Utjecaj Al2+ i Cd2+ iona na preživljavanje alge Euglena gracilis

Dobrić, Nina

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:845832

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Nina Dobrić
6800/BT

UTJECAJ Al^{2+} i Cd^{2+} IONA NA PREŽIVLJAVANJE ALGE *Euglena gracilis*

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 2
Mentor: Izv. prof. dr. sc. *Sunčica Beluhan*

Zagreb, 2017.

Ovaj rad izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Sunčice Beluhan.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,
Industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Bitehnologija

UTJECAJ Al^{2+} i Cd^{2+} IONA NA PREŽIVLJAVANJE ALGE *Euglena gracilis*

Nina Dobrić, 6800/BT

Sažetak: Stanice algi imaju izvanrednu sposobnost unošenja i nakupljanja teških metala iz vanjskog okoliša. Visoke koncentracije metala, uključujući one esencijalne za rast i metabolizam, toksično djeluju na metabolički sustav algi. Pokretljivost stanica, koncentracije klorofila *a* i *b* te karotenoida i nakupljanje prolina, kao ključni toksikološki parametri, proučavani su tijekom 14 dana uzgoja slatkovodnog flagelata *Euglena gracilis* pri različitim koncentracijama soli teških metala Al^{2+} i Cd^{2+} (0.5, 1.0 i 2.0 mM). Stanice *E. gracilis* bolje podnose izloženost Al^{2+} ionima (bolja pokretljivost i bolja sposobnost vršenja fotosinteze). Uočena je značajna osjetljivost na Cd^{2+} što se očituje i po fotosintetskim pigmentima, pokretljivosti i nakupljanju prolina. Rezultati daju korisne i važne informacije o funkcionalnoj vrijednosti *E. gracilis* u bioremedijacijskim programima.

Ključne riječi: *Euglena gracilis*, fotosintetski pigmenti, pokretljivost, nakupljanje prolina, teški metali
Rad sadrži: 35 stranica, 26 slika, 2 tablice, 66 literaturna navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: *Izv. prof. dr. sc.Sunčica Beluhan*

Datum obrane: srpanj 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Biotechnology

Department of Biochemical engineering
Laboratory for Biochemical Engineering,
Industrial Microbiology, Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

IMPACT OF Al^{2+} i Cd^{2+} IONS ON *Euglena gracilis* SURVIVAL

Nina Dobrić, 6800/BT

Abstract: Algal cells have a remarkable ability to uptake and accumulate heavy metals from their external environment. High concentrations of metals, including those essential for growth and metabolism, exert toxic effects on metabolic system of algae. The effects of different concentrations of Al^{2+} and Cd^{2+} (0.5, 1.0 and 2.0 mM) on the freshwater flagellate *Euglena gracilis* were studied upon 14 days of growth using cell mobility, contents of chlorophyll *a* and *b,* carotenoids and proline accumulation as end toxicology points. *E. gracilis* cells showed improved heavy metal tolerance to Al^{2+} ions (greater mobility and better photosynthetic capacity). Photosynthetic pigments, mobility and proline accumulation were found to be greatly sensitive to Cd^{2+}. These results provide useful and important information about functional value of *E. gracilis* for bioremediation programs.

Keywords: *Euglena gracilis*, Photosynthetic pigments, Motility, Proline accumulation, Heavy metals
Thesis contains: 35 pages, 26 figures, 2 tables, 66 references
Original in: Croatian
Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: *Sunčica Beluhan, PhD, Associate Professor*

Defence date: July 2017

Sadržaj

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 2
2.1. Euglena gracilis 2
2.2. Razmnožavanje i životni ciklus 3
2.3. Taksonomija i filogenija 4
2.4. Stanište, funkcija i interakcija s ljudima 5
2.5. Struktura i gibanje 6
2.5.1. Pigmenti 7
2.5.2. Paramilon 8
2.6. Stres izazvan metalima 8
2.6.1. Fitokelatini 9
2.6.2. Prolin 10
3. MATERIJALI I METODE RADA 13
3.1. Mikroorganizam i materijali uporabljeni u radu 13
3.1.1. Radni mikroorganizam i podloge za uzgoj 13
3.1.2. Uporabljene soli teških metala 14
3.2. Aparati 15
3.3. Metode istraživanja 16
3.3.1. Vrijeme izlaganja *E. gracilis* solima teških metala 16
3.3.2. Određivanje pokretljivosti i promjene oblika stanica *E. gracilis* 16
3.3.3. Određivanje klorofila i ukupnih karotenoida 17
3.3.4. Određivanje koncentracije slobodnog prolina 17
4. REZULTATI 19
5. RASPRAVA 26
6. ZAKLJUČCI 28
7. LITERATURA 29

1. UVOD

Brzo rastuća ljudska populacija na našem planetu veliki je teret za prirodni okoliš. No, uglavnom su industrija, rudarstvo, kućanstva i poljoprivreda izvori brojnih onečišćujućih tvari kao što su SO_2, metan i čađe, a to su samo neke koje se ispuštaju u atmosferu (Rai, 2010). Pogotovo u zemljama u razvoju to se često događa na nekontroliran način, što je zabrinjavajuće jer se ove tvari globalno distribuiraju putem vjetra i time utječu na kakvoću zraka. Mnoge od ovih supstanci nalaze svoj put prema slatkovodnim ekosustavima kao što su prirodna staništa poput jezera i rijeka kada se kišom ispiru iz atmosfere. Stupanj onečišćenja se povećava s povećanjem industrijalizacije i rastuće populacije. Nadalje, problem je pogoršan zbog globalnih klimatskih promjena koja mijenjaju obrasce vjetra i oborina (Hogsen i Harding, 2013).

Teški metali pripadaju najotrovnijim zagađivačima koji utječu na prirodni okoliš (He i sur., 1998). S jedne strane te tvari nisu biorazgradive i koncentriraju se u vodi i sedimentu (Lourie i sur., 2010). Pri niskim koncentracijama mogu biti bitni za život kao sastavni dijelovi biomolekula, ali kod većih koncentracija teški metali su toksični. Vodeni organizmi ih apsorbiraju putem hrane gdje mogu dostići toksične koncentracije koje utječu na beskralješnjake, ribe, ptice i u konačnici ljude koji konzumiraju kontaminirane vodene životinje i alge (Rai, 2008). Cd^{2+} je posebno poznat po akumuliranju u vodenim organizmima i koncentracija mu može biti od 102 do 105 puta veća od koncentracije u vodi, ovisno o vrsti vode u kojoj ribe i alge obitavaju (Mendoza-Cózatl i sur., 2006). U posljednjih nekoliko desetljeća, promjene u kiselosti tla i voda značajno su utjecale na prenošenje Al^{2+} iona u okoliš, povećavajući koncentraciju u jezerima i rijekama, a samim time i vjerojatnost da postane dio hranidbenog lanca (Quiroz-Vázquez i sur., 2010).

U ovom radu će biti istraživana morfološka svojstva, pokretljivost, promjena udjela fotosintetskih i svjetlosnih pigmenata i promjena koncentracije prolina, kao ključnih toksikoloških parametara utjecaja različitih koncentracija soli teških metala (Al^{2+} i Cd^{2+} u koncentracijama 0.5; 1.0 i 2.0 mM) na preživljavanje *E. gracilis*. Budući da se intenzitet toksičnosti mijenja s vremenom izlaganja, u radu će se istraživati kako vrijeme izlaganja ovim solima teških metala tijekom 14 dana utječe na preživljavanje ove alge.

2. TEORIJSKI DIO

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Euglena gracilis

Euglena gracilis je jednostanični protist i pripada eukariotskim organizmima. Miksotrof je, tako da može preživjeti i u heterotrofnim i autotrofnim uvjetima. To znači da može pribaviti hranu na dva različita načina, prehranjuje se s drugim organizmima i time pribavlja i sintetizira svoje hranjive tvari. Ovom sposobnošću i prilagodbom *Euglena* je postala snažnija zbog više izvora hranjivih tvari i time povećavajući mogućnosti preživljavanja (Leedale, 1967).

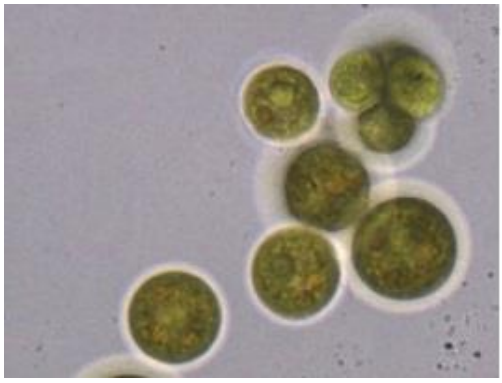
Kloroplasti u *Eugleni* daju joj sposobnost pribavljanja hranjivih sastojaka kroz proces fotosinteze. Pa iako je *Euglena* vrlo učinkovita kroz fotosintezu, sunčeva svjetlost nije uvijek dostupna pa stoga nije stalna opskrba hranom za njih. *Euglena* je obično oko zelenih algi koje su njihov drugi izvor hrane. Kad god ima puno algi oko *Euglene*, uvijek će biti tamo da uživaju u njihovom konstantnom izvoru hranjivih tvari. Uz sposobnost da okružuje i apsorbira druge organizme za hranu, *Euglena* nikad ne oskudijeva hranjivim tvarima i zato je takav uspješan organizam.

Slika 1. Različiti oblici stanica *E. gracilis* u kretanju (Arroyo i sur., 2012)

2.2. Razmnožavanje i životni ciklus

Postoje tri različite faze u životnom ciklusu *Euglene*. Prva je faza u kojoj stanice slobodno plivaju pomoću svog biča, slijedi palmela stadij gdje je stanica blago pokretna i konačno faza formiranja cista u kojoj je stanica potpuno nepokretna (Slika 2). Nadalje, postoje tri različite vrste cista; privremena, zaštitna i reproduktivna. Privremena cista je prolazna faza u kojoj je stanična stjenka zbijena, ali nije potpuno zatvorena. Stanice obično još uvijek imaju svojstvo kretanja i kreću se slobodno, a to uglavnom nastaje kao odgovor na jaku sunčevu svjetlost. Zaštitne ciste nastaju pri manjku hrane ili u suhim uvjetima. Tada stvaraju reproduktivnu cistu kao zaštitu (Slika 3).

Slika 2. Mikroskopski prikaz vegetativnih stanica i palmela stadija *E. gracilis* http://www.lebendkulturen.de/index.php/kulturen/algen/euglena-gracilis



Slika 3. Reproduktivne ciste *E. gracilis* (Gruenberger i sur., 2007)

Euglena se neprestano razmnožava putem procesa koji se zove longitudinalna binarna fizija. Ovo je proces u kojem se stanica dijeli na dva odvojena tijela kopiranjem njenog genetskog materijala (Slika 4). To se obično vrši u stadiju kada slobodno pliva. Podjela ne-flagelliranih stanica događa se unutar reproduktivne ili podijeljene ciste, gdje može biti do 64 stanice. Posljednja faza u kojoj se to može dogoditi jest u jednoj drugoj fazi svog života koji je u palmela fazi. Ova faza je kada stanica nije pokretna i prekrivena je mukoznom ili želatinoznom ovojnicom.

Slika 4. Longitudinalna binarna fizija stanice *E. gracilis*
https://www.youtube.com/watch?v=UZhikbEvMEU

2.3. Taksonomija i filogenija

Rod *Euglena* sastoji se od oko šezdeset i pet različitih vrsta, no najviše istraživanja provedeno je s *E. viridis* i *E. gracilis*. *Euglen*a pripada vrlo velikoj taksonomskoj skupini jednostaničnih organizama nazvanih Euglenozoa.

Euglena je vrlo zanimljiva jer ima svojstva koje imaju životinje, a to je heterotrofnost i svojstva biljaka - autotrofnost.

- Kraljevstvo Excavata
- Koljeno Euglenozoa
- Razred Euglenoidea

- Red Euglenales
- Porodica Euglenaceae
- Rod *Euglena*
- Vrsta *Euglena gracilis*

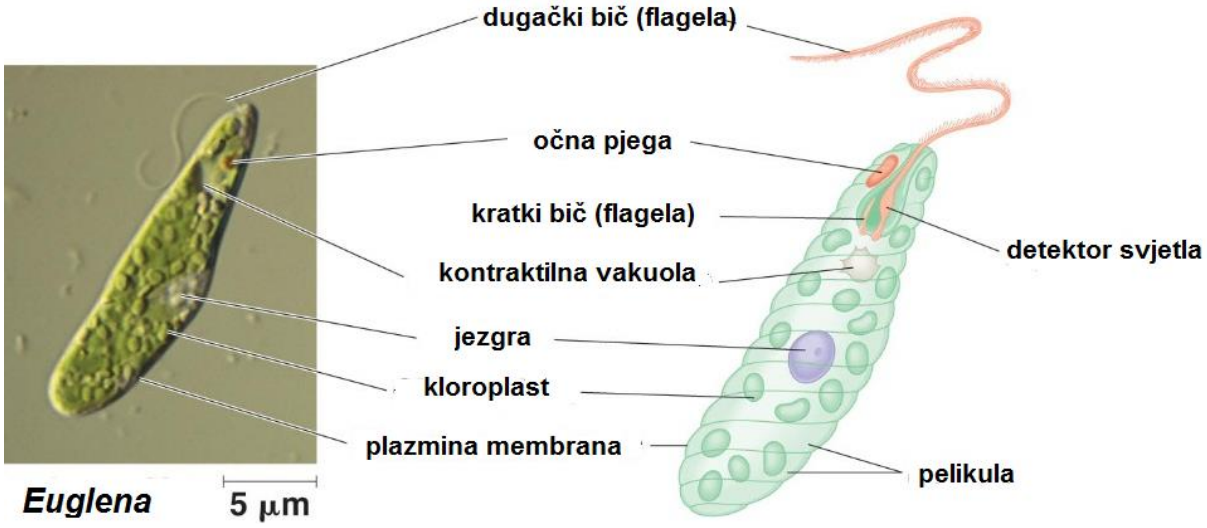
2.4. Stanište, funkcija i interakcija s ljudima

Euglena živi u mirnim i slatkovodnim vodama kao što su ribnjaci, bare, lokve i bazeni puni organske tvari i često čini vodu zelenom zbog kloroplasta (Slika 5). Glavna funkcija ovog protista jest biti dio hranidbenog lanca u vodenom okolišu. *Euglena* je vrlo je učinkovit mikroorganizam kada je u pitanju smanjenje razine ugljičnog dioksida i to učinkovitija od mnogih biljaka. Također, sintetizira važne hranjive tvari koje su potrebne ljudskom tijelu, tako da postoje tvrtke koje u industrijskim mjerilima uzgajaju *Euglenu* upravo zbog tih hranjivih sastojaka (β-1,3-glukan). Još jedna korist od *Euglene* je da ukazuje na zagađenost vode jer su zelene alge prisutne u vodi s visokom koncentracijom dušika koji dolazi iz otpada.

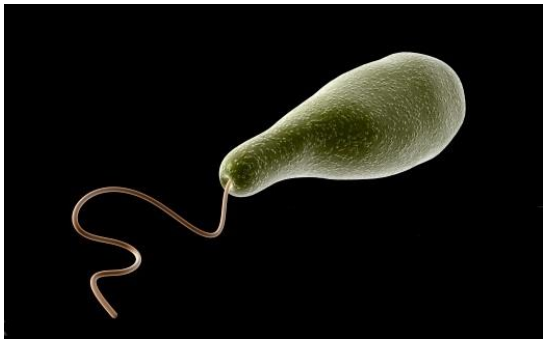
Slika 5. Prirodno stanište *E. gracilis* (http://www.clemson.edu/extension/natural_resources/water/stormwater_ponds/problem_solving/aquatic_weeds/algae_planktonic/index.html)

2.5. Struktura i gibanje

Euglena je ovalnog oblika stanice koja se sastoji od mnogih organela. Ove organele uključuju jedan ili dva biča (flagele), jezgricu, jezgru, kloroplaste, očne pjege (stigme) i kontraktilne vakuole (Slika 6). Jezgra je mozak stanice i sadrži genetički materijal stanice i regulira funkcije stanice. Nukleolus se nalazi u jezgri i sastoji se od proteina i nukleinskih kiselina pronađenih u jezgri. Nukleolus doprinosi stvaranju ribosoma. Kloroplast je ono što čini ovaj protistički mikroorganizam sličnom biljkama. Kloroplast je odgovoran za fotosintezu i čini stanicu djelomično autotrofnom. Kontraktilne vakuole sprječavaju prskanje stanice ispumpavanjem svog viška vode iz stanice. Konačno, tu je pelikula koja je dio strukture mikrotubula. Ove pelikule se međusobno križaju i to uzrokuje da *Euglena* bude istovremeno i fleksibilna i čvrsta (Slika 7).



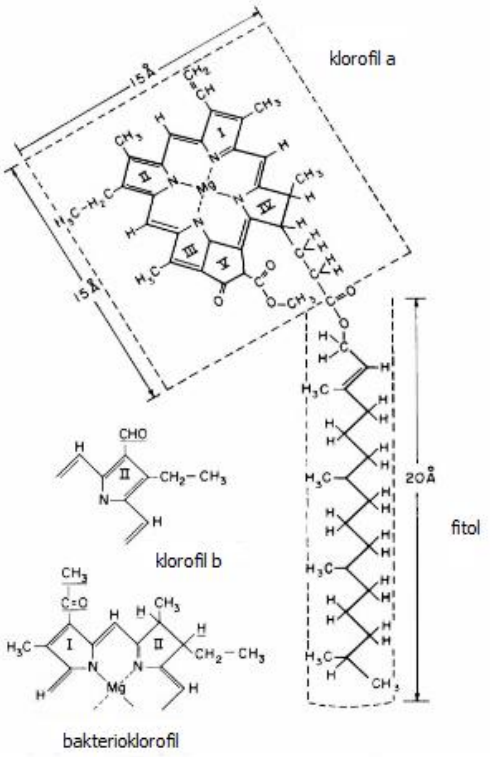
Slika 6. Struktura stanice *E. gracilis* http://keywordsuggest.org/gallery/427437.html



Slika 7. Pelikula *E. gracilis*
http://www.pmbio.icbm.de/mikrobiologischer-garten/eng/eneug03a.htm

2.5.1. Pigmenti

Klorofili, karotenoidi i fikobilini su pigmenti kojima alga koristi sunčevu svjetlost za proces fotosinteze. Klorofili su glavni fotosintetski pigmenti koji u svojoj strukturi imaju makrocikličke prstene i prisutni su u različitim formama (a, b, c1, c2, c3, d i f) u različitim algama i cijanobakterijama (Slika 8). Zelene alge imaju udjel klorofila do 6.7 % (Gantt,1996). Karotenoidi, dodatni fotosintetski pigmenti, su u mastima topljive tetraterpenoidne molekule koje su podijeljene prema strukturi u karotene bez kisika (β-karoten) i ksantofile s kisikom (lutein, astaksantin, zeaksantin) (Green i Durnford, 1996). Fikobilini su u vodi topljivi proteini koji služe kao dodatni pigmenti u modro-zelenim i crvenim algama, dajući im plavu (c-fikocijanin, alofikocijanin) (Ferrari i sur., 2013; Shukla i sur., 2009) ili ružičasto-crvenu boju (b-fikoeritrin, c-fikoeritrin) (Basaca-Loya i sur., 2009; Mishra i sur., 2012). Klorofili, karotenoidi i fikobilini danas imaju široku primjenu u prehrambenoj, kozmetičkoj, farmaceutskoj i tekstilnoj industriji kao boje, antioksidanti, dodaci prehrani i terapeutska sredstva (Stahl i Sies, 2005; Mortensen, 2006; Prasanna i sur., 2007).



Slika 8. Molekularna struktura klorofila *a*, klorofila *b* i bakterioklorofila (Falkowski i Raven, 2007)

2.5.2. Paramilon

Paramilon (β-1,3 glukan) je sličan glikogenu životinja, nalikuje na škrob, ali se s jodom ne boji modro. Granule su sastavljene od trokutastih i pravokutnih segmenata, od kojih je svaki izgrađen od nekoliko slojeva (Kiss i sur., 1987). Slično celulozi, paramilon je organiziran u mikrofibrile (4 nm promjera) sastavljene od trostruke uzvojnice β-1,3-glukoznih lanaca, koji se onda povezuju u deblja vlakna ili pločice (Slika 9). Interakcije mikrofibrila s molekulama vode doprinose visoko kristalnoj strukturi paramilona. Granule paramilona se u stanici *E. gracilis* nalaze se u citoplazmi blizu pirenoidne regije fotosintetski aktivnih plastida (Kiss i Triemer, 1988).

Slika 9. Paramilonske granule u stanicama *E. gracilis* (Monfils i sur., 2011)

2.6. Stres izazvan metalima

Nakupljanje metala u stanicama algi odvija se putem dva mehanizma:

1) adsorpcijom metala na površinu stanične stijenke koja sadrži funkcionalne grupe (karboksilnu, hidroksičnu, fosfatnu, amino i sulfhidrilnu),
2) apsorpcijom metala u stanici putem sustava transporta metala (Monteiro i sur., 2012; Blaby-Haas i Merchant, 2012).

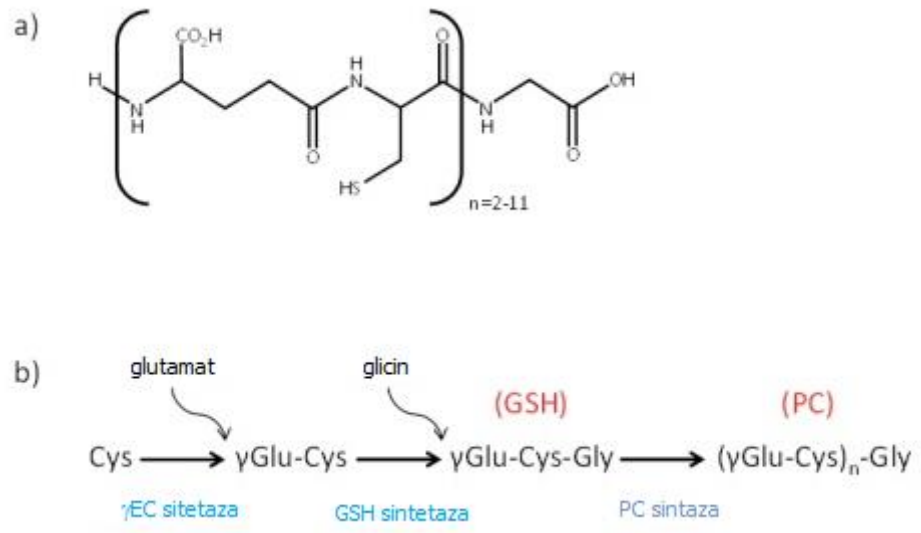
Metali u stanicama mogu izazvati nastajanje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), kao što su hidroksilni radikali (-OH), superoksidni anioni ($O_2\cdot^-$) i vodikov peroksid (H_2O_2), koji reagiraju s lipidima, proteinima i nukleinskim kiselinama, što rezultira njihovom razgradnjom. Kao obrambeni odgovor na stres izazvan metalima, alge sintetiziraju kelirajuće supstancije; fitokelatin i egzopolimere u većim koncentracijama (Cassier-Chauvat i Chauvat, 2015; Perales-Vela i sur., 2006). Kelirajuće supstancije su organski spojevi koji se vežu s dvije ili

više veza s metalnim ionima, tvoreći kompleks metal-kelat i štiteći vezanost bioloških makromolekula s metalnim ionima (Sears, 2013).

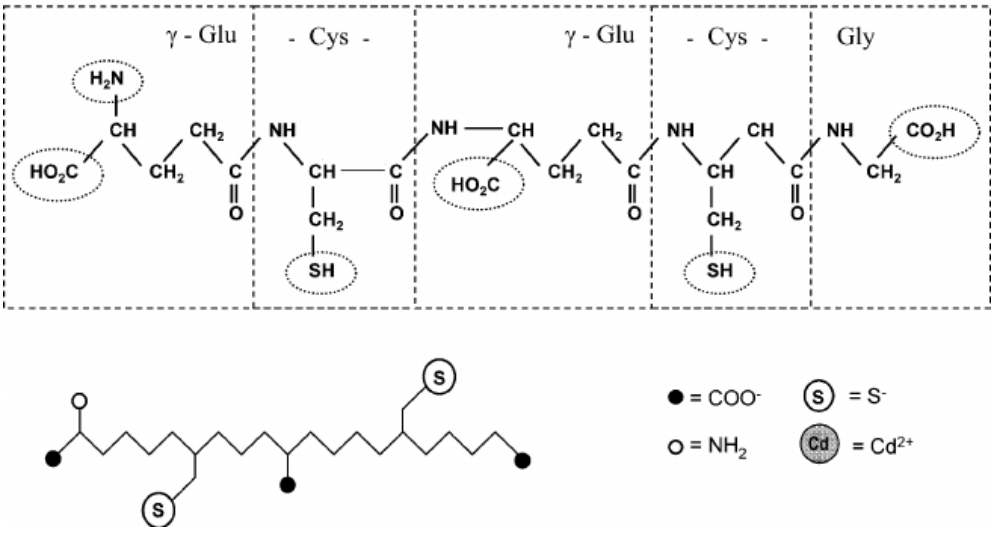
Drugi mehanizam obrane protiv oksidativnog stresa je sinteza antioksidacijskih sastojaka (pigmenti, glutation, askorbat) ili enzima (superoksid dismutaza, katalaza) koji su odgovorni za „hvatanje" reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i za redukciju metalnih iona u njihov manje reaktivni oblik (Monteiro i sur., 2012; Cassier-Chauvat i Chauvat, 2015; Perales-Vela i sur., 2006).

2.6.1. Fitokelatini

Biološki sustavi na potencijalno toksične koncentracije metalnih iona odgovaraju keliranjem i sekvestriranjem viška elemenata u bezopasne supstancije. Biljke, alge i gljive koriste intracelularne peptide koji vežu metale, poznate kao fitokelatini (Slika 10), za homeostazu i detoksifikaciju metala (Rauser, 1995; Zenk, 1996). Fitokelatini (PC_n) su porodica peptida s općom strukturom $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$-Gly (n=2-11), sintetiziranih djelovanjem enzima fitokelatin sintaze koja se aktivira u prisutnosti metalnih iona (Grill i sur., 1989). S obzirom na visoku zastupljenost cisteina u strukturi, fitokelatini vežu metalne ione stvarajući intracelularne metalne komplekse i na taj način smanjuju koncentraciju slobodnih metalnih iona u stanici (Slika 11). *In vitro* eksperimenti su pokazali da su fitokelatini sposobni zaštititi enzime osjetljive na metale od inaktivacije i da obnavljaju aktivnost enzima kojima je prisutnost metala izazvala oštećenje (Kneer i Zenk, 1992).



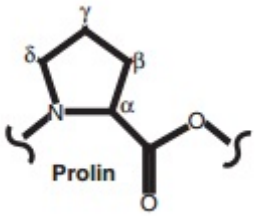
Slika 10. a) Opća struktura fitokelatinina; b) biosintetski put fitokelatonina (Merlos i sur., 2014)



Slika 11. Shematski prikaz (γ-Glu-Cys)$_2$-Gly (Merlos i sur., 2014)

2.6.2. Prolin

Zagađivanje okoliša vrlo štetno utječe na vodene ekosustave zbog prisutnosti teških metala, pesticida i različitih mineralnih soli iz poljoprivrednih, kućnih i industrijskih otpada. Nakupljanje prolina (Slika 12) u stanicama biljaka, bakterija, algi, riba i školjkaša odgovor je na stres prouzročen tim zagađenjem (Fatma i sur., 2007). Dokazano je da je u povećana koncentracija prolina indeks sposobnosti tolerancije na stres zbog sposobnosti stabilizacije, keliranja metala, inhibicije lipidne peroksidacije i vezanja hidroksilnih radikala (Alia i sur., 2001).

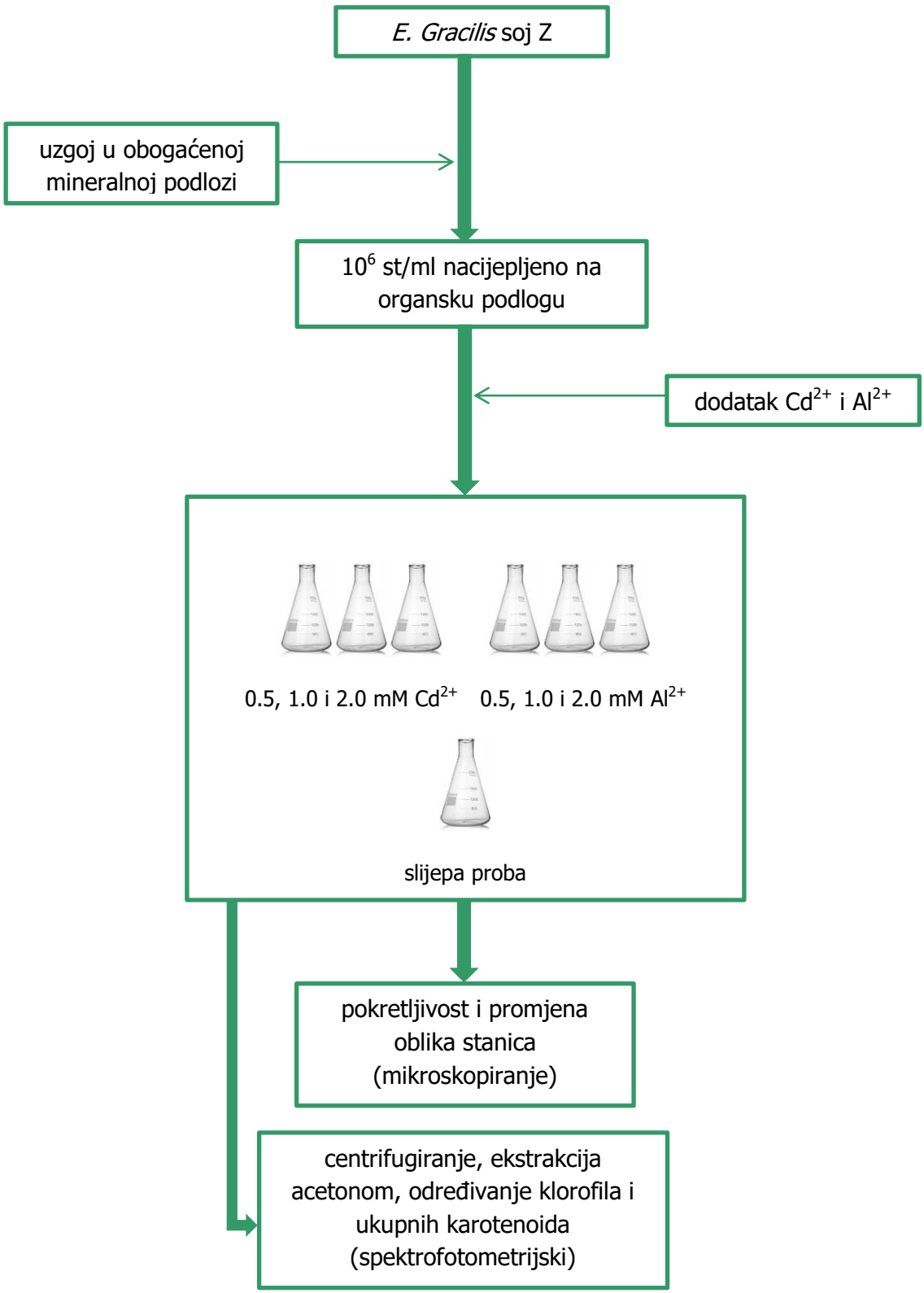


Slika 12. Struktura molekule prolina (Fatma i sur., 2007)

CILJEVI I TIJEK RADA

U ovom su radu postavljena tri cilja (Slika 13):

a) istraživanje utjecaja različitih koncentracija dvije soli teških metala (Cd^{2+} i Al^{2+}) na fiziološke i morfološke i promjene, odnosno pokretljivost stanica *E. gracilis* tijekom 14 dana uzgoja
b) određivanje udjela klorofila *a* i *b* i ukupnih karotenoida tijekom 14 dana izloženosti solima teških metala
c) praćenje i spektrofotometrijsko kvantificiranje koncentracije prolina tijekom uzgoja



Slika 13. Prikaz cjelokupnog istraživanja

3. MATERIJALI I METODE

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Mikroorganizam i materijali uporabljeni u radu

3.1.1. Radni mikroorganizam i podloge za uzgoj

E. gracilis soj Z (Klebs SAG 1224-5/25) je nabavljen iz zbirke Algensammlung Göttingen, Njemačka. Kultura (10^6 stanica/mL) je uzgajana u obogaćenoj mineralnoj podlozi (Tablica 1) tijekom 5 dana, nakon čega je nacijepljena na organsku podlogu (vodeni ekstrakt krumpira; 32.8 g/L suhe tvari koja je sadržavala 59 % dušika i 31.8 % ugljika; Emlichheim, Njemačka). Podloge su prije nacjepljivanja sterilizirane u autoklavu 25 minuta pri 121 ^{o}C.

Tablica 1. Anorganska (mineralna) podloga za uzgoj *E. gracilis* (Hutner i sur., 1966)

Sastojak	**Koncentracija**	**Sastojak**	**Koncentracija**
Makrohranjiva	**(g/L)**	**Mikrohranjiva**	**(mg/L)**
Glukoza	15	$(NH_4)Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$	21
glutaminska kiselina	5	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	24
jabučna kiselina	5	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	77
Glicin	2.5	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	18
Asparagin	2	$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	24
Urea	0.4	H_3BO_3	29
jantarna kiselina	0.1	$NaNO_3 \cdot 4\ H_2O$	74
KH_2PO_4	0.4	**Vitamini**	**(mg/L)**
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.14	B_1	60
$MgCO_3$	0.4	B_{12}	5
$MgSO_4 \cdot H_2O$	0.58		
$CaCO_3$	0.1		

3.1.1.1. Priprava anorganske (mineralne) podloge za uzgoj

Makrohranjiva su odvagana i pojedinačno otopljena u deioniziranoj vodi uz miješanje na magnetnoj mješalici. Podloga je sterilizirana pri 121 ^{o}C tijekom 25 minuta, nakon čega je pH

podešen na 6.8. Otopine mikrohranjiva u deioniziranoj vodi su sterilizirane filtriranjem preko sterilnih filtara promjera pora 0.2 ·mm (Millipore) i dodane u podlogu. Otopine vitamina B_1 i B_{12} su pripravljene u deioniziranoj vodi i dodane u podlogu na kraju bez sterilizacije.

3.1.1.2. Uzgoj kulture *E. gracilis*

E. gracilis je uzgajana u Erlenmeyer tikvicama (300 mL) koje su sadržavale 100 mL mineralne podloge nacijepljene s 5 mL (10^6 st/mL) uzgojene čiste kulture *E. gracilis* pri dnevnom svjetlu na sobnoj temperaturi tijekom 14 dana.

3.1.1.3. Brojanje stanica u Thomaovoj komorici

Za određivanje ukupnog broja stanica *E. gracilis* tekućoj kulturi te praćenje fizioloških i morfoloških promjena stanica izazvanih djelovanjem soli teških metala, uzorci su mikroskopirani u Thomaovoj komorici.
Thomaova komorica je staklena predmetnica nešto deblja i veća od obične predmetnice. U sredini predmetnice se nalazi mreža koja se sastoji od 16 velikih kvadrata od kojih je svaki podijeljen u 25 malih kvadrata. Ukupno ima 25 x 16 = 400 kvadratića. Površina mrežice iznosi 1 mm^2, a visina stupca suspenzije iznad nje 1/10 mm. Prema tome, dužina stranice jednog malog kvadratića iznosi 1/20 mm, njegova površina 1/400 mm^2, a volumen stupca suspenzije iznad tog kvadratića 1/4000 mm^3.

3.1.2. Uporabljene soli teških metala

U istraživanjima su uporabljene dvije soli teških metala; $AlCl_2$ i $CdCl_2 \cdot H_2O$ (Sigma-Aldrich, Njemačka). Sve otopine soli su pripravljane u deioniziranoj vodi u koncentracijama 0.5, 1.0 i 2.0 mM.

3.2. Aparati

- **Centrifuga**

  U pokusima je korištena centrifuga Beckman Model J-21 B, s rotorima JA-20, Sjedinjene Američke Države.

- **Mehanička mješalica**

  Za uzgoj *E. gracilis* korištena je mehanička mješalica s termostatom, Iskra, Kranj, Slovenija

- **Vage**

  Analitička vaga "Mettler", Švicarska

  Digitalna analitička vaga ˝Shimadzu˝, Japan

  Tehnička vaga "Tehtnica", ET 1211, 0-1200 g , Slovenija

- **Vibro mikser**

  Za homogenizaciju uzoraka korišten je vibrirajući mikser ˝Tehtnica EV-102˝, Železniki, Slovenija

- **Mikroskop**

  Za mikrobiološko praćenje morfoloških promjena *E. gracilis* korišten je mikroskop Olympus CX21, Nizozemska

- **Spektrofotometar**

  Za mjerenje apsorbancije korišten je spektrofotometar Unicam Heλios ε, USA

3.3. Metode istraživanja

3.3.1. Vrijeme izlaganja *E. gracilis* solima teških metala

Vrijeme izlaganja *E. gracilis* ispitivanim solima teških metala je provedeno tijekom 14 dana (intervali 24 h), pri čemu je 0-ti sat predstavljao kontrolu (slijepu probu) (Slika 14).

Slika 14. Istraživani uzorci *E. gracilis* s dodanim solima teških metala (koncentracije 0.5; 1.0 i 2 mM)

3.3.2. Određivanje pokretljivosti i promjene oblika stanica *E. gracilis*

Morfološke promjene, kao i pokretljivost, praćene mikroskopski na mikroskopu Olympus CX21 (Nizozemska) te snimljene Dino – Eye AM423X kamerom, spojenom na računalo (100 i 400 x povećanja). Pokretljivost i promjena oblika stanica su praćene brojanjem nepokretnih stanica, te stanica koje su promijenile oblik u Thomaovoj komorici. Rezultati su izraženi kao relativna vrijednost (%) između pokretnih i nepokretnih stanica i stanica promijenjenog oblika (izduženih u odnosu na okrugle).

3.3.3. Određivanje klorofila i ukupnih karotenoida

Klorofil je ekstrahiran u 80 %-tnom acetonu prema metodi Sumida i suradnika (2007). Alikvoti kulture *E. gracilis* (5 mL) su centrifugirani pri 6 000 g/10 minuta pri 4 °C. Biomasi stanica je dodan aceton (80 % v/v) i suspenzija je ostavljena na ledu 1 sat, nakon čega je ponovno centrifugirana na 6 000 okretaja/10 minuta pri 4 °C. Supernatantu (acetonski ekstrakt klorofila *a* i *b* i ukupnih karotenoida) je mjerena apsorbancija na tri valne dužine; 470, 646 i 663 nm (Unicam Heλios ε, SAD), nakon čega je izračunat udjel klorofila *a* i *b* (C_a i C_b), kao i ukupnih karotenoida (K) (µg/mL) prema jednadžbama Lichtnehaler i Wellburna (1983):

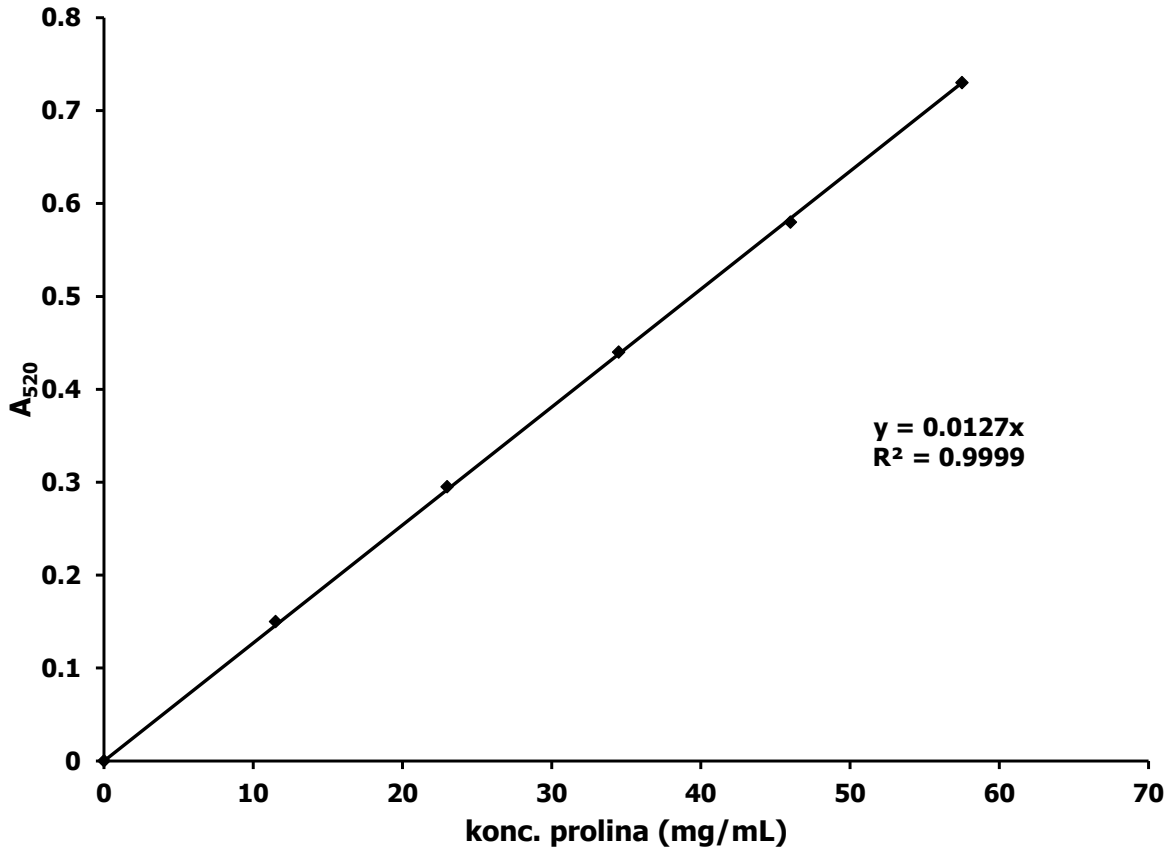
$$C_a = 12.21 \cdot A_{663} - 2.81 \cdot A_{646} \quad [1]$$

$$C_b = 20.13 - A_{646} - 5.03 \cdot A_{663} \quad [2]$$

$$K = (1000 \cdot A_{470} - 3.27 \cdot C_a - 104 \cdot C_b) / 229 \quad [3]$$

3.3.4. Određivanje koncentracije slobodnog prolina

Za određivanje prolina u epruvete s čepom stavljeno je 30 mg biomase *E. gracilis* i uzorci biomase su homogenizirani s 3 mL 3%-tne sulfosalicilne kiseline i centrifugirani (2500 okr/min) tijekom 20 minuta (Chang, 1991). Supernatantima (2 mL) je dodano 2 mL ninhidrinske kiseline i 2 mL ledene octene kiseline. Uzorci su stavljeni 1 h u suhi sterilizator na 100 °C, a nakon toga odmah u ledenu kupelj. U ohlađene uzorke je dodano 4 mL toluena, nakon čega su okretani 30 sekundi. Toluenska faza je izdvojena pomoću pipete i ostavljena na sobnoj temperaturi da se uravnoteži. Koncentracija prolina je određena spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije na 520 nm i izračunata interpolacijom iz baždarnog dijagrama prema prikazanoj jednadžbi (Slika 15).



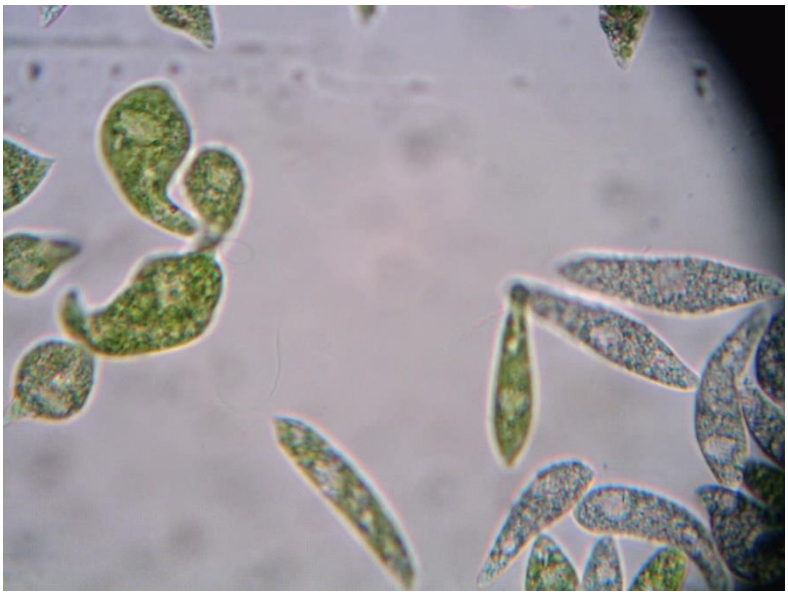
Slika 15. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije prolina

4. REZULTATI

Jedan od ciljeva istraživanja fizioloških i morfoloških promjena stanica *E. gracilis* u ovom radu bio je proučiti utjecaj soli dva teška metala ($AlCl_2$ i $CdCl_2 \cdot H_2O$) na njihove promjene (Slike 16 – 25). Nadalje, nakon ekstrakcije acetonom, spektrofotometrijski su mjerene, a nakon toga i prema jednadžbama izračunate (Metoda 3.4.3.) koncentracije klorofila *a* i *b*, te ukupnih karotenoida nakon 24 h i 14 dana izloženosti solima teških metala (Tablica 2).

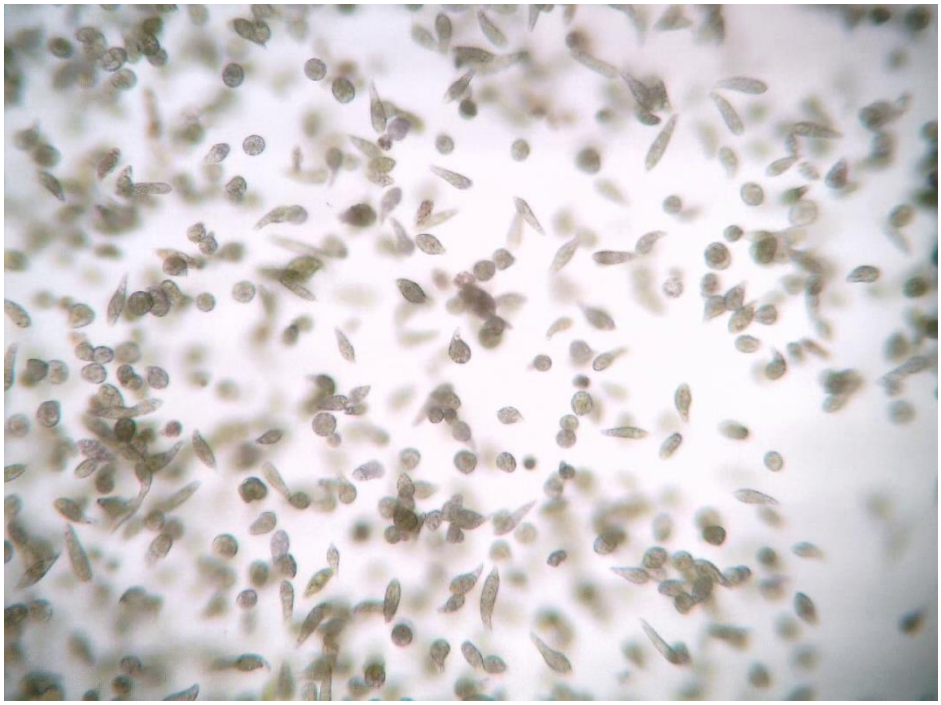
Oblik stanica *E. gracilis* (Slika 16) može se mijenjati ovisno o tome rastu li pri svjetlu ili u tami, ili je posljedica sposobnosti da mijenja oblik ovisno o smjeru kretanja (fototaksija ili gravitaksija). Nadalje, jedan od razloga mijenjanja oblika stanica je i izloženost stresu, u ovom radu solima teških metala, te cirkadijski ritam (biološki sat), pri čemu su mlađe stanice potpuno izdužene, a starenjem poprimaju ovalni oblik (Lonergan, 1983). Na slici 16 prikazani su različiti oblici stanica *E. gracilis*, fiksirani u 10 %-tnom formaldehidu, a na slikama 17 i 18 preparati u kretanju, bez dodatka soli teških metala.

Slike 19-22 prikazuju morfološke i fiziološke promjene stanica *E. gracilis* prije i nakon 14 dana izloženosti solima teških metala (Al^{2+} i Cd^{2+}).



Slika 16. *E. gracilis* bez dodatka soli teških metala (24 h, preparat fiksiran u 10 %-tnom formaldehidu; povećanje 400 x)

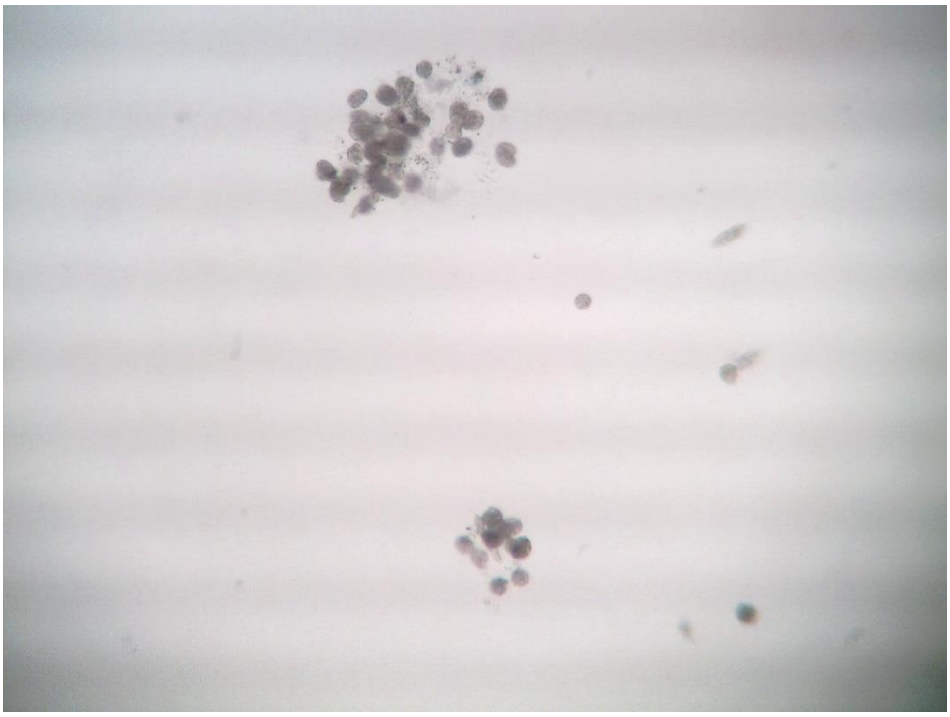
Slika 17. *E. gracilis* bez dodatka soli teških metala (24 h, preparat u kretanju, povećanje 100 x)



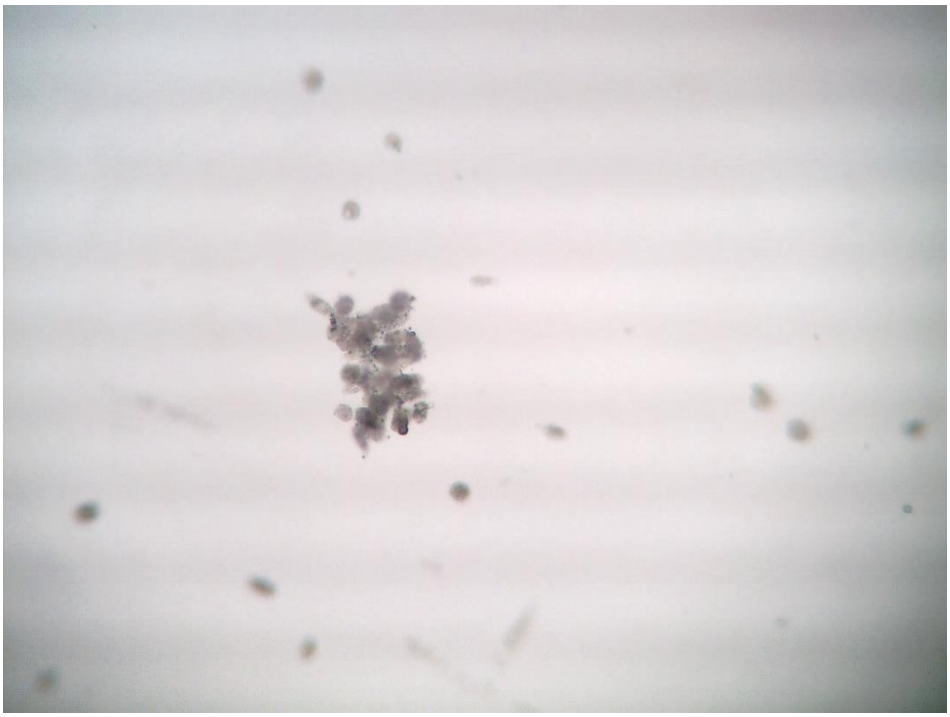
Slika 18. *E. gracilis* bez dodatka soli teških metala (14. dan, preparat u kretanju, povećanje 100 x)

Slika 19. *E. gracilis* nakon dodatka 2 mM Al^{2+} iona (24 h, preparat u kretanju, povećanje 100 x)

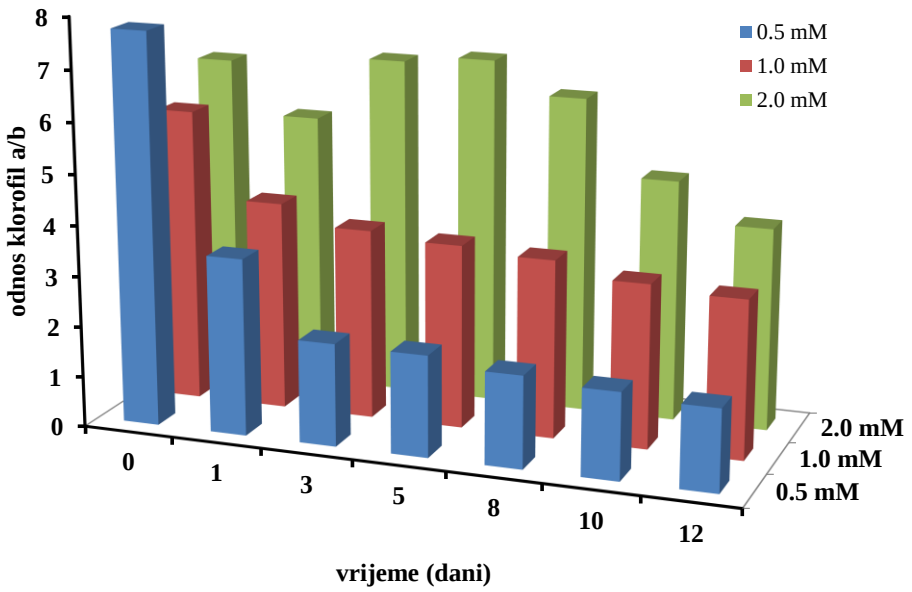
Slika 20. *E. gracilis* nakon dodatka 2 mM Al^{2+} iona (14. dan, preparat u kretanju, povećanje 100 x)



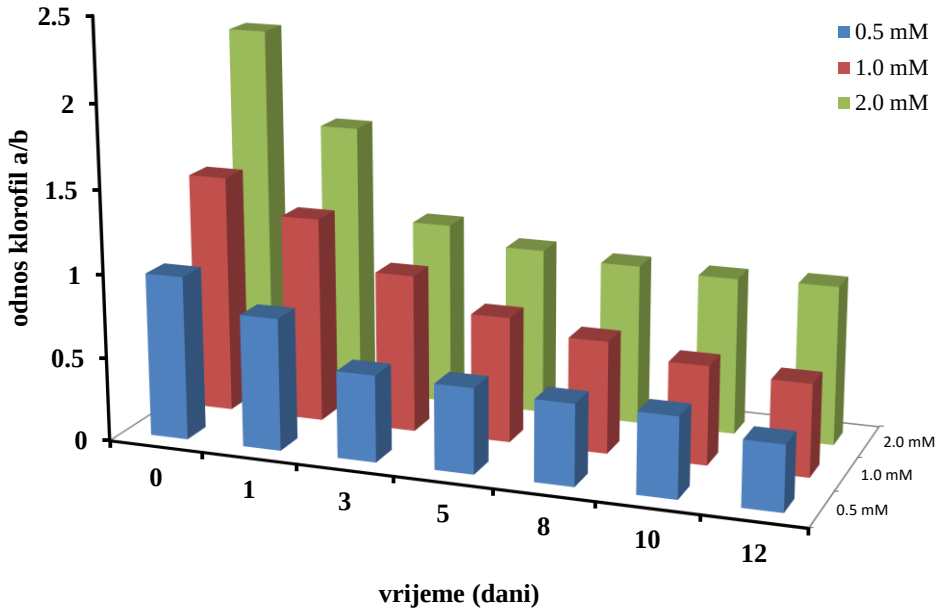
Slika 21. *E. gracilis* nakon dodatka 2 mM Cd^{2+} iona (24 h, preparat u kretanju, povećanje 100 x)



Slika 22. *E. gracilis* nakon dodatka 2 mM Cd^{2+} iona (14. dan, preparat u kretanju, povećanje 100 x)



Slika 23. Promjena udjela klorofila *a* i *b* tijekom 14 dana izloženosti Al^{2+} ionima

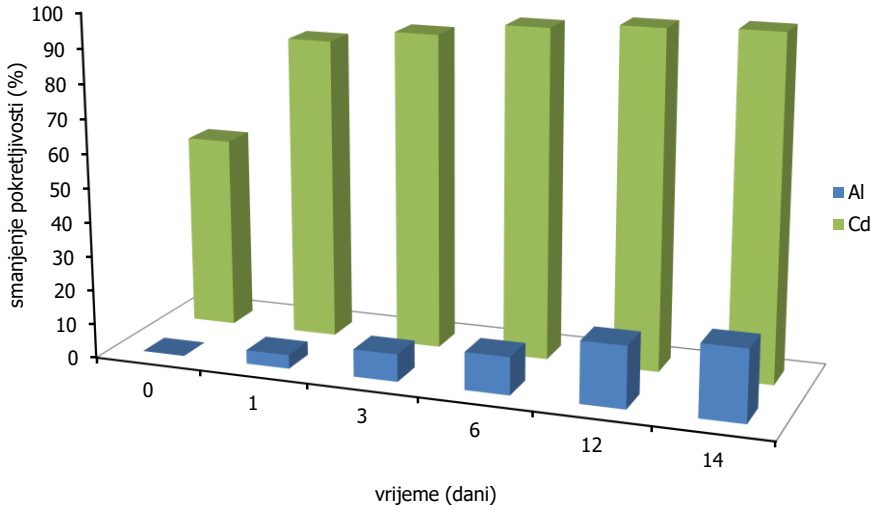


Slika 24. Promjena udjela klorofila *a* i *b* tijekom 14 dana izloženosti Cd^{2+} ionima

Tablica 2. Koncentracije klorofila *a* i *b* te ukupnih karotenoida u *E. gracilis* nakon dodatka soli teških metala (nakon 24 h i 14 dana)

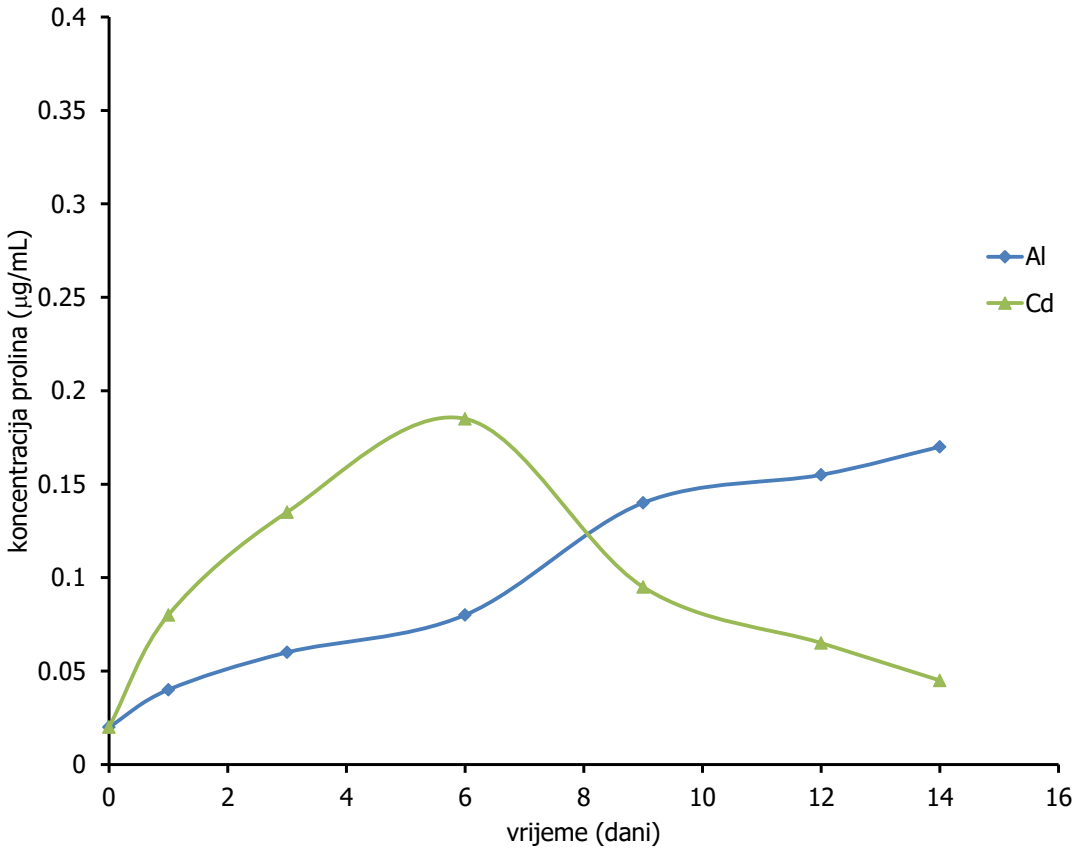
konc. iona	nakon 24 h			nakon 14 dana		
(mM)	C_a (μg/mL)	C_b (μg/mL)	K (μg/mL)	C_a (μg/mL)	C_b (μg/mL)	K (μg/mL)
Al^{2+}						
0.5	3.23	1.16	0.65	3.08	1.37	0.71
1.0	4.28	0.55	0.79	3.84	1.69	0.81
2.0	3.01	1.52	0.49	3.01	0.88	0.82
Cd^{2+}						
0.5	1.05	1.09	0.04	0.22	0.02	-
1.0	0.89	0.55	0.02	0.07	0.01	-
2.0	0.69	0.21	0.01	0.01	0.01	-

Učinak dodatka soli teških metala na pokretljivost *E. gracilis* prikazan je na Slici 25. Odmah nakon dodavanja Cd^{2+} iona, alga je izgubila 88 % pokretljivosti, dok je pokretljivost i pri Al^{2+} iona iznosila 85 % prema kontrolnom uzorku, a tijekom uzgoja se povećala. Nakon 14 dana uzgoja, kod Cd^{2+} iona *E. gracilis* je izgubila sposobnost kretanja za 99 %, dok je uz dodatak Al^{2+} iona izgubila samo 21% svoje pokretljivosti (Slika 25).



Slika 25. Smanjenje pokretljivosti *E gracilis* tijekom 14 dana izloženosti solima teških metala

Posljednji cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj dodanih soli teških metala na kinetiku nakupljanja prolina u stanicama *E. gracilis*, (Slika 26). Iz Slike 26 vidljivo je su najveće koncentracije prolina postignute nakon 6 dana uzgoja u podlozi s dodatkom Cd^{2+} iona, dok je kod Al^{2+} iona najveća koncentracija zabilježena tek na kraju uzgoja (14 dan), iako se nije značajnije mijenjala od 9-og dana uzgoja. Budući da je dodatak Cd^{2+} iona izazvao najveće morfološke promjene tijekom uzgoja, logično je da koncentracija prolina u stanicama *E. gracilis* bila najveća, no do kraja uzgoja se smanjivala i bila niža od koncentracije izmjerene u podlozi s dodanim Al^{2+} ionima, što je još jedan dokaz stanica *E. gracilis* da povećavaju svoj obrambeni sustav i prilagođavaju se postojećim uvjetima.



Slika 26. Kinetika sinteze prolina u *E. gracilis* tijekom 14 dana uzgoja u podlogama s dodanim solima Al^{2+} i Cd^{2+}

5. RASPRAVA

Mnogi su teški metali esencijalni mikronutrijenti za žive organizme i uključeni su u brojne metaboličke procese kao sastavni dijelovi enzima i drugih molekula. No, visoke koncentracije metala uglavnom izazivaju simptome toksičnosti zbog interakcija na staničnoj i molekularnoj razini (Hall, 2002). Neki organizmi mogu razviti strategiju otpornosti putem nekoliko mehanizama: ekskluzijom metala iz protoplasta vežući ih na staničnu stijenku (Heumann, 2002), slabom permeabilnosti plazmine membrane (Olivetti i sur., 1995), aktivnom ekstruzijom (van Hoof i sur., 2001) i djelomičnom integracijom metala u metabolizam (Navarro i sur., 1997; Cakmak, 2000).

Jednostaničnu algu *E. gracilis* karakterizira nevjerojatna metabolička plastičnost, odnosno prilagodljivost i zbog toga predstavlja modelni mikroorganizam za proučavanje razvoja otpornosti na teške metale (Pancaldi i sur., 2001). Stanice alge koje su uzgajane na svjetlu, a bile su izložene Cd^{2+}, Hg^{2+}, Zn^{2+}, Cr^{2+} i Pb^{2+} ionima, pokazale su inhibiciju rasta, fototaksije, pokretljivosti i fotosinteze (Watanabe i Suzuku, 2001). No, s produženim uzgojem u podlogama koje su sadržavale Cd^{2+}, Hg^{2+} i Pb^{2+}, došlo je do razvijanja obrambenog mehanizma, koji je rezultirao djelomičnim vraćanjem normalnih funkcija stanica (Navarro i sur., 1997).

U ovom je radu provedeno istraživanje utjecaja Al^{2+} i Cd^{2+} iona na morfološka svojstva (Slike 19-22) i pokretljivost stanica *E. gracilis* (Slika 25), te promjenu udjela klorofila *a* i *b*, kao i ukupnih karotenoida tijekom 14 dana uzgoja (Tablica 2).

Promjena oblika stanica povezana je, uz starenje kulture i sa stresom izazvanim uvjetima kojima je *E. gracilis* izložena (promjena temperature, pH, prisutnost teških metala) (Danilov i Ekelund, 2001). Ta se promjena oblika stanica smatra krajnjom točkom kratkotrajnog utjecaja soli teških metala na biokemijske promjene u algama, no *E. gracilis* se vrlo brzo prilagodila izloženosti Al^{2+} ionima (Slike 19 i 20), dok je već 1 sat nakon dodatka Cd^{2+} iona izgubila sposobnost pokretljivosti i prešla u palmela stadij i tako ostala do kraja istraživanja (Slike 21 i 22). Tijekom 14 dana uzgoja, *E. gracilis* je pokazala izuzetnu otpornost na utjecaje Al^{2+}, te je na kraju uzgoja izgubila samo 21 % pokretljivosti, dok je dodatkom Cd^{2+} iona nakon 14 dana bilo samo 1 % stanica pokretno (Slika 22).

Pigmenti su izrazito osjetljivi na stres izazvan dodatkom soli teških metala jer izazivaju inhibiciju njihove biosinteze i time utječu na sastav pigmenata. Nadalje, neka su istraživanja potvrdila da metali oštećuju komplekse pigment-protein i pojačavaju razgradnju već postojećih pigmenata foto-oksidacijom (Ruban i sur., 1999; Dekker i sur., 2002; Markina i Aizdaicher, 2007). Odnos udjela klorofila *a* prema klorofilu *b* prikazan je na Slikama 23 i 24. U ovom je radu uočeno da je klorofil *b* bio otporniji na stres nakon dodatka soli teških metala nego klorofil *a* i ukupni karotenoidi (Tablica 2). Dobiveni su rezultati u suglasju s rezultatima

koje su objavili Ruban i sur. (1999), koji smatraju da je klorofil *b* jače vezan za proteine od klorofila *a* i karotenoida. Slične su rezultate dobili i Azizullah i sur. (2012), nakon što su *E. gracilis* izložili djelovanju povećane koncentracije soli i mineralnih gnojiva. Kao i kod istraživanja pokretljivosti, prisutnost Cd^{2+} iona izrazito je nepovoljno utjecala na odnos klorofila *a* i *b* i pri svim istraživanim koncentracijama (Slika 24).

U ovom radu je ispitivano više neovisnih parametara, uz pretpostavku da će koncentracija dodanih soli teških metala i vrijeme izloženosti utjecati na morfologiju stanica, ponajprije pokretljivost, ali i da će se koncentracija klorofila *a* i *b*, ukupnih karotenoida i koncentracije prolina mijenjati tek nakon dužeg vremena izlaganja *E. gracilis* prisutnosti ispitivanih soli teških metala (14 dana). Pretpostavka je potvrđena jer u pokusima u kojima su u hranjivu podlogu dodani Al^{2+} ioni *E. gracilis* pokazala „ranjivost" odmah nakon dodatka soli i u prvih 24 h, no nakon toga se vrlo lako prilagodila novonastalim uvjetima, za razliku od posljedica dodatka Cd^{2+} iona (Slika 24, Tablica 2).

Mnoge biljke mogu sintetizirati velike koncentracije prolina kad se nađu u okolišu bogatom teškim metalima (Schat i sur., 1997), no vrlo je malo istraživanja napravljeno na algama (Wu i sur., 1998). Nakupljanje prolina u biljkama događa se kao odgovor na stres koji mogu izazvati visoka koncentracija soli (Lutts i sur., 1996) ili niske i visoke temperature (Naidu i sur., 1991). Prolin ima važnu ulogu u osmoregulaciji, zaštiti enzima, stabilizaciji mehanizma sinteze proteina, regulaciji kiselosti citosola i vezanju slobodnih radikala (Smirnoff i Cumbes, 1994).

Istraživanje provedeno u ovom radu, koje se odnosilo na metalima izazvano povećanje koncentracije intracelularnog prolina u *E. gracilis* u suglasju je s istraživanjima provedenim na višim biljkama (Costa i Morel, 1994), algama (Wu i sur., 1998) i cijanobakterijama (Wu i sur., 1995). Prema očekivanju, nakupljanje prolina bilo je najveće u stanica tretiranim s Cd^{2+} ionima. Kinetika nakupljanja prolina pokazala je da su najveće koncentracije postignute nakon dodatka Cd^{2+} iona nakon 6 dana uzgoja (Slika 26). Ovi rezultati razlikuju se od rezultata brzine akumulacije prolina u viših biljaka, kojima je potrebno duže vrijeme izlaganja teškim metalima da bi se postigao slični učinak (Bassi i Sharma, 1993a, b).

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu ovog istraživanja može se zaključiti:

1) Jednostanični protist *E. gracilis* uzgajana je na svjetlu 14 dana u organskoj podlozi s dodatkom različitih koncentracija soli teških metala (0.5; 1.0 i 2.0 mM Al^{2+} i Cd^{2+}).

2) *E. gracilis* se vrlo brzo prilagodila izloženosti Al^{2+} ionima i nije izgubila sposobnost pokretljivosti do kraja istraživanja. Dodatak Cd^{2+} iona izazvao je ireverzibilnu inhibiciju pokretljivosti 1 sat nakon dodatka u podlogu.

3) Koncentracija klorofila *a* se do 14 dana izloženosti solima teških metala povećala, za razliku od koncentracije klorofila *b* i ukupnih karotenoida, koje se nisu značajnije mijenjale. Promjene u koncentracijama klorofila *a* i karotenoida mogu se ocijeniti osjetljivim krajnjim točkama u ispitivanjima dugotrajnijeg (14 dana) utjecaja soli teških metala na fotosintetske sposobnosti *E. gracilis*.

4) Povećanje koncentracije intracelularnog prolina ovisno je o koncentraciji teških metala kojima je *E. gracilis* bila izložena. Kinetika nakupljanja prolina pokazala je da su najveće koncentracije postignute dodatkom Cd^{2+} iona u podlogu tek nakon 6 dana uzgoja.

7. LITERATURA

Alia, M.P., Matysik, J. (2001) Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acid* **21**: 195-200.

Arroyo, M., Heltai, L., Millan, D., DeSimone, A. (2012) Reverse engineering the euglenoid movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 17874-17879.

Azizullah, A., Richter, P., Hader, D.-P. (2012) Responses of morphological, physiological, and biochemical parameters in *Euglena gracilis* to 7-days exposure to two commonly used fertilizers DAP and urea. *Journal of Applied Phycology* **24**: 21-33.

Basaca-Loya, G.A. Valdez, M.A. Enriquez-Guevara, E.A. Gutierrez-Millan, L.E. Burboa, M.G. (2009) Extraction and purification of B-phycoerythrin from the red microalga *Rhodosorus marinus*. *Ciencias Marinas* **35**: 359–368.

Bassi, R., Sharma, S. S. (1993a) Changes in proline content accompanying the uptake of zinc and copper by *Lemna minor*. *Annals of Botany* **72**: 151-154.

Bassi, R., Sharma, S. S. (1993b) Proline accumulation in wheat seedlings exposed to zinc and copper. *Phytochemistry* **33**: 1339-1342.

Blaby-Haas, C.E., Merchant, S.S. (2012) The ins and outs of algal metal transport. *Biochimica et Biophysica Acta* **1823**: 1531–1552.

Cakmak, I. (2000) Possible role of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytologist* **146**: 185–205.

Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F. (2015) Responses to oxidative and heavy metal stresses in cyanobacteria: Recent advances. *International Journal of Molecular Sciences* **16**: 871–886.

Chang, S. C. (1991) Effect of cadmium on proline accumulation in estuarine *Chlorella* sp. cells. MSc Thesis, National Taiwan University Taipei.

Costa, G., Morel, J. L. (1994) Water relations, gas excange and amino acid content in cadmium-treated lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry* **32**: 561-570.

Danilov, R.A., Ekelund N.G.A. (2001) Responses of photosynthetic efficiency, cell shape and motility in *Euglena gracilis* (Euglenophyceae) to short-term exposure to heavymetals and pentachlorophenol. *Water, Air & Soil Pollution* **132**: 61-73.

Danilov, R.A., Ekelund N.G.A. (2002) Effects of short-term and long-term aluminum stress on photosynthesis, respiration, and reproductive capacity in a unicelluar green flagellate (*Euglena gracilis*). *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* **30**: 190-196.

Dekker, J.P., Germano, M., van Roon, H., Boekema, E.J. (2002) Photosystem II solubilizes as a monomer by mild detergent treatment of unstacked thylakoid membranes. *Photosynthesis Research* **72**: 203-210.

Falkowski, P.G., Raven, J.A. (2007) Aquatic photosythesis. Princenton University Press, Princenton.

Fatma, T., Khan., M.A., Choudhary, M. (2007) Impact of environmental pollution on cyanobacterial proline content. *Journal of Applied Phycology* **19:** 625-629.

Ferrari, S.G., Silva, P.G., Gonzalez, D.M., Navoni, J.A., Silva, H.J. (2013) Arsenic tolerance of cyanobacterial strains with potential use in biotechnology. *Revista Argentina de Microbiologia* **45**: 174–179.

Gantt, E. (1996) Pigment complexes and the concept of the photosynthetic unit: Chlorophyll complexes and phycobilisomes. *Photosynthesis Research* **48**: 47–53.

Green, B,R., Durnford, D.G. (1996) The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 685–714.

Grill E., Loffler, S., Winnacker, E.L., Zenk, M.H. (1989) Phytochelatins, the heavy- metal-binding-peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific *γ* -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**: 6838–6842.

Gruenberger, C., Ritter, R., Aumayr, F., Stachelberger, H., Gebeshuber, I. C. (2007) Algal biophysics: *Euglena gracilis* investigated by atomic force microscopy. *Materials Science Forum* **555**: 411-416.

Hall, J.L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1–11.

He, M., Wang, Z., Tang, H. (1998) The chemical, toxicological and ecological studies in assessing the heavy metal pollution in Le An river, China. *Water Research* **32**: 510-518.

Heumann, H.G. (2002) Ultrastructural localization of zinc in zinc-tolerant *Armeria maritima* ssp. *halleri* by autometallography. *Journal of Plant Physiol*ogy **159**: 191–203.

Hogsen, K.L., Harding, J.S. (2013) Anthropogenic and natural sources of acidity and metals and their influence on the structure of stream food webs. *Environmental Pollution* **162**: 466-474.

Hutner, S.H., Zahalsky, S., Aaronson, S., Baker, H., Frank, O. (1966) Culture media for *Euglena gracilis. Methods in Cell Physiology* **2**: 217-228.

Kiss, J.Z., Vasconcelos, A.C., Triemer, R.E. (1987) Structure of the euglenoid storage carbohydrate, paramylon. *American Journal of Botany* **74**: 877-882.

Kiss, J.Z., Triemer, R.E. (1988) A comparative study of the storage carbohydrate granules from *Euglena* (Euglenophyceae). *Journal of Phycology* **22**: 327-333.

Kneer, R., Zenk, M.H. (1992) Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochemistry* **31**: 2663–2667.

Leedale, G.F. (1967) Euglenoid Flagellates. Englewood Cliffs, N.J. Prentice-Hall.

Lonergan, T.A. (1983) Regulation of cell shape in *Euglena gracilis*. I. Involvement of the biological clock, respiration, photosynthesis, and cytoskeleton. *Plant Physiology* **71**: 719-730.

Longitudinalna binarna fizija stanice *E. gracilis* https://www.youtube.com/watch?v=UZhikbEvMEU Pristupljeno 06.lipnja 2017.

Lourie, E., Patil, V., Gjengedal, E. (2010) Efficient purification of heavy-metal-contaminated water by microalgaeactivated pine bark. *Water, Air & Soil Pollution* **210**: 493- 500.

Lutts, S., Kinet, J. M., Bouhartmond, J. (1996) Effects of various salts and mannitol on ion and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryzae sativa* L.) callus cultures. *Journal of Plant Physiology* **149**: 186-195.

Markina, Z.V., Aizdaicher, N.A. (2007) Influence of laundry detergents on the abundance dynamics and physiological state of the benthic microalga *Attheya ussurensis* (Bacillariophyta) in laboratory culture. *Russian Journal of Marine Biology* **33**: 391-398.

Mendoza-Cózatl, D.G., Rangel-Gonzáles, E., Moreno-Sánchez, R. (2006) Simultaneous Cd^{2+}, Zn^{2+}, and Pb^{2+} uptake and accumulation by photosynthetic *Euglena gracilis. Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **51**: 521-528.

Merlos, M.A., Michátek, P., Krištofova, O., Zitka, O., Adani, V., Kizek, R. (2014) The role of phytochelatins in plant and animals: A review. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* **1**: 22-27.

Mishra, S.K., Shrivastav, A., Maurya, R.R., Patidar, S.K., Haldar, S., Mishra, S. (2012) Effect of light quality on the C-phycoerythrin production in marine cyanobacteria *Pseudanabaena* sp. isolated from Gujarat coast, India. *Protein Expression and Purification* **81**: 5–10.

Monteiro, C.M., Castro, P.M.L., Malcata, F.X. (2012) Metal uptake by microalgae: Underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnology Progress* **28**: 299–311.

Monfils, A.K., Triemer, R.E., Bellairs, E.F. (2011) Characterization of paramylon morphological diversity in photosynthetic euglenoids (Euglenales, Euglenophyta). *Phycologia* **50**: 156-169.

Mortensen, A. (2006) Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure and Applied Chemistry* **8**: 1477–1491.

Naidu, B. P., Paleg, L. G., Aspinall, D., Jenning, A. C., Jones, G. P. (1991) Amino acid and glycine betaine accumulation in cold stressed wheat seedlings. *Phytochemistry* **30**: 407-409.

Navarro, L., Torres-Marquez, M.E., Gonzales-Morreno, S., Devars, S., Hernandez, R., Moreno-Sanchez, R. (1997) Comparison of physiological changes in *Euglena gracilis* during exposure to heavy metals in heterotrophic and autotrophic cells. *Comparative Biochemistry and Physiol*ogy **116**: 265-272.

Olivetti, G.P., Cumming, J.R., Etherton, B. (1995) Membrane potential depolarization of root cap cells precedes aluminium tolerance in snapbean. *Plant Physiology* **109**: 123–129.

Quiroz-Vázquez, P., Sigee, D.C., White, K.N. (2010) Bioavaibility and toxicity of aluminium in a model plankctonic food chain (Chlamydomonas_Daphnia) at neutral pH. *Limndogica* **40**: 269-277.

Pancaldi, S., Bonora, A., Baldisserotto, C., Gualandri, R., Neri, L.M., Fasulo, M.P. (2001) Deregulation of light-induced plastidogenesis in etiolated *Euglena gracilis* Klebs treated with DNA hypermethylating 3-azido- 3-deoxythymidine. *Plant Biology* **3**: 524–535.

Pelikula *E. gracilis* http://www.pmbio.icbm.de/mikrobiologischer-garten/eng/eneug=3a.htm Pristupljeno 06. 05. 2017.

Perales-Vela, H.V., Pena-Castro, J.M., Canizares-Villanueva, R.O. (2006) Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere* **64**: 1–10.

Prasanna, R., Sood, A., Suresh, A., Nayak, S., Kaushik, B.D. (2007) Potentials and applications of algal pigments in biology and industry. *Acta Botanica Hungarica* **49:** (1–2), 131–156.

Rai, P.K. (2008) Heavy-metal pollution in aquatic ecosystems and its phytoremediation using wetland plants: An eco-sustainable approach. *International Journal of Phytoremediation* **10**: 133- 160.

Rai, P.K. (2010) Phytoremediation of heavy metals in a tropical impoundment of industrial region. *Environmental Monitoring and Assessment* **165**: 529-537.

Rauser, W.E. (1995) Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis and function. *Plant Physiology* **109**: 1141–1149.

Ruban, A.V., Lee, P.J., Wentworth, M., Young, A.J., Horton, P. (1999) Determination of the stoichiometry and strenght of binding of xanthophylls to the photosystem II light harvesting complex. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 10458-10465.

Sears, M.E. (2013) Chelation: Harnessing and enhancing heavy metal detoxification—A review. *Sci. World J.* doi:10.1155/2013/219840.

Schat, H., Sharma, S. S., Voojy, R. (1997) Heavy metal-induced accumulation of free proline in metal-tolerant and a nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiologia Plantarum* **101**: 1023-1030.

Shukla, M.K., Tripathi, R.D., Sharma, N., Dwivedi, S., Mishra, S., Singh, R., Shukla, O.P., Rai, U.N. (2009) Responses of cyanobacterium *Anabaena doliolum* during nickel stress. *Journal of Environmental Biology* **30**: 871–876.

Smirnoff, N., Cumbes, H. (1994) Hydroxyl radical scavenging activiry of compatible solutes. *Phytochemistry* **28**: 1057-1060.

Stahl, W., Sies, H. (2005) Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta* **1740**: 101–107.

Stanište *E. gracilis*. (http://www.clemson.edu/extension/natural_resources/water/stormwater_ponds/problem_solving/aquatic_weeds/algae_planktonic/index.html). Pristupljeno 05. 05. 2014.

Struktura stanice *E. gracilis* (http://keywordssuggest.org/gallery/427437.html) Pristupljeno 06. 05. 2017.

Van Hoof, N.A.L.M., Koevoets, P.L.M., Hakvoort, H.W.J., Ten Bookum, W.M., Schat, H., Verkeleij, J.A.C., Ernst, W.H.O. (2001) Enhanced ATP-dependent copper efflux across the root cell plasma membrane in copper-tolerant *Silene vulgaris. Physiologia Plantarum* **113**: 225-232.

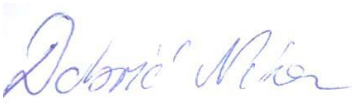
Vegetativne stanice i palmela stadij *E. gracilis*. (http://www.lebendkulturen.de/index.php/kulturen/algen/euglena-gracilis) Pristupljeno 07. 05. 2017.

Watanabe, M., Suzuki, T. (2001) Cadmium-induced abnormality in strains of *Euglena gracilis*: morphological alternation and its prevention by zinc and cyanocobalamin. *Comparative Biochemistry and Physiology* **130C**: 29-39.

Wu, J. T., Chang, S. C., Chen, K. S. (1995) Enhancement of anticellular proline level in cells of *Anacystis nidulans* (cyano-bacteria) exposed to deterious concentration of copper. *Journal of Phycology* **31**: 376-379.

Wu, J. T., Hsieh, M. T., Kow, L. C. (1998) Role of proline accumulation in response to toxic copper in *Chlorella* sp. (Chlorophyceae) cells. *Journal of Phycology* **34**: 113-117.

Zenk, M.H. (1996) Heavy metals detoxification in higher plants – a review. *Gene* **179**: 21–30.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.