Nanostrukturna karakterizacija stanica morskih dijatomeja izloženih kadmiju

Čačković, Andrea

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:221395

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Andrea Čačković

NANOSTRUKTURNA KARAKTERIZACIJA STANICA MORSKIH DIJATOMEJA IZLOŽENIH KADMIJU

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. Tee Mišić Radić, zn. sur. i dr. sc. Zrinke Ljubešić, izv. prof. 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 edukacije biologije i kemije.

Zahvale

Prvenstveno se zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Tei Mišić Radić što me strpljivo vodila kroz izradu ovog rada. Hvala Vam za sav uložen trud, veliku pomoć i za svaki savjet, svaka Vaša ohrabrujuća riječ i pozitivan stav olakšali su izradu ovog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Zrinki Ljubešić na ispravljanju i savjetima kojima je pridonijela poboljšanju kvalitete ovog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Nadici Ivošević DeNardis koja mi je omogućila izradu ovog diplomskog rada i ugodnoj atmosferi u laboratoriju.

Zahvaljujem se Jovici Lončaru, dipl. ing. za pomoć u interpretaciji rezultata dinamike rasta.

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 koji su bili uz mene, a posebno hvala Nikoli i Adeli koji su strpljivo slušali moje bezbrojne priče o faksu, hvala na nesebičnoj podršci, razumijevanju i lijepim uspomenama.

Veliko hvala mojoj obitelji na podršci. Hvala mojoj sestri Karli na ljubavi, strpljenju i svim korisnim savjetima, a najveća hvala mojim roditeljima koji su bili uz mene sve godine mog školovanja, što su mi omogućili sve što mi je trebalo i bili podrška u svim trenucima mog života.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

NANOSTRUKTURNA KARAKTERIZACIJA STANICA MORSKIH DIJATOMEJA IZLOŽENIH KADMIJU

Andrea Čačković

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Cilj ovog diplomskog rada je nanostrukturna karakterizacija površine stanica slabo silificirane morske dijatomeje *Cylindrothecae closterium* izložene povišenoj koncentraciji kadmija, primjenom mikroskopije atomskih sila (AFM-a). Svjetlosnim mikroskopom praćena je dinamika rasta *C. closterium* pri odabranim koncentracijama kadmija u rasponu 1–1000 µg/L, a morfološke promjene na površini stanica izloženih kadmiju (500 µg/L i 1000 µg/L) karakterizirane su na nanoskali mikroskopijom atomskih sila. Posljedica povišenih koncentracija kadmija u kulturama *C. closterium* bila je inhibicija rasta odnosno smanjenje specifične brzina rasta i broja dioba stanica po danu, te morfološke promjene na površini ljušturica u obliku pojedinačnih sferičnih čestica i njihovih nakupina na pojedinim dijelovima stanice. Najizraženije promjene uočene su na stanicama koje su rasle pri koncentraciji kadmija 1000 µg/L i to na jače silificiranim dijelovima stanice, pojasu i oko rafe uz fibule, dok je manji broj čestica bio lociran na samoj valvi. Pretpostavljeno je da su navedene morfološke promjene posljedica utjecaja kadmija na mehanizam depozicije silicijevog dioksida što za rezultat ima pojavnost nepravilnih struktura na pojedinim, jače silificiranim, dijelovima ljušturice. Rezultati ovog rada predstavljaju doprinos boljem razumijevanje utjecaja teškog metala kadmija na dinamiku rasta i morfološke karakteristike morske dijatomeje *C. closterium* na nanometarskoj skali. Iako se dobiveni rezultati odnose na morsku dijatomeju *Cylindrotheca closterium*, oni također tvore temelj za daljnja istraživanja utjecaja teških metala na nanostrukturna svojstva stanica drugih vrsta fitoplanktona.

(47 stranica, 27 slika, 3 tablice, 79 bibliografskih referenci; izvornik na hrvatskom jeziku)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: *Cylindrotheca closterium*, dinamika rasta, fitoplankton, kadmij, mikroskopija atomskih sila (AFM), morfološke promjene, morske dijatomeje, nanostrukturna karakterizacija.

Voditelj: dr. sc. Tea Mišić Radić, zn. suradnik

Suvoditelj: izv. prof. dr. sc. Zrinka Ljubešić

Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Zrinka Ljubešić
doc. dr. sc. Mirela Sertić Perić
izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Rad prihvaćen: 5.listopada 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

NANOSTRUCTURAL CHARACTERIZATION OF MARINE DIATOM CELLS EXPOSED TO CADMIUM

Andrea Čačković

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The aim of this Graduation Thesis is the nanostructural characterization of cell surface of lightly silicified marine diatom *Cylindrotheca closterium* exposed to increased cadmium concentration, using atomic force microscopy (AFM). *C. closterium* growth dynamics was monitored with optical microscope at selected cadmium concentrations in the range 1–1000 μg/L. Morphological changes on the cell surface of *C. closterium* exposed to cadmium (500 μg/L and 1000 μg/L) were characterized with AFM. The consequences of increased cadmium concentrations in *C. closterium* cultures were inhibition of growth and reduction of specific growth rates and number of cell divisions per day, also changes in the surface of the frustules were observed in the form of single spherical particles and their aggregates on certain parts of the cell. The most expressed changes were observed on more silicified parts of the cell, girdle band and around the raphe on fibulae of the cells that grew at cadmium concentration 1000 μg/L, while a smaller number of particles were located on the valves. These changes are likely to be due to the impact of cadmium on the silicon dioxide deposition mechanism, which results in the appearance of irregular structures on certain, more silicified, parts of the frustules. These results contribute to a better understanding of the impact of heavy metal cadmium on the growth dynamics and the morphological characteristics of the marine diatom *C. closterium* at the nanometric scale. Although, the results apply directly to *Cylindrotheca closterium*, they also form the basis for further investigation of the impact of heavy metals on the nanostructural properties of other phytoplankton species.

(47 pages, 27 figures, 3 tables, 79 references; original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: atomic force microscopy (AFM), cadmium, *Cylindrotheca closterium*, growth dynamics, marine diatoms, morphological changes, phytoplankton, nanostructural characterization.

Supervisor: dr. sc. Tea Mišić Radić, Research Associate

Co-supervisor: dr. sc. Zrinka Ljubešić, Associate Professor

Reviewers: dr. sc. Zrinka Ljubešić, Associate Professor
dr. sc. Mirela Sertić Perić, Associate Professor
dr. sc. Branimir Bertoša, Associate Professor

Thesis accepted: 5.October 2018.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Dijatomeje 2
1.2. Utjecaj teških metala na dijatomeje 6
1.3. Mikroskopija atomskih sila 8
1.3.1. Princip rada AFM-a 10
1.4. Cilj istraživanja 13
2. MATERIJALI I METODE 14
2.1. Stanična kultura *Cylindrothecae closterium* 14
2.2. Eksperimentalni dizajn 16
2.3. Određivanje dinamike rasta *Cylindrothecae closterium* 13
2.4. AFM oslikavanje stanica *Cylindrothecae closterium* 16
2.4.1. Priprema uzoraka 16
2.4.2. AFM mjerenja 16
3. REZULTATI 20
3.1. Dinamika rasta *Cylindrothecae closterium* 20
3.1.1. Krivulja rasta *Cylindrothecae closterium* bez dodatka kadmija 20
3.1.2. Krivulje rasta *Cylindrothecae closterium* uz dodatak kadmija 21
3.2. Nanostrukturna karakterizacija stanica *Cylindrothecae closterium* 24
3.2.1. Vizualizacija stanica *Cylindrothecae closterium* bez dodatka kadmija 25
3.2.2. Vizualizacija stanica *Cylindrothecae closterium* uz dodatak kadmija 28
3.2.2.1. Vizualizacija stanica *Cylindrothecae closterium* uz dodatak kadmija koncentracije 500 µg/L 28
3.2.2.2. Vizualizacija stanica *Cylindrothecae closterium* uz dodatak kadmija koncentracije 1000 µg/L 31
4. RASPRAVA 35
5. ZAKLJUČAK 38
6. LITERATURA 39
7. DODATAK 46
Prilog 1. Popis oznaka, kratica i simbola 46
8. ŽIVOTOPIS 47

1. UVOD

Više od dvije trećine Zemljine površine prekriveno je vodom, od čega je 97% morska voda (Charette i Smith 2010). Iako biomasa primarnih producenata u morima i oceanima čini samo 1% ukupne biomase na Zemlji, morski ekosustavi odgovorni su za gotovo polovicu globalne primarne proizvodnje (Gruber i sur. 2009; Häder i sur. 2011).

Fitoplankton su fotosintetski; autotrofni i miksotrofni prokariotski i eukariotski organizmi dispergirani u vodenom stupcu i pasivno nošeni strujama. Fitoplankton je glavni primarni proizvođač u oceanima, doprinoseći s više od 90% ukupnoj primarnoj proizvodnji u oceanima (Häder i Gao 2015). Fitoplankton se razvija u površinskom dijelu oceana (do dubine od oko 150 m) gdje ima dovoljno svjetlosti za njegov razvoj, što čini samo 5% volumena svih oceana. Fitoplankton, uz ključnu ulogu u globalnoj primarnoj proizvodnji, ima i ključnu ulogu u glavnim biogeokemijskim ciklusima te je temelj hranidbenog lanca u vodenom okolišu. Dominantni predstavnici krupnijeg oceanskog fitoplanktona (20-100 μm) su dijatomeje, jednostanične, fotosintetske eukariotske alge, odgovorne za oko 25% primarne proizvodnje (Armbrust 2009). Dijatomeje nazivamo i alge kremenjašice zbog modifikacije periplasta građenog od silicijeva dioksida, odnosno kremena (Lalli i Parsons 1993).

Fitoplankton kao baza trofičke piramide i zbog kratkog životnog ciklusa brzo reagira na sve promjene u okolišu. Na produktivnost fitoplanktona utječu brojni okolišni čimbenici uključujući i antropogena onečišćenja. U zadnjih nekoliko desetljeća znatno se povećala količina antropogenih onečišćenja (Suratno i sur. 2015) koja mogu imati veliki utjecaj na primarnu proizvodnju fitoplanktona. Veliki utjecaj na morski mikrosvijet imaju teški metali, uključujući i kadmij, koji zbog svoje toksičnosti, perzistencije i bioakumulacije može imati veliki utjecaj i na veće morske organizme, ali i na samo čovjekovo zdravlje (Madasamy i Babu 2016).

Fitoplankton se zbog svoje ekološke važnosti, mogućnosti uzgoja u laboratoriju i osjetljivosti na različita onečišćenja koristi za procjenu rizika za okoliš (Torres i sur. 2008), te ga međunarodne smjernice preporučaju kao test organizam (ISO 8692 1982; OECD 1998; USEPA 2002). Budući dijatomeje predstavljaju bazu hranidbenog lanca u oceanima (Chepurnov i sur. 2008) istraživanja o učinku onečišćenja na dijatomeje daju informacije bitne za predviđanja utjecaja onečišćenja na cjelokupni hranidbeni lanac u oceanima.

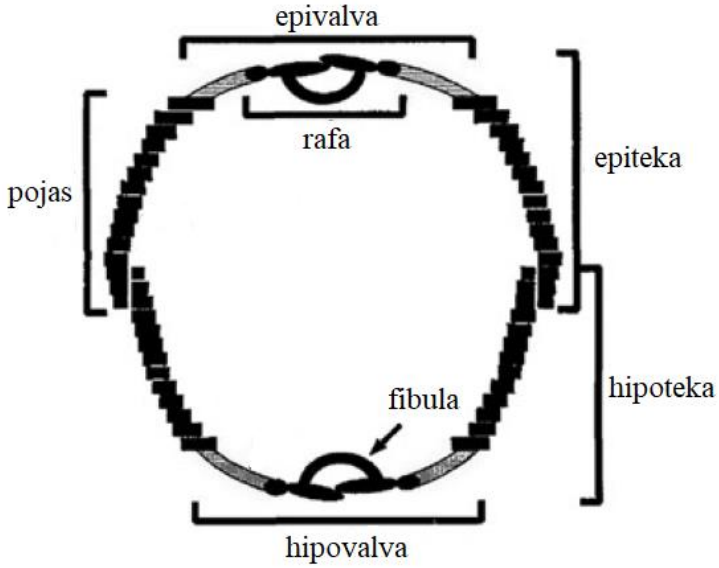
1.1. Dijatomeje

Dijatomeje su jednostanični fotosintetski eukariotski mikroorganizmi koje nalazimo u svim kopnenim, slatkovodnim i morskim ekosustavima (Round i sur. 1990). Taksonomski su klasificirane u odjel Chrysophyta, odnosno razred Bacillariophyceae (sin. Diatomeae, Diatomophyceae).

Dijatomeje su do sada vrstama najbrojnije opisana skupina alga. Dosad je opisano 12 000 vrsta dijatomeja svrstanih u preko 260 rodova, a pretpostavlja se da bi ukupan broj vrsta mogao biti do 100 000 (John 2012). Zbog karakteristične dobro organizirane silicijeve ljušturice, koju tehnologija još uvijek nije uspjela replicirati, i mogućnosti proizvodnje određenih lipida u novije vrijeme dijatomeje imaju važnu ulogu u proizvodnji biogoriva, nanotehnologiji i farmaciji (Huysman i sur. 2014).

Glavna karakteristika dijatomeja je dvodijelna silikatna ljušturica, frustula (*frustulum*), prema kojoj su i dobile naziv. Naime, naziv dijatomeja potječe od grčke riječi *diatoms*, koja u prijevodu znači „prerezana na pola“. Stanice dijatomeja ne posjeduju staničnu stijenku već modifikaciju periplasta, kojim se mlade stanice obavija nakon diobe. U vezikulama, koje se nalaze ispod plazmaleme periplasta, sintetizira se amorfni i netopljivi kremen [$(SiO_2)n(H_2O)$] iz ortosilicijeve kiseline (H_2SiO_4) i njenih polimera, topljivog oblika silicija prisutnog u moru. Naslage kremena se u vezikulama povećavaju i izbijaju na vanjsku stranu stanice nakon čega vanjska membrana vezikula zajedno s plazmalemom nestaju, a njenu funkciju obavljaju unutrašnje membrane vezikula. Naposljetku, kremen obavije čitavu stanicu u obliku dvije ljušturice (frustule), gornje epiteke (*epithaecae*) i donje hipoteke (*hypothaecae*), koje se međusobno slažu kao poklopac i kutija. Kremena ljušturica potpuno štiti citoplazmu stanice, no na površini silificiranih dijelova nalazi se tanki sloj organske tvari čija je funkcija zaštita ljušturice od otapanja (Round i sur. 1990).

Svaka ljušturica sastoji se od dvodijelne valve, epivalve (*epivalvae*) i hipovalve (*hypovalvae*), koje su bočno spojene pojasom (*cingulum*) (Slika 1.1.). Pojas, koji povezuje valve, okarakteriziran je kao skup paralelnih silikatnih traka. Uzduž valve, kod nekih vrsta dijatomeja, proteže se longitudinalni prorez, rafa (*rapha*), kroz koji dolazi do izmjene tvari između stanice i okoliša. Cijelom dužinom rafa je kod nekih vrsta dijatomeja omeđena silicijevim mostovima, fibulama (*fibulae*).

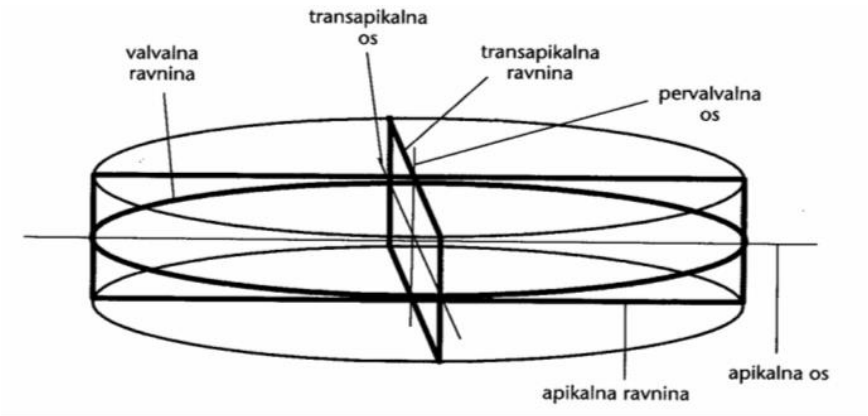


Slika 1.1. Shematski prikaz poprečnog presjeka građe dijatomeje *Cylindrothecae sp.* (preuzeto iz: Kröger i sur. 1997).

Povijesno, dijatomeje su bile podijeljene u dva reda, red Centrales i red Pennales, koji se razlikuju prema simetriji, spolnom načinu razmnožavanja te broju i obliku plastida. U red Centrales bile su svrstane dijatomeje radijalne simetrije s diskoidnim plastidima koje se razmnožavaju oogamijom, a u red Penales dijatomeje bilateralne simetrije s pločastim plastidima i razmnožavanjem izogamijom (Round i sur. 1990). Morfološki, red Pennales može se podijeliti na rafidne dijatomeje koje na površini stanice imaju rafu i arafidne dijatomeje koje nemaju rafu (Round i sur. 1990). Danas je prihvaćena podjela koja dijatomeje svrstava u tri razreda: Coscinodiscophyceae (dijatomeje radijalne simetrije), Mediophyceae (dijatomeje bi- ili polarne radijalne simetrije) i Bacillariophyceae (Medlin i Kaczmarska, 2004).

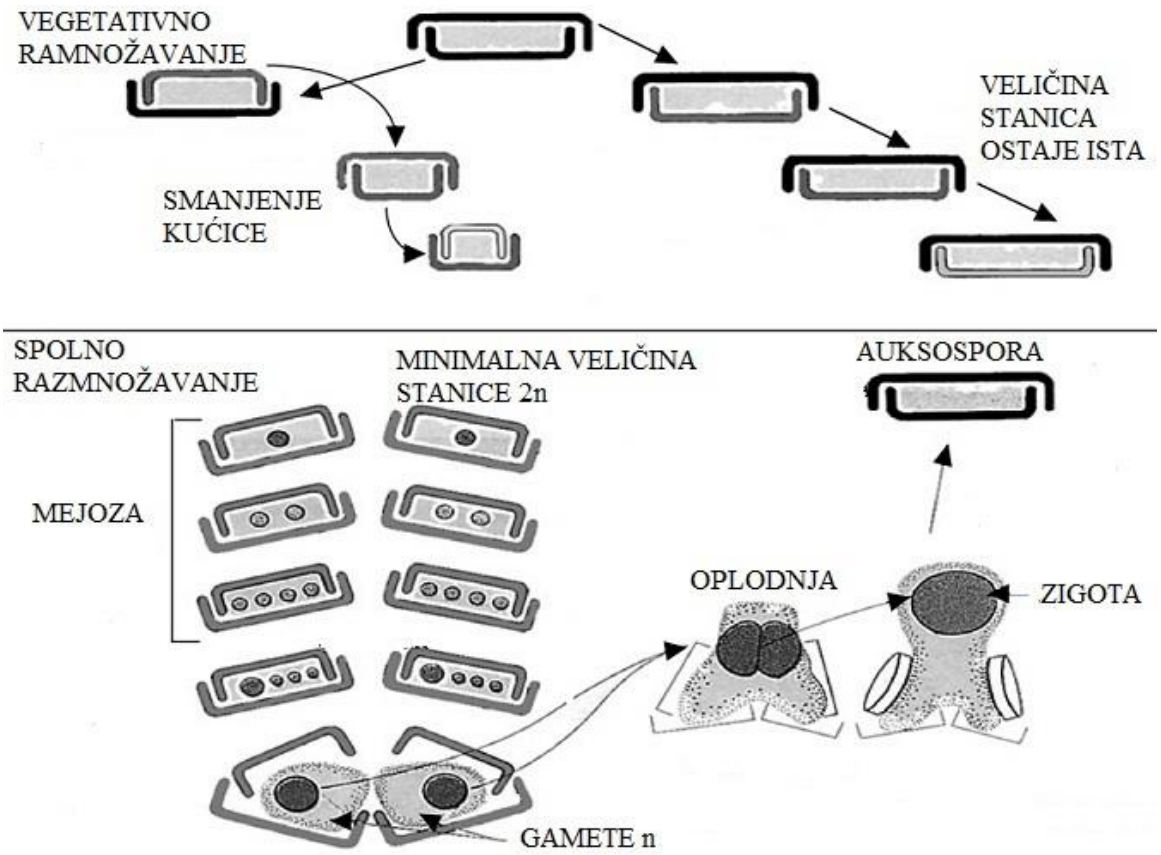
Kod radijalnih dijatomeja može se provući bezbroj ravnina simetrije koje prolaze kroz pervalvalnu os i tako dijele stanicu na dvije jednake polovice. Istraživana vrsta *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reiman & J.C. Lewin je bilateralne simetrije, što znači da se kroz stanicu mogu povući tri osi i tri ravnine simetrije (Slika 1.2.). Valvalna ravnina, koja dijeli stanicu na gornju i donju polovicu i apikalna ravnina, koja dijeli stanicu na lijevu i desnu stranu, prolaze kroz apikalnu os, te transapikalna ravnina, koja dijeli stanicu na prednju i stražnju polovicu, a prolazi kroz transapikalnu i pervalvanu os. Vrsta *C. closterium*, istraživana u ovom radu, je rafidna dijatomeja, posjeduje uzdužni prorez, rafu, kroz koju ispušta ekstracelularni polimerni materijal, EPS (engl. *extracellular polymeric substance*).

Alge odjela Chrysophyta, u koji spadaju dijatomeje, u stanicama sadrže žućkastozelene i žućkastosmeđe plastide, pa ih neki nazivaju zlatno-smeđim algama. Dijatomeje u kloroplastima sadrže klorofil *a*, klorofil *c*1 i klorofil *c*2, koje koriste za fotosintezu. Od karotenoida sadrže fukoksantin koji stanicama daje karakterističnu zlatno-smeđu boju.



Slika 1.2. Ravnine i osi simetrije u alga kremenjašica s bilateralnom simetrijom (preuzeto iz: Viličić 2002).

Stanice dijatomeja su diploidne te se najčešće razmnožavaju vegetativnom diobom stanica (Slika 1.3.). Stanice se dijele u valvalnoj ravnini, tako da epiteka i hipoteka majčinske stanice postaju epiteke stanica kćeri, a hipoteke se stvaraju iznova. Rezultat su dvije stanice kćeri koje su različitih veličina jer je jedna stanica veličine epiteke majčinske stanice, a druga stanica je veličine hipoteke majčinske stanice. Stanice se uzastopno smanjuju do polovine ili trećine normalne veličine majčinske stanice. Dosezanjem minimalne kritičke veličine stanice aktivira se gen koji zaustavlja daljnju diobu stanice te počinje spolno razmnožavanje. Uz smanjenje stanice do kritičke veličine i oštećenje stanice može biti okidač za spolno razmnožavanje. Za dijatomeje radijalne simetrije karakteristično je razmnožavanje oogamijom, gdje se oplodnja javlja između manjeg pokretnog spermija i veće nepokretne jajne stanice, a za dijatomeje bilateralne simetrije karakteristično je razmnožavanje izogamijom, u kojoj su sve gamete jednake i bez bičeva te se nazivaju izogamete. Nakon oplodnje nastaje diploidna zigota, koju obavija opna. Zigota se povećava i razvije se diploidna auksospora, koja izluči novu silicijevu stijenku. Klijanjem auksospore izrastu diploidne stanice prvobitne veličine.



Slika 1.3. Životni ciklus dijatomeja (preuzeto iz: Weier i sur. 1982).

1.2. Utjecaj teških metala na dijatomeje

Metali velike atomske mase i gustoće veće od 5 g/cm^3 nazivaju se teški metali. Od ukupno 90 prirodnih elemenata, 53 ih se smatra teškim metalima (Weast 1984). Teški se metali općenito dijele na esencijalne (npr. Cu, Fe, Zn), koji pri niskim koncentracijama nisu toksični te obavljaju ključne metaboličke funkcije, naime mogu biti kofaktori enzima koji su uključeni u mnoge biološke procese (De Filippis i Pallaghy 1994), i neesencijalne (npr. Cd, Pb, As i Hg) metale, koji nemaju nikakvu nutritivnu funkciju i smatraju se toksičnima za mikroorganizme, jer već pri niskim koncentracijama mogu ometati staničnu homeostazu inhibirajuću neke metaboličke procese (Morin 2003).

Ljudskom aktivnošću povećava se kontaminacija okoliša teškim metalima, čija je upotreba u industriji, domaćinstvu, agrokulturi, medicini i tehnologiji u znatnom porastu (Tchounwou i sur. 2012). Zagađenje oceana teškim metalima može utjecati na rast morskih alga, bazu hranidbenog lanca u oceanima, a samim time kaskadno i na cjelokupni hranidbeni lanac. Ako alga ne tolerira prisutnu koncentraciju metala stanice ne preživljavaju (Gledhill i sur. 1997; Payne i Price 1999). Stanice alga prežive izloženost metala ako toleriraju njegovu prisutnu koncentraciju, te se on akumulira unutar stanice i transportira kroz hranidbeni lanac (Davies 1978). Neki teški metali, među kojima se ističe kadmij, akumuliraju se u tkivima životinja zbog čega predstavljaju veliku opasnost za ljudsko zdravlje, gdje već u manjim količinama izazivaju zabrinjavajuće toksikološke simptome (Tchounwou i sur. 2012).

U vodenom okolišu kadmij se nalazi u stanju Cd^{2+}, koje je ujedno i njegovo najstabilnije stanje (Hasan i sur. 2009). U ovom je obliku prisutan u nezagađenim vodenim okolišima do maksimalne koncentracije 1 µg/L (Friberg i sur. 1986). U Jadranu su koncentracije kadmija u rasponu od 5-15 ng/L (Cindrić i sur. 2015).

Glavni izvori kadmija su agrokultura, rudarske aktivnosti te automobilska industrija (Das i sur. 1998), ali upotrebljava se i u proizvodnji pigmenata za boje i kao stabilizator za industriju plastike, a najveća upotreba kadmija je za proizvodnju Cd-Ni baterije (Madasamy i Babu 2016). Upravo zbog velike upotrebe i topljivosti u vodi, gdje onda postaje lako dostupan organizmima, smatra se zabrinjavajućim onečišćenjem. Kadmij predstavlja veliku opasnost za fitoplankton jer ima sposobnost zamijeniti esencijalne metale, kao što su cink ili bakar, u enzimima čime ometa njihovu biološku aktivnost, a rezultat je inhibicija respiracije, te inhibicija rasta stanica (Torres i sur. 2000). Kadmij se također može akumulirati u hranidbeni

lanac i predstavljati veliku opasnost za ljudsko zdravlje, gdje se povezuje s kardiovaskularnim i kroničnim plućnim bolestima te je i neurotoksičan i kancerogen (Tokar i sur. 2013). Iako je donedavno mišljenje o biološkoj nefunkciji kadmija bilo uobičajeno, Lane i suradnici (2005) otkrili su kako kadmij pri niskim koncentracijama cinka u morskoj dijatomeji *Thalassirosira weissflogii* zamjenjuje cink, kofaktor enzima ugljične anhidraze, bez ometanja njegove normalne aktivnosti.

Dosadašnja istraživanja utjecaja povišenih koncentracija kadmija na fitoplankton pokazala su veliku osjetljivost dijatomeja na kadmij (Kapkov i Belenikina 2007). Kod morske dijatomeje *C. closterium* izložene povišenoj koncentraciji kadmija dolazi do inhibicije dinamike rasta, fotosinteze i staničnog disanja (Lehman i Vas Cancelos 1979). Također se pretpostavlja kako teški metali imaju veliku ulogu u morfološkim promjenama na dijatomejama (McFarland i sur. 1997; Dickman 1998; Ruggiu i sur. 1998). Elektronskim mikroskopom proučavane su promjene na morskim dijatomejama izloženim kadmiju, te su uočene deformacije na valvi (Morin i sur. 2008).

Stanice dijatomeja posjeduju i određene obrambene mehanizme kojima mogu izbjeći ili reducirati štetne utjecaje teških metala. Osim unutarstaničnih mehanizama postoji i izvanstanični mehanizam, izlučivanje ekstracelularnog polimernog materijala, EPS-a (Santos i sur. 2012). EPS je većinskim dijelom građen od polisaharida, veže metale djelujući na njih mehanizmom koji im smanjuje bioraspoloživost. EPS sadrži i proteine, koji u dijatomeji *Nitzschia palea* vežu ione kadmija i povećavaju njenu toleranciju na izloženost kadmiju (Santos i sur. 2012).

1.3. Mikroskopija atomskih sila

Mikroskopija atomskih sila, AFM (engl. *atomic force microscopy*) (Binnig i sur. 1986) pripada novoj generaciji mikroskopa s pretražnom probom (engl. *scanning probe microscopy*, SPM). AFM omogućuje stvarne topografske prikaze površina u tri dimenzije „dodirujući“, a ne „gledajući“ površinu jer nije sastavljen od sustava leća kao konvencionalni mikroskopi već se površina uzorka pretražuje pomoću oštrog šiljka. AFM se, osim u oslikavajućem načinu rada, koristi i za ispitivanje mehaničkih svojstava u neoslikavajućem načinu rada.

Otkrićem AFM-a (Binning i sur. 1986) postignut je veliki napredak u oslikavanju bioloških uzoraka. AFM je prvi puta primijenjen za istraživanje dijatomeja na zraku 1992. godine kada je dokazano da može konkurirati pretražnom elektronskom mikroskopu (engl. *scanning electron microscope*, SEM) (Linder i sur. 1992). Za razliku od elektronske mikroskopije, AFM omogućava oslikavanje uzorka u ambijentalnim uvjetima, na zraku ili u tekućini. Osim toga, priprava uzorka za oslikavanje AFM-om manje je drastična od priprave za elektronsku mikroskopiju. Uzorak nije potrebno smrzavati, prevlačiti filmovima metala ili ugljika ili bojati za postizanje kontrasta. Također, za analizu površina stanica SEM-om ili TEM-om (engl. *transmission electron microscopy*) prije je potrebno oksidirati organski materijal dijatomeje što može dovesti do raspada stanice, pogotovo *C. closterium* koja je slabo silificirana dijatomeja (Almqvist i sur. 2001). AFM je tehnika kojom je moguće direktno snimanje živih stanica, zbog čega je moguće istraživati svojstva stanice na nanometarskoj razini, te analizirati pojedine molekule na površini stanice (Luís i sur. 2017).

Prva karakterizacija silikatne ljušturice dijatomeja na nanostrukturnoj razini AFM-om napravljena je na dijatomeji *Navicula pelliculosa* Kützing (Hilse) 2001. godine osušenoj etanolom (Almqvist i sur. 2001), te također iste godine na živim stanicama dijatomeja *Pinnularia viridis* (Nitzsch) Ehrenberg i *Hantzschia amphioxys* (Ehrenberg) Grunow (Crawford i sur. 2001). Ovim istraživanjima dokazana je mogućnost oslikavanja živih stanica dijatomeja AFM-om u ambijentalnim uvjetima. Broj istraživanja silikatne ljušturice dijatomeja AFM-om u naglom je porastu, te postaje i zasebna grana istraživanja (Luís i sur. 2017).

Uz nanostrukturnu karakterizaciju silikatne ljušturice dijatomeja, veliki interes pobuđuje ekstracelularni polimerni materijal, EPS koji one izlučuju. Istraživana vrsta *C. closterium* u stresnim uvjetima u stacionarnoj fazi ispušta velike količine EPS-a, koji može biti vezan uz stanicu ili kao slobodna mreža u mediju (Pletikapić i sur. 2011).

Osim morfoloških karakteristika ljušturice za bolje razumijevanje njene funkcije potrebno je dobro poznavanje i njenih mehaničkih svojstava. Istraživanja su provedena na različitim vrstama dijatomeja, a najčešće se analiziraju elastičnost, tvrdoća i adhezija. Osim nanomehaničkih svojstava analize samih stanica, istraživana su i nanomehanička svojstva ekstracelularnog polimernog materijala (Pletikapić i sur. 2011).

Pletikapić i suradnici 2012. godine okarakterizirali su nanomehanička svojstva, elastičnost i deformaciju morske dijatomeje *C. closterium* u morskoj vodi. Slabije silificirani dijelovi pojasa i valva, imali su najmanji Youngov modul elastičnosti i imali su najvišu vrijednosti deformacije, dok su jače silificirani dijelovi pojasa imali veći Youngov modul elastičnosti i nižu vrijednost deformacije. Najtvrđim i najmanje deformabilnim dijelom stanice određene su fibule koje omeđuju rafu. Razlog ovakvim rezultatima je u građi morfološki različitih dijelova stanica, koja je dokazana tretmanom sumpornom kiselinom. Pojas je okarakteriziran kao skup paralelnih [$(SiO_2)n(H_2O)$] traka međusobno spojenih organskim materijalom, a struktura valve je kompleksnija i heterogena. Dio valve iznad kloroplasta tvrđe je i manje deformabilno od dijela valve između dva kloroplasta. U regiji valve na dijelovima spajanja pojasa i rafe također se nalaze [$(SiO_2)n(H_2O)$] nanočestice spojene organskim materijalom. Tretmanom sumpornom kiselinom uklonjen je organski materijal nakon čega [$(SiO_2)n(H_2O)$] nanočestice nisu bile fuzionirane i nisu formirale fiksnu nanostrukturu, čime se je povećala elastičnost ovog dijela stanice. Na temelju rezultata, predložen je model ljušturice stanice *C. closterium* u kojem su [$(SiO_2)n(H_2O)$] nanočestice uklopljene u organski matriks valve. Takva organizacija valve i pojasa kućice omogućuje visoku fleksibilnost potrebnu za pokretanje stanice i njenu adaptaciju na različite okoliše zadržavajući integritet stanice (Pletikapić i sur. 2012).

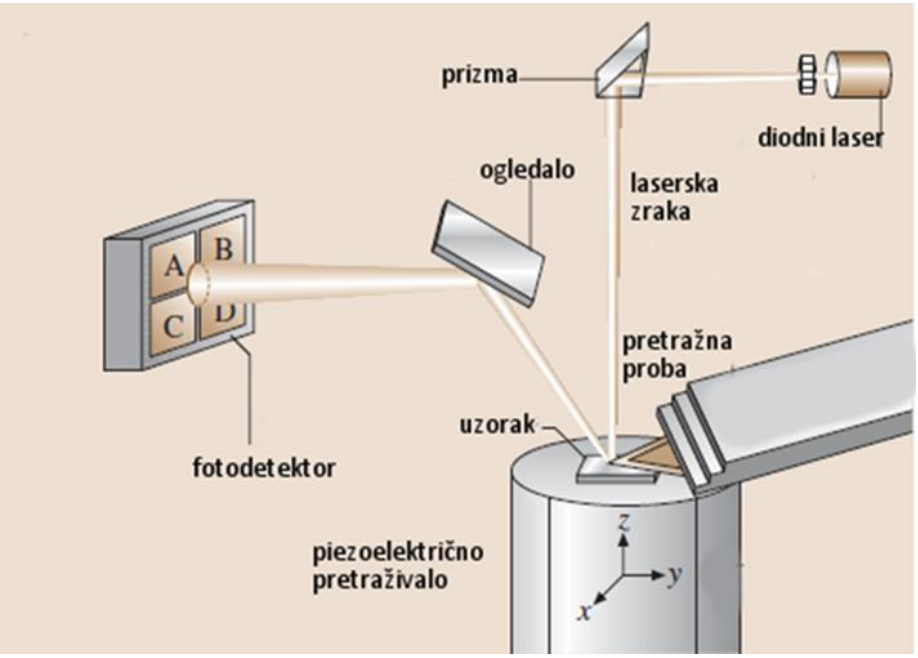
Za istraživanje utjecaja povišene koncentracije kadmija na morfološka nanostrukturna svojstva dijatomeja primjenom AFM-a izabrana je slabo silificirana morska dijatomeja *C. closterium*. *C. closterium* je sveprisutna vrsta, pojavljuje se i u oceanskim i u slatkovodnim populacijama, ima široku zemljopisnu distribuciju i nalazi se tijekom cijele godine (Hulburt 1968; Hulburt i Rodman, 1963). Nalazimo je i u onečišćenim staništima, te je dobar primjerak organizma za istraživanje utjecaja onečišćenja teškim metalima na morski mikrosvijet zbog brzog rasta stanica i dokazane osjetljivosti na teške metale (Moreno-Garrido 2003). Osim što se lako uzgaja u laboratorijskim uvjetima, također i dominira nad ostalim vrstama dijatomeja u istim uvjetima. Protokol pripreme uzorka *C. closterium* za AFM mjerenje je jednostavan, stanica tolerira sušenje na zraku te, ne dolazi do oštećenja površine stanica tokom mjerenja. Uzorak stanica *C. closterium* izoliran je iz sjevernog Jadrana bogatog nutrijentima koji uvelike utječe na rast

fitoplanktona. Sjeverni Jadran nutrijente dobiva iz velikog broja rijeka i potoka, od kojih je najveća rijeka Po (Degobbis i sur. 2000). Maksimalna godišnja biomasa fitoplanktona uvelike ovisi o brzorastućim dijatomejama, od kojih se ističe dominantna vrsta *C. closterium*, čije stanice brzo reagiraju na velike količine nutrijenata iz rijeka i oborina (Mozetič i sur. 1998).

1.3.1. Princip rada AFM-a

AFM uređaj sastoji se od tri osnovna dijela: piezoelektrično pretraživalo, pretražna proba i optički sustav za detekciju otklona poluge.

Pretražnu probu čine vrlo oštri šiljak duljine nekoliko mikrometara pričvršćen za slobodan kraj savitljive poluge dužine 100 do 200 µm, a optički sustav, koji čine laserska dioda i fotodetektor, preko povratne sprege povezan je s piezoelektričnim pretraživalom na kojem se nalazi uzorak (Slika 1.4.).



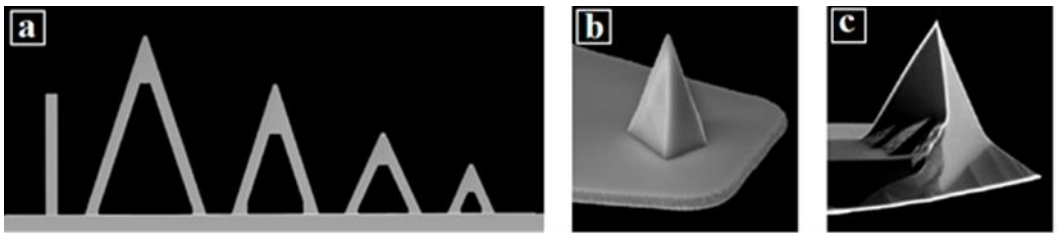
Slika 1.4. Shematski prikaz principa rada AFM-a (preuzeto iz: Bhushan 2004).

Površina uzorka pretražuje se pomoću oštrog šiljka pričvršćenog za savitljivu polugu. Između atoma šiljka i atoma na površini uzorka stvaraju se sile interakcije koje uzrokuju savijanje poluge, čiji je otklon proporcionalan istoj toj sili prema Hookovom zakonu:

$$F = -K \times \Delta d \quad (1.1.)$$

gdje je *F* sila, *K* konstanta poluge i *d* udaljenost između šiljka i uzorka. Na vrh poluge usmjerena je laserska zraka koja se reflektira na fotodetektor optičkog sustava i uzrokuje promjenu napona na fotodiodi. Zbog promjene napona dolazi do promjene visine piezoelektričnog pretraživača kako bi se održala konstantna udaljenost između pretražne probe i površine uzorka. Svakim približavanjem pretražne probe površini uzorka uključuje se povratna sprega između optičkog sustava i piezoeletričnog pretraživala koja omogućuje pozicioniranje uzorka s preciznošću od nekoliko desetaka nm, a povratni signal prevodi se u topografsku sliku površine pomoću računala.

Bitan dio AFM-a je pretražna proba jer upravo ona određuje silu koja se primjenjuje na uzorak te znatno utječe na rezoluciju snimanja. Pretražne probe tvornički se proizvode od silicija ili silicijeva nitrida s različitim konstantama poluge i različitim radijusom zakrivljenosti vrha šiljka. Ovisno o vrsti uzorka i korištenom režimu rada primjenjuju se različite pretražne probe (Slika 1.5.).

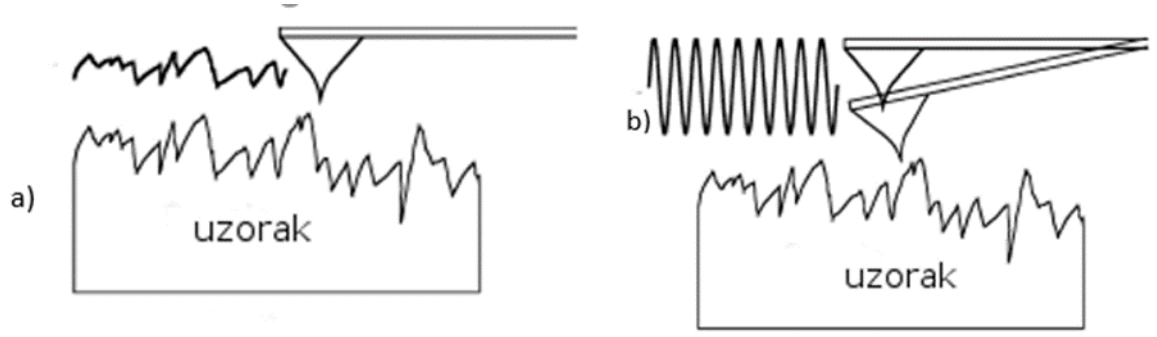


Slika 1.5. SEM slike AFM pretražnih proba: a) pretražne poluge s različitim konstantama; b-c) AFM šiljci (preuzeto iz: Bruker Probes and Accessories Catalouge 2012).

Ograničavajući faktor za oslikavanje većih stanica predstavlja piezoelektrično pretraživalo. Ono omogućava lateralno i vertikalno pomicanje uzorka ili pretražne probe. Mjerenje visine uzorka ograničeno je vertikalnim rasponom piezoelektričnog pretraživala (engl. Z-range) čiji se povratni signal prevodi u trodimenzionalnu topografsku sliku površine pomoću računala.

Ovisno o osjetljivosti biološkog uzorka koriste se različiti režimi rada u oslikavajućem načinu rada. Prethodno opisani postupak pripada kontaktnom režimu rada (engl. *contact mode*, CM) u kojem je šiljak u stalnom dodiru s uzorkom (Slika 1.6.a). Zbog povratne sprege između optičkog sustava i piezoelektričnog pretraživala tijekom snimanja se održava konstantan otklon savitljive poluge (primijenjena sila). U slučaju promjene jačine sile dolazi do promjene napona

na piezoelektričnog pretraživalu koji onda povećava udaljenost između uzorka i šiljka pretražne probe te vraća silu na početnu vrijednost. Zbog lateralnih sila kojima je uzorak izložen, za analizu osjetljivijih bioloških uzoraka potrebno je koristiti tapkajući režim rada (engl. *tapping mode*, TM).



Slika 1.6. Osnovni režimi rada AFM-a: a) kontaktni režim rada; b) tapkajući režim rada (preuzeto iz: Nölting 2006).

U tapkajućem režimu rada šiljak povremeno dolazi u kontakt s površinom uzorka jer savitljiva poluga oscilira iznad uzorka na udaljenosti od nekoliko desetaka nm (Slika 1.6.b). Poluga efektivno oscilira dok putuje kroz uzorak i povremeno ga dodiruje, približavanjem šiljka površini uzorka dolazi do smanjenja amplitude osciliranja poluge. Mjerenjem promjena amplitude generira se topografska slika uzorka. Tapkajućim režimom rada oslikavaju se mekaniji biološki uzorci jer su manje sile koje se primjenjuju na uzorak, smanjene su lateralne sile koje mogu deformirati uzorak i manje je vrijeme kontakta.

AFM se može primjenjivati i u neoslikavajućem načinu rada poznatijem kao spektroskopija sila (engl. *force spectroscopy*). Ovaj način rada zasniva se na mjerenju sile između šiljka i uzorka, a prati se otklon poluge u ovisnosti o udaljenosti od površine uzorka. Mjerenjem otklona poluge u ovisnosti o pomaku piezoelektričnog pretraživala dobivaju se krivulje sila (engl. *force distance curve*) koje prikazuju ovisnost sile o udaljenosti od površine. Krivulje sila koriste se za određivanje elastičnih i visokoelastičnih svojstva materijala, sila adhezije, te za određivanje intra- i intermolekulskih interakcija.

1.4. Cilj istraživanja

U okviru ovog diplomskog rada istraživane su nanostrukturne morfološke promjene na stanicama morskih dijatomeja uzrokovane povišenim koncentracijama teškog metala kadmija primjenom mikroskopije atomskih sila. Iako je mikroskopija atomskih sila kao metoda primjenjivana za proučavanje strukturnih svojstava dijatomeja (Gebeshuber i sur. 2003; Higgins i sur. 2003; Hildebrand i sur. 2006; Pletikapić i sur. 2011) AFM do sada nije korišten za proučavanje utjecaja povišene koncentracije teških metala, uključujući kadmij, na morfološka svojstva dijatomeja.

Za istraživanje u ovom radu odabrana je dijatomeja *Cylindrotheca closterium*, izolirana iz sjevernog Jadrana. Vrste roda *Cylindrotheca* spp. specifične su zbog slabo silificirane ljušturice, koja na nekim dijelovima ne sadrži [$(SiO_2)n(H_2O)$] (Volcani 1981; Kröeger i sur. 1997). Također je poznato da *C. closterium* u nepovoljnim uvjetima izlučuje velike količine ekstracelularnih polimera (Alcoverro i sur. 2000; Kovač i sur. 2005; Najdek i sur. 2005) koje se povezuje sa stvaranjem makroagregata morskog gela u sjevernom Jadranskom moru (Mišić Radić i sur. 2011), pojava poznata kao „cvjetanje mora“.

Ciljevi ovog diplomskog rada su sljedeći:

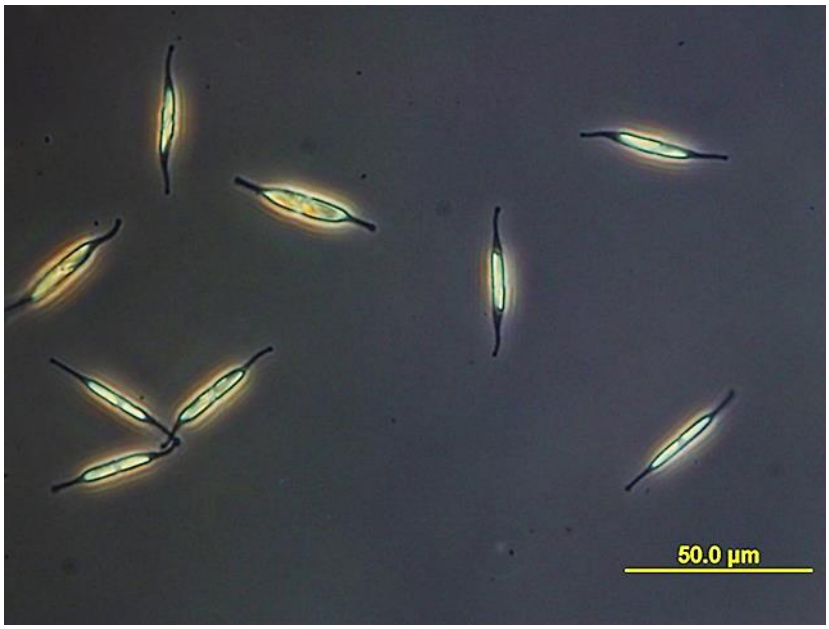
- odrediti krivulje rasta dijatomeje *Cylindrothecae closterium* pri različitim koncentracijama kadmija
- odrediti parametre specifične brzine rasta, μ i broj dioba stanica po danu, k, te postotak inhibicije rasta, $\%I$ pri različitim koncentracijama kadmija
- karakterizirati nanostrukturne morfološke promjene na površini stanica morske dijatomeje *Cylindrothecae closterium* uzrokovane povišenom koncentracijom teškog metala kadmija oslikavanjem stanica mikroskopom atomskih sila.

Analizom dobivenih rezultata omogućit će se bolje razumijevanje utjecaja teškog metala kadmija na dinamiku rasta te morfološka svojstva dijatomeje *C. closterium*. Nadalje, rezultati ovog diplomskog rada mogu poslužiti kao osnova za daljnja istraživanja utjecaja teških metala na nanostrukturna svojstva stanica drugih vrsta fitoplanktona.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Stanična kultura *Cylindrothecae closterium*

Za istraživanja u ovom radu korištena je monokultura dijatomeje *C. closterium* (Slika 2.1.) izolirana iz sjevernog Jadrana. Kulture stanica *C. closterium* uzgajane su u hranjivom mediju f/2 (Guillard 1975).



Slika 2.1. Stanice *C. closterium* izolirane iz sjevernog Jadrana, snimljene svjetlosnim mikroskopom Olympus BX51, uz povećanje od 400x.

Medij je pripremljen dodavanjem određenih volumena glavnih nutrijenata ($NaNO_3$, NaH_2PO_4 x H_2O, Na_2SiO_3 x $9H_2O$), metala u tragovima i vitamina u filtriranu morsku vodu. Morska voda je profiltrirana kroz Milipore filter veličine pora 0,22 µm.

U Erlenmeyerove tikvice od 250 mL dodano je 100 mL profiltrirane morske vode te je dodano po 100 µL osnovnih otopine $NaNO_3$, otopine Na_2SiO_3 x $9H_2O$ i otopine metala u tragovima (Tablica 2.1.). Nakon sterilizacije pripremljenog medija u mikrovalnoj pećnici (3 minute), medij je ohlađen na sobnoj temperaturi pod UV – lampom u komori za rad sa stanicama. U sterilnim uvjetima dodano je 100 µL osnovne otopine NaH_2PO_4 x H_2O te 0,5 mL otopine vitamina (kroz sterilni akrodisk filter veličine pora 0,22 µm). U tako pripremljen medij sterilno

je dodan alikvot od 500 µL monokulture *C. closterium*. Tikvice su poklopljene sterilnim vatenim čepom kako bi bio omogućen protok zraka. Nacijepljene kulture stanica rasle su u komori za uzgoj stanica pri temperaturi od 18 °C, uz ciklus dan-noć 12 h-12 h i miješanje od 20 rpm (engl. *round per minute*).

Tablica 2.1. a) Kemijski sastav medija f/2 za uzgoj kulture stanica *C. closterium*

kemikalija	**γ / g dm^{-3} (osnovna otopina)**	**V / mL**	**c / mol dm^{-3} (medij)**
$NaNO_3$	75	1	8,83 x 10^{-4}
NaH_2PO_4 x H_2O	5	1	3,63 x 10^{-5}
Na_2SiO_3 x $9H_2O$	30	1	1,06 x 10^{-4}
f/2 otopina tragova metala	vidi Tablicu 2.2.	1	-
f/2 otopina vitamina	vidi Tablicu 2.3.	0,5	-

b) Kemijski sastav otopine tragova metala za medij f/2

kemikalija	**γ / g dm^{-3} (osnovna otopina)**	**V / mL**	**m / g**	**c / mol dm^{-3} (medij)**
$FeCl_3$ x $6H_2O$	-	-	3,15	1 x 10^{-5}
Na_2EDTA x $2H_2O$	-	-	4,36	1 x 10^{-5}
$CuSO_4$ x $5H_2O$	9,8	1	-	4 x 10^{-8}
Na_2MoO_4 x $2H_2O$	6,3	1	-	3 x 10^{-8}
$ZnSO_4$ x $7H_2O$	22,0	1	-	8 x 10^{-8}
$CoCl_2$ x $6H_2O$	10,0	1	-	5 x 10^{-8}
$MnCl_2$ x $4H_2O$	180,0	1	-	9 x 10^{-7}

c) Kemijski sastav otopine vitamina za medij f/2

kemikalija	**γ / g dm^{-3} (osnovna otopina)**	**V / mL**	**m / mg**	**c / mol dm^{-3} (medij)**
Vitamin B_{12}	1,0	1	-	1 x 10^{-10}
Biotin	0,1	10	-	2 x 10^{-9}
Thiamine-HCl	-	-	200	3 x 10^{-7}

2.2. Eksperimentalni dizajn

Za određivanje pojedinih faza krivulje rasta *C. closterium* bez dodatka kadmija stanice su uzgajane 15 dana i brojane svaki drugi dan.

Za određivanje utjecaja kadmija na rast *C. closterium* stanice su uzgajane uz dodatak otopine $Cd(NO_3)_2$ različitih koncentracija. Otopine $Cd(NO_3)_2$ različitih koncentracija dodane su u ponovno nasađene kulture u eksponencijalnoj fazi rasta. Naime, alikvot od 10 mL kulture stanica peti dan rasta dodan je u 90 mL novog medija f/2 gdje su potom dodane otopine $Cd(NO_3)_2$ različitih koncentracija. U šest novo nasađenih kultura dodan je po 1 mL otopine $Cd(NO_3)_2$ različitih koncentracija (100 µg/L, 1000 µg/L, 10 000 µg/L, 25 000 µg/L, 50 000 µg/L i 100 000 µg/L), a sedma kultura u koju nije dodana otopina $Cd(NO_3)_2$ služila je kao kontrola. Otopine $Cd(NO_3)_2$ različitih koncentracija pripremljene su razrjeđivanjem otopine $Cd(NO_3)_2$ koncentracije 1 g/L ultračistom (MilliQ) vodom. Konačne koncentracije $Cd(NO_3)_2$ u mediju su bile 1 µg/L, 10 µg/L, 100 µg/L, 250 µg/L, 500 µg/L i 1000 µg/L. Stanice *C. closterium* u tako pripremljenim kulturama brojane su svakodnevno tijekom 5 dana.

Kulture stanica rasle su u komori za uzgoj stanica pri temperaturi od 18 °C, uz ciklus dan-noć 12h-12h i miješanje od 20 rpm (Slika 2.2.) te su brojane hemocitometrom svjetlosnim mikroskopom. Uzorak za nanostrukturnu karakterizaciju stanica AFM-om uzet je deveti dan rasta iz kontrolne kulture bez kadmija i kultura s kadmijem koncentracija 500 µg/L i 1000 µg/L.

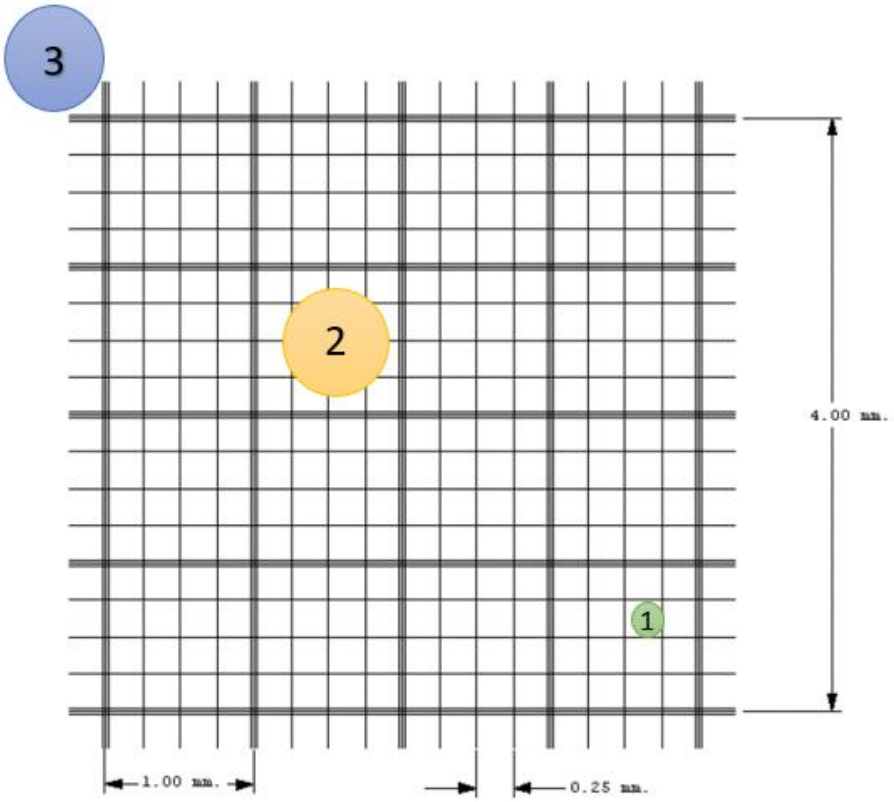
Slika 2.2. Komora za uzgoj stanica dijatomeja u Laboratoriju za biogeokemiju mora i atmosfere, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Institut Ruđer Bošković.

2.3. Određivanje dinamike rasta *Cylindrothecae closterium*

Za određivanje dinamike rasta *C. closterium* u kulturi bez dodatka kadmija stanice su brojane tijekom 15-o dnevnog eksperimenta svaka dva dana, kako bi se odredili početak i trajanje pojedinih faza rasta (početna lag, eksponencijalna (logaritamska) i stacionarna), odnosno točan početak i kraj eksponencijalne faze.

Za određivanje krivulje rasta *C. closterium* bez dodatka te sa dodatkom kadmija, kadmij je dodan u kulture koje su bile u eksponencijalnoj fazi rasta. Tako je uzet alikvot od 10 mL kulture stanica peti dan rasta i dodan u 90 mL novog medija f/2. U te novo nasađene kulture dodane su otopine $Cd(NO_3)_2$ različitih koncentracija, a u kontrolnu kulturu nije dodana $Cd(NO_3)_2$. Rast tako nasađenih kultura praćen je tijekom 5 dana uz svakodnevno brojanje za kulture bez prisutnosti kadmija, te pri različitim koncentracijama $Cd(NO_3)_2$ (1 µg/L, 10 µg/L, 100 µg/L, 250 µg/L, 500 µg/L i 1000 µg/L).

Za brojanje stanica uzorak kulture uziman je sterilno uz plamenik. 500 µL uzorka stavljeno je u hemocitometar u kojem su stanice brojane svjetlosnim mikroskopom Olympus BX51.



Slika 2.3. Fuchs-Rosenthalov hemocitometar s označenim kvadratima različitih dimenzija.

Ovisno o abundanciji stanica u ćeliji, stanice su brojane unutar određenog kvadrata (kvadrat 1, kvadrat 2 ili kvadrat 3). Ako su se unutar kvadrata označenog brojem 1 (Slika 2.3.), površine 0,0625 mm^2 i volumena 6,25 x 10^{-3} mm^3, nalazile barem po dvije stanice, one su brojane unutar takvih deset nasumično odabranih kvadrata. Ako su se unutar kvadrata označenog brojem 1 nalazile manje od dvije stanice, a unutar kvadrata označenog brojem 2 (Slika 2.3.) barem po dvije stanice, one su brojane unutar takva tri nasumično odabrana kvadrata. Kvadrat 2 je površine 1 mm^2 i volumena 0,1 mm^3. A ako su se unutar kvadrata označenog brojem 2 nalazile manje od dvije stanice, one su brojane unutar kvadrata označenog brojem 3 (Slika 2.3.), površine 16 mm^2 i volumena 1,6 mm^3. Abundancija stanica u otopini je izračunata iz brojnosti stanica prisutnih u određenom kvadratu prema Fuchs-Rosenthal formuli za hemocitometar (Tablica 2.2.).

Tablica 2.2. Fuchs-Rosenthal formule za izračunavanje abundancije stanica u otopini

KVADRAT 1	$\text{abundancija stanica} = \frac{\text{ukupan broj stanica}}{\text{broj brojenih kvadrata}} \times 160\,000$
KVADRAT 2	$\text{abundancija stanica} = \frac{\text{ukupan broj stanica}}{\text{broj brojenih kvadrata}} \times 10\,000$
KVADRAT 3	$\text{abundancija stanica} = \text{ukupan broj stanica} \times 625$

Abundancije stanica u kulturi tijekom 15-o dnevnog eksperimenta određene su svaka dva dana te je na temelju dobivenih abundancija nacrtana krivulja rasta i određene su pojedine faze rasta stanica. Abundancije stanica u kulturi s dodatkom različitih koncentracija kadmija određene su za svaki od 5 dana rasta te su na temelju njih nacrtane krivulje rasta za kulturu bez prisutne otopine $Cd(NO_3)_2$ i za kulture s prisutnim otopinama $Cd(NO_3)_2$ koncentracija 1 µg/L, 10 µg/L, 100 µg/L, 250 µg/L, 500 µg/L i 1000 µg/L. Za svaku kulturu iz izračunatih abundancija stanica u kulturi izračunata je specifična brzina rasta (engl. *growth rate*), μ, unutar određenog promatranog vremenskog perioda prema formuli:

$$\mu_{\mathrm{i-j}} = \frac{\ln c_{\mathrm{j}} - \ln c_{\mathrm{i}}}{broj\ dana} \qquad (2.1.)$$

gdje je c_j abundancija stanica zadnjeg proučavanog dana, a c_i abundancija stanica prvog proučavanog dana. Iz specifičnih brzina rasta izračunat je postotak inhibicije rasta uzrokovan povišenom koncentracijom kadmija prema formuli:

$$\% I = \frac{\mu_K - \mu_T}{\mu_K} \times 100 \qquad (2.2.)$$

gdje je I postotak inhibicije, μ_K specifična brzina rasta kontrolnog primjerka, a μ_T specifična brzina rasta u prisutnosti povišene koncentracije kadmija.

Također, je iz specifične brzine rasta stanica izračunat i parametar k koji pokazuje koliko se dioba stanica dogodilo po danu u određenoj kulturi. Parametar k izračunat je prema formuli:

$$k = \frac{\mu}{\ln 2} \qquad (2.3.)$$

gdje je μ specifična brzina rasta za određenu kulturu.

Vrijednosti μ, $\%I$ k su izračunate za kulture stanica bez dodatka otopine $Cd(NO_3)_2$ i s dodatkom otopine $Cd(NO_3)_2$ različitih koncentracija (1 µg/L, 10 µg/L, 100 µg/L, 250 µg/L, 500 µg/L i 1000 µg/L).

2.4. AFM oslikavanje stanica *Cylindrothecae closterium*

2.4.1. Priprema uzoraka

Uzorci *C. closterium* za oslikavanje AFM-om pripremljeni su tehnikom depozicije kapi (engl. *drop deposition*). Kao podloga korišten je tinjac zbog svoje atomski ravne površine. Tinjac se dvostrano ljepljivom trakom pričvrstio na metalni disk, izrađen od nehrđajućeg čelika, promjera 1,5 cm. Na svježe kalani tinjac nanosilo se 5 µL uzorka kulture *C. closterium* uzete sterilno direktno iz tikvice s kontrolnom kulturom, kulturom s koncentracijom $Cd(NO_3)_2$ 500 µg/L i kulturom s koncentracijom $Cd(NO_3)_2$ 1000 µg/L. Uzorak se nakon sat vremena sušenja, u zatvorenoj Petrijevoj zdjelici, tri puta isprao sa po 20 µL ultračiste (MilliQ) vode, kako bi se uklonili kristali soli nastali sušenjem uzorka. Uzorak se ostavio na sušenju u pokrivenoj Petrijevoj zdjelici, kako bi se spriječilo zagađenje uzorka česticama iz zraka. Svaki od uzoraka kultura stanica *C. closterium* pripremljen je na tri zasebne pločice. Ovim postupkom stanice morske dijatomeje *C. closterium* ostaju čvrsto prilijepljene za površinu tinjca što omogućuje stabilno oslikavanje uzorka AFM-om.

2.4.2. AFM mjerenja

AFM mjerenja su izvedena na uređaju Multimode Scanning Probe Microscope (MM-SPM) s Nanoscope IIIa kontrolnom jedinicom (Veeco Instruments, Santa Barbara, CA). Uređaj je postavljen na pneumatski stol za izolaciju vibracija te je dodatno opremljen optičkom kamerom visoke rezolucije (CCD, Sony Japan) (Slika 2.4.). Optičkom kamerom precizno se određivalo pozicioniranje AFM šiljka na stanice *C. closterium*.

Slika 2.4. A) Uređaj AFM u Laboratoriju za biogeokemiju mora i atmosfere, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Institut Ruđer Bošković; B) glavni dijelovi uređaja Multimode Scanning Probe Microscope s Nanoscope IIIa kontrolnom jedinicom.

Korišteno je piezoelektrično pretraživalo s vertikalnom spregom AS–130V („J“ pretraživalo, lateralnog raspona 125 µm x 125 µm i vertikalnog raspona 5 µm). Mjerenja su rađena u kontaktnom režimu rada, a korištene su pretražne probe od silicijevog nitrida, Si_3N_4 (NP-S, Bruker) s konstantnom opruge 0,06 N m^{-1} i radijusom zakrivljenosti vrha šiljka 10 nm (Slika 2.5.). Kako bi se izbjegla eventualna oštećenja uzorka tijekom mjerenja primijenjena sila je održavana na najnižoj vrijednost. Brzina skeniranja optimizirana je između 1,0 do 2,0 Hz po liniji.

AFM-om je snimljeno 7 stanica iz uzorka kontrolnog primjerka kulture *C. closterium*, 7 stanica iz kulture s koncentracijom $Cd(NO_3)_2$ 500 µg/L i 7 stanica iz kulture s koncentracijom $Cd(NO_3)_2$ 1000 µg/L. Veličina skeniranog područja bila je od 50 µm x 50 µm do 500 nm x 500 nm, a slike su snimane s najvećom rezolucijom 512 x 512 točaka po slici.

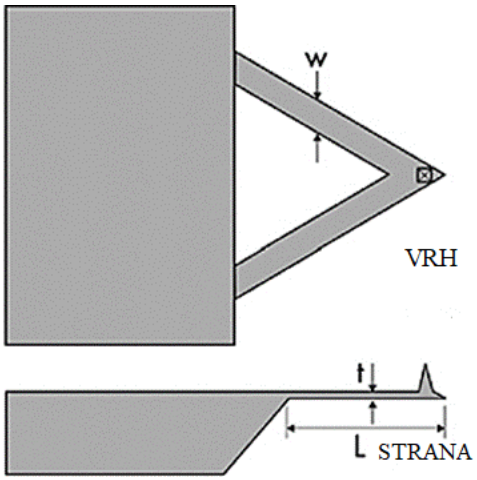
Za procesiranje i analizu slika korišten je programski paket NanoScope™ (Digital Instruments, verzija V6.14r1). Sve slike oslikane su u kontaktnom režimu rada i sve predstavljaju originalne podatke (engl. „*row data*“), osim što je korištena opcija dvodimenzijskog poravnavanja prvog reda (engl. *first order two-dimensional flattening*), kako bi se uklonio prividni nagib površine. Mjerenja su izvedena na zraku, na sobnoj temperaturi i vlažnosti zraka 50 - 60%.

Analiza slika rađena je nakon AFM oslikavanja („*off-line*“). Za oslikane površine napravljeni su topografski prikazi površina i prikazi odstupanja otklona poluge. Topografske slike koristile su za određivanje visina stanica, na njenom središnjem dijelu i na njenim krajevima, te za određivanje hrapavosti, R_a površine valve i pojasa. Hrapavost, R_a, je aritmetička sredina apsolutnih vrijednosti devijacija visine površine (z_j) mjerene u odnosu na središnji položaj ravnine.

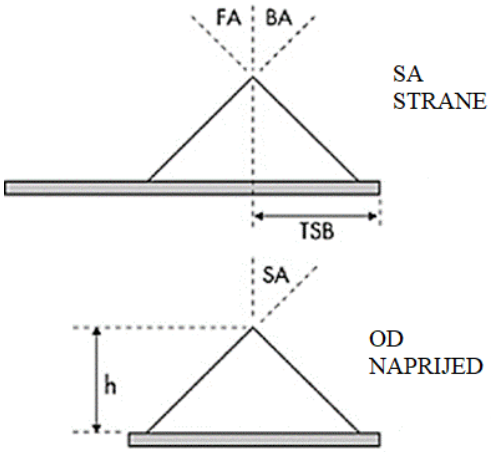
$$R_a = \frac{1}{n \Sigma |z_j|} \qquad (2.4.)$$

Na topografskoj slici funkcijom „*Section analysis*“ u programu Nanoscope V6.14r1 napravljene su analize vertikalnih presjeka na slici. U istom programu rađeni su i trodimenzionalni prikazi pomoću funkcije „*3D view*“.

Pretražna proba (dvije poluge s oštrim šiljkom)



Šiljak



Karakteristike poluge

Materijal	silicijev nitrid
Debljina (t) (nominalna)	0,6 µm
Debljina (t) (raspon)	0,4 – 0,7 µm
Konstante poluga (nominalne)	0,06 – 0,58 N m^{-1}
Frekvencija (nominalna)	12 – 40 kHz
Sloj na poleđini	Au/Cr
Donji sloj	15 nm Cr
Gornji sloj	60 nm Au
Širina (w) (nominalna)	17 – 41 µm
Duljina (L) (nominalna)	115 – 196 µm

Karakteristike šiljka

Geometrija	lijevano
Visina šiljka (h)	2,5 – 3,5 µm
Prednji kut (FA)	35 ± 2°
Stražnji kut (BA)	35 ± 2°
Bočni kut (SA)	35 ± 2°
Radijus šiljka (nominalni)	10 nm
Radijus šiljka (maksimalni)	60 nm
Udaljenost od vrha poluge do vrha šiljka (TSB) (nominalna)	4 µm
Udaljenost od vrha poluge do vrha šiljka (TSB) (raspon)	3 – 5,5 µm

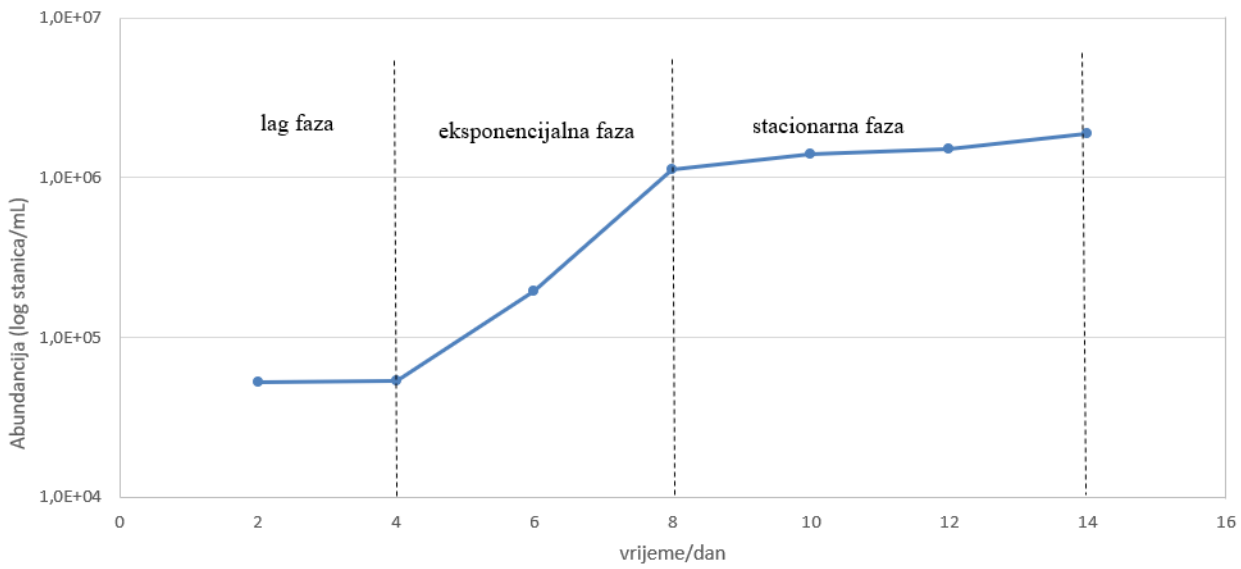
Slika 2.5. SEM slika Vecco NP-S pretražne probe za kontaktni režim rada korištene u ovom radu sa specifikacijama proizvođača (preuzeto iz: *Vecco Probes – Catalogue* 2006).

3. REZULTATI

3.1. Dinamika rasta *Cylindrothecae closterium*

3.1.1. Krivulja rasta *Cylindrothecae closterium* bez dodatka kadmija

Dijatomeja *C. closterium* je uzgajana bez dodatka kadmija da bi se odredila krivulja rasta tijekom 15 dana. Iz podataka o broju stanica izračunate su abundancije stanica u otopini prema Fuchs-Rosenthal formuli za hemocitometar te je dobivena krivulja rasta *C. closterium*. Na temelju krivulje rasta određene su početak i trajanje triju faza: 1. početna lag faza; 2. eksponencijalna (logaritamska) faza; 3. stacionarna faza (Slika 3.1.).

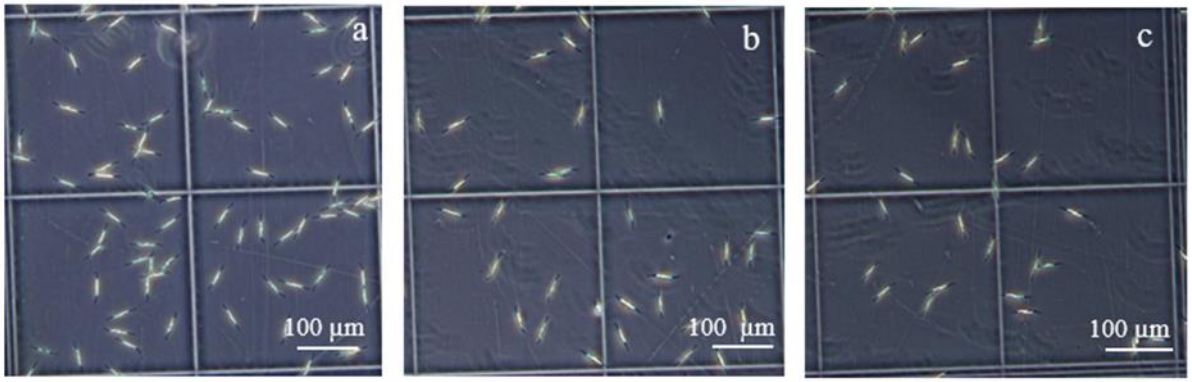


Slika 3.1. Krivulja rasta *C. closterium* u mediju f/2 kroz 15 dana eksperimenta.

Početna lag faza trajala je do četvrtog dana, a abundancija stanica se neznatno povećala od 5,25 x 10^4 stanica/mL (drugi dan) do 5,33 x 10^4 stanica/mL (četvrti dan). Eksponencijalna faza rasta nastupila je četvrti dan i trajala je do osmog dana (1,12 x 10^6 stanica/mL). Stacionarna faza rasta nastupila je nakon osmog dana i trajala je do četrnaestog dana kada je abundancija stanica iznosila 1,90 x 10^6 stanica/mL.

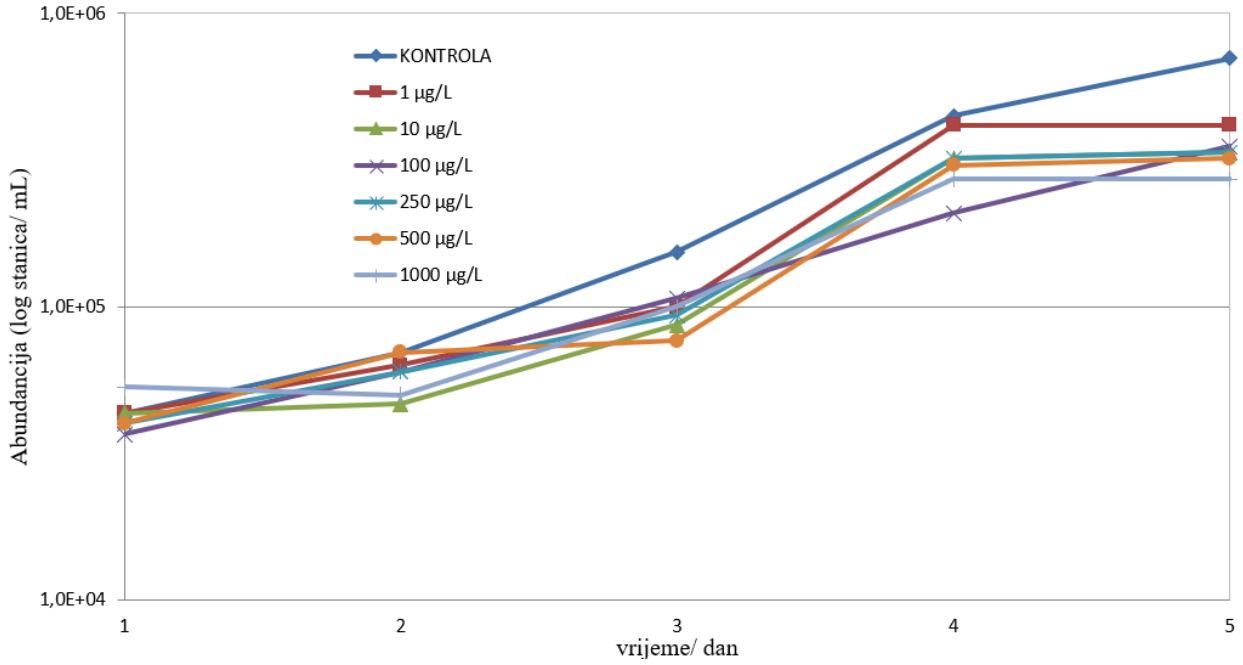
3.1.2. Krivulje rasta *Cylindrothecae closterium* uz dodatak kadmija

Usporedno je praćen rast stanica *C. closterium* u uvjetima bez dodatka kadmija, s koncentracijom kadmija 500 µg/L i s koncentracijom kadmija 1000 µg/L kroz 5 dana. Uspoređena je prisutnost stanica *C. closterium* unutar četiri kvadrata (kvadrata označen brojem 2 na Slici 2.3.) hemocitometra s različitim kulturama (kontrolna kultura bez kadmija, kultura s koncentracijom kadmija 500 µg/L i kultura s koncentracijom kadmija 1000 µg/L) te je vidljiv smanjen rast *C. closterium* uzrokovan povišenim koncentracijama kadmija (Slika 3.2.)



Slika 3.2. Stanice *C. closterium* snimljene svjetlosnim mikroskopom u hemocitometru treći dan rasta pod povećanjem 200x: a) u kontrolnoj kulturi bez dodatka kadmija; b) u kulturi s koncentracijom kadmija 500 µg/L; c) u kulturi s koncentracijom kadmija 1000 µg/L.

Abundancija stanica u kontrolnoj kulturi narasla je od početne 4,33 x 10^4 stanica/mL (prvi dan) do 7,04 x 10^5 stanica/mL (peti dan) (Slika 3.3.). Abundancija stanica u kulturi s koncentracijom kadmija 1 µg/L narasla je od 4,33 x 10^4 stanica/mL (prvi dan) do 4,16 x 10^5 stanica/mL (peti dan), a u kulturi s koncentracijom kadmija 10 µg/L od 4,33 x 10^4 stanica/mL (prvi dan) do 3,36 x 10^5 stanica/mL (peti dan) (Slika 3.3.). Abundancija stanica u kulturi s koncentracijom kadmija 100 µg/L narasla je od početne 3,67 x 10^4 stanica/mL (prvi dan) do 3,52 x 10^5 stanica/mL (peti dan), a abundancija stanica u kulturi s koncentracijom kadmija 250 µg/L od 4,00 x 10^4 stanica/mL (prvi dan) do 3,36 x 10^5 stanica/mL (peti dan) (Slika 3.3.). Abundancija stanica u kulturi s koncentracijom kadmija 500 µg/L narasla je od početne 4,00 x 10^4 stanica/mL (prvi dan) do 3,20 x 10^5 stanica/mL (peti dan) (Slika 3.3.). Najmanji porast abundancije imala je kultura stanica s koncentracijom kadmija 1000 µg/L gdje je abundancija stanica od početne 5,33 x 10^4 stanica/mL (prvi dan) narasla do 2,72 x 10^5 stanica/mL (peti dan) (Slika 3.3.).



Slika 3.3. Krivulje rasta *C. closterium* u kontroli i uz dodatak otopine $Cd(NO_3)_2$ različitih koncentracija (1 µg/L, 10 µg/L, 100 µg/L, 250 µg/L, 500 µg/L i 1000 µg/L).

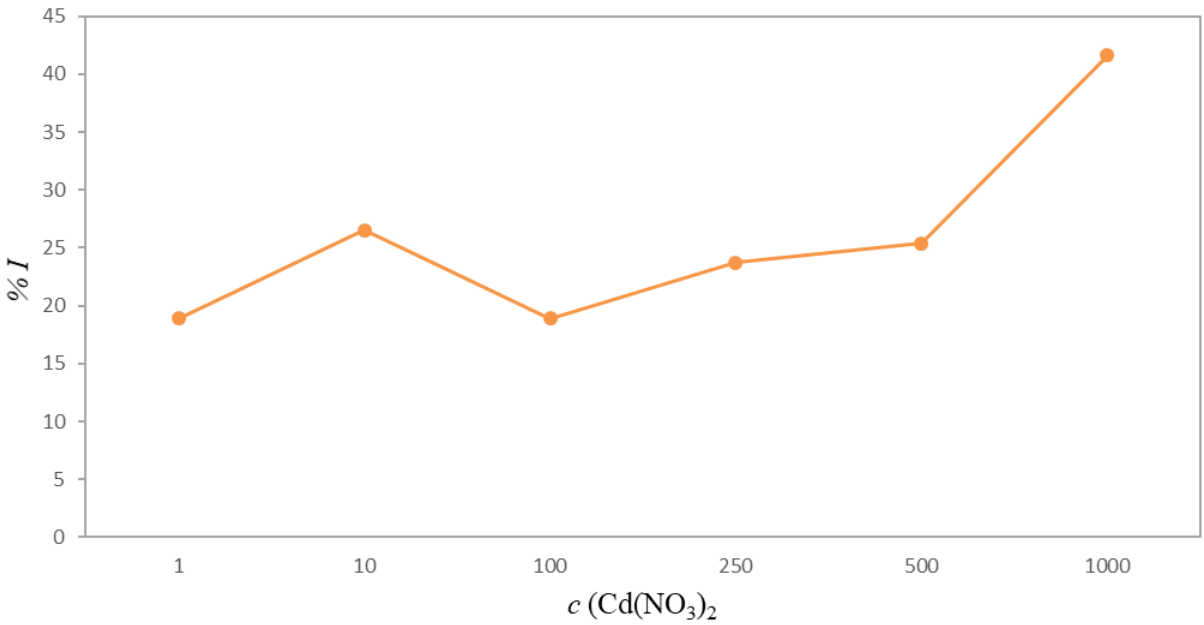
Vrijednost specifične brzine rasta, *µ*, *C. closterium* u kontrolnoj kulturi bez dodatka kadmija unutar petodnevnog eksperimenta iznosila je 0,70. Vrijednost specifične brzine rasta smanjila se u kulturi s koncentracijom kadmija 1 µg/L, za koju je iznosila 0,57. Vrijednost specifične brzine rasta za kulturu s koncentracijom kadmija 10 µg/L iznosila je 0,51.Vrijednosti specifičnih brzina rasta za kulture s koncentracijama kadmija od 100 µg/L do 500 µg/L bile su u rasponu od 0,57 do 0,52. Vrijednost specifične brzine rasta najviše se smanjila u kulturi s koncentracijom kadmija 1000 µg/L i iznosila je 0,41 (Tablica 3.1.).

Iz specifičnih brzina rasta izračunat je parametar *k* koji pokazuje koliko se dnevno dogodilo dioba stanica. Parametar *k* za stanice u kontrolnoj kulturi bez dodatka kadmija iznosio je 1,01, a u kulturi s koncentracijom kadmija 1 µg/L parametar *k* se smanjio na 0,82. Parametar *k* za stanice u kulturi s koncentracijom kadmija 10 µg/L iznosio je 0,74. Parametar *k* za stanice u kulturama s koncentracijama kadmija od 100 µg/L do 500 µg/L bio je u rasponu od 0,82 do 0,75. Vrijednost parametra *k* najviše se smanjila u kulturi s koncentracijom kadmija 1000 µg/L i iznosila je 0,59 (Tablica 3.1.).

Tablica 3.1. Specifične brzine rasta (μ), broj dioba stanica po danu (k) i inhibicija rasta *(%I)* *C. closterium* pri različitim koncentracijama $Cd(NO_3)_2$.

c **($Cd(NO_3)_2$**	***μ***	***k***	***% I***
0	0,70	1,01	-
1 μg/L	0,57	0,82	18,9
10 μg/L	0,51	0,74	26,5
100 μg/L	0,57	0,82	18,9
250 μg/L	0,53	0,77	23,7
500 μg/L	0,52	0,75	25,4
1 000 μg/L	0,41	0,59	41,6

U kulturi *C. closterium* s koncentracijom kadmija 1 μg/L rast je inhibiran 18,9%. Postotak inhibicije rasta u kulturi s koncentracijom kadmija 10 μg/L iznosio je 26,5%, a postoci inhibicije u kulturama s koncentracijama kadmija od 100 μg/L do 500 μg/L bili su u rasponu od 18,9% do 25,4%. Najveća inhibicija bila je u kulturi s koncentracijom kadmija 1000 μg/L i iznosila je 41,6% (Slika 3.4.).

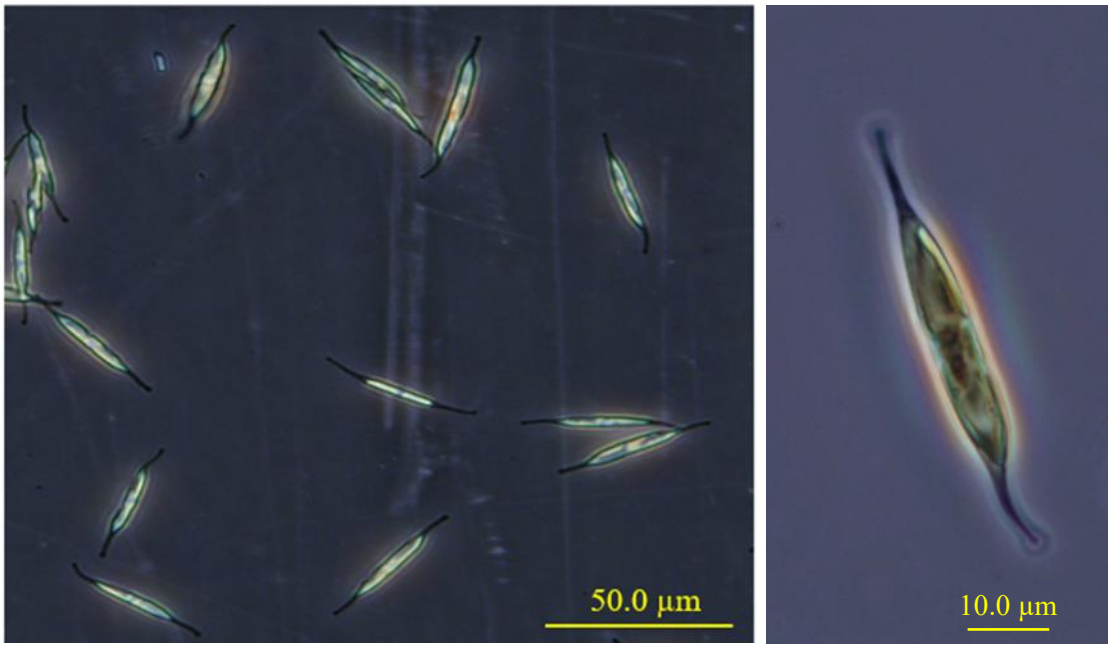


Slika 3.4. Ovisnost postotka inhibicije rasta *C. closterium* o koncentraciji $Cd(NO_3)_2$ u kulturama stanica.

3.2. Nanostrukturna karakterizacija stanica *Cylindrothecae closterium*

Stanice *C. closterium* koje su rasle u kulturama bez dodatka kadmija te s koncentracijama kadmija 500 µg/L i 1000 µg/L oslikane su pomoću mikroskopa atomskih sila, AFM-a, kako bi se mogle usporediti morfološke karakteristike stanica i odrediti do kojih je promjena došlo uslijed rasta stanica pri povišenim koncentracijama teškog metala kadmija u kulturi.

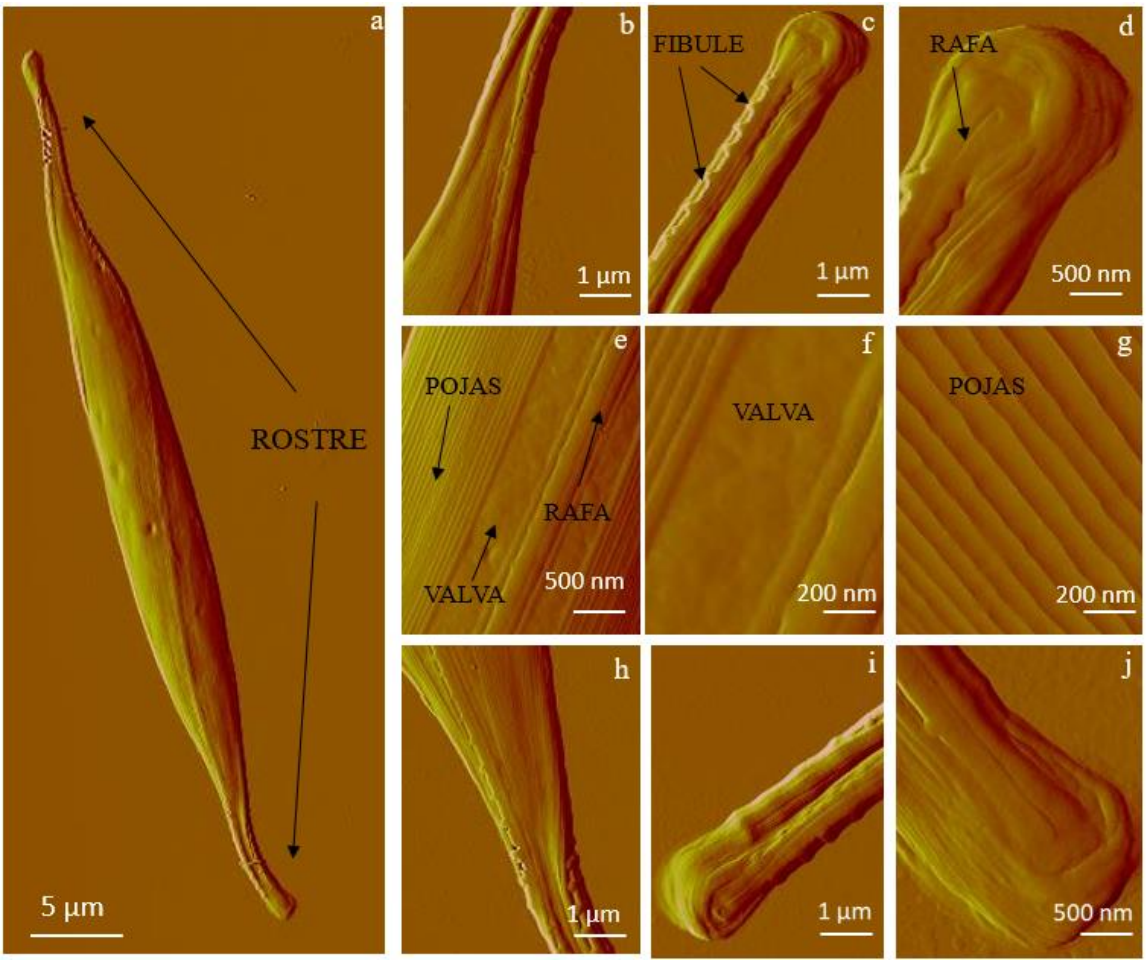
Na stanicama *C. closterium* oslikanim svjetlosnim mikroskopom mogle su se raspoznati fleksibilne rostre od središnjeg dijela stanice (Slika 3.5.). Stanice imaju dva uzdužna kloroplasta na središnjem dijelu stanice koji su jasno uočljivi svjetlosnim mikroskopom. Dužina stanica bila je u rasponu od 38-42 µm, a širina u rasponu od 3,5-5,5 µm.



Slika 3.5. Stanice *C. closterium* izolirane iz sjevernog Jadrana, snimljene svjetlosnim mikroskopom Olympus BX51, uz povećanje od: a) 400x; b) 1000x.

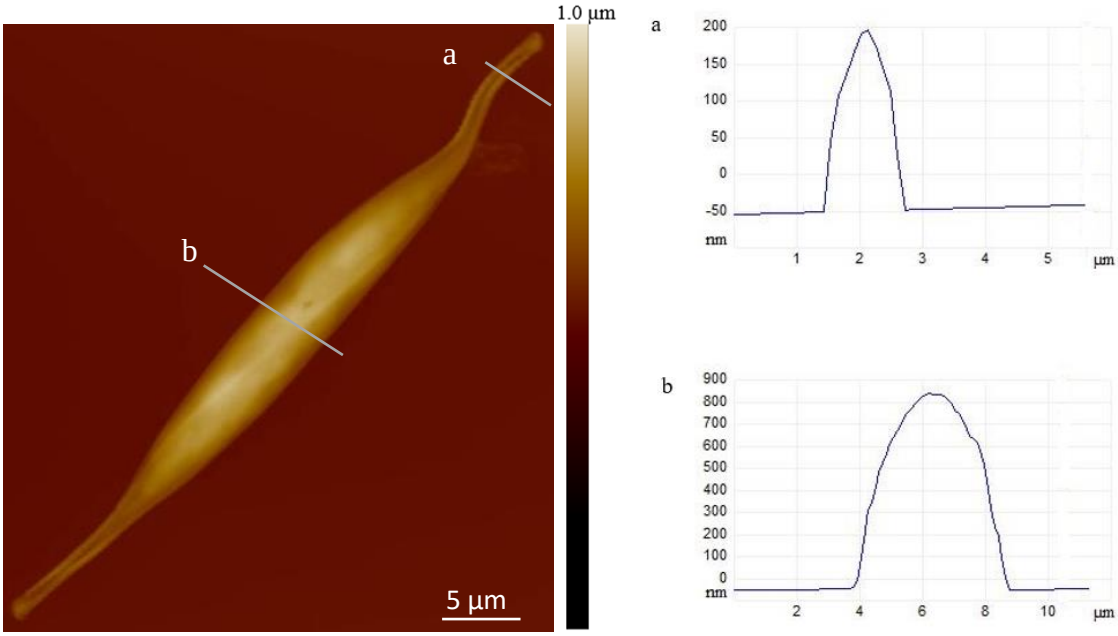
3.2.1. Vizualizacija stanica *Cylindrothecae closterium* bez dodatka kadmija

Stanice *C. closterium* oslikane AFM-om nisu imale površinskih oštećenja stoga su se jasno mogli vidjeti detalji silikatne ljušturice. Na stanicama *C. closterium* jasno se mogu raspoznati fleksibilne rostre od središnjeg dijela stanice (Slika 3.6.a). Na većoj rezoluciji na stanicama se mogu raspoznati dva morfološki različita dijela ljušturice, pojas i valva (Slika 3.6.b-j). Površina valve je ravna u usporedbi s površinom pojasa koji se sastoji od skupa paralelnih silikatnih traka (Slika 3.6.f-g). Uzduž valve proteže se longitudinalni prorez, rafa (Slika 3.6.d; e; j), kojeg omeđuju fibule (Slika 3.6.c; i-j).



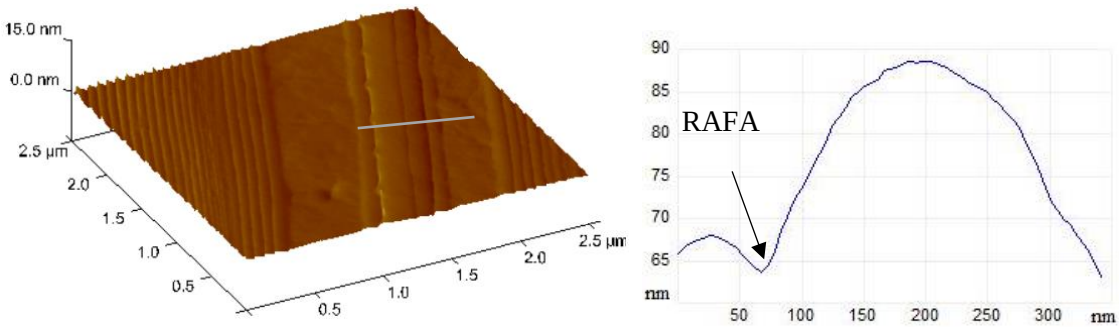
Slika 3.6. AFM prikaz cijele stanice *C. closterium* i njenih morfoloških detalja: a) cijela stanica *C. closterium*; b-d) uvećana gornja rostra stanice sa rafom i fibulama oko nje; e) uvećani središnji dio stanice, gdje se detaljnije vide pojas, valva i rafa; f) valva na središnjem dijelu stanice; g) pojas na središnjem dijelu; h-j) uvećana donja rostra stanice. AFM prikaz odstupanja otklona poluge, veličine područja: a) 40 µm x 15 µm; b) 4 µm x 3 µm; c) 3 µm x 2,5 µm; d) 2 µm x 1,5 µm; e) 3 µm x 2 µm; f) 1,5 µm x 1 µm; g) 1,5 µm x 1 µm; h) 4 µm x 3 µm; i) 3 µm x 2,5 µm; j) 2 µm x 1,5 µm.

Načinjen je topografski prikaz stanice *C. closterium* (Slika 3.7.), te su određene visine središnjeg dijela stanice i visine rostra. Visine središnjih dijelova stanica bile su u rasponu od 700 nm do 1000 nm (Slika 3.7.b), a visine rostra u rasponu od 100 nm do 300 nm (Slika 3.7.a).



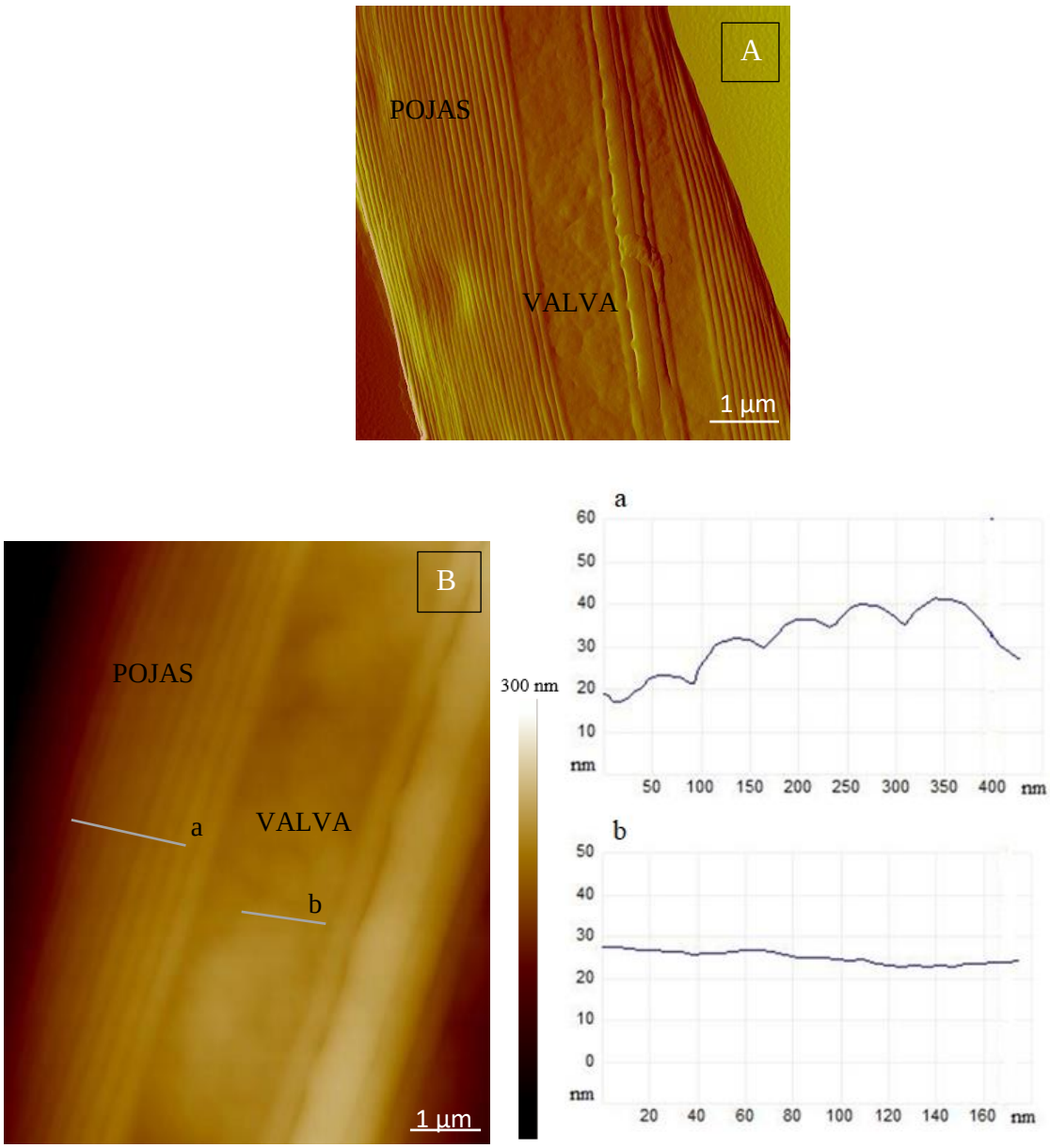
Slika 3.7. Topografski AFM prikaz stanice *C. closterium* (veličina područja 30 µm x 25 µm, vertikalna skala 1,0 µm) s analizom vertikalnih presjeka duž naznačenih linija: a) vertikalni presjek rostre duž linije a; b) vertikalni presjek središnjeg dijela stanice duž linije b.

Rafa je s donje strane omeđena fibulama (Slika 3.8.), zbog kojih je okolno područje rafe uzdignuto oko 20 nm iznad valve. Rafa je široka 40 nm i duboka oko 10 nm (Slika 3.8.). Zbog oblika i širine šiljka, moguće je da šiljak ne prodire do kraja rafe te se može reći da je prorez dubok ≥ 10 nm.



Slika 3.8. Trodimenzionalni prikaz središnjeg dijela stanice *C. closterium* na kojem je vidljiva rafa (veličina područja 2,5 µm x 2,5 µm, vertikalna skala 15 nm), s analizom vertikalnog presjeka duž naznačene linije.

Središnji dio stanice *C. closterium*, gdje su vidljivi valva i pojas, oslikan je na većoj rezoluciji (Slika 3.9.A). Na topografskom prikazu središnjeg dijela stanice načinjeni su vertikalni presjeci. Valva je ravne površine stoga su manje varijacije u visini njene strukture (oko 5 nm), dok su varijacije visine u strukturi pojasa veće i iznose oko 20 nm. Određena je hrapavost površine R_a valve i pojasa. R_a za područje valve iznosio je 3 nm, a za područje pojasa 14 nm.

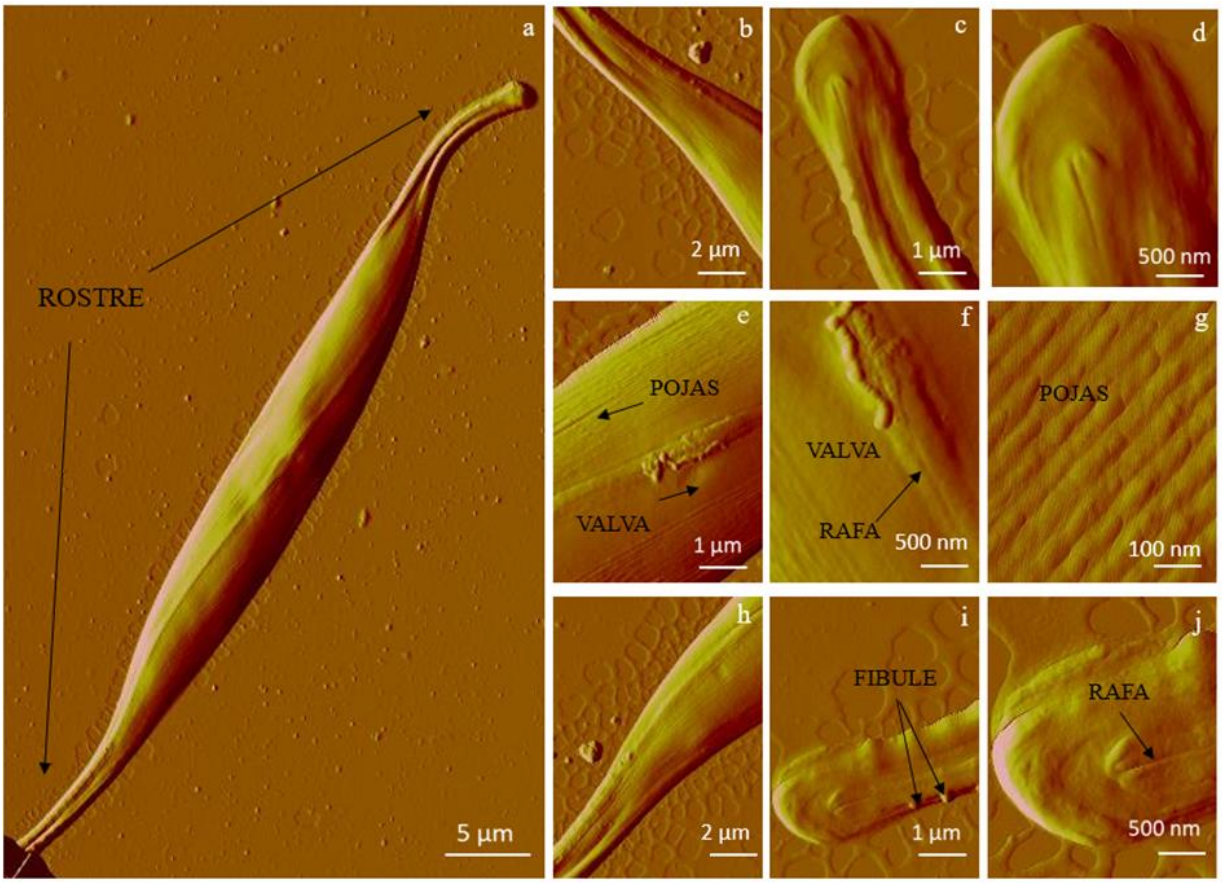


Slika 3.9. AFM prikaz središnjeg dijela stanice *C. closterium*: A) prikaz odstupanja otklona poluge (veličina područja 4,5 µm x 5 µm); B) topografski prikaz (veličina područja 2,5 µm x 3,5 µm, vertikalna skala 300 nm) s analizom vertikalnih presjeka duž naznačenih linija: a) vertikalni presjek pojasa duž naznačene linije a; b) vertikalni presjek valve duž linije b.

3.2.2. Vizualizacija stanica *Cylindrothecae closterium* uz dodatak kadmija

3.2.2.1. Vizualizacija stanica *Cylindrothecae closterium* uz dodatak kadmija koncentracije 500 µg/L

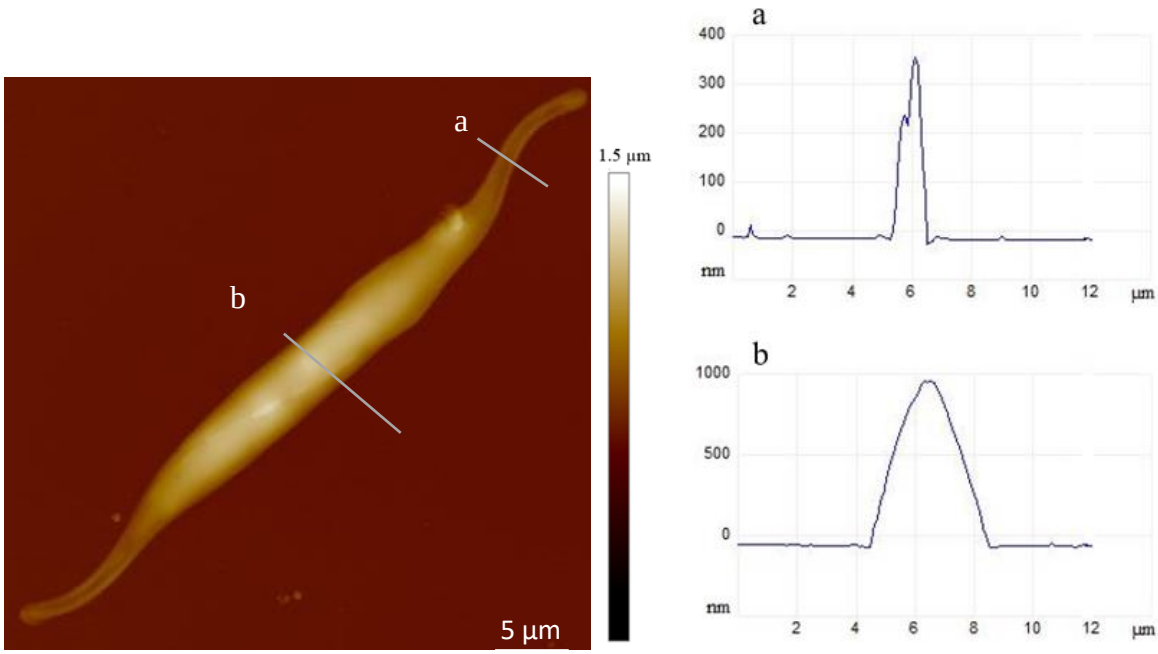
Oblik i veličina stanice *C. closterium* uzgajane u kulturi s koncentracijom kadmija 500 µg/L ostali su nepromijenjeni. Jasno se razlikuju fleksibilne rostre od središnjeg dijela stanice (Slika 3.10.a). Uzduž stanice izraženo je područje oko rafe, koje je zbog fibula uzdignuto iznad površine valve (Slika 3.10.c-d;f; i-j). Dužine stanica bile su u rasponu 38-42 µm, a širine u rasponu od 3,5-5,5 µm.



Slika 3.10. AFM prikaz cijele stanice *C. closterium* uzgajane u kulturi s koncentracijom kadmija 500 µg/L, i njenih morfoloških detalja: a) cijela stanica *C. closterium*; b-d) uvećana gornja rostra stanice; e) uvećani središnji dio stanice, gdje se detaljnije vide pojas i valva; f) valva na središnjem dijelu stanice sa izraženom rafom; g) pojas na središnjem dijelu; h-j) uvećana donja rostra stanice sa izraženom rafom i fibulama oko nje. AFM prikaz odstupanja otklona poluge, veličine područja: a) 40 µm x 20 µm; b) 6 µm x 5,5 µm; c) 3,5 µm x 3 µm; d) 2 µm x 1,5 µm; e) 3,5 µm x 3 µm; f) 2 µm x 1,5 µm; g) 1 µm x 0,5 µm; h) 6 µm x 5,5 µm; i) 3,5 µm x 3 µm j) 2 µm x 1,5 µm.

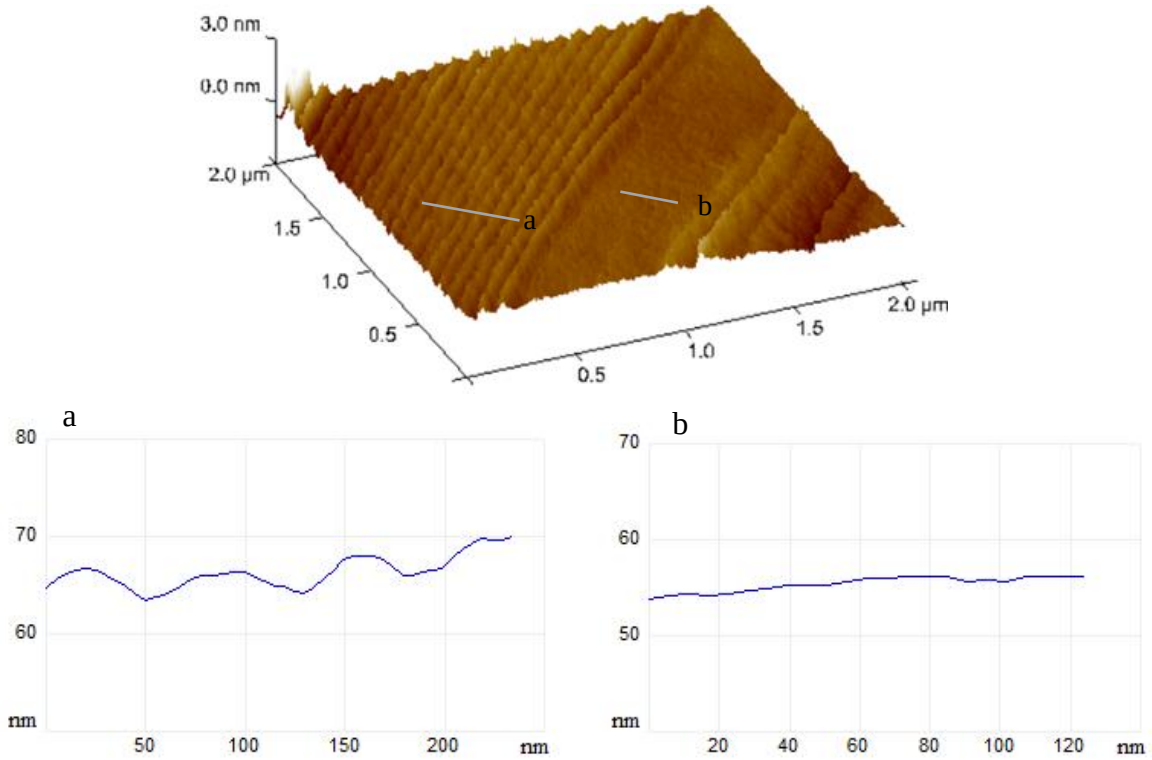
Na površini središnjeg dijela stanice primijećene su manje promjene na njenim jače silificiranim dijelovima, pojasu i oko rafe. Oko rafe uočene su nakupine manjih sferičnih čestica (3.10.e-f) kojih nije bilo na stanici *C. closterium* uzgajanoj u kulturi bez dodatka kadmija. Dok su se na pojasu nazirale manje sferične čestice (Slika 3.10.g) koje nisu bile vidljive na stanici *C. closterium* uzgajanoj u kulturi bez dodatka kadmija (Slika 3.6.g). Valva je na središnjem dijelu stanice i na rostrama zadržala ravnu površinu (Slika 3.10.c; e-f; i). Površina pojasa na rostrama (Slika 3.10. b-h; i-j) jednaka je kao i na rostrama stanice *C. closterium* uzgajanoj u kulturi bez dodatka kadmija (Slika 3.6.b-h; i-j).

Načinjen je topografski prikaz stanice *C. closterium* uzgajane u kulturi s koncentracijom kadmija 500 µg/L (Slika 3.11.), te su određene visine središnjeg dijela stanice i visine rostra. Visine središnjih dijelova stanica *C. closterium* uzgajanih u kulturi s koncentracijom kadmija 500 µg/L bile su u rasponu od 700-1200 nm (Slika 3.11.b), a visine rostra u rasponu od 100-350 nm (Slika 3.11.a).



Slika 3.11. Topografski AFM prikaz stanice *C. closterium* uzgajane u kulturi s koncentracijom kadmija 500 µg/L (veličina područja 30 µm x 30 µm, vertikalna skala 1,5 µm) s analizom vertikalnih presjeka duž naznačenih linija: a) vertikalni presjek rostre duž linije a; b) vertikalni presjek središnjeg dijela stanice duž linije b.

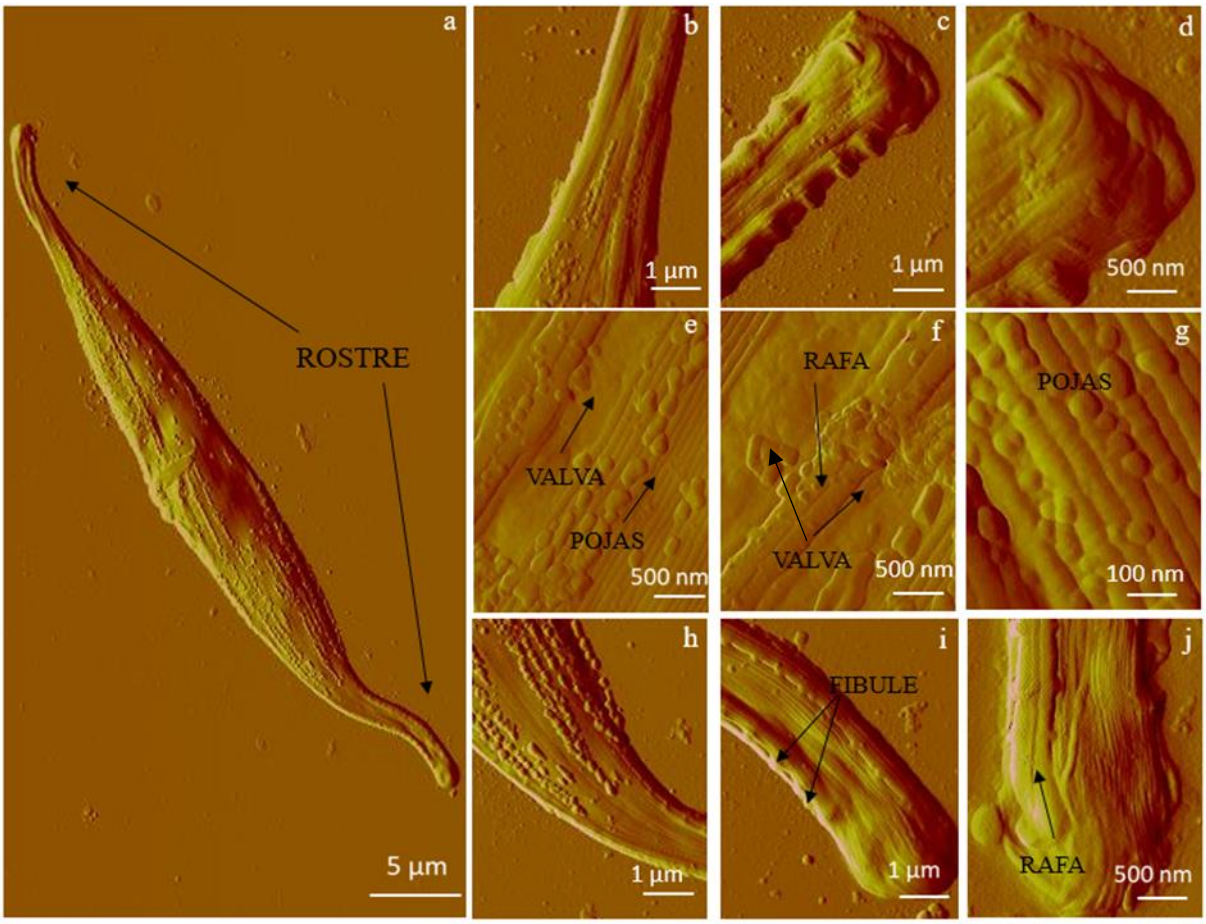
Na većoj rezoluciji oslikan je središnji dio stanice *C. closterium* uzgajane u kulturi s koncentracijom kadmija 500 µg/L (Slika 3.12.) kako bi se mogle usporediti površine pojasa i valve. Valva je bila ravnije površine u usporedbi s pojasom i na njoj nisu bile vidljive promjene. Pojas je bo nepravilnije (hrapavije) strukture, zbog sferičnih čestica, u odnosu na pojas stanice *C. closterium* uzgajane u kontrolnoj kulturi bez dodatka kadmija. Varijacije u visini pojasa iznosile su oko 10 nm (Slika 3.12.a), a varijacije u visini valve oko 5 nm (Slika 3.12.b).



Slika 3.12. Trodimenzionalni prikaz središnjeg dijela stanice *C. closterium* uzgajane u kulturi s koncentracijom kadmija 500 µg/L (veličina područja 2 µm x 2 µm, vertikalna skala 3 nm) s analizom vertikalnih presjeka duž naznačenih linija: a) vertikalni presjek pojasa duž linije a; b) vertikalni presjek valve duž linije b.

3.2.2.2. Vizualizacija stanica *Cylindrothecae closterium* uz dodatak kadmija koncentracije 1000 µg/L

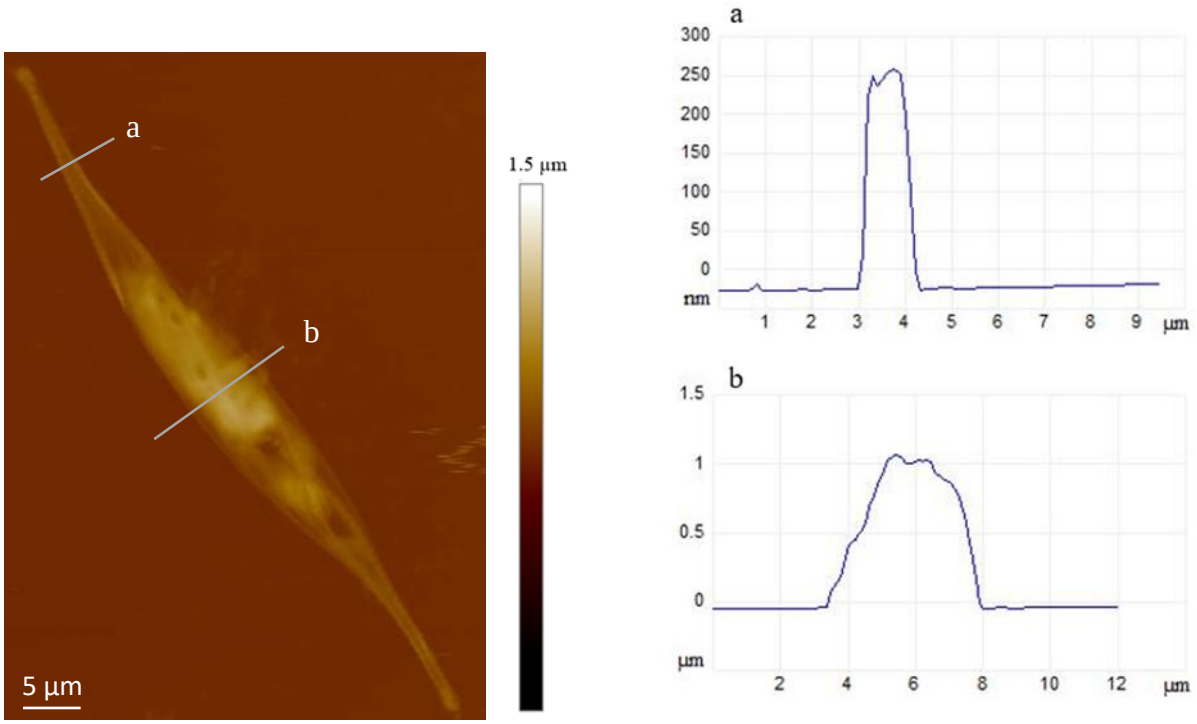
Oblik i veličina stanice *C. closterium* uzgajane u kulturi s koncentracijom kadmija 1000 µg/L ostali su nepromijenjeni. Jasno su se razlikovale fleksibilne rostre od središnjeg dijela stanice (Slika 3.13.a). Dužine stanica bile su u rasponu 38-42 µm, a širine u rasponu od 3,5-5,5 µm. Na cijeloj površini stanice bile su vidljive promjene u obliku pojedinačnih sferičnih čestica i njenih nakupina.



Slika 3.13. AFM prikaz cijele stanice *C. closterium* uzgajane u kulturi s koncentracijom kadmija 1000 µg/L i njenih morfoloških detalja: a) cijela stanica *C. closterium*; b-d) uvećana gornja rostra stanice; e) uvećani središnji dio stanice, gdje se detaljnije vide pojas i valva; f) valva na središnjem dijelu stanice sa izraženom rafom; g) pojas na središnjem dijelu; h-j) uvećana donja rostra stanice sa izraženom rafom i fibulama oko nje. AFM prikaz odstupanja otklona poluge, veličine područja: a) 45 µm x 20 µm; b) 5 µm x 4,5 µm; c) 3,5 µm x 2,5 µm; d) 2 µm x 1,5 µm; e) 3 µm x 2,5 µm; f) 2 µm x 1,5 µm; g) 1 µm x 0,5 µm; h) 5 µm x 4,5 µm; i) 3,5 µm x 2,5 µm; j) 2 µm x 1,5 µm.

Sferične čestice na središnjem dijelu stanice uglavnom su se nalazile na jače silificiranim dijelovima, pojasu (Slika 3.13.g) i oko rafe (Slika 3.13.f), dok je manji dio njih uočen i na valvi (Slika 3.13.e-f). Valva je zadržala relativno ravnu površinu, ali je pojas zbog sferičnih čestica nepravilnije strukture. Sferične čestice su uočene na pojasu i oko rafe na rostrama (Slika 3.13.b-d i h-j). Na pojasu se mjestimično ne mogu jasno raspoznati karakteristične silikatne trake (Slika 3.13.b; g-h). Dijametar sferičnih čestica bio je u rasponu od 50-390 nm, a visina u rasponu od 20-50 nm.

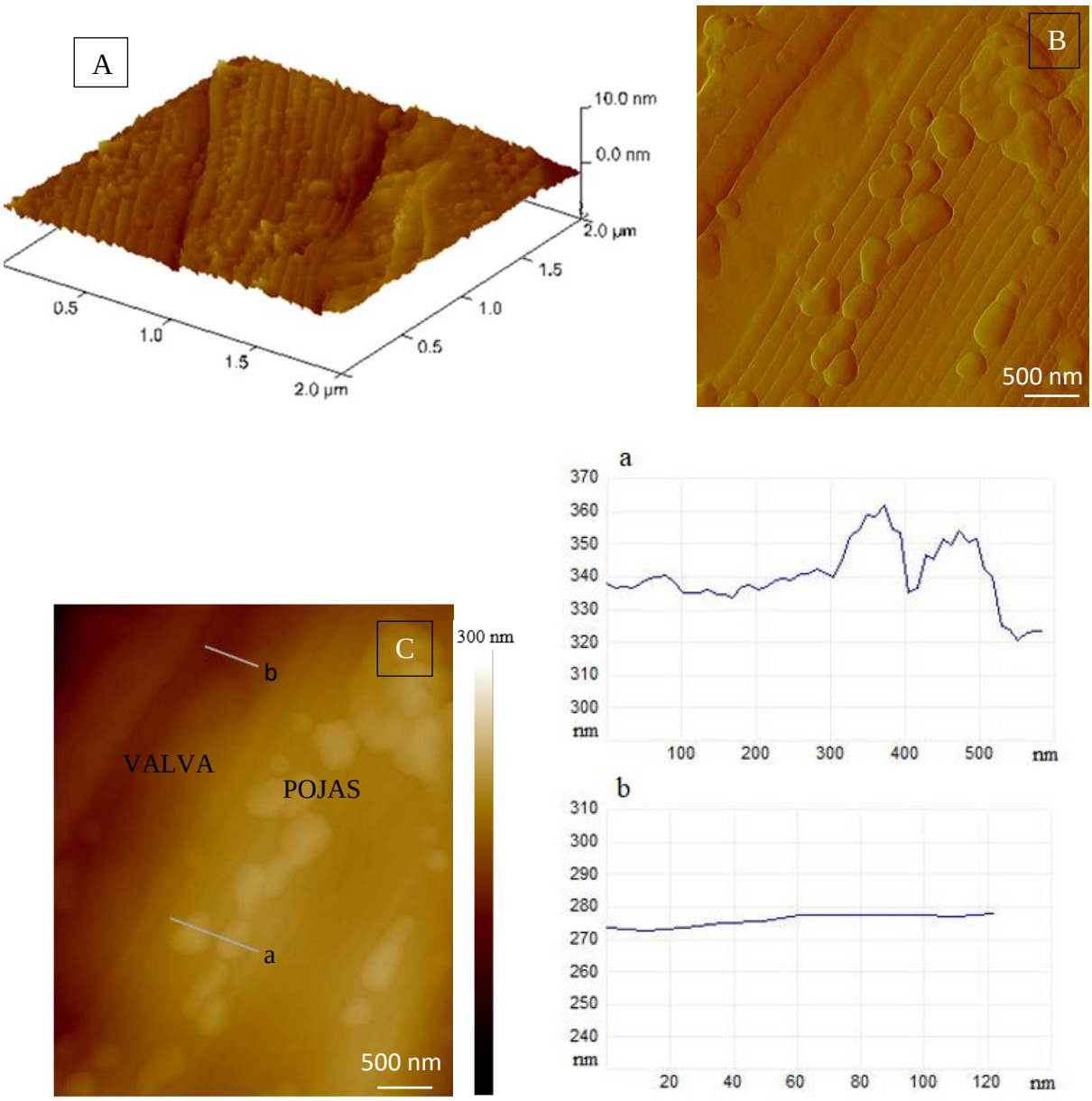
Načinjen je topografski prikaz stanice *C. closterium* uzgajane u kulturi s koncentracijom kadmija 1000 µg/L (Slika 3.14.), te su određene visine središnjeg dijela stanice i visine rostra. Visine središnjih dijelova stanica *C. closterium* uzgajanih u kulturi s koncentracijom kadmija 1000 µg/L bile su u rasponu od 700-1300 nm (Slika 3.14.b), a visine rostra u rasponu od 100-350 nm (Slika 3.14.a).



Slika 3.14. Topografski AFM prikaz stanice *C. closterium* uzgajane u kulturi s koncentracijom kadmija 1000 µg/L (veličina područja 35 µm x 25 µm, vertikalna skala 1,5 µm) s analizom vertikalnih presjeka duž naznačenih linija: a) vertikalni presjek rostre duž linije a; b) vertikalni presjek središnjeg dijela stanice duž linije b.

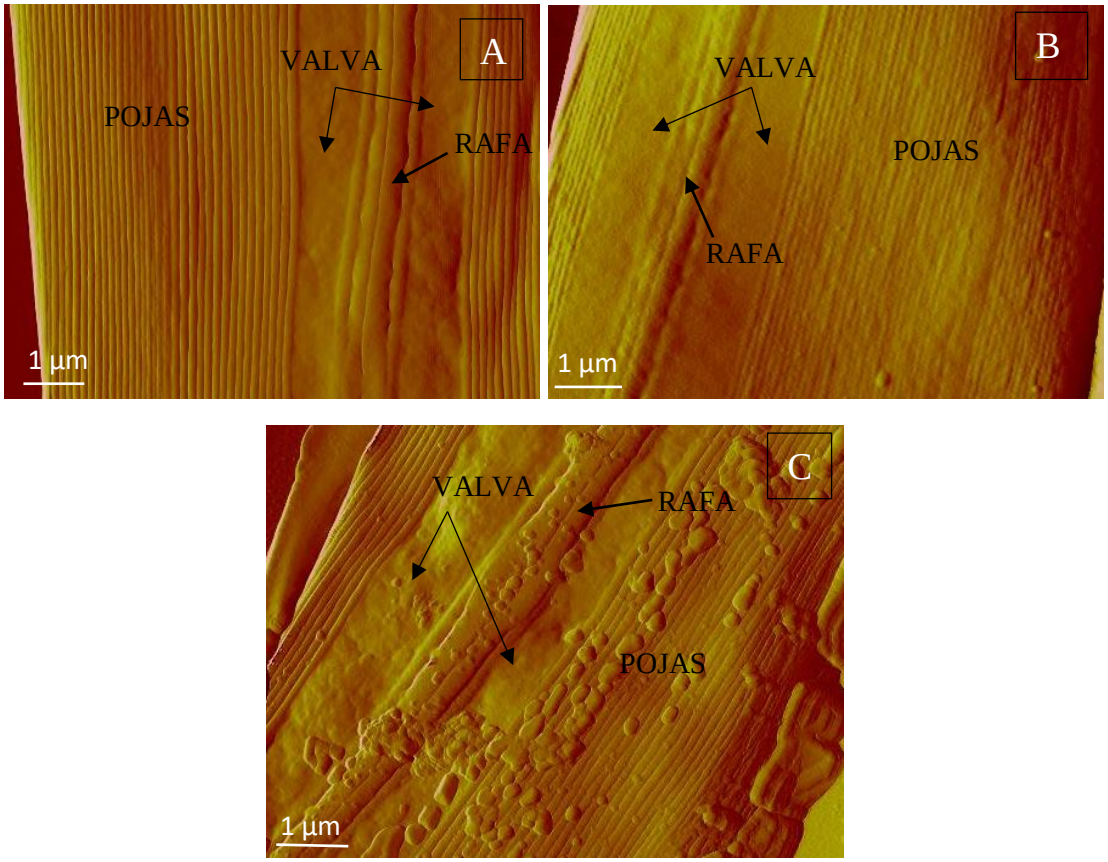
Na većoj rezoluciji oslikan je središnji dio stanice *C. closterium* uzgajane u kulturi s koncentracijom kadmija 1000 µg/L (Slika 3.15.A-B). Na topografskom prikazu središnjeg

dijela stanice načinjeni su vertikalni presjeci (Slika 3.15.C). Sferične čestice razlog su nepravilnije, odnosno hrapavije površine pojasa. U visini strukture valve bile su manje varijacije (oko 5 nm), dok su varijacije visine u strukturi pojasa znatno veće (oko 30 nm). Određena je hrapavost površine, R_a, valve i na pojasu. R_a za područje valve iznosio je 4 nm, a za područje pojasa 25 nm.



Slika 3.15. AFM prikaz središnjeg dijela stanice *C. closterium* uzgajane u kulturi s koncentracijom kadmija 1000 µg/L: A) trodimenzionalni prikaz pojasa (veličina područja 2 µm x 2 µm, vertikalna skala 10 nm); B) prikaz odstupanja otklona poluge (veličina područja 2 µm x 2 µm); C) topografski prikaz (veličina područja 2 µm x 2 µm, vertikalna skala 300 nm) s analizom vertikalnih presjeka duž naznačenih linija: a) vertikalni presjek pojasa duž linije a; b) vertikalni presjek valve duž linije b.

Središnji dijelovi stanica *C. closterium* uzgajanih u kontrolnoj kulturi bez dodatka kadmija, s koncentracijom kadmija 500 µg/L i s koncentracijom kadmija 1000 µg/L oslikani su na većoj rezoluciji kako bi se mogle usporediti površine pojasa i valva na svim stanicama i detaljnije razaznati promjene izazvane dodatkom kadmija u kulture. Sferične čestice su na stanicama uzgajanim u kulturi s koncentracijom kadmija 1000 µg/L uočene po čitavoj površini stanice, a najviše na jače silificiranim dijelovima, pojasu i oko rafe (Slika 3.16.C), na stanicama uzgajanim s koncentracijom kadmija 500 µg/L sferične čestice su se nazirale samo u strukturi pojasa (Slika 3.16.B), a na stanicama u kontroli bez dodatka kadmija sferične čestice nisu uočene (Slika 3.16.A).



Slika 3.16. AFM prikaz središnjih dijelova stanica *C. closterium* uzgajanih u: A) kontrolnoj kulturi bez dodatka kadmija; B) kulturi s koncentracijom kadmija 500 µg/L; C) kulturi s koncentracijom kadmija 1000 µg/L. AFM prikaz odstupanja otklona poluge (veličina područja 2 µm x 5 µm).

4. RASPRAVA

Teški metali, uključujući kadmij, predstavljaju važno antropogeno onečišćenje u vodenim ekosustavima stoga je važno ispitati njihov utjecaj na morski ekosustav. Budući je fitoplankton baza trofičke piramide i glavni primarni proizvođač u morskom ekosustavu, istraživanja o utjecaju teških metala na fitoplankton daju uvid o utjecaju istih na cijeli hranidbeni lanac u morskom ekosustavu. U ovom radu istraživan je utjecaj povišene koncentracije kadmija na dinamiku rasta i morfološke karakteristike površine stanice morske dijatomeje *C. closterium*, izolirane iz sjevernog Jadrana.

Dobiveni rezultati pokazuju negativan utjecaj povišene koncentracije kadmija na dinamiku rasta *C. closterium*. Naime, pri koncentraciji kadmija 1 µg/L u kulturi dolazi do smanjenja brzine rasta *C. closterium*. Specifična brzina rasta *C. closterium* te broj dioba stanica po danu su smanjeni dok je rast inhibiran sa 18,9%. Povećanjem koncentracije kadmija (100-1000 µg/L) u kulturi stanica *C. closterium* specifična brzina rasta i broj dioba stanica po danu se smanjuju, a inhibicija rasta se povećava. Iznimka je kultura s koncentracijom kadmija 10 µg/L. Naime, inhibicija rasta u kulturi *C. closterium* s koncentracijom 10 µg/L veća je od inhibicija rasta u kulturama *C. closterium* s koncentracijama kadmija 100 µg/L, 250 µg/L i 500 µg/L. Pretpostavljeno je da u kulturama *C. closterium* uzgajanih s koncentracijama kadmija većim od 10 µg/L dolazi do aktivacije obrambenog mehanizma zbog kojeg je rast stanica u kulturama s koncentracijama 100 µg/L, 250 µg/L i 500 µg/L slabije inhibiran nego u kulturama s koncentracijom kadmija 10 µg/L. Tek porastom koncentracije kadmija iznad 500 µg/L u kulturama stanica *C. closterium* inhibicija rasta se povećava. Najmanja specifična brzina rasta *C. closterium* određena je za kulturu s koncentracijom kadmija 1000 µg/L. Za istu kulturu određen je najmanji broj dioba stanica po danu, a postotak inhibicije rasta bio je najveći i iznosio je 41,6%. Unatoč negativnom utjecaju kadmija na dinamiku rasta *C. closterium,* one su i dalje zadržale pozitivan rast u eksponencijalnoj fazi. Dobiveni rezultati su u skladu s prijašnjim istraživanja, gdje je pri povišenoj koncentraciji kadmija (1 µg/L) inhibiran rast dijatomeje *C. closterium* (Satoh i sur. 2005; Lehman i Vas Cancelos 1979), te smanjenja fotosinteza i stanično disanje (Lehman i Vas Cancelos 1979). Uzroci sporijeg rasta alga izloženih kadmiju mogu biti različiti, odnosno učinci teškog metala mogu biti različiti, mogu inhibirati fotosintezu (Overnell 1976) ili unos nutrijenata (Harrison i sur. 1977), promijeniti permeabilnost membrane koje može dovesti do gubitka staničnih sastojaka (Overnell 1975) ili poremetiti enzimsku aktivnost (Fisher i Jones 1981). U prijašnjim su istraživanjima dijatomeje

pokazale veću toleranciju na toksične teške metale u odnosu na dinoflagelate izolirane iz Jadrana (Sunda i Guillard 1976; Anderson i Morel 1978; Pistocchi i sur. 2000). Također je *Cylindrotheca fusiformis*, srodna vrsta dijatomeji *Cylindrotheca closterium*, uz prisutnost kadmija koncentracije 500 µg/L pokazala pozitivan rast, odnosno rast nije u potpunosti bio inhibiran (Pistocchi i sur. 2000).

Površina stanica *C. closterium* karakterizirana je na nanoskali primjenom mikroskopije atomskih sila. Utjecaj kadmija na nanostrukturna morfološka svojstva dijatomeje *C. closterium* istraživan je na stanicama uzgajanim u kulturama s koncentracijama kadmija 500 µg/L i 1000 µg/L. Dodatak kadmija u kulturu stanica *C. closterium* ne utječe na oblik i veličinu stanica. Visine stanica uzgajanih u kontrolnoj kulturi, te u kulturama s koncentracijama kadmija 500 µg/L i 1000 µg/L nisu se međusobno znatno razlikovale. Visine rostra stanica uzgajanih u kontrolnoj kulturi i kulturama s koncentracijama kadmija 500 µg/L i 1000 µg/L slične su visinama dobivenim u istraživanju od Pletikapić i sur. (2012), gdje su visine rostra bile u rasponu od 100-250 nm. Visine središnjeg dijela stanice su u istom istraživanju bile u rasponu od 500-700 nm, odnosno niže od visina središnjih dijelova stanica izmjerenih na stanicama uzgajanim u kontrolnoj kulturi bez kadmija i u kulturama s koncentracijama kadmija 500 µg/L i 1000 µg/L. Razlog uočene razlike u visini je što presjeci nisu rađeni na istim dijelovima stanica. Naime, stanice su najviše na dijelovima gdje se nalaze kloroplasti. Upravo na tim dijelovima su rađeni presjeci središnjeg dijela stanica u ovom radu, dok je u istraživanju Pletikapić i sur. (2012) presjek rađen između kloroplasta gdje je stanica niža. Na površini stanica *C. closterium* uzgajanih u kulturi s koncentracijom kadmija 1000 µg/L nalazile su se sferične čestice dijametra 50-390 nm i visine 20-50 nm . Uvećanjem središnjeg dijela stanica *C. closterium* uočeno je da je većina sferičnih čestica locirana na jače silificiranim dijelovima stanice, na pojasu i fibulama oko rafe. Na valvi su se također mogle uočiti sferične čestice, ali u manjoj mjeri. Stoga je površina valve većinom relativno ravna kao što je na stanicama uzgajanim u kontrolnoj kulturi. Na rostrama stanica uzgajanih u kulturi s koncentracijom kadmija 1000 µg/L sferične čestice se, također, nalaze na jače silificiranim dijelovima, na pojasu i fibulama oko rafe. Na središnjem dijelu stanica *C. closterium* uzgajanih u kulturi s koncentracijom kadmija 500 µg/L sferične čestice su se samo nazirale na jače silificiranim dijelovima, na pojasu i fibulama oko rafe, dok je površina valve bez promjena. Rostre stanica uzgajanih u kulturi s koncentracijom kadmija 500 µg/L relativno su čiste, sferičnih čestica nema ni na jače silificiranim dijelovima. Uspoređene su hrapavosti pojasa i valva na stanicama uzgajanih u kontrolnoj kulturi i u kulturi s koncentracijom kadmija 1000 µg/L. Uočeno je da su

hrapavosti valva slične, ali hrapavost pojasa stanica uzgajanih u kulturi s koncentracijom kadmija 1000 µg/L veća je za otprilike 10 nm od hrapavosti pojasa stanica uzgajanih u kontrolnoj kulturi. Veća hrapavost pojasa na stanicama uzgajanim u kulturi s koncentracijom kadmija 1000 µg/L uzrokovana je sferičnim česticama lociranih na njima. Pretpostavlja se kako su sferične čestice zapravo [$(SiO_2)n(H_2O)$] nanočestice. Naime, prema podacima iz prijašnjih istraživanja (Sumper i Kröger 2004; Hildebrand i sur. 2009) silikatne strukture dijatomeja sastavljene su od sferičnih [$(SiO_2)n(H_2O)$] nanočestica dijametra 2-200 nm. U istraživanju Pletikapić i sur. (2012) pokazano je da su nanočestice u dijatomeji *C. closterium* uklopljene u organski materijal valve što je dokazano uklanjanjem organskog materijala sumpornom kiselinom nakon čega nanočestice nisu bile fuzionirane i nisu formirale fiksnu nanostrukturu (Pletikapić i sur. 2012). Morfološke promjene uočene u ovom radu na površini stanica *C. closterium* vjerojatno su posljedica utjecaja kadmija na mehanizam depozicije silicijevog dioksida što za rezultat ima pojavnost nepravilnih struktura na pojedinim, jače silificiranim, dijelovima ljušturice. Oštećenja na površini stanica dijatomeja kao posljedica izlaganja visokim koncentracijama kadmija uočena su i elektronskim mikroskopom kod manjih penatnih dijatomeja (*Amphora pediculus*, *Encyonema minutum*, *Mayamaea agrestris*, *Gomphonema parvulum*, *Eolimna minima*) (Morin i sur. 2008). Deformacije su pronađene na valvama stanica te uzduž rafe. Ovakvi rezultati posljedice su prisutnosti velike koncentracije kadmija koja remeti normalan rad mehanizama za diobu stanicu, te za formiranje silikatne ljušturice, ali moguće je i da predstavljaju obrambeni mehanizam na toksičnost metala (Torres i sur. 2000). Naime, valva ljušturice formira se procesom koji je pod velikom genetičkom kontrolom. Također je i formiranje silificiranih dijelova ljušturice pod kontrolom okolišnih efekata, kao što su dostupnost silicija u morskoj vodi ili prisutnost toksičnih elementa (Morin i sur. 2008).

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju potencijal AFM-a kao metode primjenjive za praćenje nanostrukturnih promjena na površini stanica dijatomeja nastalih pod utjecajem teških metala ili drugih antropogenih onečišćenja.

5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu pokazano je da povišena koncentracija kadmija usporava rast dijatomeje *C. closterium* i uzrokuje morfološke promjene na ljušturici dijatomeje *C. closterium*. Inhibicija rasta *C. closterium*, odnosno smanjenje specifične brzine rasta *C. closterium* i broja dioba stanica po danu zapažene su već u kulturi s koncentracijom kadmija 1 μg/L, a najveća inhibicija rasta *C. closterium*, te najniža specifična brzina rasta *C. closterium* i najmanji broj dioba stanica po danu bile su u kulturi s koncentracijom kadmija 1000 μg/L. Mikroskopija atomskih sila kao metoda po prvi puta je primijenjena za proučavanje utjecaja povišene koncentracije teških metala, uključujući kadmij, na morfološka svojstva dijatomeja. Morfološke promjene u obliku pojedinačnih sferičnih čestica i njihovih nakupina uočene su oko rafe te su se nazirale na pojasu na stanicama *C. closterium* uzgajanim u kulturi s koncentracijom kadmija 500 μg/L. Na stanicama *C. closterium* uzgajanim u kulturi s koncentracijom kadmija 1000 μg/L pojedinačne sferične čestice i njihove nakupine bile su jako izražene na jače silificiranim dijelovima ljušturice, pojasu i oko rafe uz fibule, dok se manji dio njih nalazio i na valvi. Posljedica ovakvih morfoloških promjena je veća hrapavost površine pojasa stanica uzgajanih u kulturi s koncentracijom 1000 μg/L u odnosu na hrapavost pojasa stanica uzgajanih u kontrolnoj kulturi bez kadmija, dok je hrapavost površine valve nepromijenjena. Pretpostavljeno je da su navedene morfološke promjene posljedica utjecaja kadmija na mehanizam depozicije silicijevog dioksida što za rezultat ima pojavnost nepravilnih struktura na pojedinim, jače silificiranim, dijelovima ljušturice.

Dobiveni rezultati predstavljaju novi doprinos razumijevanju utjecaja teškog metala kadmija na dijatomeju *Cylindrothecae closterium*. Provedena istraživanja također pružaju osnovu za daljnju primjenu AFM-a kao metode za proučavanje utjecaja teških metala i drugih antropogenih onečišćenja na morfološka svojstva dijatomeja na nanoskali. Iako se dobiveni rezultati odnose na morsku dijatomeju *Cylindrotheca closterium*, oni također tvore temelj za daljnja istraživanja utjecaja teških metala na nanostrukturna svojstva stanica drugih vrsta fitoplanktona.

6. LITERATURA

Alcoverro T., Conte E. i Mazzella L. (2000): Production of mucilage by the Adriatic epipelic diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophycea) under nutrient limitation, Journal of Phycology **36**: 1087-1095.

Almqvist N., Delamo Y., Smith B.L., Thomson N.H., Bartholdson Å., Lal R., Brzezinski M. i Hansma P.K. (2001): Micromechanical and structural properties of a pennate diatom investigated by atomic force microscopy. Journal of Microscopy **202**: 518-532.

Anderson D.M. i Morel F.M.M. (1978): Copper sensitivities of *Gonyaulax tamarensis*. Limnology and Oceanography **23**: 282-295.

Armbrust E.V. (2009): The life of diatoms in the world's oceans. Nature **459**: 185-192.

Bhushan B. i Marti O. (2004.): Scanning Probe Microscopy – Principle of Operation, Instrumentation, and Probes. U: Bhushan B. (ur.) Springer handbook of nanotechnology. New York, Springer, str. 325-364.

Binnig G., Quate C. F. i Gerber C. (1986): Atomic force microscope, Physical Review Letters **56**: 930-933.

Bruker Probes and Accessories Catalogue 2012. 196 p.

Charette M.A. i Smith W.H.F. (2010): The volume of Earth's Ocean. Oceanography **23**: 112-114.

Chepurnov V.A., Mann D.G., Von Dassow P., Vanormelingen P., Gillard J., Inze D., Sabbe K. i Vyverman W. (2008): In search of new tractable diatoms for experimental biology. Bioessays **30**: 692-702.

Cindrić A., Garnier C., Oursel B., Pižeta I. i Omanović D. (2015): Evidencing the natural and anthropogenic processes controlling trace metals dynamic in a highly stratified estuary: The Krka River estuary (Adriatic, Croatia). Marine Pollution Bulletin **94**: 199–216.

Crawford S.A., Higgins M.J., Mulvaney P. i Wetherbee R. (2001): Nanostructure of the diatom frustule as revealed by atomic force and scanning electron microscopy. Journal of Phycology **37**: 543-554.

Das, P., Samantaray S. i Rout G.R. (1998): Studies on Cadmium toxicity in plants: A review. Environmental Pollution, **98**, 29-36.

Davies A.G. (1978): Pollution studies with marine plankton. Part II. Heavy metals. Advances in Marine Biology **15**: 381–508.

De Filippis L. i Pallaghy C. (1994): Heavy metals: sources and biological effects. U: Rai L.C., Gaur J.P., Soeder C.J. (ur.) Algae and water pollution. Stuttgart, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, str 31–77.

Degobbis D., Precali R., Ivancic I., Smodlaka N., Fuks D. i Kveder S. (2000): Long-term changes in the northern Atlantic ecosystem related to anthropogenic eutrophication. International Journal of Environment and Pollution **13**: 495–533.

Dickman M.D. (1998): Benthic marine diatom deformities associated with contaminated sediments in Hong Kong. Environment International **24**:749–759.

Fisher N.S. i Jones G. (1981): Heavy metals and marine phytoplankton: correlation of toxicity and sulphydryl-binding. Journal of Phycology **17**: 108-111.

Friberg L., Nordberg G. i Vouk V. (1986): Handbook of the toxicology of metals, vol II. Amsterdam, Elsevier, str 130–184.

Gebeshuber I.C., Kindt J.H., Thompson J.B., Del Amo Y., Stachelberger H., Brzezinski M.A., Stucky G.D., Morse D.E. i Hansma P.K. (2003): Atomic force microscopy study of living diatoms in ambient conditions. Journal of Microscopy **212**: 292–299.

Gledhill M., Nimmo M., Hill S.J. i Brown M.T. (1997): The toxicity of copper(II) species to marine algae, with particular reference to macroalgae. Journal of Phycology **33**: 2–11.

Gruber N., Gloor M., Fletcher S.E.M., Doney S.C., Dutkiewicz S., Follows M.J. i dr. (2009): Oceanic sources, sinks and transport of atmospheric CO2. Global Biogeochemical Cycles **23**, GB1005.

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.

Harrison W.G., Eppley R.W. i Renger E.H. (1977): Phytoplankton nitrogen metabolism, nitrogen budgets, and observations on copper toxicity – a controlled ecosystem pollution experiment. Bulletin of Marine Science **27**: 44-57.

Hasan S. A., Fariduddin Q., Ali B., Hayat S. i Ahmad A. (2009): Cadmium: Toxicity and Tolerance in plants. Journal of Environmental Biology, **30**: 165-174.

Häder D.P. i Gao K. (2015): Interactions of anthropogenic stress factors on marine phytoplankton. Environmental Science **3**, Article 14.

Häder D.P., Helbling E.W., Williamson C.E. i Worrest R.C. (2011): Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. Photochemical & Photobiological Science **10**: 242-260.

Higgins M.J., Sader J.E., Mulvaney P. i Wetherbee R. (2003): Probing the surface of living diatoms with atomic force microscopy: the nanostructure and nanomechanical properties of the mucilage layer. Journal of Phycology **39**: 722–734.

Hildebrand M., York E., Kelz J.I., Davis A.K., Frigeri L.G., Allison D.P. i Doktycz M.J. (2006): Nanoscale control of silica morphology and three-dimensional structure during diatom cell wall formation. Journal of Materials Research **21**: 2689–2698.

Hildebrand M., Holton G., Joy D.C., Doktycz M.J. i Allison D.P. (2009): Diverse and conserved nano- and mesoscale structures of diatom silica revealed by atomic force microscopy. Journal od Microscopy **235**: 172-187.

Hulburt, E.M. (1968): Phytoplankton observations in the Western Caribbean Sea. Bulletin of Marine Science **18**: 388-99.

Hulburt, E.M. i Rodman, J. (1963): Distribution of phytoplankton species with respect to salinity between the coast of southern New England and Bermuda. Limnology and Oceanography **8**: 263-269.

Huysman M.J., Vyverman W. i De Veylder L. (2014): Molecular regulation of the diatom cell cycle. Journal of Experimental Botany **65**: 2573-2584.

ISO 8692 (1989): Water quality; fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*. Geneva, Switzerland. International Organization for Standardization.

John, J. (2012): A beginner's guide for diatoms. Ruggel, Liechtenstein, A.R.G. Gantner Verlag.

Kapkov V.I. i Belenikina O.A. (2007): A Study of the Resistance of Mass Marine Algae to Heavy Metals. Moscow University Biological Sciences Bulletin **62** (1): 30-33.

Kovač N., Mozetič P., Trichet J. i Defarge C. (2005): Phytoplankton composition and organic matter organization of mucous aggregates by means of light and cryo-scanning electron microscopy, Marine Biology **147**: 261-271.

Kröger N., Lehmann G., Rachel R. i Sumper M. (1997): Characterization of a 200-kDa diatom protein that is specifically associated with a silica-based substructure of the cell wall. European Journal of Biochemistry **250**: 99–105.

Lane T.W. i Morel F.M.M. (2000): A biological function for cadmium in marine diatoms. Proceedings of the National Academy of Sciences **97**: 4627-4631.

Lalli C.M. i Parsons T.R. (1993): Biological Oceanography—An Introduction. Oxford, Butterworth-Heinemann.

Lehman J.L. i Vas Concelos A.C. (1979): Physiology of zinc and cadmium stress in the marine diatom *Cylindrotheca closterium*. Journal of Phycology **15** (Suppl.): 19.

Linder A., Colchero J., Apell H.J., Marti O. i Mlynek J. (1992): Scanning force microscopy of diatom shells. Ultramicroscopy **42**: 329-332.

Luís A.T., Hlúbiková D. Vaché V., Choquet P., Hoffmann L. i Ector L. (2017): Atomic force microscopy (AFM) application to diatom study: review and perspectives. Journal of Applied Phycology **29**: 2989-3001.

Madasamy A. i Babu S. (2016): Effect of Cadmium on the marine diatoms *Seminavis robusta* and *Phaeodactylum tricornutum*: A comparative study. Enviromental Toxicology and Chemistry. Norwegian University of Science and Technology.

McFarland B.H., Hill B.H. i Willingham W.T. (1997): Abnormal *Fragilaria spp*. (Bacillariophyceae) in streams impacted by mine drainage. Journal of Freshwater Ecology **12**:141–149.

Medlin, L.K. i Kaczmarska, I. (2004): Evolution of the diatoms: V. Morphological and cytological support for the major clades and a taxonomic revision. Phycologia **43**: 245–270.

Mišić Radić T. (2010): Supramolekularna organizacija biopolimera morskog gela proučavana mikroskopijom atomskih sila. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu.

Mišić Radić T., Svetličić V., Žutić V. i Boulgaropoulos B. (2011): Seawater at the nanoscale: marine gel imaged by atomic force microscopy. Journal of Molecular Recognition **24**: 397-405.

Moreno-Garrido I., Hampel M., Lubián M. i Blasco J.(2003): Sediment toxicity tests using benthic marine microalgae *Cylindrotheca closterium* (Ehremberg) Lewin and Reimann (Bacillariophyceae). Ecotoxicology and Environmental Safety 54: 290-295.

Morin S. (2003) Ame´lioration des techniques de bioindicationdiatomique et d'analyse des donne´es, applique´es a` la re´ve´lation des effets des pollutions a` toxiques. ENITA de Bordeaux: str 70 + prilozi.

Morin S., Coste M. i Hamilton P.B. (2008): Scanning electron microscopy observations of deformities in small pennate diatoms exposed to high cadmium concentrations. Journal of Phycology **44**: 1512-1518.

Mozetič P., Fonda Umani S., Cataletto B. i Malej, A. (1998): Seasonal and inter-annualplankton variability in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic). ICES Journal of Marine Science **55**: 711-722.

Najdek M., Blažina M., Đakovac T. i Kraus R. (2005): The role of the diatom *Cylindrotheca closterium* in a mucilage event in the northern Adriatic Sea: coupling with high salinity water intrusions, Journal of Plankton Research **27**: 851-862.

Nölting B. (2006): Atomic Force Microscope (AFM) U: Methods in Modern Biophysics, Berlin, Springer, str. 121-133.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development (1998): OECD guideline for testing of chemicals: algae growth inhibition test. Paris. OECD Publications.

Overnell J. (1975): The effect of heavy metals on photosynthesis and loss of cell potassium in two species of marine algae, *Dunaliella tertiolecta* and *Phaedactylum tricornatum*. Marine Biology **29**: 99-103.

Overnell J. (1976): Inhibtion of marine algal photosynthesis by heavy metals. Marine Biology **38**: 335-342.

Payne C.D. i Price N.M. (1999): Effects of cadmium toxicity on growth and elemental composition of marine phytoplankton. Journal of Phycology **35**: 293–302.

Pistocchi R., Mormile A.M., Guerrini F., Isani G. i Boni L. (2000): Increased production of extra- and intracellular metal-ligands in phytoplankton exposed to cooper and cadmium. Journal of Applied Phycology **12**: 469-477.

Pletikapić G. (2013): Nanomehanička svojstva površina stanica dijatomeja i izvanstaničnih polimera. Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu.

Pletikapić G., Mišić Radić T., Hozić Zimmermann A., Svetličić V., Pfannkuchen M., Marić D., Gordijan J. i Žutić V. (2011): AFM imaging of extracellular polymer release by marine diatom *Cylindrothecae closterium* (Ehrenberg) Reiman & J.C. Lewin. Journal of Molecular Recognition **24**: 436-445.

Pletikapić G., Berquand A., Mišić Radić T. i Svetličić V. (2012): Quantitative nanomechanical mappig of marine diatom in seawater using peak force tapping atomic force microscopy. Journal of Phycology **48**: 174-185.

Round F. E., Crawford R. M. i Mann D. G. (1990): The Diatoms: Biology and Morphology of the Genera. Cambridge, Cambridge University Press.

Ruggiu D., Luglie A., Cattaneo A. i Panzani P. (1998): Paleoecological evidence for diatom response to metal pollution in Lake Orta (N. Italy). Journal of Paleolimnology **20**: 333–345.

Santos J., Almeida S.F.P. i Figueira E. (2012): Cadmium chelation by frustulins: a novel metal tolerance mechanism in *Nitzschia palea* (Kützing) W. Smith. Ecotoxicology **22** (1): 166-173.

Satoh A., Vudikaria L.Q., Kurano N. i Miyachi S. (2005): Evaluation of the sensitivity of marine microalgal strains to the heavy metals, Cu, As, Sb, Pb and Cd. Environment International **31**: 713-722.

Sumper M. i Kröger N. (2004): Silica formation in diatoms: the function of long-chain polyamines and silaffins. Journal of Materials Chemistry **14**: 2059-2065.

Sunda W.G. i Guillard R.R. (1976): The relationship between cupric ion activity and toxicity of copper to phytoplankton. Journal of Marine Research **34**: 511.529.

Suranto S., Puspitasari R., Purbonegoro T. i Mansur D. (2015): Copper and cadmium toxicity to marine phytoplankton *Chaetoceros gracilis* and *Isochrysis* sp. Journal of Chemistry **15**: 172-178.

Tchounwou P.B., Yedjou C.G., Patlolla A.K. i Sutton D.J. (2012): Heavy metal toxicity andthe environment. Experientia Supplementum **101**: 133-164.

Tokar E., Boyd, W., Freedman J. i Waalkes M. (2013): Casarett and Doull's toxicology: the basiccience of poisons. New York, McGraw-Hill.

Torres M.A., Barros M.P., Campos S.C.G., Pinto E., Rajamani S. i sur. (2008): Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. Ecotoxicol Environ Saf **71**: 1-15.

Torres S.E., Cid A., Herrero C. i Abalde J. (2000): Effect of cadmium on growth, ATP content, carbon fixation and ultrastructure in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. Water, Air and Soil Pollution, **117**: 1-14.

USEPA (2002): Short-term methods for estimating the chronic toxicoty of effluents and receiving waters to freshwater organisms. U.S. Environmental Protection Agency.

Vecco Probes – Catalouge 2006.

Viličić D. (2002): Fitoplankton Jadranskog mora. Zagreb, Školska knjiga.

Viličić D. (2003): Fitoplankton u ekološkom sustavu mora. Zagreb, Školska knjiga.

Volcani B.E. (1981): Cell wall formation in diatoms: morphogenesis and biochemistry. U: Simpson T.L. i Volcani B.E. (ur.) Silicon and Siliceous Structures in Biological Systems. New York, Springer, str. 157–200.

Weast, R.C. (1984): CRC Handbook of Chemistry and Physics. 64th Edn., Baca Raton, CRC Press.

Weier T.E., Stocking C.R., Barbour M. i Rost T.L. (1982): Algae: Reproduction u: Weier T.E. (ur.), Stocking C.R., Barbour M. i Rost T.L. Botany : An Introduction to Plant Biology - 6th edition. California, John Wiley & Sons, str. 467-489.

7. DODATAK

Prilog 1. Popis oznaka, kratica i simbola

AFM	mikroskopija atomskih sila (engl. *atomic force microscopy*)
EPS	ekstracelularni polimerni materijal (engl. *extracellular polymeric substance*)
f/2	medij korišten za uzgoj stanica *Cylindrothecae closterium*
MM-SPM	*Multimode Scanning Probe Microscope*
rpm	(engl. *round per minute*)
SEM	pretražni elektronski mikroskop (engl. *scanning electron microscope*)
SPM	mikroskopija s pretražnom probom (engl. s*canning probe microscopy*)
TEM	transmisijski elektronski mikroskop (engl. *transmission electron microscopy*)
UV	ultraljubičasto zračenje

c	množinska koncentracija
c_i	abundancija stanica prvog proučavanog dana
c_j	abundancija stanica zadnjeg proučavanog dana
d	udaljenost između šiljka i površine uzorka
F	sila
K	konstanta poluge
k	broj dioba stanica po danu

μ	specifična brzina rasta
$\% I$	postotak inhibicije
R_a	hrapavost površine

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Andrea Čačković

Mjesto i godina rođenja: Zagreb, 1994.
Kontakt: andreacackovic@gmail.com

Obrazovanje:

2013-2018 Integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2009-2013 Gimnazija Lucijana Vranjanina, Zagreb

2001-2009 Osnovna škola Sveta Nedjelja

Radno iskustvo:

ožujak, 2018. Osnovna škola Kajzerica (nestručna zamjena)

Iskustva u popularizaciji znanosti:

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

travanj, 2018. Otvoreni dani PMF- a, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet

travanj, 2017. Otvoreni dani PMF- a, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet

2017. Organizacija i sudjelovanje na Istraživačko-edukacijskom projektu Dugi otok

2016. Organizacija i sudjelovanje na Istraživačko-edukacijskom projektu Mura-Drava

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

2016. Osmišljavanje i provođenje radionice „Na mladima svijet ostaje: ZELENA BUDUĆNOST“, financirane od strane Sveučilišta u Zagrebu; u osnovnim školama Zagreba i Svete Nedelje

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

Strani jezici:

Engleski Cambridge ESOL Level 1 Certification in ESOL International, First Certificate in English, Concuil of Europe Level B2