

Promjene sastava lipida diatomeje *Chaetoceros pseudocurvisetus* ovisno o dostupnosti nutrijenta fosfata

Bertanjoli, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:001567>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-03**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Matea Bertanjoli

**Promjene sastava lipida diatomeje *Chaetoceros
pseudocurvisetus* ovisno o dostupnosti nutrijenta
fosfata**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za biogeokemiju mora i atmosfere (Zavod za istraživanje mora i okoliša) na Institutu Ruđer Bošković, pod mentorstvom dr. sc. Blaženke Gašparović. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof. dr. sc. Nives Galić.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) pod nazivom „*Utjecaj okolišnog stresa na pojavnost i međudjelovanje biološki važnih organskih molekula i mikronutrijenata u morskom ekosustavu (AMBIOMERES)*” (IP-11-2013-8607).

Prije svega zahvaljujem mentorici dr. sc. Blaženki Gašparović na predloženoj temi, pomoći i podršci, strpljenju, stručnom vodstvu te razumijevanju i usmjeravanju prilikom izrade diplomskog rada.

Veliko hvala prof. dr. sc. Nives Galić na strpljenju i savjetima kojima je pridonijela poboljšanju kvalitete ovog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Jeleni Godrijan na velikoj pomoći oko same pripreme eksperimenta, kao i na tome što me naučila raditi na mikroskopu i brojati stanice.

Hvala dr. sc. Sanji Frki-Milosavljević i dr. sc. Milanu Čavkoviću na pomoći kod ekstrakcije lipida.

Zahvala Zdeslavu Zovku koji je pripomogao kada god je bilo potrebno te svima koji su na bilo koji način sudjelovali u izradi ovog rada.

Na kraju, veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na bezgraničnoj podršci koju su mi pružali svih ovih godina.

Matea Bertanjoli

Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Fitoplankton	2
2.2. Lipidi fitoplanktona i klasifikacija lipida	2
2.2.1. Napolarni lipidi.....	3
2.2.2. Polarni lipidi	8
2.3. Promjena dostupnosti nutrijenata.....	12
2.3.1. Limitacija fosforom.....	13
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. Priprema uzgoja monoklonalnih kultura stanica	15
3.2. Priprema medija za uzgoj stanica	15
3.3. Mikroskopiranje uzoraka.....	18
3.4. Filtriranje uzoraka za analizu lipida.....	18
3.5. Ekstrakcija lipida.....	18
3.6. Instrument za analizu lipida: IATROSCAN MK-6.....	19
3.7. Analiza lipida na IATROSCANU.....	21
3.7.1. Priprema kromaroda.....	21
3.7.2. Spotiranje uzoraka.....	23
3.7.3. Separacija uzoraka	24
3.7.4. Mjerenje i analiza podataka.....	25
§ 4. REZULTATI.....	27
4.1. Krivulje rasta <i>Chaetoceros pseudocurvisetus</i> u uzgojima 1, 2 i 3 dobivene brojanjem stanica svjetlosnim mikroskopom.....	27
4.2. Ukupni lipidi	30
4.3. Stanični lipidi.....	32
4.4. Lipidi kao produkti razgradnje	33
4.5. Lipidi energetske rezerve.....	34
4.6. Promjena sastava lipida izražena u postocima	36
§ 5. RASPRAVA	38
§ 6. ZAKLJUČAK	40

§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	41
§ 8. LITERATURNI IZVORI.....	42
§ 9. ŽIVOTOPIS	XLV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

PROMJENE SASTAVA LIPIDA DIATOMEJE *Chaetoceros pseudocurvisetus* OVISNO O DOSTUPNOSTI NUTRIJENTA FOSFATA

Matea Bertanjoli

Sistematsko razumijevanje prilagodbe fitoplanktona, glavnog proizvođača lipida mora, na stres u smislu sinteze lipida još je u začetku. Istražene su promjene sastava lipida diatomeje *Chaetoceros pseudocurvisetus* u ovisnosti o dostupnosti fosfata. *C. pseudocurvisetus* pripremljen je na dva načina, jedan prekondicioniran u mediju bogatom fosfatom, a drugi u uvjetima manjka fosfata. *C. pseudocurvisetus* prekondicioniran u bogatom mediju presađen je u bogati medij i u medij osiromašen fosfatom. *C. pseudocurvisetus* prekondicioniran u fosfat osiromašenom mediju presađen je u medij osiromašen fosfatom. Ovim radom dobiven je uvid u promjenu sastava lipida u ovisnosti o dostupnosti fosfata, neophodnim za izgradnju fosfolipida stanične membrane, te je potvrđena mogućnost da *C. pseudocurvisetus* u uvjetima viška fosfata akumulira stanične rezerve fosfata koje koristi kada izvori fosfata izostanu. Lipidi su analizirani tankoslojnim kromatografom IATROSCAN MK-6 (TLC/FID-FPD).

(44 stranice, 32 slike, 5 tablica, 52 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: alge, fitoplankton, fosfat, IATROSCAN, kromatografija, lipidi, nutrijenti

Mentor: dr. sc. Blaženka Gašparović, zn. savj.

Nastavnik: prof. dr. sc. Nives Galić

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
 2. doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski
 3. prof. dr. sc. Željka Soldin
- Zamjena: prof. dr. sc. Ines Primožič

Datum diplomskog ispita: 28. veljače 2019.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

LIPID-COMPOSITION CHANGES OF THE DIATOM *Chaetoceros pseudocurvisetus* DEPENDING ON THE PHOSPHATE AVAILABILITY

Matea Bertanjoli

The systematic understanding of phytoplankton, a major marine lipid producers, in regard to its adaptation to stress in terms of lipid synthesis is still in the early stages. Lipid-composition changes of the diatom *Chaetoceros pseudocurvisetus*, depending on the phosphate availability, were explored. *C. pseudocurvisetus* was prepared in two ways: one which was preconditioned in a phosphate-rich medium and the other in phosphate deficient conditions. *C. pseudocurvisetus* cells that were preconditioned in a phosphorus (P)-rich medium were inoculated into both the enriched and the P-depleted medium. *C. pseudocurvisetus* cells that were preconditioned in a P-depleted medium were inoculated into a P-deficient medium. This thesis provides insight into lipid-composition changes depending on the availability of P, which is necessary for the phospholipid synthesis, the fundamental building blocks of all cell membranes. It is also shown that *C. pseudocurvisetus* in conditions of phosphate excess can accumulate cellular P reserves, which can be used in a conditions of an absence of phosphate sources. A IATROSCAN MK-6 (TLC/FID-FPD) thin-layer chromatograph was used for lipid analyses.

(44 pages, 32 figures, 5 tables, 52 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: algae, chromatography, IATROSCAN, lipids, nutrients, phosphate, phytoplankton

Mentor: Dr. Blaženka Gašparović, Research Associate
Supervisor: Dr. Nives Galić, Professor

Reviewers:

1. Dr. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor
 2. Dr. Aleksandra Maršavelski, Assistant Professor
 3. Dr. Željka Soldin, Associate Professor
- Substitute: Dr. Ines Primožič, Associate Professor

Date of exam: 28th February, 2019

§ 1. UVOD

Lipidi su biološki važne molekule bogate ugljikom koje sudjeluju u izgradnji i funkcioniranju stanica, a unutar molekule mogu sadržavati i ostale bitne elemente uključujući fosfor, sumpor i dušik. Lipidi su dobri pokazatelji promjena organske tvari u okolišu, njezinih izvora, produkcije, karakterizacije, kruženja i raznolikosti, te se zbog svoje raznolikosti koriste kao biomarkeri podrijetla organske tvari¹, prilagodbe na stres u okolišu², infekcije fitoplanktona³ i ostalo. Biomolekule lipida proizvode organizmi u moru, a najveća proizvodnja lipida odvija se u osunčanim oceanima gdje je najveći proizvođač fitoplankton.⁴

Fitoplankton su velika skupina jednostaničnih organizama koje nalazimo u različitim vodenim okolišima te su zaslužni za najveći udio primarne produkcije na svijetu.⁵ Fitoplanktonske alge sve se više koriste kao modelni organizmi, a uz to sve više istraživanja dovelo je do otkrića mnogih novih vrsta i njihovih zanimljivih komponenti. Fitoplankton uvelike ovisi o okolišnim uvjetima, trajanju noći i dana, dostupnosti nutrijenata, temperaturi, salinitetu i ostalome, te u takvom varijabilnom okolišu mora preživjeti i razmnožavati se.⁶ Manjak hranjivih tvari često se promatra upravo kod fitoplanktonskih zajednica, a može na kraju dovesti do ograničenja rasta i stehiometrijskih promjena u biomasi fitoplanktona.

Cilj diplomskog rada je dobiti uvid u promjenu sastava lipida u ovisnosti o dostupnosti nutrijenta fosfata (adaptacija), neophodnim za izgradnju fosfolipida stanične membrane, te istražiti mogućnost diatomeje *C. pseudocurvisetus* da u uvjetima viška fosfata prikuplja stanične rezerve fosfata koje koristi kada izvori fosfata izostanu. Povod ovom istraživanju posljedica je spoznaje o smanjivanju koncentracije hranjivih soli, poglavito fosfata, hrvatskog Jadrana.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Fitoplankton

Biljni plankton ili fitoplankton obuhvaća jednostanične i kolonijalne, autotrofne i miksotrofne mikroorganizme – alge, od kojih su u morskome planktonu najvažniji predstavnici kremenjašice (diatomeje), svijetleći bičaši i kokolitoforidi. Fitoplankton je prva karika u prehrambenom lancu vodenih ekosustava, a fotosintezom proizvodi 95% primarne organske tvari u oceanima te veže 40% ugljika u biosferi. Hrana je mnogim vrstama životinjskoga planktona te nekim ribama.⁵

Skupine fitoplanktona međusobno se razlikuju u vidljivim značajkama kao što su veličina i morfologija, ali i u manje vidljivim karakteristikama kao što je korištenje ugljika i energije iz okoliša kroz kompleksne metaboličke puteve.⁷ S obzirom na raspon veličina stanica, fitoplankton se dijeli na tri veličinske frakcije: (i) mikrofitoplankton (stanice 20 – 200 μm), (ii) nanofitoplankton (stanice 2 – 20 μm) i (iii) pikofitoplankton (stanice 0,2 μm – 2 μm).

Dinamika i fiziologija fitoplanktona uvelike ovisi o okolišu u kojem žive, a u kojem dolazi do promjene svjetlosti, temperature, saliniteta, nutrijenata. U takvim uvjetima oni fiksiraju ugljik i nutrijente te proizvode proteine, lipide i ugljikohidrate, a pritom rastu i dijele se.⁸ Fitoplankton se adaptira na uvjete ekstremnih promjena u okolišu (temperatura, saliniteta, nutrijenata) kompleksnim premještanjem ugljika i energije kroz metaboličke puteve.⁷ Mogućnost prilagodbe osigurana im je i različitim, ponekad neobičnim promjenama u lipidima, najčešće membranskim.⁹ Generalno gledano, budući da je organska tvar mora glavni spremnik ugljika, razumijevanje čimbenika koji utječu na proizvodnju organske tvari, uključujući lipide, ključni su za razumijevanje dinamike globalnog ciklusa ugljika.

2.2. Lipidi fitoplanktona i klasifikacija lipida

Lipidi su skupina biomolekula koja se bitno razlikuje od aminokiselina i proteina. Prema definiciji to su u vodi netopljive, a u organskim otapalima poput etera, kloroforma ili benzena, jako topljive biomolekule. Lipidi imaju niz bioloških uloga: služe kao gorivo, pružaju važan

oblik 'spremnika' energije, vrlo su važan sastojak stanične membrane, a glavna uloga im je u procesima stanične signalizacije.¹⁰

U moru se pojavljuju u relativno niskim koncentracijama, ali su rasprostranjeni u svim oceanima.² U morskoj vodi pojavljuju se u otopljenoj i partikularnoj fazi.¹¹

Sve se više stavlja težište na istraživanje algalnih lipida i njihovih novih karakteristika zbog njihove značajne komercijalne vrijednosti. Koriste se kao dodatci prehrani, u farmaceutskoj i petrokemijskoj industriji.⁹

Klasifikacija lipida je prilično neuobičajena, jer lipidi nemaju karakteristična kemijska ni strukturalna svojstva. Jedina zajednička veza koja u toj skupini veže spojeve, jest način izolacije i slično biogenetsko porijeklo.¹² Lipidi se mogu podijeliti u 16 klasa biogenog i antropogenog podrijetla. S obzirom na polarnost, dijele se u dvije osnovne skupine; (i) nepolarni lipidi: ugljikovodici, digliceridi, trigliceridi, steroli, slobodne masne kiseline, voskovi i alkoholi te (ii) polarni lipidi: fosfolipidi, pigmenti, monoacilgliceridi i glikolipidi.² Nepolarni lipidi imaju različite uloge, npr. služe kao skladište energije, dok polarni imaju važnu ulogu u izgradnji staničnih membrana, čija je uloga selektivna permeabilnost organela i same stanice. Neki polarni lipidi uz to imaju senzorsku ulogu te su glavni intermediji u staničnom signalizacijskom putu, a time imaju važnu ulogu u reakciji stanica na okolišni stres.²

2.2.1. Nepolarni lipidi

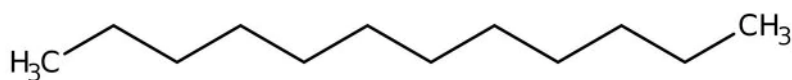
Ugljikovodici (HC)

Ugljikovodici (slika 1.) jesu spojevi sastavljeni samo od elemenata ugljika i vodika. Mogu biti alifatski ili aromatski.¹³

Ugljikovodici u morskoj vodi često su u literaturi spominjani kao indikatori onečišćenja, iako oni čine značajan udio lipida u morskom organizmu. Biogeni ugljikovodici pojavljuju se u svim morskim organizmima i najčešće zauzimaju udio od oko 1% ukupnih lipida organizama.¹¹ Kod eukariotskih algi zabilježen je veći udio od oko 10%.¹⁴

Biosintetski prekursori ugljikovodika kod biljaka i algi su masne kiseline koje obično sadrže paran broj ugljikovodika jer nastaju kondenzacijom C₂ jedinica, dok sinteza ugljikovodika dekarboksilacijom dovodi do najčešće neparnog broja C atoma.¹¹

Ugljikovodici su također i toksični spojevi nastali uglavnom antropogenim djelovanjem. Primjer su policiklički aromatski ugljikovodici (PAH) koje sintetizira mali broj organizama u malim količinama te su velike koncentracije indikator antropogenog zagađenja. Također su vrlo toksični i često korišteni ugljikovodici kao poliklorirani bifenoli (PCB-i) te biocidi kao nekad korišteni diklordifeniltrikloretan (DDT) ili pentaklorfenol (PCP).¹¹



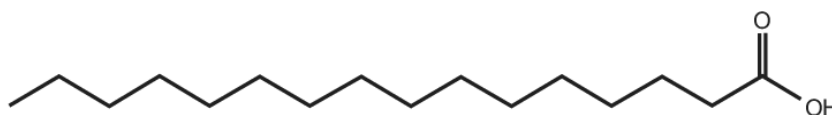
Slika 1. Ugljikovodik, n-dodekan

Slobodne masne kiseline (FFA)

Masne kiseline spojevi su opće strukture RCOOH. Prirodne masne kiseline sadrže 12 – 30 ili više atoma ugljika, s karboksilnom skupinom (COOH) na jednom kraju. Zasićene masne kiseline ne sadrže dvostruke veze, dok one nezasićene imaju jednu ili više dvostrukih i/ili trostrukih veza u svojim ugljikovodičnim lancima.¹³ Važan su izvor energije za morske organizme, a zbog ugljika koji se u masnim kiselinama nalazi u reduciranim obliku od ugljikovodika, oksidacija masne kiseline dat će veću količinu energije.

Masne kiseline glavni su konstituent većine morskih lipida, a u sastavu dominiraju palmitinska kiselina (n-C16:0) (slika 2.) te polinezasićene masne kiseline, poglavito n-C20:5 i n-C22:6.¹¹ U okolišnim uzorcima najčešće ih nalazimo kao produkte razgradnje lipida.¹⁵ Alge koje otpuštaju masne kiseline u okoliš također mogu pridonjeti inhibiciji rasta nekih vrsta algi i bakterija. Naime, masne kiseline toksične su za morske organizme, što zbog svojih jakih površinski aktivnih svojstava, što zbog toksičnih produkata koji nastaju njihovom oksidacijom.¹⁶

Masne kiseline koriste se kao biomarkeri određenih svojstava morskih uzoraka, kao npr. određivanje zooplanktona i fitoplanktona te procjenu utjecaja s kopna.¹⁵

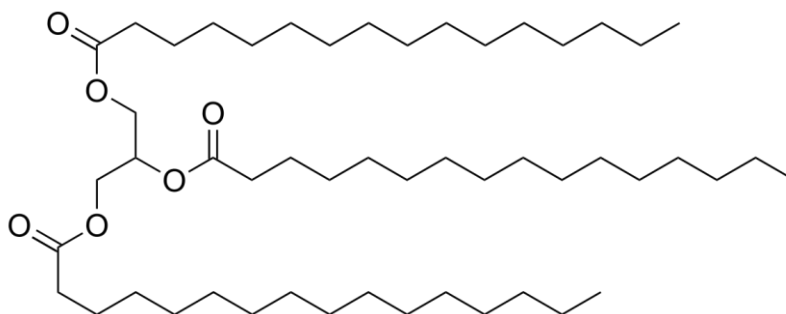


Slika 2. Palmitinska masna kiselina

Trigliceridi (TG)

Triacilgliceroli ili trigliceridi (slika 3.), poznatiji kao masti i ulja, najobilniji su lipidi. To su triesteri koji hidrolizom proizvode glicerol i tri molekule masne kiseline. Jednostavni trigliceridi sastoje se od tri identična bočna lanca masnih kiseline, dok mješoviti trigliceridi sadrže dvije ili tri različite masne kiseline.¹³ Masne kiseline od kojih se sastoje trigliceridi gotovo uvijek imaju paran broj ugljikovih atoma (16-22), što je povezano s njihovom sintezom.¹²

U mnogim algama nepolarni trigliceridi čine značajan udio lipida te su vrlo važan izvor energije za stanice, međutim, njihov je udio u bakterijama malen. U stresnim uvjetima stanice sintetiziraju više triglicerida te se smatra da je udio triglicerida najvjerojatnije određen dostupnošću hranjivih tvari.¹⁷

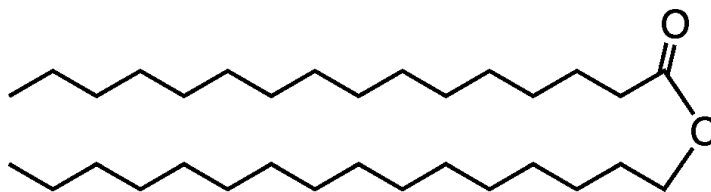


Slika 3. Struktura triglicerida, tripalmitina

Voskovi (WE)

Voskovi su lipidi koji se sastoje od dva dugačka alkilna lanca međusobno povezana jednom funkcionalnom skupinom koja sadrži kisik. Drugim riječima, to su esteri (RCOOR') formirani iz alkohola velike molekulske mase (R'OH) i masne kiseline (RCOOH) te ne sadrže glicerol. Zbog svojih dugih ugljikovodičnih lanaca, voskovi su vrlo hidrofobni.¹³

Glavni su neutralni lipidi u nekim vrstama zooplanktona¹⁸ te u njihovim detritusima i fekalnim peletima.¹⁹ Rjeđe se mogu pronaći u eukariotskim algama te se najčešće spominju kao alternativni skladišni lipidi. Primjerice, otkrivena je akumulacija voskova kod kultura *Euglene gracilis* prilikom uzgoja u mraku, te u starijim kulturama *Chroomonas salina*. U pravilu, zelene alge tijekom rasta ne akumuliraju velike količine skladišnih lipida ili ostalih nemembranskih lipida.⁹

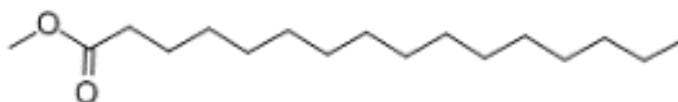


Slika 4. Molekula voska, cetil palmitat

Kratkolančani metil esteri (ME)

Metilni esteri masnih kiselina dobivaju se transesterifikacijom iz biljnih ulja, životinjskih masti ili otpadnih jestivih ulja iz kućanstava. U procesu transesterifikacije glicerid reagira s alkoholom u prisustvu katalizatora, stvarajući smjesu estera masnih kiselina i alkohola. Upotreba triglicerida rezultira proizvodnjom glicerola.²⁰

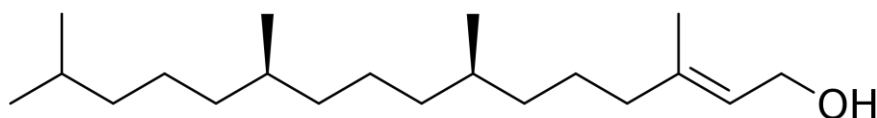
Iako u malim udjelima, u uzorcima morske vode zamijećeni su metilni esteri s dominantnom grupom metil palmitata (slika 5.).²¹ Pretpostavlja se da su nastali esteri rezultat razgradnje humidnih tvari, a druga je pretpostavka da su produkt djelovanja kvasaca na morske ugljikovodike.¹¹



Slika 5. Metilni ester, metil palmitat

Alkoholi (ALC)

Do stvaranja alkohola (R'OH) (slika 6.), dolazi biološkom razgradnjom, hidrolizom voskova te klorofila *a* i *b*, dok morski organizmi ne proizvode značajne količine alkohola u slobodnom acikličkom obliku.²²

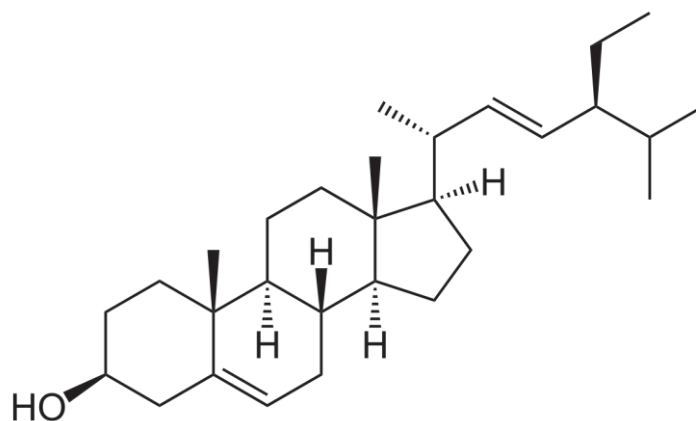


Slika 6. Alkohol fitol

Steroli (ST)

Steroli (slika 7.) su prstenasti, višefunkcionalni lipidi koji imaju bitnu ulogu u živoj stanici. Dio su stanične membrane, tj. nakupljaju se u njoj gdje su prisutni u koncentracijama sličnim onima fosfolipida. Funkcioniraju kao specifični regulatori fluidnosti i propusnosti membrana.^{23,24} Pojedini steroli su biomarkeri za specifične organizme i kategorije od kojih su potekli.²⁵

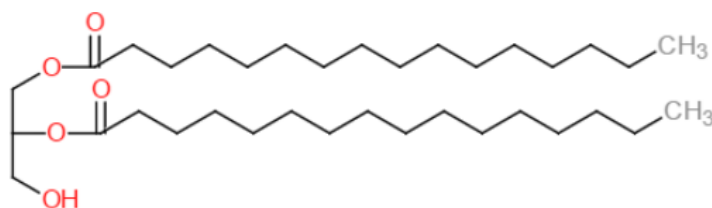
Četiri klase biljnih lipida čija je osnova sterol čine: slobodni steroli, sterolni esteri, steril glikozidi i acilirani steril glikozidi, a svi su važne komponente staničnih membrana.¹¹ Istraživanja su pokazala da slobodni steroli čine oko 17% lipida u morskim diatomejama.²⁶



Slika 7. Struktura stigmasterola, biljnog sterola (fitosterola)

Digliceridi (DG)

Digliceridi (slika 8.) su lipidi koji nastaju kao produkti razgradnje glicerida. Imaju važnu ulogu kao intermedijeri u anaboličkim i kataboličkim putevima estera masnih kiselina te igraju temeljnu ulogu u staničnoj signalizaciji. To su sekundarni glasnici u biomembranama i, iako relativno jednostavne molekule sa strukturne točke gledišta, mogu pokrenuti iznenađujuće širok raspon bioloških odgovora. Čine mali dio ukupnih lipida u stanici.^{11,27}

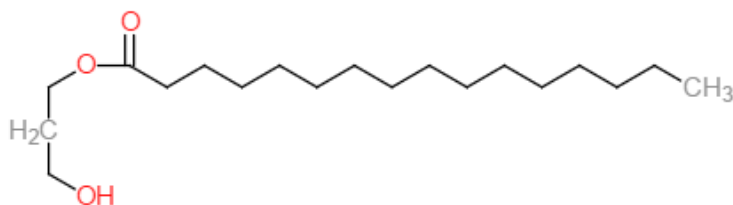


Slika 8. Struktura diglicerida, 1,2-dipalmitina

2.2.2. Polarni lipidi

Monogliceridi (MG)

Monogliceridi (slika 9.) su polarni lipidi čija je funkcija i podrijetlo jednaka kao diglicerida.¹¹ U bakterijama, gljivicama, biljkama i životinjama nastaju iz diacilglicerola djelovanjem diacilglicerol lipaza.²⁸ Monogliceridi zajedno s pigmentima i glikolipidima pripadaju grupi lipida koji se označavaju kao AMPL (Acetone Mobile Polar Lipids), lipidi koji se razvijaju u acetonu.²⁹

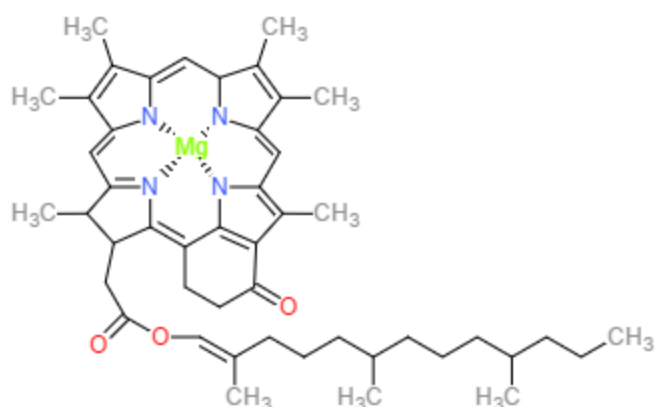


Slika 9. Struktura monoglicerida, n-monopalmitina

Pigmenti (PIG)

Pigmenti su lipidi kloroplasta. Reflektiraju i apsorbiraju samo određene valne duljine vidljive svjetlosti i na taj način daju određenu boju biljkama i algama. Budući da su u interakciji sa svjetlošću kako bi apsorbirali samo određene valne duljine, pigmenti su korisni biljkama i drugim autotrofima – organizmima koji sami sebi proizvode hranu pomoću fotosinteze. Naime, u biljkama, algama i cijanobakterijama, pigmenti su sredstvo pomoću kojeg se hvata energija sunčeve svjetlosti potrebna za fotosintezu.³⁰ Koriste se kao indikatori za taksonomiju algi, praćenje procesa u moru i abundanciju fitoplanktona.³¹

U algama se pojavljuju tri glavne klase pigmenata: klorofili, karotenoidi (karoteni i ksantofili) i fikocijanini.³² Struktura klorofila *a*, glavnog fotoreceptora u kloroplastima većine zelenih biljaka prikazana je na slici 10.¹⁰



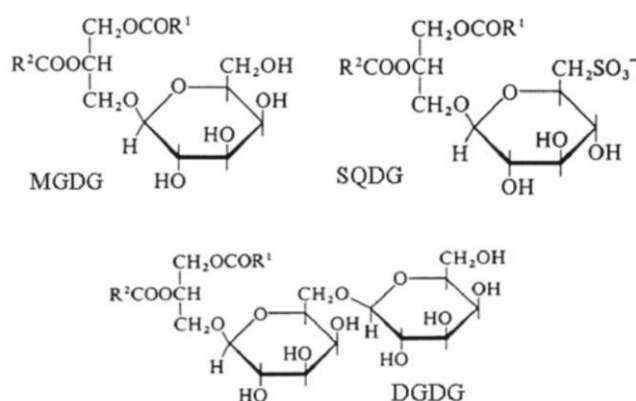
Slika 10. Struktura pigmenta, klorofila *a*

Glikolipidi (GL)

Glikolipidi, kao što im i ime kaže, jesu lipidi koji sadrže šećer.¹⁰ Najčešće sadrže jednu ili dvije molekule galaktoze povezane na sn-3 poziciju glicerola.² Zajedno s fosfolipidima glavni su konstituenti bioloških membrana. Posebice su u izobilju prisutni u plazmatskim membranama eukariotskih stanica.³³

Glikolipidi se najčešće nalaze na ekstracelularnom dijelu eukariotskih membrana te potiču interakcije između stanica, ali mogu djelovati i kao receptori virusa i patogena za ulazak u stanicu.³⁴ Sulfolipidi i galaktolipidi nalaze se u plastidima, dok su fosfolipidi i glikolipidi sastavni dijelovi vanjske membrane kloroplasta. Tako omjer klasa lipida može otprilike odrediti odnos kloroplastnih i nechloroplastnih membrana u stanicama algi.⁹

Glavni glikolipidi algi su monogalaktozildiacylglicerol (MGDG) i digalaktozildiacylglicerol (DGDG) te zauzimaju postotak od 40-55% i 15-35% ukupnih tilakoidnih lipida.² Omjer između ova dva galaktolipida važan je za ultrastrukturu kloroplasta, osobito tijekom prilagodbe na stres.³⁵ Također, u značajnim količinama u eukariotskim algama zabilježen je lipid sulfokinovozildiacylglicerol (SQDG), jedan od najznačajnijih sulfolipida u biljnim stanicama (slika 11.).



Slika 11. Glavni glikolipidi algi, R1 i R2 predstavljaju lance masnih kiselina. Preuzeto iz literaturnog izvora 2

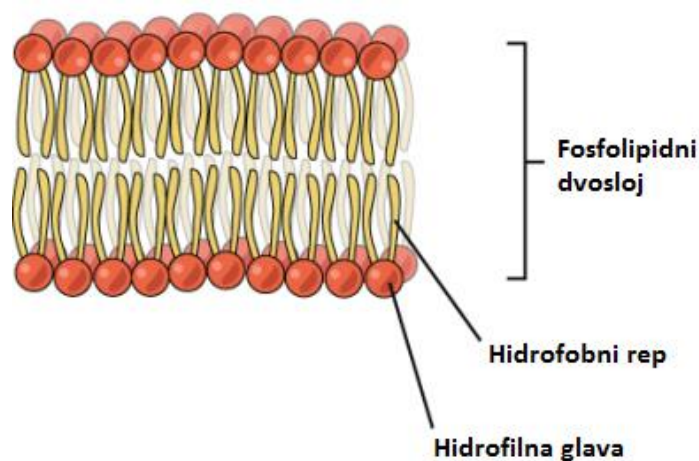
Fosfolipidi (PL)

Fosfolipidi su osnovni gradivni blokovi svih biomembrana te igraju ključnu ulogu u komunikaciji između izvanstaničnog i unutarstaničnog prostora.³⁶ Molekula fosfolipida sastavljena je od četiriju komponenti: jedne ili više masnih kiselina, platforme na koju su masne kiseline povezane, fosfata i alkohola vezanog za taj fosfat. Masna kiselina osigurava hidrofobnu barijeru, a ostatak molekule ima hidrofilna svojstva i omogućuje interakciju s vodenim okolišem.

Platforma može biti glicerol, alkohol s tri ugljikova atoma, ili mnogo složeniji alkohol sfingozin. Fosfolipidi potekli iz glicerola nazivaju se fosfogliceridima. Fosfoglicerid se sastoji od glicerolske osnove na koju su vezana dva lanca masnih kiselina i fosforilirani alkohol.

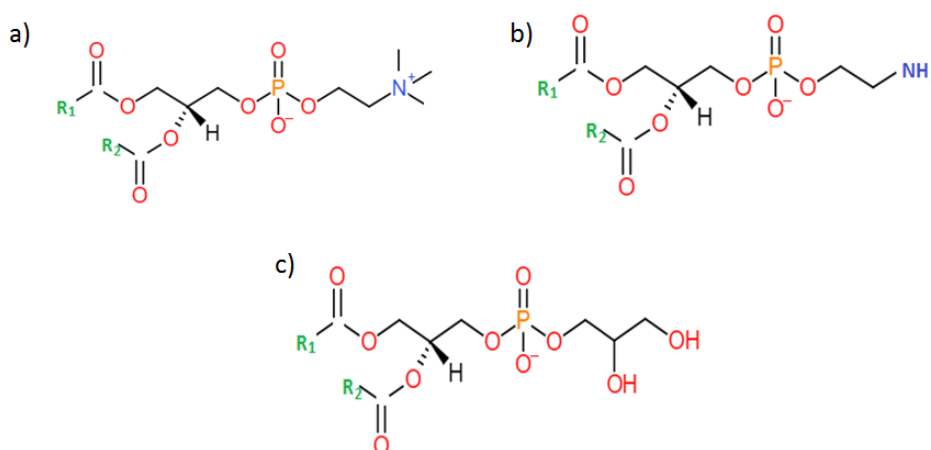
U fosfogliceridima su hidroksilne skupine na položajima C-1 i C-2 u molekuli glicerola esterificirane karboksilnim skupinama dviju masnih kiselina, a hidroksilna skupina na C-3 položaju esterificirana je fosfornom kiselinom. Taj se najjednostavniji fosfoglicerid zove fosfatidat (diacilglicerol-3-fosfat). U membranama ga ima malo, međutim, ključan je međuprodukt u biosintezi ostalih fosfoglicerida.

Tvorba membrana posljedica je amfipatske prirode fosfolipida. Međusobno suprotni afinitet hidrofilnih i hidrofobnih dijelova ovih membranskih lipida može se zadovoljiti nastankom lipidnoga dvosloja, izgrađenog od dvaju lipidnih slojeva. Hidrofobni repovi dvaju slojeva u međusobnoj su interakciji i tvore hidrofobnu unutrašnjost koja djeluje kao nepropusna barijera. Hidrofilne su glave na objema stranama dvosloja u dodiru s vodenim medijem (slika 12.). Lipidni dvosloj nastaje spontano procesom samoorganizacije, a za njegov nastanak presudne su i hidrofobne interakcije.¹⁰



Slika 12. Shema presjeka kroz dvoslojnu membranu. Preuzeto i prilagođeno iz literaturnog izvora 37

Glavni fosfolipidi u većini eukariotskih algi su fosfatidilkolin (PC), fosfatidiletanolamin (PE) te fosfatidilglicerol (PG) (slika 13.). Osim njih u dostatnim količinama nalaze se i fosfatidilserin (PS), fosfatidilinozitol (PI) te difosfatidilglicerol (DPG).² Međusobno se razlikuju po alkoholu vezanom za fosfatidat. Fosfolipide nalazimo u vanjskoj membrani kloroplasta, osim fosfatidilglicerola (PG) koji se u značajnim količinama nalazi u tilakoidnim membranama.² S obzirom na činjenicu da je PE dominantan u bakterijama, a PG u fitoplanktonu, omjer PE/PG često se koristi kako bi se otkrilo dominiraju li u danom uzorku bakterijske ili fitoplanktonske vrste.²⁹



Slika 13. Prikaz strukture a) fosfatidilkolina (PC), b) fosfatidiletanolamin (PE) te c) fosfatidilglicerol (PG). R₁ i R₂ predstavljaju lance masnih kiselina

2.3. Promjena dostupnosti nutrijenata

Na rast i razmnožavanje algi utječu razni okolišni faktori kao što su temperatura, svjetlo, salinitet, nutrijenti i koncentracija ugljikovog dioksida.^{6,7,8,38} Promjene u okolišu utječu na stanice pa tako i na strukturu i sastav lipida algi. Glavne se promjene događaju na lipidnom dvosloju membrane, tako da se mogu održati normalne funkcije unutar stanice.²

Kod promjene dostupnosti nutrijenata, tj. u slučaju njihova nedostatka, uobičajeno je da se zaustavlja stopa rasta stanica te se koriste masne kiseline za stvaranje skladišnih lipida, npr.

triglicerida. Neke alge u takvim uvjetima udvostručuju sadržaj lipida u stanici.⁹ Zamijećeno je da u oligotrofnim uvjetima fitoplankton stvara više lipida, a u eutrofnim proteine. U oligotrofnim uvjetima stvara se više lipida bez udjela dušika i fosfata³⁹ pa je tako u sjevernom Jadranu zamijećena čak 20% povećana koncentracija glikolipida.^{40,41}

2.3.1. Limitacija fosforom

Fosfor (P) je esencijalni nutrijent za morski fitoplankton i sve životne oblike. Središnja je komponenta nukleinskih kiselina (i DNA i RNA) te stoga igra ključnu ulogu u pohrani, replikaciji i transkripciji genetičkih informacija. Prisutan je u već spomenutim fosfolipidima, glavnim komponentama staničnih membrana. Također, igra središnju ulogu u proizvodnji kemijske energije (adenozin-trifosfata [ATP]) i reducirajućih ekvivalenata NADH (reducirani nikotinamid-adenin-dinukleotid) i NADPH (reducirani nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat) tijekom fotosinteze i respiracije, potrebnih za fiksaciju dušika i stanični metabolizam. Fosfor je posebno značajan i u sintezi proteina preko ribosomske RNA. Također, regulira aktivnost i funkciju mnogih proteina i metaboličkih procesa (putem fosforilacije i defosforilacije) i modulira signalne puteve u stanicama.⁴² Fosfor je gotovo potpuno odsutan u atmosferi, jedini značajniji unos fosfora u mora i oceane je putem riječne vode.⁴³ U morskim vodama javlja se kao otopljeni anorganski fosfat (prvenstveno ortofosfat [P_i]) ili kao mnoštvo otopljenih organskih spojeva fosfora (DOP, engl. *dissolved organic phosphorus*).

Ovisno o okolišu, rast morskog fitoplanktona obično je limitiran nedostatkom nekog od glavnih nutrijenata (fosfora, dušika i silicija) i/ili mikronutrijenta željeza. Sjeverni dio Jadranskog mora predstavlja poluzatvoreni planktonski ekosustav u kojemu se za fitoplanktonsku zajednicu često javlja nedostatak fosfata u odnosu na soli dušika i silikata.⁴⁴ Do limitacije fosforom u moru dolazi kada biodostupni oblici fosfata (anorganski ortofosfatni ioni, $HPO_4^{2-} + PO_4^{3-}$ i dostupni otopljeni organski fosfor, DOP) padnu ispod praga koncentracije dostupnosti fitoplanktonskim stanicama u odnosu na ostale neophodne nutrijente. Fitoplankton preferirano koristi P_i jer se može direktno unijeti i asimilirati kako bi podržao metabolizam algi i njihov rast, dok DOP općenito zahtijeva pretvorbu u P_i prije njegove metaboličke asimilacije, što je energetske manje isplativo. Ipak, koncentracije anorganskog fosfata mogu biti limitirajuće u određenim vodenim sredinama, osobito u oligotrofnim morskim staništima pa rast fitoplanktona obično ovisi o mogućnosti iskorištenja mnogo obilnijeg DOP,

njegovom enzimskom hidrolizom u P_i .^{42,45}

Biokemijski mehanizmi koji omogućuju fitoplanktonu da ograniči svoju potražnju za fosfatom te i dalje održava rast, uglavnom su nepoznati. U morima sa smanjenom koncentracijom fosfata, fitoplankton reducira potrebu za staničnim fosforom zamjenjujući fosfolipidnu membranu ne-fosfolipidnom.⁴⁶

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Priprema uzgoja monoklonalnih kultura stanica

Kultura stanica umjetni je proces kojim stanice rastu u kontroliranim uvjetima, uglavnom izvan njihovog prirodnog okoliša. Medij je sredstvo koje opskrbljuje te stanice esencijalnim nutrijentima i treba imitirati uvjete što sličnije onima iz kojih je vrsta izolirana. Uz medij kulture i stanice koje rastu u mediju, neophodan je zrak kako bi se omogućila razmjena ugljikovog dioksida između medija i atmosfere. Moraju se poduzeti opsežne mjere kako bi se monoklonalne kulture održale kemijski i biološki čiste. Kemijska kontaminacija može dovesti do neželjenih posljedica na rast stanica (algi), dok biološka kontaminacija čistih kultura od strane ostalih eukariotskih i prokariotskih organizama u većini slučajeva poništava eksperimentalni rad, a može dovesti i do izumiranja željene vrste stanica u kulturi. U praksi je vrlo teško dobiti sterilne kulture, i iako treba poduzeti mjere kako bi se smanjila koncentracija bakterija, određen stupanj bakterijske kontaminacije često je prihvatljiv.

U eksperimentu su analizirani lipidi monoklonalne kulture *Chaetoceros pseudocurvisetus*, morske diatomeje izvorno opisane kao tropska ili suptropska vrsta.⁴⁷ Uzorci mora prikupljeni su na području sjevernog Jadrana, a kolonija *Chaetoceros pseudocurvisetus* ručno je izolirana pomoću mikropipete. Kulture ove vrste ne rastu u atmosferi obogaćenoj s CO₂. Uzgajane su u obogaćenom (F2) mediju u sterilnim bocama za kulture stanica, izložene 12h/12h dnevno-noćnom ciklusu svjetla na 16 °C.⁴⁸ Stanice su potom nacjepljene u novi obogaćeni (F2) medij i fosfor osiromašeni medij (P-) gdje su prije nasađivanja rasle tjedan dana.

3.2. Priprema medija za uzgoj stanica

Jedan od najčešćih hranjivih medija koji se koristi za uzgoj morskih mikroalgi je F2 obogaćen morski medij. Za izradu medija korištena je morska voda iz sjevernog Jadrana koja je isprva 2 mjeseca držana u mraku kako bi se reducirala aktivnost i broj živih organizama. Morska voda je zatim filtrirana u laminaru pomoću Millipore sustava za filtraciju na sterilnom membranskom filteru promjera 0,22 µm kako bi se odstranile slobodne bakterije. Tako filtrirana morska voda podvrgnuta je trideset minutnoj UV sterilizaciji. Pripremljeno je, u duplikatima, 200 mL obogaćenog (F2) medija te 200 mL fosfor limitirajućeg medija (P-) u kojeg nije dodan

anorganski oblik fosfata (Na_2HPO_4). Stanice *C. pseudocurvisetus* prekondicionirane su u ta dva medija kroz tjedan dana na 20 °C.

Eksperiment je postavljen u triplikatima – ukupno 9 boca s uzgojima 1, 2 i 3. Uzgoj 1 predstavlja *C. pseudocurvisetus* prekondicioniran u obogaćenom (F2) mediju koji je presađen u bogati medij, tzv. F2 kontrolni medij nazvan F2 → F2. Uzgoj 2 naziv je za *C. pseudocurvisetus* prekondicioniran u obogaćenom (F2) mediju koji je presađen u P- medij, tzv. F2 → P- medij. Uzgoj 3 predstavlja *C. pseudocurvisetus* prekondicioniran u P osiromašenom mediju i presađen u medij osiromašen fosfatom, tzv. P- → P- medij. Volumeni svih boca iznosili su 1000 mL, a stanice su nasadene s početnom koncentracijom od 10^5 stanica mL^{-1} . Dodane su hranjive soli – fosfati, nitrati, silikati te elementi u tragovima i vitamini čije su koncentracije u konačnom mediju navedene u tablicama 1., 2. i 3., s tim da u uzgoje 2 i 3 nije dodan fosfat. Tijekom 10 dana kulture su bile u strogo kontroliranim uvjetima u komori za uzgoj fitoplanktona, na temperaturi od 20 °C, s fotoperiodom od 12 h dan i 12 h noć te intenzitetom svjetlosti od 4500 luxa.

Tablica 1. F2 otopina (Guillard, 1975) pripremljena u 950 mL filtrirane morske vode

Količina	Spoj	Stock otopina	Koncentracija u konačnom mediju
1,0 mL	NaNO_3	$75,0 \text{ g L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$	$8,82 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
1,0 mL	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	$30,0 \text{ g L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$	$1,06 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
1,0 mL	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ *	$5,6 \text{ g L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$	$3,62 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$
1,0 mL	F2 otopina elemenata u tragovima	(recept prikazan u tablici 2.)	(recept prikazan u tablici 2.)
0,5 mL	F2 otopina vitamina	(recept prikazan u tablici 3.)	(recept prikazan u tablici 3.)

* Nije dodano u uzgoje 2 i 3

Otopina je nadopunjena filtriranom morskom vodom do 1000 mL

Tablica 2. F2 otopina elemenata u tragovima pripravljena u 50 mL destilirane vode

Količina	Spoj	Stock otopina	Koncentracija u konačnom mediju
0,1575 g	FeCl ₃ 6H ₂ O	–	$1,17 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$
0,218 g	Na ₂ EDTA 2H ₂ O	–	$1,17 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$
0,05 mL	CuSO ₄ 5H ₂ O	9,8 g L ⁻¹ dH ₂ O	$3,93 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$
0,05 mL	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	6,3 g L ⁻¹ dH ₂ O	$2,60 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$
0,05 mL	ZnSO ₄ 7H ₂ O	22,0 g L ⁻¹ dH ₂ O	$7,65 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$
0,05 mL	CoCl ₂ 6H ₂ O	11,9 g L ⁻¹ dH ₂ O	$4,20 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$
0,05 mL	MnCl ₂ 4H ₂ O	178,2 g L ⁻¹ dH ₂ O	$9,10 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$

Tablica 3. F2 otopina vitamina pripravljena u 50 mL destilirane vode

Količina	Spoj	Stock otopina	Koncentracija u konačnom mediju
0,05 mL	cijanokobalamin (vitamin B12) $M=1355,37 \text{ g mol}^{-1}$	1 g L ⁻¹ dH ₂ O	$2,96 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$
0,05 mL	biotin (vitamin H) $M=244,31 \text{ g mol}^{-1}$	1 g L ⁻¹ dH ₂ O	$2,05 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$
10 mg	tiamin HCl (vitamin B1) $M=337,27 \text{ g mol}^{-1}$	–	$2,96 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$

3.3. Mikroskopiranje uzoraka

U vremenskom razdoblju od devet dana, svaki drugi dan u isto vrijeme, iz svakog triplikata kulture stanica uzorkovano je 1 mL uzorka za brojanje stanica pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX51-P, Olympus Co., Japan). Prije samog uzimanja uzorka, svaka kultura je dobro homogenizirana pažljivim ručnim okretanjem boca u svim smjerovima. Uzorci su pomoću automatske pipete oprezno nanošeni na predmetno stakalce pazeći da ne ostanu mjehurići zraka koji bi mogli narušiti sliku pod mikroskopom. Stanice su brojane u Sedgewick Rafter komoricama za brojanje metodom nasumično odabranih redova pod povećanjem 200 x. Dobivene ukupne vrijednosti stanica u mL preračunate su u broj stanica po litri (stanica L⁻¹).

3.4. Filtriranje uzoraka za analizu lipida

Za analizu lipida, iz svakog su triplikata filtrirane kulture stanica preko filtera sa staklenim vlaknima veličine pora 0,7 µm (GF/F Whatman) korištenjem Millipore sustava za filtraciju. Filteri su prethodno žareni kako bi se uklonila sva organska tvar na njima. Prvotno je, nakon nasadivanja stanica za uzgoj profiltriran ostatak, tj. 50 mL za F2 i 54 mL za P- iz pripremnog uzgoja. Ta dva uzorka nazvana su D0 (dan nula). U idućem periodu od devet dana, svaki drugi dan (1., 3., 5., 7. i 9. dan) na isti su način filtrirane kulture stanica. Prvi dan filtrirano je po 300 mL, drugi dan 200 mL, treći dan 120 mL, a četvrti i peti dan po 100 mL iz svakog triplikata. Svi uzorci za analizu lipida pohranjeni su do analize na – 80 °C.

3.5. Ekstrakcija lipida

Partikularni lipidi iz svih triplikata, ukupno 47 uzoraka uključujući i dva iz pripremnog uzgoja, ekstrahirani su standardnom metodom prema Bligh i Dyeru (1959). GF/F filteri izrezani su škarama na komadiće u pyrex epruvetu od 20 mL, gdje su homogenizirani dodatkom 9,5 mL monofazne smjese (diklormetan – metanol – voda; 1:2:0,8). Pomoću šprice je dodano 5 µg standarda n-heksadekanona, koji se ekstrahira zajedno s lipidima iz uzorka i služi kao unutarnji standard za određivanje konačne koncentracije svih klasa lipida. Uzorci su stavljeni u

ultrazvučnu kupelj na 3 minute i zatim ostavljeni preko noći na 4 °C. Idući dan, izrezani filtri još su jednom isprani sa 9,5 mL monofazne smjese te su prebačeni u ljevak za odjeljivanje od 25 mL. U isti je ljevak dodana i bifazna smjesa: 5 mL diklormetana i 5 mL 0,73% otopine NaCl. U ljevku za odjeljivanje dobivena su dva sloja, vodeni i organski. Lipidi se odvajaju u donjoj otopini tj. organskoj fazi, tako da su organske faze sakupljene i spremljene u tamne, smeđe staklene bočice i držane u frižideru do uparavanja. Sljedeći dan uzorci su upareni na dušiku do volumena od otprilike 1 mL. Prije same analize, svi su uzorci još jednom upareni do suha i stavljeni u male staklene inserte.

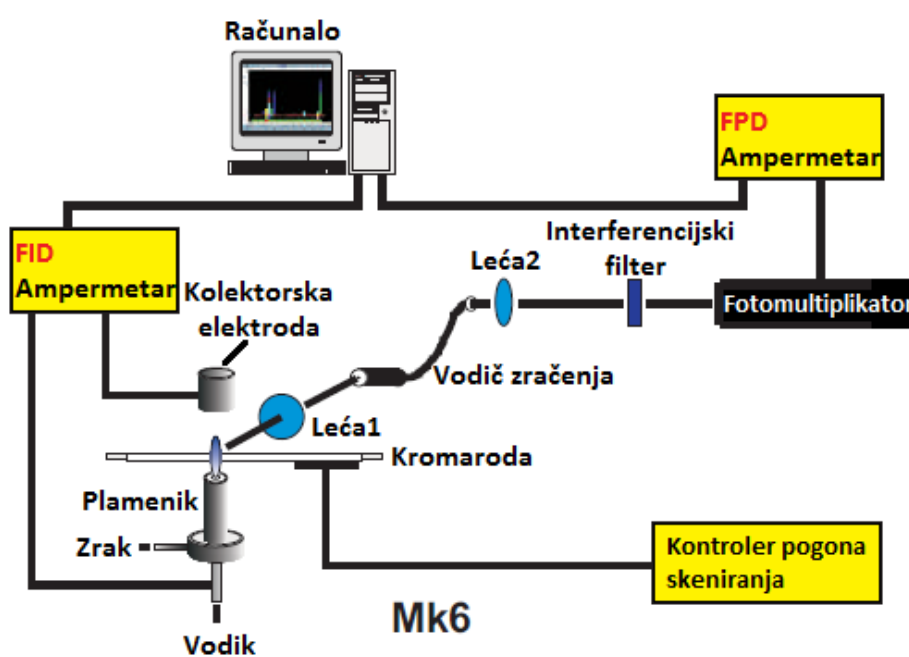
3.6. Instrument za analizu lipida: IATROSCAN MK-6

Instrument IATROSCAN MK-6 (TLC/FID-FPD) (Mitsubishi Kagaku Iatron, INC, Tokyo, Japan) analizator (slika 14.) pogodan je za razne analize organskih spojeva, a posebno lipidnih spojeva te mineralnih ulja. Koristi se za kvantitativnu i kvalitativnu analizu lipida te selektivno detektira heteroatome kao što su fosfor i sumpor. Instrument kombinira tankoslojnu kromatografiju (engl. *Thin layer chromatography* – TLC), uhodanu tehniku za razdvajanje organskih spojeva, sa plameno ionizirajućim (engl. *Flame ionisation detector* – FID) i/ili plameno fotometrijskim detektorom (engl. *Flame photometer detector* – FPD).



Slika 14. Instrument za analizu lipida, IATROSCAN MK-6

Nakon nanošenja uzoraka na kromarode (kvarcni štapići obloženi silika gelom) i razdvajanja komponenata unutar pojedinog uzorka tankoslojnom kromatografijom, kromarode pričvršćene na nosač stavljaju se u instrument te se skeniraju kroz plamen vodika pri konstantnoj brzini. Svaki od organskih spojeva razdvojenih na kromarodi ionizira se energijom plamena što stvara električnu struju na FID elektrodama. Ta električna struja proporcionalna količini tvari u plamenu, umnaža se i time omogućuje kvantifikaciju. Naime, kolektor smješten iznad plamena stvara analogni signal koji se mjeri na računalo pomoću SES ChromStar softvera. U slučaju kada su na rodi kromatografski razdvojeni organski spojevi koji sadrže elemente fosfora i/ili sumpora, oni izgaranjem na plamenu vodika emitiraju svoje inherentno zračenje. Nakon spektroskopskog razdvajanja interferencijskim filterima, ta se zračenja umnažaju fotomultiplikatorom kako bi se selektivno detektirao fosfor i/ili sumpor (slika 15.)



Slika 15. Načelo rada IATROSCAN MK-6 analizatora

Može se koristiti u mnogim područjima primjene kao što su oplemenjivanje biljaka, šumarstvo, ribarstvo, industrija nafte i ugljena, biokemija, biotehnologija, farmaceutska industrija, zagađenje okoliša, prehrambena industrija, itd. Uporaba ovog instrumenta započela je upravo 1980-ih godina, kada polako stječe popularnost u istraživanjima vezanim uz zaštitu okoliša i posebice u radu sa klasama lipida u moru.

IATROSCAN MK-6 ima funkciju djelomičnog snimanja koje omogućava detaljnu analizu uzoraka na samo jednoj kromarodi, što rezultira pouzdanijom analizom uzoraka. Visoko je efikasan jer je moguće istovremeno razdvajanje i detekcija komponenata u uzorcima na 10 kromaroda montiranih na jednom držaču roda. Također, za mjerenje jednog uzorka potrebno je otprilike 30 sekundi, što omogućava vrlo učinkovitu analizu. Zbog male potrošnje otapala te zbog kromaroda koje se mogu iznova upotrebljavati do 100 puta, analiza s IATROSCANOM MK-6 ekonomski je isplativa. Jednostavna je identifikacija i kvantifikacija molekulskih vršaka (pikova) jer se analitički rezultati šalju u programski paket za obradu kromatograma na računalu. Široko je područje primjene IATROSCANA; omogućuje analizu čak i onih organskih spojeva s visokim točkama vrelišta (oligomeri, polimeri, itd.) koje je inače teško analizirati plinskom kromatografijom, kao i onih teško detektiranih tekućinskom kromatografijom (masti i ulja, lipidi, itd.).

3.7. Analiza lipida na IATROSCANU

3.7.1. Priprema kromaroda

Razdvajanje spojeva izvršeno je pomoću TLC metode na takozvanim kromarodama. Korištene su kromarode tipa SIII (Analysesysteme, Bechenheim, Njemačka). To su uske kvarcne cjevčice dimenzija 0,9 x 15,2 mm, ravnomjerno obložene tankim uniformnim slojem (debljine 75 μm) sinteriranog anorganskog punila i adsorbensa tj. silika gela veličine čestica 5 μm , s dijametrom pora 60 Å. Deset takvih kromaroda postavljeno je u posebni metalni držač (Chromarod Holder SD-5, Analysesystem, Bechenheim, Njemačka). Držač roda na vodoravnoj je osi označen brojevima 1-10 (broj kromaroda), a na okomitim osima ima skalu od 0 – 100. Kromarode tipa SIII daju izvrsnu odvojivost komponenti i pokazuju stabilnu reproducibilnost. Kada nisu u upotrebi pohranjuju se u specijaliziranoj skladišnoj komori napravljenoj od jednog komada kvarcnog stakla s poklopcem (slika 16.).

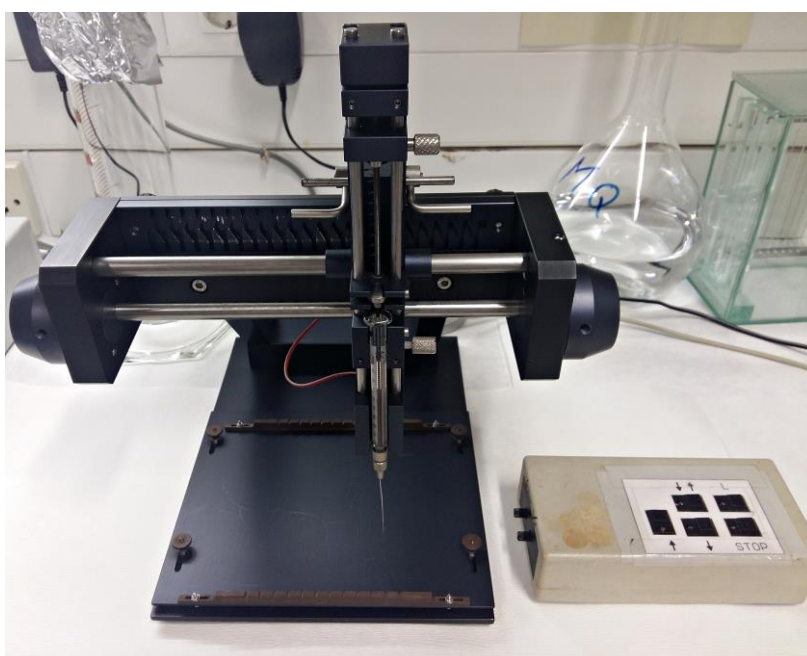


Slika 16. Kromarode u komori od kvarcnog stakla s poklopcem

U eksperimentu su korištena 2 metalna holdera sa po 10 kromaroda, svaki označen svojim serijskim brojem. Kromarode su prije prvog korištenja očišćene od mogućih organskih nečistoća zaostalih nakon pakiranja i transporta, na način da su razvijane u sustavu otapala te nakon toga potpuno skenirane u IATROSCANU brzinom od 30 s/snimanju. Prije svake upotrebe, kromarode su aktivirane ispiranjem tankim mlazom Milli-Q vode (ultračiste deionizirane vode bez organskih nečistoća koje su uklonjene filtracijom kroz kolonu s aktivnim ugljenom i kroz kolonu "Organex" (Millipore SAD)) i acetona, te su nakon 3-minutnog sušenja na grijaču snimane u IATROSCANU kako bi se provjerila čistoća sustava i samih kromaroda. Takvom provjerom osiguravaju se uvjeti pouzdane analize. Čišćenje i aktiviranje kromaroda obično se postiže plamenom vodika putem praznog skeniranja na IATROSCANU već spomenutom brzinom od 30 s/snimanju, što omogućuje njihovo ponovno korištenje.

3.7.2. Spotiranje uzoraka

Uzorci su na kromarode nanešeni „spotiranjem” poluautomatskim uzorkivačem (model SES 3202/IS-02; Analysesystem, Bechemheim, Njemačka) (slika 17.), elektronski kontroliranim mikroprocesorskim sklopom s preciznošću većom od 0,5%. U okomitom djelu uzorkivača fiksirana je injekcija (Hamilton, SAD) kojom su uzorci nanošeni na kromarode. Spotirani su na području koje je na držaču roda označeno kao "0" na skali, kako bi se osiguralo jednoliko razvijanje svih nanešenih uzoraka i modelnih otopina lipida koja imaju svrhu standarda.



Slika 17. Poluautomatski uzorkivač SES 3202/IS-02

Najprije je svim suhim uzorcima lipida u insertima dodana točna količina diklormetana. Na prve dvije, krajnje desne kromarode označene brojevima 1 i 2, uvijek je nanešeno po 0,8 μ L standarda, otopine svih modelnih lipida. Na ostale kromarode 3 – 10 nanošeni su alikvoti uzoraka u duplikatima, dakle, maksimalno 4 uzorka po holderu. Nakon svakog duplikata injekcija (Hamilton) ispirana je šest puta u čistom diklormetanu kako bi se osigurala točnost idućih mjerenja. Kod spotiranja svakog novog uzorka navuče se željeni volumen, vrati, ponovno navuče i tek onda spotira.

3.7.3. Separacija uzoraka

Nakon što su uzorci nanešeni, kromarode su provedene kroz sustav otapala pri čemu je došlo do razdvajanja lipidnog materijala. Sustavi otapala nalaze se u specijaliziranim komorama za razvijanje (model DT-150, Analysysteme, Bechenheim, Njemačka), koje su napravljene od jednog komada kvarcnog stakla sa filter papirom i poklopcem (slika 18.).



Slika 18. Kromarode u kupeljima za razdvajanje lipidnih klasa

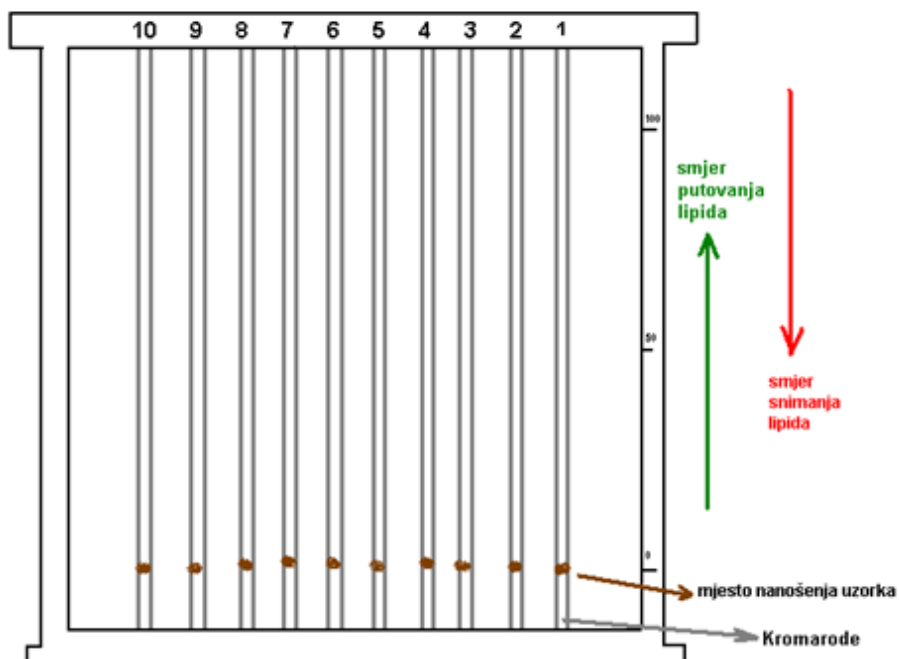
Kromarode su provedene kroz sustav od 7 kupelji organskih otapala rastuće polarosti kako bi došlo do postepenog razdvajanja lipida. Svaka smjesa otapala razdvaja određene klase lipida. Korištene otopine, klase lipida koje se u pojedinim otopinama razvijaju i vrijeme razvijanja navedeni su u tablici 4.

Tablica 4. Sustavi otapala i vrijeme potrebno za razdvajanje pojedinih lipidnih klasa u uzorcima i standardima na kromarodma SIII, $T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Otapala	Volumni omjeri (mL)	$t_{\text{razvijanja}} \text{ min}^{-1}$	Lipidne klase
n-heksan:dietileter: mravlja kiselina	97:3:0.2	28	HC, WE, ME, KET
n-heksan:dietileter: mravlja kiselina	80:20:0,2	30	TG, FFA
n-heksan:dietileter: mravlja kiselina	80:20:0,2	20	ALC, 1,3 DG, ST, 1,2 DG
kloroform:aceton: mravlja kiselina	95:5:0,6	32	PIG, MG
kloroform:aceton	28:72	30	MGDG, DGDG
aceton:kloroform: metanol:mravlja kiselina	33:33:33:0,6	37	SQDG, PG
kloroform:metanol: amonijev hidroksid	50:50:5	38	PE, PC

3.7.4. Mjerenje i analiza podataka

Nakon točno određenog vremena razvijanja u svakoj otopini, kromarode su sušene 3 minute na grijaču i parcijalno snimljene, tako da se snimaju tek netom razvijene klase lipida. Za vrijeme snimanja mjesto nanošenja uzorka ostaje netaknuto kako bi se ostali lipidi dalje mogli razdvajati u idućim kupeljima. Instrument se nakon uključivanja automatski postavlja na početne uvjete rada; brzinu snimanja od 30 s/snimanju te kromarode 1-10. Brzina protoka zraka za FID namještena je na 2000 mL min^{-1} , a protok vodika na 160 mL min^{-1} . Tijekom mjerenja stalno je provjeravano je li protok H_2 zadržan. Smjer snimanja lipida suprotan je smjeru putovanja lipida (slika 19.).



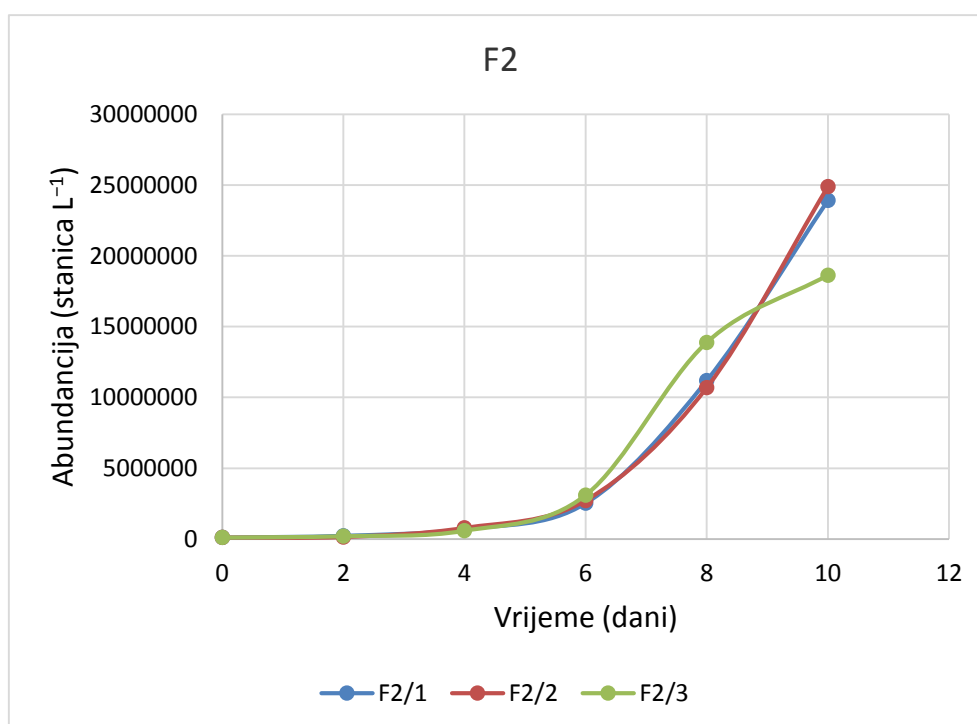
Slika 19. Smjer snimanja lipida suprotan smjeru putovanja lipida na kromarodama

Podaci su prikupljeni u SESChromStar programu na računalo. Kromatogrami dobiveni snimanjem pripisani su pojedinoj klasi lipida na osnovi usporedbe sa standardima (kromarode 1 i 2), te je svakom piksu određena površina matematičkom funkcijom integracije. Nadalje, obradom prikupljenih podataka određene su točne količine pojedinih lipidnih klasa u analiziranim uzorcima na osnovu kalibracijskih krivulja za svaku klasu posebno.

§ 4. REZULTATI

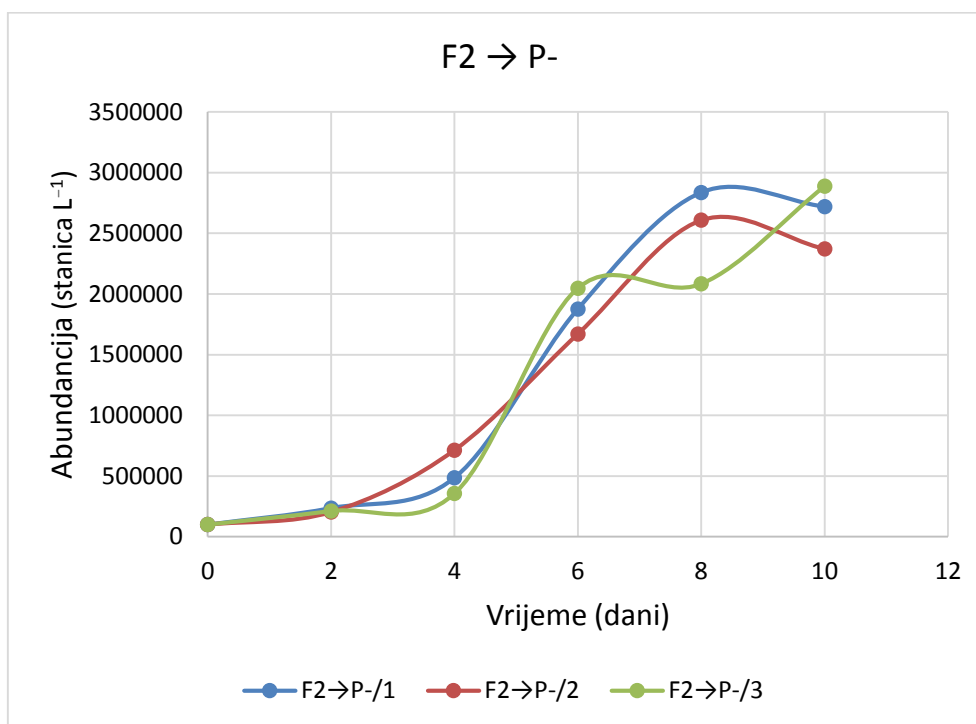
4.1. Krivulje rasta *Chaetoceros pseudocurvisetus* u uzgojima 1, 2 i 3 dobivene brojanjem stanica svjetlosnim mikroskopom

Tijekom 10-odnevnog uzgoja u obogaćenom F2 mediju broj stanica se povećavao od 1×10^5 stanica L^{-1} do $2,2 \times 10^7$ stanica L^{-1} u prosjeku triplikata. (slika 20.). U prva četiri dana stanice su se aklimatizirale na nove uvjete, a od četvrtog dana na dalje počele su rasti u eksponencijalnoj fazi, dok je maksimum rasta zabilježen u zadnja dva dana uzgoja.



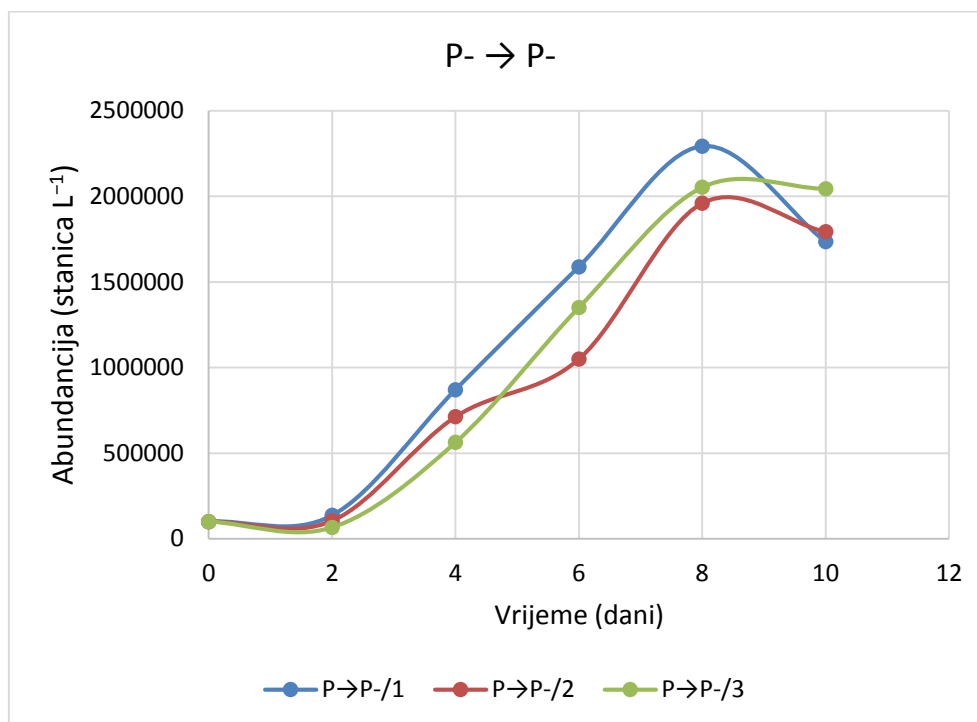
Slika 20. Krivulja rasta diatomeje *Chaetoceros pseudocurvisetus* u F2 mediju dobivena brojanjem stanica u Sedgewick Rafter komoricama kroz 10 dana uzgoja

Uzgojem u F2 → P- mediju vrijednosti abundancije kretale su se od 1×10^5 stanica L^{-1} na prosječno $2,6 \times 10^6$ stanica L^{-1} , što je očekivano manji porast nego u F2 mediju (slika 21.). U triplikatima 1 i 2, to jest F2 → P-/1 i F2 → P-/2 jasno je vidljivo kako broj stanica raste do osmog dana, zatim kreće padati.



Slika 21. Krivulja rasta diatomeje *Chaetoceros pseudocurvisetus* u F2 → P- mediju dobivena brojanjem stanica u Sedgewick Rafter komoricama kroz 10 dana uzgoja

Uzgojem u P- → P- mediju zabilježen je najmanji porast stanica, sa 1×10^5 stanica L^{-1} na prosječno $1,8 \times 10^6$ stanica L^{-1} (slika 22.). Stanice rastu od dana 2 do dana 8, nakon čega broj stanica kreće naglo padati, posebice u zadnja dva dana uzgoja.



Slika 22. Krivulja rasta diatomeje *Chaetoceros pseudocurvisetus* u P- → P- mediju dobivena brojanjem stanica u Sedgewick Rafter komoricama kroz 10 dana uzgoja

4.2. Ukupni lipidi

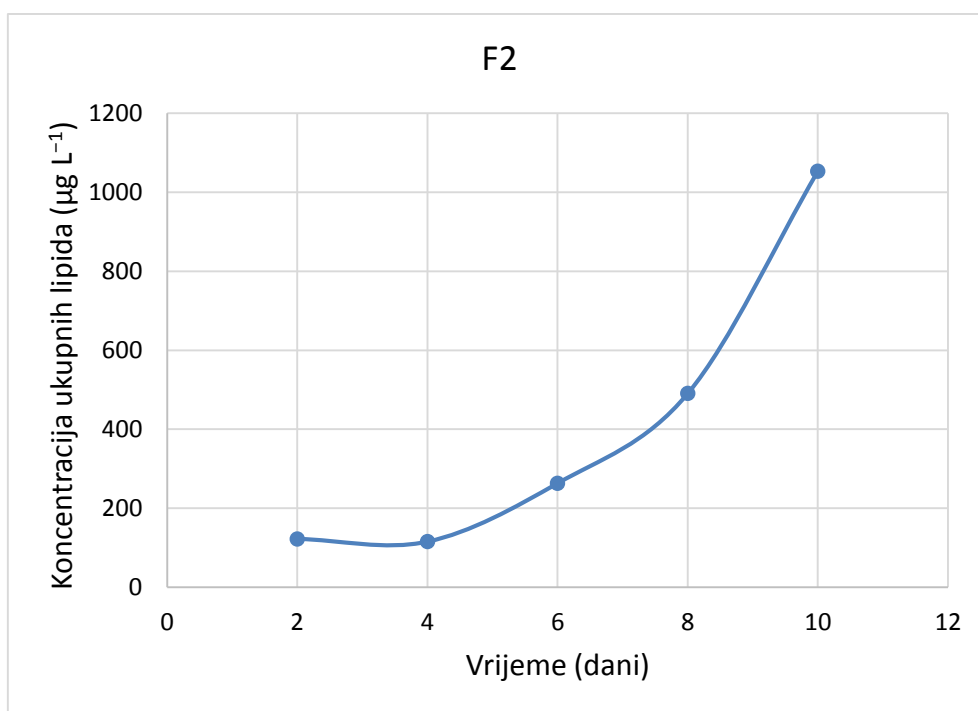
Rezultati koncentracija lipida i lipidnih klasa prikazani su u tablici 5. Za svaki pojedini uzgoj najviše vrijednosti su dobivene u zadnjem danu uzgoja.

Tablica 5. Koncentracija ukupnih lipida i određenih klasa lipida u sva tri uzgoja

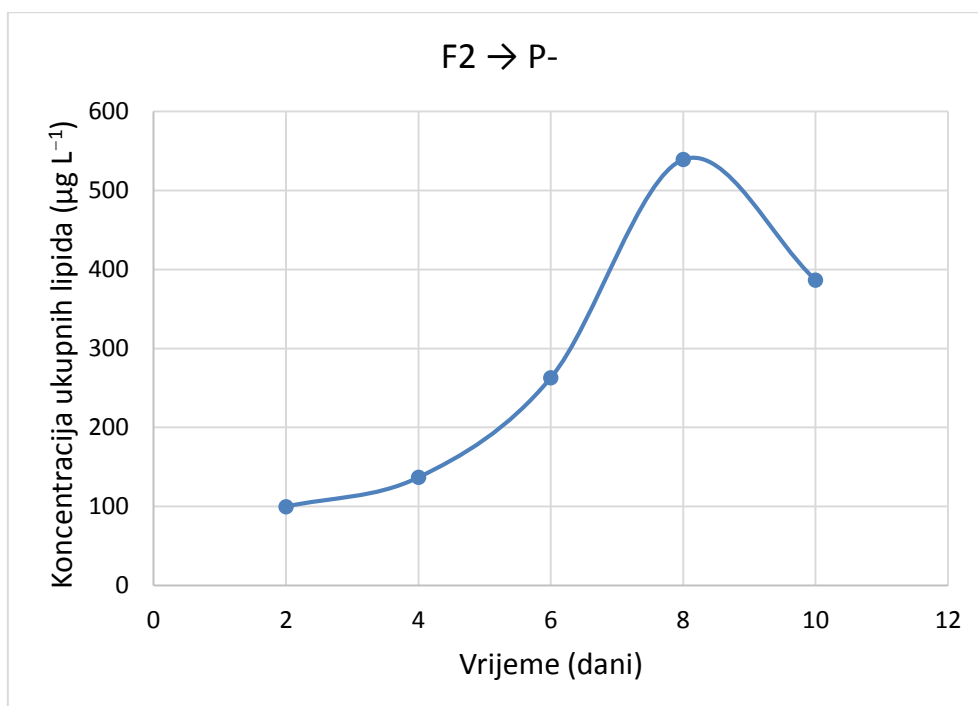
Medij	Dan	Ukupni lipidi	HC	SE	TG	ST	PIG	MGDG	DGDG	SQDG	DI
		(µg L ⁻¹)									
F2 → F2	2	169,3	12,8	3,0	2,7	0,4	6,0	17,6	11,2	17,5	29,9
	4	172,9	16,9	1,2	2,7	1,1	5,4	18,4	11,4	13,4	39,1
	6	410,9	23,1	7,9	6,2	1,5	20,1	34,7	25,3	34,4	115,4
	8	643,3	46,6	5,2	9,2	3,9	30,7	69,9	37,3	84,4	100,6
	10	1411,2	65,3	15,1	43,9	27,2	35,0	175,8	67,9	173,0	264,7
F2 → P-	2	134,3	7,4	2,4	1,9	0,8	4,8	11,6	7,9	15,0	25,3
	4	212,3	10,2	3,0	2,8	1,1	6,4	21,9	12,0	23,6	63,8
	6	446,5	18,9	4,8	4,9	1,9	30,0	46,4	23,1	30,7	160,8
	8	1228,9	18,3	7,2	26,5	4,9	32,0	91,8	37,9	71,8	667,5
	10	2163,6	10,9	2,5	15,8	10,4	40,0	90,3	34,9	41,0	1762,8
P- → P-	2	100,4	7,7	1,1	1,7	0,4	4,5	11,5	5,6	9,6	20,7
	4	300,6	18,8	4,6	6,6	1,4	10,5	33,1	12,7	31,6	78,8
	6	916,7	17,7	2,7	5,8	2,0	29,4	53,8	26,9	37,8	620,4
	8	1543,8	11,1	5,7	6,7	3,3	42,8	82,6	31,3	43,4	1147,4
	10	1921,4	28,1	8,7	36,0	8,4	28,4	110,8	83,1	82,4	1293,9

DI = lipidi pokazatelji razgradnje (engl. *degradation indices*)

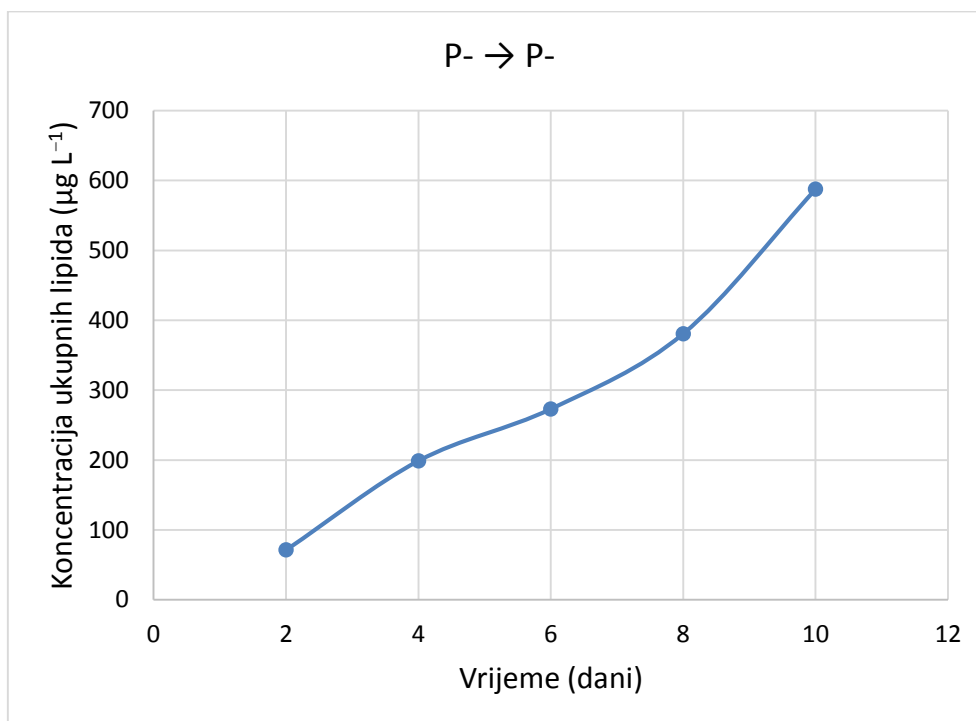
Promatrane su koncentracije ukupnih lipida bez ugljikovodika (HC) i lipida pokazatelja razgradnje (DI) dobivene analizom na IATROSCANU. Od dana 2 do dana 10, u obogaćenom F2 mediju koncentracija ukupnih lipida eksponencijano raste od 122,8 µg L⁻¹ do 1053,4 µg L⁻¹, s tim da je maksimum rasta zabilježen u zadnja dva dana uzgoja, što pokazuje isti trend kao i abundancija u istome mediju (slika 23.). Ukupna koncentracija lipida u mediju F2 → P- pokazuje eksponencijalni rast od dana 2 do dana 8 (od 99,8 – 386,6 µg L⁻¹), nakon čega se kreće smanjivati (slika 24.) Konačno, u mediju P- → P- koncentracija ukupnih lipida raste gotovo linearno, od 71,3 – 587,6 µg L⁻¹ (slika 25.)



Slika 23. Prosječna koncentracija ukupnih lipida u F2 mediju



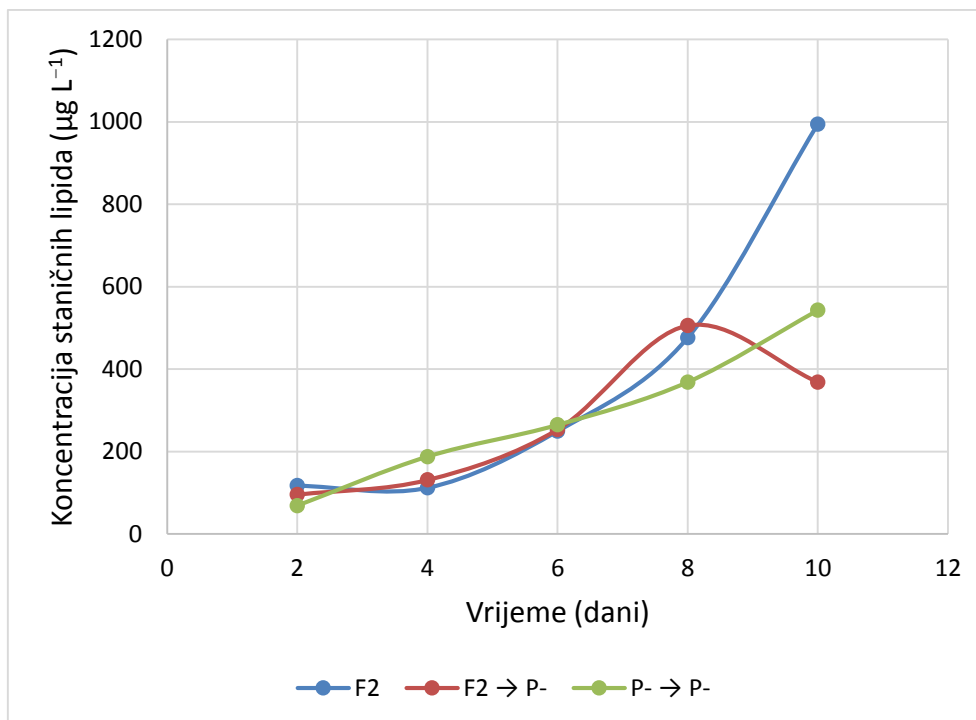
Slika 24. Prosječna koncentracija ukupnih lipida u F2 → P- mediju



Slika 25. Prosječna koncentracija ukupnih lipida u P- → P- mediju

4.3. Stanični lipidi

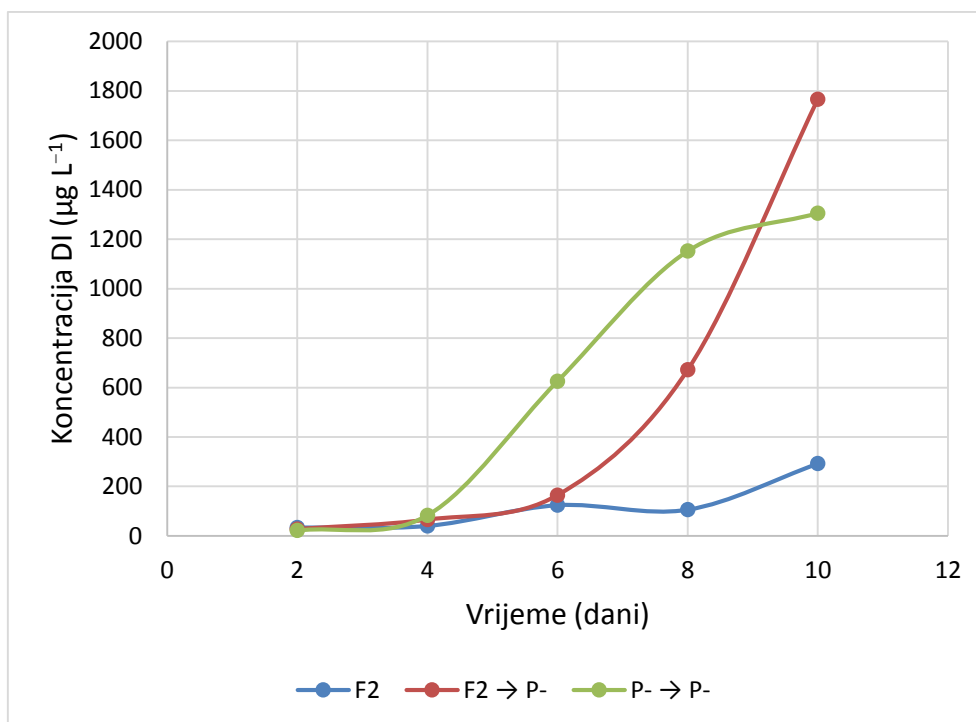
Kako bi se ustanovile promjene sastava staničnih lipida tijekom desetodnevnog rasta mikroalgi, zbrojeni su glavni fosfolipidi: fosfatidilglicerol (PG), fosfatidiletanolamin (PE) i fosfatidilkolin (PC), glavni glikolipidi: monogalaktozildiacylglicerol (MGDG), digalaktozildiacylglicerol (DGDG), sulfokinovozildiacylglicerol (SQDG) te steroli (ST) i pigmenti (PIG). Prosjek zbroja koncentracija navedenih staničnih lipida kroz dane u sva tri medija prikazan je na slici 26. Najveći porast koncentracije staničnih lipida ponovno se zapaža kod F2 medija, posebno u zadnja dva dana uzgoja gdje doseže maksimum. Najmanji porast koncentracije zabilježen je u uzgoju F2 → P- jer nakon gotovo eksponencijalnog rasta do dana 8, kreće padati sve do zadnjeg dana uzgoja.



Slika 26. Promjena koncentracije staničnih lipida u uzgojima 1, 2 i 3

4.4. Lipidi kao produkti razgradnje

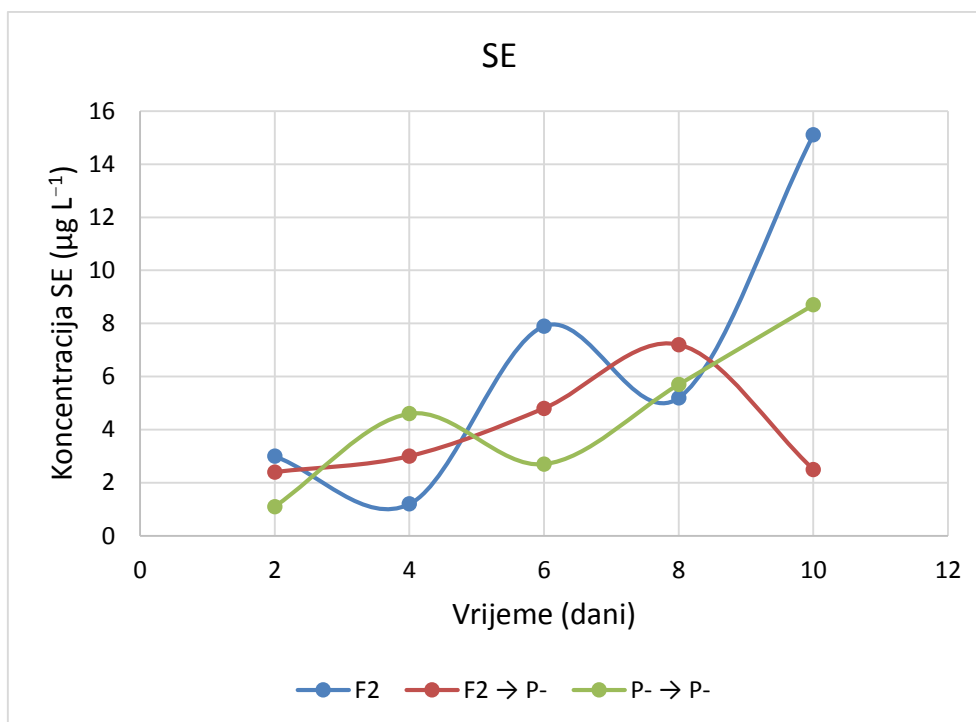
Lipidi koji nastaju različitim razgradnim procesima su: slobodne masne kiseline (FFA), metil esteri (ME), alkoholi (ALC), 1,2 digliceridi (1,2 DG), 1,3 digliceridi (1,3 DG) i monogliceridi (MG). U 10-odnevnom uzgoju, prosječna koncentracija indikatora razgradnje porasla je u sva tri medija, s tim da je najveći porast zabilježen u F2 → P- uzgoju (od 27,2 – 1766,2 $\mu\text{g L}^{-1}$) (slika 27.). Porast koncentracije nešto je niži u P- → P- mediju (od 21,4 – 1305,7 $\mu\text{g L}^{-1}$), a daleko najniži u F2 uzgoju (od 33,6 – 292,5 $\mu\text{g L}^{-1}$).



Slika 27. Prosječna koncentracija lipida pokazatelja razgradnje u sva tri uzgoja

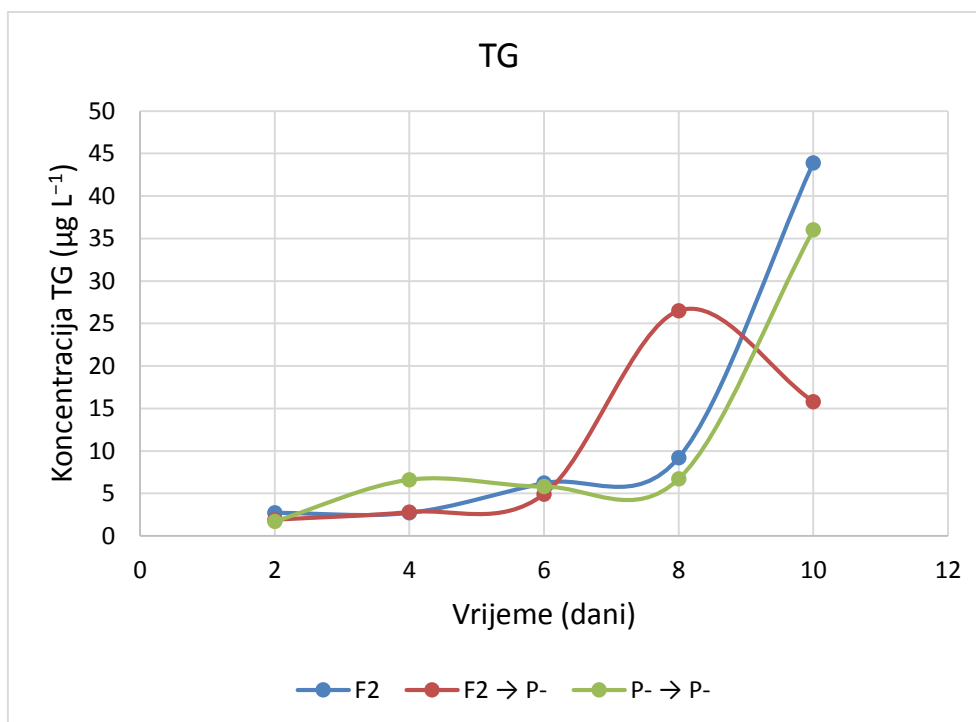
4.5. Lipidi energetske rezerve

Lipidi koji služe kao energetske rezerve jesu sterolni esteri (SE) i trigliceridi (TG). Promatrajući promjenu koncentracije sterolnih estera u vremenu, uočava se zanimljiv trend uzastopnog pada i rasta koncentracije u uzgojima F2 i P- → P- (slika 28.). U četvrtom danu uzgoja, koncentracija SE u mediju F2 pada, a u P- → P- raste. U šestom danu uzgoja koncentracija SE u mediju F2 raste, dok se u P- → P- smanjuje. U konačnici, od dana 8 – 10 koncentracija SE u oba medija raste. S druge strane, u mediju F2 → P- koncentracija se konstantno povećava do osmog dana uzgoja, nakon čega naglo pada u posljednja dva dana uzgoja, tako da je koncentracija SE izmjerena u danu 10 gotovo identična onoj izmjerenoj u drugom danu uzgoja.



Slika 28. Promjena koncentracije sterolnih estera u vremenu u uzgojima: F2, F2 → P- i P- → P-.

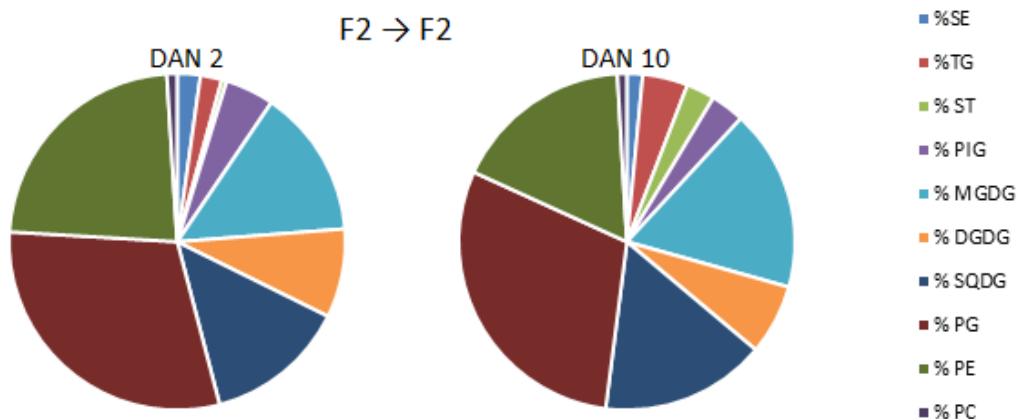
Promjena koncentracije triglicerida u vremenu pokazuje vrlo sličan trend kao i promjena koncentracije SE (slika 29.). Naime, zabilježen je linearan rast koncentracije triglicerida u F2 i P- → P- uzgoju od dana 8 do dana 10, dok se koncentracija u ta dva posljednja dana smanjuje u uzgoju F2 → P-.



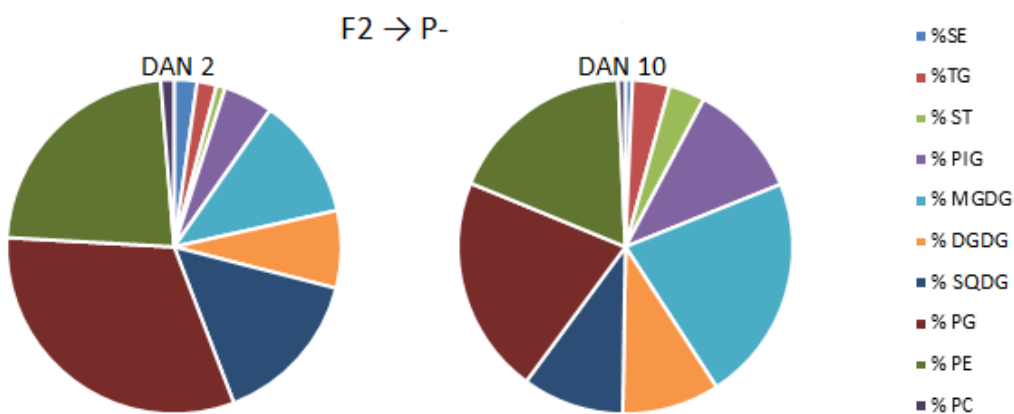
Slika 29. Promjena koncentracije triglicerida u vremenu u uzgojima: F2, F2 → P- i P- → P-.

4.6. Promjena sastava lipida izražena u postotcima

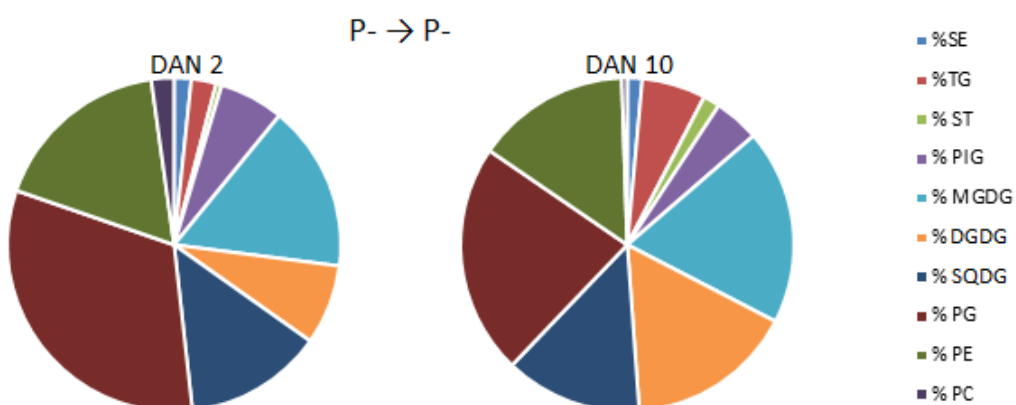
U tortnim grafikonima vidljivo je kako kod pojedinih uzgoja dolazi do promjene sastava lipida između dana 2 i dana 10 (slika 30 – 32.). Najmanje promjena je uočeno za F2 uzgoj (slika 30.). U F2 → P- i P- → P- došlo je do značajnog smanjenja udjela fosfolipida i paralelno do povećanja udjela glikolipida. Udio energetskih rezervi TG se također povećao u F2 → P- i P- → P- medijima.



Slika 30. 2D tortni grafikoni koji prikazuju postotke glavnih lipida u uzgoju F2 → F2 u drugom i desetom danu uzgoja



Slika 31. 2D tortni grafikoni koji prikazuju postotke glavnih lipida u uzgoju F2 → P- u drugom i desetom danu uzgoja



Slika 32. 2D tortni grafikoni koji prikazuju postotke glavnih lipida u uzgoju P- → P- u drugom i desetom danu uzgoja

§ 5. RASPRAVA

Promjena stope rasta *Chaetoceros pseudocurvisetus* ovisno o dostupnosti nutrijenta fosfata

Stanice *Chaetoceros pseudocurvisetus* dostigle su visoku abundanciju u F2 mediju koji je obogaćen nutrijentima, budući da su im bili dostupni dušik za sintezu proteina i enzima, kao i fosfor koji je ključan u replikaciji DNA i za sintezu fosfolipida, glavnih komponenata staničnih membrana.⁴² U prvih nekoliko dana eksperimenta trajala je faza aklimatizacije stanica na nove uvjete, koje zatim ulaze u esponencijalnu fazu rasta i dosežu svoj maksimum u posljednjim danima uzgoja.

S druge strane, stanice *C. pseudocurvisetus* koje su prvotno prekondicionirane u obogaćenom (F2) mediju pa zatim presađene u P- medij, a osobito one prekondicionirane u fosfat osiromašenom mediju i presađene u medij osiromašen fosfatom pokazuju očekivano manju abundanciju. Razlog tomu je što nedostatak fosfora smanjuje učinkovitost fotosinteze, sinteze ATP-a te učinkovitost Calvinovog ciklusa koji utječu na stopu fotosinteze i dijeljenje stanica.^{49,50,51} Budući da je u fosfor limitirajućim medijima ipak održavana mala stopa rasta, veća u F2 → P- mediju, može se zaključiti da su stanice koristile stanične rezerve fosfata za održavanje metabolizma koje su akumulirale tijekom prvotnog rasta u obogaćenom mediju. Stanice koje su bile pre-kondicionirane u osiromašenom mediju i potom presađene u osiromašeni medij rasle su najslabije što potvrđuje pretpostavku o formiranju staničnih rezervi fosfata i boljeg rasta stanica u F2 → P- mediju no u P- → P- mediju.

Promjene sastava lipida *Chaetoceros pseudocurvisetus* ovisno o dostupnosti nutrijenta fosfata

Sastav medija za uzgoj algi znatno utječe na rast i fiziologiju stanica. Rast mikroalge *C. pseudocurvisetus* ovisi o sastavu medija uzgoja, što je potvrđeno ovim eksperimentom.

Abundancija stanica *C. pseudocurvisetus* i promjena koncentracije ukupnih lipida pokazale su isti trend kod F2 uzgoja – eksponencijalni rast. U F2 → P- došlo je do smanjenja ukupne koncentracije lipida, vjerojatno uslijed limitacije fosforom. Zanimljivo je da u uzgoju P- → P- nije došlo do pada koncentracije ukupnih lipida već koncentracija raste gotovo linearno.

Rezultati ukazuju na pojačanu akumulaciju lipida u medijima siromašnim na hranjivim solima, poglavito u P- → P- u kojem stanice nisu mogle nagomilati rezerve fosfora koji bi iskoristili za rast i razmnožavanje. U tom slučaju stanice akumuliraju molekule bogate ugljikom, a što su lipidi.

C. pseudocurvisetus reagira na promjenu okolišnih uvjeta (u ovom slučaju značajno smanjenje dostupnosti fosfata) aktivirajući promjenu sastava membranskih lipida. Najmanje promjena uočeno je u uzgoju F2, međutim, u F2 → P- i P- → P- uzgojima došlo je do značajnog smanjenja udjela fosfolipida (PG, PE, PC) te do povećanja udjela glikolipida (MGDG, DGDG) i sterola. U nedostatku fosfora stanice sintetiziraju zamjenske lipide da bi se održao integritet stanice. U takvom slučaju stanice mogu umjesto fosfolipida koristiti glikolipide DGDG⁵² ili SQDG.⁴⁶

Uobičajeno je da stanice uz to što se razmnožavaju, isto tako i odumiru uslijed različitih faktora. Produkti razgradnje lipida (FFA, ME, ALC, 1,2 DG, 1,3 DG i MG) prisutni su u sva tri uzgoja gdje im je koncentracija u porastu jer dolazi do raspada odumrlih stanica pa nastaju lipidi koji su indikatori razgradnje. Najniži porast koncentracije lipida indikatora razgradnje (DI) zabilježen je u F2 mediju koji je obogaćen svim nutrijentima potrebnim za metabolizam stanice pa je očekivan i najmanji broj odumrlih stanica u takvom mediju, a time i najmanji broj indikatora razgradnje. Najveći porast koncentracije DI zabilježen u F2 → P- mediju, što je vjerojatno rezultat odumiranja najvećeg broja stanica zbog stresnih uvjeta nastalih prebacivanjem stanica iz obogaćenog u osiromašeni medij.

U uvjetima nedostatka nutrijenata uobičajeno je da se zaustavlja stopa rasta stanica pa u tim uvjetima mnoge vrste sintetiziraju masne kiseline koje se kasnije koriste za sintezu triglicerida (TG). Trigliceridi se mogu skladištiti u neograničenim količinama i koristiti kao izvor energije kada se uvjeti poboljšaju.⁹ Linearan porast koncentracije TG u P- → P- mediju u posljednjim danima uzgoja potvrđuje činjenicu da u stresnim uvjetima stanice sintetiziraju više triglicerida.¹⁷ Uz TG, u lipide energetske rezerve za fitoplankton ubrajaju se i sterolni esteri (SE), inertni oblici pohrane sterola. U P- → P- mediju, sinteza SE također je pojačana, što je u teoriji karakteristično upravo u periodima nepravilne ishrane.

§ 6. ZAKLJUČAK

Manjak nutrijenata jedan je od teških uvjeta kojima su povremeno ili često izložene fitoplanktonske alge u moru. Fosfor je neophodan nutrijent za rast svih organizama; glavni biokemijski „rezervoari” fosfora u morskom fitoplanktonu uključuju nukleinske kiseline i fosfolipide. Postoje dva različita okolišna uvjeta glede manjka fosfata, a to su uvjeti gdje su fluktuirajuće koncentracije fosfata, što je simulirano F2 → P- uzgojem, kao i oni uvjeti gdje su konstantno veoma niske koncentracije fosfora, što je simulirano P- → P- uzgojem. U okolišu stalnog nedostatka fosfata (P- → P- uzgoj) stanice su slabo rasle, sintetizirale su veliku količinu lipida, što je ukazalo na pojačanu sintezu molekula bogatih ugljikom, kao što su lipidi. U istom mediju je pokazano da su stanice smanjile sadržaj staničnih fosfolipida koji su zamjenjeni glikolipidima. Fosfolipidne supstitucije temeljni su biokemijski mehanizmi koji omogućavaju fitoplanktonu da održi rast u uvjetima ograničenja fosforom. U uvjetima fluktuirajuće koncentracije fosfata (F2 → P- uzgoj) stanice su vjerojatno akumulirale stanične rezerve fosfora koje su iskorištene za bolje razmnožavanje, stanice su bile u manjem stresu te su sintetizirale manje lipida i manje staničnih rezervi u obliku triglicerida.

Promjene u okolišu uglavnom utječu na sastav stanice, a time i na strukturu i sastav lipida stanice. Rezultati dobiveni ovim radom ukazali su na indukciju mehanizama za preživljavanje u različitim fosfor limitirajućim uvjetima promjenom količine i sastava lipida. Došlo je do promjene pojedinih udjela lipida s ulogom energetske rezervi (triglicerida i sterolnih estera), remodeliranja membranskih lipida (glikolipida i fosfolipida) te porasta lipida indikatora razgradnje.

Fitoplankton je odličan pokazatelj prilagodbi na promjene u okolišu, no još uvijek je istražena samo nekolicina vrsta. Potrebno je i dalje proučavati prilagodbe fitoplanktona na okolišni stres, proširiti vrste na kojima se istražuje i predložiti nove modelne organizme.

§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ALC	alkoholi
DG	digliceridi
DGDG	digalaktozildiacilglicerol
DPG	difosfatidilglicerol
FID	plameno ionizirajući detektor
FFA	slobodne masne kiseline
FPD	plameno fotometrijski detektor
GL	glikolipidi
HC	ugljikovodici
KET	ketoni
ME	metil esteri
MG	monogliceridi
MGDG	monogalaktozildiacilglicerol
PC	fosfatidilkolin
PE	fosfatidiletanolamin
PG	fosfatidilglicerol
PI	fosfatidilinozitol
PIG	pigmenti
PL	fosfolipidi
PS	fosfatidilserin
SE	sterolni esteri
ST	steroli
SQDG	sulfokinovozildiacilglicerol
TG	trigliceridi
TLC	tankoslojna kromatografija
WE	voskovi

§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. M. P. Mansour, J. K. Volkman, D. G. Holdsworth, A. E. Jackson, S. I. Blackburn, *Phytochemistry* **50** (1999) 541-548.
2. I. A. Guschinia, J. L. Harwood, u M. T. Arts, M. T. Brett, M. J. Kainz (ur.), *Lipids in Aquatic ecosystems*, Springer, New York, 2009, str. 1-24.
3. J. M. Fulton, H. F. Fredricks, K. D. Bidle, A. Vardi, B. J. Kendrick, G. R. DiTullio, B. A. Van Mooy, *Environ. Microbiol.* **16** (2014) 1137–1149.
4. B. Gašparović, S. Frka, B. P. Koch, Z. Y. Zhu, A. Bracher, O. J. Lechtenfeld, S. B. Neogi, R. J. Lara, G. Kattner, *Deep-Sea Res.* **89** (2014) 56-67.
5. <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=48601> (datum pristupa 30. prosinca 2018.)
6. I. A. Guschina, J. L. Harwood, *Prog. Lipid Res.* **40** (2006) 160-186.
7. K. H. Halsey, B. M. Jones, *Annu. Rev.* **7** (2015) 265-297.
8. B. Palenik, *Ann. Rev. Marine Sci.* **7** (2015) 325-340.
9. G. A. Thompson, *Biochim. Biophys. Acta* **1302** (1996) 17-45.
10. J. M. Berg, J. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 176, 329-331, 544.
11. C. C. Parrish, *Marine Chem.* **23** (1988), 17-40.
12. S. H. Pine, *Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, 1994, str. 858-908.
13. J. Gorzynski Smith, *Organic Chemistry*, McGraw-Hill, New York, 2008, str. 83, 150, 367-368, 1121-1122.
14. R. F. Lee, J. Hirota, J. C. Nevenzel, R. Sauerheber, A. A. Benson, A. Lewis, *CalCOFI Rept.* **16** (1972) 95-102.
15. C. C. Parrish, T. A. Abrajano, S. M. Budge, R. J. Helleur, E. D. Hudson, K. Pulchan, C. Ramos, u P. Wangersky (ur.), *The Handbook of Environmental Chemistry*, Vol. 5, Springer, Berlin, 2000, str. 193-223.
16. Y. Hashimoto, *Marine toxins and other bioactive marine metabolites*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1979, str. 223.
17. C. C. Parrish, P. J. Wangersky, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **35** (1987) 119-128.
18. G. Kattner, *Comp. Biochem. Physiol.* **94** (1989) 185-188.

19. S. G. Wakeham, C. Lee, J. W. Farrington, R. B. Gagosian, *Deep-Sea Res.* **31** (1984) 509-528.
20. <http://www.etipbioenergy.eu/images/fame-fact-sheet.pdf> (datum pristupa 2. siječnja 2019.)
21. M. Ehrhardt, C. Osterroht, G. Petrick, *Marine Chem.* **10** (1980) 67-76.
22. C. C. Parrish, C. H. McKenzie, B. MacDonald, E. Hatfield, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **129** (1995) 151-164.
23. <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/sterols> (datum pristupa 4. siječnja 2019.)
24. G. W. Patterson, W. D. Nes, *Physiology and Biochemistry of Sterols*, American Oil Chemists' Society, Illinois, 1991, str. 118-157.
25. J. C. Colombo, N. Silverberg, J. N. Gearing, *Org. Geochem.* **25** (1996) 211-225.
26. R. F. Lee, J. C. Nevenzel, G. A. Paffenhofer, *Mar. Biol.* **9** (1971) 99-108.
27. J. C. Gomez-Fernandez, S. Corbalan-Garcia, *Chem. Phys. Lipids.* **148** (2007) 1-25.
28. <http://www.lipidhome.co.uk/lipids/simple/mg/index.htm> (datum pristupa 5. siječnja 2019.)
29. M. Goutx, A. Momzikoff, L. Striby, V. Andersen, J. C. Marty, I. Vescovali, *Deep-Sea Res.* **47** (2000) 533-556.
30. <http://www.ucmp.berkeley.edu/glossary/gloss3/pigments.html> (datum pristupa 5. siječnja 2019.)
31. R. F. C. Mantoura, S. W. Wright, *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*, UNESCO, Paris, 1997, str. 335.
32. <https://wordpress.clarku.edu/debrobertson/laboratory-protocols/algal-pigments/> (datum pristupa 5. siječnja 2019.)
33. H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, S. L. Zipursky, J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman and Company, New York, 2004, str. 161.
34. <https://www.nature.com/subjects/glycolipids> (datum pristupa 7. siječnja 2019.)
35. http://www.hdbb.hr/Lea_Vojta_2012.pdf (datum pristupa 7. siječnja 2019.)
36. T. H. M. Da Costa, M. K. Ito, u B. Caballero, P. Finglas, F. Toldra (ur.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Academic Press, Cambridge, 2003, str. 4523.

37. <http://www.macroevolution.net/fluid-mosaic-model.html> (datum pristupa 8. siječnja 2019.)
38. J. Yu, C. Wang, Z. Su, P. Xiong, J. Liu, *Asian J. Chem.* **26** (2014), 3366-3370.
39. S. H. Lee, H. J. Kim, T. E. Whitley, *Cont. Shelf Res.* **29** (2009) 1689–1696.
40. B. Gašparović, J. Godrijan, S. Frka, I. Tomažić, A. Penezić, D. Marić, T. Djakovac, I. Ivančić, P. Paliaga, D. Lyons, R. Precali, N. Tepić, *Mar. Environ. Res.* **92** (2013) 120-132.
41. S. Frka, B. Gašparović, D. Marić, J. Godrijan, T. Djakovac, V. Vojvodić, J. Dautović, Z. Kozarac, *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **93** (2011) 290-304.
42. S. Lin, R. Wayne Litaker, W. G. Sunda, *J. Phycol.* **52** (2016) 10-36.
43. T. Tyrrell, *Nature*, **400** (1999) 525–31.
44. M. Pfannkuchen, A. Baričević, M. Smodlaka Tanković, N. Kužat, I. Ivančić, E. Pustijanac, B. Gašparović, T. Novak, G. Kušpilić, D. Marić Pfannkuchen, *Razumjeti kako nadmetanje za ograničavajuće nutrijente oblikuje fitoplanktonsku zajednicu u moru*, 13. Hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Poreč, 2018, Zbornik sažetaka str. 90-91.
45. S. Duhamel, K. M. Björkman, D. J. Repeta, D. M. Karl, *Prog. Oceanogr.* **151** (2017) 261-274.
46. B. A. S. Van Mooy, H. F. Fredricks, B. E. Pedler, S. T. Dyrman, D. M. Karl, M. Koblížek, M. W. Lomas, T. J. Mincer, L. R. Moore, T. Moutin, M. S. Rappé, E. A. Webb, *Nature*, **458** (2009) 69-72.
47. A. Kuwata, T. Hama, M. Takahashi, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **102** (1993) 245-255.
48. T. Novak, J. Godrijan, D. Marić Pfannkuchen, T. Djakovac, M. Mlakar, A. Baričević, M. Smodlaka Tanković, B. Gašparović, *J. Mar. Sys.* **180** (2018) 289-298.
49. A. L. Fredeen, T. K. Raab, I. M. Rao, N. Terry, *Planta*, **181** (1990) 399-405.
50. J. Jacob, D. W. Lawlor, *Plant Cell Environ.* **16** (1993) 785-795.
51. S. Lippemeier, D. M. Frampton, S. I. Blackburn, S. C. Geier, A. P. Negri, *J. Phycol.* **39** (2003) 320-331.
52. H. Hartel, P. Dormann, C. Benning, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97** (2000) 10649-10654.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Matea Bertanjoli

Datum rođenja: 07. travnja 1993.

Mjesto rođenja: Slavonski Brod

Obrazovanje

2000–2008 Osnovna škola Antun Mihanović, Slavonski Brod

2008–2012 Srednja škola Matija Mesić, Jezična gimnazija, Slavonski Brod

2012–2016 Preddiplomski studij kemije, Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2013 Sudjelovanje na Smotri Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2014 Sudionica Inova - Budi uzor 2014., 39. hrvatskog salona inovacija s međunarodnim sudjelovanjem i 10. izložbe inovacija, prototipova i studentskih poslovnih planova

2018 Sudjelovanje u organizaciji jedanaestog Otvorenog dana Kemijskog odsjeka PMF-a u Zagrebu