 0,1 M NaCl izabrana je zbog toga što je u njoj polarografski maksimum redukcije kisika jače izražen nego u morskoj vodi zbog niže ionske jakosti i odsutnosti adsorbabilne organske tvari.

Polarografska mjerenja

Snimanjem polarograma redukcije kisika gdje se potencijal mijenja linearno u vremenu možemo pratiti interakciju stanica fitoplanktona s nabijenom KŽE. Slika 14 prikazuje polarogram redukcije kisika snimljen prije, u čistom elektrolitu (a) i nakon dodatka stanične suspenzije u otopinu elektrolita (b).



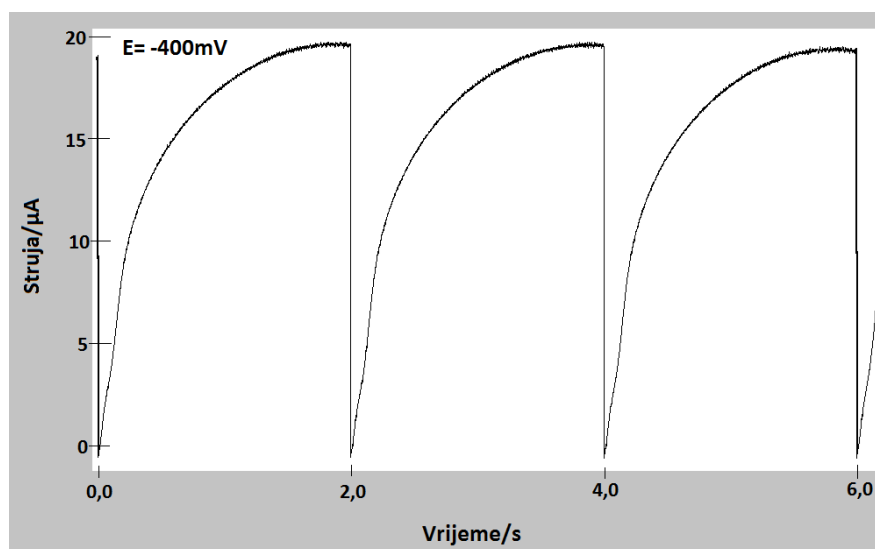
Slika 14. Polarogrami redukcije kisika snimljeni u a) 0,1M NaCl; b) suspenziji stanica *D. tertiolecta*.

Prije dodatka stanica, polarogram sniman u elektrolitu je savršeno gladak i pravilan, a struja zadovoljavajuća što upućuje da je sistem čist, bez prisustva organskih čestica. Prisutnost stanica fitoplanktona u osnovnom elektrolitu uzrokuje pojavu nepravilnih perturbacija tj.

signala na polarogramu redukcije kisika, koje se pojavljuju samo u području kritičnih potencijala od -100 mV do -1100 mV. Izvan tog područja potencijala (pozitivnije i negativnije) nema adhezije stanica na elektrodi te je polarogram pravilan kao u otopini osnovnog elektrolita.

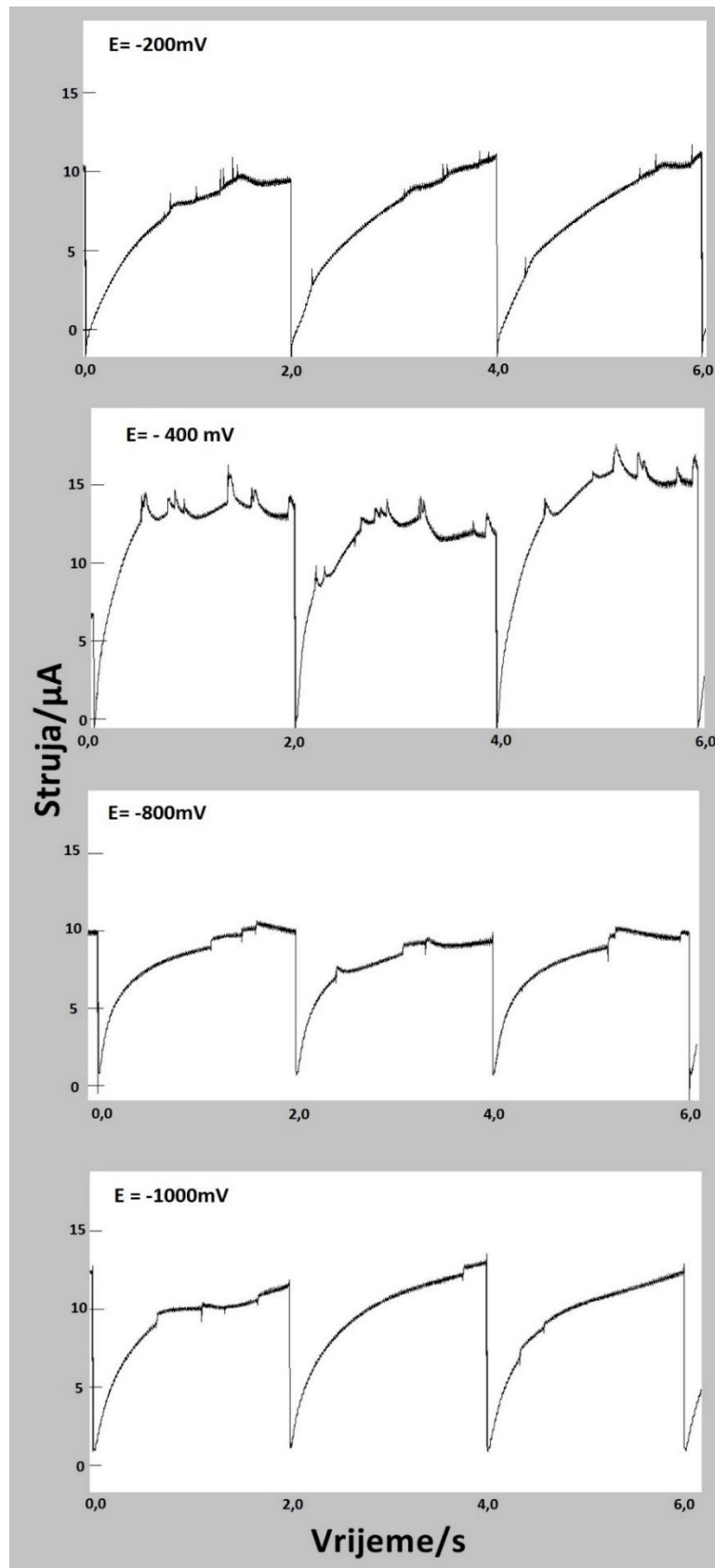
Kronoamperometrijska mjerenja

Snimljene su kronoamperometrijske krivulje kod različitih potencijala za svih pet medija. Na Slici 15 prikazana je I-t krivulja zabilježena u 0,1M NaCl. Kapi su pravilne i bez perturbacija, iznos struje je oko 20 μA , a kap traje 2 sekunde što su indikatori čistoće sistema, odnosno da u sistemu nema organske tvari.



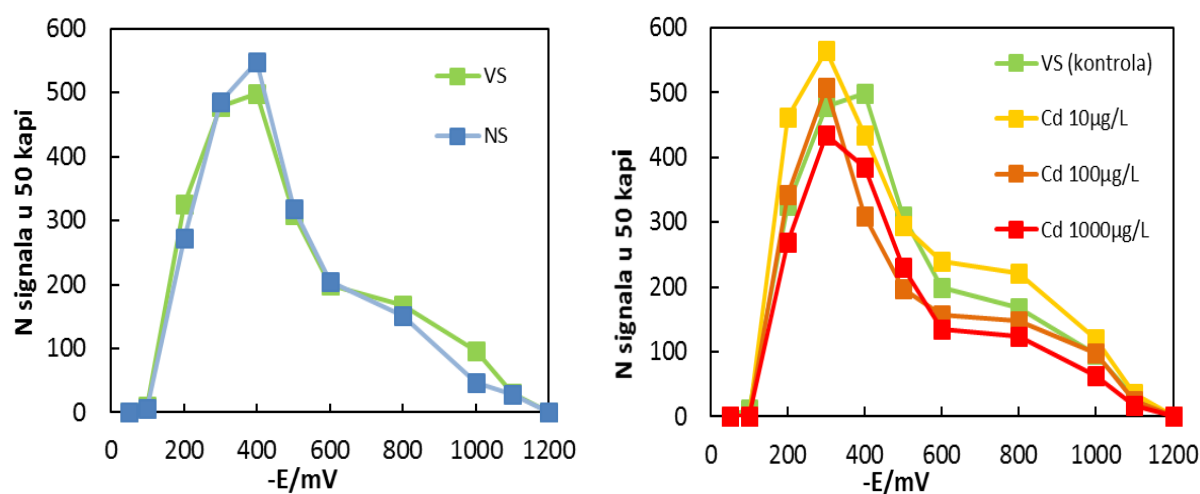
Slika 15. Tri uzastopne I-t krivulje snimljene u 0,1M NaCl.

Također su snimljene i I-t krivulje s dodatkom suspenzije stanica koje su rasle u f/2 mediju, pri različitim potencijalima od -200,-400, -800 te -1000 mV prikazane na Slici 16. Na tim reprezentativnim I-t krivuljama vidljivi su signali prijanjanja stanica superponirani na osnovnu struju. Svaki signal odgovara prijanjanju pojedinačne stanice na međupovršini elektroda/elektrolit. Pri potencijalu od -400mV struja je najviša, oko 15 μA , te su i signali razvijeni i bolje vidljivi. Pri potencijalima od -800 i -1000 mV, elektroda mijenja polarnost i postaje negativno nabijena, te amperometrijski signali stanica sadržavaju dodatnu kapacitetnu komponentu struje. Sve opisano vrijedi i za stanice uzgajane u modificiranim medijima.



Slika 16. Uzastopne I-t krivulje snimljene u suspenziji stanica *D. tertiolecta* koje su rasle u f/2 mediju (salinitet 38‰) pri potencijalima od -200,-400,-800 i -1000 mV u prisustvu kisika.

Ovisnost broja amperometrijskih signala stanica o potencijalu snimljena u uvjetima višeg, nižeg saliniteta, te kod dodatka kadmija raznih koncentracija otopina prikazana je na slici 17.



Slika 17. Ovisnost broja signala stanica snimljenih na 50 kapi o potencijalu kod višeg (VS), nižeg (NS) saliniteta i uz dodatak raznih koncentracija kadmija (10, 100, 1000 µg/L).

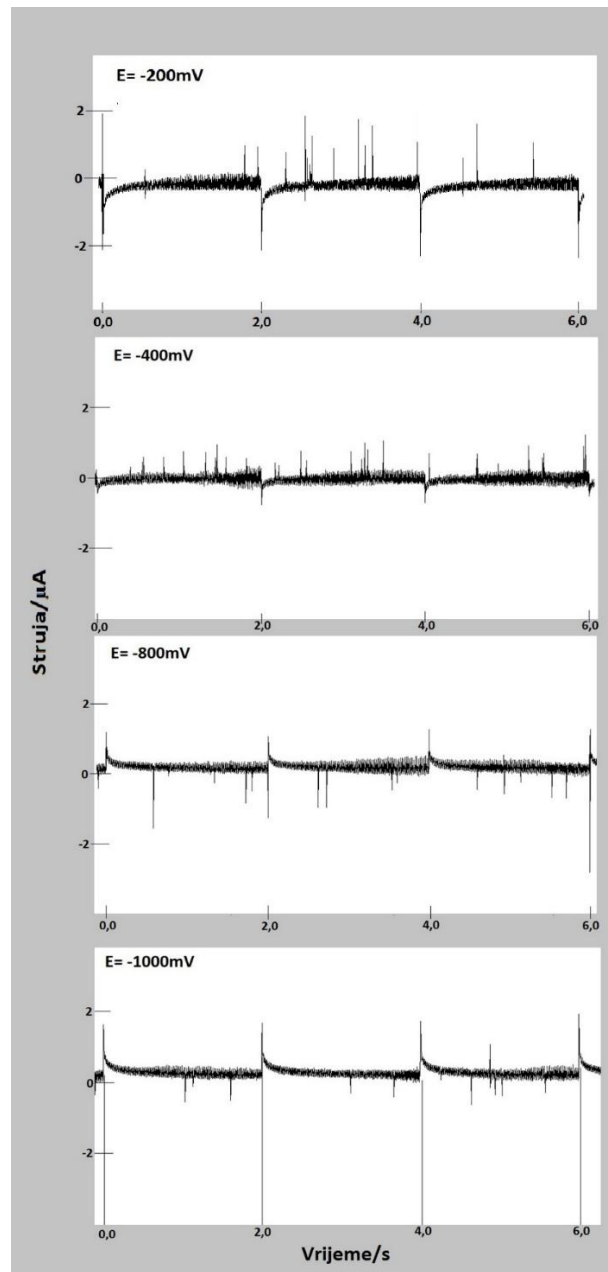
Amperometrijski signali pojavljuju se samo u rasponu kritičnog potencijala od -100 mV do -1100 mV. Izvan navedenog raspona potencijala (pozitivnije ili negativnije) nema adhezije stanica na elektrodi, te je frekvencija signala nula. Maksimalan broj signala u prisustvu kadmija pojavljuje se pri potencijalu -300 mV, dok se kod kontrole, maksimum signala očitava pri potencijalu od -400 mV. Pomakom potencijala pozitivnije ili negativnije od -300 i -400 mV broj signala adhezije se smanjuje. Brojnost signala prianjanja je oko dva puta veća na pozitivno nabijenoj elektrodi (-400 mV) nego na negativno nabijenoj elektrodi (-800 mV), što ukazuje na utjecaj elektrostatskih interakcija između pozitivno nabijene elektrode i negativno nabijene stanice. Zabilježeni su signali prianjanja stanica kod potencijala -500 mV (naboj na elektrodi nula, maksimalna napetost međupovršine) zbog doprinosa Faradayske struje uslijed redukcije molekularnog kisika iz otopine koja pojačava odziv na elektrodi.

4.3.2. Bez prisustva kisika

Suspenzija stanica propuhivana je dušikom u elektrokemijskoj ćeliji oko 1 minutu, u svrhu uklanjanja otopljenog kisika iz otopine 0.1M NaCl. Nakon čega su snimane kronoamperometrijske krivulje.

Kronoamperometrijska mjerenja

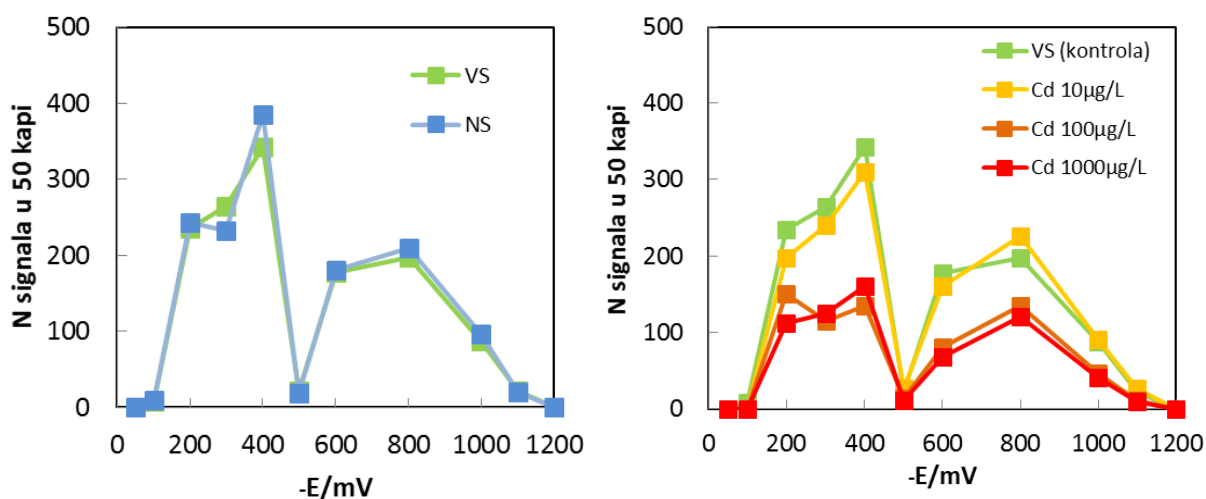
U cilju preciznije karakterizacije adhezijskih svojstava stanica snimljene su kronoamperometrijske krivulje u odsutnosti kisika. Pri narinutom potencijalu na elektrodi, frekvencija signala ukazuje na koncentraciju čestica u suspenziji, dok amplituda signala ukazuje na veličinu čestica i polidisperznost uzorka. Na slici 18 prikazane su I-t krivulje sa signalima prijanjanja stanica pri potencijalima od -200,-400,-800 i -1000 mV.



Slika 18. I-t krivulje snimljene u suspenziji stanica *D. tertiolecta* koje su rasle u f/2 mediju (salinitet 38‰) pri potencijalima od -200,-400,-800 i -1000 mV bez prisustva kisika.

Vidljivo je da kad je uklonjen kisik iz mjerne otopine, amplituda signala je znatno manja u odnosu na amplitude signala prijanjanja stanica snimljene u prisutnosti kisika jer nema redoks reakcije otopljenog kisika koji pojačava signal prijanjanja. U odsutnosti kisika signali prijanjanja stanica sadržavaju samo struju potiskivanja naboja dvosloja.

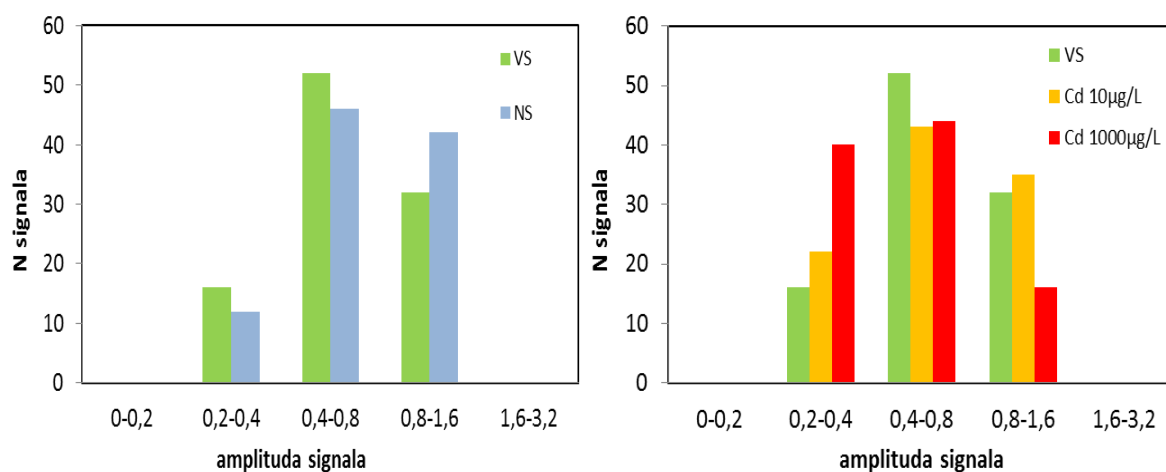
Na slici 19. prikazana je ovisnost broja signala prijanjanja o primijenjenom potencijalu na elektrodi u uvjetima višeg, nižeg saliniteta te kod raznih koncentracija kadmija.



Slika 19. Ovisnost broja signala amperometrijskih signala stanica na 50 kapi o potencijalu u uvjetima višeg, nižeg saliniteta, te u prisutnosti kadmija u kulturi.

Određeno je područje kritičnog potencijala na elektrodi u kojem dolazi do prijanjanja stanica; za kontrolni medij (VS) to je od -110 mV do -1190 mV, a za medij s najvećom koncentracijom kadmija od -120mV do -1150mV. U navedenom području potencijala kod kojeg dolazi do adhezije stanica brojnost signala prijanjanja se mijenja. Izvan područja kritičnog potencijala nema adhezije na elektrodi, te je frekvencija signala jednaka nuli. Brojnost signala prijanjanja stanica je blizu maksimalne vrijednosti kod potencijala -400 mV (blizina elektrokapilarnog maksimuma). Kod potencijala -500 mV kada je naboj na elektrodi blizu nule (elektrokapilarni maksimum), brojnost signala prijanjanja pada na minimum. Pri potencijalima pozitivnijim od -500 mV uočen je veći broj signala jer je naboj na međupovršini pozitivan te prevladava jako elektrostatsko privlačenje s negativno nabijenom stanicom. Kod potencijala negativnijih od -500 mV gdje je elektroda negativno nabijena uočavamo manji broj signala zbog elektrostatskog odbijanja.

Analizom amplitude pojedinačnih signala prijanjanja možemo dobiti informaciju o relativnoj veličini čestice na elektrodi, odnosno o stupnju polidisperznosti ispitivanog uzorka.



Slika 20. Raspodjela amplituda signala stanica snimljenih kod potencijala -400mV u odsutnosti kisika.

Za primjer su uzete I-t krivulje snimljene u suspenziji stanica uzgajanih u različitim medijima pri potencijalu -400mV bez kisika. U kontrolnom mediju (VS) najviše je signala amplitude 0,4-0,8 µA, dok se u mediju nižeg saliniteta (NS) javlja nešto više većih signala u odnosu na kontrolu amplitude 0,8-1,6 µA. Amplituda signala prijanjanja proporcionalna je veličini čestice. Zbog osmolarnosti stanice u mediju nižeg saliniteta su nešto veće od onih u mediju višeg saliniteta, što objašnjava veći broj signala veće amplitude u mediju sniženog saliniteta. U prisutnosti kadmija u staničnoj kulturi, također je najviše signala amplitude 0,4-0,8 µA koje pripisujemo signalima prijanjanja stanica. No, u mediju s koncentracijom kadmija 10 µg/L više je signala amplitude 0,8-1,6 µA u odnosu na kontrolu. Dok je u mediju s najvećom koncentracijom kadmija 1000 µg/L, više signala male amplitude 0,2-0,4 µA u odnosu na kontrolu. Te frakcije većih i manjih čestica možemo pripisati produktima staničnog metabolizma i lučenja uslijed izlaganja stanica stresu što je potvrđeno mikroskopskom analizom istih uzoraka uz pomoć bojanja fluorescentnim bojama.

5. RASPRAVA

U ovom radu istražen je odgovor morskog fitoplanktona odnosno vrste *D. tertiolecta* pri različitom salinitetu i prisustvu teškog metala kadmija u kulturi u smislu praćenja brzine rasta, fiziološkog odgovora, oblika stanice te adhezijskog ponašanja na elektrodi. Odabrane vrijednosti saliniteta od 38 ‰ (morska voda) i 9‰ (bočata/slatka voda) odgovaraju uvjetima prirodnih staništa u kojima *D. tertiolecta* kao eurihalina vrsta (Katz i sur. 2010) može rasti i živjeti. Očekivano, *D. tertiolecta* rasla je u oba hranjiva medija, no u hranjivom mediju nižeg saliniteta postigla je tek nešto veću brojnost i brži rast. Elektrokemijskom karakterizacijom staničnih suspenzija i na temelju distribucija amplitude signala, uočeno je da postoji više stanica u većoj veličinskoj frakciji kod nižeg saliniteta u odnosu na kontrolni medij višeg saliniteta. Razlog tome je da je stanica nešto veća u mediju nižeg saliniteta. Raja i suradnici, 2007. zaključili su da je mehanizam kojim se alga *Dunaliella* prilagođava na širok raspon saliniteta baziran na promjenama u intracelularnoj koncentraciji glicerola. Glicerol je osmolit koji je glavni zaslužan za podnošenje osmotskog stresa, te njegova intracelularna koncentracija raste kad je stanica izložena osmotskom stresu kao što je npr. rast u mediju visokog saliniteta (Shariati, 2003; Hadi et al., 2008). U većine biljaka i cijanobakterija visoke koncentracije soli inhibiraju fotosintezu, dok kod stanica *Dunaliella* dolazi do ubrzavanja fotosintetske aktivnosti, te se nastali ugljik koristi kao izvor biosinteze glicerola. Katz i suradnici 2010. iznijeli su zaključak da je za prilagodbu na visok salinitet, osim masivne akumulacije glicerola, važna i sposobnost stanice *D. tertiolecta* u eliminaciji natrijevih iona uz pomoć posebnih ion-regulirajućih proteina, što je proces koji zahtjeva velika metabolička ulaganja. Osim glicerola *D. tertiolecta* sposobna je akumulirati i velike količine β -karotena u stanici u uvjetima visokog saliniteta i manjka nutrijenata, jakog intenziteta svjetlosti povišene temperature (Shariati i Hadi., 2011.).

Također, zamijećena je i promjena u obliku stanice, tako da su stanice u mediju nižeg saliniteta nešto veće i okruglog oblika, od onih u mediju višeg saliniteta gdje su elipsoidnog oblika. Ta pojava vjerojatno je rezultat osmoregulacije, odnosno bubrenja stanica uslijed pasivnog ulaska vode u stanicu zbog razlike u koncentracijskom gradijentu stanice i njene okoline. Naime, specifičnost stanice *D. tertiolecta* je u izostanku celulozne stanične stijenke što rezultira time da je stanična morfologija pod snažnim utjecajem osmotskih promjena (Oren, 2005.). Stoga, stanice bez krute stanične stijenke moraju održavati izoosmotske uvjete s njihovim vanjskim okolišem (Jahnke i White, 2003.). Jahnke i White su istražili da li je u fitoplanktonskih organizama tolerancija na stres salinitetom usko povezana s količinom

antioksidacijskih enzima i supstrata kao što je to slučaj u viših biljaka. Rezultati su pokazali da je oksidativni stres u stanicama *D. tertiolecta* prisutan pri oba ekstremna saliniteta, niskom 0,05 mol/L i visokom 3,0 mol/L NaCl, što podrazumijeva i promjene u antioksidacijskim enzimima i supstratima. No, velike su specifične razlike u vrsti enzima i supstrata između hipo i hipersalinih uvjeta. Također, pokazano je da volumen stanice udvostručen u uvjetima niskog saliniteta (0,05 mol/L). Takagi i suradnici, 2006. su otkrili da se u stanici *D. tertiolecta* koja raste u uvjetima visokog saliniteta povećava sadržaj lipida za 70%, u odnosu na stanicu koja raste u optimalnim uvjetima saliniteta. Također, poznato je i da stres salinitetom utječe na profil masnih kiselina u stanicama fitoplanktona.

Nadalje, ispitan je utjecaj prisutnosti teškog metala kadmija u nekoliko odabranih koncentracija u kulturi na stanice *D. tertiolecta*. Rezultati pokazuju da prisutnost teškog metala kadmija u kulturi nije u potpunosti inhibiralo rast fitoplanktona, no u odnosu na kontrolni medij, njihova je brojnost smanjena i rast sporiji. Najmanja brojnost stanica i najsporiji rast zapaženi su u mediju s najvećom koncentracijom kadmija od 1000 µg/L. Činjenica da nije došlo do potpune inhibicije rasta u skladu je s navedenim literaturnim podacima o otpornosti vrste *D. tertiolecta* (Fisher i sur., 1984). Fisher i suradnici (1984) zaključili da je *D. tertiolecta* pokazala otpornost na prisutnost Zn, Ag i Hg u hranjivom mediju, odnosno da je ta vrsta mogla podnijeti veće koncentracije teških metala u odnosu na ostale ispitivane fitoplanktonske vrste, kokolitoforida, dijatomeje, te cijanofita. Navedena otpornost *D. tertiolecta* na teške metale u okolišu postignuta je na dva načina; isključivanjem metala (imajući manje metal-reaktivne površine), te unutarnjom razgradnjom metala kako bi se izbjeglo izlaganje osjetljivih dijelova stanice metalima. Belghith i sur. (2015) postavili sličan pokus, te su također iznijeli zaključak da se povećanjem koncentracije kadmija u kulturi, smanjuje brojnost stanica i sadržaj klorofila *a*. Nadalje, zaključili su da prisutnost kadmija u kulturi stimulira sintezu nekih sekundarnih metabolita, od strane stanice, kao što su polifenoli, flavonoidi i karotenoidi.

Imani i sur. su (2011) istraživali sposobnost *D. tertiolecta* u bioremedijaciji, odnosno u eliminaciji teških metala iz okoliša uz pomoć same alge. Rezultati su pokazali da je *Dunaliella* koristan organizam u bioremedijaciji jer dok uobičajenim kemijskim postupcima remedijacije poput precipitacije i izmjene iona u okolišu još uvijek zaostaju toksični produkti, bioremedijacijom uz pomoć *D. tertiolecta* nema toksičnih ostataka.

Preliminarni rezultati (B. Gyurscik 2018, izvještaj) ukazuju da se uslijed stresa s teškim metalom kadmijem stanica *D. tertiolecta* prilagođava na uvjete stresa tako da dolazi do

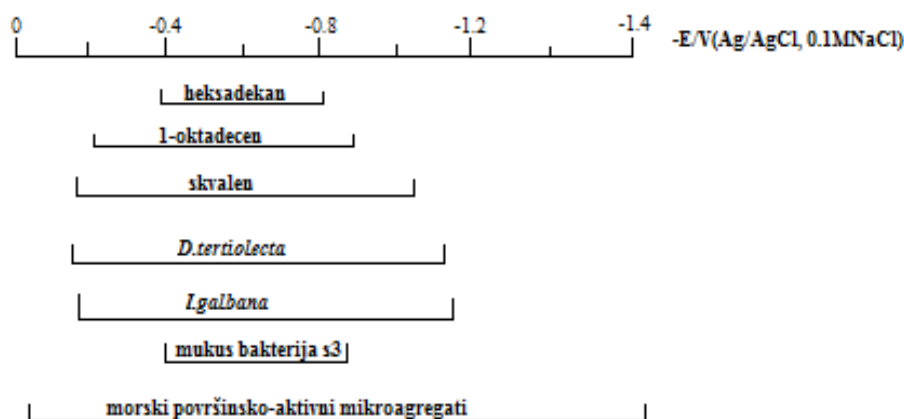
ekspresije specifičnih membranskih proteina između 20-25 kDa koji su identificirani kao „chlorophyll binding protein“ koji vjerojatno imaju važnu ulogu u regulaciji i staničnoj adaptaciji na stres teškim metalom.

Mikroskopskom karakterizacijom uočeno je da su stanice alga kod najveće koncentracije kadmija nešto manje, te da imaju narušenu strukturu vanjskog omotača stanice. Molekularnim bojanjem staničnih kultura pokazana je prisutnost velikog broja lipofilnih mikrometerskih čestica, što je vjerojatno rezultat fiziološkog odgovora stanica na stres s kadmijem. Chen i Jiang (2009) su prilikom izlaganja stanica *D. tertiolecta* osmotskom šoku opazili postojanje lipidnih kapljica na površini stanice, te zaključili da stanica uslijed izlaganja stresu izlučuje lipidne čestice. Rezultati se slažu s elektrokemijski dobivenim rezultatima vezanim za distribuciju amplitude signala, te postojanju dominantne frakcije čestica 0,2-0,4 μA koje imaju površinsko-aktivni karakter.

Kozarac i suradnici (1989) obrazložili da vrsta i sadržaj oslobođenih površinsko-aktivnih tvari od strane stanica ovise i o sastavu hranjivog medija u kojem su stanice uzgajane. U hranjivom mediju bez tragova metala i kelatora zabilježen je visok kapacitet kompleksiranja, no niska površinska aktivnost, dok je u hranjivom mediju s tragovima metala i bez kelatora zabilježena velika koncentracija površinsko-aktivnih tvari, ali i kapacitet kompleksiranja.

Nadalje, ispitano je adhezijsko svojstvo stanica na nabijenoj međupovršini, za stanice koje su rasle kod različitih koncentracija kadmija. Adhezijsko ponašanje stanice na modelnoj međupovršini je posljedica površinskih svojstava stanice, koja uslijed djelovanja stresora mogu biti promijenjena. Elektrokemijska karakterizacija suspenzija stanica pokazuje da je područje prijanjanja stanica slično za sve ispitivane medije, no uočene su promjene u obliku, trajanju i amplitudama pojedinačnih signala stanica. Promjene u veličini i obliku signala postoje zbog različite prirode organskih čestica u analiziranim suspenzijama, ali isto tako se mogu biti posljedica adaptacije stanice na novonastale uvjete pri čemu dolazi do promjene staničnih površinskih svojstva što se reflektira na kinetiku adhezijskog procesa. Neovisni preliminarni rezultati (Ružić i sur., 2018, izvještaj) upućuju da je kinetika adhezije stanice *D. tertiolecta* koje su rasle kod niže koncentracije kadmija gotovo dva puta sporija nego u uvjetima kada je koncentracija kadmija bila maksimalna tj. kod 1000 $\mu\text{g/L}$, što upućuje da je vjerojatno došlo do promjene površinskih svojstava stanica u stresnim uvjetima. Stanična ovojnica predstavlja biomedupovršinu preko koje je stanica odvojena od medija, komunicira s okolinom, odvija se izmjena tvari, te štiti stanicu. Površinska svojstva stanica imaju presudnu ulogu u međupovršinskim procesima kao npr. adheziji. Slika 5.1. prikazuje shematski

adhezijsko ponašanje kapljica organskih tekućina različitog stupnja hidrofobnosti, stanica fitoplanktona i bakterija i prirodnih površinski-aktivnih mikroagregata na nabijenoj međupovršini KŽE/vodena otopina elektrolita.



Slika 21. Shema adhezijskog ponašanja kapljica organskih tekućina, stanica i prirodnih površinski-aktivnih mikroagregata na nabijenoj međupovršini KŽE/0.1M NaCl.

Iz slike 21 vidljivo je da ugljikovodik heksadekan koji je hidrofoban ima interakciju s elektrodom u uskom području potencijala. S povećanjem dužine lanca ugljikovodika ili zbog razgranatosti lanca, kapljice organskih tekućina postaju sve hidrofilnije, te se širi područje potencijala interakcije s nabijenom međupovršinom.

U neobjavljenim istraživanjima (F. Pilet i sur. u postupku objavljivanja) utvrđeno je da se površinska svojstva stanica *D. tertiolecta* mijenjaju tijekom samog rasta tj. između eksponencijalne i stacionarne faze rasta.

Poznavanje površinskih svojstava stanice je od važnosti da se bolje razumiju strategije prilagodbe stanice na uvjete stresa. Stanični odgovor dijatomeja u sjevernom Jadranu uslijed nedostatka hranjivih tvari manifestira se lučenjem biopolimera predominantno polisaharidnih koje u određenim oceanografskim i hidrodinamskim uvjetima u akvatoriju mogu dovesti do nastanka morskog gela na kilometarskoj skali. Pletikapić i sur. (2012) ispitali su strukturnu i nanomehaničku karakterizaciju stanica dijatomeja primjenom mikroskopije atomskih sila kako bi se dokazalo porijeklo nastanka morskog gela.

Razumijevanje mehanizama adaptacija stanica fitoplanktona u uvjetima stresa *in vitro* može doprinijeti unapređenju znanja o njihovom preživljavanju i prilagodbi na prirodnim međupovršinama u vodenim sustavu pod opterećenjem. Glavni abiotički čimbenici (temperatura, svjetlost, salinitet, količina nutrijenata) pokazuju znatna kolebanja uzrokovana globalnim klimatskim promjenama i sve više prisutnim antropogenim učinkom, što pak uzrokuje promjene u raznolikosti, brojnosti i fiziologiji fitoplanktonskih organizama. Budući da su fitoplanktonski organizmi temelj svakog hranidbenog lanca u vodenim okolišima, navedene promjene brzo se očituju i na višim trofičkim nivoima.

5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu ispitan je utjecaj saliniteta i teškog metala kadmija na adhezijska svojstva morskog fitoplanktona *D. tertiolecta* u kulturi, primjenom elektrokemijske metode amperometrije na kapajućoj živinoj elektrodi, te optičke mikroskopije.

U uvjetima nižeg saliniteta (9‰), određena je nešto veća konačna abundancija stanica *D. tertiolecta* koje su okruglijeg oblika za razliku od onih u kulturi višeg saliniteta (38 ‰). Analizom pojedinačnih signala prijanjanja uočen je porast brojnosti čestica veće frakcije u odnosu na kontrolu, što upućuje da su stanice kod nižeg saliniteta veće dimenzije. S obzirom da područje potencijala adhezije i efikasnost prijanjanja stanica na pozitivno i negativno nabijenoj elektrodi pokazuju slaganje kod nižeg i višeg saliniteta, to ukazuje da su adhezijska svojstva stanica ostala sačuvana.

U prisustvu teškog metala kadmija u kulturi dolazi do usporavanja rasta stanica, odnosno konačna abundancije stanica je oko 2 puta manja kod najveće koncentracije kadmija od 1000 µg/L. Mikroskopski je zapaženo da su stanice koje su rasle u prisustvu kadmija nešto manje dimenzije i da imaju narušeniji oblik od onih koje su rasle u mediju saliniteta 38 ‰. Područje potencijala adhezije stanica na pozitivnoj i negativno nabijenoj elektrodi ne pokazuje značajna odstupanja. Efikasnost prijanjanja stanica na nabijenu elektrodu se smanjuje s porastom koncentracije kadmija, što je posljedica adsorpcije predominantnih površinski-aktivnih molekula na elektrodu koje blokiraju detekciju adhezije pojedinačnih stanica.

Dobiveni rezultati mogu doprinijeti razumijevanju strategija preživljavanja i adaptacije fitoplanktona na okolišne pritiske u ekosustavu.

7. LITERATURA

1. Adenan N. S., Yusoff F. M. i Shariff M. (2013): Effect of salinity and temperature on the growth of Diatoms and Green Algae. *J. Fish. Aquat. Sci.* **8**: 397–404.
2. Anderson W. i Parsons R. (1957): *Proc. 2nd Intern. Congress Surface Activity*.
3. Bard A. J., Faulkner L. R., Leddy J. i Zoski C. G. (1980): *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. Wiley.
4. Belghith T., Athmouni K., Bellassoued K., El Feki A. i Ayadi H. (2015): *Physiological and biochemical response of *Dunaliella salina* to cadmium pollution*. Springer Science, Business Media Dordrecht.
5. Ben-Amotz A. (1996): Effect of low temperature on the stereoisomer composition of β - carotene in the halo-tolerant alga *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta). *J. Phycol.* **32**: 272–275.
6. Borowitzka M. A. i Borowitzka L. J. (1988): *Dunaliella*. U: Borowitzka M. A. i Borowitzka L. J. *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press. Str. 27-58.
7. Chen H., Jiang J. G. (2009): Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *J. Cell Physiol.* **219**: 251–8.
8. Coesel S. N., Baumgartner A. C., Teles L. M., Ramos A. A., Henriques N. M., Cancela L. i Varela J. C. S. (2008): Nutrient limitation is the main regulatory factor for carotenoid accumulation and for Psy and Pds steadystate transcript levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) exposed to high light and salt stress. *Mar. Biotechnol.* **10**: 602–611.
9. Ćosović B. (1985): *Aqueous surface chemistry: Assessment of adsorption characteristics of organic solutes by electrochemical methods*. U :Stumm.W. *Chemical processes in lakes*. str. 55-80.
10. DeLorenzo M. E. (2009): *Utility of Dunaliella in Ecotoxicity Testing*. U: Oren, A. *The Alga Dunaliella. Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology*, str.495-512.
11. Falkowski P. G., Katz M. E., Knoll A. H., Quigg A., Raven J. A., Schofield O. i Taylor. F. J. R. (2004): The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science* **305**: 354-360.
12. Fava G. i Martini E. (1988) : Effect of inbreeding and salinity on quantitative characters and asymmetry of *Tisbe holothuriae* (Humes). *Hydrobiologia* **167**: 463-467.
13. Field, C. B., M. J. Behrenfeld, J. T. Randerson, i P. Falkowski. (1998): Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* **281**: 237–240.
14. Fisher S. N., Bohe M. i Teyessie J. L. (1984.) Accumulation and toxicity of Cd, Zn, Ag and Hg in four marine phytoplankters. *Marine Ecology. Progress series.* **18**: 201-213.
15. Fung I., Doney S. C., Lindsay K. i John J. (2008): Evolution of carbon sinks in a changing climate. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, **102** : 201–11.
16. Ghoshal D., Mach D., Agarwal M. i Goyal A. (2002): Osmoregulatory isoform of dihydroxyacetone phosphate reductase from *Dunaliella tertiolecta*: Purification and characterization. *Protein. Expr. Purif.* **24**: 404-411.

17. Ginzburg M. (1987): *Dunaliella*: a green alga adapted to salt. *Adv. Bot. Res.* **14**: 95-183.
18. Ginzburg M. i Ginzburg B. Z. (1981): Interrelationships of light, temperature, sodium chloride and carbon sources in growth of halotolerant and halophylic strains of *Dunaliella*. *Br. Phycol. J.* **16**: 313-324.
19. Greenspan P., Mayer E.P. i Fowler S. D. (1985): Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell. Biol.* **100** : 965-73.
20. Guillard R. R. L. (1975): Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. U: Smith W. L. i Chanley M. H. (ur.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. New York, Plenum Press, str. 26-60.
21. Gyurscik B. (2018): Izvještaj, Algae under stressors-Protein profiling, International Visegrad Fund.
22. Häder D.-P. i Gao K. (2015): Interactions of anthropogenic stress factors on marine phytoplankton. *Frontiers in Environmental Science* **3**: 1–14.
23. Hadi M. R., Shariati M. i Afsharzadeh S. (2008): Microalgal biotechnology: carotenoid and glycerol production by *Dunaliella* sp. algae isolated from the Gave khooni salt marsh, Iran. *Biotech. Bioproc. Eng.* **13**: 540-544.
24. Hamburger C. (1905): Zur Kenntnis der *Dunaliella salina* und einer Amöbe aus Salinenwasser von Cagliari. *Arch. f. Protistenkd.* **6**: 111-130.
25. Hemaiswarya S., Raja R., Ravi Kumar R., Ganesan V. i C. Anbazhagan (2011): Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **27** (8): 1737–1746
26. Heyrovsky J. i Kuta J. (1965): *Principles of Polarography*. Czechoslovak Academy of Science, Prague.
27. Hosseini Tafreshi A. i Shariati M. (2006): Pilot culture of three strains of *Dunaliella salina* for b-carotene production in open ponds in the central region of Iran. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 1003–1009.
28. Hozić Zimmermann A. (2007): Elektrokemijski senzor za detekciju mekih čestica. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu.
29. Imani S., Rezaei-Zarchi S., Hashemi M., Borna H., Javid A., Zand A. M., Abarghouei HB. (2011): Hg, Cd and Pb heavy metal bioremediation by *Dunaliella* alga. *J. Med. Plant. Res.* **5** (13): 2775-2780.
30. Israelachvili J. N. (1991): *Intermolecular and surface forces*. San Diego: Academic Press.London
31. Ivošević N. i Žutić V. (1997): Polarography of marine particles: A model study. *Croat. Chem. Acta.* **70**: 167-178
32. Ivošević DeNardis N., Pečar Ilić J., Ružić I. i Pletikapić G. (2015): Dynamics of adhesion and spreading of single cell at a charged interface. *Electrochimica Acta* **176**: 743–754.
33. Jahnke L. S. i White A. L. (2003): Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *J. Plant Physiol.* **160**: 1193–1202.
34. Katz A., Paz Y. i Pick U. (2010): Salinity tolerance and iron deprivation resistance mechanisms revealed by proteomic analyzes in *Dunaliella salina*. U: Oren, A. *The Alga Dunaliella. Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology*, str. 341-358.

35. Keil D. E, Berger-Ritchie J. i McMillin G. A. (2011): Testing for Toxic Elements: A Focus on Arsenic, Cadmium, Lead, and Mercury. *Lab. Med.* **42**: 735-742.
36. Kovač S., Kraus R., Geček S. i Žutić V. (2000): Cell suspension as a model system for electrochemical analysis. *Croat. Chem. Acta.* **73**: 279.
37. Kozarac Z., Plavšić M., Čosović B. i Viličić D. (1989): Interaction of cadmium and copper with surface-active organic matter and complexing ligands released by marine phytoplankton. *Marine Chemistry* **26**: 313-330.
38. Lerche W. (1937): Untersuchungen über Entwicklung und Fortpflanzung in der Gattung *Dunaliella*. *Arch. Protistenkd.* **88**: 236-268.
39. Liska A. J., Shevchenko A., Pick U. i Katz A. (2004): Enhanced photosynthesis and redox energy production contribute to salinity tolerance in *Dunaliella* as revealed by homology-based proteomics. *J. Plant Physiol.* **136**: 2806-2817.
40. Marin N., Morales F., Lodeiros C. i Tamigneaux E. (1998): Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities. *J. Appl. Phycol.* **10**: 405-411.
41. Mikac N. i Picer M. (1984): Živa u okolišu, Tvornice kloralkalija kao izvor zagađenja životom, primjer zagađenja Kaštelanskog zaljeva. *Kemija u industriji*, **33**: 653-60.
42. McKenzie R. L., Aucamp P. J., Bais A. F., Björn L. O., Ilyas M. i Madronich S. (2011): Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* **10**: 182–198.
43. McLachlan J. (1960): The culture of *Dunaliella tertiolecta* Butcher—a euryhaline organism. *Can. J. Microbiol.* **6**: 367-379.
44. Oberholster P., Myburgh J., Ashton P. i Botha A.-M. (2010): Responses of phytoplankton upon exposure to a mixture of acid mine drainage and high levels of nutrient pollution in Lake Loskop, South Africa. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **73**: 326-335.
45. Oliveira L., Bisalputra T. i N. J. Antia. (1980): Ultrastructural observation of the surface coat of *Dunaliella tertiolecta* from staining with cationic dyes and enzyme treatments. *New Phytol.* **85**:385-392.
46. Omanović D., Kwokal Ž., Goodwin A., Lawrence A., Banks C.E., Compton R. G. i Komorsky-Lovrić Š. (2006): Trace metal detection in Šibenik bay, Croatia: Cadmium, Lead and Copper with Anodic Stripping Voltammetry and Manganese via Sonoelectrochemistry A Case Study. *J. Iran. Chem. Soc.* **3**: 128-139.
47. Oren, A. 2005. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005. *Sal. Systems* **1**: 2.
48. Pletikapić G., Berquand A., Radić T.M., Svetličić V. (2012): Quantitative Nanomechanical Mapping of Marine Diatom in Seawater Using Peak Force Tapping Atomic Force Microscopy. *J. Phycol.* **48**:174-185.
49. Polle J. E. W., Tran D. i Ben-Amotz A. (2010): History, Distribution, and Habitats of Algae of the Genus *Dunaliella* TEODORESCO. U: Oren, A. *The Alga Dunaliella. Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology*, str.1-15.
50. Raja R., Hemaiswarya S. i Rengasamy R. (2007): Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**: 517-523.
51. Riebesell U., Bellerby R. G. J., Grossart H.-P. i Thingstad F. (2008): Mesocosm CO₂ perturbation studies: from organism to community level. *Biogeosciences* **5**:1157-1164.

52. Ružić I. (2018): Analysis of amperometric signals of cell under influence of stressors. Methodology based on reaction kinetics model, Izvještaj, International Visegrad Fund
53. Simon N., Cras A.-L., Foulon E. i Lemée R. (2009): Diversity and Evolution of Marine Phytoplankton. *Comptes Rendus-Biologies* **332**: 159-70.
54. Shariati M. i Lilley R. M. (1994): Loss of intracellular glycerol from *Dunaliella* by electroporation at constant osmotic pressure: Subsequent restoration of glycerol content and associated volume changes. *Plant Cell Environ.* **17**: 1295-1304.
55. Shariati M. i Hadi R. M. (2011): Progress in Molecular and Environmental Bioengineering—From Analysis and Modeling to Technology Applications
56. Sheehan J., Dunahay T., Benemann J. i Roessler P. (1998): A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program-Biodiesel from Algae. Golden. National Renewable Energy Laboratory. Colorado, USA.
57. Svetličić V., Ivošević N., Kovač S. i Žutić V. (2001): Charge displacement by adhesion and spreading of a cell. *Bioelectrochemistry* **53**: 79-86.
58. Takagi M., Karseno i Yoshida T. (2006): Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J. Biosci.Bioen.* **101**: 223-226
59. Telfer A. (2002): What is β -carotene doing in the photo system II reaction centre? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **357**: 1431-1439.
60. Zvonarić T., Žutić V. i Branica M. (1973): Determination of surfactant activity by polarography. *Thalassia Jugosl.* **9**: 65-67.
61. Žutić V., Čosović B., Marčenko E., Bihari N. i Kršinić F. (1981): Surfactant production by marine phytoplankton. Field observation and laboratory culture experiments. *Rapp. Comm. Int. mer. Medit.* **25**: 8-9.
62. Žutić V., Pleše T., Tomaić J. i Legović T. (1984): Electrochemical characterization of fluid vesicles in natural waters. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **113**:131-145.
63. Žutić V., Ivošević N., Svetličić V., Long R. A. i Azam F. (1999): Film formation by marine bacteria at a model fluid interface. *Aquat. Microb. Ecol.* **17**: 231-238.
64. Žutić V., Svetličić V., Ivošević N., Hozić A. i Pečar O. (2004): Northern Adriatic mesocosm experiment Rovinj 2003: dynamics of organic microparticles studied by the electrochemical technique. *Period. Biolog.* **106**: 67-74.

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Nives Novosel

Datum i mjesto rođenja: 14. srpnja 1994., Zagreb

Obrazovanje

2016-2018. Diplomski studij znanosti o okolišu, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2013-2016. Preddiplomski studij znanosti o okolišu, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2009-2013. XV. Gimnazija–Informatički smjer, Zagreb

2001-2009. Osnovna škola Bukovac, Zagreb

Sudjelovanja na znanstveno-istraživačkim projektima

2017-2018. International Visegrad Fund, Algal cell biophysical properties as markers for environmental stress in aquatic systems (voditelj: N. Ivošević DeNardis), *suradnik*

2017. Organizacija i sudjelovanje na Istraživačko-edukacijskom projektu Dugi otok, Udruga studenata biologije–BIUS

Sudjelovanja na kongresima, radionicama

kolovoz 2018. sudjelovanje na Final workshop-Visegrad Grant, Genus Dunaliella, *usmeno izlaganje*.

lipanj 2018. sudjelovanje na 2. studentskom kongresu okolišnog zdravlja s međunarodnim sudjelovanjem, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

svibanj 2018. sudjelovanje na 5. Danu elektrokemije & 8th ISE satellite student regional symposium on electrochemistry, Zagreb. Behavior of algal cells under stress in the laboratory condition: Electrochemical approach, Novosel N. i Ivošević DeNardis N. (*poster*)

Sudjelovanja u manifestacijama popularizacije znanosti

svibanj 2018. Otvoreni dani Instituta Ruđer Bošković; Baština znanosti: provođenje radionice 'Morski mikrosvijet: Fitoplankton'

travanj 2017. Noć biologije, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet

prosinac 2017. Znanstveni piknik, Zagreb

travanj 2016. Noć biologije, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet

travanj 2015. Noć biologije, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet

Znanstveni rad (*poslan u časopis*)

N. Ivošević DeNardis, J. Pečar Ilić, I. Ružić, N. Novosel, T. Mišić Radić, A. Weber, Damir Kasum, Z. Pavlinska, R. Katalin Balogh, B. Hajdu, A. Marček Chorvatova, B. Gyurcsik, 'Algal cell response to cadmium induced stress in culture: Multimethod approach, Eur. Biophys. J. (2018)