

# Učinak glukoze na fitotoksičnost nanočestica i iona srebra u algi *Chlorella vulgaris*

---

Đaković, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:486947>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Matea Đaković

**Učinak glukoze na fitotoksičnost  
nanočestica i iona srebra u algi *Chlorella*  
*vulgaris***

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Matea Đaković

**The effect of glucose on phytotoxicity of  
silver nanoparticles and ions in *Chlorella*  
*vulgaris***

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Petre Peharec Štefanić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Petri Peharec Štefanić na neizmjernej pomoći, strpljenju i svim savjetima vezanim uz eksperimentalni dio pokusa, jednako kao i uz pisanje samog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se također doktorandu Bruni Komazecu na velikoj pomoći u provođenju svih eksperimenata, na savjetima pri radu u laboratoriju i pisanju diplomskog rada. Veliko hvala i svim ostalim profesorima, asistentima, kolegicama i kolegama u laboratoriju koji su pomogli kad god je bilo potrebno, a prije svega što su bili podrška i ugodno društvo.*

*Zahvaljujem se svojim roditeljima na njihovoj ljubavi i brizi i što mi omogućuju da činim velike stvari u životu. Hvala mojim sestrama i bratu što su me gurali naprijed i što sam uz njih mogla puno učiti i završiti svoj studij. Veliko hvala mojoj šogorici i nećacima koji su mi ispunjavali život između učenja i činili ga još radosnijim. Naravno, hvala i svim ostalim članovima obitelji koji su me bodrili i željno iščekivali završetak mojeg studija.*

*Zahvaljujem svojem zaručniku Mislavu, što me pratio neizmjernom ljubavlju u vrijeme studija, i prije toga. Hvala mu jer je bio moj oslonac i podržavao me u svakom trenutku. Hvala mu što nikada nije posumnjao u mene i što je u meni uvijek vidio nešto više od prosjeka.*

*Zahvaljujem i svim svojim prijateljima, koji su me pratili od početka do kraja studija, a posebno Esmi, Ani Mariji i Marinu koje sam upoznala na faksu, a vjerujem da će ostati doživotni prijatelji. Hvala mojim prijateljima i kumovima Beti i Tončku što su uvijek uz mene, te Dori i Matei koje unose radost u moj život. Zahvaljujem svim prijateljima i poznanicima iz župe, posebno Meliti i Draženu koji su bili velika podrška, mojem župniku i kapelanu te svim bivšim đakonima na poticajnim riječima, ohrabrenju i savjetima danim tijekom studiranja.*

*Najveće hvala dragom Bogu bez kojega danas ne bih bila tu gdje jesam.*



Ovo istraživanje provedeno je u sklopu projekta  
Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava i toksičnosti  
nanočestica srebra, bakra i plastike kao potencijalno štetnih  
novih materijala u obalnim vodama (HRZZ IP-2018-01-5351)

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Učinak glukoze na fitotoksičnost nanočestica i iona srebra u algi *Chlorella vulgaris*

Matea Đaković

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Nanočestice srebra (AgNP) koriste se u različitim granama industrije, ali zbog svoje toksičnosti i reaktivnosti predstavljaju opasnost za okoliš. S ciljem razumijevanja učinka glukoze na fitotoksičnost AgNP stabiliziranih polivinilpirolidonom (AgNP-PVP) i ionskog srebra (AgNO<sub>3</sub>) na algu *Chlorella vulgaris*, uzgajala sam alge na hranjivoj BBM podlozi s (Glc +) i bez dodatka glukoze (Glc -) i izlagala koncentracijama 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 mg/L AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub>. Apsorpcijski spektar za AgNP-PVP pokazao je karakterističan pik za čestice srebra u oba tipa podloge, dok je apsorpcijski spektar za AgNO<sub>3</sub> pokazao nastanak novih čestica srebra u oba tipa podloge nakon 1 sata. Sve ispitivane koncentracije AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> uzrokovale su smanjenje broja stanica i povećanje postotka neživih stanica u odnosu na kontrolu. Tretman s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> uzrokovao je povećanje stupnja lipidne peroksidacije, te povećanje aktivnosti katalaze, superoksid dismutaze i peroksidaza u odnosu na kontrolu. Nakon oba tretmana uočene su značajne promjene u ultrastrukturi stanica algi u odnosu na kontrolu. Za sve izmjerene parametre, alge uzgojene na Glc + podlozi pokazale su znatno veću otpornost na oba tretmana i bolje preživljenje, iako je tretman s AgNO<sub>3</sub> većinom bio toksičniji za alge.

(85 stranica, 20 slika, 2 tablice, 76 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: nanočestice srebra, ioni srebra, *Chlorella vulgaris*, glukoza, ultrastruktura, stabilnost, oksidacijski stres

Voditelj: dr. sc. Petra Peharec Štefanić, izv. prof.

Ocjenitelji: dr. sc. Petra Peharec Štefanić, izv. prof.; dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, prof.; dr. sc. Martina Šeruga Musić, izv. prof.

Rad prihvaćen: 15.9.2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Master Thesis

The effect of glucose on phytotoxicity of silver nanoparticles and ions in *Chlorella vulgaris*

Matea Đaković

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Silver nanoparticles (AgNP) are used in various industries, but they pose a risk to the environment, due to their toxicity and reactivity. To understand the effect of glucose on the phytotoxicity of AgNP stabilized with polyvinylpyrrolidone (AgNP-PVP) and ionic silver (AgNO<sub>3</sub>) on *Chlorella vulgaris*, algae were grown on BBM nutrient medium with and without glucose and exposed to AgNP-PVP and AgNO<sub>3</sub> at concentrations of 0.5, 1.0, 1, 5, 2.0 mg/L. The absorption spectra for AgNP-PVP had a characteristic peak for silver particles in both medium types, while the absorption spectra for AgNO<sub>3</sub> showed that new silver particles were synthesised in both medium types after one hour. All tested concentrations of AgNP-PVP and AgNO<sub>3</sub> led to a decrease in cell number and an increase in the percentage of dead cells relative to the control. Treatment with AgNP-PVP and AgNO<sub>3</sub> caused an increase in lipid peroxidation, and in the activity of catalase, superoxide dismutase, and peroxidase relative to control. After both treatments, significant changes in the ultrastructure of cells were observed compared to the control. For all measured parameters, algae grown on a glucose-supplemented medium showed greater resistance and better survival to both treatments, while treatment with AgNO<sub>3</sub> being more toxic to algae.

(85 pages, 20 figures, 2 tables, 76 references, original in: Croatian language)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: silver nanoparticles, silver ions, *Chlorella vulgaris*, glucose, ultrastructure, stability, oxidative stress

Supervisor: Dr. Petra Peharec Štefanić, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Petra Peharec Štefanić, Assoc. Prof.; Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Prof.; Dr. Martina Šeruga Musić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 15.9.2021.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Nanotehnologija .....	1
1.1.1. Nanočestice i ioni srebra .....	2
1.2. Uzgoj alga u miksotrofnim uvjetima.....	3
1.3. Učinak nanočestica i iona srebra.....	4
1.3.1. Oksidacijski stres.....	4
1.3.2. Antioksidacijski sustav u algama .....	5
1.3.3. Izvanstanične polimerne tvari.....	7
1.4. Elektronska mikroskopija.....	8
1.4.1. Transmisijska elektronska mikroskopija .....	8
1.5. <i>Chlorella vulgaris</i> kao modelni organizam.....	10
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	11
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	12
3.1. Materijal .....	12
3.1.1. Fikološki materijal.....	12
3.1.2. Nanočestice srebra.....	12
3.2. Metode.....	12
3.2.1. Kultura alge <i>C. vulgaris</i> .....	12
3.2.1.1. Uvjeti uzgoja .....	12
3.2.1.2. Praćenje rasta kulture alge <i>C. vulgaris</i> .....	14
3.2.1.3. Spektrofotometrijsko određivanje stabilnosti AgNP-PVP i AgNO <sub>3</sub> u hranjivoj podlozi .....	14
3.2.3. Izlaganje kulture alge <i>C. vulgaris</i> otopinama AgNP-PVP i AgNO <sub>3</sub> različitih koncentracija .....	15
3.2.4. Određivanje vijabilnosti stanica primjenom fluorescentne boje propidij jodid.....	15
3.2.5. Određivanje broja stanica algi u suspenziji .....	16
3.2.6. Mjerenje pH vrijednosti suspenzije stanica alge .....	16
3.2.7. Određivanje količine kisika i mjerenje stope fotosinteze u suspenziji stanica alge .....	16
3.2.8. Spektrofotometrijska analiza apsorpcijskih spektara klorofila <i>a</i> i <i>b</i> u suspenziji stanica alge .....	17
3.2.9. Ekstrakcija ukupnih topivih proteina.....	17
3.2.10. Određivanje koncentracije ukupnih topivih proteina .....	18
3.2.11. Određivanje stupnja lipidne peroksidacije .....	18
3.2.12. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima .....	19
3.2.12.1. Određivanje aktivnosti katalaze.....	19



3.2.12.2. Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze .....	19
3.2.12.3. Određivanje aktivnosti pirogalol peroksidaze .....	20
3.2.12.4. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze .....	20
3.2.13. Transmisijaska elektronska mikroskopija .....	21
3.2.13.1. Vizualizacija AgNP-PVP u matičnoj otopini .....	21
3.2.13.2. Vizualizacija alge u nativnim uvjetima .....	21
3.2.13.3. Analiza promjena ultrastrukture stanica alge .....	21
3.3. Statistička obrada podataka .....	23
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>24</b>
4.1. Vizualizacija AgNP-PVP u matičnoj otopini .....	24
4.2. Stabilnost AgNP-PVP i AgNO <sub>3</sub> u hranjivoj podlozi .....	25
4.3. Izgled kultura alge <i>C. vulgaris</i> nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO <sub>3</sub> .....	30
4.4. Krivulja rasta alge <i>C. vulgaris</i> i broj stanica nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO <sub>3</sub> .....	33
4.5. Učinak tretmana s AgNP-PVP i AgNO <sub>3</sub> na vijabilnost stanica algi u suspenziji.....	37
4.6. Učinak tretmana s AgNP-PVP i AgNO <sub>3</sub> na pH vrijednost suspenzije stanica algi .....	40
4.7. Količina kisika i stopa fotosinteze u suspenziji stanica alge .....	43
4.8. Apsorpcijski spektri klorofila <i>a</i> i <i>b</i> u suspenziji stanica alge .....	46
4.9. Stupanj lipidne peroksidacije .....	49
4.10. Aktivnost antioksidacijskih enzima.....	52
4.10.1. Aktivnost katalaze .....	52
4.10.2. Aktivnost askorbat peroksidaze.....	55
4.10.3. Aktivnost pirogalol peroksidaze.....	57
4.10.4. Aktivnost superoksid dismutaze.....	59
4.11. Analiza rezultata dobivenih transmisijskom elektronskom mikroskopijom .....	61
4.11.1. Vizualizacija stanica alge u nativnim uvjetima .....	61
4.11.2. Ultrastruktura stanica alge <i>C. vulgaris</i> .....	66
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>68</b>
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>76</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>77</b>

## KRATICE

AgNP	nanočestice srebra (engl. <i>silver (Ag) nanoparticles</i> )
APX	askorbat peroksidaza (engl. <i>ascorbate peroxidase</i> )
BBM	hranjiva podloga korištena za uzgoj algi, tzv. Boldova osnovna podloga (engl. <i>Bold's Basal Medium</i> )
CAT	katalaza (engl. <i>catalase</i> )
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EPS	izvanstanične polimerne tvari (engl. <i>extracellular polymeric substances</i> )
Glc -	oznaka za alge uzgojene na podlozi bez dodatka glukoze
Glc +	oznaka za alge uzgojene na podlozi s dodatkom 1%-tne glukoze
MDA	malondialdehid (engl. <i>malondialdehyde</i> )
NBT	nitro-plavo tetrazolijski klorid (engl. <i>nitroblue tetrazolium chloride</i> )
NP	nanočestice (engl. <i>nanoparticles</i> )
PI	propidij jodid (engl. <i>propidium iodide</i> )
PPX	pirogalol peroksidaza (engl. <i>pyrogallol peroxidase</i> )
PVP	polivinilpirolidon (engl. <i>polyvinylpyrrolidone</i> )
ROS	reaktivni kisikovi oblici (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
SEM	pretražni elektronski mikroskop (engl. <i>scanning electron microscope</i> )
SOD	superoksid dismutaza (engl. <i>superoxide dismutase</i> )
TEM	transmijski elektronski mikroskop (engl. <i>transmission electron microscope</i> )

# 1. UVOD

## 1.1. Nanotehnologija

Nanotehnologija je rastuće područje znanosti koje uključuje razvoj nanočestica različitih materijala. Postoje različite definicije nanotehnologije, a najčešće se opisuje kao tehnologija stvaranja i upotrebe struktura, uređaja i sustava u dimenzijama između 1 i 100 nm, koji imaju jedinstvena svojstva, te omogućuju nove i drugačije primjene (Robinson, 2014). Riječ *nanos* dolazi iz grčkog jezika i znači patuljak, što slikovito opisuje o koliko se malim veličinama radi. Skok iz područja konvencionalne mikroskopije, od milijuntog dijela metra, do nanovelicina, odnosno milijarditog dijela metra, zahtijevao je razvoj novih alata za bolje promatranje i slaganje materijala (Booth i Baker, 2017).

Nanomaterijal se definira kao materijal koji ima neku vanjsku dimenziju u nano-području ili ima unutarnju strukturu ili površinsku strukturu u nano-području, kojeg čine objekti veličine između 1 i 100 nm. Nanomaterijali se mogu podijeliti u dvije glavne kategorije: nano-objekti, koji su diskretni komadi materijala s jednom ili više vanjskih dimenzija u nano-području i nanostrukturirani materijali, koji su materijali sa strukturom u nano-području. Nano-objekti mogu se podijeliti u tri kategorije ovisno o veličini i obliku. Prva grupa obuhvaća nanočestice (NP, engl. *nanoparticles*) koje su nano-objekti čije su sve vanjske dimenzije u nano-području i gdje se duljina najduže i najkraće osi ne razlikuje značajno. Druga grupa obuhvaća nanovlakna koja imaju dvije vanjske dimenzije u nano-području i treću dimenziju značajno veću. Treću, i posljednju skupinu, čine nanoploče koje imaju jednu vanjsku dimenziju u nano-području, a druge dvije dimenzije značajno su veće (Calderon-Jimenez i sur., 2017).

NP su velika skupina nanomaterijala, a karakterizira ih građa u tri sloja: površinski sloj, čija se funkcija može mijenjati različitim malim molekulama, metalnim ionima, surfaktantima i polimerima; sloj omotača (ljuska) koji se značajno kemijski razlikuje od druga dva sloja i srž, koja je esencijalni središnji dio. S obzirom na takvu složenu građu i specifične karakteristike, ovakvi materijali pobuđuju veliki interes istraživača u multidisciplinarnim područjima (Khan i sur., 2019). Fizikalna, kemijska i biološka svojstva NP ovisna su o njihovoj veličini i obliku. To ih čini pogodnima za primjenu u različite biomedicinske svrhe – dostavu lijekova, kao biosenzori, u vizualizaciji stanica i slično (Suresh i sur., 2010). Pokazano je da NP djeluju toksično na većinu organizama, pa tako i na alge. Primijećen je niz učinaka na organizme: oštećenje membrana, gubitak metaboličkih funkcija, mutacije, stvaranje reaktivnih kisikovih oblika, oštećenje mitohondrija, liza stanica, adhezija stanica, inhibicija rasta, promjene u

fotosintezi, itd. (Dash i sur., 2012). Fiziološke promjene u algama dugoročno dovode do posljedica u čitavom ekosustavu, s obzirom na to da su na prvoj razini akumulacije u hranidbenom lancu vodenih ekosustava (Romero i sur., 2020).

### 1.1.1. Nanočestice i ioni srebra

Nanočestice srebra (AgNP) trenutno su najčešće korišten nanomaterijal u komercijalne svrhe. Niska cijena proizvodnje i širok spektar antimikrobnih svojstava čine ih izrazito pogodnima za svakodnevnu upotrebu u antiseptičkim raspršivačima, pakiranjima za hranu, odjeći, kozmetici, antimikrobnim pokrovima medicinskih uređaja i sl. Takva široka upotreba AgNP dovela je do njihovog povećanog ispuštanja u okoliš, što dovodi do potrebe za istraživanjem njihovog učinka na ekosustave (Wang i sur., 2013). U istraživanju toksičnosti AgNP potrebno je uzeti u obzir dva važna aspekta. Prvo, razumijevanje toksičnosti AgNP komplicirano je zbog istovremenog postojanja čestica i ionskog oblika srebra, koji djeluju ili u međusobno neovisnom ili sinergističkom načinu. Postoje oprečne studije koje tvrde da su ioni srebra, odnosno AgNP, glavni uzrok toksičnosti. Drugo, toksičnost AgNP značajno ovisi o ciljnom organizmu, pa tako postoje razlike između najčešće testiranih organizama – bakterija, alga i gljiva (Zouzelka i sur., 2016).

AgNP imaju veliku površinu u odnosu na mali volumen, zbog čega su vrlo reaktivne i sklone stvaranju agregata te oksidaciji  $\text{Ag}^0$  u ione srebra ( $\text{Ag}^+$ ), što dovodi do otpuštanja iona u okoliš. Kako bi poboljšali njihovu stabilnost, u sintezi AgNP koriste se različiti površinski omotači koji mijenjaju svojstva NP (veličinu i oblik, površinski naboj, potencijal za vezanje i agregaciju), čime određuju citotoksičnost AgNP i interakciju s biološkim molekulama (Suresh i sur., 2010). Tri su najčešće korištena stabilizirajuća agensa: citrat, koji se slabo veže na srž AgNP i stabilizira njihov naboj, polietilen-glikol (PEG, engl. *polyethylene glycol*) i polivinilpirolidon (PVP, engl. *polyvinylpyrrolidone*) koji sterički stabiliziraju i snažno se vežu za srž NP (Tejamaya i sur., 2012). PVP je neutralni stabilizator i manje podložan promjenama pH i ionske jakosti i stoga su AgNP stabilizirane pomoću PVP-a stabilnije od drugih AgNP i manje toksične za stanice sisavaca. Također, AgNP stabilizirane PVP-om imaju bolju *in vivo* antimikrobnu aktivnost od drugih AgNP (Tiwari i sur., 2017).

## 1.2. Uzgoj alga u miksotrofnim uvjetima

Glukoza spada u skupinu ugljikohidrata koje nazivamo jednostavni šećeri ili monosaharidi, a ima molekulska formulu  $C_6H_{12}O_6$ . Glukoza je izvrstan izvor hrane, a može se pronaći u hrani biljnog i životinjskog porijekla. Organizmi koriste glukozu najčešće kao izvor energije, za sintezu glikoproteina i glikolipida, te kao generalni prekursor za sintezu kompleksnijih organskih tvari u organizmu.

Alge su fotosintetski organizmi, stoga se najčešće uzgajaju u fotoautotrofnim kulturama, gdje mogu pretvarati  $CO_2$  i vodu u biomasu procesom fotosinteze. Međutim, takav uzgoj ima nekoliko nedostataka, kao što su dobivanje male biomase i dugi kultivacijski period, što rezultira nedovoljnim prinosom i visokim troškovima uzgoja. Miksotrofna kultura, koja se ostvaruje dodatkom izvora ugljika (npr. glukoze) u podlogu za uzgoj algi, smatra se obećavajućim pristupom za rješavanje tog problema (Deng i sur., 2018). Sposobnost prelaska s fotoautotrofnog na miksotrofni način života fenomen je kod mikroalgi. Mnoge alge mogu koristiti i autotrofne i heterotrofne metaboličke procese, što znači da mogu vršiti fotosintezu, ali isto tako i koristiti organske tvari. Takva sposobnost omogućuje da se njihov rast ne oslanja isključivo na fotosintezu, odnosno da svjetlost nije limitirajući faktor. Miksotrofni način života nutritivno je idealan za dobivanje kultura algi velike gustoće, što je moguće iskoristiti u proizvodnji biogoriva ili industriji (Kong i sur., 2013).

Mali broj istraživanja do danas proučavao je djelovanje NP u uvjetima miksotrofnog uzgoja algi. Većina testova toksičnosti fokusirala se na fotosintetske parametre i parametre rasta, koji ne prikazuju potpuni toksični potencijal testiranog agensa. Marchello i sur. (2018) proveli su istraživanje učinka  $TiO_2$ -NP u algi *Chlorella sorokiniana* i pokazali da su alge rezistentnije na NP u miksotrofnim uvjetima uzgoja. Svoje zaključke donijeli su na temelju fotosinteze, rasta, vijabilnosti i biokemijskog sastava alge. Rezultati su pokazali smanjenu razinu klorofila *a* i fotosintetsku aktivnost u miksotrofnim uvjetima, a stanična vijabilnost nije se promijenila u miksotrofnim uvjetima, dok je u fotoautotrofnim značajno smanjena. S obzirom na nedostatak istraživanja ove problematike, potrebno je sveobuhvatnije proučiti učinak glukoze na toksičnost NP, uzimajući u obzir veći broj parametara za što kvalitetniju usporedbu.

### 1.3. Učinak nanočestica i iona srebra u algama

AgNP imaju negativan učinak na vijabilnost stanica, varijabilan učinak na koncentraciju klorofila, a uzrokuju i pojačano stvaranje reaktivnih kisikovih oblika (ROS, engl. *reactive oxygen species*). Osim toga, ranije analize transmisijskim elektronskim mikroskopom pokazale su da AgNP prisutne unutar stanica mikroalga stvaraju velike agregate i uzrokuju puknuća stanične stijenke. Toksične učinke AgNP moguće je povezati s oštećenjima površine stanica, oksidacijskim stresom i nastankom ROS-ova, ili s kontaktom  $\text{Ag}^+$  iona sa staničnim proteinima i enzimima (Hazeem i sur., 2019). Također, imaju značajan učinak na rast i morfologiju algi ovisno o primijenjenoj dozi. Izlaganje algi sve većim koncentracijama AgNP dovodi do progresivnog opadanja u sadržaju klorofila, kromosomske nestabilnosti i poremećaja u procesima mitoze, jednako kao i morfoloških promjena u algama (Dash i sur., 2012). Jiang i sur. (2017) pokazali su da se AgNP i  $\text{AgNO}_3$  mogu akumulirati u vodenim biotičkim komponentama koje onda mogu konzumirati životinje na višoj trofičkoj razini, čime se AgNP i  $\text{AgNO}_3$  mogu prenijeti preko hranidbene mreže i predstavljati opasnost za čovjeka.

#### 1.3.1. Oksidacijski stres

Primijenjeni vanjski stresni čimbenik može uzrokovati prekomjerno stvaranje ROS-ova čime dolazi do oksidacijskog stresa. Termin „oksidacijski stres“ prvi je upotrijebio Helmut Sies 1985. godine, kad je identificirao vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) kao normalni metabolit aerobnih organizama i upotrijebio metodu određivanja njegove koncentracije (Jones i Radi, 2014). Postoji velik broj različitih ROS-ova, a među najvažnijima su singletni kisik ( $^1\text{O}_2$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$ , superoksidni radikal ( $\text{O}_2^-$ ), hidroksilni radikal ( $\text{OH}^\cdot$ ) i perhidroksilni radikal ( $\text{O}_2\text{H}^\cdot$ ) (Buchanan i sur., 2015).  $\text{H}_2\text{O}_2$  se u mikroalgama stvara u normalnim fiziološkim uvjetima u peroksisomima uslijed fotorespiracije i oksidacije masnih kiselina, te djelovanjem enzima katalaze. Superoksidni radikal stvara se ponajviše u mitohondrijima procesom oksidativne fosforilacije i putem NADPH oksidaze na plazmatskoj membrani (Cirulis i sur., 2013). Međutim, povišene razine ROS-ova u mikroalgama mogu oštetiti nukleinske kiseline, proteine, lipide i ometati prijenos signala, što može dovesti do metaboličke neravnoteže, pa čak i stanične smrti (Gauthier i sur., 2020).

Metali doprinose stvaranju ROS-ova, a njihov učinak i toksičnost je kod mikroalga vrsno specifičan (Cirulis i sur., 2013). Bakar i cink esencijalni su metali u sintezi enzima i fotosintezi, no većina drugih metala nisu esencijalni za funkcioniranje stanica alga. Toksični metali imaju različita djelovanja – mogu inhibirati fotosintezu, depolarizirati staničnu

membranu, zakiseliti citoplazmu i/ili narušiti staničnu homeostazu. Zbog toga je za sve organizme koji se oslanjaju na fotosintezu izrazito važna dobra obrana od oksidacijskog stresa. Većina ROS-ova nastalih uslijed djelovanja metalnih iona posljedica su Haber-Weissove reakcije, Fentonovog procesa ili prijenosa elektrona tijekom oksidativne fosforilacije. Haber-Weissova reakcija stvara hidroksilni radikal i katalizirana je pomoću željeza ili drugog metalnog iona putem Fentonove reakcije. Fentonova reakcija može se opisati kao povećani oksidacijski potencijal  $H_2O_2$  u kombinaciji sa željezom ili drugim metalom niskog oksidacijskog statusa, koji onda služi kao katalizator u kiselim uvjetima. Ovakva kombinirana reakcija može proizvesti puno više ROS-ova iz superoksidnog radikala i vodikovog peroksida nego što nastaje enzimatskim putem. Antioksidacijski odgovor na oksidacijski stres prouzročen metalima razlikuje se između vrsta alga i ovisno o tipu metala koji je izazvao kontaminaciju (Gauthier i sur., 2020).

Lipidna peroksidacija proces je u kojem ROS-ovi djeluju na makromolekule u staničnoj membrani i tako oštećuju stanice. Lipidi i membrane svih organizama osjetljivi su na lipidnu peroksidaciju potaknutu oksidacijskim stresom. Kloroplasti zelenih mikroalgi osobito su podložni lipidnoj peroksidaciji zbog visokog sadržaja polinezasićenih masnih kiselina (Sabatini i sur., 2009). Lipidna peroksidacija odvija se u tri faze, a to su inicijacija, propagacija i terminacija. Dolazi do uklanjanja vodikovog atoma iz masne kiseline pomoću ROS-ova, čime nastaje lipidni radikal koji ponovno uklanja vodikov atom iz susjedne masne kiseline, te stvara novi lipidni radikal i omogućuje cikličku lančanu reakciju (Catala, 2006). Lipidna peroksidacija dovodi do nastanka jako reaktivnih aldehida, kao što je malondialdehid (MDA, engl. *malondialdehyde*), koji dalje mogu oštetiti proteine, aminokiseline i strukturu DNA (Gauthier i sur., 2020). Spektrofotometrijsko određivanje količine malondialdehida (Heath i Packer, 1968) koristi se kao metoda za određivanje razine lipidne peroksidacije.

### 1.3.2. Antioksidacijski sustav u algama

Antioksidacijski obrambeni sustav omogućuje uklanjanje prekomjerne količine ROS-ova u stanicama nastalih uslijed okolišnog stresa. Uključuje nekoliko enzimatskih i neenzimatskih mehanizama kao što su antioksidacijski enzimi katalaza, peroksidaza, superoksid dismutaza, te tokoferoli, karotenoidi, flavonoidi, fikocijanin, itd (Mallick, 2004). Antioksidacijski enzimi primarni su mehanizam kontrole koncentracije ROS-ova u svim organizmima izloženim kisiku. Ti enzimi kataliziraju uklanjanje ROS-ova kroz stvaranje manje reaktivnih molekula kao što su kisik i voda. Antioksidacijski sustav ključan je u mikroalgama

za uspješnu obranu od oksidativnog stresa, a enzimi koji su najčešće uključeni su superoksid dismutaza, katalaza i peroksidaze (Cirulis i sur., 2013).

Superoksid dismutaza (SOD, engl. *superoxide dismutase*) enzim je koji katalizira neutralizaciju dva superoksidna radikala dodatkom dva vodikova iona kako bi nastali  $H_2O_2$  i kisik. Postoji nekoliko izoforma ovog enzima koje se međusobno razlikuju prema metalnom kofaktoru, pa postoje SOD s bakar-cink kombinacijom, željezom, manganom i niklom. Ekspresija SOD izoenzima u mitohondriju, citoplazmi, peroksisomu i kloroplastu razlikuje se između vrsta od prokariota do eukariota. Sve tri izoforme učestale u biljaka (bakar-cink, željezo, mangan) mogu se pronaći i u mikroalgama. SOD aktivnost pokrenuta ROS-ovima nakon primjene vanjskog stresnog čimbenika ovisna je o koncentraciji i vremenu izlaganja. Povećana aktivnost SOD ovisna o koncentraciji zabilježena je nakon tretmana nekim metalima, npr. bakrom ili cinkom, a isto tako do povećanja aktivnosti dolazi sve duljim izlaganjem stresu (Cirulis i sur., 2013). Aktivnost SOD može se spektrofotometrijski izmjeriti praćenjem redukcije supstrata nitro-plavog tetrazolijskog klorida (NBT, engl. *nitroblue tetrazolium chloride*), u NBT-diformazan oblik (Beauchamp i Fridovich, 1971).

Katalaza (CAT, engl. *catalase*) je enzim koji sadrži aktivno mjesto s porfirinom i hemom u kojem dolazi do degradacije vodikovog peroksida u vodu i kisik. Na aktivnost CAT u mikroalgama najviše utječe koncentracija i trajanje stresnog faktora ili podražaja (Cirulis i sur., 2013). Nalazi se prvenstveno u peroksisomima, koji su mjesto povećanog stvaranja  $H_2O_2$ , ali je prisutna i u citosolu i mitohondrijima (Gauthier i sur., 2020). Aktivnost CAT može se spektrofotometrijski izmjeriti praćenjem razgradnje  $H_2O_2$  (Aebi, 1984).

Peroksidaze su skupina enzima koji kataliziraju oksidaciju supstrata s vodikovim peroksidom. Supstrati za neke od peroksidaza uključuju askorbat, citokrom c, pirogalol i glutation (Cirulis i sur., 2013). Askorbat peroksidaza (APX, engl. *ascorbate peroxidase*) najčešće se nalazi u kloroplastima i citosolu stanica, a ima veći afinitet za  $H_2O_2$  nego CAT, što je čini vrlo važnom u njegovom uklanjanju. APX reducira  $H_2O_2$  pomoću askorbinske kiseline, pri čemu nastaje voda i monodehidroaskorbat (MDHA, engl. *monodehydroascorbate*) (Gauthier i sur., 2020). Aktivnost APX može se spektrofotometrijski pratiti mjerenjem smanjenja koncentracije supstrata, tj. askorbinske kiseline (Nakano i Asada, 1981). Pirogalol peroksidaza (PPX, engl. *pyrogallol peroxidase*), slično kao i APX, uključena je u procese vezane uz oksidacijski stres, a nalazi se u citosolu, vakuoli i staničnoj stijenci. PPX uz utrošak  $H_2O_2$  oksidira donor elektrona – gvajakol, pri čemu nastaje purpurogalin (Uarrota i sur., 2016).



Aktivnost PPX može se spektrofotometrijski izmjeriti praćenjem nastanka produkta reakcije, purpurogalina (Nakano i Asada, 1981).

### 1.3.3. Izvanstanične polimerne tvari

Izvanstanične polimerne tvari (EPS, engl. *extracellular polymeric substances*) vrsta su makromolekulskih tvari koje stvara organizam, a većinom se sastoje od proteina, polisaharida, lipida, nukleinskih kiselina, itd. (Babiak i Krzeminska, 2021). Makromolekule u EPS-u potječu iz mikrobnog metabolizma, lize stanica, hidrolize makromolekula i apsorpcije komponenata iz otpadnih voda. EPS stvara dinamičku strukturu u dva sloja koji čine topivi EPS (S-EPS, engl. *soluble*) i vezani EPS (B-EPS, engl. *bound*). Osim toga, ima puno biološki važnih uloga u algama s obzirom na to da obiluje funkcionalnim skupinama (npr. -COOH, -NH, -OH, -CO-, itd.), pa je nužan za prianjanje na staničnu površinu. Zbog toga se EPS može vezati s mnogim organskim tvarima i anorganskim ionima i stvarati zaštitni sloj protiv štetnih tvari (Chen i sur., 2015). Neka istraživanja proučavala su učinak EPS-a na toksičnost NP. Otkriveno je da u prisutnosti NP, mikrobi stvaraju velike količine EPS-a i pokazuju višu toleranciju na AgNP (Ozturk i sur., 2014). U teoriji, EPS mogu ili stabilizirati raspršivanje NP ili mogu inducirati njihovu agregaciju, te tako smanjiti njihov direktan toksični učinak. EPS također pruža puno veznih mjesta za toksikante (npr. metalne ione), smanjuje njihovu akumulaciju ili mijenja substanični raspored u stanicama i tako mijenja indirektne učinke NP (Miao i sur., 2009). Međutim, točan mehanizam djelovanja EPS-a na toksičnost NP nije poznat i potrebna su daljnja istraživanja.

## 1.4. Elektronska mikroskopija

Mikroskopija omogućuje karakterizaciju objekata manjih od onih vidljivih ljudskim okom, što je čini izrazito važnim alatom u istraživanjima. Od 1660-ih godina i prve upotrebe jednostavnog optičkog mikroskopa, mikroskopija je imala ključnu ulogu u razvoju znanosti. Pogodna je za vizualizaciju čitavog organizma, pojedinih organela, staničnih struktura, membrana, površinskih struktura, čestica unutar stanica i sl. Proučavanje utjecaja nanočestica srebra na ultrastrukturne promjene u algi *Chlorella vulgaris* također nije moguće golim okom zbog njihove male veličine, pa je potrebno korištenje mikroskopa. Visoko povećanje daje velike mogućnosti, ali istovremeno omogućuje analizu samo malog dijela uzorka, stoga je potreban dobar izbor i priprema preparata. Svjetlosna mikroskopija najčešće omogućuje povećanje do 100 puta i ima manju razlučivost, stoga je za manje objekte potrebno primijeniti elektronski mikroskop. Ubrzani elektroni u vakuumu imaju svojstvo vala čija je duljina mnogo kraća od valne duljine svjetlosti pa je moć razlučivanja elektronskog mikroskopa veća u usporedbi sa svjetlosnim. Međutim, elektronska mikroskopija zahtijeva nešto naprednije tehnike pripreme uzoraka i zato se uzorci rijetko promatraju u nativnom stanju (Bunjies i Kuntsche, 2016).

U usporedbi sa svjetlosnim mikroskopima, većina elektronskih mikroskopa izrazito su veliki instrumenti. Svaki elektronski mikroskop sastoji se od izvora elektrona, optičkog sustava, stolića za preparat i detekcijskog sustava koji pruža informacije za stvaranje elektronsko-mikroskopskih slika. Dva su različita tipa elektronskog mikroskopa – transmisijski elektronski mikroskop (TEM, engl. *transmission electron microscope*) i pretražni elektronski mikroskop (SEM, engl. *scanning electron microscope*). Kod različitih elektronskih mikroskopa proces stvaranja snopa elektrona i fokusiranje konceptualno su slični, ali se procesi uključeni u stvaranje slike temeljno razlikuju. Kod TEM-a, slika se dobiva iz dubljih slojeva uzoraka i elektroni prolaze kroz uzorak, dok kod SEM-a elektroni pretražuju površinu uzorka ne prolazeći kroz njega (Bunjies i Kuntsche, 2016).

### 1.4.1. Transmisijska elektronska mikroskopija

TEM je uređaj u kojem snop elektrona prolazi kroz ultratanki preparat (tanji od 200 nm) i interagira s njime. Slika se stvara interakcijama elektrona propuštenih kroz uzorak, koji se fokusiraju do uređaja za vizualizaciju kao što je fluorescentni zaslon i sloj filma, ili ih detektira kamera. Pojava raspršenja elektrona tijekom prolaska kroz uzorak određuje tip informacija koji će se detektirati i pojaviti na zaslonu. Kako bi se omogućio neometani protok elektrona, TEM mora biti u uvjetima niskog tlaka, najčešće od  $10^{-4}$  do  $10^{-8}$  kPa. Razlučivost TEM-a limitirana

je prije svega sfernim aberacijama, ali postoje nove generacije uređaja kod kojih se aberacije korigiraju kako bi se povećala razlučivost (Shah, 2013). U biologiji, TEM se koristi za dobivanje slika visoke razlučivosti različitih unutarstaničnih struktura biljaka, životinja, mikroba, virusa, faga i molekule DNA. TEM se može koristiti i za lokalizaciju elemenata, enzima, proteina i proučavanje strukture membrana i makromolekula.

U novije vrijeme, TEM se koristi u nanotehnologiji za karakterizaciju AgNP i za proučavanje prodiranja NP u stanice i lokalizaciju unutar stanica (Kratošová i sur., 2014). AgNP dovoljno su velike da se pomoću TEM-a može promatrati njihov oblik i položaj u stanici na ultrastrukturnoj razini, te utvrditi njihova lokalizacija i akumulacija. Metode pripreme uzoraka za TEM mogu stvoriti artefakte velike elektronske gustoće, koji nalikuju NP metala, pa je potrebna dodatna provjera za konačnu potvrdu radi li se o NP. Za to je potrebna analiza spektra energijski razlučujuće, tj. disperzivne rendgenske spektroskopije (EDX, eng. *Energy Dispersive X-Ray Analysis*). TEM-EDX fokusira snop elektrona na mali promatrani dio uzorka, pri čemu elektroni međudjeluju s elektronima u unutarnjim elektronskim ljuskama atoma uzorka i izbacuju elektron iz ljuske. Zatim, elektron iz više elektronske ljuske dolazi na njegovo mjesto i pritom se otpusti energija u obliku X-zraka. S obzirom na to da svaki element ima karakterističnu vrijednost otpuštene energije, pomoću EDX detektora može se odrediti elementarni sastav dijela uzorka u obliku emisijskog spektra (Scimeca i sur., 2018).

### 1.5. *Chlorella vulgaris* kao modelni organizam

Mikroalge su mikroskopski eukariotski organizmi sposobni stvarati kisik putem fotosinteze, a usto su i izvor hrane, korisnih tvari i goriva. Kompletni razvojni ciklus mikroalga može trajati od 24 sata do nekoliko dana, zbog čega imaju veliku primjenu. Koriste se prvenstveno za bioremedijaciju kontaminiranih voda i izvor su hrane za vodene organizme. Također, komercijalno se proizvode i primjenjuju ponajviše u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji.

*Chlorella vulgaris* zelena je jednostanična mikroalga, koja raste u autotrofnim, heterotrofnim i miksotrofnim uvjetima (Ahmad i sur., 2020). Prvi puta je otkrivena 1890. od strane nizozemskog istraživača Martinusa Willema Beijerincka kao prva mikroalga s definiranom jezgrom. Njezino ime dolazi od grčke riječi *chloros*, što znači zelena, i latinskog sufiksa *ella* koji se odnosi na njezinu mikroskopsku veličinu. *C. vulgaris* je sferična ili elipsoidna alga, a veličina joj varira od 2 do 10  $\mu\text{m}$  u promjeru. Ima jednostaničnu stijenku čija se debljina i sastav mijenjaju ovisno o vanjskim uvjetima i rastu. Citoplazma je nalik gelu i sastoji se od vode, topivih proteina i minerala, te sadrži malu jezgru, vakuole, jedan vrčasti kloroplast i Golgijevo tijelo. Kloroplast ima dvostruku membranu građenu od fosfolipida i tilakoidne membrane kojima dominira fotosintetski pigment klorofil (Safi i sur., 2014).

Mnoge značajke alge *C. vulgaris* čine je osobito pogodnom kao modelni organizam. Kao i druge mikroalge, imaju visok sadržaj proteina, a za njihov rast i razvoj potrebno je malo nutrijenata jer su jednostanični, fotosintetski i brzo-rastući mikroorganizmi. U kratkom vremenu stvaraju izrazito veliku biomasu i vrlo lako se uzgajaju u kulturi. Također, veliki su izvor aminokiselina, vitamina i antioksidansa (Panahi i sur., 2019). Posljednjih godina posebice se koristi u istraživanjima koja prate nastanak oksidacijskog stresa uslijed izlaganja AgNP (Hazeem i sur., 2019; Romero i sur., 2020).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Široka upotreba nanočestica i iona srebra otvara mnogobrojna pitanja i zabrinutost oko njihovog otpuštanja u okoliš i utjecaja na organizme koji žive u njemu. Posljednjih godina mnogobrojna istraživanja bave se upravo tom problematikom i kao model počinje se koristiti alga *C. vulgaris* zbog brzog i lakog uzgoja u kulturi. Međutim, ne postoje relevantne spoznaje kako glukoza utječe na algu *C. vulgaris*, odnosno na unutarstanične procese i ultrastrukturu, te kako utječe na AgNP i na njihovo djelovanje u stanici. Stoga su ciljevi ovoga rada:

1. Istražiti stabilnost AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> u vremenskom periodu od 48 sati:
  - u tekućoj hranjivoj Boldovoj osnovnoj podlozi (BBM, engl. *Bold's basal medium*) s i bez dodatka glukoze
  - u suspenziji stanica alge s i bez dodatka glukoze
2. Istražiti utjecaj AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> nakon 5., 24. i 48. sata tretmana u tekućoj hranjivoj BBM podlozi s i bez dodatka glukoze:
  - na rast i vijabilnost alge
  - na promjenu aktivnosti antioksidacijskih enzima u suspenziji stanica alge
  - na stupanj lipidne peroksidacije u suspenziji stanica alge
  - na promjene u ultrastrukturi stanica alge

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Materijal

##### 3.1.1. Fikološki materijal

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

##### 3.1.2. Nanočestice srebra

Nanočestice srebra dobivene su redukcijom srebrovog nitrata ( $\text{AgNO}_3$ ) i stabilizirane pomoću polimera polivinilpirolidona (PVP). Pripremljena je otopina  $\text{AgNO}_3$  i polimera otapanjem 0,02 g  $\text{AgNO}_3$  i 0,019 g PVP-a u 120 mL ultračiste vode. Otopina je zagrijana do vrenja te je naglo dodana 1% (*w/v*) otopina natrijeva citrata. Otopina je opet zagrijana do vrenja. Nakon par minuta došlo je do promjene boje iz prozirnog u svijetlo-žutu. Otopina je zatim ohlađena do sobne temperature (Peharec Štefanić i sur. 2021). Laboratorijski sintetizirane nanočestice srebra, veličine 50 nm, pripremila je kolegica Renata Biba sa Zavoda za molekularnu biologiju, PMF, Zagreb.

#### 3.2. Metode

##### 3.2.1. Kultura alge *C. vulgaris*

###### 3.2.1.1. Uvjeti uzgoja

Kulturu alge *C. vulgaris* nasadila sam na tekuću hranjivu BBM podlogu (Bischoff i Bold, 1963) (Tablice 1. i 2.) s dodatkom 1% (*w/v*) glukoze i bez glukoze u prethodno autoklaviranim, sterilnim tikvicama od 50 mL zatvorenim vatom i aluminijskom folijom. Alge su rasle u komori za uzgoj biljaka na 24 °C u uvjetima dugog dana (16 h osvjetljenje, 8 h mrak) i intenziteta svjetla  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  uz konstantno miješanje na orbitalnoj miješalici. Kultura alge održavana je presađivanjem na svježju tekuću BBM podlogu svakih 14 dana kako bi se osigurao dovoljan broj stanica alge za eksperiment.

**Tablica 1.** Sastav BBM podloge (pH 6,6) korištene za uzgoj alge *Chlorella vulgaris*.

Sastojak	Koncentracija matične vodene otopine (g $L^{-1}$ )	Volumen koji treba dodati za 1 L podloge (mL)
NaNO <sub>3</sub>	25	10
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	2,5	10
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	7,5	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,5	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,5	10
NaCl	2,5	10
Otopina EDTA*	*	1
Otopina zakiseljenog željeza**	**	1
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	11,42	1
Otopina metala u tragovima***	***	1

**Tablica 2.** Detaljan sastav otopina EDTA, zakiseljenog željeza i metala u tragovima, korištenih za pripremu BBM podloge.

Sastojak	Količina koju treba dodati u 1 L dH <sub>2</sub> O	
Otopina EDTA*	EDTA	50 g
	KOH	31 g
Otopina zakiseljenog željeza**	FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	4,98 g
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (96 %)	1 mL
Otopina metala u tragovima***	ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	8,82 g
	MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	1,44 g
	MoO <sub>3</sub>	0,71 g
	CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	1,57 g
	CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,49 g

### 3.2.1.2. Praćenje rasta kulture alge *C. vulgaris*

Rast kulture alge *C. vulgaris* pratila sam brojanjem stanica pomoću automatiziranog brojača stanica (Luna II, Logos Biosystems) i brojanjem u Bürker-Türk-ovoj komorici pod svjetlosnim mikroskopom na povećanju od 40x u vremenu od 30 dana, svaki dan u isto vrijeme. Praćen je rast kontrolne skupine koja je rasla na podlozi s 1% (w/v) glukozom i bez glukoze. Za mjerenje pomoću automatiziranog brojača stanica iz šest replika nasađenih kultura izdvojila sam alikvot i pripremila razrjeđenja za brojanje tako da sam pomiješala 950  $\mu$ L destilirane vode s 50  $\mu$ L kulture alge. Pomoću automatske pipete stavila sam 12  $\mu$ L uzorka na predmetno stakalce s nosačem koji sam zatim umetnula u uređaj za brojanje stanica. U uređaju sam izabrala protokol za mjerenje u kojem sam odredila ključne parametre kao što su razrjeđenje i volumen koji je dodan na stakalce. Uređaj je izbrojao stanice i prikazao rezultat kao broj stanica u mL otopine. Za brojanje stanica pomoću Bürker-Türk-ove komorice iz pripremljenih razrjeđenja uzela sam 20  $\mu$ L i stavila u komoricu te brojala stanice pod svjetlosnim mikroskopom. Konačne rezultate izrazila sam umnoškom srednje vrijednosti broja izbrojanih stanica u komorici, razrjeđenja i vrijednosti  $10^4$ . Vrijednost  $10^4$  je volumen (u mL) kvadratnog polja unutar kojeg sam brojala stanica, pa se konačni broj množi s tom vrijednošću. Rast kulture algi pratila sam kako bih odredila početak i trajanje eksponencijalne faze rasta.

### 3.2.1.3. Spektrofotometrijsko određivanje stabilnosti AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> u hranjivoj podlozi

Stabilnost AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> u tekućoj hranjivoj podlozi određena je spektrofotometrijski metodom prema Peharec Štefanić i sur. (2018). Tekuća hranjiva BBM podloga bez glukoze i s dodatkom 1%-tne (w/v) glukoze pripremljen je prema Tablicama 1. i 2. i autoklavirana u čistim tikvicama u konačnom volumenu od 50 mL. Hranjiva podloga bez glukoze i s 1 %-tnom (w/v) glukozom prebačena je u sterilnim uvjetima u po dvije plastične uvele s dodatkom matične otopine AgNP-PVP (95,4 mg/L), tj. matične otopine AgNO<sub>3</sub> (10 mM), kako bi se postigla konačna koncentracija 1,5 mg/L. Otopine AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> koncentracije 1,5 mg/L u ultračistoj vodi, bez glukoze i s dodatkom glukoze, korištene su kao kontrola. Na otvor plastičnih uveta stavila sam parafilm kako se hranjiva podloga ne bi kontaminirala. U svakoj otopini izmjerena je apsorbancija u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm u vremenskim intervalima od 0, 1, 2, 5, 10, 20 i 30 minuta, te 1, 2, 3, 4, 5, 24 i 48 sati. Dobivene podatke analizirala sam u računalnom programu Microsoft Excel 2016 (iz paketa programa Microsoft Office Professional Plus 2016) i konačne rezultate prikazala kao grafove stabilnosti AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> koncentracije 1,5 mg/L u BBM podlozi.



### 3.2.3. Izlaganje kulture alge *C. vulgaris* otopinama AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> različitih koncentracija

Za tretman sam uzela stanice treći dan nakon nasađivanja na svježju BBM podlogu s i bez dodatka 1%-tne (w/v) glukoze u koncentraciji od  $1 \times 10^7$  stanica alga mL<sup>-1</sup> koju smo izračunali mjerenjem broja stanica u suspenziji. U 50 mL suspenzije stanica algi dodala sam odgovarajući volumen AgNP-PVP (matična otopina 95,4 mg/L) kako bi postigla konačne koncentracije 0,5, 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L. U ovom radu je, uz AgNP-PVP, korišteno i ionsko srebro u obliku srebrovog nitrata (AgNO<sub>3</sub>). Matičnu otopinu AgNO<sub>3</sub> molarne koncentracije 10 mM, pripremila sam u ultračistoj vodi i profiltrirala pomoću 0,45 µm filtra (Sartorius, Njemačka). Odgovarajući volumen matične otopine AgNO<sub>3</sub> sam dodala u 50 mL suspenzije stanica algi kako bi postigla konačne koncentracije 0,5, 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L. U kontrolnu suspenziju stanica nisu dodane AgNP-PVP ni AgNO<sub>3</sub>. Alge sam tretirala sveukupno 48 sati, pri čemu su bile u komori za uzgoj na istim uvjetima kao što je opisano u poglavlju 3.2.1.1., a učinak nanočestica i iona srebra u algama analizirala sam nakon 5., 24. i 48. sata od početka tretmana.

### 3.2.4. Određivanje vijabilnosti stanica primjenom fluorescentne boje propidij jodid

Vijabilnost stanica algi odredila sam primjenom fluorescentne boje propidij jodid (PI, engl. *propidium iodide*) pomoću fluorescencijskog mikroskopa. PI se koristi kao indikator vijabilnosti jer prilikom oštećenja stanica prodire kroz staničnu membranu i interkalira se u DNA stanice te posljedično stanice fluoresciraju crveno. Vijabilnost stanica algi analizirala sam u staničnim suspenzijama alge koje su rasle na podlozi bez glukoze i s 1 %-tnom (w/v) glukozom nakon 5, 24 i 48 sati tretmana s različitim koncentracijama AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub>. Stanične suspenzije prvo sam centrifugirala 5 minuta pri 1300 g. Dobiveni talog stanica resuspendirala sam u 3 mL ultračiste vode. Iz ovako resuspendiranih stanica odpipetirala sam 200 µL suspenzije te ih prebacila u mikroeprijetu. U mikroeprijetu sam dodala 2 µL radne otopine boje PI koncentracije 1 mg/mL i inkubirala 5 minuta pri sobnoj temperaturi u mraku. Nakon toga, 9 µL uzorka pipetom sam prenijela na predmetno stakalce i kratko osušila. Preparate sam promatrala fluorescencijskim mikroskopom *Olympus BX51*, fotografirala visokorezolucijskom kamerom *Olympus DP70* i fotografije pohranila za analizu. Uzorci su fotografirani pri povećanju objektiva od 60 puta i filteru 3 (ekscitacija zeleno svjetlo, emisija crveno svjetlo) pri ekspoziciji od 1,2 sekunde. Analizirala sam 100 nasumično odabranih stanica po predmetnom stakalcu i izbrojala nežive stanice kako bih izračunala postotak neživih stanica u odnosu na ukupan broj stanica algi.

### 3.2.5. Određivanje broja stanica algi u suspenziji

Broj stanica alge *C. vulgaris* u hranjivoj podlozi s dodatkom 1%-tne (w/v) glukoze i bez dodatka glukoze nakon 5, 24 i 48 sati tretmana s različitim koncentracijama AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub>, pratila sam brojanjem pomoću automatiziranog brojača stanica Luna II (poglavljje 3.2.1.2.).

### 3.2.6. Mjerenje pH vrijednosti suspenzije stanica alge

Promjenu pH vrijednosti u suspenziji alge *C. vulgaris* pratila sam mjerenjem iste pomoću pH-metra (Sartorius, Njemačka), kako bi utvrdila dolazi li do promjene pH vrijednosti nakon tretmana s različitim koncentracijama AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub>, te ima li razlike u pH vrijednosti suspenzije između algi uzgojenih na podlozi s dodatkom i bez dodatka glukoze. Prije mjerenja pH-metar bio je baždaren u dvije referentne točke. Izmjerala sam pH vrijednost u suspenziji alga koje su rasle na podlozi bez glukoze i s 1 %-tnom (w/v) glukozom nakon 5, 24 i 48 sati tretmana s različitim koncentracijama AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub>. Elektrodu pH-metra uronila sam u Falcon epruvetu s izdvojenim alikvotom od 3 mL iz svake suspenzije alga i pričekala da se pH vrijednost stabilizira. Kada se pH vrijednost na zaslonu više nije mijenjala, očitala sam je, a postupak ponovila s ostalim uzorcima.

### 3.2.7. Određivanje količine kisika i mjerenje stope fotosinteze u suspenziji stanica alge

Za mjerenje stope fotosinteze koristila sam uređaj Chlorolab 2 (Hansatech, UK) povezan s osobnim računalom. Prvo sam uključila vodenu kupelj i namjestila temperaturu na 30 °C (Vidaković-Cifrek i sur., 2017). Pokrenula sam program Oxylab 1.10. i namjestila brzinu miješanja reakcijske otopine na 30. Prije mjerenja potrebno je bilo kalibrirati elektrodu, tako da se oko 20 mL vode stavi u odmjernu tikvicu od 500 mL i uroni u vodenu kupelj na 5 minuta. Odčepljena tikvica se snažno protrese da bi se dobio uzorak zasićen kisikom. Napuni se reakcijska posuda s oko 1,5 mL vode zasićene kisikom i ugrijane na 30 °C. Uz pomoć termometra izmjeri se temperatura i podatak upiše u računalo tijekom postupka kalibracije. Pričeka se do 10 minuta da se signal mjerenja uzorka vode zasićene kisikom stabilizira i dobivena vrijednost predstavlja prvu točku kalibracije. U reakcijsku posudu doda se mala količina natrijeva ditionita koji iz vode uklanja sav otopljeni kisik i dobivena vrijednost predstavlja drugu točku kalibracije. Na temelju toga uređaj i program rade baždarni pravac i na taj način vrše kalibraciju uređaja. Kapalicom se isprazni reakcijska posuda i ispere četiri puta destiliranom vodom, a pažljivo se ispere i mali čep i poklopac reakcijske posude. Na kraju se u

reakcijsku posudu ponovno stavi deionizirana voda zasićena kisikom i izmjeri koncentracija kisika koja se uspoređi s referentnom vrijednošću. Osim toga, potrebno je napraviti i kalibraciju izvora svjetlosti tako da se upiše željeni protokol mjerenja u PFD (engl. *photon flux density*) tablicu i kalibrira izvor svjetlosti prema uputama samog programa koristeći nižu i višu točku intenziteta svjetlosti. Odabere se nekoliko intenziteta svjetlosti, npr. 50, 100, 150 i 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , kojima će se osvjetljivati suspenzija alge u vremenskim periodima od 10 minuta, a iza svakog perioda svjetla upiše se period tame (3 ili 5  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) kako bi se izmjerila i stopa staničnog disanja. U dijaloškom okviru programa gdje se nalazi PFD tablica i kalibriranje svjetla uključi se funkcija "Automatic". Nakon kalibracije, izvadila sam kapaljkom vodu iz reakcijske posude i stavila oko 1,5 mL suspenzije alge iz izdvojenog alikvota iz svake suspenzije alga. Uređaj je automatski mjerio količinu nastalog kisika pri intenzitetu svjetlosti 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  te u potpunom mraku. Iz dobivenih podataka, koji su predstavljali količinu oslobođenog kisika, izračunala sam vrijednosti za stope fotosinteze u sekundi koje sam konačno izrazila u  $\mu\text{mol}$  kisika oslobođenog fotosintezom po mililitru suspenzije u jednom satu [ $\mu\text{mol O}_2 \text{mL}^{-1} \text{h}^{-1}$ ].

### 3.2.8. Spektrofotometrijska analiza apsorpcijskih spektara klorofila *a* i *b* u suspenziji stanica alge

UV/VIS spektrofotometrom (Specord 50, Analytik Jena) izmjerila sam apsorbanciju suspenzije stanica algi koje su rasle na podlozi bez glukoze i s 1 %-tnom (*w/v*) glukozom nakon 5, 24 i 48 sati tretmana s različitim koncentracijama AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub>. Izdvojene alikvote od 1,5 do 2 mL iz svake suspenzije algi prebacila sam u kivetu te izmjerila apsorbanciju suspenzije u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm. Iz dobivenih apsorpcijskih spektara proučila sam karakteristične apsorpcijske spektre klorofila *a* i *b*. Uočeni pikovi na valnim duljinama od 420-450 nm i od 670-690 nm odgovaraju karakterističnim valnim duljinama za klorofil *a* i *b*.

### 3.2.9. Ekstrakcija ukupnih topivih proteina

Ukupne topive proteina ekstrahirala sam iz suspenzije stanica algi koje su rasle na podlozi bez glukoze i s 1 %-tnom glukozom nakon 5, 24 i 48 sati tretmana s različitim koncentracijama AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> kao i iz kontrolnih skupina stanica. Za pripremu proteinskih ekstrakata koristila sam po 50 ml suspenzije stanica, koje sam prvo centrifugirala 10 minuta na 1300 g pri 4 °C. Nakon centrifugiranja, uklonila sam supernatant i talog

resuspendirala u 700  $\mu$ l 0,1 M kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0). Stanice u tako dobivenoj suspenziji razbila sam pomoću uređaja za razbijanje stanica (*Constant Cell Disruption Systems*, UK) nakon dva uzastopna ponavljanja pri tlaku od 37 000 psi (2 500 bar). Homogenate sam zatim centrifugirala 15 minuta pri 20 854 g i 4 °C, nakon čega sam supernatant prebacila u čistu mikroeprijetu, te ponovno centrifugirala 45 minuta pri 20 854 g i 4 °C. Po završetku sam supernatant prebacila u novu čistu mikroeprijetu i uzorke pohranila na temperaturi od -20 °C za daljnje analize. Ekstrakti su korišteni za mjerenje ukupne koncentracije topivih proteina i za određivanje aktivnosti enzima katalaze, askorbat peroksidaze, pirogolol peroksidaze i superoksid dismutaze.

### 3.2.10. Određivanje koncentracije ukupnih topivih proteina

Koncentraciju ukupnih topivih proteina odredila sam metodom po Bradfordu (1976). Za izradu standardne krivulje koristila sam niz otopina albumina iz goveđeg seruma (BSA, engl. *bovine serum albumin*) u rasponu koncentracija od 0,2 do 2,0 mg mL<sup>-1</sup>. Za spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije proteina u uzorcima, u mikroeprijetu od 1,5 ml dodala sam 1 mL radne otopine po Bradfordu (2,58 %-tni (v/v) etanol, 5,28 %-tna (v/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> i 6 %-tna Bradford matična otopina koja se sastoji od 0,01 %-tnog Coomassie Brilliant Blue, 31,35 %-tnog (v/v) i 58,6 %-tne (v/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) i 20  $\mu$ L proteinskog ekstrakta, s time da sam svaki uzorak pripremila u dvije tehničke replike. Za slijepu probu sam umjesto proteinskog ekstrakta dodala 20  $\mu$ L 0,1 M kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0). Dobivenu smjesu kratko sam promiješala na vibracijskoj miješalici i inkubirala pet minuta na sobnoj temperaturi u mraku, nakon čega sam spektrofotometrijski izmjerila apsorbanciju uzoraka na valnoj duljini od 595 nm. Na isti način izmjerila sam i apsorbancije prethodno pripremljenih razrjeđenja BSA koje su korištene za izradu baždarnog pravca. Koncentraciju ukupnih topivih proteina izračunala sam iz vrijednosti apsorbancija, pomoću baždarne krivulje, te vrijednosti izrazila kao mg proteina po mL [mg/mL].

### 3.2.11. Određivanje stupnja lipidne peroksidacije

Za pripremu lipidnih ekstrakata koristila sam po 50 mL kultura kontrolnih skupina i onih izloženih određenoj koncentraciji AgNO<sub>3</sub> i AgNP-PVP, koje sam prvo centrifugirala 10 minuta na 1300 g pri 4 °C. Nakon centrifugiranja, uklonila sam supernatant i talog resuspendirala u 700  $\mu$ L ekstrakcijske smjese, koju je sačinjavala 0,4 %-tna (w/v) tiobarbituratna kiselina (TBA, engl. *tiobarbituric acid*) u 10 %-tnoj (w/v) trikloroacetičnoj kiselini (TCA, engl. *trichloroacetic acid*). Stanice u tako dobivenoj suspenziji razbila sam pomoću

uređaja za razbijanje stanica nakon dva uzastopna ponavljanja pri tlaku od 37 000 psi (2 500 bar). Dobivene ekstrakte zagrijavala sam u termomikseru na temperaturi od 95 °C 30 minuta u otvorenim mikroeprevetama jer smjesa vrije. Nakon toga, mikroeprevete s ekstraktima prebacila sam u led nekoliko minuta kako bi se ohladile, a reakcija zaustavila. Nakon hlađenja uzorke sam centrifugirala 30 minuta na 20 854 g pri 4 °C. Supernatant sam prebacila u kivete i spektrofotometrijski izmjerila apsorbancije na valnim duljinama od 532 nm i 600 nm. Od vrijednosti apsorbancije očitane na 532 nm oduzela sam vrijednost očitane na 600 nm kako bih napravila korekciju za nespecifično zamućenje. Stupanj lipidne peroksidacije izrazila sam kao sadržaj MDA u nmol produkta po broju stanica [ $\text{nmol}_{\text{produkta}}/\text{broj stanica}$ ], prema formuli:

$$\text{sadržaj MDA} = \frac{A_{532} - A_{600}}{\varepsilon \cdot l \cdot n}$$

gdje  $A_{532}$  i  $A_{600}$  označavaju apsorbancije izmjerene na valnoj duljini od 532 i 600 nm,  $\varepsilon$  je ekstinkcijski koeficijent, koji iznosi  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $l$  je duljina puta zrake svjetlosti kroz kivetu i  $n$  je broj stanica algi u suspenziji. Konačni rezultati izraženi su kao postotak od kontrole, pri čemu je kontrola predstavljala 100 %.

### 3.2.12. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima

#### 3.2.12.1. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost CAT mjerila sam spektrofotometrijski prema Aebi (1984). Pripremila sam reakcijsku smjesu tako da sam u 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0) dodala 51  $\mu\text{L}$  30 %-tne otopine  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Za mjerenje uzoraka, u kivetu sam dodala 950  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese i 50  $\mu\text{L}$  proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.2.9.), dok sam za slijepu probu dodala 50  $\mu\text{L}$  50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0) umjesto ekstrakta. Aktivnost CAT mjerila sam na valnoj duljini od 240 nm svakih deset sekundi tijekom dviju minuta. Iz promjene apsorbancije po minuti i ekstinkcijskog koeficijenta za  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\varepsilon = 40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), te sadržaja proteina u ekstraktu, izračunala sam aktivnost CAT i izrazila je kao  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  po min po mg proteina [ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot.}}^{-1}$ ].

#### 3.2.12.2. Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze

Aktivnost APX odredila sam spektrofotometrijski prema metodi Nakano i Asada (1981). Reakcijska smjesa sastojala se od 800  $\mu\text{L}$  50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0) s 0,1 mM EDTA, 180  $\mu\text{L}$  proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.2.9.), 10  $\mu\text{L}$  10 mM askorbinske kiseline i 10  $\mu\text{L}$  12 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Slijepa proba je umjesto proteinskog ekstrakta sadržavala 0,1 M kalij-

fosfatni pufer (pH 7,0). Uzorcima sam izmjerila apsorbanciju na valnoj duljini od 290 nm svaku sekundu tijekom 15 sekundi. Aktivnost APX izračunala sam iz promjene apsorbancije po minuti i ekstinkcijskog koeficijenta za askorbinsku kiselinu ( $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), a konačnu aktivnost izrazila sam u  $\mu\text{mol}$  produkta po minuti po mg proteina [ $\mu\text{mol}_{\text{produkta}} \text{ min}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot.}}^{-1}$ ].

### 3.2.12.3. Određivanje aktivnosti pirogalol peroksidaze

Aktivnost PPX odredila sam spektrofotometrijski prema metodi Nakano i Asada (1981). Pripremila sam reakcijsku smjesu tako da sam u 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0) otopila 0,126 g pirogalola i neposredno prije korištenja dodala 5,5  $\mu\text{L}$  30 %-tne otopine  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Reakcijsku smjesu zamotala sam u aluminijsku foliju zbog osjetljivosti na svjetlost. Za mjerenje uzoraka u kivetu sam dodala 980  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese i 20  $\mu\text{L}$  proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.2.9.), dok sam za slijepu probu dodala 20  $\mu\text{L}$  0,1 M kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0) umjesto ekstrakta. Uzorcima sam izmjerila apsorbanciju na valnoj duljini od 430 nm svakih 15 sekundi tijekom 1 minute. Aktivnost PPX izračunala sam iz promjene apsorbancije po minuti i ekstinkcijskog koeficijenta za purpurogalin ( $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), a konačnu aktivnost izrazila sam u  $\mu\text{mol}$  produkta po minuti po mg proteina [ $\mu\text{mol}_{\text{produkta}} \text{ min}^{-1} \text{ mg}_{\text{prot.}}^{-1}$ ].

### 3.2.12.4. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost SOD odredila sam spektrofotometrijski prema metodi Beauchamp i Fridovich (1971). Reakcijska smjesa sadržavala je 50 mM kalij-fosfatni pufer (pH 7,8), 13 mM metionin, 75  $\mu\text{M}$  NBT i 0,1 M EDTA. Pripremila sam 1 mM riboflavin, koji sam dodavala u reakcijsku smjesu neposredno prije spektrofotometrijskog mjerenja. Slijepa proba sadržavala je 800  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese, 195  $\mu\text{L}$  50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,8) i 5  $\mu\text{L}$  1 mM riboflavina. Prvo sam odredila maksimalnu brzinu redukcije NBT-a u NBT-diformazan tako da sam pripremila šest replika otopina koje su sadržavala 800  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese, 195  $\mu\text{L}$  50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,8) i 5  $\mu\text{L}$  1,0 mM riboflavina. Otopine sam izložila osam minuta djelovanju fluorescentnih svjetiljki (Philips TL-D 18W/54-765) i izmjerila apsorbanciju. Očekivana vrijednost apsorbancije je oko 0,5 što sam uzela u obzir prilikom prilagođavanja volumena i koncentracije sastojaka reakcijske smjese. Za mjerenje uzoraka u kivetu sam dodala 800  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese, 175  $\mu\text{L}$  50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,8), 20  $\mu\text{L}$  proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.2.9.) i 5  $\mu\text{L}$  1,0 mM riboflavina. Sadržaj sam promiješala okretanjem kivete i izložila osam minuta djelovanju svjetlosti, nakon čega sam mjerila apsorbanciju uzoraka na valnoj duljini od 560 nm. Također, izradila sam standardnu krivulju sa standardom

enzima SOD (Sigma). Priredila sam seriju razrjeđenja 0,01, 0,025, 0,05, 0,08, 0,1, 0,2 i 0,5 U iz matične otopine enzima (U – jedinica aktivnosti enzima, od engl. *unit*). U ovoj metodi 1 U označava 50 %-tnu inhibiciju reakcije redukcije NBT-a u NBT-diformazan. Apsorbanciju razrjeđenja izmjerila sam na isti način kao i apsorbanciju uzoraka, tj. umjesto ekstrakta dodala sam pojedino razrjeđenje otopine standarda. Iz dobivene standardne krivulje odredila sam aktivnost SOD za pojedini uzorak, a konačnu aktivnost izrazila sam u jedinicama aktivnosti enzima po mg proteina [U/mg<sub>prot</sub>].

### 3.2.13. Transmisijska elektronska mikroskopija

#### 3.2.13.1. Vizualizacija AgNP-PVP u matičnoj otopini

Dva mikrolitra matične otopine AgNP-PVP nakapala sam na bakrenu mrežicu presvučenu folijom Formvar te naparenu ugljikom. Nakon što se uzorak osušio analizirala sam ga transmisijskim elektronskim mikroskopom (Morgagni 268D, FEI, Nizozemska) pri 70 kV.

#### 3.2.13.2. Vizualizacija alge u nativnim uvjetima

Za vizualizaciju alge u nativnim uvjetima upotrijebila sam TEM (Morgagni 268D, FEI, Nizozemska). Metodu sam koristila kako bih mogla lokalizirati izvanstanične polimerne tvari (EPS). Uzela sam 50 mL stanične suspenzije alge u tikvicama nakon 5 i 24 sata tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> u koncentraciji 1,5 mg/L i centrifugirala 5 minuta na 1300 g. Po isteku tog vremena, supernatant sam odlila i dodala 30 mL ultračiste vode za ispiranje te ponovno centrifugirala na isti način. Postupak ispiranja s ultračistom vodom ponovila sam još dva puta. Na kraju, dobiveni talog stanica resuspendirala sam u 1 mL ultračiste vode za alge koje su rasle na podlozi s glukozom, odnosno u 0,5 mL ultračiste vode za alge koje su rasle na podlozi bez glukoze. Po kapljicu suspenzije za različite tretmane stavila sam na parafilm i u svaku uronila bakrenu mrežicu presvučenu Formvarom i naparenu ugljikom te inkubirala 10 minuta. Po isteku inkubacije, uzorke sam analizirala na TEM-u pri 70 kV. Osim toga, TEM sam koristila kako bih u ovako pripremljenim uzorcima lokalizirala AgNP-PVP i novonastale AgNP dobivene interakcijama AgNO<sub>3</sub> s hranjivom podlogom i kako bih utvrdila hoće li se i koja količina AgNP „zarobiti“ u omotaču EPS.

#### 3.2.13.3. Analiza promjena ultrastrukture stanica alge

Ultrastrukturne promjene analizirala sam u algi *C. vulgaris* koja je rasla na podlozi bez glukoze i s 1 %-tnom (w/v) glukozom nakon 5 i 24 sata tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub>

koncentracije 1,5 mg/L. Uzorke sam pripremila prema modificiranom protokolu opisanom u Peharec Štefanić i sur. (2013). Iz tikvica s kulturom stanica prebacila sam po 50 mL suspenzije u Falcon epruvete i centrifugirala 5 minuta na 1300 g. Po završetku centrifugiranja supernatant sam odlila, a na talog stanica dodala sam 200  $\mu$ L otopine 2%-tnog glutaraldehida u 0,5 M radne otopine kakodilatnog pufera (pH 7) za fiksaciju i resuspendirala. Radnu otopinu kakodilatnog pufera pripremila sam otapanjem 4,28 g natrijevog kakodilata ( $C_2H_6AsNaO_2$ ) u 100 mL destilirane vode, čime sam pripravila 2 M matičnu otopinu. Zatim sam razrjeđivanjem matične otopine na 0,5 M pomoću destilirane vode dobila radnu otopinu kakodilatnog pufera koju sam koristila za fiksaciju, ispiranje i postfiksaciju. Na predmetno stakalce nanijela sam ohlađenu (ali neskrutnutu) 1,5 %-tnu (*w/v*) agarozu i u nju injektirala suspenziju fiksiranih stanica alge i ostavila da se agarozna skruti. Narezala sam sitne komadiće agaroze s uklopljenim stanicama i stavila ih u mikroeprovete s pripremljenim fiksativom u trajanju od 60 minuta na ledu (+4 °C). Po isteku tog vremena, promiješala sam sadržaj u mikroeproveta, izbacila fiksativ i stavila po 2 mL radne otopine kakodilatnog pufera, te isprala uzroke dva puta po 10 minuta. Nakon ispiranja, uzorke sam postfiksirala u 1 mL 1 %-tne (*w/v*) otopine osmijeva tetroksida u 0,5 M radne otopine kakodilatnog pufera u trajanju od 60 minuta na temperaturi +4 °C. Po isteku tog vremena, izlila sam osmijev tetroksid i uzorke isprala destiliranom vodom u trajanju od 10 minuta pri +4 °C. Nakon ispiranja, uzorke sam dehidrirala u seriji etanola rastućih koncentracija pri sobnoj temperaturi. Svaki uzorak uronila sam u otopinu etanola i inkubirala 10 minuta redom u 50 %, 60 %, 70 %, 80 % i 96 %-tnom etanolu, te sam ih na kraju prebacila u 100 %-tni etanol i inkubirala preko noći na +4 °C. Sutradan, uzorke sam inkubirala prvo u 1:1 smjesi 100 %-tnog etanola i acetona u trajanju 30 minuta, zatim u čistom acetonu u trajanju 30 minuta. Nakon toga uzorke sam postupno uklopila u epoksidnu smolu, tako da sam ih prvo inkubirala u smjesi 1/3 Spurrove epoksidne smole i 2/3 acetona (1:2) u trajanju 30 minuta, zatim u 1:1 smjesi smole i acetona u trajanju 30 minuta, i naposljetku u smjesi 2/3 smole i 1/3 acetona (2:1) u trajanju 30 minuta. Konačno, uzorke sam stavila u čistu smolu, tako da sam napunila do pola volumena mikroeprovete i inkubirala ih 2 sata u pećnici na 42 °C. U kalupe za uklapanje uzoraka, uz identifikacijske oznake na papirićima, stavila sam komadiće uzoraka i prekrila ih čistom Spurrovom smolom. Uklonila sam nastale mjehuriće, izravnala površinu uklopina i inkubirala uzorke u kalupima na temperaturi od 65 °C u trajanju od 48 sati, kako bi smola polimerizirala. Nakon što je smola polimerizirala, pripremila sam ultratanke prereze debljine 70 nm pomoću ultramikrotoma (Ultracut R, Leica, Njemačka). Prereze sam prebacila na bakrenu mrežicu presvučenu Formvarom i naparenu ugljikom, te analizirala na TEM-u (Morgagni 268D, FEI, Nizozemska) pri 70 kV. Cilj ove metode bio je vidjeti postoje li



promjene u ultrastrukturi stanica algi nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> i utvrditi razlike nakon uzgoja na podlozi s i bez dodatka glukoze.

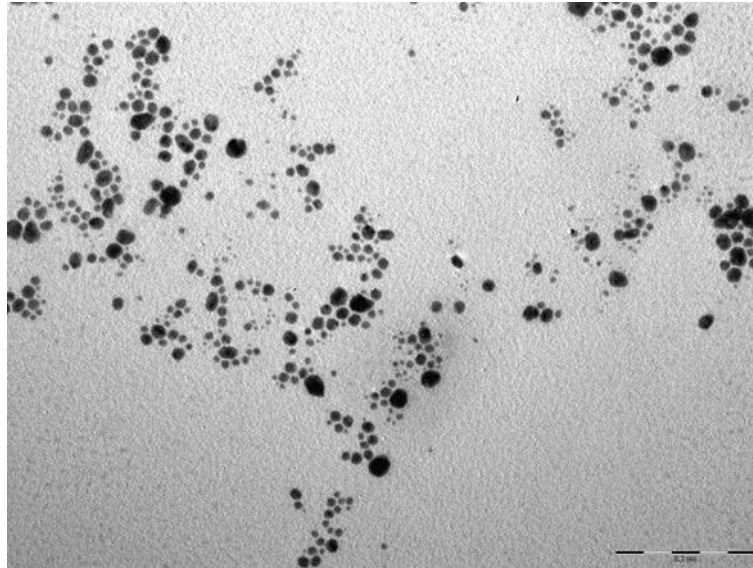
### 3.3. Statistička obrada podataka

Brojčane podatke obradila sam računalnim programom Microsoft Excel 2016 (iz paketa programa Microsoft Office Professional Plus 2016), pri čemu sam konačne rezultate prikazala kao srednje vrijednosti šest bioloških replika iz dva nezavisna biološka eksperimenta, a odstupanje od srednje vrijednosti izrazila kao standardnu pogrešku. Podatke sam statistički obradila računalnim programom Statistica 13 (TIBCO Software Inc., SAD). Provela sam jednosmjernu analizu varijance (*one-way* ANOVA), nakon čega sam provela Newman-Keuls test s ciljem određivanja značajnosti razlika između kontrolnih i tretiranih skupina alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze i bez glukoze. Statistički značajnima smatrala sam samo one rezultate gdje sam dobila razinu značajnosti manju ili jednaku 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Vizualizacija AgNP-PVP u matičnoj otopini

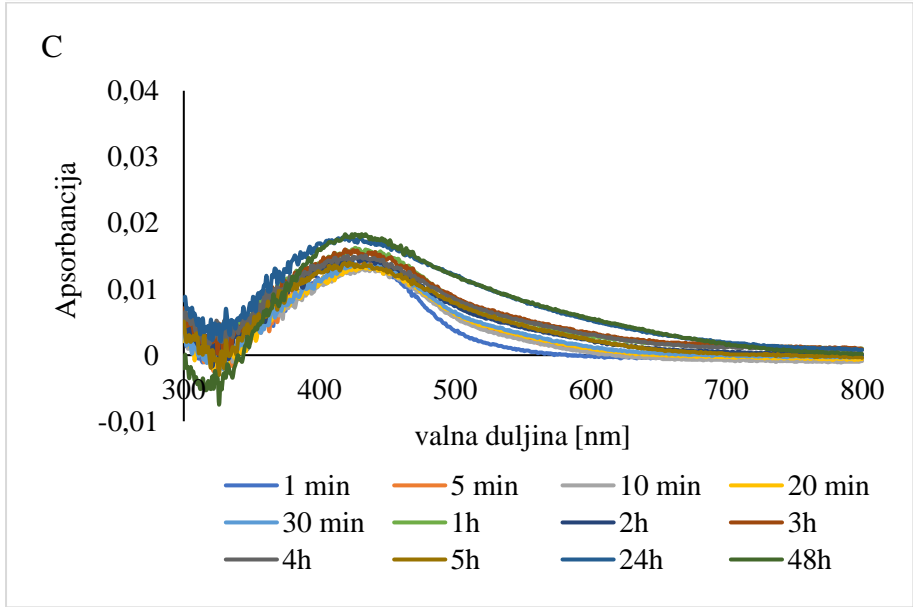
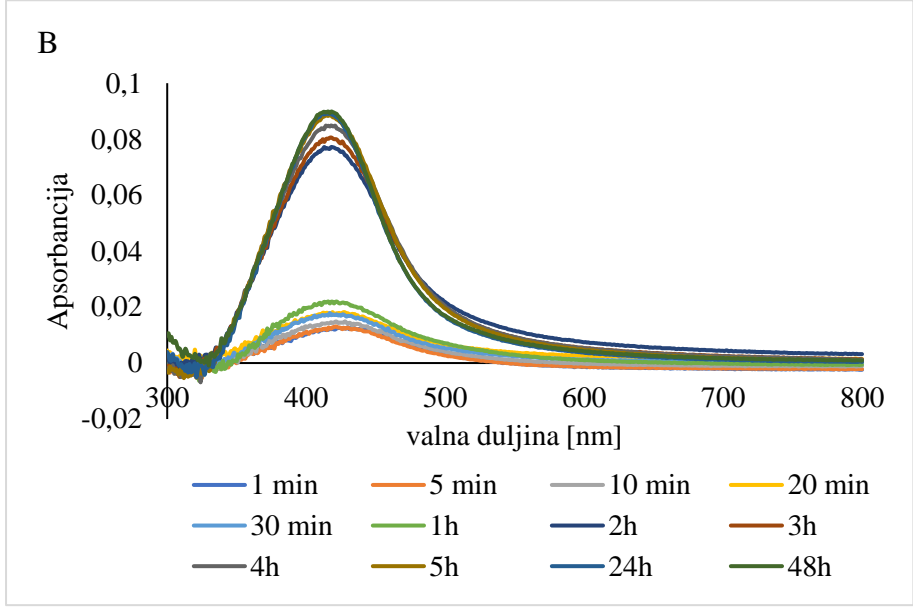
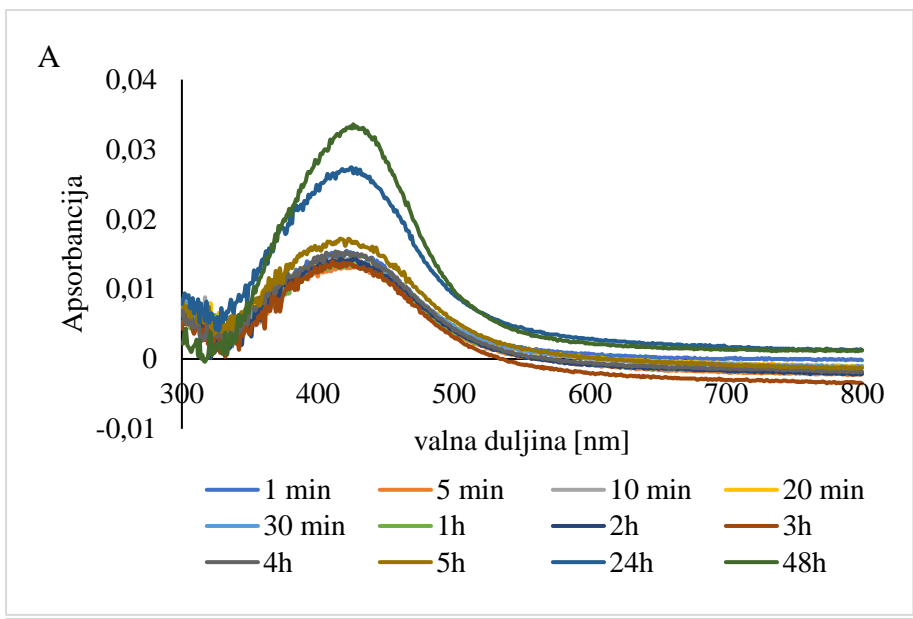
Nanočestice srebra korištene u ovom eksperimentu su sfernog oblika i prosječne veličine od 50 nm, što se vidi na TEM snimkama (Slika 1) dobivenim pomoću transmisijskog elektronskog mikroskopa (Morgagni 268D, FEI, Nizozemska). Pojavljuju se pojedinačno ili u nakupinama.

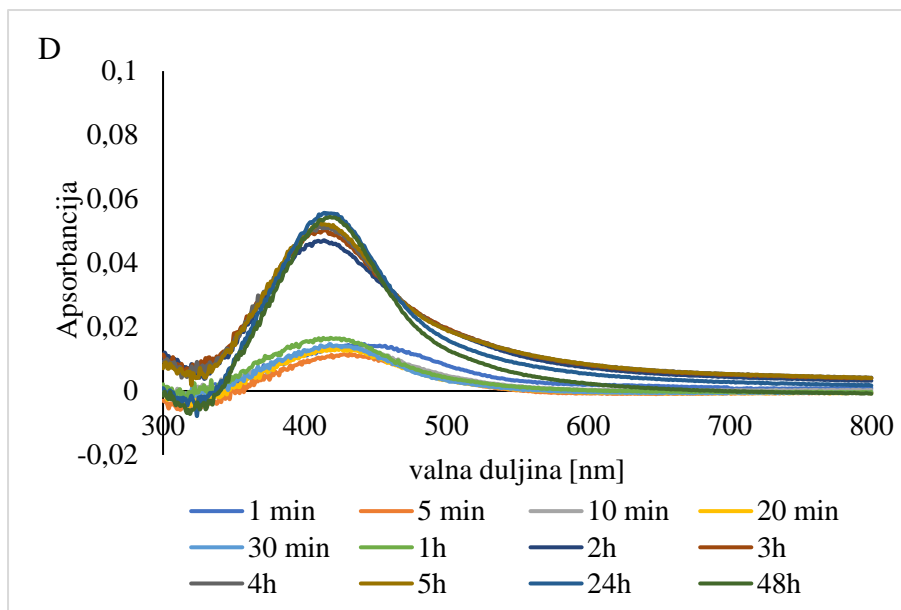


Slika 1. Mikrofotografija matične otopine nanočestica srebra stabiliziranih pomoću polimera polivinilpirolidona (PVP) snimljena transmisijским elektronskim mikroskopom. Skala na slici je veličine 0,2  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2. Stabilnost AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> u hranjivoj podlozi

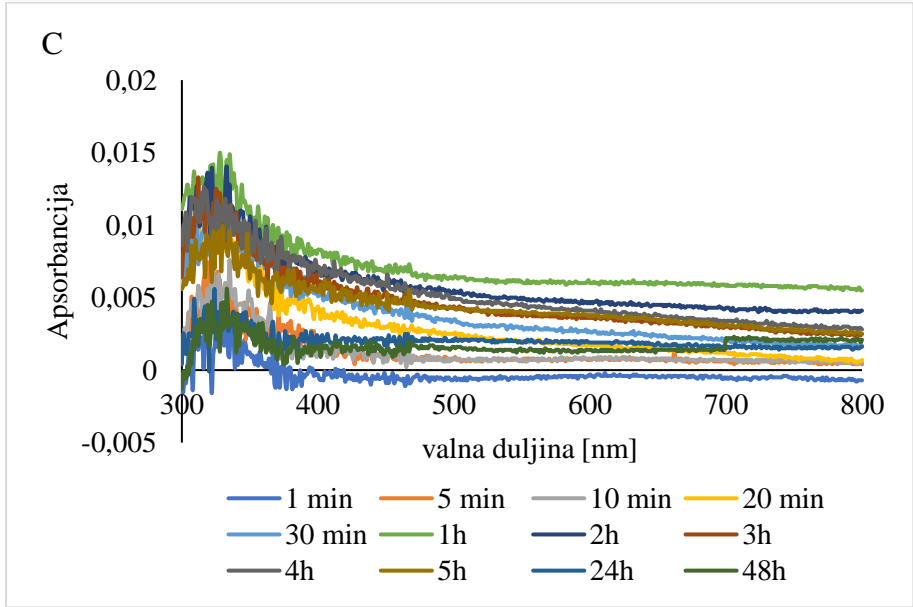
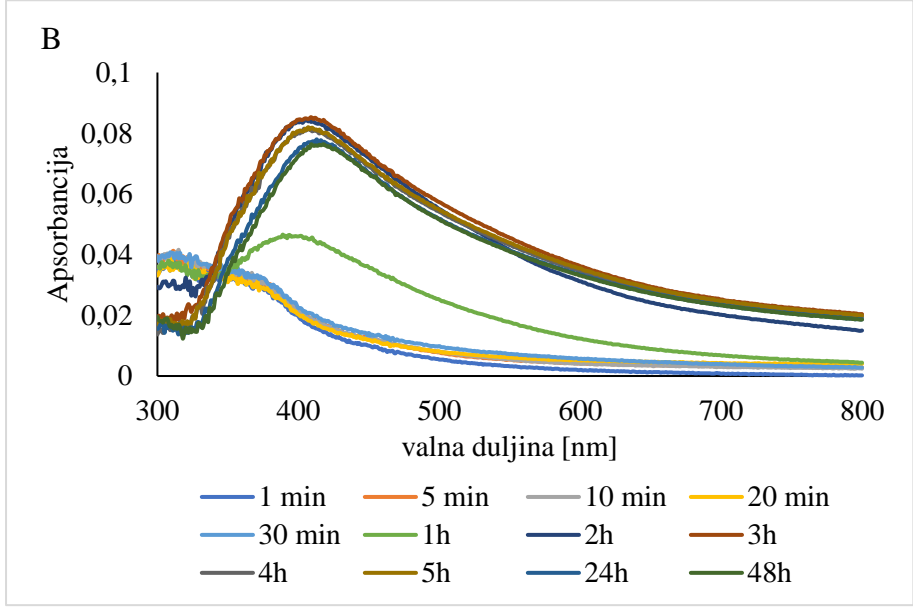
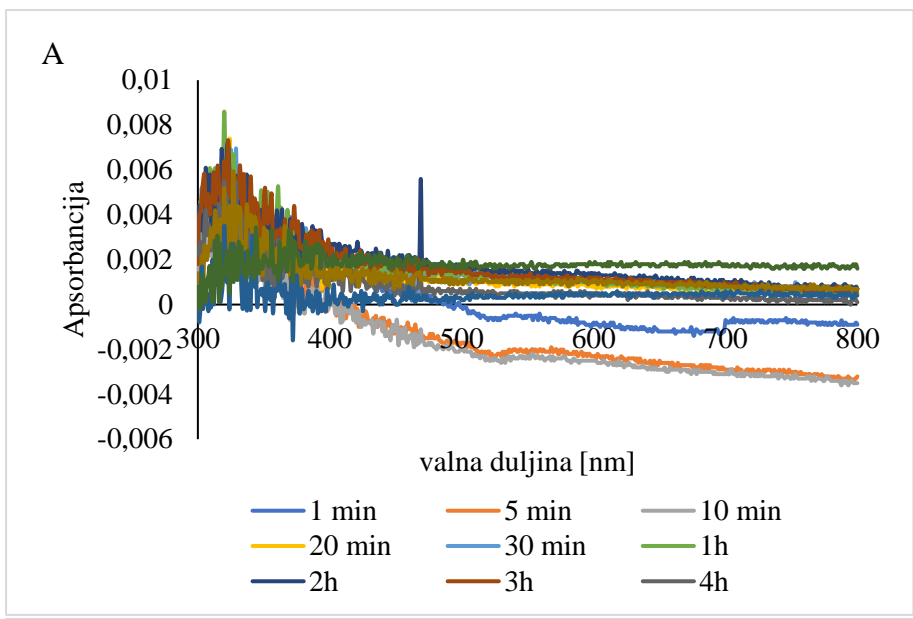
Apsorpcijski spektri kontrolne otopine ultračiste vode i otopine BBM podloge s AgNP-PVP koncentracije 1,5 mg/L prikazani su na Slici 2. Apsorpcijski spektar AgNP-PVP koncentracije 1,5 mg/L u kontrolnoj otopini ultračiste vode s dodatkom glukoze pokazao je maksimum intenziteta apsorpcije (pik) na valnoj duljini oko 420 nm. Od prve minute do drugog dana zabilježila sam porast apsorpcije u otopini, s time da se značajniji porast dogodio nakon 5 sati (Slika 2A). Apsorpcijski spektar AgNP-PVP koncentracije 1,5 mg/L u BBM podlozi s dodatkom glukoze također je pokazao pik na 420 nm, a apsorpcija otopine kontinuirano raste, s time da se značajniji porast apsorpcije dogodio već nakon drugog sata (Slika 2B). U kontrolnoj otopini ultračiste vode bez dodatka glukoze apsorpcijski spektar AgNP-PVP koncentracije 1,5 mg/L pokazuje pik na 420 nm, a apsorpcija se ne mijenja značajno kroz vrijeme (Slika 2C). Apsorpcijski spektar AgNP-PVP koncentracije 1,5 mg/L u BBM podlozi bez dodatka glukoze također pokazuje pik na 420 nm i apsorpcija otopine kontinuirano raste, s najvećim porastom nakon dva sata (Slika 2D), jednako kao i u BBM podlozi s dodatkom glukoze. Usporedbom stabilnosti AgNP-PVP koncentracije 1,5 mg/L u navedenim otopinama, uočila sam kako AgNP-PVP u BBM podlozi s dodatkom glukoze ima veću apsorpciju na 420 nm od AgNP-PVP u BBM podlozi bez dodatka glukoze.

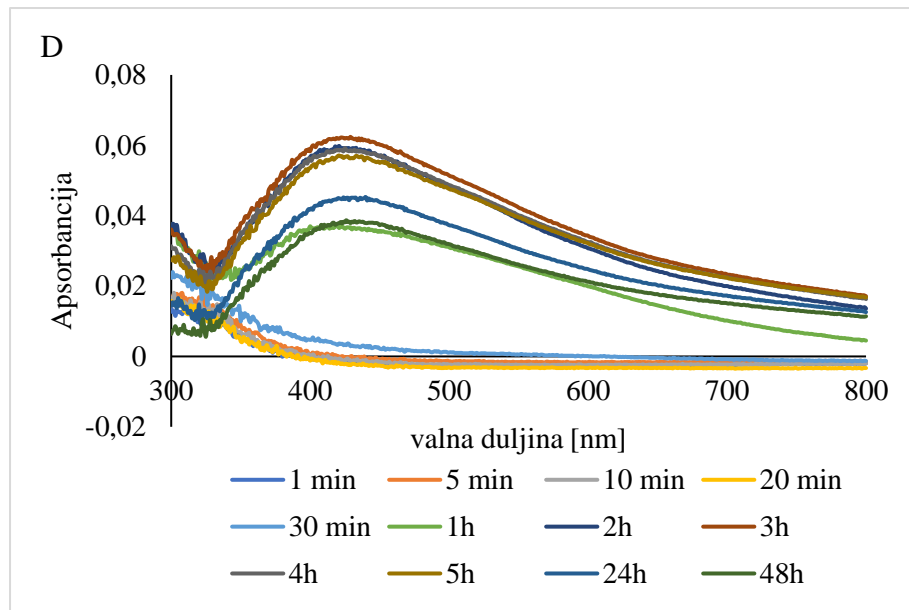




Slika 2. Apsorpcijski spektri AgNP-PVP koncentracije 1,5 mg/L u A) ultračistoj vodi s dodatkom 1 %-tne glukoze, B) BBM podlozi s dodatkom 1 %-tne glukoze, C) ultračistoj vodi bez dodatka glukoze i D) BBM podlozi bez dodatka glukoze. Spektri su dobiveni mjerenjem apsorbancije uzoraka u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm u vremenskim intervalima od 0, 1, 5, 10, 20 i 30 minuta te 1, 2, 3, 4, 5, 24 i 48 sati.

Apsorpcijski spektri kontrolne otopine ultračiste vode i otopine BBM podloge s  $\text{AgNO}_3$  koncentracije 1,5 mg/L prikazani su na Slici 3. Apsorpcijski spektar  $\text{AgNO}_3$  koncentracije 1,5 mg/L u kontrolnoj otopini ultračiste vode s dodatkom glukoze pokazuje maksimum intenziteta apsorbancije (pik) na valnoj duljini oko 320 nm, a apsorbancija otopine nije se značajno mijenjao kroz vrijeme (Slika 3A). Apsorpcijski spektar  $\text{AgNO}_3$  u BBM podlozi s dodatkom glukoze pokazuje pik na oko 420 nm tek nakon 1 sata. Intenzitet apsorbancije ovog maksimuma postupno se povećava do 4 sata i nakon toga počinje opadati te se stabilizira nakon 24 sata (Slika 3B). U kontrolnoj otopini ultračiste vode bez dodatka glukoze apsorpcijski spektar  $\text{AgNO}_3$  koncentracije 1,5 mg/L ima pik pri 320 nm, a apsorbancija se ne mijenja značajno kroz vrijeme (Slika 3C). Apsorpcijski spektar  $\text{AgNO}_3$  u BBM podlozi bez dodatka glukoze pokazuje da je pik na 420 nm nastao nakon 1 sata mjerenja. Vrijednost apsorbancije maksimuma rasla je do 3 sata, a zatim se stabilizirala do 5 sati. Mjerenjem apsorbancije otopine nakon 24 i 48 sati vidljivo je da apsorbancija opada s vremenom. Nakon 48 sati vrijednost apsorbancije je bila slična vrijednosti koja je izmjerena nakon 1 sata (Slika 3D). Usporedbom stabilnosti  $\text{AgNO}_3$  koncentracije 1,5 mg/L u navedenim otopinama, mogu uočiti kako  $\text{AgNO}_3$  u BBM podlozi s dodatkom glukoze ima veću apsorbanciju na 420 nm od  $\text{AgNO}_3$  u BBM podlozi bez dodatka glukoze.



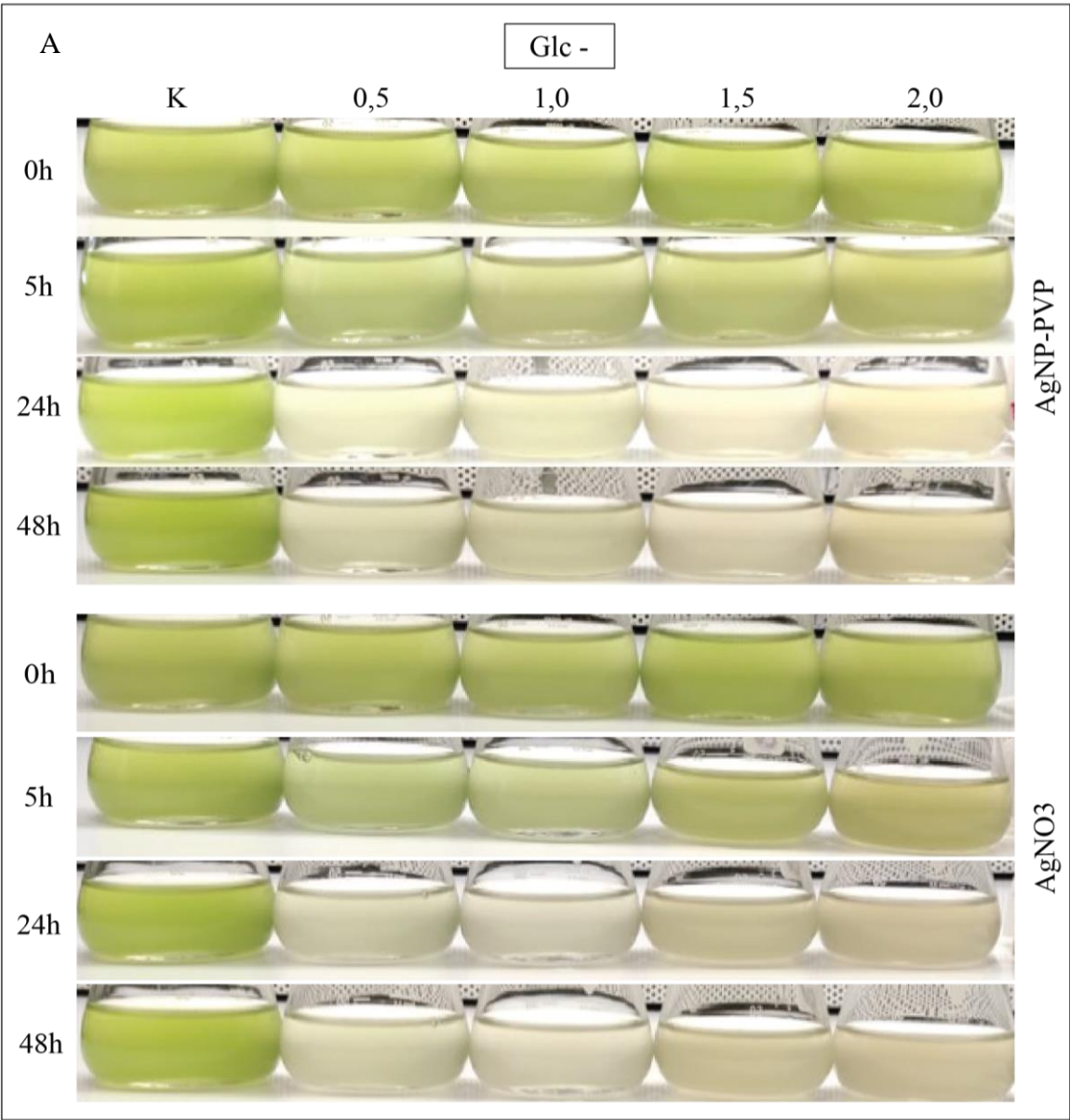


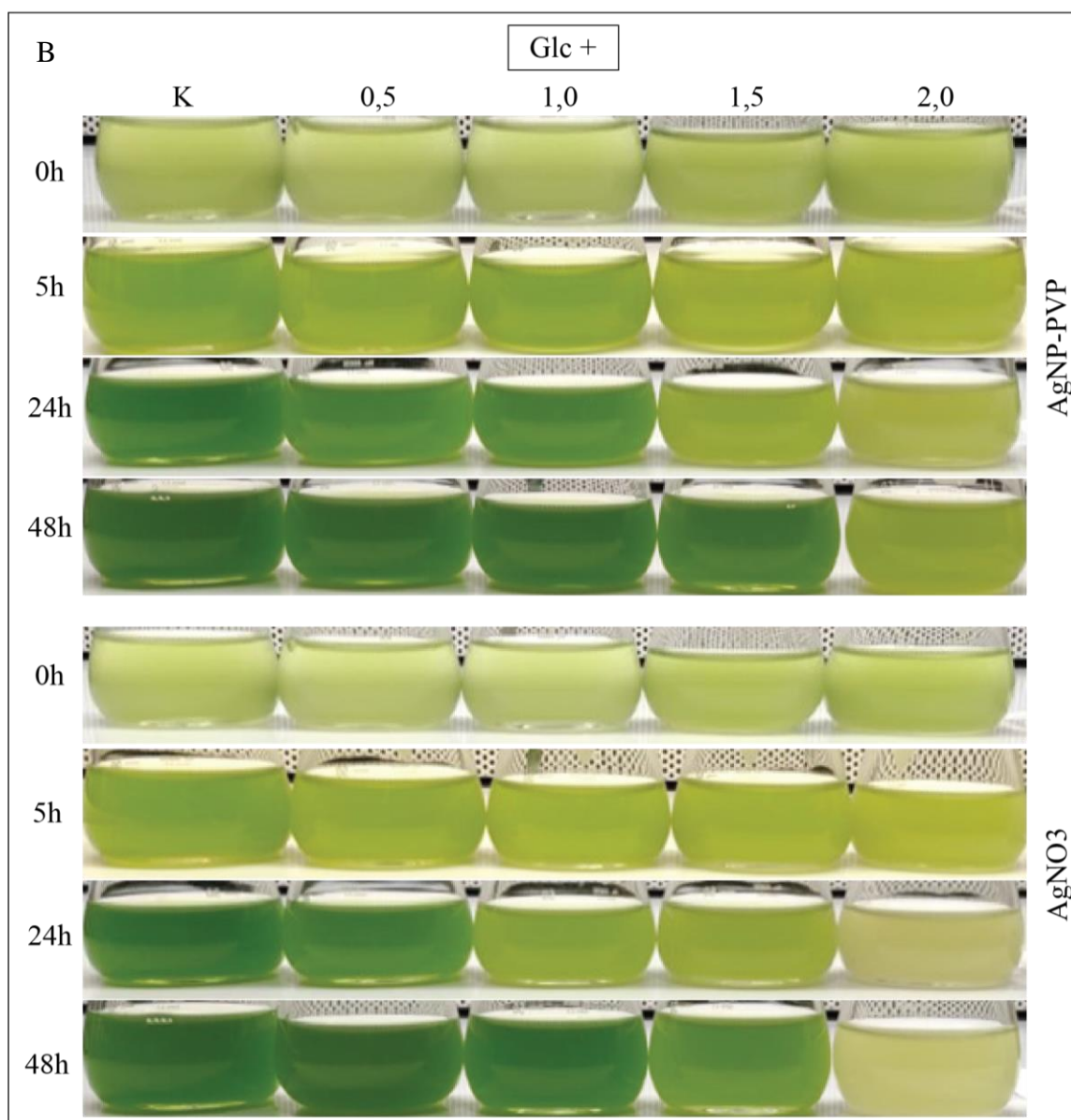
Slika 3. Apsorpcijski spektri AgNO<sub>3</sub> koncentracije 1,5 mg/L u A) ultračistoj vodi s dodatkom 1 %-tne glukoze, B) BBM podlozi s dodatkom 1 %-tne glukoze, C) ultračistoj vodi bez dodatka glukoze i D) BBM podlozi bez dodatka glukoze. Spektri su dobiveni mjerenjem apsorbancije uzoraka u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm u vremenskim intervalima od 0, 1, 5, 10, 20 i 30 minuta te 1, 2, 3, 4, 5, 24 i 48 sati.

#### 4.3. Izgled kultura alge *C. vulgaris* nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub>

Tretman s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> koncentracija 0,5, 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L doveo je do promjena u izgledu kultura alge *C. vulgaris* (Slika 4). Na početku eksperimenta, prije samog dodavanja AgNP i AgNO<sub>3</sub>, sve su kulture alga bile ujednačene svijetlo-zelene boje, i one uzgojene na podlozi s dodatkom glukoze i bez dodatka glukoze. Kontrolne skupine kultura alga uzgojenih na podlozi bez dodatka glukoze bile su svijetlo-zelene boje, a učinak tretmana kod njih je puno izraženiji nego u kulturama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze. Već nakon 5 sati tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> u ovim kulturama primijećen je početak kloroze stanica koji se manifestira promjenom boje kulture iz svijetlo-zelene u svijetlo-žutu boju, dok je nakon 24 i 48 sati s oba tretmana došlo do potpune kloroze stanica, a boja kulture se mijenja do svijetlo-smeđe (Slika 4A). Kontrolne skupine kultura alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze su postepeno u vremenu od 5, 24 i 48 sati poprimala sve tamniju zelenu boju, dok su kontrolne skupine alga uzgojenih na podlozi bez glukoze ostale svijetlo-zelene boje i nakon 48 sati. U kulturama alga uzgojenih u podlozi s dodatkom glukoze s porastom primijenjenih koncentracija AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub>, vidljiva je postepena promjena boje kulture iz zelene preko svijetlo-zelene do svijetlo-žute boje. Najjača promjena boje kulture iz žute u svijetlo-žutu boju, gdje je došlo do značajne kloroze stanica algi (Slika 4B), vidljiva je nakon 24 i 48 sati tretmana s 2,0 mg/L AgNO<sub>3</sub>.



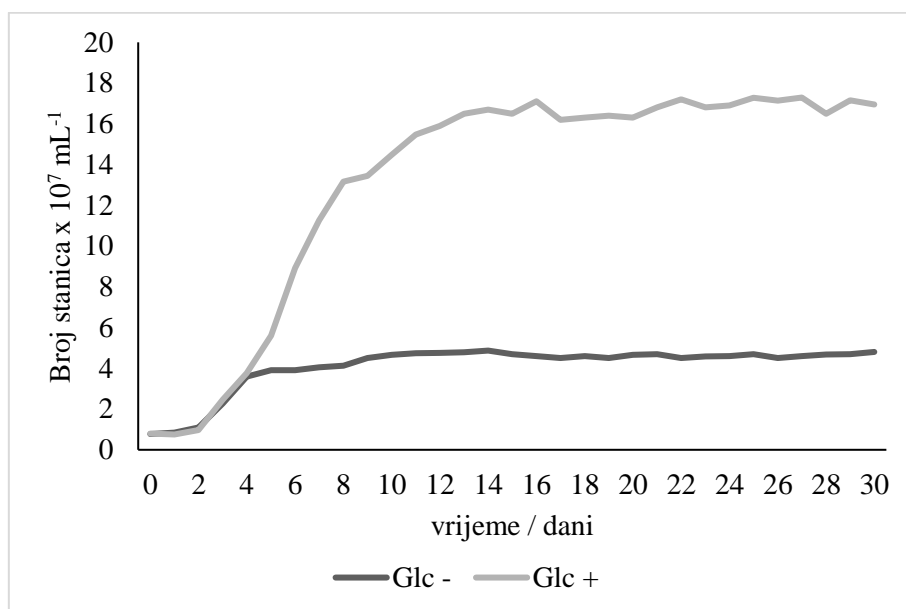




Slika 4. Izgled kultura stanica alge *C. vulgaris* nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> koncentracija 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 mg/L. Prikazani su rezultati kontrolnih skupina alge (K) i rezultati dobiveni nakon 5, 24 i 48 sati tretmana. A) Kultura alga uzgojenih na podlozi bez dodatka 1 %-tne glukoze, B) Kultura alga uzgojenih na podlozi s dodatkom 1 %-tne glukoze.

#### 4.4. Krivulja rasta alge *C. vulgaris* i broj stanica nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub>

Krivulja rasta kulture alge *C. vulgaris* uzgojene na podlozi s i bez dodatka glukoze praćena brojanjem kontrolnih stanica pokazuje jasno povećanje broja stanica u kulturi kroz period od 30 dana (Slika 5). Vrijednosti dobivene mjerenjem broja stanica putem automatiziranog brojača stanica bile su sukladne rezultatima dobivenim brojanjem stanica u Bürker-Türk-ovoj komorici, stoga je prikazan rezultat dobiven brojanjem putem automatiziranog brojača. Eksponencijalni rast kulture počinje drugog dana i za alge uzgajane na podlozi s dodatkom 1 %-tne (w/v) glukoze (Glc +) nastavlja se do otprilike 14. dana kada kultura ulazi u stacionarnu fazu i broj stanica u suspenziji se drastično ne mijenja. Alge uzgajane na podlozi bez dodatka glukoze (Glc -) ulaze u stacionarnu fazu oko 4. dana i njihov broj ne mijenja se drastično do kraja mjerenja.



Slika 5. Krivulja rasta kulture alge *C. vulgaris* praćena brojanjem stanica pomoću automatiziranog brojača stanica kroz 30 dana. Broj za svaki dan predstavlja srednju vrijednost broja stanica dobivenih od pet replika nasađenih kultura algi. Prikazane su vrijednosti za alge uzgojene na podlozi bez dodatka glukoze (Glc -) i podlozi s dodatkom 1 %-tne glukoze (Glc +).

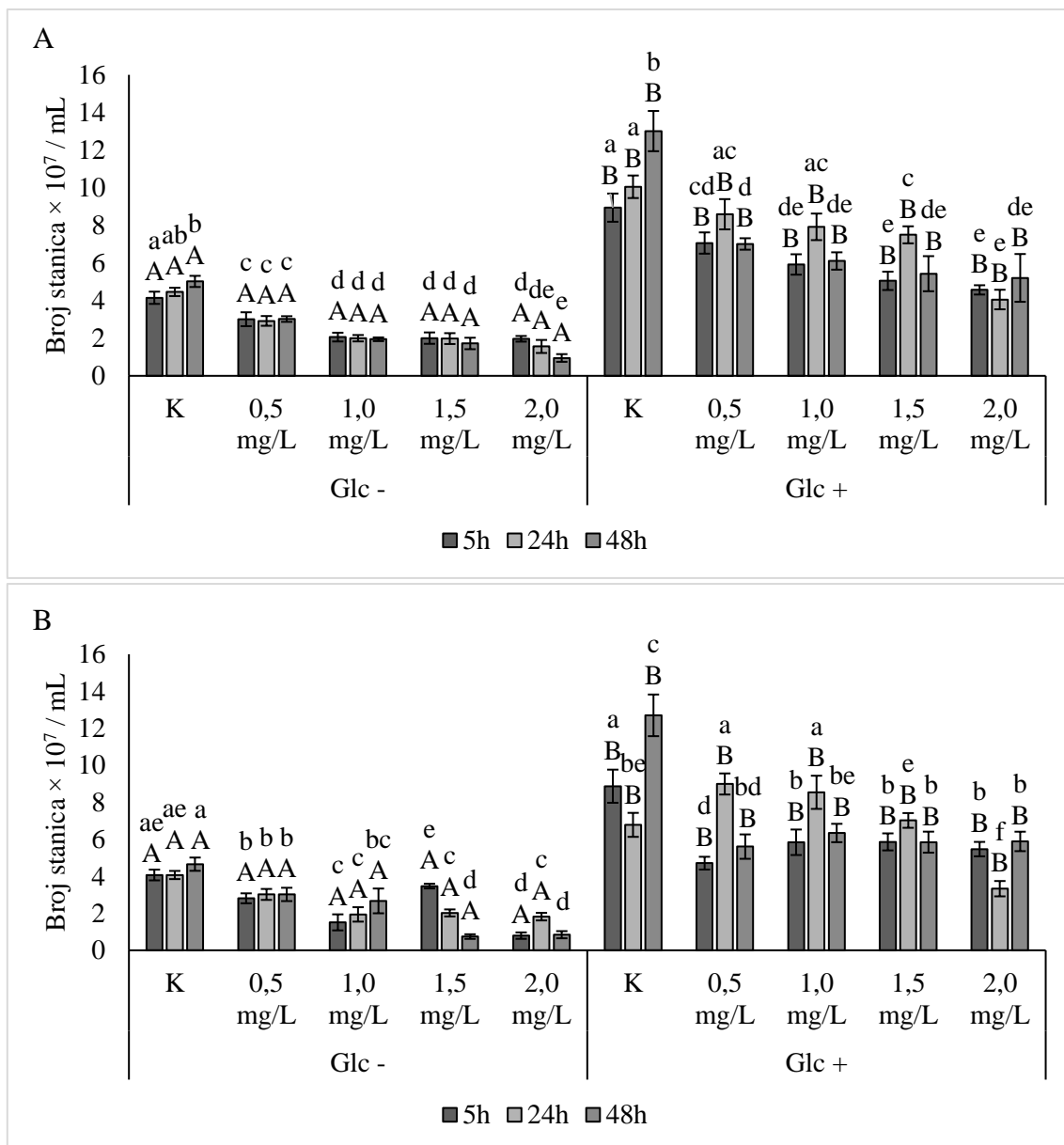
Nakon određivanja eksponencijalne faze rasta stanica, provela sam tretman s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> koncentracija 0,5, 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L i odredila učinak tretmana na broj stanica u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s i bez dodatka glukoze. Nakon 5 sati tretmana suspenzije alge *C. vulgaris* koja je uzgojena na podlozi bez glukoze s AgNP-PVP broj stanica statistički se značajno smanjio u odnosu na kontrolu pri svim koncentracijama, a statistički značajna razlika prisutna je i između najniže koncentracije i svih ostalih koncentracija tretmana

(Slika 6A). Nakon 24 i 48 sati tretmana s AgNP-PVP u suspenzijama alga uzgojenim na podlozi bez glukoze broj stanica statistički se značajno smanjio u odnosu na kontrolu, ali ne i u odnosu na tretman u trajanju 5 sati. Iznimka je tretman s najvišom koncentracijom AgNP-PVP gdje postoji statistički značajna razlika nakon 48 sati tretmana u odnosu na 5 sati. Nakon 5 sati tretmana suspenzija alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze s AgNP-PVP dolazi do statistički značajnog smanjenja broja stanica u odnosu na kontrolu pri svim koncentracijama, pri čemu je broj stanica to manji što je veća koncentracija tretmana. Nakon 24 sata tretmana s AgNP-PVP u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze dolazi do statistički značajnog povećanja broja stanica u odnosu na 5 sati pri svim koncentracijama, osim 0,5 mg/L. Osim toga, nakon 24 sata dolazi do statistički značajnog smanjenja broja stanica u odnosu na kontrolu u suspenzijama alga tretiranih s AgNP-PVP koncentracija 1,5 i 2,0 mg/L. Nakon 48 sati, broj stanica u kontrolnoj suspenziji alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze statistički značajno raste, dok se broj stanica pri svim koncentracijama tretmana s AgNP-PVP statistički značajno smanjio u odnosu na kontrolu i u odnosu na 24 sata. Usporedbom tretmana s AgNP-PVP u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom i bez dodatka glukoze, vidljivo je da je pri svim koncentracijama navedenog tretmana, kao i u kontrolnim skupinama, broj stanica statistički značajno veći u suspenzijama alga s dodatkom glukoze.

Nakon 5 sati tretmana s AgNO<sub>3</sub> u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez glukoze broj stanica statistički se značajno smanjio u odnosu na kontrolu pri svim koncentracijama, osim 1,5 mg/L, a statistički značajna razlika prisutna je i između svih tretmana (Slika 6B). Nakon 24 sata tretmana s AgNO<sub>3</sub> u suspenzijama alga uzgajanih na podlozi bez glukoze broj stanica statistički se značajno smanjio pri svim koncentracijama tretmana u odnosu na kontrolu, a između tretmana različitih koncentracija razlika je bila prisutna samo između koncentracije 0,5 mg/L i ostalih koncentracija. Tretman s AgNO<sub>3</sub> u suspenzijama alga uzgajanih na podlozi bez glukoze u trajanju 48 sati doveo je do statistički značajnog smanjenja broja stanica u odnosu na kontrolu. Osim toga, nakon 48 sati pri nižim koncentracijama tretmana broj stanica nije statistički značajno promijenio u odnosu na 5 i 24 sata, a pri višim koncentracijama je došlo do statistički značajnog smanjenja u odnosu na tretman u trajanju 5 i 24 sata. Nakon 5 sati tretmana s AgNO<sub>3</sub> svih koncentracija u suspenzijama alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze broj stanica statistički se značajno smanjio u odnosu na kontrolu. Tretman s AgNO<sub>3</sub> u trajanju 24 sata u suspenzijama alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze doveo je do statistički značajnog povećanja broja stanica u odnosu na kontrolu pri koncentraciji tretmana 0,5 i 1,0 mg/L, dok pri višim koncentracijama nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu.

Nakon 48 sati tretmana s  $\text{AgNO}_3$  u suspenzijama alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze dolazi do statistički značajnog smanjenja broja stanica u odnosu na kontrolu, ali ne postoji statistički značajna razlika između pojedine koncentracije tretmana. Usporedbom tretmana s  $\text{AgNO}_3$  u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom i bez dodatka glukoze, vidljivo je da je pri svim koncentracijama navedenog tretmana i u kontrolnim skupinama broj stanica statistički značajno veći u suspenzijama alga s dodatkom glukoze.

Iz svih navedenih rezultata i grafičkih prikaza (Slika 6) također je vidljivo da je učinak tretmana s  $\text{AgNP-PVP}$  i  $\text{AgNO}_3$  na broj stanica u suspenzijama alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze i bez dodatka glukoze vrlo sličan.



Slika 6. Broj stanica alge *C. vulgaris* u suspenziji nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> koncentracija 0,5, 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L. Prikazane su vrijednosti za kontrolnu skupinu (K) i vrijednosti dobivene nakon primjene tretmana u trajanju 5, 24 i 48 sati na alge uzgojene na podlozi bez dodatka glukoze (Glc -) i podlozi s dodatkom 1 %-tne glukoze (Glc +). A) Tretman algi s AgNP-PVP, B) Tretman algi s AgNO<sub>3</sub>. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti izmjerenog broja stanica za šest bioloških replika ± standardna pogreška. Mala tiskana slova označavaju razlike između različitih koncentracija i različitog vremena trajanja tretmana na istom tipu podloge (ili Glc – podloga ili Glc + podloga). Velika tiskana slova označavaju razlike između različitih koncentracija i različitog vremena trajanja tretmana između različitih tipova podloga (Glc – i Glc + podloge). Različita slova na stupcima, predstavljaju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0,05$ ; Newman-Keuls test).

#### 4.5. Učinak tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> na vijabilnost stanica algi u suspenziji

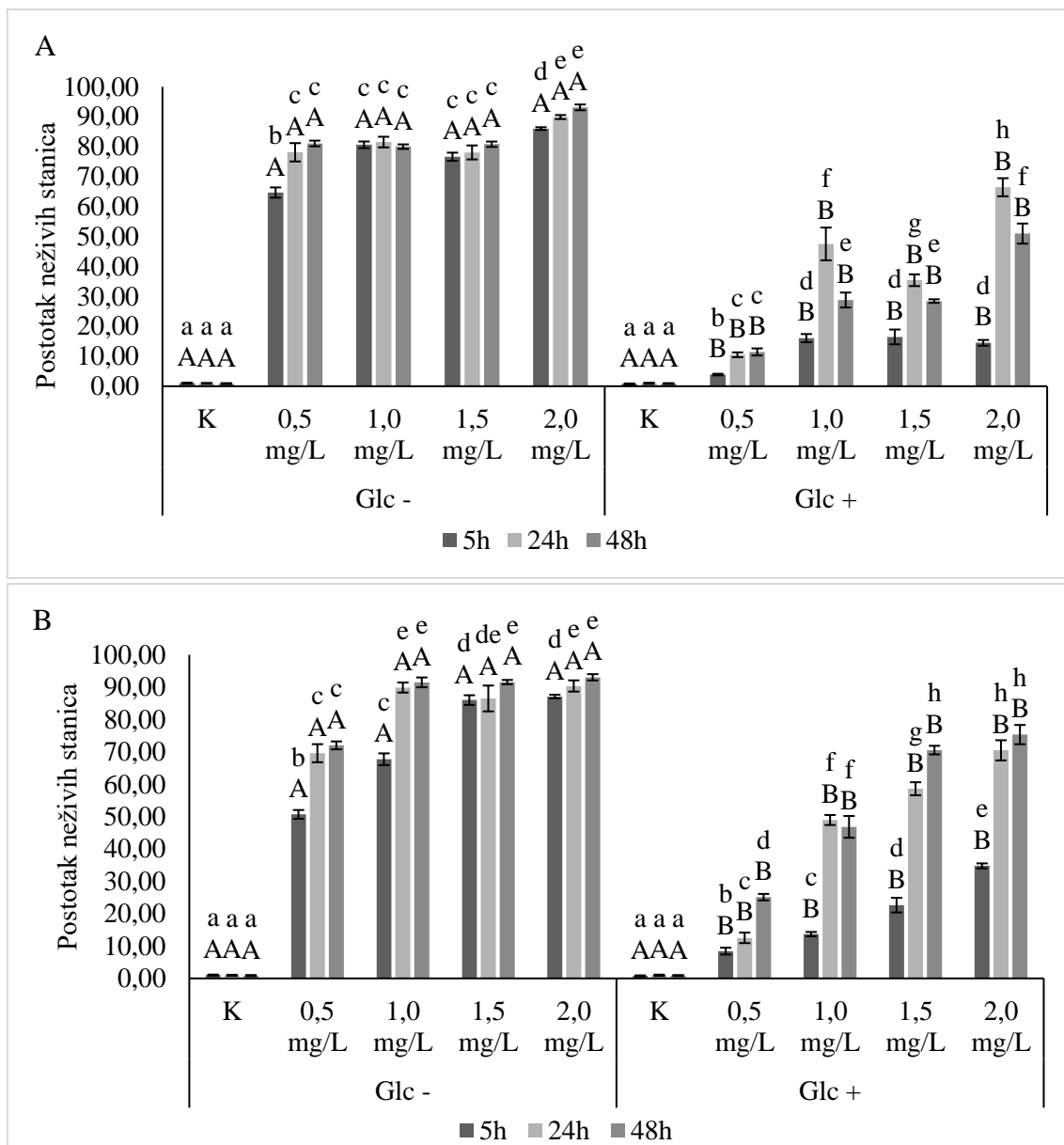
Nakon 5 sati tretmana suspenzije alge *C. vulgaris* koja je uzgojena na podlozi bez glukoze s AgNP-PVP koncentracije 0,5 mg/L izbrojala sam 60 % neživih stanica. Broj neživih stanica povećavao se povećanjem koncentracije tretmana, pa sam pri koncentraciji 2,0 mg/L izbrojala gotovo 90 % neživih stanica (Slika 7A). Nakon 24 i 48 sati tretmana s AgNP-PVP, broj neživih stanica u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez glukoze povećavao se proporcionalno sa sve većom koncentracijom tretmana, pa sam u konačnici pri koncentraciji 0,5 mg/L izbrojala oko 80 % neživih stanica, a pri koncentraciji 2,0 mg/L oko 90 % neživih stanica. Nakon 5 sati tretmana s AgNP-PVP u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze pri najnižoj koncentraciji (0,5 mg/L) izbrojala sam manje od 5 % neživih stanica, dok sam pri najvišoj koncentraciji (2,0 mg/L) izbrojala oko 15 % neživih stanica. Nakon 24 sata tretmana s AgNP-PVP, broj neživih stanica u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze statistički se značajno povećavao u odnosu na broj neživih stanica nakon 5 sati, ali je postotak neživih stanica pri tretmanu koncentracije 1,5 mg/L bio statistički značajno manji nego pri koncentraciji 1,0 mg/L i 2,0 mg/L. Nakon 48 sati tretmana suspenzije alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze s AgNP-PVP došlo je do statistički značajnog smanjenja broja neživih stanica u odnosu na 24 sata, pri svim koncentracijama osim 0,5 mg/L, tako da je u konačnici broj neživih stanica pri najnižoj koncentraciji bio oko 10 %, a pri najvećoj koncentraciji tretmana oko 50 %. Usporedbom tretmana s AgNP-PVP u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez glukoze i s dodatkom glukoze, vidljivo je da je tretman svim koncentracijama uzrokovao statistički značajno veći postotak neživih stanica u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez glukoze.

Nakon 5 sati tretmana suspenzije alge *C. vulgaris* uzgojene na podlozi bez glukoze s AgNO<sub>3</sub> koncentracije 0,5 mg/L izbrojala sam 60 % neživih stanica. Broj neživih stanica povećavao se povišenjem koncentracije tretmana, pa sam pri koncentraciji 2,0 mg/L izbrojala preko 80 % neživih stanica (Slika 7B). Nakon 24 i 48 sati tretmana s AgNO<sub>3</sub>, broj neživih stanica u suspenziji alga uzgojenih na podlozi bez glukoze statistički se značajno povećao u odnosu na 5 sati, i broj neživih stanica ponovno je rastao s povećanjem koncentracije tretmana. U konačnici, postotak neživih stanica u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez glukoze nakon tretmana s AgNO<sub>3</sub> najniže koncentracije bio je oko 70 %, a nakon tretmana s najvišom koncentracijom oko 90 %. Nakon 5 sati tretmana s AgNO<sub>3</sub> u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze pri najnižoj koncentraciji izbrojala sam manje od 10 % neživih stanica, dok sam pri najvišoj koncentraciji izbrojala 35 % neživih stanica. Nakon 24 i 48 sati

tretmana s  $\text{AgNO}_3$ , broj neživih stanica u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze statistički je značajno porastao u odnosu na 5 sati, pri čemu se broj neživih stanica povećavao s povećanjem koncentracije tretmana. U konačnici, postotak neživih stanica u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze nakon tretmana s  $\text{AgNO}_3$  najniže koncentracije bio je oko 25 %, a nakon tretmana s najvišom koncentracijom oko 75 %. Usporedbom tretmana s  $\text{AgNO}_3$  u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez glukoze i s dodatkom glukoze, vidljivo je da je tretman svim koncentracijama uzrokovao statistički značajno veći postotak neživih stanica u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez glukoze.

Iz svih navedenih rezultata i grafičkih prikaza (Slika 7) također je vidljivo da je učinak tretmana na povećanje broja neživih stanica izraženiji pri tretmanu s  $\text{AgNO}_3$  u odnosu na AgNP-PVP u suspenzijama alga s dodatkom glukoze. Osim toga, tretman s  $\text{AgNO}_3$  viših koncentracija (1,5 i 2,0 mg/L) imao je veći učinak na povećanje broja neživih stanica u suspenzijama alga bez dodatka glukoze u odnosu na tretman s AgNP-PVP, dok je pri nižim koncentracijama tretmana broj neživih stanica bio veći pri tretmanu s AgNP-PVP.





Slika 7. Postotak neživih stanica u suspenziji alge *C. vulgaris* dobiven primjenom fluorescentne boje propidij-jodid nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> koncentracija 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 mg/L. Prikazane su vrijednosti za kontrolnu skupinu (K) i vrijednosti dobivene nakon primjene tretmana u trajanju 5, 24 i 48 sati na suspenziju alge uzgojene na podlozi bez dodatka glukoze (Glc -) i podlozi s dodatkom 1 %-tne glukoze (Glc +). A) Tretman s AgNP-PVP, B) Tretman s AgNO<sub>3</sub>. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti izmjereneog postotka neživih stanica za šest bioloških replika ± standardna pogreška. Mala tiskana slova označavaju razlike između različitih koncentracija i različitog vremena trajanja tretmana na istom tipu podloge (ili Glc – podloga ili Glc + podloga). Velika tiskana slova označavaju razlike između različitih koncentracija i različitog vremena trajanja tretmana između različitih tipova podloga (Glc – i Glc + podloga). Različita slova na stupcima, predstavljaju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0,05$ ; Newman-Keuls test).

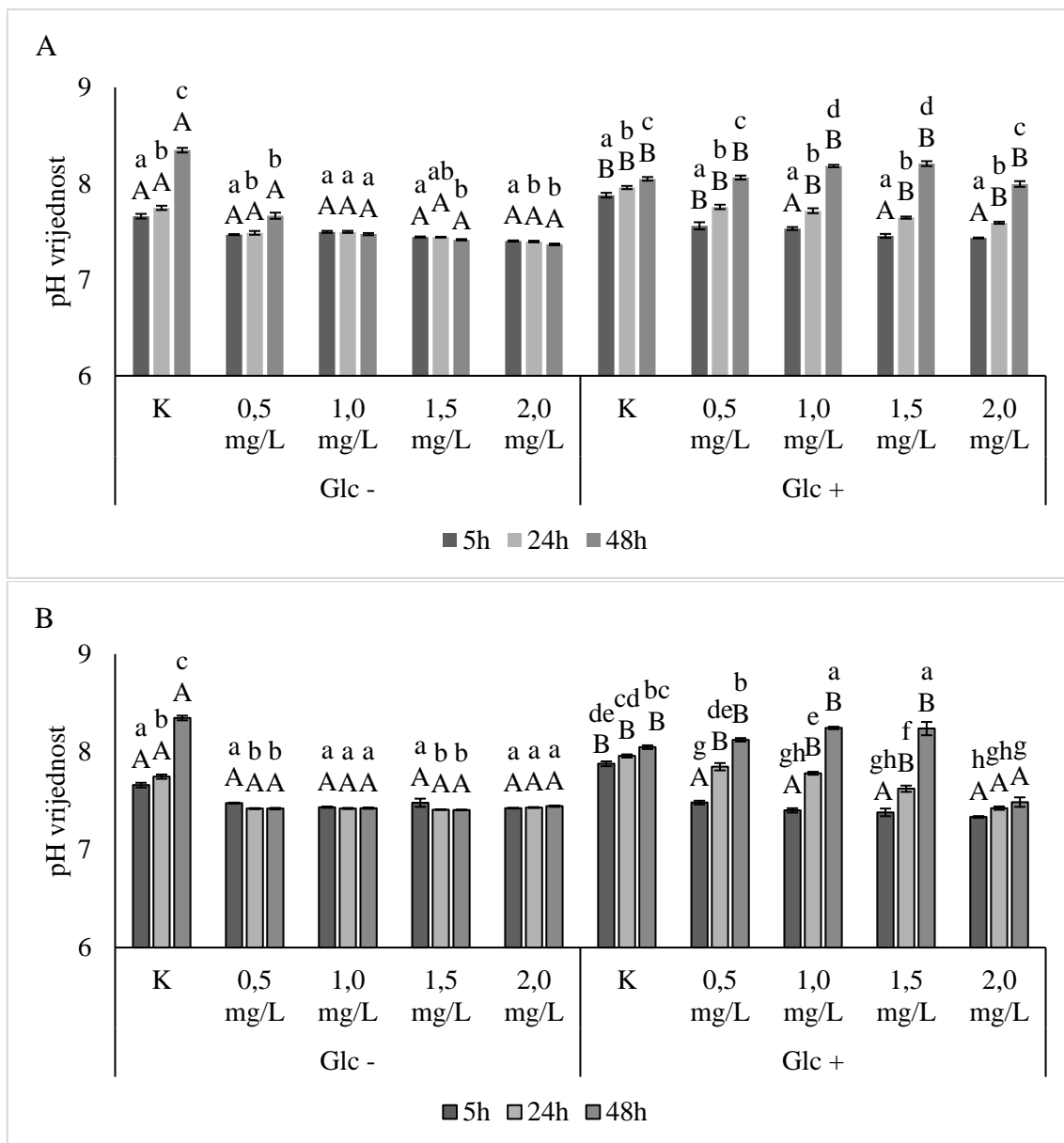
#### 4.6. Učinak tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> na pH vrijednost suspenzije stanica algi

Nakon 5 sati tretmana suspenzije alge *C. vulgaris* koja je uzgojena na podlozi bez glukoze s AgNP-PVP pH vrijednost nije se statistički značajno razlikovala u odnosu na kontrolu, a nakon 24 sata statistički se značajno smanjila u odnosu na kontrolu samo pri koncentraciji tretmana 1,0 mg/L (Slika 8A). Nakon 48 sati tretmana s AgNP-PVP u suspenziji alga uzgojenih na podlozi bez glukoze statistički značajno smanjenje pH vrijednosti u odnosu na kontrolu bilo je prisutno pri svim koncentracijama tretmana, ali između različitih koncentracija tretmana nije bilo statistički značajne razlike. U kontrolnim skupinama alga uzgojenih i na podlozi s dodatkom glukoze i bez dodatka glukoze, pH vrijednost statistički se značajno povećavala s vremenom. U suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze, tretman s AgNP-PVP nakon 5, 24 i 48 sati nije doveo do statistički značajne promjene pH vrijednosti u odnosu na kontrolu. Međutim, u odnosu na 5 sati tretmana, nakon 24 i 48 sati došlo je do statistički značajnog povećanja pH vrijednosti pri svim koncentracijama tretmana. Usporedbom tretmana s AgNP-PVP u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez glukoze i s dodatkom glukoze, vidljivo je da je nakon 24 i 48 sati tretman svih koncentracija doveo do statistički značajno veće pH vrijednosti u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze u odnosu na one uzgojene na podlozi bez dodatka glukoze, a nakon 5 sati tretmana statistički značajna razlika vidljiva je samo pri koncentraciji 0,5 mg/L.

Nakon 5 sati tretmana s AgNO<sub>3</sub> u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez glukoze nije došlo do statistički značajne promjene pH vrijednosti u odnosu na kontrolu (Slika 8B). Nakon 24 sata tretmana suspenzije alga uzgojenih na podlozi bez glukoze s AgNO<sub>3</sub> do statistički značajnog smanjenja pH vrijednosti u odnosu na kontrolu došlo je pri koncentracijama 1,0 i 2,0 mg/L, dok je nakon 48 sati pH vrijednosti bila statistički značajno manja u odnosu na kontrolu pri svim koncentracijama tretmana. U suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze tretman s AgNO<sub>3</sub> nakon 5 sati doveo je do statistički značajne promjene pH vrijednosti pri svim koncentracijama u odnosu na kontrolu. Tretman s AgNO<sub>3</sub> u trajanju 24 sata u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze doveo je do statistički značajnog smanjenja pH vrijednosti u odnosu na kontrolu pri koncentracijama 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L. Nakon 48 sati tretmana s AgNO<sub>3</sub> u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze došlo je do statistički značajnog povećanja pH vrijednosti u odnosu na kontrolu pri koncentracijama 1,0 i 1,5 mg/L, dok je pri koncentraciji 2,0 mg/L došlo do statistički značajnog smanjenja pH vrijednosti u odnosu na kontrolu. Također, nakon 24 sata došlo je do statistički značajnog povećanja pH vrijednosti u odnosu na 5 sati od početka

tretmana, a nakon 48 sati došlo je do statistički značajnog povećanja pH vrijednosti u odnosu na 5 i 24 sata od početka tretmana pri koncentracijama 0,5, 1,0 i 1,5 mg/L. Usporedbom tretmana s  $\text{AgNO}_3$  u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez glukoze i s dodatkom glukoze, vidljivo je da je nakon 24 i 48 sati tretman s koncentracijama 0,5, 1,0 i 1,5 mg/L doveo do statistički značajno veće pH vrijednosti u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze u odnosu na one uzgojene na podlozi bez dodatka glukoze.

Iz svih navedenih rezultata i grafičkih prikaza (Slika 8) također je moguće zaključiti kako je učinak  $\text{AgNO}_3$  i AgNP-PVP vrlo sličan u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez dodatka glukoze i u onima uzgojenim na podlozi s dodatkom glukoze. Jedina značajnija razlika vidljiva je u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze gdje nakon tretmana s  $\text{AgNO}_3$  koncentracije 2,0 mg/L pH vrijednost ne raste toliko značajno kao nakon tretmana s AgNP-PVP iste koncentracije.



Slika 8. pH vrijednost u suspenziji alge *C. vulgaris* nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> koncentracija 0,5, 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L. Prikazane su vrijednosti za kontrolnu skupinu (K) i vrijednosti dobivene nakon primjene tretmana u trajanju 5, 24 i 48 sati na alge uzgojene na podlozi bez dodatka glukoze (Glc -) i podlozi s dodatkom 1 %-tne glukoze (Glc +). A) Tretman algi s AgNP-PVP, B) Tretman algi s AgNO<sub>3</sub>. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti pH za šest bioloških replika ± standardna pogreška. Mala tiskana slova označavaju razlike između različitih koncentracija i različitog vremena trajanja tretmana na istom tipu podloge (ili Glc – podloga ili Glc + podloga). Velika tiskana slova označavaju razlike između različitih koncentracija i različitog vremena trajanja tretmana između različitih tipova podloga (Glc – i Glc + podloge). Različita slova na stupcima, predstavljaju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0,05$ ; Newman-Keuls test).

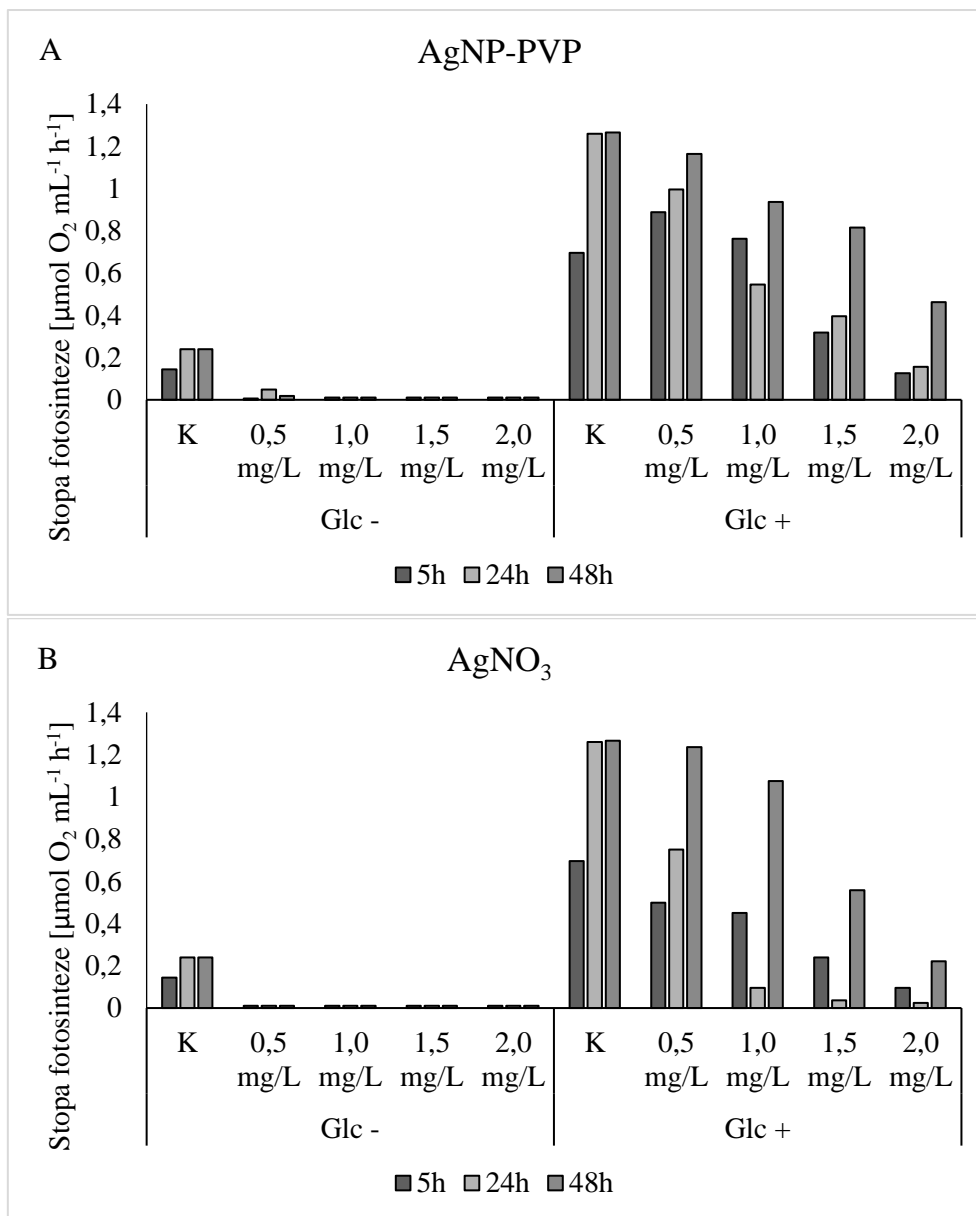
#### 4.7. Količina kisika i stopa fotosinteze u suspenziji stanica alge

Nakon 5 sati tretmana suspenzije alge *C. vulgaris* koja je uzgojena na podlozi bez glukoze s AgNP-PVP koncentracije 0,5 mg/L stopa fotosinteze smanjila se u odnosu na kontrolu, a pri višim koncentracijama tretmana vrijednost je bila blizu nule (Slika 9A). Nakon 24 sata tretmana s AgNP-PVP koncentracije 0,5 mg/L u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez glukoze dolazi do blagog povećanja u odnosu na tretman trajanja 5 sati, a nakon 48 sati dolazi do ponovnog smanjenja stope fotosinteze. Pri višim koncentracijama AgNP-PVP u suspenzijama alga uzgajanih na podlozi bez dodatka glukoze nakon 24 i 48 sati dolazi do smanjenja stope fotosinteze i vrijednost je blizu nule. U suspenzijama alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze nakon 5 sati tretmana s AgNP-PVP pri koncentracijama 0,5 i 1,0 mg/L dolazi do povećanja stope fotosinteze u odnosu na kontrolu, dok pri koncentracijama 1,5 i 2,0 mg/L dolazi do smanjenja stope fotosinteze u odnosu na kontrolu. Nakon 24 i 48 sati tretmana s AgNP-PVP u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze pri svim koncentracijama tretmana dolazi do smanjenja stope fotosinteze u odnosu na kontrolu, pri čemu je smanjenje proporcionalno s povećanjem koncentracije tretmana. Međutim, pri svim koncentracijama tretmana, nakon 24 i 48 sati tretmana dolazi do povećanja stope fotosinteze u odnosu na tretman u trajanju 5 sati. Usporedbom tretmana s AgNP-PVP u suspenzijama alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze i bez dodatka glukoze vidljivo je da je učinak tretmana puno jači na alge uzgojene na podlozi bez dodatka glukoze, gdje je stopa fotosinteze vrlo niska i pri gotovo svim koncentracijama tretmana doseže vrijednost nula. Tretman s AgNP-PVP u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze također dovodi do smanjenja stope fotosinteze, međutim vrijednosti ne dolaze blizu vrijednosti nule i događa se porast u stopi fotosinteze za vrijeme trajanja eksperimenta, unatoč primijenjenom tretmanu.

Nakon 5 sati tretmana suspenzije alga uzgojenih na podlozi bez glukoze s AgNO<sub>3</sub> svih koncentracija dolazi do smanjenja stope fotosinteze u odnosu na kontrolu i vrijednost je blizu nule, a isti učinak vidljiv je i nakon 24 i 48 sati od primjene tretmana (Slika 9B). U suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze nakon 5, 24 i 48 sati tretmana pri svim koncentracijama dolazi do smanjenja stope fotosinteze u odnosu na kontrolu. Isto kao i kod tretmana s AgNP-PVP, stopa fotosinteze raste nakon 48 sati u odnosu na 5 i 24 sata od primjene tretmana, a nakon 24 sata od primjene tretmana smanjuje se pri koncentracijama 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L u odnosu na 5 sati od primjene tretmana. Usporedbom tretmana s AgNO<sub>3</sub> u suspenzijama alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze i bez dodatka glukoze vidljivo je da je učinak tretmana izraženiji u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez dodatka glukoze, gdje je pri

svim koncentracijama tretmana stopa fotosinteze jednaka nuli. S druge strane, tretman s AgNP-PVP u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze do tako značajnog smanjenja doveo je samo pri višim koncentracijama nakon 24 sati od primjene tretmana.

Iz svih navedenih rezultata i grafičkih prikaza (Slika 9) vidljivo je da je učinak AgNO<sub>3</sub> i u suspenzijama alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze i bez dodatka glukoze veći nego učinak AgNP-PVP. AgNO<sub>3</sub> je pri svim koncentracijama doveo do potpunog smanjenja stope fotosinteze u suspenzijama alga uzgajanih na podlozi bez dodatka glukoze, a u suspenzijama alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze doveo je do značajnijeg smanjenja stope fotosinteze, pri čemu su neke vrijednosti gotovo dosegnule nula.



Slika 9. Stopa fotosinteze u suspenziji alge *C. vulgaris* nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> koncentracija 0,5, 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L. Prikazane su vrijednosti za kontrolnu skupinu (K) i vrijednosti dobivene nakon primjene tretmana u trajanju 5, 24 i 48 sati na alge uzgojene na podlozi bez dodatka glukoze (Glc -) i podlozi s dodatkom 1 %-tne glukoze (Glc +). A) Tretman algi s AgNP-PVP, B) Tretman algi s AgNO<sub>3</sub>.

#### 4.8. Apsorpcijski spektri klorofila *a* i *b* u suspenziji stanica alge

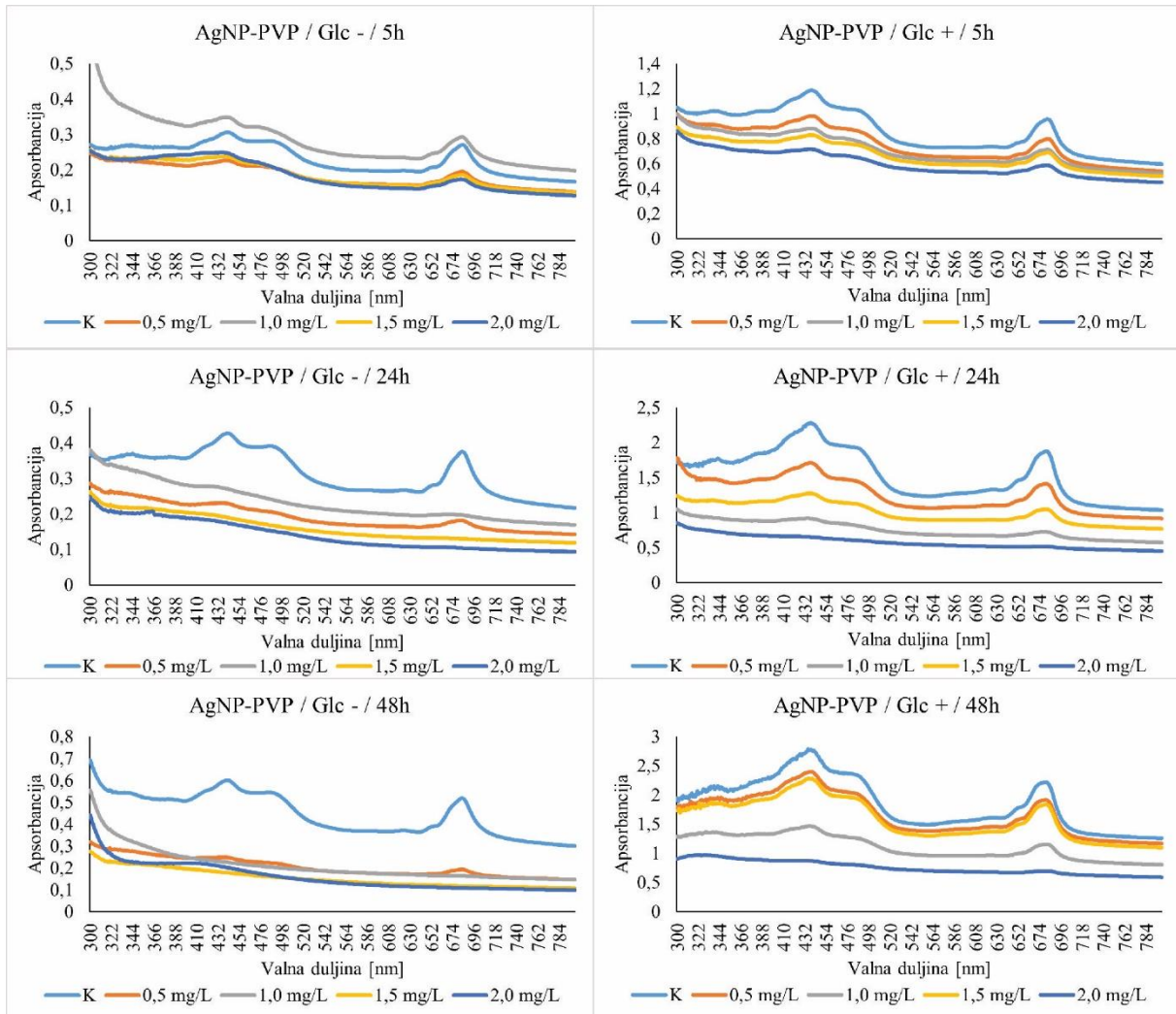
Apsorpcijski spektar klorofila *a* i *b* kontrolne skupine suspenzija alga uzgojenih na podlozi bez dodatka glukoze i s dodatkom glukoze imao je maksimum apsorpcije (pik) između 435 i 440 nm, te drugi oko 680 nm. Nakon 5 sati tretmana s AgNP-PVP suspenzije alga uzgojene na podlozi bez dodatka glukoze pokazale su smanjenja visine pika pri svim koncentracijama i to smanjenje bilo je proporcionalno povišenju koncentracije tretmana (Slika 10). Nakon 24 sata tretmana s AgNP-PVP koncentracija 0,5 i 1,0 mg/L suspenzije alga uzgojene na podlozi bez dodatka glukoze pokazale su smanjenja visine pika, dok koncentracije 1,5 i 2,0 mg/L dovode do potpunog nestanka pika, a nakon 48 sati dolazi do nestanka pikova pri svim koncentracijama, osim 0,5 mg/L. Apsorpcijski spektar suspenzija alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze je nakon 5 sati tretmana s AgNP-PVP imao smanjenu visinu pikova, proporcionalno s primijenjenom koncentracijom tretmana. Tretmani u trajanju 24 i 48 sati u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze pokazali su smanjenja visine pikova u odnosu na kontrolu, a potpuni nestanak pikova zabilježila sam jedino pri koncentraciji 2,0 mg/L. Usporedbom apsorpcijskih spektara za tretman s AgNP-PVP u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom i bez dodatka glukoze, vidljivo je da su apsorpcije uzoraka 2-3 puta više u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze, i da je učinak tretmana manje izražen u tim suspenzijama.

Nakon 5 i 24 sata tretmana s AgNO<sub>3</sub> suspenzije alga uzgojene na podlozi bez dodatka glukoze pokazale su smanjenja visine pikova u odnosu na kontrolu pri svim koncentracijama tretmana, pri čemu je smanjenje bilo veće što je bila veća koncentracija primijenjenog tretmana (Slika 11). Nakon 48 sati u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez dodatka glukoze, tretman s AgNO<sub>3</sub> dovodi do smanjenja visine pikova u odnosu na kontrolu, a tretman s najvećom koncentracijom dovodi do potpunog nestanka pikova. U suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze nakon 5, 24 i 48 sati tretmana s AgNO<sub>3</sub> došlo je do smanjenja visine pikova u odnosu na kontrolu. Usporedbom apsorpcijskih spektara nakon tretmana s AgNO<sub>3</sub> vidljivo je da su apsorpcije suspenzija alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze 1,5-2 puta više u odnosu na apsorpcije suspenzija alga uzgojenih na podlozi bez dodatka glukoze, i da je učinak tretmana manje izražen u tim suspenzijama.

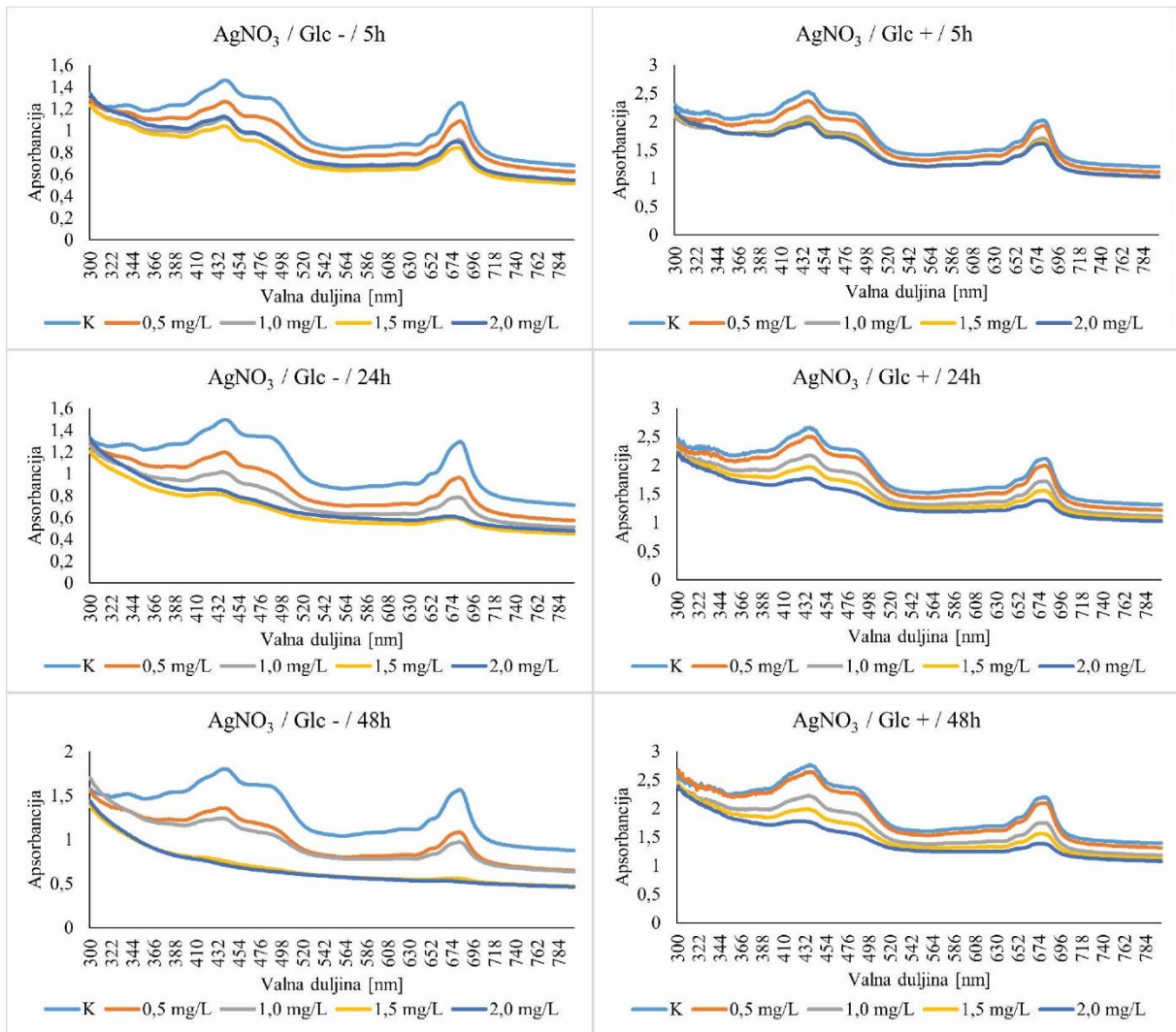
Iz svih navedenih rezultata i grafičkih prikaza, vidljivo je da je učinak AgNP-PVP izraženiji nego učinak AgNO<sub>3</sub>, kako u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze, kao i u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez dodatka glukoze. Tretman s AgNP-



PVP u više slučajeva dovodi do potpunog nestanka pikova, maksimumi apsorpcije uzoraka niži su u odnosu na tretman s  $\text{AgNO}_3$  i puno je veće smanjenje visine pikova već i pri nižim koncentracijama tretmana.



Slika 10. Apsorpcijski spektri klorofila *a* i *b* u suspenziji stanica alge *C. vulgaris* uzgajane na podlozi bez dodatka glukoze (Glc -) i podlozi s dodatkom glukoze (Glc +) izmjereni nakon 5, 24 i 48 sati tretmana s AgNP-PVP koncentracija 0,5, 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L. Spektri su dobiveni mjerenjem apsorbcije uzoraka u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm.



Slika 11. Apsorpcijski spektri klorofila *a* i *b* u suspenziji stanica alge *C. vulgaris* uzgajane na podlozi bez dodatka glukoze (Glc -) i podlozi s dodatkom glukoze (Glc +) izmjereni nakon 5, 24 i 48 sati tretmana s  $\text{AgNO}_3$  koncentracija 0,5, 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L. Spektri su dobiveni mjerenjem apsorbancije uzoraka u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm.

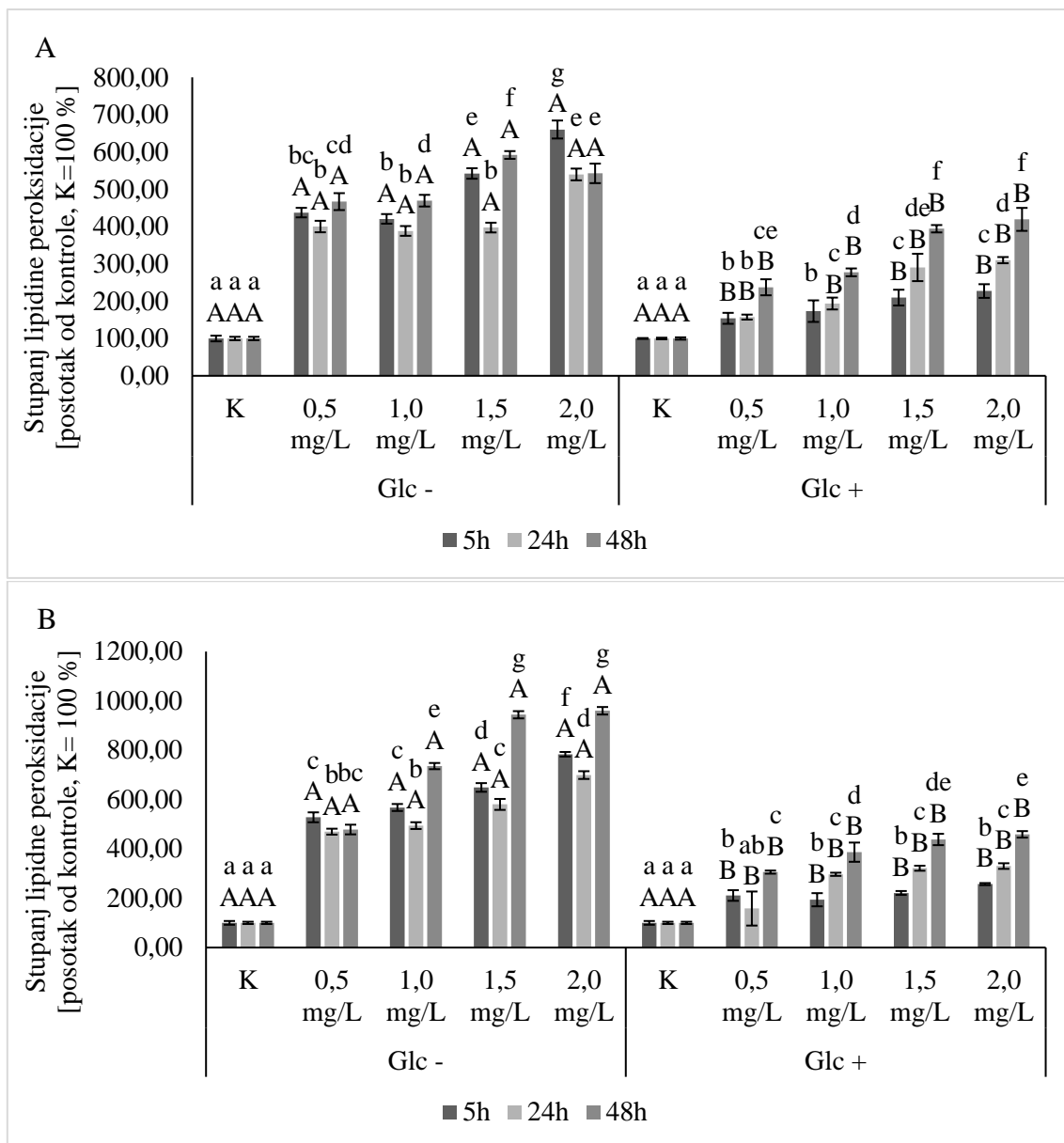
#### 4.9. Stupanj lipidne peroksidacije

Nakon 5 sati tretmana s AgNP-PVP u suspenzijama alge *C. vulgaris* uzgojene na podlozi bez dodatka glukoze dolazi do statistički značajnog povećanja stupnja lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu, a pri koncentraciji 2,0 mg/L doseže najvišu vrijednost u odnosu na ostale tretmane (Slika 12A). Nakon 24 sata tretmana s AgNP-PVP u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez dodatka glukoze dolazi do statistički značajnog povećanja stupnja lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu, a pri koncentracijama 1,5 i 2,0 mg/L dolazi do statistički značajnog smanjenja stupnja lipidne peroksidacije u odnosu na tretman u trajanju 5 sati. Nakon 48 sati u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez dodatka glukoze tretman s AgNP-PVP svih koncentracija doveo je do statistički značajnog povećanja stupnja lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu. U odnosu na tretman u trajanju 5 i 24 sata, nakon 48 sati došlo je do statistički značajnog povećanja stupnja lipidne peroksidacije pri koncentracijama 0,5, 1,0 i 1,5 mg/L, a pri koncentraciji 2,0 mg/L došlo je do statistički značajnog smanjenja stupnja lipidne peroksidacije. U suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze tretman s AgNP-PVP u trajanju 5, 24 i 48 sati doveo je do statistički značajnog povećanja stupnja lipidne peroksidacije, pri čemu je povećanje bilo proporcionalno primijenjenoj koncentraciji tretmana. Nakon 24 sata tretmana s AgNP-PVP u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze statistički značajno povećanje u odnosu na tretman u trajanju 5 sati zabilježila sam pri koncentraciji 1,5 i 2,0 mg/L, dok je nakon 48 sati tretmana statistički značajno povećanje u odnosu na 5 i 24 sata zabilježeno pri svim koncentracijama tretmana. Usporedbom tretmana s AgNP-PVP u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze i bez dodatka glukoze, vidljiva je statistički značajna razlika, pri čemu je tretman u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez dodatka glukoze doveo do statistički značajno višeg stupnja lipidne peroksidacije pri svim tretmanima, a u kontrolnim skupinama nisu zabilježene razlike.

Nakon 5 sati tretmana s AgNO<sub>3</sub> u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez dodatka glukoze dolazi do statistički značajnog povećanja stupnja lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu, proporcionalno s koncentracijom primijenjenog tretmana (Slika 12B). Nakon 24 sata tretmana u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez dodatka glukoze tretman s AgNO<sub>3</sub> doveo je do statistički značajnog povećanja stupnja lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu, ali i statistički značajnog smanjenja stupnja lipidne peroksidacije u odnosu na tretman u trajanju 5 sati. Nakon 48 sati tretmana s AgNO<sub>3</sub> došlo je do statistički značajnog povećanja stupnja lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez dodatka glukoze. Pritom je došlo do statistički značajnog povećanja stupnja lipidne

peroksidacije u odnosu na 5 i 24 sata pri koncentracijama 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L, dok se stupanj lipidne peroksidacije nakon tretmana s  $\text{AgNO}_3$  koncentracije 0,5 mg/L nije značajno razlikovao. U suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze tretman s AgNP-PVP svih koncentracija u trajanju 5 sati doveo je do statistički značajnog povećanja stupnja lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu. Nakon 24 sata tretmana s  $\text{AgNO}_3$  u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze dolazi do statistički značajnog povećanja stupnja lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu pri koncentracijama 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L, a nakon 48 sati tretmana do povećanja stupnja lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu dolazi pri svim koncentracijama tretmana. Također, nakon 48 sati tretmana s  $\text{AgNO}_3$  u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze zabilježila sam statistički značajno povećanje stupnja lipidne peroksidacije u odnosu na 5 i 24 sata pri svim koncentracijama tretmana. Usporedbom tretmana s  $\text{AgNO}_3$  u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom i bez dodatka glukoze, vidljiva je statistički značajna razlika, pri čemu je tretman doveo do statistički značajno višeg stupnja lipidne peroksidacije pri svim koncentracijama u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez dodatka glukoze, a u kontrolnim skupinama nisu zabilježene razlike.

Iz svih navedenih rezultata i grafičkih prikaza, vidljivo je da je tretman s  $\text{AgNO}_3$  svih koncentracija imao značajniji učinak na stupanj lipidne peroksidacije u odnosu na tretman s AgNP-PVP. Konačne vrijednosti stupnja lipidne peroksidacije u suspenzijama alga uzgojenih i na podlozi s dodatkom glukoze i na podlozi bez dodatka glukoze pri tretmanu s  $\text{AgNO}_3$  bile su više nego pri tretmanu s AgNP-PVP svih koncentracija.



Slika 12. Stupanj lipidne peroksidacije u suspenziji alge *C. vulgaris* nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> koncentracija 0,5, 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L. Prikazane su vrijednosti za kontrolnu skupinu (K) i vrijednosti dobivene nakon primjene tretmana u trajanju 5, 24 i 48 sati na alge uzgojene na podlozi bez dodatka glukoze (Glc -) i podlozi s dodatkom 1 %-tne glukoze (Glc +). A) Tretman algi s AgNP-PVP, B) Tretman algi s AgNO<sub>3</sub>. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti stupnja lipidne peroksidacije za šest bioloških replika ± standardna pogreška. Mala tiskana slova označavaju razlike između različitih koncentracija i različitog vremena trajanja tretmana na istom tipu podloge (ili Glc - podloga ili Glc + podloga). Velika tiskana slova označavaju razlike između različitih koncentracija i različitog vremena trajanja tretmana između različitih tipova podloga (Glc - i Glc + podloge). Različita slova na stupcima, predstavljaju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0,05$ ; Newman-Keuls test).

## 4.10. Aktivnost antioksidacijskih enzima

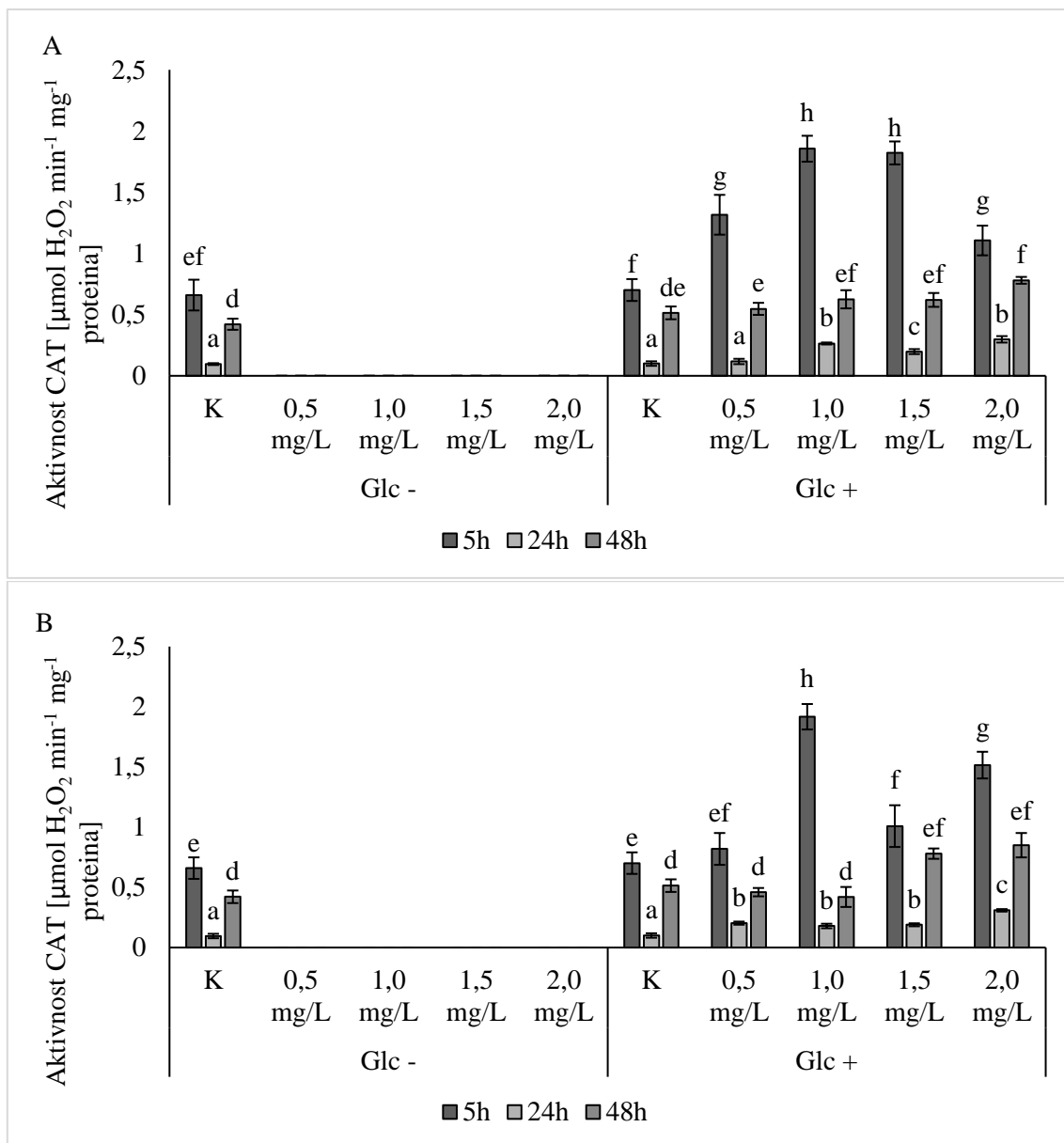
### 4.10.1. Aktivnost katalaze

U kontrolnim skupinama alga uzgojenih na podlozi bez dodatka glukoze, jednako kao i u stanicama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze, pri oba tretmana aktivnost CAT statistički se značajno smanjila nakon 24 i 48 sati u odnosu na 5 sati tretmana, ali je nakon 48 sati bila statistički značajno viša u odnosu na 24 sata tretmana. Vrijednosti za tretirane skupine alga uzgojenih na podlozi bez glukoze nisu zabilježene jer nije bilo moguće izolirati dovoljnu količinu proteina za daljnje analize. Tretman sa svim ispitivanim koncentracijama AgNP-PVP na podlozi s glukozom u trajanju od 5 sati doveo je do statistički značajnog povećanja aktivnosti CAT u stanicama alge *C. vulgaris* u odnosu na kontrolu (Slika 13A). Nakon 24 sata, do statistički značajnog povećanja aktivnosti CAT u stanicama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze u odnosu na kontrolu došlo je pri tretmanu s AgNP-PVP koncentracija 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L. Također, nakon 24 sata tretmana s AgNP-PVP u istim suspenzijama, došlo je do statistički značajnog smanjenja aktivnosti CAT pri svim koncentracijama u odnosu na vrijednosti dobivene nakon 5 sati tretmana. Nakon 48 sati tretmana s AgNP-PVP u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze došlo je do statistički značajnog povećanja aktivnosti CAT u odnosu na kontrolu pri koncentraciji 2,0 mg/L. Aktivnost CAT nakon 48 sati u stanicama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze statistički se značajno smanjila u odnosu na 5 sati tretmana, a statistički se značajno povećala u odnosu na tretman u trajanju 24 sata.

Što se tiče tretmana s AgNO<sub>3</sub>, nakon 5 sati zabilježila sam značajan porast aktivnosti CAT u stanicama alge u odnosu na kontrolu pri koncentracijama 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L (Slika 13B). Nakon 24 sata tretmana s AgNO<sub>3</sub> statistički značajan porast aktivnosti CAT u stanicama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze u odnosu na kontrolu dogodio se pri svim tretmanima, a nakon 48 sati samo pri koncentracijama 1,5 i 2,0 mg/L. U stanicama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze nakon 24 sata tretmana s AgNO<sub>3</sub> došlo je do statistički značajnog smanjenja aktivnosti CAT pri svim koncentracijama u odnosu na tretman u trajanju 5 sati. Nakon 48 sati u stanicama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze došlo je do statistički značajnog smanjenja aktivnosti CAT u odnosu na 5 sati tretmana pri koncentracijama 0,5, 1,0 i 2,0 mg/L, i do statistički značajnog povećanja aktivnosti CAT u odnosu na 24 sata tretmana svih koncentracija. Aktivnost CAT kontrolne skupine uzgojene na

podlozi bez glukoze nije se statistički značajno razlikovala od aktivnosti za stanice alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze.

Iz svih navedenih podataka i grafičkih prikaza (Slika 13) vidljive su male razlike u učinku tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> na aktivnost CAT u stanicama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze. Tretman s AgNO<sub>3</sub> pri koncentraciji 1,5 mg/L uzrokovao je značajno manje povećanje aktivnosti u odnosu na kontrolu, za razliku od tretmana s AgNP-PVP. Osim toga aktivnost CAT bila je viša nakon tretmana s AgNO<sub>3</sub> koncentracije 2,0 mg/L u odnosu na aktivnost CAT nakon tretmana s AgNP-PVP.



Slika 13. Aktivnost katalaze u stanicama alge *C. vulgaris* nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> koncentracija 0,5, 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L. Prikazane su vrijednosti za kontrolnu skupinu (K) i vrijednosti dobivene nakon primjene tretmana u trajanju 5, 24 i 48 sati na alge uzgojene na podlozi bez dodatka glukoze (Glc -) i podlozi s dodatkom 1 %-tne glukoze (Glc +). A) Tretman algi s AgNP-PVP, B) Tretman algi s AgNO<sub>3</sub>. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti aktivnosti katalaze za šest bioloških replika ± standardna pogreška. Mala tiskana slova označavaju razlike između različitih koncentracija i različitog vremena trajanja tretmana na istom tipu podloge (ili Glc – podloga ili Glc + podloga). Velika tiskana slova označavaju razlike između različitih koncentracija i različitog vremena trajanja tretmana između različitih tipova podloga (Glc – i Glc + podloge). Različita slova na stupcima, predstavljaju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0,05$ ; Newman-Keuls test).

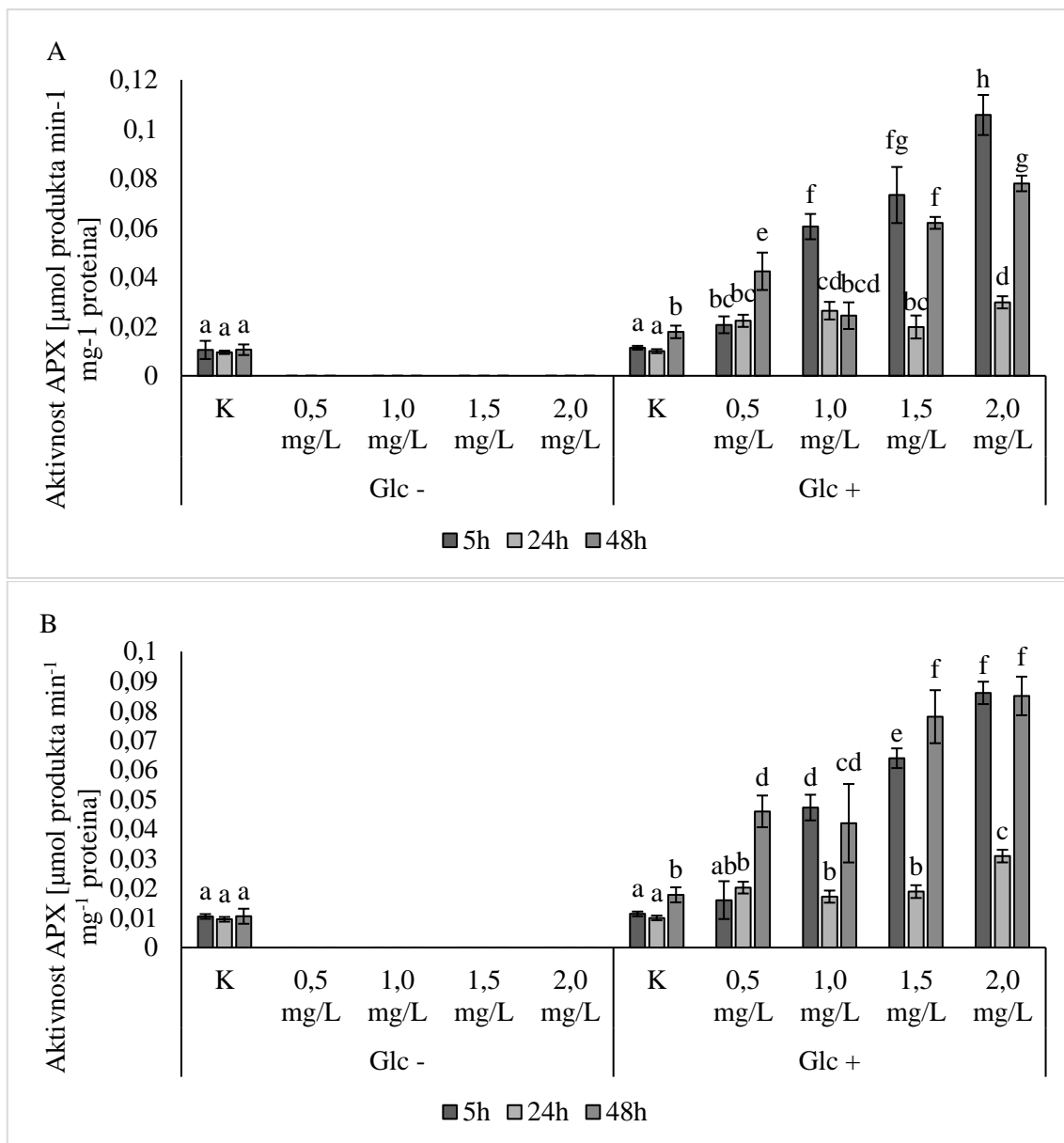


#### 4.10.2. Aktivnost askorbat peroksidaze

U kontrolnim skupinama alga uzgojenih na podlozi bez dodatka glukoze aktivnost APX nije se statistički značajno mijenjala nakon 24 i 48 sati tretmana u odnosu na 5 sati, a u kontrolnim suspenzijama alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze aktivnost APX bila je statistički značajno viša nakon 48 sati tretmana u odnosu na 5 i 24 sata. Vrijednosti za tretirane skupine alga uzgojenih na podlozi bez glukoze nisu zabilježene jer nije bilo moguće izolirati dovoljnu količinu proteina za daljnje analize. Tretman stanica alge *C. vulgaris* svim ispitivanim koncentracijama AgNP-PVP u trajanju 5 i 24 sata izazvao je statistički značajno povećanje aktivnosti APX u stanicama alge u odnosu na kontrolu (Slika 14A). Nakon 24 sata tretmana u stanicama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze došlo je do statistički značajnog smanjenja aktivnosti APX pri tretmanu s AgNP-PVP koncentracija 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L u odnosu na 5 sati tretmana. Nakon 48 sati došlo je do statistički značajnog povećanja aktivnosti APX u odnosu na kontrolu pri tretmanu s AgNP-PVP koncentracija 0,5, 1,5 i 2,0 mg/L i do statistički značajnog povećanja aktivnosti APX u odnosu na 24 sata tretmana pri koncentracijama 0,5, 1,5 i 2,0 mg/L.

Nakon tretmana s AgNO<sub>3</sub>, zabilježila sam statistički značajan porast aktivnosti APX u stanicama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze u odnosu na kontrolu nakon 5 sati pri koncentracijama 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L (Slika 14B). Nakon 24 i 48 sati statistički značajan porast aktivnosti APX u odnosu na kontrolu dogodio se pri svim koncentracijama AgNO<sub>3</sub>. Nakon 24 sata tretmana s AgNO<sub>3</sub> u stanicama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze došlo je do statistički značajnog smanjenja aktivnosti APX u odnosu na tretman u trajanju 5 sati pri koncentracijama 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L, a nakon 48 sati pri svim koncentracijama tretmana dogodio se statistički značajan porast u odnosu na 24 sata.

Iz svih navedenih rezultata i grafičkih prikaza (Slika 14) vidljive su manje razlike u tretmanu s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> i njihovom učinku na aktivnost APX. Maksimalne vrijednosti za aktivnost APX više su pri tretmanu s AgNP-PVP, pri čemu je najviša vrijednost aktivnosti APX dostignuta nakon 5 sati tretmana s AgNP-PVP koncentracije 2,0 mg/L, jednako kao i kod tretmana s AgNO<sub>3</sub>. Osim toga, tretman s AgNP-PVP pri koncentracijama 1,0 i 2,0 mg/L uzrokovao je statistički značajno veću aktivnosti APX nakon 5 sati tretmana, u odnosu na 24 i 48 sati, dok tretman s AgNO<sub>3</sub> nije imao takav učinak.



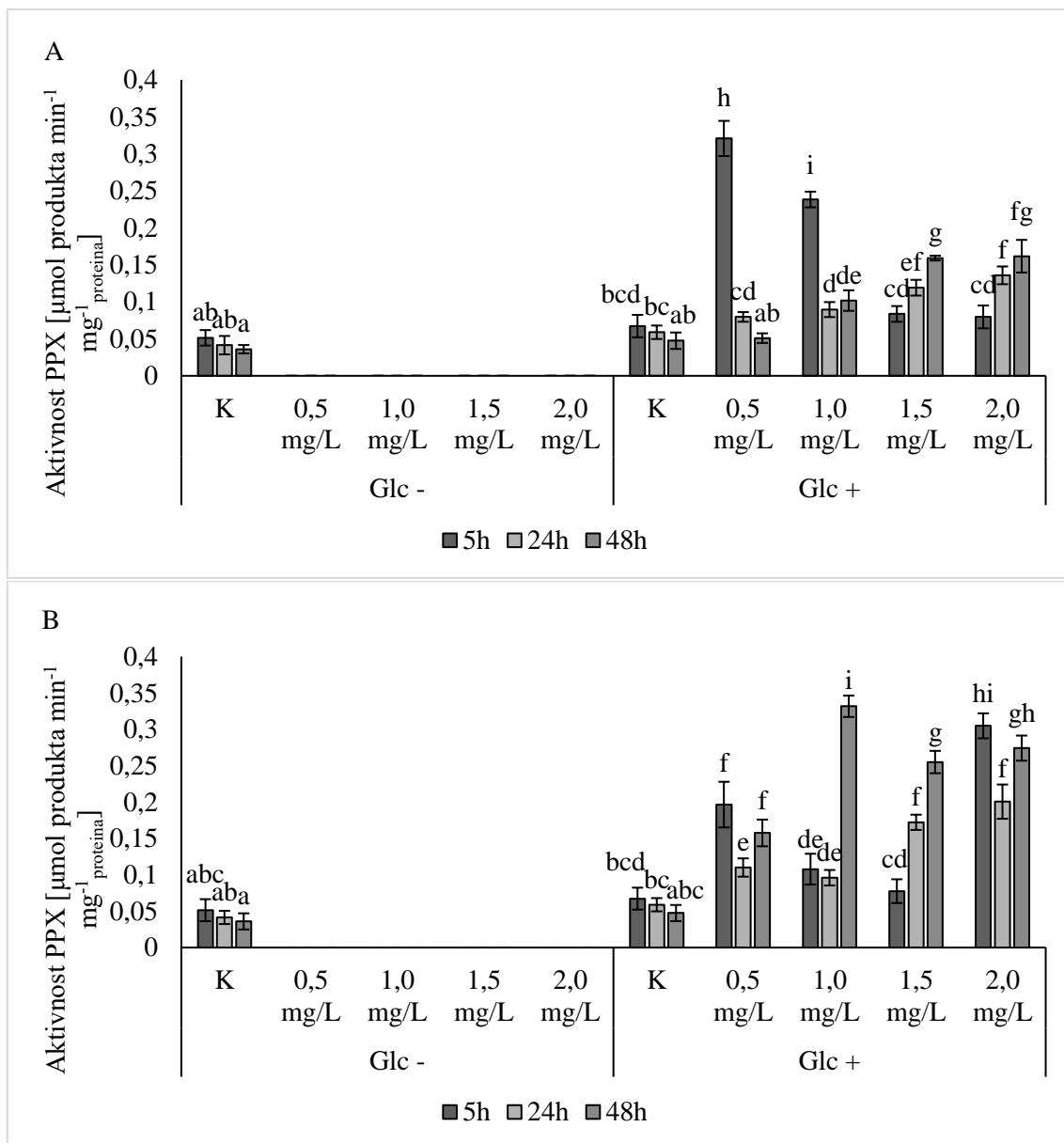
Slika 14. Aktivnost askorbat peroksidaze u stanicama alge *C. vulgaris* nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> koncentracija 0,5, 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L. Prikazane su vrijednosti za kontrolnu skupinu (K) i vrijednosti dobivene nakon primjene tretmana u trajanju 5, 24 i 48 sati na alge uzgojene na podlozi bez dodatka glukoze (Glc -) i podlozi s dodatkom 1 %-tne glukoze (Glc +). A) Tretman algi s AgNP-PVP, B) Tretman algi s AgNO<sub>3</sub>. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti aktivnosti askorbat peroksidaze za šest bioloških replika ± standardna pogreška. Mala tiskana slova označavaju razlike između različitih koncentracija i različitog vremena trajanja tretmana na istom tipu podloge (ili Glc – podloga ili Glc + podloga). Velika tiskana slova označavaju razlike između različitih koncentracija i različitog vremena trajanja tretmana između različitih tipova podloga (Glc – i Glc + podloga). Različita slova na stupcima, predstavljaju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0,05$ ; Newman-Keuls test).

#### 4.10.3. Aktivnost pirogalol peroksidaze

U kontrolnim skupinama alga uzgojenih na podlozi bez dodatka glukoze aktivnost PPX nije se statistički značajno mijenjala nakon 24 i 48 sati tretmana u odnosu na 5 sati, jednako kao i u stanicama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze. Vrijednosti za tretirane skupine alga uzgojenih na podlozi bez glukoze nisu zabilježene jer nije bilo moguće izolirati dovoljnu količinu proteina za daljnje analize. Tretman s AgNP-PVP koncentracija 0,5 i 1,0 mg/L u trajanju od 5 sati izazvao je statistički značajno povećanje aktivnosti PPX u stanicama alge *C. vulgaris* u odnosu na kontrolu (Slika 15A). Nakon 24 i 48 sati došlo je do statistički značajnog povećanja aktivnosti PPX u stanicama alge u odnosu na kontrolu pri tretmanu s AgNP-PVP u koncentraciji 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L, pri čemu se aktivnost povećavala proporcionalno koncentraciji tretmana. Također, pri tretmanu s AgNP-PVP koncentracija 0,5 i 1,0 mg/L aktivnost PPX bila je najviša nakon 5 sati, dok je pri tretmanu koncentracija 1,5 i 2,0 mg/L aktivnost PPX bila najviša nakon 48 sati.

Što se tiče tretmana s AgNO<sub>3</sub>, zabilježila sam značajan porast aktivnosti PPX u odnosu na kontrolu nakon 5 sati pri koncentracijama 0,5 i 2,0 mg/L (Slika 15B). Nakon 24 i 48 sati porast aktivnosti PPX u odnosu na kontrolu dogodio se pri svim koncentracijama AgNO<sub>3</sub>. Također, nakon 24 sata tretmana s AgNO<sub>3</sub> zabilježen je statistički značajno smanjenje aktivnosti APX u odnosu na tretman u trajanju 5 sati pri koncentracijama 0,5 i 2,0 mg/L, dok je nakon 48 sati tretmana zabilježen porast aktivnosti PPX u odnosu na 24 sata pri svim koncentracijama. Pri tretmanu s AgNO<sub>3</sub> koncentracije 0,5 i 2,0 mg/L najviša aktivnost PPX bila je nakon 5 sati, a pri tretmanu koncentracijama 1,0 i 1,5 mg/L najviša aktivnost PPX zabilježena je nakon 48 sati.

Iz svih navedenih rezultata i grafičkih prikaza (Slika 15) vidljive su određene razlike u djelovanju AgNO<sub>3</sub> i AgNP-PVP na aktivnost PPX u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze. Maksimalna vrijednost aktivnosti PPX pri tretmanu s AgNP-PVP postignuta je nakon 5 sati tretmana koncentracije 0,5 mg/L i bila je viša u odnosu na maksimalnu aktivnost PPX pri tretmanu s AgNO<sub>3</sub>, koja je postignuta nakon 48 sati tretmana koncentracije 1,0 mg/L.



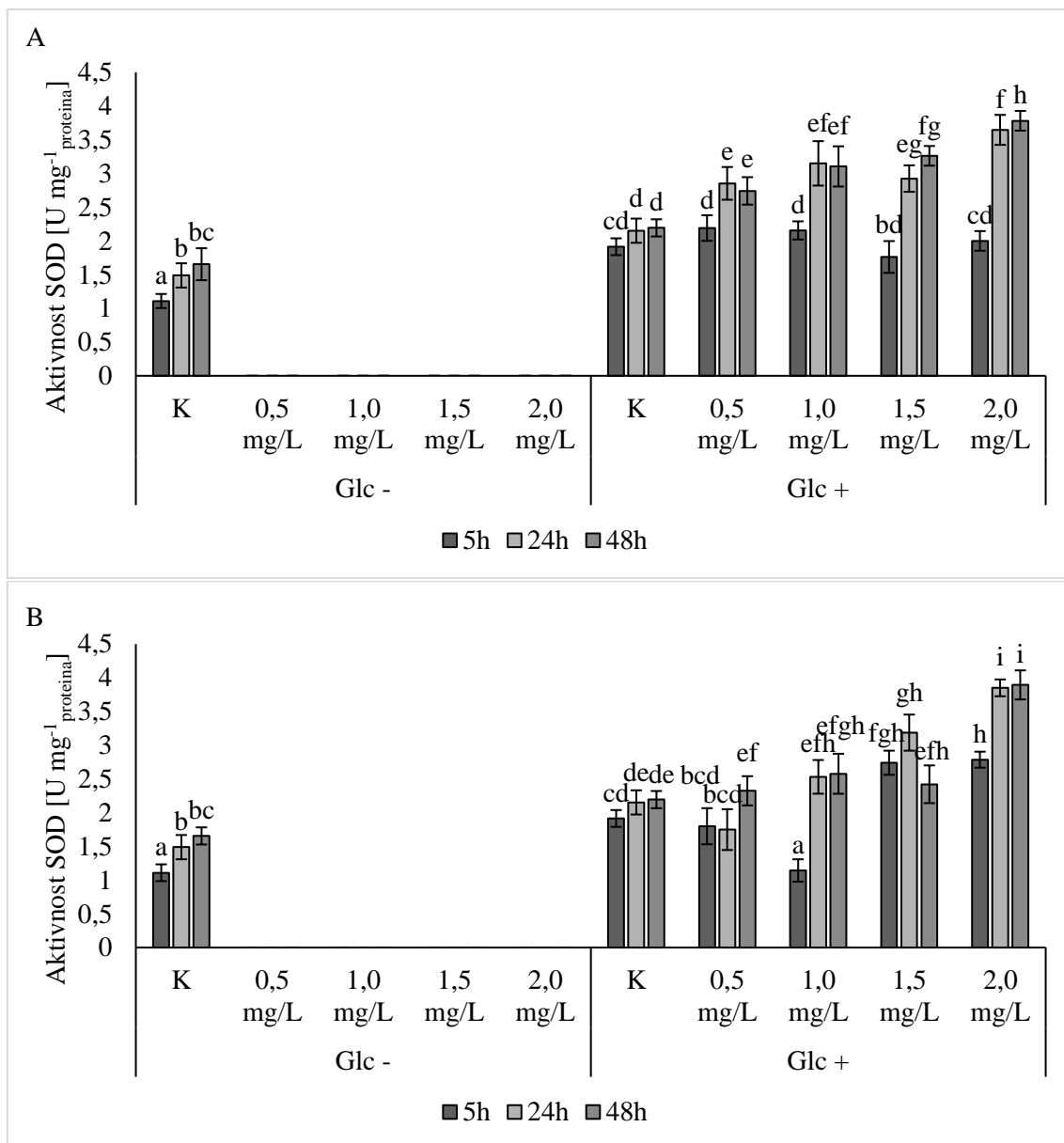
Slika 15. Aktivnost pirogalol peroksidaze u stanicama alge *C. vulgaris* nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> koncentracija 0,5, 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L. Prikazane su vrijednosti za kontrolnu skupinu (K) i vrijednosti dobivene nakon primjene tretmana u trajanju 5, 24 i 48 sati na alge uzgojene na podlozi bez dodatka glukoze (Glc -) i podlozi s dodatkom 1 %-tne glukoze (Glc +). A) Tretman algi s AgNP-PVP, B) Tretman algi s AgNO<sub>3</sub>. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti aktivnosti pirogalol peroksidaze za šest bioloških replika ± standardna pogreška. Mala tiskana slova označavaju razlike između različitih koncentracija i različitog vremena trajanja tretmana na istom tipu podloge (ili Glc - podloga ili Glc + podloga). Velika tiskana slova označavaju razlike između različitih koncentracija i različitog vremena trajanja tretmana između različitih tipova podloga (Glc - i Glc + podloge). Različita slova na stupcima, predstavljaju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0,05$ ; Newman-Keuls test).

#### 4.10.4. Aktivnost superoksid dismutaze

U kontrolnim skupinama alga uzgojenih na podlozi bez dodatka glukoze aktivnost SOD statistički se značajno promijenila nakon 24 i 48 sati tretmana u odnosu na tretman trajanja 5 sati, dok se u kontrolnim skupinama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze aktivnost SOD nije se statistički značajno mijenjala kroz vrijeme. Vrijednosti za tretirane skupine alga uzgojenih na podlozi bez glukoze nisu zabilježene jer nije bilo moguće izolirati dovoljnu količinu proteina za daljnje analize. Tretman svim ispitivanim koncentracijama AgNP-PVP u trajanju od 5 sati nije doveo do statistički značajne razlike aktivnosti SOD u stanicama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze u odnosu na kontrolu (Slika 16A). Nakon 24 i 48 sati došlo je do statistički značajnog povećanja aktivnosti SOD u stanicama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze pri tretmanu s AgNP-PVP svih koncentracija. Pri svim koncentracijama tretmana statistički značajnu razliku zabilježila sam nakon 24 i 48 sati tretmana s AgNP-PVP u odnosu na tretman trajanja 5 sati, a samo pri koncentraciji 2,0 mg/L statistički značajna razlika zabilježena je i nakon 48 sati tretmana u odnosu na 24 sata tretmana. Aktivnost SOD pri tretmanu s AgNP-PVP u stanicama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze povećavala se proporcionalno koncentraciji primijenjenog tretmana.

Što se tiče tretmana s AgNO<sub>3</sub>, zabilježila sam statistički značajan pad aktivnosti SOD u stanicama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze u odnosu na kontrolu nakon 5 sati pri koncentraciji 1,0 mg/L, ali i povećanje aktivnosti SOD pri koncentracijama 1,5 i 2,0 mg/L (Slika 16B). Nakon 24 sata, statistički značajan porast aktivnosti SOD u stanicama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze u odnosu na kontrolu primijetila sam pri tretmanu s AgNO<sub>3</sub> koncentracije 1,5 i 2,0 mg/L, a nakon 48 sati samo pri koncentraciji 2,0 mg/L. Pri tretmanu s AgNO<sub>3</sub> koncentracije 0,5 mg/L statistički značajna promjena aktivnosti dogodila se nakon 48 sati tretmana u odnosu na 5 i 24 sata tretmana, a pri tretmanu koncentracije 1,5 i 2,0 mg/L statistički značajnu promjenu zabilježila sam nakon 24 i 48 sati u odnosu na tretman u trajanju 5 sati.

Iz svih navedenih rezultata i grafičkih prikaza (Slika 16) vidljivo je da je tretman s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> u stanicama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze imao sličan učinak na aktivnost SOD. Pri oba tretmana maksimumi aktivnosti SOD postignuti su pri koncentraciji 2,0 mg/L nakon 48 sati tretmana i vrijednosti su približno jednake. Jedina značajna razlika je da je tretman s AgNP-PVP već pri nižim koncentracijama tretmana uzrokovao veliko povećanje aktivnosti SOD, u odnosu na tretman s AgNO<sub>3</sub>.



Slika 16. Aktivnost superoksid dismutaze u stanicama alge *C. vulgaris* nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> koncentracija 0,5, 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L. Prikazane su vrijednosti za kontrolnu skupinu (K) i vrijednosti dobivene nakon primjene tretmana u trajanju 5, 24 i 48 sati na alge uzgojene na podlozi bez dodatka glukoze (Glc -) i podlozi s dodatkom 1 %-tne glukoze (Glc +). A) Tretman algi s AgNP-PVP, B) Tretman algi s AgNO<sub>3</sub>. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti aktivnosti superoksid dismutaze za šest bioloških replika ± standardna pogreška. Mala tiskana slova označavaju razlike između različitih koncentracija i različitog vremena trajanja tretmana na istom tipu podloge (ili Glc – podloga ili Glc + podloga). Velika tiskana slova označavaju razlike između različitih koncentracija i različitog vremena trajanja tretmana između različitih tipova podloga (Glc – i Glc + podloga). Različita slova na stupcima, predstavljaju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0,05$ ; Newman-Keuls test.).

#### 4.11. Analiza rezultata dobivenih transmisijskom elektronskom mikroskopijom

##### 4.11.1. Vizualizacija stanica alge u nativnim uvjetima

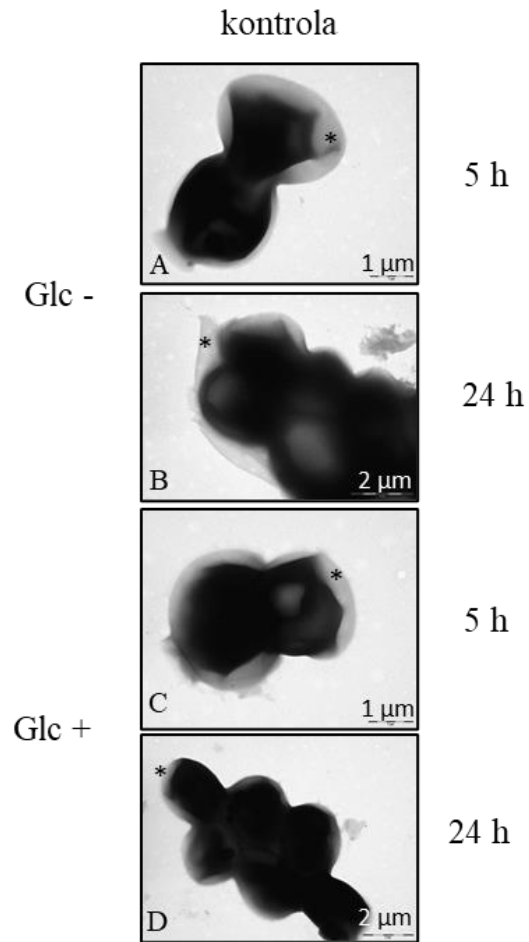
Kontrolne stanice alga uzgojene na mediju bez dodatka glukoze i s dodatkom glukoze prikazane su na Slici 17. Kontrolne stanice nakon 5 sati uglavnom su prisutne pojedinačno ili u paru (Slika 17A i 17C), dok su nakon 24 sata pretežno u nakupinama (Slika 17B i 17D), a oko njih se nalazi vrlo malo omotača izvanstaničnih polimernih suspcstancu (EPS) (Slika 17, zvjezdica) u kojem nisam uočila AgNP. Nakon 5 sati tretmana s AgNP-PVP koncentracije 1,5 mg/L, alge uzgojene na podlozi bez glukoze uglavnom su vizualizirane u nakupinama (Slika 18A), a oko njih zamijećena je i veća količina omotača EPS u odnosu na kontrolu u kojem sam uočila AgNP (Slika 18B i C; crvena strelica). Osim stanica u nakupini pronašla sam i pojedinačne stanice obložene s puno omotača EPS-a u kojem se mogu uočiti i AgNP (Slika 18B i C). Nakon 24 sata tretmana s AgNP-PVP iste koncentracije, alge uzgojene na podlozi bez glukoze uglavnom su u nakupinama, obložene velikom količinom omotača EPS-a u kojem su pronađene i AgNP (Slika 18D, E i F; crvena strelica). Stanice alga uzgojene na podlozi s dodatkom glukoze nakon 5 sati tretmana s AgNP-PVP koncentracije 1,5 mg/L, vizualizirane su kao stanice u nakupinama i kao pojedinačne stanice (Slika 18G i H). Uočena je manja količina omotača EPS-a oko stanica algi (Slika 18 G i H; zvjezdica) u odnosu na alge koje su rasle na podlozi bez dodatka glukoze i u odnosu na kontrolu. U omotaču uočila sam i AgNP (Slika 18H i I; crvena strelica). Nakon 24 sata tretmana s AgNP-PVP iste koncentracije stanice alga uzgojene u mediju s dodatkom glukoze vizualizirane su kao pojedinačne stanice i stanice u nakupinama (Slika 18J i K). Zamijetila sam puno manju količinu omotača EPS-a oko stanica u odnosu na alge uzgojene na podlozi bez dodatka glukoze. U omotaču EPS uočila sam AgNP (Slika 18L; crvena strelica)

Nakon 5 sati tretmana s AgNO<sub>3</sub> koncentracije 1,5 mg/L, alge uzgojene na podlozi bez dodatka glukoze uglavnom su u nakupinama, oko kojih je vidljiva velika količina omotača EPS-a, u kojem su pronađene AgNP (Slika 19A i B; crvena strelica). Nakon 24 sata tretmana s AgNO<sub>3</sub> iste koncentracije, alge uzgojene na podlozi bez dodatka glukoze i dalje su uglavnom bile u nakupinama, ali sam pronašla i pojedinačne stanice oko kojih je vidljiva velika količina omotača EPS-a s AgNP (Slika 19C, D i E; crvena strelica). Alge uzgojene na podlozi s dodatkom glukoze nakon 5 sati tretmana s AgNO<sub>3</sub> koncentracije 1,5 mg/L uglavnom su u nakupinama, s manjom količinom omotača EPS-a u kojem nisam zamijetila AgNP (Slika 19F i G). Nakon 24 sata tretmana s AgNO<sub>3</sub> iste koncentracije, alge uzgojene na podlozi s dodatkom

glukoze uglavnom su bile u nakupinama, iako sam uočila i pojedinačne stanice (Slika 19H i I). Nadalje, uočila sam i manju količinu omotača EPS oko samih stanica kao i manju količinu AgNP u omotaču u odnosu na alge koje su rasle na podlozi bez glukoze (Slika 19I i J; crvena strelica).

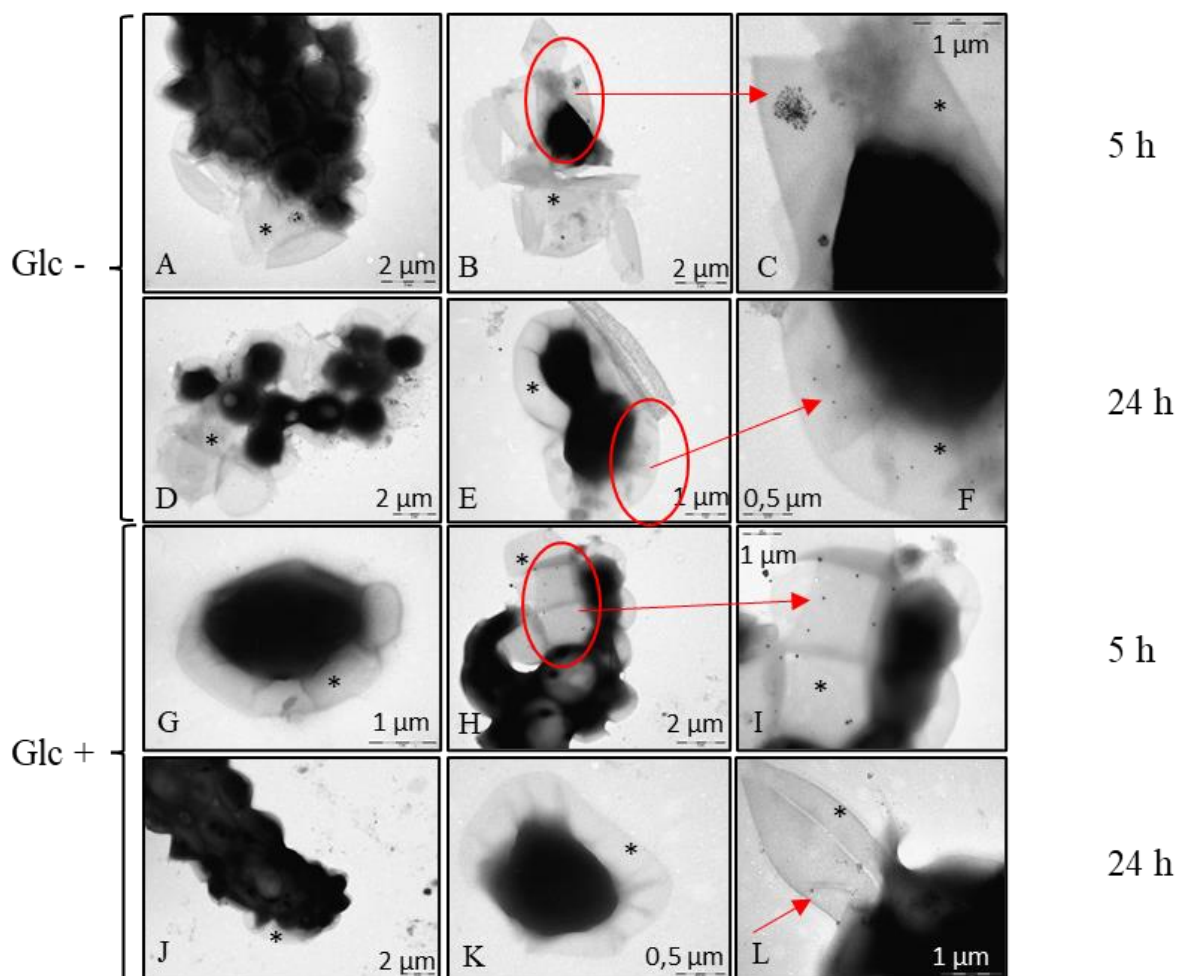
Iz snimki dobivenih TEM-om vidljive su razlike u učinku AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> na stanice alga u nativnim uvjetima. U staničnim suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez dodatka glukoze nakon tretmana s AgNO<sub>3</sub>, u odnosu na tretman s AgNP-PVP, zamijetila sam veću količinu omotača EPS oko stanica algi u kojem sam uočila i veliku količinu AgNP. U staničnim suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze situacija je obrnuta. Uočila sam nešto veću količinu omotača EPS oko stanica alge tretirane s AgNP-PVP u kojem sam zamijetila i AgNP. Najmanju količinu omotača EPS zamijetila sam oko stanica algi tretiranih s AgNO<sub>3</sub> u kojem sam uočila i najmanje AgNP.





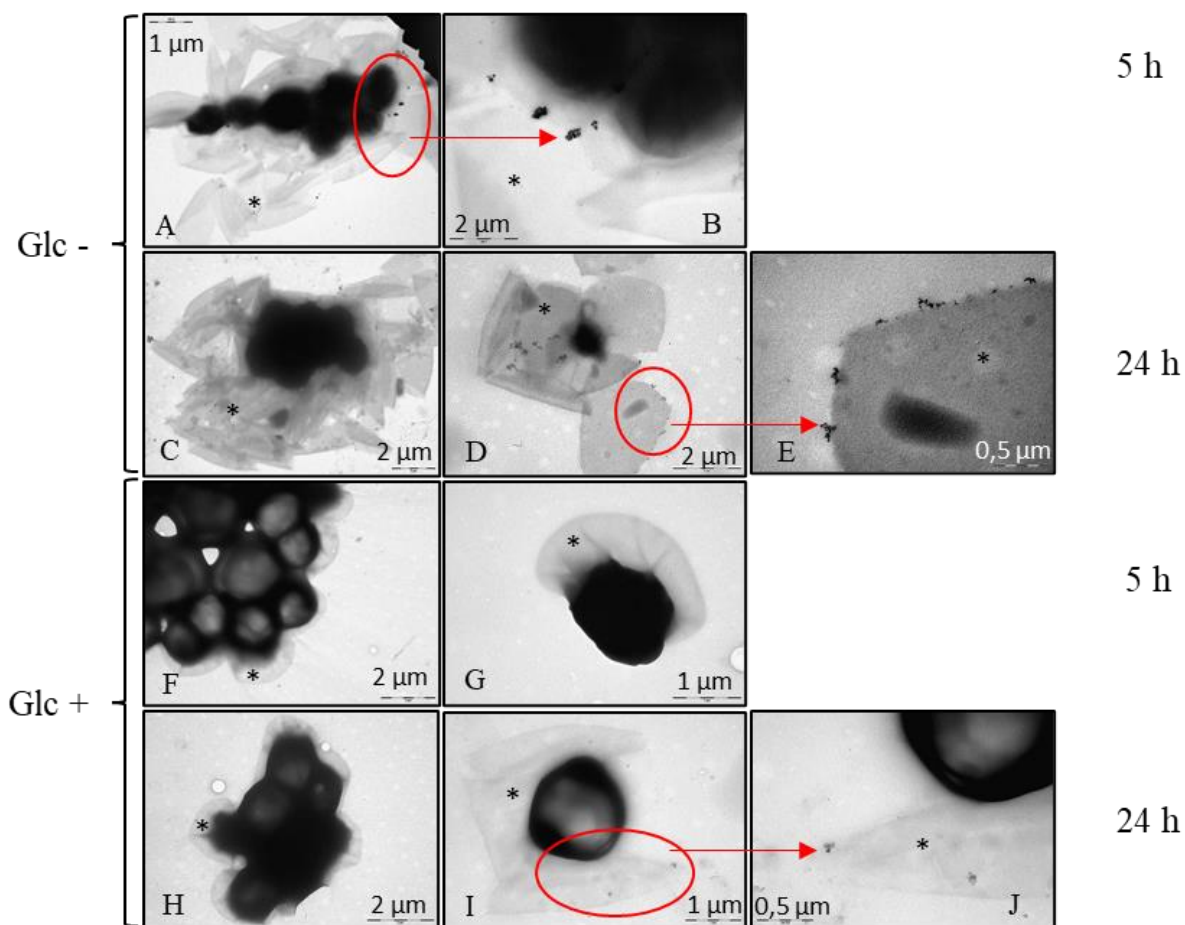
Slika 17. Vizualizacija kontrolnih stanica alge *C. vulgaris* uzgojene na podlozi A) i B) bez dodatka glukoze (Glc -) i na podlozi C) i D) s dodatkom 1 %-tne glukoze (Glc +) u nativnim uvjetima. Prikazane su snimke dobivene nakon 5 sati (A i C) i 24 sata uzgoja (B i D). Zvezdicom je označen EPS.

## AgNP-PVP



Slika 18. Vizualizacija stanica alge *C. vulgaris* uzgojene na podlozi A) - F) bez dodatka glukoze (Glc -) i na podlozi G) - L) s dodatkom 1 %-tne glukoze (Glc +) u nativnim uvjetima nakon tretmana s AgNP-PVP koncentracije 1,5 mg/L. Prikazane su snimke dobivene nakon 5 sati tretmana (A - C i G - I) i 24 sata tretmana (D - F i J - L). Crveni krug prikazuje dio uzorka koji je uvećan i prikazan na slikama desno (C, F, I), crvene strelice označavaju pozicije AgNP, a zvjezdicom je označen EPS.

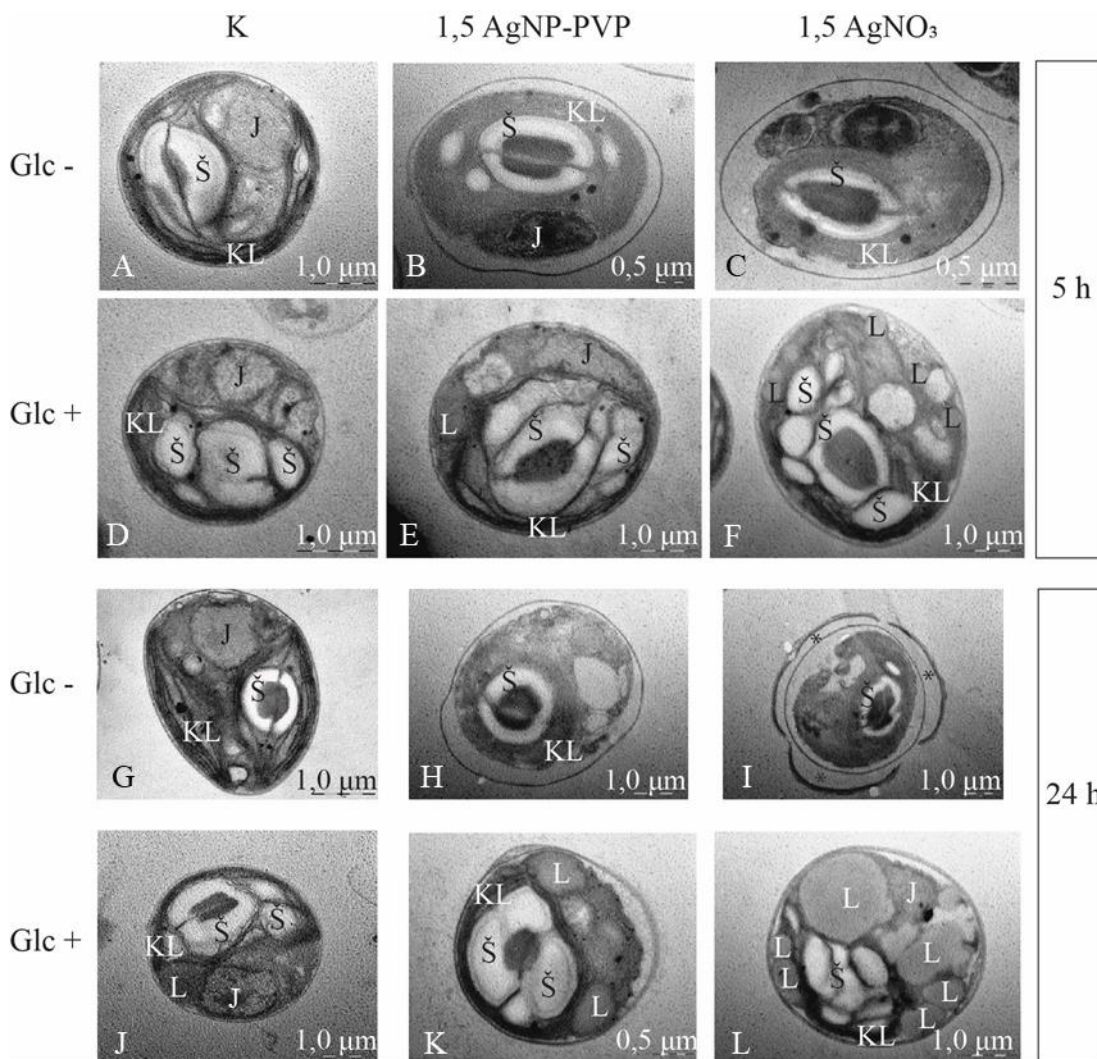
AgNO<sub>3</sub>



Slika 19. Vizualizacija stanica alge *C. vulgaris* uzgojene na podlozi A) – E) bez dodatka glukoze (Glc -) i na podlozi F) – J) s dodatkom 1 %-tne glukoze (Glc +) u nativnim uvjetima nakon tretmana s AgNO<sub>3</sub> koncentracije 1,5 mg/L. Prikazane su snimke dobivene nakon 5 sati tretmana (A, B, F i G) i 24 sata tretmana (C – E i H – J). Crveni krug prikazuje dio uzorka koji je uvećan i prikazan na slikama desno (B, E, J), crvene strelice označavaju pozicije AgNP, a zvjezdicom je označen EPS.

#### 4.11.2. Ultrastruktura stanica alge *C. vulgaris*

Kontrolne skupine alga uzgojene na podlozi s dodatkom glukoze i bez dodatka glukoze imale su dobro zavijen kloroplast sa škrobnim zrcem, vidljivu jezgru i pokoju lipidnu kapljicu (Slika 20A, D, G i J). Nakon 24 sata nisam uočila promjene u ultrastrukturi kod kontrolnih skupina alga uzgojenih na podlozi s dodatkom i bez dodatka glukoze. Tretman s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> koncentracije 1,5 mg/L u suspenziji stanica alge *C. vulgaris* uzgojene na podlozi s dodatkom glukoze i bez dodatka glukoze nakon 5 i 24 sata doveo je do promjena u ultrastrukturi stanica (Slika 20). U suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez glukoze, već nakon 5 sati uočila sam značajne promjene u ultrastrukturi stanica koje su vidljive prvenstveno u staničnoj plazmolizi (Slika 20B i C), dok sam u stanicama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze primijetila da ima više škroba pri oba tretmana, a integritet stanica nije bio narušen (Slika 20E i F). Stanice alga uzgojene na podlozi bez glukoze nakon 24 sata pokazuju još drastičnije promjene, plazmoliza stanica je još izraženija i dolazi do mjestimičnog puknuća stanične stijenke (Slika 20H i I). U stanicama alga uzgojenih na podlozi bez glukoze i tretiranih s AgNO<sub>3</sub> nakon 24 sata može se uočiti i omotač EPS kojeg sam vizualizirala u nativnim uvjetima, i tu je učinak tretmana najveći (Slika 20I, zvjezdica). Nakon 24 sata, u stanicama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze zamijetila sam početak plazmolize kod oba tretmana te povećan broj lipidnih kapljica u odnosu na kontrolnu skupinu algi (Slika 20K i L).



Slika 20. Promjene ultrastrukture stanica alge *C. vulgaris* uzgojene na podlozi A) – C) i G) – I) bez glukoze (Glc -) i na podlozi D) – F) i J) – L) s dodatkom 1 %-tne glukoze (Glc +) nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> koncentracije 1,5 mg/L. Prikazani su rezultati kontrolnih skupina alge (K) i rezultati dobiveni nakon 5 sati tretmana (A – F) i 24 sata tretmana (G – L). Slovo Š označava škrob, KL označava kloroplast, L označava lipidne kapljice, J označava jezgru, zvjezdicom je označen EPS.

## 5. RASPRAVA

Nanočestice srebra zbog svojih su jedinstvenih karakteristika danas sve češće prisutne u komercijalnim proizvodima i pronašle su svoje mjesto u svakodnevnoj upotrebi. Razgradnjom tih proizvoda nanočestice dospijevaju u okoliš i dolaze u interakciju s organizmima koji žive u njemu, stoga se sve više istražuje problem njihove toksičnosti. Većina dosadašnjih istraživanja bazirala su se na mikroorganizmima (Fabrega i sur., 2009; Chatterjee i sur., 2011; Rajput i sur., 2018; Grün i sur., 2019), animalnim stanicama (Sahu i sur., 2014; Sykes i sur., 2014; Korani i sur., 2015; Falagan-Lotsch i sur., 2016; Brohi i sur., 2017), a u nešto manjoj mjeri na mikroalgama (Oukarroum i sur., 2012; Hazeem i sur., 2019; Romero i sur., 2020), međutim svega je nekoliko istraživanja bilo usmjereno na učinak nanočestica u uvjetima uzgoja s dodatkom glukoze (El-Naggar i El-Sheekh, 1998; Marchello i sur., 2018). Stoga je cilj ovog istraživanja bio donijeti nove spoznaje i dati sveobuhvatniju informaciju o toksičnosti nanočestica u miksotrofnim uvjetima uzgoja alga.

Iz ranijih istraživanja poznato je da nanočestice srebra nisu izrazito stabilne molekule i da u vodenim otopinama agregiraju čime se njihova svojstva znatno mijenjaju (Zhang i sur., 2012). Stoga sam u ovom istraživanju ispitala stabilnost nanočestica i iona srebra u hranjivoj BBM podlozi korištenoj za uzgoj alga s dodatkom glukoze i bez dodatka glukoze. U BBM podlozi s dodatkom i bez dodatka glukoze apsorpcijski spektar za AgNP-PVP ima karakterističan pik na 420 nm koji predstavlja čestice srebra. Također, može se vidjeti da u BBM podlozi s dodatkom glukoze apsorpcija tog pika raste nakon 2 sata i postaje stabilna nakon 5 sati, dok u BBM podlozi bez dodatka glukoze također raste nakon 2 sata i postaje stabilna nakon 24 sata. Mogući uzrok rasta apsorpcije je što u postupku sinteze AgNP-PVP može ostati nešto neiskorištenih  $\text{Ag}^+$  iona koji mogu uzrokovati povećanje apsorpcije, što ukazuje na dodatno stvaranje čestica srebra. U BBM podlozi s dodatkom glukoze apsorpcijski spektar za  $\text{AgNO}_3$  nakon 1 sata ima karakterističan pik na 420 nm koji predstavlja srebro, što bi značilo da nastaju nanočestice srebra. Apсорbancija toga pika raste kroz 3. i 4. sat, zatim pada u 5. satu i ostaje stabilna u 24. i 48. satu od početka tretmana. U BBM podlozi bez dodatka glukoze na apsorpcijskom spektru za  $\text{AgNO}_3$  uočila sam karakterističan pik nakon 1 sata, čija apsorpcija je rasla do 3 sata (i tu je bila najviša), a zatim je postupno padala i nakon 48 sati došla do vrijednosti slične onoj nakon 1 sata. Ovakva razlika u odnosu na AgNP-PVP vjerojatno se javlja zbog činjenice da ionsko srebro nije stabilizirano i  $\text{Ag}^+$  ioni mogu reagirati s raznim spojevima unutar hranjive podloge i stvoriti nove AgNP, dok se koncentracija AgNP-PVP ne mijenja značajno kad postigne stabilnost u hranjivoj podlozi. Osim toga, kontrolne otopine

ultračiste vode s dodatkom  $\text{AgNO}_3$  nisu imale karakterističan pik na 420 nm, nego su njihovi apsorpcijski spektri imali pik na oko 320 nm. Taj pik na oko 320 nm vjerojatno je posljedica prisutnosti nitratnih iona u otopini (Nakamura i sur., 2011).

U ovom istraživanju suspenzije alge *C. vulgaris* izlagane su tretmanu s AgNP-PVP i  $\text{AgNO}_3$  u eksponencijalnoj fazi rasta koju sam odredila pomoću krivulje rasta da nastupa 3. dan od nasadivanja alga u hranjivu podlogu. Suspenzije alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze ulazile su u stacionarnu fazu tek oko 14. dana, dok je kod suspenzija alga uzgajanih na podlozi bez dodatka glukoze stacionarna faza nastupila već oko 4. dana. Također, suspenzije alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze dostigle su broj stanica koji je bio za jedan red veličine veći od broja stanica u suspenzijama alga uzgajanih na podlozi bez dodatka glukoze. To je u korelaciji s ranijim istraživanjima koja su pokazala da dolazi do povećanja broja stanica i ubrzanog rasta u kulturama alga uzgajanih s dodatkom glukoze (Deng i sur., 2019; Nouri i sur., 2020). Takav porast broja stanica sudeći po ranijim istraživanjima vjerojatno je rezultat akumulacije masnih kiselina u algama (Feng i sur., 2004).

Nakon tretmana suspenzija alge *C. vulgaris* s različitim koncentracijama AgNP-PVP i  $\text{AgNO}_3$  u trajanju od 5, 24 i 48 sati došlo je do značajnijih promjena u boji staničnih kultura kod algi uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze i bez dodatka glukoze. Kontrolne suspenzije alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze postupno su postajale tamnozeleno boje, dok su kontrolne suspenzije alga uzgajanih na podlozi bez dodatka glukoze bile svijetlo-zelene boje čitavo vrijeme trajanja eksperimenta. Alge na podlozi s dodatkom glukoze rastu brže, što je vidljivo iz rezultata dobivenih brojanjem stanica u suspenziji, stoga su ove kulture tamnije boje od kultura alga uzgajanih na podlozi bez dodatka glukoze. Također, iz apsorpcijskih spektara za klorofil *a* i *b* dobivenih spektrofotometrijskim mjerenjem vidljivo je da su apsorbancije suspenzija alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze puno veće u odnosu na apsorbancije suspenzija alga uzgojenih na podlozi bez dodatka glukoze pri oba tretmana, što je u skladu s izgledom i bojom kultura nakon tretmana. Isto tako, u kulturama alga uzgajanih na podlozi bez dodatka glukoze uočen je početak kloroze stanica u vidu postepenog gubitka zelene boje same suspenzije stanica alga, već nakon 5 sati pri najnižoj koncentraciji AgNP-PVP i  $\text{AgNO}_3$ . S druge strane, u kulturama alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze početak kloroze događa se nakon 24 sata pri tretmanu s AgNP-PVP koncentracija 1,5 i 2,0 mg/L, a nakon 48 sati zadržava se samo pri tretmanu s koncentracijom 2,0 mg/L. Tretman s  $\text{AgNO}_3$  pokazao je veći učinak, s obzirom da je do pojave kloroze došlo nakon 24 sata pri koncentracijama 1,0, 1,5 i 2,0 mg/L, a nakon 48 sati pri koncentracijama 1,5 i 2,0 mg/L. Takvu pojavu zabilježila su i neka ranija

istraživanja učinka nanočestica, koja taj učinak pripisuju gubitku ili smanjenju klorofila uslijed puknuća staničnih membrana, te izmjenama u strukturi klorofila uslijed tretmana s nanočesticama, što je najvjerojatniji uzrok tog učinka i u ovom istraživanju (Zhang i sur., 2019; Djearmane i sur., 2019). Suspenzije alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze bile su otpornije na tretman i uspješno su se oporavile nakon pojave kloroze nakon 24 sata pri koncentraciji 1,5 mg/L AgNP-PVP, odnosno koncentracijama 1,0 i 1,5 mg/L, pa se nakon 48 sati kloroza zadržala samo pri najvećoj koncentraciji oba tretmana. Dobiveni rezultati stoga ukazuju na povećanu klorozu stanica algi na podlozi bez glukoze nakon 24 i 48 sati pri oba tretmana te jaču klorozu stanica algi na podlozi s glukozom nakon 24 i 48 sati pri najvećoj koncentraciji tretmana s AgNO<sub>3</sub>.

Kako bih utvrdila učinak nanočestica i iona srebra na vijabilnost alge *C. vulgaris* stanice sam promatrala pod fluorescencijskim mikroskopom nakon primjene boje propidij-jodid. Propidij-jodid ulazi u stanice kroz oštećenja na membranama i stanice fluoresciraju crveno, pa je dobar alat za provjeru vijabilnosti stanica. Već nakon 5 sati tretmana suspenzija alga uzgajanih na podlozi bez dodatka glukoze pri najnižoj koncentraciji oba tretmana postotak neživih stanica bio je oko 60 %. U suspenzijama alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze, postotak neživih stanica nakon 5 sati pri najnižim koncentracijama oba tretmana bio je oko 5 %. Nakon 5 sati u suspenzijama alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze tek pri tretmanu s AgNP-PVP koncentracije 2,0 mg/L postotak neživih stanica dostiže vrijednost 70 %, a pri tretmanu s AgNO<sub>3</sub> koncentracije 1,0 mg/L dostiže vrijednost 50 %. Postotak neživih stanica povećavao se proporcionalno s koncentracijom tretmana i s duljinom trajanja tretmana. U suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez dodatka glukoze konačni postotak neživih stanica nakon 48 sati bio je značajno viši nego u suspenzijama alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze, što govori da miksotrofan način života omogućava tim algama da prevladaju toksični učinak oba tretmana. Iz ovih rezultata moguće je zaključiti da je došlo do oštećenja stanica uslijed tretmana, što je dovelo do smrti određenog broja stanica. Ovi rezultati u korelaciji su s ranijim istraživanjima koja pokazuju smanjenu vijabilnost alge *C. vulgaris* nakon tretmana s nanočesticama srebra (Oukarroum i sur., 2012). Također, rezultati vijabilnosti stanica usporedivi su s rezultatima koje sam dobila brojeći stanice u suspenziji. Vijabilnost stanica, odnosno postotak neživih stanica u suspenziji smanjuje se s porastom koncentracije i duljinom izlaganja tretmanu, jednako kao i broj stanica. Isto tako, broj stanica alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze smanjuje se sporije nego broj stanica alga uzgajanih na podlozi bez dodatka



glukoze, jednako kao i postotak neživih stanica u suspenziji, što pokazuje da su oba tretmana toksičnija za alge uzgajane na podlozi bez dodatka glukoze.

Jedan od promatranih parametara u ovom istraživanju bila je i pH vrijednost u suspenziji alga nakon tretmana s  $\text{AgNO}_3$  i  $\text{AgNP-PVP}$ . U suspenziji alga uzgajanih na podlozi bez dodatka glukoze, pH vrijednost nije se značajno mijenjala u ovisnosti o koncentraciji primijenjenog tretmana, nego je ostala približno jednaka kontroli nakon 5 sati. U kontrolnim suspenzijama alga uzgojenih na oba tipa hranjive podloge došlo je do povećanja pH vrijednosti nakon 24 i 48 sati tretmana, a isti porast zabilježen je i nakon tretmana u suspenzijama alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze. Alge tijekom procesa fotosinteze troše ugljikov dioksid, pa pH vrijednost u suspenziji raste, stoga je zabilježen rast u kontrolnim skupinama alga, gdje se fotosinteza neometano vrši (Gerardi i Lytle, 2015). Navedeni porast pH vrijednosti u suspenziji alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze nakon tretmana s  $\text{AgNP-PVP}$  zabilježen je i u ranijim istraživanjima (Deng i sur., 2019). U tom istraživanju, primijetili su prvotno smanjenje pH u suspenziji alga, a zatim povećanje pH vrijednost uslijed trošenja glavne glukoze zbog prelaska alge na autotrofni način života. U suspenzijama alga uzgajanih na podlozi bez dodatka glukoze posljedično se takav porast pH vrijednosti nije mogao dogoditi, stoga pH vrijednost stagnira nakon tretmana.

Ranija istraživanja pokazala su da tretman s nanočesticama metala može utjecati na promjene u koncentraciji fotosintetskih pigmenta i poremećaje u fotosintetskim procesima (Hazeem i sur., 2019; Li i sur., 2020). U svojem istraživanju to sam provjerila određivanjem stope fotosinteze pomoću uređaja Chlorolab i spektrofotometrijskim određivanjem apsorpcijskih spektara klorofila. Pokusi su pokazali da u suspenzijama alga uzgajanih na oba tipa hranjive podloge dolazi do smanjenja stope fotosinteze nakon tretmana s  $\text{AgNP-PVP}$  i  $\text{AgNO}_3$ . U suspenzijama alga uzgajanih na podlozi bez dodatka glukoze stopa fotosinteze ubrzo se smanjuje na vrijednost nula, čak i pri nižim koncentracijama tretmana. Alge uzgajane na podlozi s dodatkom glukoze ponovno pokazuju veću otpornost na navedeni tretman, vjerojatno zbog toga što je korištenjem glukoze kroz proces staničnog disanja omogućena intenzivnija sinteza i drugih organskih molekula, uključujući fotosintetske pigmente, pa je stoga stopa u tim suspenzijama znatno viša. Osim toga, iz apsorpcijskih spektara dobivenih spektrofotometrijom, vidljivo je da se u suspenzijama alga uzgajanih na podlozi bez dodatka glukoze događa značajno veće smanjenje koncentracije klorofila (što se može zaključiti iz smanjenja apsorbancije) u odnosu na suspenzije alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze. U suspenzijama alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze potpuni nestanak pika (između 435 i 440 nm)

apsorpcijskog spektra koji predstavlja klorofil *a* događa se jedino nakon 48 sati pri tretmanu s AgNP-PVP koncentracije 2,0 mg/L, kada je i stopa fotosinteze najniža. Učinak AgNO<sub>3</sub> na koncentraciju klorofila *a* puno je blaži. U suspenzijama alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze ne događa se potpuni nestanak pika, iako se koncentracija klorofila *a* smanjuje uslijed tretmana, dok se u suspenzijama alga uzgajanih na podlozi bez dodatka glukoze potpuni nestanak pika događa samo nakon 48 sati pri tretmanu s AgNO<sub>3</sub> koncentracije 2,0 mg/L. Iste rezultate dobili su i Zheng i sur. (2019) kad su istraživali ulogu EPS-a u toksičnom učinku AgNO<sub>3</sub> i AgNP-PVP na algu *C. vulgaris*. Oni su pokazali da se sadržaj klorofila *a* u stanici smanjuje primjenom tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub>, s time da je smanjenje bilo statistički značajno veće nakon tretmana s AgNP-PVP u odnosu na AgNO<sub>3</sub>. Mogući uzrok tome je što je kod alga tretiranih s AgNO<sub>3</sub> veliki broj novonastalih čestica zapeo u EPS-u, što je vidljivo iz slika dobivenih TEM-om, pa učinak nije bio toliko jak kao nakon tretmana s AgNP-PVP.

Istraživanja učinka nanočestica i iona srebra do sada također su pokazala da tretman s AgNP i AgNO<sub>3</sub> u algama može dovesti do povećanog stvaranja ROS-ova i posljedično, oksidacijskog stresa (Cirulis i sur., 2013). Kao najčešći parametar oksidacijskog stresa uzima se stupanj lipidne peroksidacije, stoga sam u ovom istraživanju provela spektrofotometrijsko određivanje sadržaja MDA u suspenzijama alga nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub>. Ovaj parametar pokazao se značajno višim nakon tretmana u suspenzijama alga uzgojenim na podlozi s dodatkom glukoze i bez dodatka glukoze u odnosu na kontrolu. Osim toga, u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi bez dodatka glukoze stupanj lipidne peroksidacije bio je značajno viši nego u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze. Dobiveni rezultat u korelaciji je s ranije spomenutim rezultatima koji pokazuju da su alge uzgajane na podlozi s dodatkom glukoze puno otpornije na oba tretmana, da pokazuju veću vijabilnost, te bolji rast i preživljenje nakon tretmana. Također, u suspenzijama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom i bez dodatka glukoze tretman s AgNO<sub>3</sub> imao je značajniji učinak na stupanj lipidne peroksidacije u odnosu na AgNP-PVP. Takav rezultat u skladu je s ranijim istraživanjem provedenim na pšenici (*Triticum aestivum*), gdje je dobiveno da AgNO<sub>3</sub> uzrokuje statistički značajno veći rast stupnja lipidne peroksidacije u odnosu na AgNP-PVP, i da AgNP-PVP pri nižim koncentracijama ne uzrokuje statistički značajnu promjenu stupnja lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu (Karimi i Mohsenzadeh, 2017).

Ovim istraživanjem htjela sam također utvrditi sposobnost obrane alge *C. vulgaris* od tretmana s nanočesticama i ionima srebra kroz spektrofotometrijsko mjerenje aktivnosti enzima antioksidacijskog sustava. Enzimi antioksidacijskog sustava imaju mogućnost uklanjanja viška

ROS-ova, čime štite stanicu od potencijalnih oštećenja, a u svom istraživanju analizirala sam aktivnost CAT, APX, PPX i SOD. Što se tiče stanica alga uzgojenih na podlozi bez dodatka glukoze, navedeni parametri nisu izmjereni jer nisam uspjela izolirati dovoljnu količinu proteina za analize. Samim time mogu zaključiti kako alge uzgojene na podlozi bez dodatka glukoze stvaraju puno manje proteina u odnosu na alge uzgojene na podlozi s dodatkom glukoze, s obzirom da resurse usmjeravaju prema važnijim procesima, kao što je rast. U stanicama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze većinom dolazi do povećanja aktivnosti svih promatranih enzima nakon primjene tretmana. Aktivnost CAT u stanicama alga uzgojenih na podlozi s dodatkom glukoze nakon tretmana s AgNP-PVP porasla je u odnosu na kontrolne stanice, a najveća je bila pri koncentraciji 2,0 mg/L. Tretman s AgNO<sub>3</sub> u trajanju 5 sati doveo je do najvećeg povećanja aktivnosti CAT pri koncentraciji 1,0 mg/L, dok je nakon 24 i 48 sati aktivnosti bila najveća pri koncentraciji 2,0 mg/L. Istraživanje koje su proveli Movafeghi i sur. (2019) također je zabilježilo fenomen povećanja aktivnosti CAT nakon tretmana s nižim koncentracijama nanočestica kadmijevog selenida (CdSeNP), te smanjenje aktivnosti CAT nakon tretmana s višim koncentracijama istih nanočestica. Takvo povećanje aktivnosti pri nižim koncentracijama NP može biti rezultat adaptivnih mehanizama u algi, dok smanjenje aktivnosti pri višim koncentracijama NP može biti posljedica oštećenja enzima uslijed prekomjernog nastanka ROS-ova. Aktivnost APX u stanicama alga uzgojenih na mediju s dodatkom glukoze većinom se povećavala nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> i nakon 5, 24 i 48 sati vrijednost je bila najveća pri koncentraciji 2,0 mg/L. Takav rezultat govori da je došlo do uspješne aktivacije obrambenih mehanizama u algama nakon tretmana nanočesticama putem ovog enzima, što je u skladu s ranijim istraživanjima na drugim algama (Fazelian i sur., 2020). Slično kao i APX, aktivnost PPX u stanicama alga nakon primjene tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> u trajanju 24 i 48 sati povećava se proporcionalno s koncentracijom tretmana, što govori o dobroj aktivaciji antioksidacijskih mehanizama. Međutim, nakon 5 sati tretmana s AgNP-PVP aktivnost PPX raste pri nižim koncentracijama, dok pri višim koncentracijama nije značajno različita od kontrole, a nakon tretmana s AgNO<sub>3</sub> u trajanju 5 sati dolazi do povećanja aktivnosti u odnosu na kontrolu, pri svim koncentracijama osim 1,5 mg/L. To može ponovno ukazivati da je prekomjerno nakupljanje ROS-ova uzrokovalo oštećenje ovog enzima i da zbog toga nije došlo do aktivacije, ili da trajanje tretmana nije bilo dovoljno dugo da bi se enzim aktivirao. Posljednji enzim čiju sam aktivnost mjerila, bio je SOD, za koji su ranija istraživanja pokazala povećanu aktivnost u algama i vodenim biljkama nakon tretmana s nanočesticama (Morelli i sur., 2012; Movafeghi i sur., 2019). Tretman stanica alga s AgNP-PVP u trajanju 24 i 48 sati pokazao je značajno povećanje aktivnosti SOD proporcionalno s primijenjenom

koncentracijom tretmana, dok nakon 5 sati nije bilo značajne razlike. Tretman s  $\text{AgNO}_3$  u trajanju 5 i 24 sata pokazao je značajno povećanje aktivnosti SOD pri višim koncentracijama, dok pri nižim promjene nije bilo ili je aktivnost bila manja. Nakon 48 sati, aktivnost SOD značajno se povećala samo pri tretmanu s  $\text{AgNO}_3$  koncentracije 2,0 mg/L. Neka ranija istraživanja pokazala su veću aktivnost SOD prilikom tretmana s  $\text{AgNO}_3$  u odnosu na AgNP-PVP (Khan i sur., 2019), što je oprečno rezultatima dobivenim u ovom istraživanju. Međutim, prema istraživanju koje su proveli Leonardo i sur. (2016), ioni srebra u nižim koncentracijama prvotno se zadržavaju u citosolu u ionskom obliku, i kada dolazi do povećanja njihove koncentracije, reduciraju se i nastaju nanočestice koje se nakupljaju na staničnim površinama i u samim organelima, pretežno u kloroplastima i mitohondrijima. Ta činjenica mogla bi objasniti dobivene rezultate, gdje je aktivnost SOD bila veća samo pri višim koncentracijama tretmana, što može govoriti da je do aktivacije enzima došlo uslijed stvaranja nanočestica u organelima gdje je SOD primarno lokalizirana.

Alge sam vizualizirala TEM-om u nativnim uvjetima kako bih utvrdila potencijalne promjene u stanicama nakon tretmana. Primijetila sam da su stanice alga uzgajanih na podlozi bez dodatka glukoze nakon tretmana s AgNP-PVP i  $\text{AgNO}_3$  puno češće u nakupinama i okružene s više EPS-a u kojem se nalaze nanočestice srebra. Stanice alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze nakon tretmana s AgNP-PVP i  $\text{AgNO}_3$  nalaze se kao pojedinačne u suspenziji, okružuje ih manje EPS-a s puno manje AgNP u odnosu na stanice alga uzgajanih na podlozi bez dodatka glukoze. Takav rezultat u skladu je s nekim ranijim istraživanjima koja su pokazala da dodatak glukoze na podlozi za uzgoj alga uzrokuje smanjenje količine EPS-a (Wu i sur., 2011). Međutim, postoje i brojna oprečna istraživanja koja tvrde da se u miksotrofnim uvjetima uzgoja događa akumulacija EPS-a (Ding i sur., 2013; Cheirsilp i sur., 2016), stoga je potrebno dalje istraživati učinak glukoze na količinu EPS-a. Također, neka istraživanja pretpostavljaju da je prisutnost veće količine AgNP u stanicama povezana s većom toksičnošću (Sendra i sur., 2017), što korelira s drugim dobivenim parametrima u ovom istraživanju. Na ultrastrukturnoj razini, tretman s AgNP-PVP i  $\text{AgNO}_3$  doveo je do značajnijih promjena u morfologiji stanica alga. U stanicama alga uzgajanih na podlozi bez glukoze već nakon 5 sati tretmana s AgNP-PVP i  $\text{AgNO}_3$  koncentracije 1,5 mg/L dolazi do plazmolize, povećanja broja lipidnih tjelešaca, a nakon 24 sata stanična stijenka je narušena i stanica se izdužuje. Negativan učinak na stanice je izraženiji nakon tretmana s  $\text{AgNO}_3$  u odnosu na AgNP-PVP, s obzirom da nakon 24 sata dolazi do promjena u citoplazmi stanica i vidljiv je EPS koji okružuje stanicu. Takav rezultat u skladu je s istraživanjem na algi *C. pyrenoidosa* koje su napravili Zhou i sur.

(2016), gdje su snimke dobivene TEM-om pokazale veću toksičnost tretmana s  $\text{AgNO}_3$  u odnosu na AgNP iste koncentracije. Ioni srebra visoko su reaktivni u biološkim sustavima i mogu reagirati s ligandima kao što su kloridni ioni, tioli, peptidi i proteini, i tako mogu uzrokovati ovako značajne promjene u ultrastrukturi stanica (Zhang i Wang, 2018). U stanicama alga uzgajanih na podlozi s dodatkom glukoze promjene nisu toliko izražene, tek nakon 24 sata tretmana dolazi do blage plazmolize stanica.

Ovo istraživanje učinka glukoze na toksičnost AgNP-PVP i  $\text{AgNO}_3$  nudi mnogo korisnih spoznaja koje bi mogle biti temelj budućih istraživanja. S obzirom na većinu izmjerenih parametara pokazano je da je negativan učinak AgNP-PVP i  $\text{AgNO}_3$  puno izraženiji u algama uzgajanim na podlozi bez dodatka glukoze, u odnosu na one uzgajane na podlozi s dodatkom glukoze. Isto tako, najtoksičniji učinak pokazala je najviša ispitivana koncentracija 2,0 mg/L, što govori da je toksični učinak direktno proporcionalan primijenjenoj koncentraciji. Osim toga, za određene parametre vidljive su jasne razlike u tretmanu s AgNP-PVP i  $\text{AgNO}_3$ , koje bi bilo potrebno još istražiti kako bi se utvrdilo koji je oblik u konačnici toksičniji. Budući da je u ovom istraživanju analiza parametara provedena 48 sati od tretmana, za donošenje novih zaključaka potrebno je istražiti učinak AgNP-PVP i  $\text{AgNO}_3$  u duljem vremenskom periodu. Također, u budućim istraživanjima trebalo bi se osvrnuti na dodatak glukoze u drugim koncentracijama od one ispitivane u ovom radu i ispitati učinak nižih koncentracija AgNP-PVP i  $\text{AgNO}_3$  na promjene u algama.

## 6. ZAKLJUČAK

- Apsorpcijski spektar za AgNP-PVP izmjeren u Glc + BBM podlozi (alge uzgojene na podlozi s dodatkom glukoze) i Glc – BBM podlozi (alge uzgojene na podlozi bez dodatka glukoze) pokazao je karakterističan pik za čestice srebra na 420 nm. Sinteza AgNP-PVP u Glc + podlozi se stabilizirala nakon 5 sati, a u Glc - podlozi nakon 24 sata.

- Apsorpcijski spektar za AgNO<sub>3</sub> izmjeren u Glc + BBM podlozi i Glc – BBM podlozi pokazao je također karakterističan pik za čestice srebra na 420 nm, što ukazuje na stvaranje nanočestica srebra. Karakterističan pik za čestice srebra pojavio se nakon 1 sata u oba tipa podloge. Nakon 5 sati u Glc + podlozi primijećeno je smanjenje sinteze čestica sve do 24 sata, a u Glc - podlozi primijećeno je smanjenje sinteze čestica nakon 3 sata pa sve do 48 sati.

- Nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> u suspenzijama alge *C. vulgaris* uzgajane na oba tipa podloge u trajanju od 5, 24 i 48 sati došlo je do smanjenja broja stanica i povećanja postotka neživih stanica u odnosu na kontrolu. U suspenzijama alga uzgojenih na Glc – podlozi broj i postotak živih stanica je bio značajno manji u odnosu na broj i postotak živih stanica u suspenziji alga uzgojenih na Glc + podlozi pri oba tretmana.

- Tretman s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> u suspenzijama alge *C. vulgaris* u trajanju 5, 24 i 48 sati doveo je do povećanja stupnja lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu, u stanicama alga uzgajanim na oba tipa podloge. U suspenzijama alga uzgojenih na Glc – podlozi stupanj lipidne peroksidacije nakon oba tretmana bio je značajno viši nego u suspenzijama alga uzgojenih na Glc + podlozi pri oba tretmana. Tretman s AgNO<sub>3</sub> imao je značajno veći učinak na stupanj lipidne peroksidacije u odnosu na tretman s AgNP-PVP.

- Tretman s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> u suspenzijama alge *C. vulgaris* uzgajane na oba tipa podloge u trajanju od 5, 24 i 48 sati doveo je do povećanja aktivnosti svih ispitivanih antioksidacijskih enzima u odnosu na kontrolu (CAT, APX, PPX i SOD).

- Nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> zabilježene su značajne promjene u ultrastrukтури stanica alge u odnosu na kontrolu, pri čemu su izraženija oštećenja imale stanice alga uzgajanih na Glc - podlozi.

- Analizom rezultata dobivenih mjerenjem svih parametara, može se zaključiti da su alge uzgajane na Glc + podlozi bile otpornije na tretman s AgNP-PVP i AgNO<sub>3</sub> svih koncentracija u odnosu na alge uzgajane na Glc – podlozi.

## 7. LITERATURA

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, **105**, 121-126.
- Ahmad, M.T., Shariff, M., Md. Yusoff, F., Goh, Y.M. i Banerjee, S. (2020). Applications of microalga *Chlorella vulgaris* in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, **12**(1), 328-346.
- Babiak, W. i Krzemińska, I. (2021). Extracellular polymeric substances (EPS) as microalgal bioproducts: A Review of Factors Affecting EPS Synthesis and Application in Flocculation Processes. *Energies*, **14**(13), 4007.
- Beauchamp, C. i Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, **44**(1), 276-287.
- Booth, T.J. i Baker, M.A.B. (2017). Nanotechnology: Building and Observing at the Nanometer Scale. *Pharmacognosy*, Academic Press, 633-643.
- Brohi, R.D., Wang, L., Talpur, H.S., Wu, D., Khan, F.A., Bhattarai, D., Rehman, Z.U., Farmanullah, F. i Huo, L.J. (2017). Toxicity of nanoparticles on the reproductive system in animal models: a review. *Frontiers in pharmacology*, **8**, 606.
- Buchanan, B., Gruissem, W. i Jones, R. (2015). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. 2nd ed. John Wiley and Sons, 1094-1097.
- Bunjes, H. i Kuntsche, J. (2016). Light and electron microscopy. Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences. Springer, New York, 491-522.
- Calderón-Jiménez, B., Johnson, M.E., Montoro Bustos, A.R., Murphy, K.E., Winchester, M.R. i Vega Baudrit, J.R. (2017). Silver nanoparticles: technological advances, societal impacts, and metrological challenges. *Frontiers in Chemistry*, **5**, 6.
- Catala, A. (2006). An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **38**, 1482-1495.
- Chatterjee, S., Bandyopadhyay, A. i Sarkar, K. (2011). Effect of iron oxide and gold nanoparticles on bacterial growth leading towards biological application. *Journal of Nanobiotechnology*, **9**(1), 1-7.

- Cheirsilp, B., Mandik, Y.I. i Prasertsan, P. (2016). Evaluation of optimal conditions for cultivation of marine *Chlorella* sp. as potential sources of lipids, exopolymeric substances and pigments. *Aquaculture international*, **24**(1), 313-326.
- Chen, B., Li, F., Liu, N., Ge, F., Xiao, H. i Yang, Y. (2015). Role of extracellular polymeric substances from *Chlorella vulgaris* in the removal of ammonium and orthophosphate under the stress of cadmium. *Bioresource Technology*, **190**, 299-306.
- Cirulis, J.T., Scott, J.A. i Ross, G.M. (2013). Management of oxidative stress by microalgae. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **91**(1), 15-21.
- Dash, A., Singh, A.P., Chaudhary, B.R., Singh, S.K. i Dash, D. (2012). Effect of silver nanoparticles on growth of eukaryotic green algae. *Nano-Micro Letters*, **4**, 158-165.
- Deng, X.Y., Xue, C.Y., Chen, B., Amoah, P.K., Li, D., Hu, X.L. i Gao, K. (2019). Glucose addition-induced changes in the growth and chemical compositions of a freshwater microalga *Chlorella kessleri*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **94**(4), 1202-1209.
- Ding, Z., Jia, S., Han, P., Yuan, N. i Tan, N. (2013). Effects of carbon sources on growth and extracellular polysaccharide production of *Nostoc flagelliforme* under heterotrophic high-cell-density fed-batch cultures. *Journal of applied phycology*, **25**(4), 1017-1021.
- Djearamane, S., Lim, Y.M., Wong, L.S. i Lee, P.F. (2019). Cellular accumulation and cytotoxic effects of zinc oxide nanoparticles in microalga *Haematococcus pluvialis*. *PeerJ*, **7**, 7582.
- El-Naggar, A.H. i El-Sheekh, M.M. (1998). Abolishing cadmium toxicity in *Chlorella vulgaris* by ascorbic acid, calcium, glucose and reduced glutathione. *Environmental Pollution*, **101**(2), 169-174.
- Fabrega, J., Fawcett, S.R., Renshaw, J.C. i Lead, J.R. (2009). Silver nanoparticle impact on bacterial growth: effect of pH, concentration, and organic matter. *Environmental science and technology*, **43**(19), 7285-7290.
- Falagan-Lotsch, P., Grzincic, E.M. i Murphy, C.J. (2016). One low-dose exposure of gold nanoparticles induces long-term changes in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113**(47), 13318-13323.



- Fazelian, N., Movafeghi, A., Yousefzadi, M., Rahimzadeh, M. i Zarei, M. (2020). Impact of silver nanoparticles on the growth, fatty acid profile, and antioxidative response of *Nannochloropsis oculata*. *Acta Physiologiae Plantarum*, **42**(7), 1-14.
- Feng, F.Y., Yang, W., Jiang, G.Z., Xu, Y.N. i Kuang, T.Y. (2005). Enhancement of fatty acid production of *Chlorella* sp. (*Chlorophyceae*) by addition of glucose and sodium thiosulphate to culture medium. *Process biochemistry*, **40**(3-4), 1315-1318.
- Gauthier, M.R., Senhorinho, G.N.A. i Scott, J.A. (2020). Microalgae under environmental stress as a source of antioxidants. *Algal Research*, **52**, 102-104.
- Geisler-Lee, J., Wang, Q., Yao, Y., Zhang, W., Geisler, M., Li, K., Huang, Y., Chen, Y., Kolmakov, A. i Ma, X. (2012). Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. *Nanotoxicology*, **7**(3), 323-337.
- Gerardi, M.H. (2015). Algae, alkalinity, and pH. U: Gerardi M.H. i Lytle B. The biology and troubleshooting of facultative lagoons. John Wiley & Sons, 105-106.
- Grün, A.L., Manz, W., Kohl, Y.L., Meier, F., Straskraba, S., Jost, C., Drexel, R. i Emmerling, C. (2019). Impact of silver nanoparticles (AgNP) on soil microbial community depending on functionalization, concentration, exposure time, and soil texture. *Environmental Sciences Europe*, **31**(1), 1-22.
- Hazeem, L.J., Kuku, G., Dewailly, E., Slomianny, C., Barras, A., Hamdi, A., Boukherroub, R., Culha, M. i Bououdina, M. (2019). Toxicity effect of silver nanoparticles on photosynthetic pigment content, growth, ROS production and ultrastructural changes of microalgae *Chlorella vulgaris*. *Nanomaterials*, **9**(7), 914.
- Heath, R.L. i Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **125**(1), 189-198.
- Jiang, H.S., Yin, L., Ren, N.N., Xian, L., Zhao, S., Li, W. i Gontero, B. (2017). The effect of chronic silver nanoparticles on aquatic system in microcosms. *Environmental Pollution*, **223**, 395-402.
- Jones, D. P. i Radi, R. (2014). Redox pioneer: Professor Helmut Sies. *Antioxidants and Redox Signaling*, **21**, 2459-2468.

- Karimi, J. i Mohsenzadeh, S. (2017). Physiological effects of silver nanoparticles and silver nitrate toxicity in *Triticum aestivum*. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, **41**(1), 111-120.
- Khan, I., Raza, M.A., Khalid, M.H.B., Awan, S.A., Raja, N.I., Zhang, X., Min, S., Wu, B.C., Hassan, M.J. i Huang, L. (2019). Physiological and biochemical responses of pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) seedlings exposed to silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) and silver nanoparticles (AgNPs). *International Journal of Environmental Research and Public health*, **16**(13), 2261.
- Khan, I., Saeed, K. i Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, **12**(7), 908-931.
- Kong, W.B., Yang, H., Cao, Y.T., Song, H., Hua, S.F. i Xia, C.G. (2013). Effect of glycerol and glucose on the enhancement of biomass, lipid and soluble carbohydrate production by *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture. *Food Technology and Biotechnology*, **51**(1), 62.
- Korani, M., Ghazizadeh, E., Korani, S., Hami, Z. i Mohammadi-Bardbori, A. (2015). Effects of silver nanoparticles on human health. *European Journal of Nanomedicine*, **7**(1), 51-62.
- Kratošová, G., Dědková, K., Vávra, I. i Čiampor, F. (2014). Investigation of Nanoparticles in Biological Objects by Electron Microscopy Techniques. *Intracellular Delivery II*. Springer, Dordrecht, 165-187.
- Leonardo, T., Farhi, E., Pouget, S., Motellier, S., Boisson, A.M., Banerjee, D., Rébeillé, F., den Auwer, C. i Rivasseau, C. (2016). Silver accumulation in the green microalga *Coccomyxa actinabiotis*: Toxicity, in situ speciation, and localization investigated using synchrotron XAS, XRD, and TEM. *Environmental Science and Technology*, **50**(1), 359-367.
- Li, Z., Juneau, P., Lian, Y., Zhang, W., Wang, S., Wang, C., Shu, L., Yan, Q., He, Z. i Xu, K. (2020). Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on Photosynthetic and Antioxidative Processes of *Scenedesmus obliquus*. *Plants*, **9**(12), 1748.
- Mallick, N. (2004). Copper-induced oxidative stress in the chlorophycean microalga *Chlorella vulgaris*: response of the antioxidant system. *Journal of Plant Physiology*, **161**(5), 591-597.

- Marchello, A.E., Barreto, D.M. i Lombardi, A.T. (2018). Effects of titanium dioxide nanoparticles in different metabolic pathways in the freshwater microalga *Chlorella sorokiniana* (Trebouxiophyceae). *Water, Air, and Soil Pollution*, **229**(2), 1-11.
- Miao, A.J., Schwehr, K.A., Xu, C., Zhang, S.J., Luo, Z., Quigg, A. i Santschi, P.H. (2009). The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environmental Pollution*, **157**(11), 3034-3041.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**, 405-410.
- Morelli, E., Cioni, P., Posarelli, M. i Gabellieri, E. (2012). Chemical stability of CdSe quantum dots in seawater and their effects on a marine microalga. *Aquatic toxicology*, **122**, 153-162.
- Movafeghi, A., Khataee, A., Abedi, M., Tarrahi, R., Dadpour, M. i Vafaei, F. (2018). Effects of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the aquatic plant *Spirodela polyrrhiza*: Evaluation of growth parameters, pigment contents and antioxidant enzyme activities. *Journal of Environmental Sciences*, **64**, 130-138.
- Nakamura, T., Magara, H., Herbani, Y. i Sato, S. (2011). Fabrication of silver nanoparticles by highly intense laser irradiation of aqueous solution. *Applied Physics A*, **104**(4), 1021-1024.
- Nakano, Y. i Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, **22**(5), 867-880.
- Nouri, H., Mohammadi Roushandeh, J., Hallajisani, A., Golzary, A. i Daliry, S. (2020.) The effects of glucose, nitrate, and pH on cultivation of *Chlorella sp.* Microalgae. *Global Journal of Environmental Science and Management*, **7**(1), 103-116.
- Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F. i Popovic, R. (2012). Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology and environmental safety*, **78**, 80-85.
- Ozturk, S., Aslim, B., Suludere, Z. i Tan, S. (2014). Metal removal of cyanobacterial exopolysaccharides by uronic acid content and monosaccharide composition. *Carbohydrate Polymers*, **101**, 265-271.

- Panahi, Y., Khosroushahi, A.Y., Sahebkar, A. i Heidari, H.R. (2019). Impact of cultivation condition and media content on *Chlorella vulgaris* composition. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, **9**(2), 182.
- Peharec Štefanić, P., Cvjetko, P., Biba, R., Domijan, A.M., Letofsky-Papst, I., Tkalec, M., Šikić, S., Cindrić, M. i Balen, B. (2018). Physiological, ultrastructural and proteomic responses of tobacco seedlings exposed to silver nanoparticles and silver nitrate. *Chemosphere*, **209**, 640-653.
- Peharec Štefanić, P., Koffler, T., Adler, G. i Bar-Zvi, D. (2013). Chloroplasts of salt-grown *Arabidopsis* seedlings are impaired in structure, genome copy number and transcript levels. *PLoS One*, **8**(12), e82548.
- Peharec Štefanić, P., Košpić, K., Lyons, D.M., Jurković, L., Balen, B. i Tkalec, M. (2021). Phytotoxicity of silver nanoparticles on tobacco plants: evaluation of coating effects on photosynthetic performance and chloroplast ultrastructure. *Nanomaterials*, **11**(3), 744.
- Rajput, V.D., Minkina, T., Sushkova, S., Tsitsuashvili, V., Mandzhieva, S., Gorovtsov, A., Nevidomskyaya, D. i Gromakova, N. (2018). Effect of nanoparticles on crops and soil microbial communities. *Journal of Soils and Sediments*, **18**(6), 2179-2187.
- Robinson, R.K. (2014). Encyclopedia of food microbiology. U: Khare, S., Williams, K. i Gokulan, K. Nanotechnology. Academic press, 893-900.
- Romero, N., Visentini, F.F., Márquez, V.E., Santiago, L.G., Castro, G.R. i Gagnetten, A.M. (2020). Physiological and morphological responses of green microalgae *Chlorella vulgaris* to silver nanoparticles. *Environmental Research*, **189**, 109857.
- Sabatini, S.E., Juárez, Á.B., Eppis, M.R., Bianchi, L., Luquet, C.M. i de Molina, M.D.C.R. (2009). Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**(4), 1200-1206.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y. i Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **35**, 265-278.
- Sahu, S.C., Zheng, J., Graham, L., Chen, L., Ihrle, J., Yourick, J.J. i Sprando, R.L. (2014). Comparative cytotoxicity of nanosilver in human liver HepG2 and colon CaCO2 cells in culture. *Journal of Applied Toxicology*, **34**(11), 1155-1166.

- Scimeca, M., Bischetti, S., Lamsira, H.K., Bonfiglio, R. i Bonanno, E. (2018). Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis. *European Journal of Histochemistry*, **62**(1).
- Sendra, M., Yeste, M.P., Gatica, J.M., Moreno-Garrido, I. i Blasco, J. (2017). Direct and indirect effects of silver nanoparticles on freshwater and marine microalgae (*Chlamydomonas reinhardtii* and *Phaeodactylum tricornutum*). *Chemosphere*, **179**, 279-289.
- Shah, M.A. (2013). Electron Microscopy: A versatile tool in nanoworld. Materials Science Forum. Trans Tech Publications Ltd, **760**, 43-51.
- Suresh, A.K., Pelletier, D.A., Wang, W., Moon, J.W., Gu, B., Mortensen, N.P., Allison, D.P., Joy, D.C., Phelps, T.J. i Doktycz, M.J. (2010). Silver nanocrystallites: biofabrication using *Shewanella oneidensis*, and an evaluation of their comparative toxicity on gram-negative and gram-positive bacteria. *Environmental Science and Technology*, **44**(13), 5210-5215.
- Sykes, E.A., Dai, Q., Tsoi, K.M., Hwang, D.M. i Chan, W.C. (2014). Nanoparticle exposure in animals can be visualized in the skin and analysed via skin biopsy. *Nature communications*, **5**(1), 1-8.
- Tejamaya, M., Römer, I., Merrifield, R.C. i Lead, J.R. (2012). Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. *Environmental Science and Technology*, **46**(13), 7011-7017.
- Tiwari, V., Tiwari, M. i Solanki, V. (2017). Polyvinylpyrrolidone-capped silver nanoparticle inhibits infection of carbapenem-resistant strain of *Acinetobacter baumannii* in the human pulmonary epithelial cell. *Frontiers in Immunology*, **8**, 973.
- Uarrota, V. G., Moresco, R., Schmidt, E. C., Bouzon, Z. L., da Costa Nunes, E., de Oliveira Neubert, E., Peruch, L. A. M., Rocha, M. i Maraschin, M. (2016). The role of ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, and polysaccharides in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots under postharvest physiological deterioration. *Food Chemistry* **197**, 737-746.
- Vidaković-Cifrek, Ž., Pevalek-Kozlina, B., Tkalec, M., Babić, M., Radić Brkanac, S. (2017). Praktikum iz fiziologije bilja. Skripta za internu upotrebu, 101-103.

- Wang, J., Koo, Y., Alexander, A., Yang, Y., Westerhof, S., Zhang, Q., Schnoor, J.L., Colvin, V.L., Braam, J. i Alvarez, P.J. (2013). Phytostimulation of poplars and *Arabidopsis* exposed to silver nanoparticles and Ag<sup>+</sup> at sublethal concentrations. *Environmental Science and Technology*, **47**(10), 5442-5449.
- Wu, N., Li, Y. i Lan, C.Q. (2011). Production and rheological studies of microalgal extracellular biopolymer from lactose using the green alga *Neochloris oleoabundans*. *Journal of Polymers and the Environment*, **19**(4), 935-942.
- Zhang, H., Smith, J.A. i Oyanedel-Craver, V. (2012). The effect of natural water conditions on the anti-bacterial performance and stability of silver nanoparticles capped with different polymers. *Water research*, **46**(3), 691-699.
- Zhang, L. i Wang, W.X. (2018). Dominant role of silver ions in silver nanoparticle toxicity to a unicellular alga: evidence from luminogen imaging. *Environmental science & technology*, *53*(1), pp.494-502.
- Zhang, M., Wang, H., Liu, P., Song, Y., Huang, H., Shao, M., Liu, Y., Li, H. i Kang, Z. (2019). Biototoxicity of degradable carbon dots towards microalgae *Chlorella vulgaris*. *Environmental Science: Nano*, **6**(11), 3316-3323.
- Zhou, K., Hu, Y., Zhang, L., Yang, K. i Lin, D. (2016). The role of exopolymeric substances in the bioaccumulation and toxicity of Ag nanoparticles to algae. *Scientific reports*, **6**(1), 1-11.
- Zouzelka, R., Cihakova, P., Ambrozova, J.R. and Rathousky, J. (2016). Combined biocidal action of silver nanoparticles and ions against Chlorococcales (*Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris*) and filamentous algae (*Klebsormidium sp.*). *Environmental Science and Pollution Research*, **23**(9), 8317-8326.

## ŽIVOTOPIS

Završila sam Osnovnu školu Augusta Šenoje i XI. gimnaziju u Zagrebu. Tijekom obrazovanja u osnovnoj i srednjoj školi sudjelovala sam na brojnim školskim, županijskim i međužupanijskim natjecanjima. Preddiplomski sveučilišni studij Molekularne biologije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta (PMF-a) Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2016. godine i završila 2019. godine, nakon čega sam upisala diplomski sveučilišni studij Molekularne biologije. Tijekom studija sudjelovala sam dvaput na manifestaciji Noć biologije (2018. i 2021.) i jednom na Simpoziju studenata bioloških usmjerenja u Zagrebu (2021.), te na simpoziju studenata biologije u Banjoj Luci (2020.). U akademskoj godini 2020./2021. sudjelovala sam u projektu PROMISE programa Erasmus+, u kojem sam stekla vještine i znanja vezana uz P4 medicinu. U kolovozu 2021. godine sudjelovala sam i na trodnevnoj radionici u sklopu toga projekta, a u rujnu 2021. godine na konferenciji u Zagrebu gdje je projekt predstavljen široj javnosti. Laboratorijsku stručnu praksu odradila sam na Botaničkom zavodu u Laboratoriju za fiziologiju bilja, istražujući učinak toplinskog stresa na biljku *Arabidopsis thaliana*. U slobodno vrijeme, volontiram u Zakladi Dijete svjetla koja pomaže siromašnoj djeci, a posebice djevojčicama bez roditeljske skrbi, u afričkoj državi Benin. Od hobija bih istaknula pjevanje – aktivna sam članica dvaju pjevačkih zborova, među kojima je i zbor Cantus Naturae na PMF-u, grafički dizajn i fotografiranje te uređivanje fotografija. Aktivno se služim engleskim jezikom, a poznajem i upotrebljavam njemački jezik.