UTJECAJ SELENITA NA RAST I ANTIOKSIDACIJSKI ODGOVOR ZELENE MIKROALGE Monoraphidium cf. contortum

Pilipović, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:549559

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Ana Pilipović

UTJECAJ SELENITA NA RAST I ANTIOKSIDACIJSKI ODGOVOR ZELENE MIKROALGE *Monoraphidium* cf. *contortum*

Diplomski rad

Osijek, 2018

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Diplomski rad**
Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

UTJECAJ SELENITA NA RAST I ANTIOKSIDACIJSKI ODGOVOR ZELENE MIKROALGE *Monoraphidium* cf. *contortum*

Ana Pilipović

Rad je izrađen:
Laboratorij za ekologiju alga, Odjel za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Laboratorij za biokemiju Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Mentor: dr. sc. Dubravka Špoljarić Maronić, docent
Komentor: dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, docent

Kratki sažetak: Selen (Se) je kemijski mikroelement esencijalan za mnoge organizme, uključujući i mikroalge koje predstavljaju glavni put prijenosa Se iz vode prema drugim potrošačima u hranidbenim mrežama vodenih ekosustava. Cilj istraživanja bio je utvrditi utjecaj različitih koncentracija selenita (5, 25, 50 i 100 mg/L) na antioksidacijski status jednostanične zelene alge *Monoraphidium* cf. *contortum* tijekom različitih vremenskih perioda (24, 48 i 72 sata). Tretmani selenitom uzrokovali su inhibiciju rasta alga i smanjenje sadržaja fotosintetskih pigmenata. U odnosu na kontrolne kulture, selenit je povećao aktivnost antioksidacijskih enzima (glutation-reduktaze, glutation-peroksidaze i askorbat-peroksidaze), a inhibirao aktivnost katalaze te uzrokovao povećanje sadržaja produkata lipidne peroksidacije. Utjecaj je bio izraženiji pri višim koncentracijama i tijekom dužeg izlaganja selenitu.

Broj stranica: 37
Broj slika: 13
Broj tablica: 1
Broj literaturnih navoda: 68
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: selenit, *Monoraphidium* cf. *contortum*, antioksidacijski enzimi, lipidna peroksidacija, fotosintetski pigmenti

Datum obrane: 31.1.2018.
Stručno povjerenstvo za obranu:
1. dr. sc. Rosemary Vuković, docent, predsjednik povjerenstva
2. dr. sc. Dubravka Špoljarić Maronić, docent, mentor
3. dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, docent, komentor
4. dr.sc. Tanja Žuna Pfeiffer, docent, zamjena člana

Rad je pohranjen u: knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **Master's Thesis**
Department of Biology
Graduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural sciences
Scientific Field: Biology

THE INFLUENCE OF SELENITE ON GROWTH AND ANTIOXIDATIVE RESPONSE IN GREEN MICROALGA *Monoraphidium* cf. *contortum*

Ana Pilipović

Thesis performed at:
Laboratory of Algal Ecology, Department of Biology, J.J. Strossmayer University of Osijek
Laboratory of Biochemistry, Department of Biology, J.J. Strossmayer University of Osijek
Supervisor: Dubravka Špoljarić Maronić, PhD, Assistant Professor
Co-supervisor: Ivna Štolfa Čamagajevac, PhD, Assistant Professor

Short abstract: Selenium (Se) is a chemical microelement essential for many organisms, including microalgae. In aquatic ecosystems, microalgae represent the primary route of Se transport from water to other consumers in the food webs. The aim of this study was to determine the influence of different selenite concentrations (5, 25, 50 i 100 mg/L) on the antioxidative status of unicellular green alga *Monoraphidium* cf. *contortum* during different time periods (24, 48 and 72 hours). The results showed the inhibiting effect of selenite on algal growth as well as reduced content of photosynthetic pigments. Also, selenite treatment increased the activity of antioxidative enzymes (glutathione reductase, glutathione peroxidase and ascorbate peroxidase), inhibited the activity of catalase and caused the increase in the content of lipid peroxidation products compared to control cultures. All changes were more pronounced in higher selenite concentrations and longer treatments.

Number of pages: 37
Number of figures: 13
Number of tables: 1
Number of references: 68
Original in: Croatian
Key words: selenite, *Monoraphidium* cf. *contortum,* antioxidant enzymes, lipid peroxidation, photosynthetic pigments

Date of the thesis defence: 31.1.2018.
Reviewers:
1. Rosemary Vuković, Assistant Professor, PhD, president
2. Dubravka Špoljarić Maronić, Assistant Professor, PhD, supervisor
3. Ivna Štolfa Čamagajevac, Assistant Professor, PhD, co-supervisor
4. Tanja Žuna Pfeiffer, Assistant Professor, PhD, substitute reviewer

Thesis deposited in: the Library of the Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek and in the National and University Library in Zagreb in electronic form. It is also available on the website of the Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Dubravki Špoljarić Maronić i komentorici doc. dr. sc. Ivni Štolfi Čamagajevac na strpljenju, razumijevanju i vođenju kroz provedeno istraživanje te na pruženim savjetima tijekom pisanja ovog diplomskog rada.

Veliko hvala i Nikolini Sabo na pomoći u eksperimentalnom radu.

Posebno se zahvaljujem svojim prijateljima i Luki koji su bili uz mene čitavo vrijeme od početka studija i studentske dane učinili nezaboravnima.

Najveće zahvale idu mojim roditeljima i sestri Ivani na bezgraničnoj podršci, pomoći i razumijevanju tijekom studiranja.

Rad je izrađen u sklopu projekta „Utjecaj selena na alge - in vitro i ekološka istraživanja u vodenim ekosustavima“ internog natječaja Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku za prijavu znanstvenoistraživačkih i umjetničkih projekata na program Gost istraživač (INGI-2015-23).

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Selen i njegovi oblici u okolišu 1
1.2. Akumulacija i metabolizam selena u algama 3
1.3. Uloga selena u oksidacijskom statusu biljnih stanica 6
1.3.1. Pokazatelji oksidacijskog stresa 6
1.3.2. Antioksidacijski pokazatelji 7
1.3.3. Fiziološki odgovor biljnih stanica na tretmane selenom 8
1.4. Cilj diplomskog rada 10
2. MATERIJALI I METODE 11
2.1. Uzgoj kultura alge *Monoraphidium* cf. *contortum* i tretman natrijevim selenitom (Na_2SeO_3 x $5H_2O$) 11
2.2. Praćenje prirasta kultura 14
2.3. Određivanje koncentracije pigmenata 14
2.4. Izolacija proteina 15
2.5. Određivanje koncentracije proteina 15
2.6. Enzimske antioksidacijske komponente 15
2.6.1. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze 15
2.6.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti askorbat-peroksidaze 16
2.6.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti glutation-reduktaze 16
2.6.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze 16
2.7. Pokazatelji oksidacijskoga stresa 16
2.7.1. Određivanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije 16
2.8. Statistička obrada podataka 17
3. REZULTATI 18
3.1. Utjecaj tretmana selenitom na rast kulture alga *Monoraphidium* cf. *contortum* 18
3.2. Utjecaj tretmana selenitom na koncentraciju fotosintetskih pigmenata 19
3.2.1. Koncentracije klorofila-a (Chl-a) 19
3.2.2. Koncentracije klorofila-b (Chl-b) 20
3.2.3. Koncentracija karotenoida (Car) 21
3.3. Utjecaj tretmana selenitom na aktivnost antioksidacijskih enzima 22
3.3.1. Aktivnost enzima katalaze (CAT) 22
3.3.2. Aktivnost enzima glutation-reduktaze (GR) 23

3.3.3. Aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APX) 25
3.3.4. Aktivnost enzima glutation-peroksidaze (GPX) 26
3.4. Utjecaj tretmana selenitom na koncentraciju produkata lipidne peroksidacije (LPO) 27
4. RASPRAVA 28
5. ZAKLJUČCI 32
6. LITERATURA 33

1. UVOD

1.1. Selen i njegovi oblici u okolišu

Selen (Se) je kemijski mikroelement koji je esencijalan za mnoge organizme, uključujući mikroalge i bakterije. Pripada skupini halkogenih elemenata (VIA skupina elemenata) s atomskom masom od 78,96 g/mol te atomskim brojem 34 (Kopsell i Kopsell, 2006). Bioraspoloživost i toksičnost Se ovisi o njegovom kemijskom obliku. Budući da Se posjeduje svojstva slična metalima, pojavljuje se u više oksidacijskih stanja: (+6), (+4), (0) i (-2) pri čemu nastaju različiti spojevi. Selen se u prirodi može pronaći u obliku organskih i anorganskih spojeva (Tan i sur., 2016).

Anorganski oblici, selenit (SeO_3^{2-}) i selenat (SeO_4^{2-}), predstavljaju najvažnije oblike Se za biljne organizme. Selenit, selenat, selenidi te netopljivi elementarni selen (Se^0) se često mogu pronaći u površinskim i podzemnim vodama te močvarnim ekosustavima (Tan i sur., 2016). Koncentracija selenata i selenita ovisi o pH vrijednosti sustava u kojem se nalaze. Selenat je učestaliji u alkalnim sredinama koje su bogate kisikom, dok selenit prevladava u uvjetima anoksije te povećane vlažnosti i kiselosti (Tan i sur., 2016). Osim o pH vrijednosti, koncentracija selenita i selenata u vodama ovisi i o mikrobnoj aktivnosti. Pojačana mikrobna aktivnost uzrokuje smanjenje koncentracije selenita i selenata te je stoga izuzetno važan pokazatelj koji utječe na topljivost i dostupnost Se i brojnih drugih kemijskih elemenata (Martens, 2003).

Osim anorganskih oblika, vrlo su važni i organski oblici Se. Ključni korak biogeokemijskog ciklusa Se je pretvorba anorganskih oblika u organske oblike, takozvane selenoproteine, djelovanjem primarnih producenata kao što su bakterije i alge (Janz, 2011). Proteini koji u svom sastavu imaju selenocistein (SeCys) kao integralni dio polipeptida nazivaju se selenoproteini. Ovakav je oblik proteina sto puta jači nukleofilni agens u odnosu na uobičajeni sa sumporom u cisteinu (Cys) (Milanović i sur., 2014). Također, zbog svoje niže pK_a vrijednosti (5,2 za SeCys, 8,3 za Cys), SeCys je znatno reaktivniji od samog Cys (Stock i Rother, 2009). Biokemijski i stanični učinci Se postižu se kroz aktivnost selenoproteina, točnije kroz atipičnu aminokiselinu SeCys u njihovom aktivnom mjestu (Steinbrenner i sur., 2016). Većina selenoproteina pronađena je kod životinja, no otkriveni su i kod alga. Istraživanje genoma jednostanične zelene alge *Chlamydomonas reinhardtii* dovelo je do identifikacije cijelog selenoproteoma s dvanaest selenoproteina (Novosel i sur., 2002). Jednostanične alge roda *Ostreococcus* (Chlorophyta) i *Cyanidioschyzon* (Rhodophyta) te vrsta *Emiliania huxleyi* (Haptophyta) također sadrže selenoenzime (Umysovà i sur., 2009). Selenoproteini imaju vrlo važnu antioksidacijsku ulogu jer sudjeluju u hvatanju reaktivnih

kisikovih spojeva (engl. *Reactive Oxygen Species*; ROS), a imaju i brojne još nepoznate funkcije koje su važne za održavanje redoks potencijala (Umysovà i sur., 2009).

Glavni izvori Se u atmosferi su rudarenje i izgaranje fosilnih goriva pa se sukladno tome u urbanim područjima mogu uočiti sezonske fluktuacije koncentracije Se s višim koncentracijama u zimskim mjesecima i nižim u ljetnom razdoblju (Sager, 1993). Dodatno taloženje Se može imati negativne učinke na vodene ekosustave, a istraživanja su pokazala da se upravo taloženjem iz atmosfere povećava njegova koncentracija u oceanskim površinskim vodama (Cutter i Church, 1986). Selen se iz atmosfere najčešće uklanja takozvanim mokrim taloženjem te vezivanjem na čestice aerosola. Istraživanje provedeno na području Belgije dokazalo je prisutnost visokih koncentracija selenata i selenita u kišnici i snijegu dok su vrijednosti selenida i elementarnog sumpora bile zanemarive (Sager, 1993).

Sadržaj Se u prirodnim vodama varira u širokom rasponu od 2 ng/L do 300 pg/L. Uobičajene koncentracije u slatkovodnim ekosustavima kreću se u rasponu od 0,13 do 2,50 nmol/L (ekvivalentno 0,01 - 0,5 μg Se/L), dok veće koncentracije od 5 μmol/L (ekvivalentne 400 μg Se/L) nalazimo na onečišćenim područjima (Sun i sur., 2014). Najviše koncentracije pronađene su u vodama aridnih područja te u vodama s malom količinom kisika. Također, visoke vrijednosti Se pojavljuju se u vodama s velikom količinom sumporovodika te vodama s niskim ili neutralnim pH vrijednostima kao i u sustavima onečišćenim otpadnim vodama. Jedan od anorganskih oblika Se, selenat, ima veliku mobilnost te ga vrlo često nalazimo u vodama. Otapanjem pirita (FeS_2) se oslobađa veća količina selenata i sulfata dok otapanje kalcijevog sulfata dihidrata ($CaSO_4 \times 2H_2O$) ne doprinosi povećanju njegove koncentracije (Sager, 1993). U kiseloj sredini, selenat se reducira u selenit uz pomoć huminske kiseline (An i Langqiu, 1987). Za razliku od selenata i selenita, organski Se se rijetko može pronaći u površinskim vodama.

Zbog adsorpcijskih pojava i geokemijskih afiniteta, limnički (kopneni) i morski sediment je obogaćen velikom količinom Se. Prosječna koncentracija u kopnenom sedimentu dvostruko je veća nego u morskoj glini. U slatkovodnim ekološkim sustavima, selenat se djelomično reducira u selenit pa su ova područja bogatija selenitom. Toksičnost Se u slatkovodnim ekološkim sustavima rezultat je njegove bioakumulacije, biotransformacije i cirkulacije u hranidbenoj mreži (Maier i Knight, 1994). Osim prirodnih procesa, brojne antropogene aktivnosti također utječu na prisutnost Se u prirodi pa tako ugljen, fosfati i različite rude iz brojnih rudnika te primjena mulja na poljoprivrednim zemljištima mogu povećati unos Se u vodene ekosustave (Chua i sur., 2016). Selenat je obično dominantan oblik selena kod antropogenog ulaska Se u vodene ekosustave (Janz, 2011). Također, sirova nafta

predstavlja veliki izvor Se koji u vodeni sustav dolazi otpuštanjem nepročišćenih otpadnih voda (Cutter, 1989).

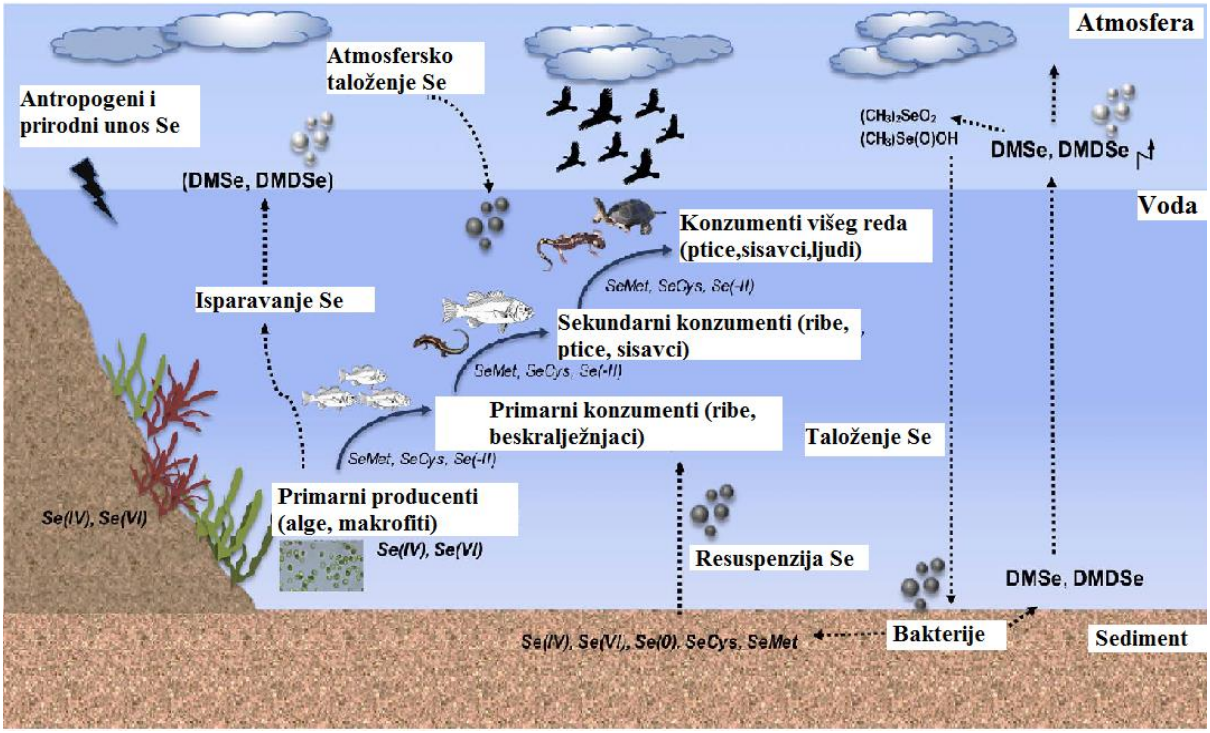
Postoje tri najznačajnija mehanizma transformacije Se u okolišu: oksidacija/redukcija, isparavanje i mineralizacija/inkorporacija. Apsorpcijska sposobnost najniža je kod selenata, a najviša kod selenita (selenat → selenometionin → selenit) (Sager, 1993).

1.2. Akumulacija i metabolizam selena u algama

U mikroalge ubrajamo oko 50 000 različitih vrsta alga, među kojima su najbrojnije dijatomeje, zelene alge i cijanobakterije (Web 1). Njihova biomasa koristi se u proizvodnji farmaceutskih, prehrambenih i kozmetičkih proizvoda (proteina, masnih kiselina, vitamina, antioksidansa, pigmenata, lijekova i imunostimulansa) kao i u proizvodnji biogoriva, električne energije i topline, bioplastike i gnojiva (Rezić i sur., 2014). Zbog visokog sadržaja višestruko nezasićenih masnih kiselina, pigmenata, antioksidansa i drugih bioaktivnih tvari, mikroalge se također koriste u prehrani i proizvodnji različitih zdravih dodataka prehrani (Gojković i sur., 2015). Velika količina ugljikovog dioksida kojeg apsorbiraju iz atmosfere te brži prirast biomase za proizvodnju biogoriva i smanjena potrošnja vode u odnosu na poljoprivredne kulture, samo su neke od prednosti korištenja mikroalga (Web 1).

Zelene alge (Chlorophyta) su fotosintetski organizmi koji uključuje mikroskopske eukariotske alge kao i makroskopske oblike. Podijeljene su na oko 6390 rodova s oko 10 000 različitih vrsta (Web 2). Bez obzira na veliku raznolikost, imaju ista osnovna obilježja: klorofil-a i -b, grupirane tilakoide te škrob u kloroplastima. Selen, ovisno o koncentraciji, ima dvojni utjecaj na alge. Pri nižim koncentracijama može pospješiti njihov rast, dok je pri višim izrazito toksičan (Gojković i sur., 2015). Mikroalge imaju sposobnost pretvorbe Se u selenoproteine, Se-metabolite i brojne hlapljive spojeve (Gojković i sur., 2015).

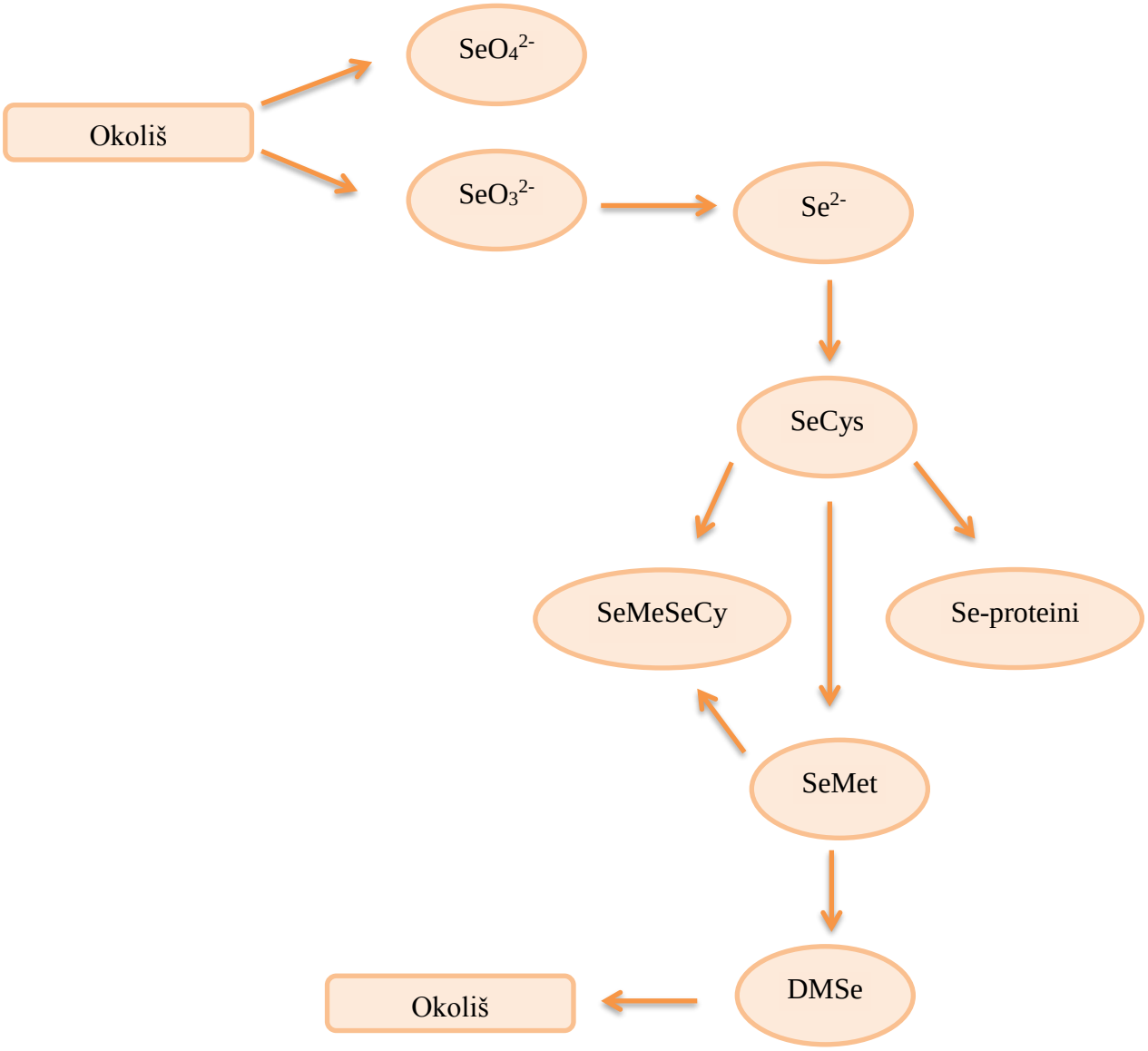
U vodenim ekosustavima, mikroalge predstavljaju glavnu kariku u prijenosu Se iz vode prema drugim potrošačima u hranidbenom lancu. Apsorbiraju Se iz vode u obliku selenita i selenata te ga djelomično pretvaraju u organske oblike prije nego što ga akumuliraju viši organizmi (Fan i sur., 2002). Organske komponente se dalje prenose preko primarnih i sekundarnih konzumenata do konzumenata višeg reda (Schiavon i sur., 2017) (Slika 1.)



Slika 1. Prijenos Se između jedinica vodenog ekosustava i unutar hranidbene mreže (preuzeto i modificirano prema Schiavon i sur., 2017.)

Selenit je prisutniji u blago oksidirajućim sustavima, dok selenat prevladava u oksidirajućim sredinama, stoga ih alge akumuliraju ovisno o uvjetima i dostupnosti (Schiavon i sur., 2017). Zbog svoje toksičnosti, selenit se znatno brže akumulira od selenata (Hasanuzzaman i sur., 2010). Alge također mogu akumulirati i druge oblike Se, no njih nalazimo u znatno nižim koncentracijama (Schiavon i sur., 2017). Za akumulaciju Se u stanicama alga vrlo je važna pH vrijednost vodenog medija. Primjerice, zelena alga *C. reinhardtii* akumulira najveću količinu selenita i selenata kada je pH vrijednost blizu 8 te kada je niža od 5. Nadalje, Se smanjuje unos metala kao što su kadmij i živa čime ublažava toksične učinke tih metala na organizme koji ih apsorbiraju (Lo i sur., 2015). Prisutnost sulfata, fosfata i silikata u vodama također utječe na apsorpciju Se. Selenat je kemijski vrlo sličan sulfatima te se s njima natječe za vezna mjesta prilikom akumulacije u stanice alga (Lo i sur., 2015). Kinetička analiza akumulacije Se ukazuje na postojanje različitih sustava koji omogućavaju prijenos selenata i selenita kroz stanične membrane alga. Zbog svoje sličnosti sa sumporom, Se se nalazi u obliku selenida koji se dalje koristi kao supstrat za sintezu Se-aminokiselina, SeCys i selenometionina (SeMet). Neke mikroalge mogu učinkovito metilirati aminokiseline te ih pretvoriti u hlapljive spojeve ili akumulirati Se u obliku elementarnog Se (Schiavon i sur., 2017). Nakon apsorpcije Se iz vode, selenat i selenit se reduciraju u selenid

(Se^{2-}) koji se potom može ugraditi u proteine preko selenocisteinskog puta ili postupno metabolizirati na SeMet i SeCys. SeMet isparava do hlapljivog spoja dimetil-selenida (DMSe), dok SeCys služi za daljnju akumulaciju, odnosno metilira se do Se-metilselenocisteina (SeMeSeCys) (Slika 2) (Gojković i sur., 2015).



Slika 2. Shematski prikaz metabolizma Se u mikroalgama (preuzeto i modificirano prema Hasanuzzaman i sur., 2010.)

Količina akumuliranog Se u višim biljkama manja je od 25 µg po gramu suhe tvari, a veće koncentracije mogu na biljke djelovati toksično. S druge strane, cijanobakterije poput vrste *Spirulina platensis*, mogu akumulirati znatno veće koncentracije, čak do 400 µg/g (Sun i

sur., 2014). Selen je vrlo važan za mnoge vrste alga. Brojna istraživanja dokazuju pozitivne učinke Se na rast alga i njegov značaj u antioksidacijskom odgovoru. Zheng i suradnici (2017) dokazali su pozitivan utjecaj nižih koncentracija selenita na rast zelene mikroalge *Haematococcus pluvialis*. Kod zelene alge *Chlorella vulgaris* veće koncentracije selenita uzrokovale su povećanje aktivnosti enzima superoksid-dismutaze (SOD), dok su aktivnost katalaze (CAT) inhibirale (Sun i sur., 2014). Većina provedenih istraživanja govore o dvostrukom djelovanju Se, antioksidacijskom pri manjim koncentracijama, odnosno prooksidacijskom pri većim koncentracijama (Sun i sur., 2014).

Postoje brojne metode i testovi za određivanje toksičnosti elemenata i određenih spojeva u vodi koji koriste različite modele istraživanja: bakterije, alge, beskralježnjake, biljke i brojne druge skupine organizama (Web 3). Testovi toksičnosti na algama relativno su jeftini, brzi, izuzetno osjetljivi i jednostavni te omogućuju brzi prirast testnog organizma (Nyholm i Källqvist, 1989). Zelene mikroalge, posebice vrsta *Pseudokirchneriella subcapitata*, najčešći su modeli u testovima toksičnosti (Radix i sur., 2000). Takvi testovi razlikuju se po uvjetima uzgoja alga, primjerice temperaturi, intenzitetu svjetlosti i aeraciji.

1.3. Uloga selena u oksidacijskom statusu biljnih stanica

1.3.1. Pokazatelji oksidacijskog stresa

Svaki organizam odgovara na promjene koje se događaju u njegovoj okolini i ekološkom sustavu. Brojni abiotički čimbenici, kao što su promjene u intenzitetu svjetlosti, temperaturi, salinitetu, poplave, suša i teški metali mogu utjecati na organizme i uzrokovati oksidacijski stres. Oksidacijski stres se definira kao pomak ravnoteže u smjeru oksidacije, odnosno stanje u kojem se povećava koncentracija ROS-a pri čemu se narušava stanični metabolizam i njegova regulacija što u konačnici dovodi do oštećenja staničnih struktura (Lushchak, 2011). U normalnim fiziološkim uvjetima, molekula kisika može oduzeti elektrone drugim molekulama što dovodi do stvaranja slobodnih radikala (Štefan i sur., 2007). Reaktivni kisikovi spojevi kao što su peroksilni radikal (ROO·), hidroksilni radikal (OH·), superoksidni radikal ($O_2^{\bullet -}$), vodikov peroksid (H_2O_2) i singletni kisik ($^1O_2$) predstavljaju slobodne radikale i reaktivne tvari koje su ujedno i nusprodukti normalnog metabolizma. Prekomjerno stvaranje i nakupljanje ROS-a dovodi do oksidacijskih oštećenja lipida, proteina i nukleinskih kiselina koja u konačnici dovode do smrti stanice (Wang i sur., 2007). Stupajući u interakciju s različitim staničnim molekulama, ROS smanjuju ili u potpunosti uništavaju funkciju stanice (Foyer i Noctor, 2001). Povećana koncentracija ROS-a aktivira brojne

enzimske i neenzimske antioksidacijske sustave koje ih učinkovito uklanjaju (Wang i sur., 2007).

Lipidna peroksidacija predstavlja proces oksidacije, odnosno razgradnje višestruko nezasićenih masnih kiselina (engl. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) pri čemu nastaju brojni reaktivni produkti. Najčešći začetnik lipidne peroksidacije je OH·, iako ju mogu uzrokovati i drugi oblici ROS-a ili reaktivnih dušikovih spojeva (Štefan i sur., 2007). Inicijacija, propagacija i terminacija predstavljaju ključne korake ovog procesa. Malondialdehid (MDA), 4-hidroksinonenal (HNE) i izoprostani su krajnji produkti lipidne peroksidacije te predstavljaju sekundarne glasnike, odnosno biomarkere oksidacijskog stresa (Andreou i sur., 2009). Peroksidacija lipida može imati vrlo štetne posljedice za stanicu: gubitak fluidnosti membrana i povećana propusnost iona, opadanje membranskog potencijala te inaktivacija enzima i ionskih kanala, što u konačnici može dovesti do smrti stanice (Štefan i sur., 2007).

1.3.2. Antioksidacijski pokazatelji

Antioksidansi su tvari uključene u fiziološku obranu od oksidacijskog stresa koje u malim koncentracijama dovode do odgađanja ili inhibicije oksidacije supstrata (Štefan i sur., 2007). Antioksidansi zaustavljaju lančanu reakciju stvaranja novih radikala, inaktivirajući slobodne radikale doniranjem elektrona te štite stanicu od daljnjih oštećenja (Štefan i sur., 2007). Prekomjerno stvaranje ROS-a može aktivirati antioksidacijski obrambeni sustav. Stanični antioksidacijski sustav sastoji se od enzimskih i neenzimskih komponenti (Karuppanapandian i sur., 2011). Najznačajniji enzimski antioksidansi uključuju katalazu, superoksid-dismutazu, gvajakol-peroksidazu, askorbat-peroksidazu, glutation-reduktazu i glutation-peroksidazu, dok u najvažnije neenzimske komponente ubrajamo askorbinsku kiselinu i glutation (GSH) koji su topljivi u vodi te tokoferol i karotenoide topljive u lipidima (Arora i sur., 2002).

Katalaza (engl. *catalase* – CAT, EC 1.11.1.6) ili H_2O_2-oksidoreduktaza je enzim koji ima ulogu uklanjanja H_2O_2 nastalog tijekom glioksilatnog ciklusa, procesom ß-oksidacije masnih kiselina, fotorespiracijom ili kao posljedica oksidacijskog stresa (Mittler i sur., 2002). Neophodna je za detoksikaciju ROS-a tijekom stresnog stanja jer H_2O_2 razlaže na vodu (H_2O) i kisik (O_2) prema jednadžbi: $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ (Gill i Tuteja, 2010). Tetramerna je molekula te ima veliki broj izoenzima prisutnih u višim biljkama (Mittler i sur., 2002). Katalaza predstavlja izuzetno važan enzim u antioksidacijskom sustavu stanice s obzirom da jedna molekula enzima može reducirati oko šest milijuna molekula H_2O_2 u minuti (Gill i Tuteja, 2010).

Askorbat-peroksidaza (engl. *ascorbate peroxidase* – APX, EC 1.11.1.11) se smatra jednim od najvažnijih enzima prvenstveno za uklanjanje ROS-a nastalog u kloroplastima te zaštitu stanica biljaka, alga i drugih organizama (Gill i Tuteja, 2010). Za uklanjanje H_2O_2 kao donor elektrona koristi askorbat, pri čemu nastaje H_2O i dehidroaskorbat (DHA) (Asada, 2000). U usporedbi s katalazom, askorbat-peroksidaza ima znatno veći afinitet prema H_2O_2, što ovom enzimu omogućava snažno antioksidacijsko djelovanje (Gill i Tuteja, 2010).

Glutation-reduktaza (engl. *glutathione reductase* – GR, EC 1.6.4.2) je flavoprotein prisutan kod prokariota i eukariota (Romero-Puertas i sur., 2004). Održava reducirano stanje GSH-a koristeći reduciranu energiju (NADPH) zbog čega ima važnu ulogu u procesu uklanjanja ROS-a (Gill i Tuteja, 2010).

Glutation-peroksidaza (engl. *glutathione peroxidase* – GPX, EC 1.11.1.9) pripada velikoj skupini enzima koji koriste GSH za redukciju H_2O_2 te organskih i lipidnih hidroperoksida (Noctor i sur., 2002). Redoks-ciklus GSH ima značajnu ulogu u uvjetima umjerenog oksidacijskog stresa, dok je aktivnost CAT značajnija u uvjetima intenzivnog oksidacijskog stresa. Biosinteza GPX je slična biosintezi svih selenoproteina te ovisi o dostupnosti Se (Jurkovič i sur., 2008).

1.3.3. Fiziološki odgovor biljnih stanica na tretmane selenom

Selen, kao i brojni drugi elementi, utječe na oksidacijski status organizma. Hasanuzzaman i suradnici (2010) su dokazali kako Se, osim što pospješuje rast i razvoj, također povećava otpornost i antioksidacijski kapacitet viših biljaka (jednosupnica i dvosupnica) izloženih različitim oblicima stresa. Singh i suradnici (1980) su dokazali pozitivan učinak selenita (0,5 mg/kg) na rast gorušice (*Brassica juncea* L.) što ujedno i predstavlja jedan od prvih primjera pozitivnog učinka selenita na biljke. Pozitivan utjecaj na rast utvrđen je i kod klijanaca zelene salate (*Lactuca sativa* L.) i rajčice (*Solanum lycopersicum* L.) u koncentracijama većim od 29 mg/kg (Carvalho i sur., 2003). Uspoređujući primjenu selenita i selenata, uočena je veća toksičnost selenita u odnosu na selenat te je tretman selenitom uzrokovao višu koncentraciju H_2O_2 i indukciju peroksidacije lipida kod vrste *L. sativa* (Rios i sur., 2009). S druge strane, tretman malim koncentracijama selenata je kod istih biljaka inducirao aktivnost antioksidacijskih enzima kao što su APX i GPX pa se može pretpostaviti kako takav tretman može biti koristan u svrhu poticanja antioksidacijskog odgovora i povećanja otpornosti organizma na stresne uvjete (Rios i sur., 2009). Kod pšenice (*Triticum aestivum* L.), niske koncentracije Se (0,05 mM/kg) pozitivno utječu na antioksidacijski odgovor, dok veće koncentracije (veće od 0,45 mM/kg) imaju

prooksidacijsku ulogu (Nowak i sur., 2002). Osim kod pšenice, tretman selenitom je pozitivno djelovao i na antioksidacijski odgovor kod ljulja (*Lolium perenne* L.) gdje je vidljiva povećana aktivnost SOD (Hartikainen i sur., 2000). Kod heljde (*Fagopyrum tataricum* Moench) i hibridne vrste heljde (*F. hybridum*) je tretman natrijevim selenatom na samom početku cvatnje pozitivno utjecao na razvoj lista, stabljike i sjemenki (Golob i sur., 2016). Osim dokazanog učinka na biljke, različiti oblici Se utječu i na razvoj alga. Zajednice alga imaju vrlo važnu ulogu u prijenosu i akumulaciji Se u više trofičke razine (Pastierová i sur., 2009) te je stoga izuzetno važno proučiti njegov utjecaj. Pozitivan utjecaj selenita na rast alga vrste *Chlorella vulgaris* uočen je u istraživanju Suna i suradnika (2014). Naime, korištene su koncentracije selenita od 25 do 200 mg/L tijekom šest dana. Značajan rast kulture *C. vulgaris* utvrđen je uslijed povećanja koncentracije (25-75 mg/L). Vrijednosti veće od 75 mg/L značajno su smanjile rast *C. vulgaris* nakon 6 dana zbog velike toksičnosti selenita. Može se zaključiti kako je idealna koncentracija selenita za vrstu *C. vulgaris* 75 mg/L, dok su veće koncentracije inhibirale rast. Kod zelene mikroalge *Haematococcus pluvialis* niske koncentracije selenita (3 mg/L) nisu inhibirale rast kulture dok su veće koncentracije (> 13 mg/L) dovele do inhibicije rasta (Zheng i sur., 2017). Također, tretman višim koncentracijama selenita inducirao je antioksidacijski odgovor, povećanjem aktivnosti enzima SOD, GST i GPX.

1.4. Cilj diplomskog rada

Budući da je utjecaj različitih oblika Se na antioksidacijski status u algama slabo istražen, cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj različitih koncentracija selenita na antioksidacijski status jednostanične zelene alge *Monoraphidium* cf. *contortum* tijekom različitih vremenskih perioda (24, 48 i 72 sata).

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Uzgoj kultura alge *Monoraphidium* cf. *contortum* i tretman natrijevim selenitom (Na_2SeO_3 x $5H_2O$)

U ovom istraživanju je korištena kultura jednostanične zelene slatkovodne alge *Monoraphidium* cf. *contortum* (Slika 3A) kupljena iz zbirke kultura autotrofnih organizama laboratorija Botaničkog instituta Češke akademije znanosti u Třeboňu te kultivirana u Laboratoriju za ekologiju alga, Zavoda za ekologiju voda Odjela za biologiju u Osijeku. Vrsta *Monoraphidium contortum* (Thuret) Komárková-Legnerová pripada odjeljku Chlorophyta, razredu Chlorophyceae, porodici Selenastraceae (Guiry, 2017). U skladu s njenim ekološkim karakteristikama, najčešći je predstavnik klorokokalnih zelenih alga u umjereno do jako onečišćenim vodama (Hindák, 1988). Ima vrlo varijabilan sigmoidalni oblik stanice koji se mijenja ovisno o ekološkim uvjetima. Primjerice, stanice izolirane iz ribnjaka obogaćenog hranjivim tvarima (Dolná Krupá, Trnava, Slovačka) su blago zakrivljene, lučno svijene ili helikoidalno uvijene, veličine 20-35 x 1,5-2-(3) µm i ušiljenih krajeva, dok su stanice izolirane iz oligotrofnog alpskog jezera (Königsee, Bavarska, Njemačka) bile lučno svijene, blago sigmoidalne ušiljenih krajeva te su bile slične dužine (25-35 µm), no nešto šire (2-3.5 µm) (Hindák, 1988) (Slika 3B). Općenito, rod *Monoraphidium* karakterizira veličina stanice u rasponu 2-182 x 1-8 µm, sigmoidalni, blago zakrivljeni ili pak spiralno uvijeni oblik, često s izduženim krajevima. Stanične stijenke su glatke, kloroplasti najčešće pojedinačni, a pirenoid obično nije prisutan. Razmnožavanje je nespolno, autosporama (Web 4).



B



Slika 3. A) Kultura zelene alge *Monoraphidium* cf. *contortum* u tekućem hranjivom mediju (Fotografija: Zavod za ekologiju voda); B) Oblik stanice vrste *Monoraphidium contortum*: 1) jedinke populacije oligotrofnog jezera 2) jedinke populacije ribnjaka (preuzeto iz Hindák, 1988).

Kulture zelene alge *Monoraphidium* cf. *contortum* uzgajane su u tekućem hranjivom mediju (BBM, Bischoff i Bold, 1963). Za pripremu medija, u odmjernim tikvicama je pripremljeno 14 matičnih otopina hranjivih soli prema točno naznačenim masama (g/100 mL H_2O) te je dodan odgovarajući volumen svake otopine i destilirane vode (Tablica 1). BBM je u staklenim bocama steriliziran u autoklavu u vremenu od 15 minuta pri temperaturi od 121°C i tlaku od 1 bar. Kulture su uzgajane u uzgojnoj komori pri fotoperiodu od 16 sati

svijetla i 8 sati tame i temperaturi od 25±2°C. Održavane su presađivanjem svakih sedam dana kako bi se osigurao dovoljan broj stanica za istraživanje. Tretirane su u sterilnim Erlenmeyerovima tikvicama od 250 mL u 100 mL BBM-a pri jednakim uvjetima uzgoja (Slika 4). Presađivanje kulture obavljeno je u sterilnim uvjetima u laminaru, dodatkom određenog volumena kulture u medij. Radna površina, pribor i posuđe su prije presađivanja i tretmana sterilizirani UV svjetlošću. Za tretman je korišten natrijev selenit ($Na_2SeO_3x\ 5H_2O$) otopljen u BBM-u te su kulture u eksponencijalnoj fazi tretirane sljedećim koncentracijama: 5, 25, 50 i 100 mg/L. Kontrolne kulture uzgajane su pri jednakim uvjetima, no nisu tretirane natrijevim selenitom. Uzorci stanica alga za sve analize prikupljeni su tijekom 24, 48 i 72 sata. Tijekom istraživanja, kulture su ručno miješane i razmještene unutar uzgojne komore kako bi se smanjile prostorne razlike u temperaturi i osvjetljenju.

Tablica 1. Sastav tekućeg hranjivog medija (Bischoff i Bold 1963).

	Matična otopina (g/100 mL dH_2O)	**Količina potrebna za 1 L BBM**
$NaNo_3$	2,5 g	10 mL
$CaCl_2$	0,33 g	10 mL
$MgSO_4$ x $7H_2O$	0,75 g	10 mL
K_2HPO_4	0,75 g	10 mL
KH_2PO_4	1,75 g	10 mL
NaCl	0,25 g	10 mL
Na_2EDTA KOH	5 g 3,1 g	1 mL
$FeSO_4$ x $7H_2O$ H_2SO_4 (96%)	0,498 g 0,1 mL	1 mL
H_3BO_3	1,142 g	1 mL
$ZnSO_4$ x $7H_2O$	0,882 g	1 mL
$MnCl_2$ $4H_2O$	0,144 g	1 mL
Na_2MoO_4 x $2H_2O$	0,278 g	1 mL
$CuSO_4$ x 5 H_2O	0,157 g	1 mL
$CoCl_2$ x $6H_2O$	0,0404 g	1 mL



Slika 4. Kulture *Monoraphidium* cf. *contortum* u uzgojnoj komori (fotografija: A. Pilipović).

2.2. Praćenje prirasta kultura

Prirast kultura *Monoraphidium* cf. *contortum* praćen je brojanjem stanica u Bürker-Türkovoj komorici te mjerenjem optičke gustoće suspenzije stanica spektrofotometrom. Za određivanje brojnosti, u komoricu pokrivenu pokrovnicom stavljeno je 15 µL uzorka alga fiksiranih u 4%-tnoj otopini formaldehida. Stanice su prebrojane pomoću invertnog mikroskopa (Axiovert 25, Carl Zeiss, Inc., Njemačka), a broj stanica je izračunat prema formuli: $x=\frac{x}{64}$ pri čemu se dobiveni rezultat množi s 1000 kako bi se dobio broj stanica u 1 mL. Također je rast kulture praćen spektrofotometrijski. U kivete je stavljeno 2 mL uzorka te je mjerena apsorbancija pri 750 nm (OD_{750}) korištenjem Lambda 2 (Perkin-Elmer, SAD) spektrofotometra.

2.3. Određivanje koncentracije pigmenata

Za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije pigmenata (klorofila-a (Chl-a), klorofila-b (Chl-b) i ukupnih karotenoida (Car)) korišteno je 10 mL uzorka iz svake kulture nakon tretmana. Uzorci za analizu pigmenata su filtrirani uz pomoć vakuum sisaljke kroz MN GF-3 filtere (Macherey-Nagel, Njemačka) promjera 55 mm koji su zatim stavljeni u plastične kivete s čepom te pohranjeni na -20˚C do daljnje obrade. Filteri su homogenizirani u tarioniku s tučkom u 90%-tnom acetonu. Ekstrakcija pigmenata se odvijala na 4˚C u mraku tijekom 24 sata. Zatim su ekstrakti centrifugirani na 3000 okr/min u trajanju od 10 minuta. Mjerena je apsorbancija ekstrakata spektrofotometrom (Lambda 2, Perkin-Elmer, SAD) pri 480, 630,

645, 663 i 750 nm. Aceton je služio kao slijepa proba. Koncentracije Chl-a, Chl-b i Car određene su prema metodama SCOR-Unesco (1966) te Strickland i Parsons (1972).

2.4. Izolacija proteina

Preostali volumen kulture korišten je za izolaciju proteina. Stanice alga su sakupljene centrifugiranjem pri 6000 okr/min tijekom 20 minuta. Nakon uklanjanja supernatanta, talog je prebačen u plastične kivetice te ispran s 1 mL kalij-fosfatnog pufera (0,2 M K_2HPO_4, 0,2 M KH_2PO_4, 1 mM EDTA, dH_2O; pH 7,0) centrifugiranjem na 6500 okr/min tijekom 10 minuta. Nakon ispiranja, stanice alga su sonicirane korištenjem sonikatora (Vibra-Cell, Sonics and Materials Inc., SAD) deset sekundi u plastičnim kivetama u ledenoj kupelji. Postupak je ponovljen 5 puta nakon čega je 1 mL soniciranog uzorka prebačen u nove kivetice i centrifugiran na 21000 g tijekom 20 minuta na 4˚C. Supernatanti su potom prebačeni u nove kivetice i smrznuti na -80˚C. Ekstrakti su naknadno odleđeni i korišteni za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima katalaze (CAT), askorbat-peroksidaze (APX), glutation-reduktaze (GR) i glutation-peroksidaze (GPX) te koncentraciju proteina.

2.5. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određena je uz pomoć Bradford (1976) metode. Mjerena je apsorbancija uzorka pri 595 nm koji je sadržavao 50 µL proteinskog ekstrakta i 950 µL Bradfordovog reagensa (Comassie blue G, 96%-tni etanol, 14,79 M fosfatna kiselina, dH_2O). Za slijepu probu je, umjesto ekstrakta proteina, dodan kalij-fosfatni pufer. Koncentracija proteina u ekstraktima izračunata je iz baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopina albumina goveđeg seruma poznatih koncentracija i Bradfordovog reagensa.

2.6. Enzimske antioksidacijske komponente

2.6.1. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost enzima CAT određena je po Aebiju (1984). Kao reakcijski pufer korišten je 50 mM kalij-fosfatni pufera, pH=7,0 uz dodatak 10 mM H_2O_2. Reakcija započinje dodavanjem 100 µL ekstrakta proteina u 1900 µL reakcijske smjese. Promjena apsorbancije pri 240 nm, koja nastaje zbog smanjene količine vodikovog peroksida, praćena je svakih deset sekundi tijekom dvije minute.

2.6.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti askorbat-peroksidaze

Aktivnost APX određena je prema Nakano i Asada (1981). Reakcijska smjesa sadržavala je 50 mM kalij-fosfatni pufer, 0,1 mM EDTA, 50 mM askorbinske kiseline i 12 mM H_2O_2 (pH=7,0). U kvarcnu kivetu dodano je 895 µL 50 mM kalij-fosfatni pufer zajedno s 0,1 mM EDTA, 20 µL askorbinske kiseline, 75 µL sirovog ekstrakta proteina i 10 µL H_2O_2. Smanjenje apsorbancije je praćeno na valnoj duljini od 290 nm svake sekunde tijekom tri minute.

2.6.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti glutation-reduktaze

Protokol Doplhina i suradnika (1989) korišten je prilikom određivanja aktivnosti enzima GR. Reakcijska smjesa (pH=7,5) je sadržavala 0,1 M kalij-fosfatni pufer, 1 mM EDTA, 2 mM NADPH i 2 mM GSSG, 500 µL 2 mM otopine GSSG, 400 µL 50 mM kalij-fosfatnog pufera zajedno s 1 mM EDTA, 50 µL ekstrakta proteina i 50 µL 2 mM otopine NADPH dodano je u kvarcnu kivetu i mjerena je promjena apsorbancije pri valnoj duljini od 340 nm svake sekunde tijekom dvije minute.

2.6.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze

Za određivanje aktivnosti GPX korištena je reakcijska smjesa (pH=7,0) koja se sastojala od 36,8 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera zajedno s 0,4 mM EDTA, 40 µL stock-otopine NADPH, 400 µL otopine glutation-reduktaze (GR) i 50 µL 200 mM otopine reduciranog glutationa (GSH). Pad apsorbancije, do kojeg dolazi dolazi uslijed oksidacije NADPH, pratio se pri valnoj duljini od 340 nm svakih 30 sekundi tijekom 5 minuta. Potom je u kvarcnu kivetu dodano 1500 µL reakcijske smjese i 25 µL razrijeđenog uzorka, nakon čega je slijedila ekvilibracija na 25˚C i dodavanje 25 µL otopine H_2O_2 (Wendel, 1980).

2.7. Pokazatelji oksidacijskoga stresa

2.7.1. Određivanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije

Koncentracija produkata lipidne peroksidacije određena je metodom po Vermi i Dubeyu (2003). Izražena je kao koncentracija supstanci koje reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (engl. *thiobarbituric acid reactive substances* – TBARS). Kulture su centrifugirane tijekom 20 minuta na 6000 okr/min. Talog dobiven centrifugiranjem ispran je s 1 mL kalij-fosfatnog pufera (sadržavao je 0,2 M K_2HPO_4, 0,2 M KH_2PO_4 (pH 7,0)). Slijedilo je centrifugiranje dobivenog uzorka na 6500 okr/min tijekom 10 minuta te ekstrakcija dobivenog taloga s 1 ml 0,1%-tne trikloroctene kiseline (TCA). Nakon ekstrakcije, ekstrakt je soniciran

deset sekundi u vodenoj kupelji (led i voda). Postupak je ponovljen 5 puta nakon čega je sonicirani ekstrakt centrifugiran 5 minuta na 6000 g. Nakon centrifugiranja, odvojeno je 0,5 mL supernatanta te pomiješano s 1 mL 0,5%-tne tiobarbiturne kiseline (TBA) u 20%-tnoj otopini TCA. Uzorci su zatim zagrijavani u vodenoj kupelji (95˚C) tijekom 30 minuta. Kao slijepa proba korištena je otopina 0,5% TBA u 20% TCA. Uzorci su ohlađeni na ledu (10 minuta) te centrifugirani 15 minuta na 18 000 g pri temperaturi od 4˚C. Dobiveni supernatant je korišten za spektrofotometrijsko mjerenje apsorbancije pri valnim duljinama od 532 i 600 nm.

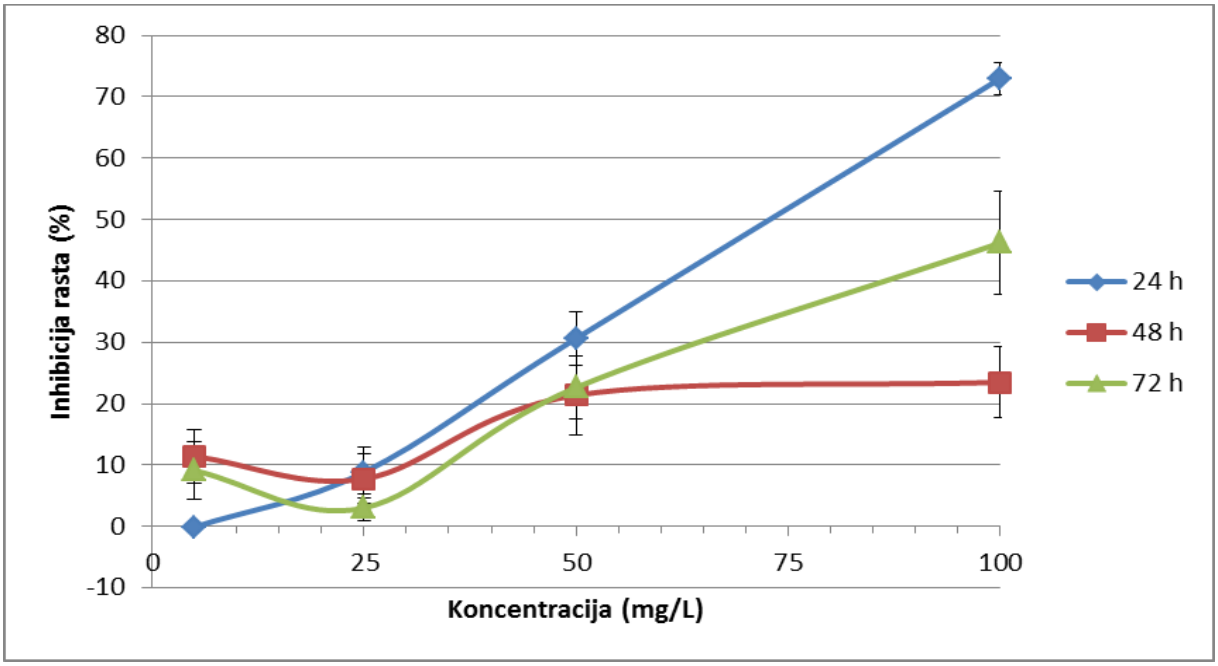
2.8. Statistička obrada podataka

Istraživanje je provedeno u tri ponavljanja i svi uzorci su uzimani u triplikatu (iz tri Erlenmayerove tikvice). Podaci su obrađeni u statističkom programu Statistica 13.3 (TIBCO Inc., SAD). Nakon provjere normalnosti podataka (Shapiro-Wilk W test) i ispitivanja homogenosti varijance (Levene test), korištena je analiza varijance (engl. *analysis of varianc*e - ANOVA) te LSD test (engl. *least significant difference* - LSD) značajnosti utjecaja primijenjenih tretmana uz razinu značajnosti od $p<0,05$.

3. REZULTATI

3.1. Utjecaj tretmana selenitom na rast kulture alga *Monoraphidium* cf. *contortum*

Primijenjene koncentracije selenita i dužina tretmana značajno su utjecali na rast kulture *Monoraphidium* cf. *contortum* (Slika 5). Pri najkraćem izlaganju selenitu (24 h), najniža koncentracija (5 mg/L) imala je blagi stimulativni učinak na rast kultura u odnosu na kontrolu. Ostale koncentracije inhibirale su rast alga te je pri koncentraciji selenita od 25 mg/L rast bio inhibiran za 8%, pri 50 mg/L za 30,64%, a kod najviše koncentracije (100 mg/L) za 72,99%.



Slika 5. Postotak inhibicije rasta u kulturama *M.* cf. *contortum* 24, 48 i 72 h nakon tretmana različitim koncentracijama selenita (5, 25, 50 i 100 mg/L). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene istim slovima (a, b, c) ne razlikuju se prema LSD testu; $p<0,05$.

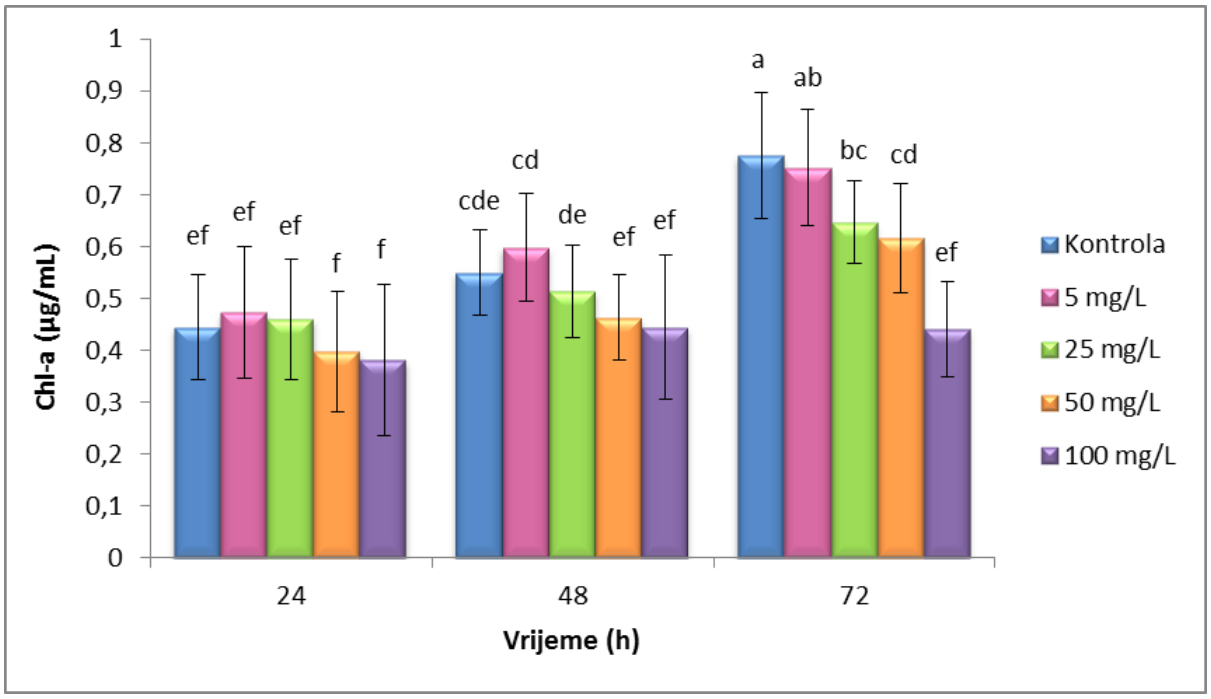
Nakon 48 i 72 h tretmana selenitom, sve primijenjene koncentracije inhibirale su rast kultura. Najveći postotak inhibicije nakon 48 h utvrđen je pri koncentraciji od 100 mg/L (23,5%), dok je nakon 72 h, pri istoj koncentraciji, postotak inhibicije bio gotovo dvostruko veći (46,21%). Koncentracija od 50 mg/L selenita nakon 48 h uzrokovala je inhibiciju rasta od 21,39%, a vrijednost je bila slična i nakon 72 h (22,64%). Niže koncentracije selenita slabije su utjecale na kulture te je postotak inhibicije rasta bio niži. Iznosio je 7,76% nakon 48 h tretmana s 25 mg/L selenita odnosno 3,03% nakon 72 h tretmana. Najniža koncentracija od

5 mg/L uzrokovala je inhibiciju rasta od 11,42% nakon 48 h te 9,11% nakon najdužeg izlaganja selenitu (72 h).

3.2. Utjecaj tretmana selenitom na koncentraciju fotosintetskih pigmenata

3.2.1. Koncentracije klorofila-a (Chl-a)

Nakon 24 i 48 h tretmana selenitom, nisu utvrđene statistički značajne razlike u koncentraciji Chl-a u odnosu na kontrolne kulture (Slika 6). Nakon 24 h, vrijednosti Chl-a su se smanjivale s povećanjem koncentracije selenita te su se kretale u rasponu od 0,38 µg/mL (100 mg/L selenita) do 0,47 µg/mL (5 mg/L selenita), dok je u kontrolnim kulturama koncentracija Chl-a iznosila 0,44 µg/mL. Nakon 48 h tretmana, samo je pri tretmanu najnižom koncentracijom selenita (5 mg/L) utvrđeno povećanje sadržaja Chl-a (0,59 µg/mL) u odnosu na kontrolne kulture (0,55 µg/mL). Ovo povećanje Chl-a statistički se razlikovalo samo u odnosu na tretmane s dvjema višim koncentracijama selenita, pri kojima je u kulturama utvrđen smanjeni sadržaj Chl-a s vrijednostima od 0,46 µg/mL (50 mg/L selenita) i 0,44 µg/mL (100 mg/L selenita). Duže izlaganje kultura selenitu (72 h) uzrokovalo je značajno smanjenje sadržaja Chl-a s povećanjem koncentracije selenita u odnosu na kontrolu (Slika 6). Statistički značajne razlike utvrđene su nakon tretmana trima višim koncentracijama selenita te su vrijednosti Chl-a u kulturama iznosile 0,64 µg/mL kod tretmana s 25 mg/L selenita, 0,61 µg/mL pri 50 mg/L selenita i 0,44 µg/mL kod tretmana s najvišom koncentracijom selenita (100 mg/L). U kontrolnim kulturama koncentracija Chl-a je iznosila 0,77 µg/mL.

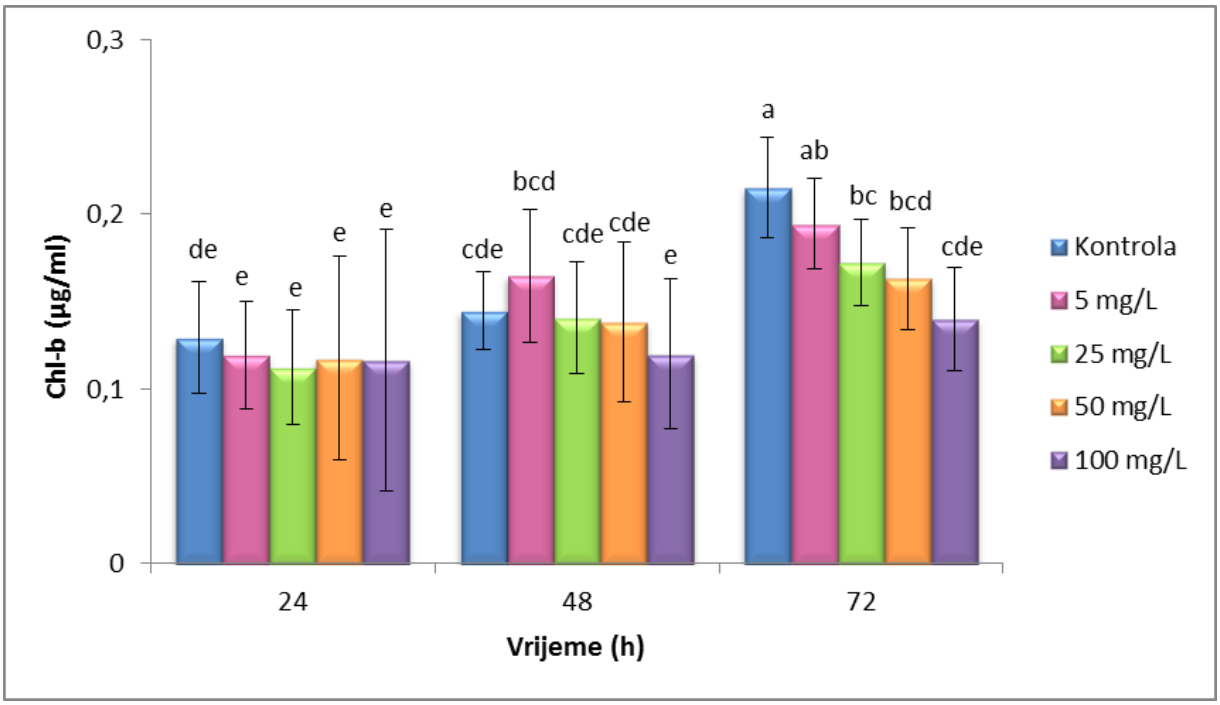


Slika 6. Koncentracija Chl-a u kulturama *M.* cf. *contortum* 24, 48 i 72 h nakon tretmana različitim koncentracijama selenita (5, 25, 50 i 100 mg/L). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene istim slovima (a, b, c) ne razlikuju se prema LSD testu; $p<0,05$.

3.2.2. Koncentracije klorofila-b (Chl-b)

Koncentracije Chl-b su se mijenjale sukladno koncentracijama Chl-a (Slika 7). Također nisu utvrđene statistički značajne razlike u sadržaju Chl-b u odnosu na kontrolu 24 i 48 h nakon tretmana selenitom. Vrijednosti su bile slične i kretale su se oko 0,11 µg/mL za sve primijenjene koncentracije selenita nakon 24 h. Nakon 48 h, vrijednosti su se kretale u rasponu od 0,16 µg/mL (5 mg/L selenita) do 0,11 µg/mL (100 mg/L selenita) dok su vrijednosti pri koncentraciji od 25 mg/L i 50 mg/L iznosile 0,14 µg/mL.

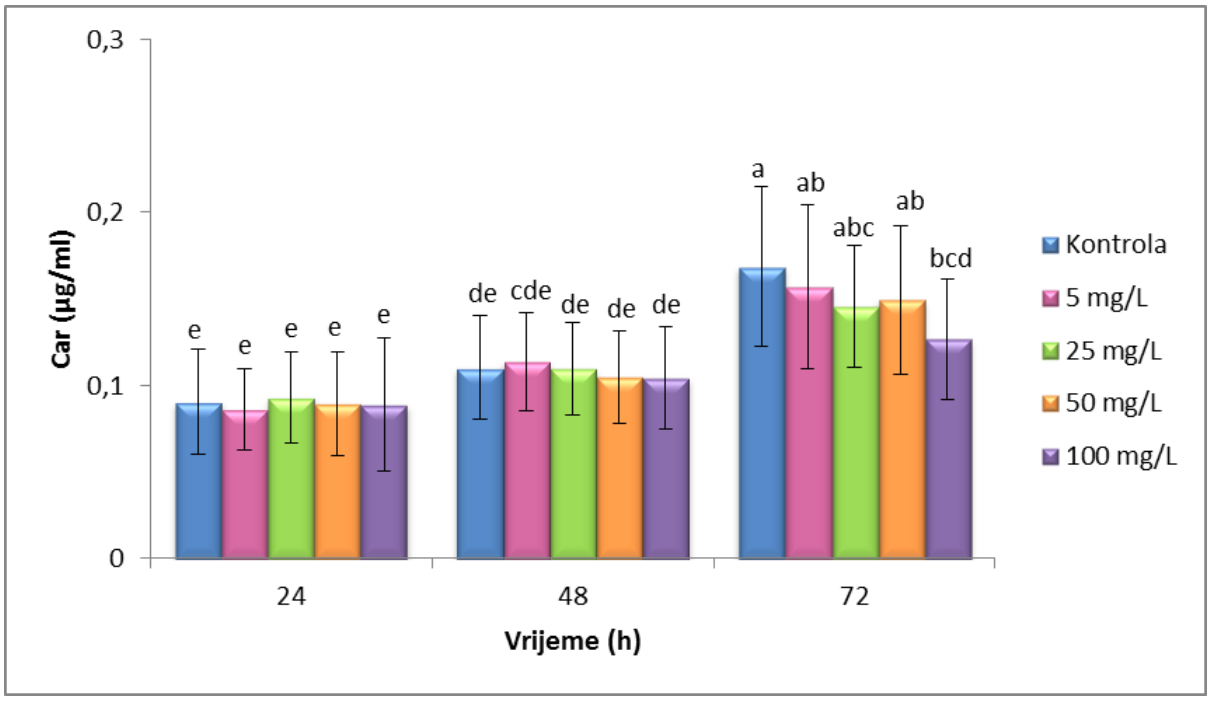
Nakon 72 h tretmana sadržaj Chl-b se postupno smanjivao s povećanjem koncentracije selenita, a statistički značajno smanjenje u odnosu na kontrolu (0,21 µg/mL) utvrđeno je kod koncentracije 25 mg/L (0,17 µg/mL), 50 mg/L (0,16 µg/mL) i 100 mg/L (0,13 µg/mL).



Slika 7. Koncentracija Chl-b u kulturama *M.* cf. *contortum* 24, 48 i 72 h nakon tretmana različitim koncentracijama selenita (5, 25, 50 i 100 mg/L). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene istim slovima (a, b, c) ne razlikuju se prema LSD testu; $p<0,05$.

3.2.3. Koncentracija karotenoida (Car)

Tretman selenitom nije značajno utjecao na koncentraciju Car nakon 24 i 48 h inkubacije (Slika 8). Vrijednosti su bile ujednačene te su iznosile oko 0,08 µg/mL pri koncentracijama od 5 mg/L, 50 mg/L i 100 mg/L selenita, dok je pri koncentraciji od 5 mg/L selenita vrijednost iznosila 0,09 µg/mL (24 h). Nakon 48 h tretmana, koncentracije Chl-b iznosile su oko 0,10 µg/mL (25 mg/L, 50 mg/L i 100 mg/L selenita), a vrijednost za tretman s 5 mg/L bila je identična kontroli (0,11 µg/mL).



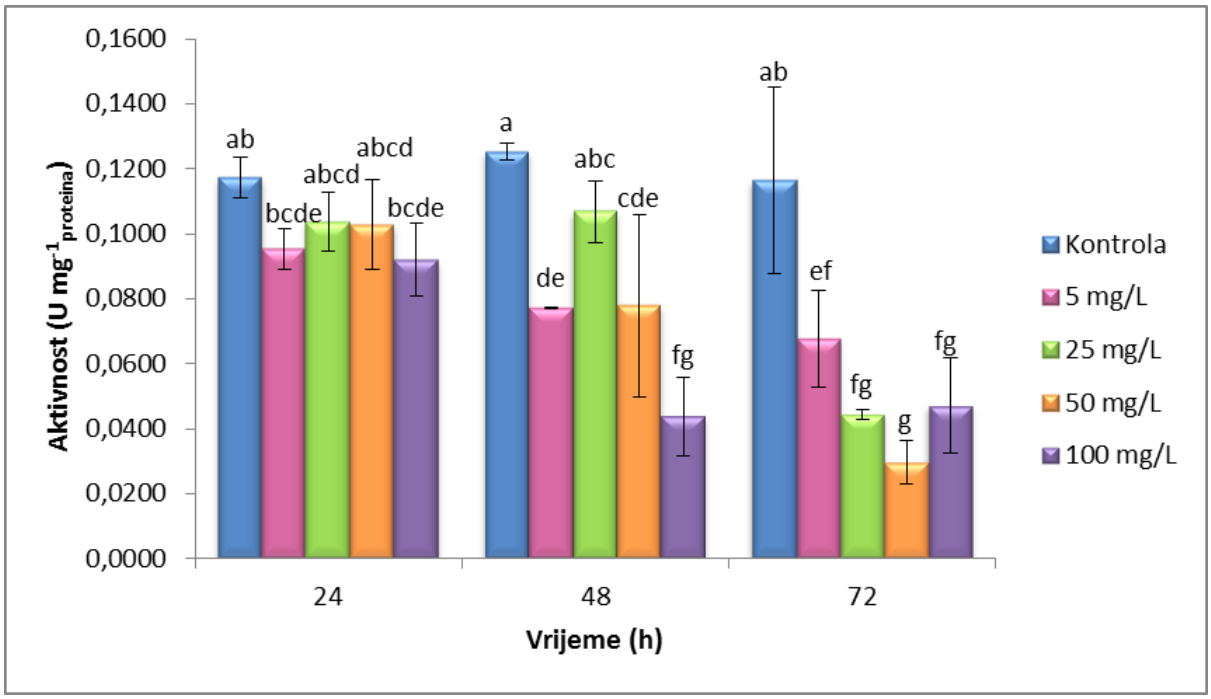
Slika 8. Koncentracija Car u kulturama *M.* cf. *contortum* 24, 48 i 72 h nakon tretmana različitim koncentracijama selenita (5, 25, 50 i 100 mg/L). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene istim slovima (a, b, c) ne razlikuju se prema LSD testu; $p<0,05$.

Nakon 72 sata tretmana uočeno je smanjenje sadržaja Car s povećanjem koncentracije selenita. Statistički značajno smanjenje Car (0,12 µg/mL) u odnosu na kontrolne kulture (0,16 µg/mL) utvrđeno je samo kod tretmana najvišom koncentracijom selenita (100 mg/L).

3.3. Utjecaj tretmana selenitom na aktivnost antioksidacijskih enzima

3.3.1. Aktivnost enzima katalaze (CAT)

Najviše aktivnosti CAT tijekom cijelog pokusa utvrđene su u kontrolnim kulturama (Slika 9). Tretman selenitom uzrokovao je smanjenje aktivnosti CAT 24 h nakon inkubacije u odnosu na kontrolne kulture (0,1173 U $mg^{-1}_{proteina}$) kod svih primijenjenih koncentracija, ali razlike nisu bile statistički značajne (Slika 9). Najveće smanjenje aktivnosti (0,0919 U $mg^{-1}_{proteina}$) u odnosu na kontrolu nakon 24 h utvrđeno je kod najviše koncentracije selenita.



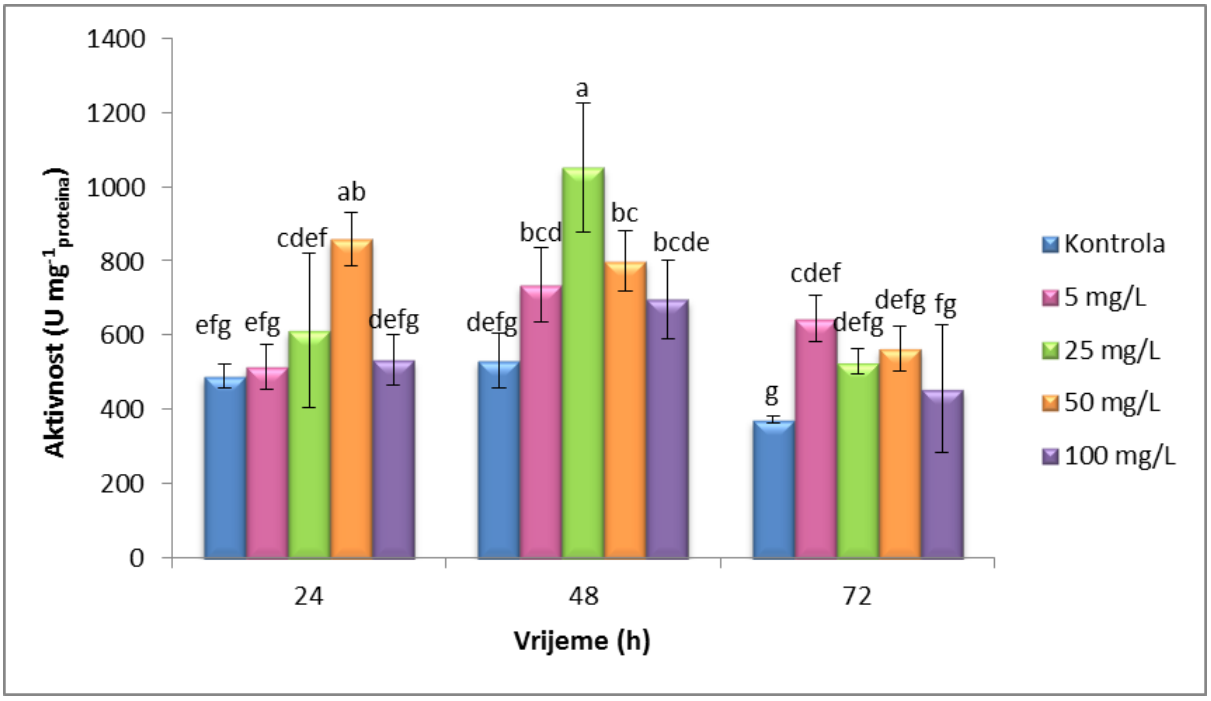
Slika 9. Aktivnost CAT u stanicama *M.* cf. *contortum* 24, 48 i 72 h nakon tretmana različitim koncentracijama selenita (5, 25, 50 i 100 mg/L). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene istim slovima (a, b, c) ne razlikuju se prema LSD testu; $p<0,05$.

Najviša aktivnost CAT tijekom cijelog pokusa utvrđena je u kontrolnim kulturama nakon 48 h inkubacije (0,12 U $mg^{-1}_{proteina}$). Statistički značajno smanjenje vrijednosti u odnosu na kontrolu utvrđeno je pri koncentracijama selenita od 5 mg/L i 50 mg/L (0,07 U $mg^{-1}_{proteina}$) te 100 mg/L (0,04 U $mg^{-1}_{proteina}$). Nakon 72 h također je zabilježen trend smanjenja aktivnosti CAT u usporedbi s kontrolnim kulturama, a utvrđena je statistička značajnost kod svih tretmana selenitom. U odnosu na aktivnost CAT u kontroli (0,11 U $mg^{-1}_{proteina}$), tretmani s 25 i 50 mg/L selenita uzrokovali su najveće smanjenje aktivnosti enzima (0,04 U $mg^{-1}_{proteina}$ i 0,02 U $mg^{-1}_{proteina}$).

3.3.2. Aktivnost enzima glutation-reduktaze (GR)

Najniže aktivnosti GR utvrđene su u kontrolnim kulturama u sve tri vremenske točke (Slika 10). Tretman selenitom je nakon 24 h uzrokovao povećanje aktivnosti GR u odnosu na kontrolne kulture (490,94 U $mg^{-1}_{proteina}$) kod svih primijenjenih koncentracija, no samo je pri koncentraciji od 50 mg/L (858,24 U $mg^{-1}_{proteina}$) povećanje bilo statistički značajno. Ostale vrijednosti su se kretale u rasponu od 514,85 U $mg^{-1}_{proteina}$ (5 mg/L selenita) do 613,37 U mg^{-}

$^{1}_{proteina}$ (25 mg/L selenita) dok je vrijednost pri najvišoj koncentraciji iznosila 533,23 U mg$^{-1}_{proteina}$ (Slika 10).



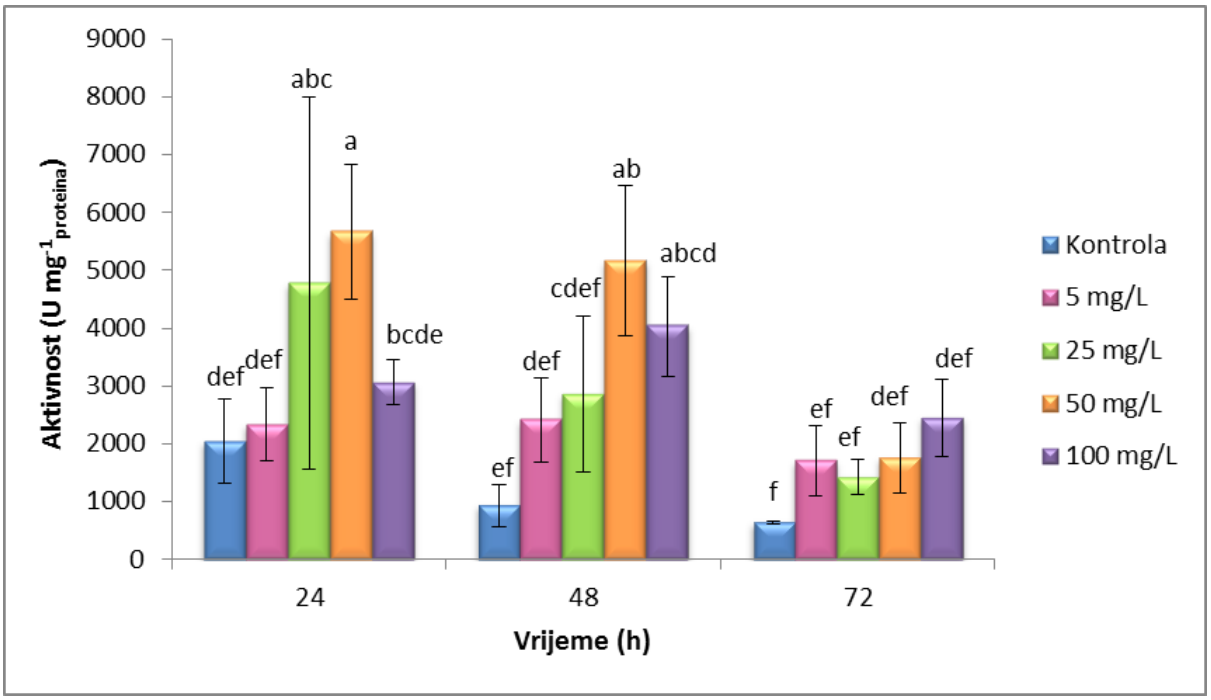
Slika 10. Aktivnost GR u stanicama *M.* cf. *contortum* 24, 48 i 72 h nakon tretmana različitim koncentracijama selenita (5, 25, 50 i 100 mg/L). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene istim slovima (a, b, c) ne razlikuju se prema LSD testu; $p<0,05$.

Nakon 48 h tretmana utvrđeno je statistički značajno povećanje aktivnosti GR u odnosu na kontrolne kulture (532,57 U mg$^{-1}_{proteina}$) pri koncentraciji selenita od 25 mg/L (1052 U mg$^{-1}_{proteina}$) i 50 mg/L (800,22 U mg$^{-1}_{proteina}$). Statistički značajna razlika nije utvrđena kod najniže koncentracije selenita (736,91 U mg$^{-1}_{proteina}$) te najviše koncentracije (696,71 U mg$^{-1}_{proteina}$).

Najniža aktivnost GR tijekom cijelog pokusa utvrđena je u kontrolnim kulturama nakon 72 h (Slika 10). Duže izlaganje kultura selenitu (72 h) uzrokovalo je statistički značajno povećanje aktivnosti GR u odnosu na kontrolu (373, 35 U mg$^{-1}_{proteina}$) pri koncentraciji od 5 mg/L (644,35 U mg$^{-1}_{proteina}$). Kod ostalih primijenjenih koncentracija selenita utvrđen je porast aktivnosti GR, ali u odnosu na kontrolu porast nije bio statistički značajan.

3.3.3. Aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APX)

U sve tri vremenske točke, najniže aktivnosti APX utvrđene su u kontrolnim kulturama (Slika 11). Aktivnost APX nakon 24 h značajno se povećala u odnosu na kontrolu samo nakon tretmana s 25 mg/L (4778,25 U $mg^{-1}_{proteina}$) i 50 mg/L (5661,56 U $mg^{-1}_{proteina}$) selenita, a vrijednosti su bile značajno više i u odnosu na tretman s 5 mg/L (2334,07 U $mg^{-1}_{proteina}$).



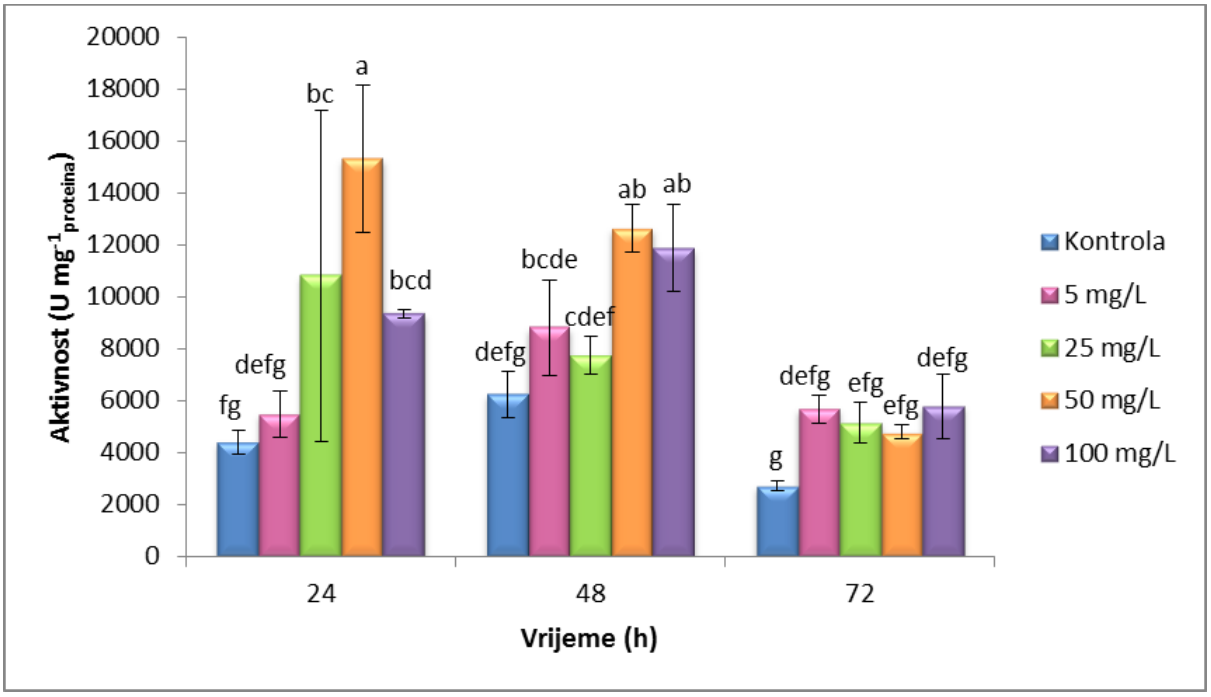
Slika 11. Aktivnost APX u stanicama *M.* cf. *contortum* 24, 48 i 72 h nakon tretmana različitim koncentracijama selenita (5, 25, 50 i 100 mg/L). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene istim slovima (a, b, c) ne razlikuju se prema LSD testu; $p<0,05$.

Nakon 48 h utvrđeno je statistički značajno povećanje aktivnosti APX s dvjema višim koncentracijama; 50 mg/L (5164,5 U $mg^{-1}_{proteina}$) i 100 mg/L (4034,6 U $mg^{-1}_{proteina}$) u odnosu na kontrolu (939,11 U $mg^{-1}_{proteina}$).

Najniža aktivnost APX tijekom cijelog pokusa utvrđena je u kontrolnim stanicama nakon 72 h tretmana te je iznosila 637,92 U $mg^{-1}_{proteina}$. U ovom slučaju, tretman selenitom nije značajno utjecao na aktivnost APX nakon najdužeg izlaganja selenitu. Vrijednosti su također bile niske i kretale su se u rasponu od 1431,43 U $mg^{-1}_{proteina}$ (25 mg/L selenita) do 2454,21 U $mg^{-1}_{proteina}$ (100 mg/L). Tretmani s 5 i 50 mg/L selenita dali su ujednačene vrijednosti aktivnosti enzima (1707,27 U $mg^{-1}_{proteina}$ i 1753,53 U $mg^{-1}_{proteina}$).

3.3.4. Aktivnost enzima glutation-peroksidaze (GPX)

Sličan trend povećanja aktivnosti u odnosu na kontrolu nakon tretmana selenitom uočen je i kod enzima GPX te je utvrđena niža aktivnost GPX kod svih kontrolnih kultura u odnosu na primijenjene koncentracije (Slika 12). Nakon 24 h, značajno povećanje aktivnosti GPX utvrđeno je nakon tretmana s 25 mg/L selenita (10802,31 U $mg^{-1}_{proteina}$), 50 mg/L (15317,9 U $mg^{-1}_{proteina}$) i 100 mg/L (9341,5 U $mg^{-1}_{proteina}$) u odnosu na kontrolu (4404,7 U $mg^{-1}_{proteina}$). Aktivnosti GPX nakon tretmana s 25 i 50 mg/L također su se značajno razlikovale u odnosu na tretman s 5 mg/L selenita (5493,79 U $mg^{-1}_{proteina}$).



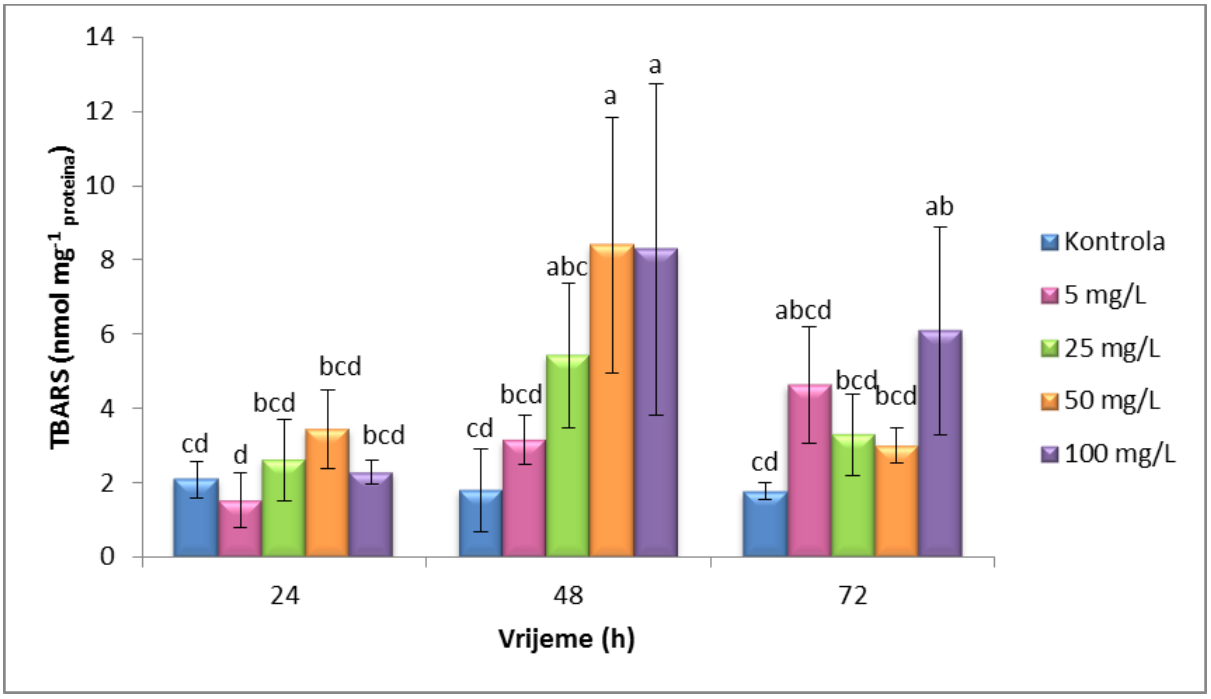
Slika 12. Aktivnost GPX u stanicama *M.* cf. *contortum* 24, 48 i 72 h nakon tretmana različitim koncentracijama selenita (5, 25, 50 i 100 mg/L). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene istim slovima (a, b, c) ne razlikuju se prema LSD testu; $p<0,05$.

Tretman selenitom nakon 48 h uzrokovao je najvišu aktivnost kontrole tijekom cijelog istraživanja za GPX. Značajno povećanje aktivnosti GPX, nakon 48 h tretmana selenitom u odnosu na kontrolu i tretman s 25 mg/L, utvrđeno je kod dvije više koncentracije, a vrijednosti su iznosile 12623,43 U $mg^{-1}_{proteina}$ (50 mg/L selenita) i 11864,8 U $mg^{-1}_{proteina}$ (100 mg/L). Navedene koncentracije značajno su se razlikovale od tretmana s dvjema nižim koncentracijama (8808,02 U $mg^{-1}_{proteina}$ i 7747,65 U $mg^{-1}_{proteina}$). Najniža aktivnost GPX tijekom cijelog pokusa utvrđena je u kontrolnim stanicama (2714,56 U $mg^{-1}_{proteina}$) nakon 72

h. Tretman selenitom nije značajno utjecao na aktivnost GPX, a vrijednosti su bile u rasponu od 5788,05 U $mg^{-1}_{proteina}$ (100 mg/L) do 4795,98 U $mg^{-1}_{proteina}$ (50 mg/L).

3.4. Utjecaj tretmana selenitom na koncentraciju produkata lipidne peroksidacije (LPO)

Tretman selenitom povećao je količinu LPO u stanicama alga, a najviše koncentracije utvrđene su nakon 48 h inkubacije (Slika 13). Vrijednosti su bile niske 24 h nakon tretmana i nisu se značajno razlikovale u odnosu na kontrolu. Kretale su se u rasponu od 1,53 do 3,45 nmol $mg^{-1}_{proteina}$.



Slika 13. Količina produkata lipidne peroksidacije (LPO) u stanicama *M.* cf. *contortum* 24, 48 i 72 h nakon tretmana različitim koncentracijama selenita (5, 25, 50 i 100 mg/L). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene istim slovima (a, b, c) ne razlikuju se prema LSD testu; $p<0,05$.

Pri tretmanu koncentracijama od 50 mg/L (8,4 nmol $mg^{-1}_{proteina}$) i 100 mg/L (8,29 nmol $mg^{-1}_{proteina}$) nakon 48 h utvrđeno je značajno povećanje količine produkata LPO u odnosu na kontrolu (1,8 nmol $mg^{-1}_{proteina}$) i najnižu koncentraciju selenita (3,16 nmol $mg^{-1}_{proteina}$). Nakon 72 h tretmana selenitom, jedino je koncentracija od 100 mg/L značajno povećala sadržaj LPO do vrijednosti od 6,08 nmol $mg^{-1}_{proteina}$ u odnosu na kontrolne kulture (1,77 nmol $mg^{-1}_{proteina}$).

4. RASPRAVA

Selenit se, kao i ostali oblici Se, često može pronaći u površinskim i podzemnim vodama te močvarnim ekosustavima (Tan i sur., 2016). Zbog pretvorbe iz selenata, najčešći je oblik Se u slatkovodnim sustavima (Maier i Knight, 1994). S ciljem razumijevanja utjecaja različitih koncentracija selenita na slatkovodne alge, kultura *Monoraphidium* cf. *contortum* je izložena selenitu tijekom 72 h te je ispitana njegova toksičnost i antioksidacijski odgovor alga. Selen je kemijski mikroelement koji je esencijalan za mnoge organizme, uključujući mikroalge (Kopsell i Kopsell, 2006) te ovisno o koncentraciji, ima dvojni utjecaj. U nižim koncentracijama može pospješiti njihov rast, dok je u višim izrazito toksičan (Gojković i sur., 2015). Toksičnost Se se kod mikroalga prvenstveno očituje kroz smanjenje gustoće populacije ili stope rasta proporcionalno koncentraciji Se u mediju (Gojković i sur., 2015). U našem istraživanju su primijenjene koncentracije selenita kao i dužina tretmana utjecali na rast kulture. Općenito je utvrđeno inhibirajuće djelovanje selenita kod svih korištenih koncentracija u sve tri vremenske točke. Iznimka je najniža koncentracija selenita (5 mg/L) pri najkraćem izlaganju kultura koja je stimulativno djelovala na rast *M.* cf. *contortum*. U mnogim slučajevima, sličan raspon koncentracija selenita različito djeluje na rast zelenih mikroalga, najčešće u ovisnosti o vrsti ili trajanju tretmana. U istraživanju Suna i suradnika (2014) korištene su koncentracije selenita u rasponu od 25 do 200 mg/L tijekom šest dana. Značajan prirast kulture *Chlorella vulgaris* utvrđen je povećanjem koncentracije (25-75 mg/L), dok su više koncentracije značajno smanjile prirast nakon 6 dana zbog velike toksičnosti selenita. Vrsta istog roda, ali karakteristična za morske ekosustave, *C. pyrenoidosa*, povećala je biomasu u odnosu na kontrolu tijekom 12 dana tretmana s 20 i 40 mg/L selenita, dok su više koncentracije (60 i 80 mg/L) snažno smanjile njen prirast (Zhong i Cheng, 2017). Rast nekih vrsta, poput cijanobakterije *Microcystis aeruginosa*, može biti snažno inhibiran već i pri znatno nižim koncentracijama selenita (3-10 mg/L) (Zhou i sur., 2017). Rezultati istraživanja Morlona i suradnika (2005) na kulturama zelene mikroalge *Chlamydomonas reinhardtii* pokazali su da selenit (10, 20, 30, 40 i 50 μM) ne mora nužno utjecati na stopu rasta kultura, ali može znatno smanjiti njihovu biomasu. Predtretman sumporom može ublažiti toksično djelovanje Se pa čak i pospješiti rast alga. Proučavanjem utjecaja selenita na rast šest vrsta morskih alga, nakon predtretmana sumporom, zabilježeno je stimulativno djelovanje selenita na rast svih istraživanih vrsta (Wheeler i sur., 1982). Smanjenje toksičnosti selenita utvrđeno je također i pri ambijentalnim koncentracijama sumpora kod vrste *Scenedesmus quadricauda* (Umisová i sur., 2009). Općenito, fizikalno-kemijske osobine Se i sumpora su vrlo slične pa njihovi spojevi prolaze iste metaboličke

puteve (Birringer i sur., 2002). Selen može zamijeniti sumpor u aminokiselinama i drugim metabolitima, ali potpuna supstitucija nije moguća zbog velike reaktivnosti Se koja je često razlog njegove toksičnosti. Tako je moguće, prilagođavanjem metabolizma sumpora i Se te omjera njihovih spojeva u stanici, ublažiti toksičnost Se. Utvrđena EC_{50} (96 h) vrijednost (50% maksimalne efektivne koncentracije) selenita iznosila je 50 mg/L za vrstu *S. quadricauda*, dok je dvostruko veća koncentracija (100 mg/L) bila letalna te je potpuno inhibirala diobu stanica (Vítová i sur., 2011). Isti autori također su pokazali da Se uzrokuje morfološke promjene stanica (npr. promjene u obliku stanica, broju i položaju izraštaja), ali i promjene u ultrastrukturi stanice, što je posebno vidljivo u građi kloroplasta, posebice u reorganizaciji tilakoida te granulaciji strome. Inhibitorni učinci visokih koncentracija selenita zabilježeni su i za druge vrste zelenih alga u kojima se kloroplasti također smatraju glavnim mjestima njegovog toksičnog djelovanja, što dovodi do neposredne inhibicije fotosinteze (Gojković i sur., 2015).

U našem istraživanju proučavan je posljedični utjecaj na koncentraciju pigmenata (Chl-a, Chl-b i Car) u kulturama *M.* cf. *contortum*. Dokazano je značajno smanjenje sadržaja fotosintetskih pigmenata s povećanjem koncentracije selenita nakon najdužeg izlaganja (72 h). Na sadržaj Chl-a i Chl-b najveći utjecaj imale su tri više koncentracije selenita (25-100 mg/L), a na sadržaj Car značajno je utjecala samo najviša koncentracija selenita (100 mg/L). Smanjenje sadržaja pigmenata pod utjecajem tretmana selenitom utvrđeno je i kod drugih vrsta zelenih mikroalga. Kod *C. vulgaris* uočeno je značajno smanjenje sadržaja karotenoida i klorofila pri koncentracijama selenita višim od 75 mg/L, dok su niže koncentracije (<75 mg/L) povećale sadržaj ovih pigmenata (Sun i sur., 2014). Povećanje koncentracije pigmenata neki autori povezuju s antioksidacijskim djelovanjem karotenoida koji imaju zaštitnu ulogu u fotosintetskim membranama gdje sudjeluju u neutralizaciji radikala te sprječavaju fotooksidaciju i degradaciju klorofila (Zhong i Cheng, 2017). Tako su u kulturama alge *C. pyrenoidosa* utvrđene više koncentracije pigmenata u odnosu na kontrolu nakon tretmana s 20 i 40 mg/L selenita, a smanjeni sadržaj pigmenata pri višim koncentracijama (60 i 80 mg/L selenita) te pri duljem izlaganju (6-12 dana). Smanjenje sadržaja pigmenata utvrđeno je i kod vrste *Haematococcus pluvialis*, već pri koncentracijama selenita višim od 13 mg/L (Zheng i sur., 2016).

Kada je alga izložena višim koncentracijama Se obično dolazi do porasta aktivnosti antioksidacijskih enzima i sadržaja antioksidacijskih tvari kojima se smanjuje toksičnost ROS-a (Chu i sur., 2010). Za uklanjanje H_2O_2 i održavanje stanične oksido-redukcijske ravnoteže organizmi su razvili učinkovit antioksidacijski sustav (Foyer i Noctor, 2001) u

kojem je izuzetno važan enzim katalaza (CAT) (Mittler i sur., 2002). U našem istraživanju najviše aktivnosti CAT zabilježene su kod kontrolnih skupina, dok je kod tretmana selenitom došlo do smanjenja aktivnosti enzima u stanicama *M.* cf. *contortum*. Izraženija inhibicija CAT uočena je nakon 48 i 72 h tretmana selenitom. Za vrstu *C. vulgaris* utvrđen je drugačiji trend aktivnosti CAT. Naime, kod ove zelene mikroalge uočeno je povećanje aktivnosti CAT s povećanjem koncentracije selenita u rasponu koncentracija 0-75 mg/L. Više koncentracije uzrokovale su smanjenje aktivnosti enzima, dok je maksimalna aktivnost uočena pri koncentraciji od 75 mg/L (Sun i sur., 2014). Važnu ulogu u procesu uklanjanja ROS-a ima i enzim GR koji koristi reduciranu energiju (NADPH) i zajedno s enzimom askorbat-peroksidazom (APX) čini važnu komponentu askorbat-glutationskog ciklusa koji je odgovoran za održavanje unutarstaničnog reduciranog stanja i smanjenje oksidativnih oštećenja (Gill i Tuteja, 2010). U našem istraživanju su oba enzima bila aktivirana tretmanom selenitom. Najviša aktivnost APX nakon 24 h uočena je pri koncentracijama od 25 i 50 mg/L, dok je pri koncentracijama od 50 i 100 mg/L uočena najviša aktivnost nakon 48 sati. Najniža aktivnost GR zabilježena je kod kontrolnih skupina, dok je povećanje uočeno pri koncentracijama od 50 mg/L (24 h), 25 i 50 mg/L (48 h) te pri koncentraciji od 5 mg/L (72 h). Utjecaj Se na enzime askorbat-glutationskog ciklusa na stanice alga dosada još nije istražen, no utvrđeno je da različiti abiotički čimbenici mogu imati dvojak učinak na enzime tog ciklusa. Tako kod mikroalge *Dunaliella salina* kombinirani stres uslijed niskih temperatura i visokog intenziteta svjetlosti nije imao značajnog učinka na enzime askorbat-glutationskog ciklusa (Haghjou i sur., 2009), dok su kod makroalge *Ulva lactuca* uslijed tretmana UV-B zračenjem enzimi askorbat-glutationskog ciklusa bili inducirani (Shiu i Lee, 2005).

Vítová i sur. (2011) smatraju da aktivnost enzima glutation-peroksidaze (GPX) može poslužiti kao glavni marker oksidacijskog stresa uzrokovanog Se. Njihovi rezultati pokazali su drastično povećanje aktivnosti GPX u stanicama alge *S. quadricauda* pri tretmanu s 50 mg/L selenita u odnosu na kontrolu, a također su uočene puno više vrijednosti aktivnosti nego pri istoj koncentraciji selenata. Kao i ostale peroksidaze, GPX razgrađuje H_2O_2 do H_2O pri čemu koristi reducirani glutation (GSH) kao reducirajući spoj. Regeneracija GSH moguća je kroz redukciju oksidiranog glutationa (GSSG) uz pomoć glutation-reduktaze (GR) čime se zatvara proces (Apel i Hirt, 2004). U našem je istraživanju također uočen trend povećanja aktivnosti enzima u odnosu na kontrolne kulture nakon tretmana selenitom. Nakon 24 h tretmana, najveća aktivnost uočena je pri koncentracijama od 25, 50 i 100 mg/L, dok je nakon 48 h aktivnost bila veća pri dvjema višim koncentracijama. Zheng i sur. (2016) proučavali su aktivnost GPX kod mikroalge *H. pluvialis* te su zaključili kako nema značajnih razlika

između kontrolne skupine i najniže primijenjene koncentracije, no uočene su razlike pri višim koncentracijama. Naime, koncentracije od 13, 23 i 33 mg/L povećale su aktivnost GPX za oko 5,5, 8,3 i 26,7 puta u odnosu na kontrolu. Poznato je kako selenit u nižim koncentracijama djeluje kao antioksidans, dok pri višim koncentracijama dovodi do prekomjerne proizvodnje ROS-a i oksidacijskog stresa (Sun i sur., 2014).

Koncentracija produkata lipidne peroksidacije značajan je pokazatelj oksidacijskog stresa (Štefan i sur., 2007). Tretman kultura *M.* cf. *contortum* je povećao sadržaj produkata LPO pri višim koncentracijama selenita i pri dužem izlaganju. Najveći sadržaj LPO imale su stanice tretirane s 50 i 100 mg/L selenita nakon 48 h te one tretirane najvišom koncentracijom (100 mg/L) nakon 72 h. Koncentracije selenita od 25 do 75 mg/L povećale su sadržaj produkata LPO nakon 48 h i u stanicama zelene alge *C. vulgaris* (Sun i sur., 2014). Međutim, selenit može također djelovati na smanjenje ROS-a i produkata LPO u stanicama nekih mikroalga. Tako je tretman Se (≤40 mg/L), osim stimulirajućeg učinka na rast, koncentraciju pigmenata i aktivnosti antioksidacijskih enzima (CAT i GPX), utjecao i na smanjenu generaciju ROS-a te spriječio nastanak lipidne peroksidacije u stanicama *C. pyrenoidosa*, ali je ipak u višim koncentracijama (60 i 80 mg/L) imao suprotan učinak (Zhong i Cheng, 2017).

5. ZAKLJUČCI

Tretmani selenitom uzrokovali su inhibiciju rasta i smanjenje sadržaja fotosintetskih pigmenata u kulturama zelene mikroalge *Monoraphidium* cf. *contortum.* Selenit je povećao aktivnost antioksidacijskih enzima GR, GPX i APX, a inhibirao aktivnost CAT u odnosu na kontrolne kulture te uzrokovao povećanje produkata lipidne peroksidacije u stanicama alga. Promjene su bile izraženije pri višim koncentracijama i tijekom dužeg izlaganja selenitu, što ukazuje na dvojni učinak Se u stanicama alga koji može djelovati kao esencijalni element potreban za mnoge metaboličke funkcije, ali i kao prooksidans u višim koncentracijama.

Alge predstavljaju osnovni izvor Se za više trofičke razine u hranidbenim mrežama vodenih ekosustava te je vrlo važno istražiti akumulaciju i toksičnost Se u stanicama alga te proučiti njihov antioksidacijski odgovor.

6. LITERATURA

Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Method Enzymol* 105:121-126.

An P, Langqui X. 1987. Biological properties of selenium in the environment. *Sci Total Environ* 64: 89-98.

Andreou A, Brodhun F, Feussner I. 2009. Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Prog Lipid Res* 48: 148-70.

Apel K, Hirt A. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399.

Arora A, Sairam RK, Srivastava GC. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr Sci India* 82: 1227-1238.

Asada K. 2000. The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Phil Trans RSoc Lond B Biol Sci* 355: 1419-1431.

Birringer M1, Pilawa S, Flohé L. 2002 Trends in selenium biochemistry. *Nat Prod Rep* 19(6): 693-718.

Bischoff HW, Bold HC. 1963. Phycological Studies IV. Some Soil Algae From Enchanted Rock and Related Algal Specie. University of Texas, Austin, 6318: 1-95.

Carvalho KM, Gallardo-Williams MT, Benson RF, Martin DF. 2003. Effects of selenium supplementation on four agricultural crops. *J Agric Food Chem* 51: 704-709.

Chu J, Yao X, Zhang Z. 2010. Responses of wheat seedlings to exogenuos selenium supply under cold stress. *Biol Trace Elem Res* 136: 355-363.

Chua TL, Nancharaiah YV, Van Hullebusch ED, Lens PNL. 2016. Selenium: Environmental significance, pollution, and biological treatment technologies. *Biotechnol Adv* 19: 27-33.

Cutter, GA. 1989. The estuarine behaviour of selenium in San Francisco Bay. *Estuar Coast Shelf Sci* 28: 13-34.

Cutter GA, Church TM. 1986. Selenium in western Atlantic precipitation. *Nature* 322: 720-722.

Fan WMT, Teh SJ, Hinton DE, Higashi RM. 2002. Selenium biotransformations into proteinaceous forms by foodweb organisms of selenium-laden drainage waters in California. *Aquat Toxicol* 57: 65-84.

Filek M, Keskinen R, Hartikainen H, Szarejko I, Janiak A, Miszalski Z, Golda A. 2008. The protective role of selenium in rape seedlings subjected to cadmium stress. *J Plant Physiol* 165: 833-844.

Foyer CH, Noctor G. 2001. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytol* 146: 359-388.

Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48: 909-930.

Gojković Ž, Garbayo I, Gómez Ariza JL, Márová I, Vílchez C. 2015. Selenium bioaccumulation and toxicity in cultures of green microalgae. *Algal Res* 7: 106-116.

Golob A, Germ M, Kreft I, Zelnik I, Kristan U, Stibilj V. 2016. Selenium uptake and Se compounds in Se-treated buckwheat. *Acta Bot Croat* 75 (1): 17–24.

Guiry MD in Guiry MD. & Guiry GM. 2017. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.

Haghjou MM1, Shariati M, Smirnoff N. 2009. The effect of acute high light and low temperature stresses on the ascorbate-glutathione cycle and superoxide dismutase activity in two *Dunaliella salina* strains. *Physiol Plant* 135(3): 272-80.

Hartikainen H, Xue T, Piironen V. 2000. Selenium as an antioxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant Soil* 225: 193-200.

Hasanuzzaman M, Hossain MA, Fujita M. 2010. Selenium in higher plants: physiological role, antioxidant metabolism and abiotic stress tolerance, *J Plant Sci* 5 (4): 354–375.

Hawrylak-Nowak B. 2009. Beneficial effects of exogenous selenium in cucumber seedlings subjected to salt stress. *Biol. Trace Elem Res* 132: 259-269.

Hindák F. 1988. *Studies on the Chlorococcal Algae (Chlorophyceaea). IV* . Biologické Práce VEDA, Publishing House of the Slovak Academy of Sciences, Slovakia, 263 pp.

Iqbal M, Hussain I, Liaqat H, Ashraf MA, Rasheed R, Rehman AU. 2015. Exogenously applied selenium reduces oxidative stress and induces heat tolerance in spring wheat. *Plant Physiol Biochem* 94: 95-103.

Janz D. 2011. Selenium in *Homeostasis and Toxicology of Essential Metals*. Edited by Wood CM, Farrell AP, Brauner CJ. Fish Physiology Vol. 31, Part A: 1-497.

Jurkovič S, Osredkar J, Marc J. 2008. Molekularni utjecaj glutation-peroksidaza u antioksidacijskim procesima. *Biochem Med* 18(2): 162-74.

Karuppanapandian T, Moon JC, Kim C, Manohran K, Kim W. 2011. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Aust J Crop Sci* 5(6): 709-725.

Kopsell DA, Kopsell DE. 2006. Selenium in *Handbook of Plant Nutrition* Edited by Barker AV, Pilbeam DJ. Taylor and Francis Group, New York, 773 pp.

Lushchak VI. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol* 101: 13-30.

Lo BP, Elphick JR, Bailey HC, Baker JA, Kennedy CJ. 2015. The effect of sulfate on selenate bioaccumulation in two freshwater primary producers: a duckweed (*Lemna minor*) and a green alga (*Pseudokirchneriella subcapitata*). *Environ Toxicol Chem* 34: 2841-2845.

Maier KJ, Knight AW. 1994. Ecotoxicology of selenium in freshwater systems. *Environ Contam Toxicol* 134: 31-48.

Martens DA. 2003. Selenium, in *Encyclopedia of Water Sciences* edited by Stewart BA, Howel TA. Marcel Dekker, New York, 1034 pp.

Milanović S, Jovanović I, Valčić O. 2014. Selenoproteini. *Vet glasnik* 69 (1-2): 75-89.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9: 490-498.

Morlon H, Fortin C, Floriani M, Adam C, Garnier-Laplace J, Boudou A. 2005. Toxicity of selenite in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: Comparison between effects at the population and sub-cellular level. *Aquat Toxicol* 73: 65-78.

Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22: 867-880.

Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH. 2002. Interactions between biosynthesis, compartmentation, and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling, *J Exp Bot* 53: 1283-1304.

Novoselov SV, Rao M, Onoshko NV, Zhi H, Kryukov GV, Xiang Y, Weeks DP, Hatfield DL, Gladyshev VN. 2002. Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J* 21: 3681-3693.

Nowak J, Kaklewski K, Ligocki M. 2004. Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and in plants. *Soil Biol Biochem* 36: 1553-1558.

Nyholm N, Källqvist T. 1989. Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. *Environ Toxicol Chem* 8: 689-703.

Pastierová J, Kramarová Z, Molnárová M, Fargašová A. 2009. Comparison of the sensitivity of four freshwater microalgae to selenate and selenite. *Fresenius Environ Bull* 18: 2029-2033.

Radix P, Léonard M, Papantoniou C, Roman G, Saouter E, Gallotti-Schmitt S, Thiébaud H, Vasseur P. 2000. Comparison of Four Chronic Toxicity Tests Using Algae, Bacteria, and Invertebrates Assessed with Sixteen Chemicals. *Ecotoxicol Environ Saf* 47: 186-194.

Rezić T, Filipović J, Šantek B. 2014. Mikroalge – potencijalni izvor lipida za proizvodnju biodizela. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 9 (1-2): 26-36.

Rios JJ, Blasco B, Cervilla LM, Rosales MA, Sanchez-Rodriguez E, Romero L, Ruiz JM. 2009. Production and detoxification of H_2O_2 in lettuce plants exposed to selenium. *Ann Appl Biol* 154: 107-116.

Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Corpas FJ, Gómez M, Del Río LA. 2004. Cadmium induced subcellular accumulation of $O2^-$ and H_2O_2 in pea leaves. *Plant Cell Environ* 27: 1122-1134.

Sager M. 1993. Selenium occurance and ecology in *Enviromental contamination* edited by Vernet JP. Elsevier Science Publisher B.V, Geneva, 480 pp.

Schiavon M, Ertani A, Parrasia S, Dalla Vecchia F. 2017. Selenium accumulation and metabolism in algae. *Aquat Toxicol* 189: 1-8.

SCOR-Unesco Working Group 17, 1966. Determination of photosynthetic pigments, in: Unesco (Ed.) Monographs on Oceanographic Methodology 1. Determination of photosynthetic pigments in sea-water. Unesco, Paris, pp. 11-18.

Shiu CH, Lee TM. 2005. Ultraviolet-B-induced oxidative stress and responses of the ascorbate–glutathione cycle in a marine macroalga *Ulva fasciata. J Exp Bot* 56 (421): 2851-2865.

Singh M, Singh H, Bhandari DK. 1980. Interaction of selenium and sulphur on the growth and chemical composition of raya. *Soil Sci* 129: 238-244.

Steinbrenner H, Speckmann B, Klotz LO. 2016. Selenoproteins: Antioxidant selenoenzymes and beyond. *Arch Biochem Biophys* 595: 113-119.

Strickland JD, Parsons, TR. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada, Bulletin 167, second ed., Otawa, pp. 185-192.

Sun X, Zhong Y, Huang Z, Yang Y. 2014. Selenium Accumulation in Unicellular Green Alga *Chlorella vulgaris* and Its Effects on Antioxidant Enzymes and Content of Photosynthetic Pigments. *PLoS One* 9: 1-8.

Štefan L, Tepešić T, Zavidić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. 2007. Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina* 43: 84-93.

Tan LA, Nancharaiah YA, van Hullebusch ED, Lens Piet NL. 2016. Selenium: Environmental significance, pollution, and biological treatment technologies. *Biotechnol Adv* 16: 5-19.

Umysová D, Vítová M, Doušková I, Bišová K, Hlavová M, Žížková M, Machát J,

Doucha J, Zachleder V. 2009. Bioaccumulation and toxicity of selenium compounds in the green alga *Scenedesmus quadriacauda. BMC Plant Biol* 9: 58-74.

Verma S, Dubey RS. 2003. Leads toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci* 164: 645-655.

Vítová, M, Bišová, K, Hlavová M, Zachleder V, Rucki M, Čížková M. 2011. Glutathione peroxidase activity in the selenium-treted alga *Scenedesmus quadricauda*. *Aquat Toxicol* 102: 87–94.

Wang SY, Lewers KS, Bowman L, Ding M. 2007. Antioxidant Activities and Anticancer Cell Proliferation Properties of Wild Strawberries. *J Amer Soc Hort Sci* 132(5): 647-658.

Wendel A. 1980. Glutathione Peroxidase. Enzymatic basis of detoxification. In: WB Jacoby (ed) Vol 1. Academic Press, New York, pp. 333–353.

Wheeler AE, Zingaro RA, Irgolic K. 1982. The effect of selenate, selenite and sulfate on the growth of six unicellular marine algae. *J Exp Mar* Biol *Ecol* 57: 181-194.

Zheng Y, Li Z, Tao M, Hu Z. 2016. Effects of selenite on green microalga *Haematococcus pluvialis*: Bioaccumulation of selenium and enhancement of astaxanthin production. *Aquat Toxicol* 183:21-27.

Zhong Y, Cheng JJ. 2017 Effects of Selenite on Unicellular Green Microalga *Chlorella pyrenoidosa*: Bioaccumulation of Selenium, Enhancement of Photosynthetic Pigments, and Amino Acid Production. *J Agric Food Chem* 65 (50): 10875-10883.

Zhou C, Huang JC, Liu F, He S, Zhou W. 2017. Effects of selenite on *Microcystis aeruginosa*: Growth, microcystin production and its relationship to toxicity under hypersalinity and copper sulfate stresses. *Environ Pollut* 223: 535-544.

WEB:

1. http://sajamideja.fkit.hr/sajam%202016/prezentacije/Magi%C4%87_predavanje.pdf
2. http://www.algaebase.org/browse/taxonomy/?id=97241 (preuzeto: 22. listopada 2017.)
3. biolozi.bio.bg.ac.rs/attachments/article/1187/Testovi%20toksicnosti.doc
4. http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=43438

(preuzeto: 26. kolovoza 2017.)