

Priprema i karakterizacija vezikula plazmatske membrane iz stanica alga

Balen, Tomo

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:852292>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-07**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Tomo Balen

Priprema i karakterizacija vezikula plazmatske membrane iz stanica alga

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistra kemije

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za biogeokemiju mora i atmosfere,
Zavod za istraživanje mora i okoliša, Institut Ruđer Bošković pod mentorstvom
dr. sc. Nadice Ivošević DeNardis. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je
prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta HRZZ pod nazivom
„Od površinskih svojstava stanica alga do pokazatelja stresa u vodenim ekosustavima“
[IP-2018-01-5840] (voditelj: dr. sc. Nadica Ivošević DeNardis).

Zahvale

Najljepše zahvale mentorici dr. sc. Nadici Ivošević DeNardis na pruženoj prilici, stručnom vodstvu, strpljenju i ispravicima.

Zahvaljujem se mentorici s Kemijskog odsjeka prof. dr. sc. Ivi Juranović Cindrić na ispravicima i savjetima.

Puno hvala dr. sc. Maji Levak Zorinc na uputama, uloženom trudu i pomoći prilikom eksperimentalnog dijela.

Puno hvala Nives Novosel, mag. oecol. na savjetima i pomoći.

Puno hvala dr. sc. Tei Mišić Radić na korisnim savjetima i ugodnoj radnoj atmosferi u laboratoriju.

Puno hvala dr. sc. Blaženki Gašparović na analizi lipida.

Puno hvala dragim roditeljima na strpljenju i ljubavi.

Puno hvala bratu Luki na brizi mlađeg brata.

Sadržaj

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Mikroalge i njihova uloga u vodenom okolišu.....	2
2.2. Biotehnoški potencijal mikroalga	2
2.3. Mikroalga <i>Dunaliella tertiolecta</i>	5
2.4. Metode.....	6
2.4.1. Epifluorescencijska mikroskopija	6
2.4.2. Konfokalno laserska pretražna mikroskopija	8
2.4.3. Mikroskopija atomskih sila	10
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. Kemikalije.....	12
3.2. Laboratorijska monokultura stanica mikroalga <i>Dunaliella tertiolecta</i>	12
3.3. Instrumentacija	13
3.4. Uzgoj, određivanje gustoće i izolacija stanica	13
3.5. Priprema vezikula plazmatske membrane	15
3.6. Priprema uzorka za karakterizaciju AFM-om i analiza podataka	16
3.7. Priprema uzorka za karakterizaciju CLSM-om i analiza podataka.....	18
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. Rast stanica <i>D. tertiolecta</i> kod dvaju saliniteta hranjivoga medija.....	19
4.2. Karakterizacija vezikula optičkom mikroskopijom	20
4.3. Karakterizacija vezikula plazmatske membrane AFM-om	22
4.4. Karakterizacija vezikula plazmatske membrane CLSM-om.....	26
4.4.1. Propusnost vezikula plazmatske membrane kalceinom	27
4.4.2. Propusnost vezikula plazmatske membrane konkanavalin A-FITC-om.....	29
4.5. Od stanica do vezikula te usporedba s ostalim nosačima aktivnih komponenti	31
§ 5. ZAKLJUČAK	35
§ 6. LITERATURNI IZVORI.....	36
§ 7. DODATAK	XL
§ 8. ŽIVOTOPIS	XLI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Priprema i karakterizacija vezikula plazmatske membrane iz stanica alga

Tomo Balen

U ovom je radu provedena priprema i karakterizacija vezikula plazmatskih membrana dobivenih iz mikroalga *Dunaliella tertiolecta* uzgojenih kod dvaju saliniteta. Osmotskim šokom mekanih stanica nastale su mikrometarske vezikule koje su karakterizirane metodama oslikavanja primjenom epifluorescencijske, konfokalne i mikroskopije atomskih sila. Pripremljene vezikule bile su mikrometarske, pojedinačne, uglavnom sferičnoga oblika, prazne ili s nešto staničnoga materijala te su pokazale svojstvo autofluorescencije uslijed prisutnosti klorofila koji je ugrađen tijekom rekonstrukcije membrane. Oslikavanjem na nanometarskoj skali vizualizirane su površinske globularne strukture koje bi mogle odgovarati glikoproteinima između kojih su nanometarske pore. Vezikule plazma membrane su propusne za male hidrofilne molekule kalceina, dok su polupropusne za veće molekule konkanavalin A-FITC uz specifičnu interakciju s površinskim skupinama glukoza i manozila na membrani. Rezultati nisu pokazali značajnu razliku u smislu morfologije i propusnosti između vezikula plazma membrana kod dva saliniteta. Rezultati ovoga rada doprinose daljnjem razvoju nove generacije alternativnih bioinspiriranih nosača aktivnih komponenti.

(53 stranica, 24 slika, 5 tablica, 51 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

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

Ključne riječi: *Dunaliella tertiolecta*, fluorescentne boje, konfokalna mikroskopija, mikroskopija atomskih sila, nanomorfologija, propusnost membrane, vezikule plazmatske membrane

Mentori: dr. sc. Nadica Ivošević DeNardis, viši znanstveni suradnik

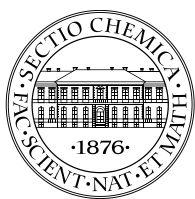
Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
2. doc. dr. sc. Đani Škalamera
3. doc. dr. sc. Jana Pisk

Zamjena: prof. dr. sc. Sanda Rončević

Datum diplomskog ispita: 25. veljače 2022.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

Preparation and characterization of algal plasma membrane vesicles

Tomo Balen

In this Thesis plasma membrane vesicles of *Dunaliella tertiolecta* microalgae grown at two salinities were prepared and characterized. Osmotic shock of soft cells resulted in micrometer-sized vesicles that were characterized by imaging methods using fluorescence, confocal, and atomic force microscopy. The prepared vesicles were micrometer-sized, single, mostly spherical, empty or with some cellular material, and exhibited the property of autofluorescence due to the presence of chlorophyll incorporated during membrane reconstruction. Nanometer-scale measurements show spherical surface structures that could correspond to glycoproteins, with nanometer pores in between. Plasma membrane vesicles are permeable to small hydrophilic calcein molecules, whereas they are semipermeable to larger concavalin A-FITC molecules consistent with specific interaction with glucosyl and mannosyl groups on the membrane. The results showed no significant difference in morphology and permeability between plasma membrane vesicles in the two salinities. The results of this work contribute to the further development of a new generation of alternative bioinspired drug carriers.

(53 pages, 24 figures, 5 tables, 51 references, original in Croatian)

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

Keywords: atomic force microscopy, confocal microscopy, *Dunaliella tertiolecta*, fluorescent dye, membrane permeability, nanomorphology, plasma membrane vesicles

Mentors: dr. sc. Nadica Ivošević DeNardis, Senior Research Associate

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić, Full professor

Reviewers:

1. Dr. Iva Juranović Cindrić, Full Professor
2. Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor
3. Dr. Jana Pisk, Assistant Professor
4. Substitute: Dr. Sanda Rončevićić, Full Professor

Date of exam: Feb 25, 2022

§ 1. UVOD

Mikroalge su jednostanični, eukariotski, fotosintetski mikroorganizmi koji s ekološkog aspekta imaju ključnu ulogu u primarnim reakcijama fotosinteze, biogeokemijskim ciklusima važnim za kruženje elemenata te su osnova hranidbenog lanca u vodenom okolišu. S tehnološkog aspekta najčešće se koriste za izolaciju bioaktivnih komponenata (proteina, lipida, pigmenata, vitamina) u proizvodnji lijekova, dodataka prehrani, biogoriva, gnojiva, te kozmetičkih proizvoda, ali i za pročišćavanje industrijskih otpadnih voda.¹⁻³

Razvoj nove generacije prirodnih nosača aktivnih komponenti, koji bi što bolje oponašali staničnu membranu, važan je u farmaceutskoj industriji, za razliku od sintetskih nosača koji koriste različite oblike fosfolipidnih vezikula. Nedostatak sintetskih vezikula je što nemaju u potpunosti svojstva prirodnih staničnih membrana. Stoga se sve više istražuju složeniji sustavi kao što su egzozomi koji nastaju unutar stanice mikroalga, te se procesom egzocitoze oslobađaju u okolni medij. Egzozomi su male sferične vezikule čija je glavna funkcija prijenos različitih vrsta proteina do susjednih stanica. Nedostatak primjene egzozoma je što im mehanizam nastanka nije u potpunosti razjašnjen, složeni su i zahtjevni za određivanje, proučavanje i izolaciju. Jedan od mogućih nosača aktivnih tvari bila bi izolirana membrana mekih stanica mikroalga, no njene mogućnosti za uporabu još uvijek nisu detaljno istražene. U okviru ovog rada provedeno je istraživanje rekonstruirane vezikule plazmatske membrane kao potencijalnog nosača aktivnih komponenti.

Cilj istraživanja bila je priprema i karakterizacija vezikula plazmatske membrane izoliranih iz stanica mikroalga. Kao modelni organizam korištena je jednostanična mikroalga bez stanične stijenke *D. tertiolecta*. Stanice mikroalga *D. tertiolecta* uzgojene su pri dva saliniteta u kojima su površinska svojstva njihovih stanica poznata. Primjenom metoda oslikavanja pomoću fluorescencijske mikroskopije, konfokalne mikroskopije i mikroskopije atomskih sila, vezikulama plazmatske membrane mikroalgi *D. tertiolecta* određena je veličina, intenzitet fluorescencije, strukturna organizacija i propusnost na odabrane molekularne boje specifičnih fizikalno-kemijskih svojstava.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Mikroalge i njihova uloga u vodenom okolišu

Mikroalge su jednostanični ili kolonijalni mikroorganizmi veličine od nekoliko mikrometara do nekoliko stotina mikrometara. Karakteristika svih algi je mogućnost pretvorbe ugljikova dioksida i vode u glukozu i kisik pomoću sunčeve energije. Imaju važnu ulogu u kružnom toku ugljika, fosfora, dušika, silicija i sumpora te predstavljaju osnovu hranidbenog lanca u vodenom okolišu. Sistematski pripadaju skupini fototrofnih protoktista, koji obuhvaćaju eukariote i fotoautotrofnih monera, odnosno prokariotskih cijanobakterija. Pojedinačne mikroalge mogu biti prokariotske, slične cijanobakterijama (*Chloroxybacteria*) ili eukariotske, slične zelenim algama (*Chlorophyta*). Prema načinu ishrane, mikroalge mogu biti autotrofi, heterotrofi i miksotrofi. Kao izvor energije za rast autotrofne alge koriste CO₂ iz zraka i Sunčevu svjetlost, a heterotrofi organske spojeve u vodenom okolišu. Alge obitavaju u vodenim okolišima, pri čemu najveći broj vrsta živi u morima i oceanima, zatim u kopnenim vodama i na vlažnim mjestima.

Mikroalge predstavljaju pouzdan pokazatelj promjena u ekosustavu budući da zbog kratkog životnog ciklusa brzo reagiraju na promjene u okolišu. Temperatura i salinitet su glavni okolišni indikatori klimatskih promjena u vodenim ekosustavima. Promjena temperature, saliniteta, prisutnost teških metala ili hranjivih tvari u mediju daju mjerljiv odgovor prilagodbe stanica u smislu promjene u dinamici staničnog rasta, pokretljivosti, fiziološkoj aktivnosti, mehaničkim svojstvima, morfološkim karakteristikama stanica, sastavu lipida, ekspresiji proteina i autofluorescenciji. Kao pokazatelji stanja i promjena okoliša mikroalge su danas predmet brojnih istraživanja.⁶⁻¹⁰

2.2. Biotehnološki potencijal mikroalga

Dosadašnja saznanja o algama otvaraju nove mogućnosti za njihovu sve veću biotehnološku primjenu. Zbog svoje jedinstvenosti i velikog udjela bioaktivnih spojeva mikroalge danas imaju primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, u proizvodnji gnojiva, te za pročišćavanje industrijskih otpadnih voda.^{1,2}

Rodovi alga poput *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, *Dunaliella* i *Haematococcus* imaju širu industrijsku primjenu. Jedan od produkata mikroalgi koji se koristi u prehrambenoj industriji su karotenoidi, uz koje se mogu pronaći i fikobiliproteini, dodatni pigmenti koji se također koriste kao prirodne boje u prehrani. Vrste *Arthrospira platensis* (rod *Spirulina*) i *Chlorella vulgaris* (rod *Chlorella*) često se koriste kao dodaci hrani (npr. salate) u Irskoj, Koreji, Kini i Japanu. U okviru Kineskog nacionalnog strateškog programa s ciljem dodatka alge *Spirulina* hrani, proizvodnja stanica *Spirulina* porasla je s 3000 tona u 2004. do 55 000 tona u 2021. godini.^{3,11,12} Oko 30 % ukupne proizvodnje alga koristi se za prehranu životinja, primarno *Spirulina*. Alge su izrazito bogate proteinima i različitim spojevima koji pojačavaju odgovor imunosnog sustava.¹³ Općenito, nedostatak primjene algi u ljudskoj prehrani je njihova loša probavljivost zbog celulozne stanične stijenke i toksičnost zbog akumulacije štetnih tvari potencijalno prisutnih u vodenom okolišu.³

Mikroalge su prepoznate i kao važan izvor obnovljive energije, sve se više koriste u proizvodnji alternativnih izvora energije (bioulja, biodizela, biovodika, alkohola i gnojiva). U proizvodnji bioulja i biodizela važan je masovan uzgoj algi, ekstrakcija lipida te razdvajanje triacilglicerola i slobodnih masnih kiselina od krutih lipida. Vrste mikroalgi koje se koriste u proizvodnji biogoriva su *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, *Sargassum patens* i *Spirulina*.¹⁴

Bioulja se proizvode iz biomaterijala alga procesom termičko kemijske konverzije u uvjetima nedostatka kisika. Slična su po sastavu petrolejskim uljima te su im najčešće prihvatljiva zamjena. Biodizel se proizvodi transesterifikacijom lipida algi s alkoholom uz pomoć katalizatora. Dobiveni biodizel nije štetan za okoliš kao tradicionalna goriva jer je biorazgradiv. Biovodik se proizvodi iz alga reakcijama pokrenutim ATP, indirektnom i direktnom fotolizom, no tehnologija proizvodnje je još uvijek u razvoju. Razni alkoholi poput metanola, etanola i butanola dobivaju se pomoću anorganske razgradnje s mikrobakterijama te imaju industrijsku i farmaceutsku upotrebu, a koriste se i kao dodatak gorivu. Za razliku od tradicionalno uzgojenih kopnenih biljaka (repe, kukuruza i palminog ulja), mikroalge su bogatije energetske spojevima, zahtijevaju puno manje slatke vode u odnosu na klasičnu poljoprivredu, rastu tijekom cijele godine, a uzgoj se može odvijati u jezerima, bioreaktorima ili na neplodnoj zemlji. Alge se već stoljećima koriste kao gnojiva, često se dodaju u zemlju kao biognojivo i sredstvo za održavanje pogodnog tla. Imaju mogućnost fiksacije dušika što

potpomaže rast biljaka, lako se razgrađuju te sadrže derivate koji vežu vodu i omogućavaju zadržavanje vode.^{3,11,14,15}

Za potrebe farmaceutske industrije mikroalge kao živi reaktori mogu proizvesti znatne količine važnih organskih spojeva poput masnih kiselina, pigmenata, vitaminima i ostalih bioaktivnih tvari. Također, produkti sekundarnog metabolizma mikroalga imaju različite terapijske učinke, pa pojedini spojevi imaju svojstva imunomodulatora, antiviralnih tvari, inhibitora ili citostatika.¹⁶ Ekstrakti algi mogu se koristiti u kozmetičke svrhe poput proteina, vitamina i minerala, a s ciljem popravljivanja oštećene kože, u smanjenju masnoće na koži te smanjenju upalnih procesa, a u tu svrhu najčešće korištene su *Dunaliella salina* i *Spirulina platensis*. U farmaceutskoj industriji fikobiliproteini se koriste kao vrlo osjetljivi fluorescentni reagensi te se primjenjuju u imunokemijskim laboratorijima kao oznake za protutijela i receptore u razvrstavanju stanica pomoću protutijela, te u fluorescencijskoj mikroskopiji i dijagnostici.³ Osim toga, u farmaceutskoj industriji osobito je važan i razvoj nove generacije nosača aktivnih komponenti koji bi što bolje oponašali staničnu membranu. Kao sintetski nosači aktivnih komponenti koriste se lipidne vezikule, koje nemaju u potpunosti svojstva prirodnih staničnih membrana. U novije vrijeme, sve se više istražuju složeniji sustavi kao što su egzosomi koji nastaju unutar stanice mikroalga, te se procesom egzocitoze oslobađaju u okolni medij. Egzosomi su male sferične vezikule čija je glavna uloga prijenos različitih vrsta proteina do susjednih stanica. Osim njihove uloge u reguliranju ekspresije gena na posttranskripcijskoj razini, egzosomi mogu i izbjevati različite mehanizme imunskog odgovora sudjelovanjem u virusnim infekcijama prenoseći virusne čestice između stanica. Nakon što se egzosomi odvoje od membrane mogu izbaciti svoj sadržaj u izvanstanični prostor ili ga transportirati do određene stanice. Nedostatak primjene egzosoma je što im mehanizam nastanka nije u potpunosti razjašnjen, složeni su i zahtjevni za određivanje, proučavanje i izolaciju.

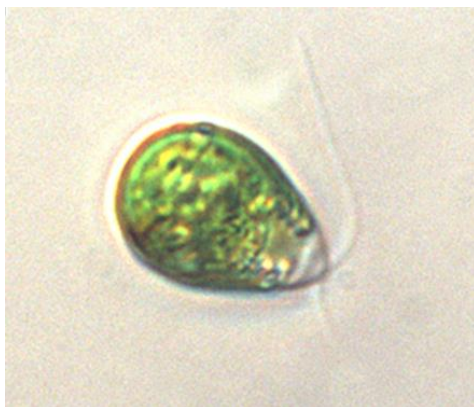
Smatra se da biotehnološki potencijal mikroalga nije posve iscrpljen. U prilog tome ide činjenica da se ispituje moguća primjena mikroalga u smislu bioreaktora za kisik te kao „super-hrana“ za astronaute na svemirskoj stanici.¹⁷⁻¹⁹

2.3. Mikroalga *Dunaliella tertiolecta*

Jednostanična, zelena alga *Dunaliella tertiolecta* (*D. tertiolecta*) taksonomski je klasificirana u odjel *Chlorophyta*, razred *Chlorophyceae*, red *Volvocales*, porodica *Chlamydomonaceae*, rod *Dunaliella*, vrsta *Dunaliella tertiolecta*. *Dunaliella tertiolecta* je halotolerantna vrsta i dobro raste u širokom rasponu saliniteta te je geografski rasprostranjena po cijelom svijetu (Crno more, Mrtvo more, Veliko slano jezero, solana Pag). Smatra se ekstremofilom zbog dobre prilagodbe na niske temperature, ekstremne vrijednosti pH, različito osvjetljenje, toksične koncentracije teških metala te se koristi kao bioindikator u mnogim istraživanjima.^{16,20,21}

Stanice mikroalge *D. tertiolecta* veličine su 6-12 μm , radijalno su simetrične, ponekad bilateralno simetrične i elipsoidalno spljoštene, nemaju staničnu stijenku već samo plazma membranu modificiranu na površini s glikoproteinima što čini glikokaliks debljine 9 nm.²² Zbog toga im je stanica vrlo mekana te njezina čvrstoća (engl. *stiffness*) u povoljnim uvjetima rasta iznosi nekoliko kPa.⁶ Strukturne značajke stanične membrane omogućavaju mikroalgi *D. tertiolecta* laku prilagodbu promjeni saliniteta regulacijom unutarstaničnog glicerola. Membrane im se primarno sastoje od proteina, lipida i ugljikohidrata.^{16,21} Lipidi imaju različite uloge u stanici, te mogu služiti kao zaliha energije, kao gradivna komponenta membrana te kao signalne molekule ili glasnici u prijenosu signala. Sadržaj i sastav lipida ovisi o starosti mikroalgi, o njihovom fiziološkom stanju te o ekološkim faktorima kao što je primjerice dostupnost hrane. Tako u slučaju nedostatka fosfata u mediju dolazi do sporijeg rasta stanica i povećanja masnih kiselina (npr. oleinske kiseline), dok se promjeni saliniteta stanice prilagođavaju promjenom lipidnog sastava.¹⁶ Membrane *D. tertiolecta* su asimetrične, fluidne i sadrže transportne sustave koje im daju svojstvo selektivne propusnosti te mogućnost opskrbe potrebnim molekulama kao i oslobađanje nepotrebnih molekula.

Stanice mikroalgi *D. tertiolecta* (slika 1.) imaju dva biča i pokazuje aktivno kretanje. Srednja brzina kretanja u povoljnim uvjetima rasta iznosi oko 72 $\mu\text{m s}^{-1}$.²¹



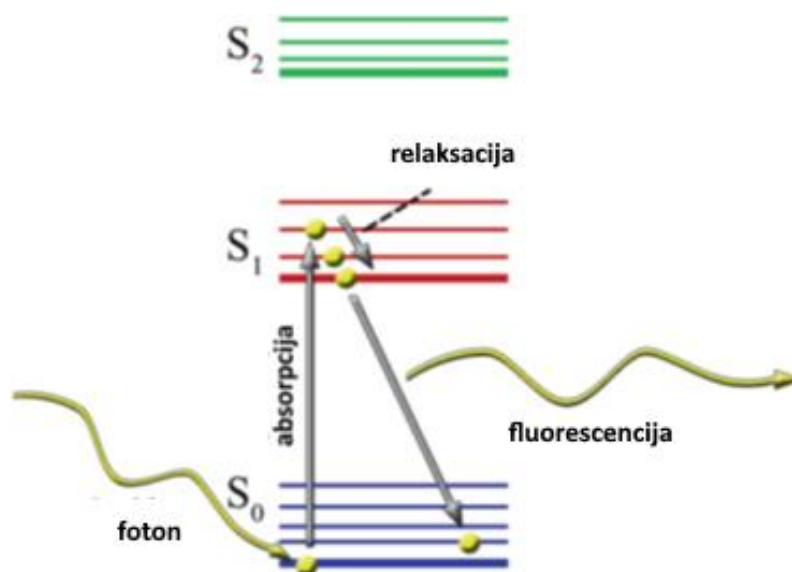
Slika 1. Mikroalga *Dunaliella tertiolecta* (preuzeto i prilagođeno iz literaturnog izvora 23)

2.4. Metode

U ovom radu metode oslikavanja korištene su za karakterizaciju vezikula plazmatske membrane u smislu veličine, intenziteta fluorescencije, strukturne organizacije i propusnosti membrane na odabrane molekularne boje specifičnih fizičko-kemijskih svojstava.

2.4.1. Epifluorescencijska mikroskopija

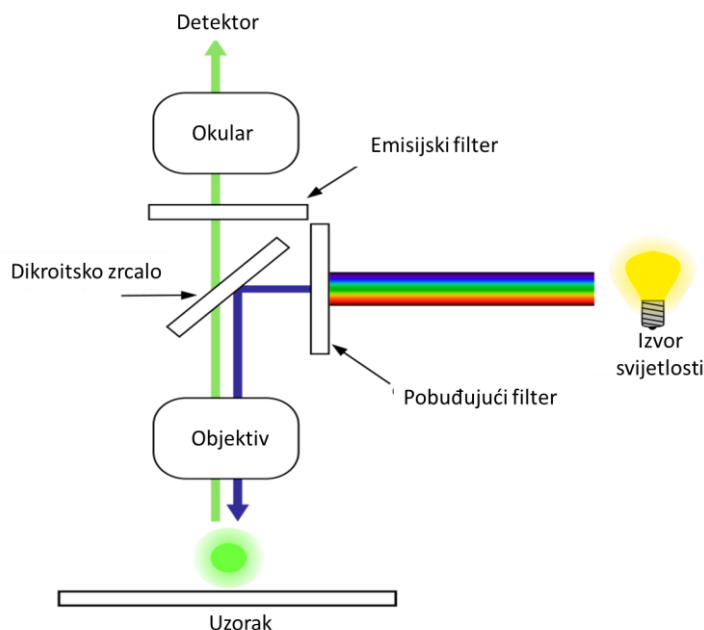
Epifluorescencijska mikroskopija je vrsta fluorescencijske mikroskopije koja se koristi u staničnoj biologiji i poznata je pod nazivom mikroskopija širokog polja jer izvor osvjetljava cijelo vidno polje, pri čemu se pobuđivanje i detekcija signala izvode kroz isti svjetlosni put (objektiv). Za označavanje uzoraka u fluorescencijskoj mikroskopiji koriste se fluorescentne boje. Fluorescencija je pojava kojom se molekule kromofora (fluorofora) pobuđuju elektromagnetskim zračenjem u UV/Vis području te povratkom u osnovno stanje emitiraju zračenje. Uzorak se pobuđuje iz vanjskog izvora svjetlosti, najčešće živinom lampom. Molekule koje mogu apsorbirati zračenje određene valne duljine i fluorescirati nazivamo fluoroforima. Nakon apsorpcije zračenja određene valne duljine, elektroni prelaze u više energetske stanje ($S_0 \rightarrow S_1$), koje je nestabilno te vrlo brzo (u nanosekundama) prelaze u niže energetske stanje pri čemu dolazi do emisije zračenja ($S_1 \rightarrow S_0$), tj. pojave fluorescencije. Valne duljine emisije imaju veću valnu duljinu od valne duljine pobudne svjetlosti zbog relaksacije pobuđenog vibracijskog stanja (slika 2).



Slika 2. Jablonski dijagram elektronskog stanja pobuđene molekule i nastanka fluorescencije (preuzeto i prilagođeno iz izvora 24)

Svaka molekula posjeduje više energetske stanja od kojih se svako elektronsko stanje sastoji od niza vibracijskih i rotacijskih nivoa. Apsorpcijom zračenja točno određene valne duljine molekula prelazi u viša energetska stanja. Nakon kratkog zadržavanja, vraćaju se u osnovno stanje na nekoliko različitih načina: radijacijskim procesima (fluorescencija ili fosforescencija) ili neradijacijskim deaktivacijskim procesima (unutarnja pretvorba ili međusustavno križanje). Favorizirani put povratka u osnovno stanje je onaj koji minimalizira život pobuđenog stanja. Apsorpcijom zračenja molekula prelazi iz osnovnog u jedno od pobuđenih singletnih elektronskih stanja. Vrlo brzo vibracijskom relaksacijom molekula prelazi u osnovno vibracijsko stanje istog pobuđenog elektronskog stanja, iz kojeg neradijativnim putem “unutarnjom pretvorbom” prelazi u najniže pobuđeno elektronsko stanje ili može međusustavnim križanjem prijeći u stanje različitog multipliciteta (tripletno stanje).^{24,25}

Izvor svjetlosti za pobuđenje u sklopu epifluorescencijskog mikroskopa mora odgovarati valnim duljinama pobuđenja uzorka koji fluorescira, a to se najčešće postiže prolaženjem svjetlosti kroz dikroitsko zrcalo (slika 3).

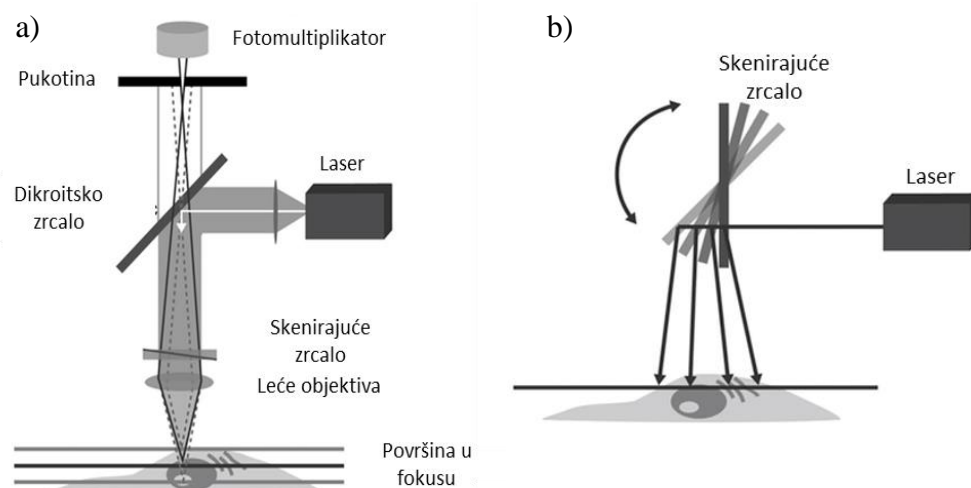


Slika 3. Shema epifluorescencijskog mikroskopa (preuzeto i prilagođeno iz literaturnog izvora 26)

Dikroitsko zrcalo ima svojstvo propuštanja ili refleksije određenih valnih duljina svjetlosti. Nakon refleksije na dikroitskom zrcalu, pobudna svjetlost preko objektiva dolazi do uzorka, a zatim opet dolazi na drugo dikroitsko zrcalo koje na okular (detektor) propušta samo emisijsko zračenje pri čemu nastaje slika fluorescencije uzorka. Epifluorescencijska mikroskopija se najčešće koristi za karakterizaciju uzorka debljine preko $10\ \mu\text{m}$.^{24–26}

2.4.2. Konfokalno laserska pretražna mikroskopija

Konfokalna mikroskopija (engl. *confocal laser scanning microscopy*, CLSM) je varijacija fluorescencijske mikroskopije. Mikroskopu je nadodan zaslon s pukotinom čime se uklanja sva svjetlost koja ne dolazi iz fokusiranog dijela uzorka (slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz a) konfokalnog mikroskopa i b) skenirajućeg zrcala (preuzeto i prilagođeno iz literaturnog izvora 27)

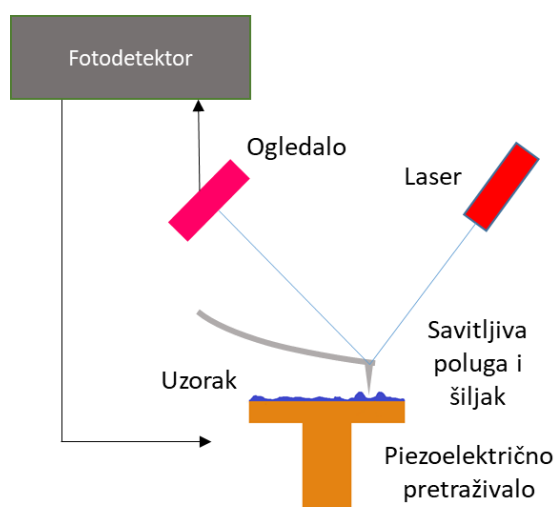
Izvor svjetlosti kod konfokalnog laserskog pretražnog mikroskopa je točkast, najčešće laserski. Laserski snop prelazi uzorak pomoću motoriziranih zrcala, osvjetljavajući tako uzorak točku po točku, pobuđujući fluorescentne molekule. Nedostatak je što se ne može vidjeti realna slika cijelog vidnog polja kao kod klasične mikroskopije. Valne duljine odabiru se pomoću djelitelja snopa ili dikroitskog zrcala postavljenog na put laserske svjetlosti. Ispred detektora, u ravnini optički konjugiranoj s fokusom u uzorku, nalazi se zaslon s pukotinom. Do detektora kroz pukotinu dolazi samo svjetlost iz fokusa na uzorku, dok se svjetlost iz bilo koje druge točke na uzorku zaustavlja na zaslonu. Rezultat je dvojak: optička razlučivost je vrlo dobra, no svjetlosni intenzitet signala je smanjen. Da bi signal tako slabog intenziteta ipak bio koristan, detektori konfokalnog mikroskopa najčešće su fotomultiplikatori, uređaji koji detektiraju dolazne fotone te ih pretvaraju u pojačani električni signal. Električni signal potom se pretvara u digitalni, računalno obrađuje i konačno prikazuje na monitoru točku po točku u tonovima sive. Svaki piksel konfokalne mikrografije dobiva svoju vrijednost na ljestvici tonova sive (engl. *gray scale*) koja ovisi broju fotona pristiglih na fotomultiplikator. To omogućava uspoređivanje intenziteta svjetlosti u različitim dijelovima uzorka, te između različitih uzoraka. Fluorescentne molekule moguće je u postupku pripreve uzorka za mikroskopiranje vezati za točno određene biološki i kemijski važne spojeve. Upotrebljavajući više pobuda, detektora i različitih fluorescentnih boja koje se vežu za točno određene strukture dobiva se detaljna karakterizacija

uzorka. Primarno se koristi za tanke presjeke uzorka te nije optimalna za istraživanja *in vivo* i uzorke tkiva.^{24,25,27,28}

2.4.3. Mikroskopija atomskih sila

Mikroskopija atomskih sila (engl. *Atomic Force Microscopy*, AFM) omogućava nedestruktivno pretraživanje površine uzorka mjereći interakciju između atoma oštrog šiljka pričvršćenog za savitljivu polugu i atoma površine uzorka.²⁹ Mikroskopija atomskih sila ima dva načina rada. U oslikavajućem načinu rada stvara se topografski trodimenzionalni prikaz površine putem „dodirivanja“ površine u ambijentalnim uvjetima, na zraku ili u tekućini uz vertikalno razlučivanje od 1 Å i lateralno razlučivanje od 1 nm. U neoslikavajućem načinu rada određuju se mehanička svojstva, sile koje djeluju među molekulama, te magnetna i električna svojstva. Priprema uzorka je jednostavna, mogu se oslikati žive stanice u fiziološkim uvjetima, te istražiti utjecaj različitih faktora na morfologiju, strukturnu organizaciju i mehanička svojstva stanica^{6,7,30–32} te abiotskih čestica.^{33,34}

Uređaj AFM sastoji se od tri osnovna dijela: piezoelektričnog pretraživala, pretražne probe i sustava za detekciju pomaka poluge. Piezoelektrično pretraživalo izrađeno je od piezoelektričnog materijala koji se širi i skuplja proporcionalno primijenjenom naponu. Proba AFM sastoji se od poluge sa šiljkom (SiN₃, SiO₂, C-nanocijevi i dr.), dužine nekoliko mikrometara dok je poluga dužine 100 – 200 μm. Sustav za detekciju pomaka poluge je optički sustav koji se sastoji od lasera i fotodetektora povezanog preko povratne sprege s piezoelektričnim pretraživalom na kojem je smješten uzorak (slika 5).



Slika 5. Shema prikaz rada mikroskopa atomskih sila

Metoda AFM temelji se na relativno jednostavnom načelu rada. Oštar šiljak koji se nalazi na slobodnom kraju fleksibilne poluge skenira površinu uzorka pri čemu osjeća interakcijske sile između šiljka i uzorka. Uslijed interakcije između šiljka i uzorka dolazi do otklona poluge koji je proporcionalan sili interakcije prema Hookovom zakonu (1):

$$F = -K \times \Delta d \quad (1)$$

gdje je F sila interakcije, K konstanta poluge, a d udaljenost između šiljka i uzorka.

Uzorak je smješten na piezoelektričnom pretraživalu koje omogućuje trodimenzionalno pozicioniranje sa subnanometarskom točnošću. Uslijed otklona poluge dolazi do otklona reflektirane laserske zrake do fotodetektora što uzrokuje promjenu napona na fotodiodi, te se preko povratne sprege mijenja visina piezoelektričnog pretraživala, kako bi se održavala stalna udaljenost između pretražne probe i uzorka. Registrirane vrijednosti otklona poluge se elektronički konvertiraju u topografsku trodimenzionalnu sliku uzorka.

Ovisno o vrsti uzorka koji se karakterizira ključan je odabir režima rada i odgovarajuće probe. Izbor probe AFM određuje silu koja se primjenjuje na uzorak te rezoluciju. Postoje dva režima rada: kontaktni režim rada (engl. *contact mode*) i tapkajući režim rada (engl. *tapping mode*). Kontaktni režim rada temelji se na konstantnoj interakciji između atoma šiljka i uzorka. Za osjetljive biološke uzorke, kontaktni režim rada nije uvijek najpogodniji, pa se koristi i tapkajući režim rada. Tapkajući režim rada temelji se na skeniranju površine uzorka oscilirajućom polugom. Poluga efektivno oscilira dok putuje preko uzorka i povremeno ga dodiruje, a približavanjem šiljka površini uzorka dolazi do smanjenja amplitude osciliranja poluge. To omogućuje stvaranje topografske slike mjerenjem promjene amplitude poluge. Tapkajući režim rada se koristi kada se zahtjeva velika preciznost te kada su uzorci previše mekani za kontaktni režim rada.^{23,35}

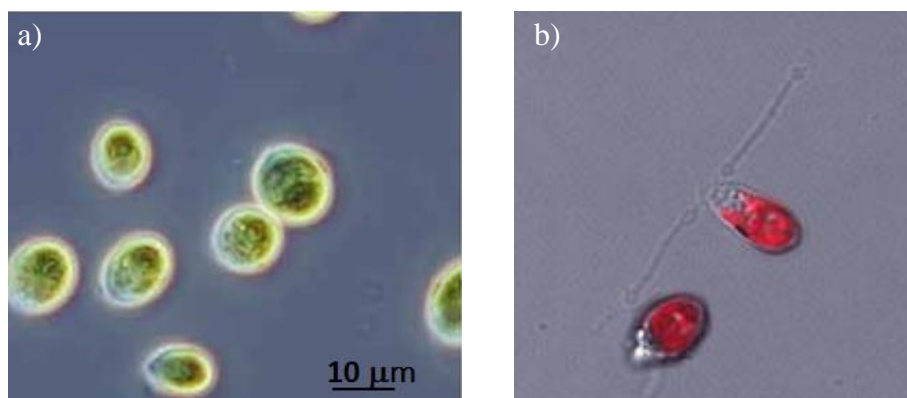
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Otopina polimera polietilenimina i molekularne boje: DiI (1,1'-Dioktadecil-3,3,3',3'-Tetrametilindokarbocijanin perklorat), kalcein, konkanavalinA-FITC (konkanavalin A – fluorescein–izotiocijanat) nabavljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich, SAD. Tris(hidroksimetil)aminometan–HCl pufer nabavljen je od tvrtke Fisher, SAD. Etanol 96 %-tni nabavljen je od tvrtke Kefo d.o.o., Hrvatska, a formaldehid od tvrtke Kemika d.o.o., Hrvatska. Sve kemikalije za pripremu medija $f/2^{36}$ prema tablicama D1 i D2 (u prilogu) nabavljene su od tvrtke Kefo d.o.o., Hrvatska.

3.2. Laboratorijska monokultura stanica mikroalga *Dunaliella tertiolecta*

U diplomskom radu korištena je monokultura stanica mikroalga *D. tertiolecta* koja je služila kao modelni organizam (slika 6).



Slika 6. Stanice *D. tertiolecta* (Butcher) snimljene pod a) optičkim mikroskopom te b) konfokalnim mikroskopom preklapanjem slika u transmissijskom i fluorescentnom modu

Stanice *D. tertiolecta* naručene su iz laboratorija *Provasoli-Guillard Center of Marine Phytoplankton, Bigelow Laboratory for Ocean Sciences, West Boothbay Harbour, Maine, SAD.*

3.3. Instrumentacija

Instrumentacija korištena u ovom radu je: sterilni kabinet *Safe FAST Light*, DASITGROUP, Italija za rad sa staničnim monokulturama, komora za uzgoj stanica *GLF 1086*, centrifuga za izolaciju stanica i vezikula *HiCen 21*, Herolab, hemacitometar Fuchs-Rosenthal, Fein-Optik Jena, Njemačka, s dubinom jažice 0,2 mm za određivanje gustoće stanica. Voda koja se koristila u eksperimentalnom radu je MiliQ ultračista voda dobivena pomoću Milipore MiliQ sustava za pročišćavanje vode, dok je salinitet određen pomoću refraktometra *Exttech RF20*, proizvođača Cole-Parmer, SAD. Za vizualizaciju su korišteni: epifluorescencijski mikroskop *Olympus BX51*, konfokalni laserski pretražni mikroskop *Leica SP8 X FLIM*, mikroskop atomskih sila *Multimode Scanning Probe Microscope s Nanoscope IIIa* kontrolnom jedinicom (Veeco Instruments, Santa Barbara, CA) korištenjem pretražnih proba od silicijevog nitrida, Si₃N₄ (DNP-10, Bruker).

3.4. Uzgoj, određivanje gustoće i izolacija stanica

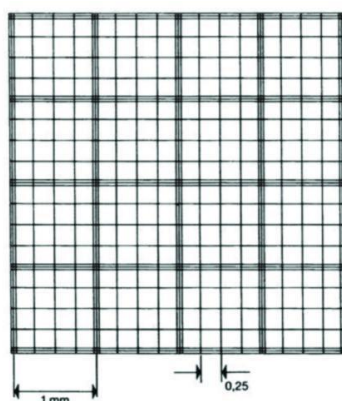
Monokulture stanica mikroalga uzgojene su u obogaćenom mediju f/2 pripremljenom prema recepturi po Guillardu³⁶ čiji su osnovni sastojci bili morska voda, hranjive soli, metali u tragovima i vitamini. Morska voda uzeta je dana 14.04.2021. u blizini otoka Visa (uvala Stončica), na dubini od 30 metara te je profiltrirana kroz membranski filter čija je veličina pora 0,20 µm. Morska voda saliniteta 27 ‰ i 38 ‰ pripremljena je razrjeđivanjem profiltrirane morske vode saliniteta 40 ‰ s ultračistom vodom. U volumen od 100 mL filtrirane morske vode saliniteta 27 ‰ i 38 ‰ dodano je 100 µL otopine NaNO₃ koncentracije 8,82 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ i 100 µL otopine metala prema sastavu u tablici D1. Otopina je sterilizirana u mikrovalnoj pećnici 3 minute te čuvana pod UV lampom 7 minuta. Nakon hlađenja medija do sobne temperature doda se 100 µL NaH₂PO₄ koncentracije 3,62 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ u 100 mL otopine, te volumen od 500 µL otopine vitamina (tablica D2) prethodno profiltrirane kroz akrodisk promjera pora 0,20 µm. U sterilnim uvjetima dodaje se alikvot stanica kako bi početna brojnost monokulture odgovarala približno 4 x 10⁴ stanica mL⁻¹. Tikvice su bile zatvorene sterilnim

vatenim čepovima kako ne bi došlo do kontaminacije. Uzorci su čuvani u komori za stanični uzgoj pri sobnoj temperaturi i ciklusu 12 sati sa i 12 sati bez osvjjetljenja. Intenzitet osvjjetljenja u komori iznosi $31 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (slika 7).



Slika 7. Komora za uzgoj stanica u Laboratoriju za biogeokemiju mora i atmosfere Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković.

Mikroskopski je praćena brojnost stanica mikroalga u monokulturi. U volumen od 1 mL medija dodano je $50 \mu\text{L}$ neutraliziranog 36% formaldehida (za neutralizaciju je korišten CaCO_3). Uzorak fiksiranih stanica volumena $350 \mu\text{L}$ stavi se u komoricu za brojanje (Fuchs-Rosenthalova komora, slika 8) i prekrije pokrovnim stakalcem.



Slika 8. Fuchs-Rosenthalova komora s označenim dimenzijama ćelija (preuzeto iz „*Electron microscopy sciences – catalog*“).

Komorica za brojanje stavi se pod optički mikroskop, te su prebroje stanice po određenim kvadratima pri povećanju od 200 puta. Prilikom brojanja uzete su u obzir i stanice koje se nalaze na graničnim linijama. Stanice su brojane metodom nasumično odabranih polja, te se broji nekoliko kvadrata kako bi se mogla odrediti srednja vrijednost broja stanica u uzorku. Iz dobivenih brojnosti stanica izračuna se broj stanica po mL prema Fuchs-Rosenthalovoj formuli (tablica 1) za hemocitometar. Brojnost stanica određena je svaka dva dana kako bi se pratila dinamika rasta.

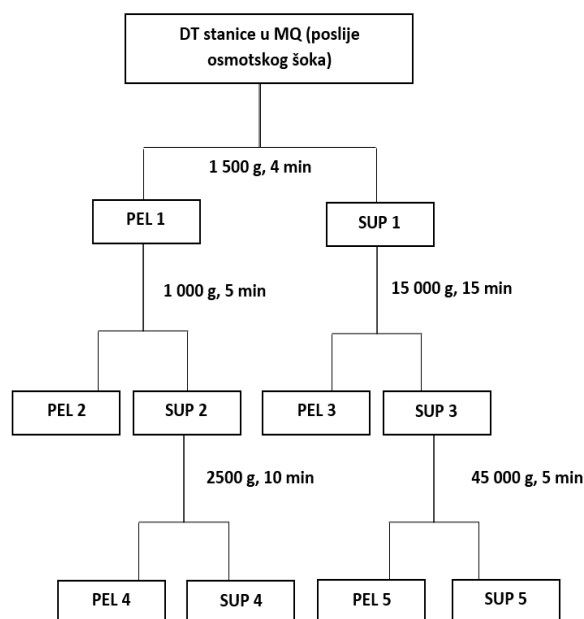
Tablica 1. Fuchs-Rosenthalove formule za izračunavanje abundancije stanica u otopini

Površina kvadrata	Izraz
0,25 mm x 0,25 mm	Broj stanica po mL = $\frac{\text{Ukupan broj stanica}}{\text{Ukupan broj kvadrata}} \times 160\,000$
1 mm x 1 mm	Broj stanica po mL = $\frac{\text{Ukupan broj stanica}}{\text{Ukupan broj kvadrata}} \times 10\,000$
4 mm x 4 mm	Broj stanica po mL = Ukupan broj stanica x 625

Stanice mikroalga izolirane su u stacionarnoj fazi rasta pri čemu su odvojene od hranjive podloge centrifugiranjem (1500 g, 4 min). Mikropipetom je pažljivo odvojen supernatant od stanica, koje su zatim isprane dva puta s filtriranom morskom vodom određenog saliniteta pa ponovno odvojene centrifugiranjem. Konačni volumen peleta stanica mikroalga kod određenog saliniteta korišten je za pripremu vezikula plazmatske membrane.

3.5. Priprema vezikula plazmatske membrane

Volumen od 50 mL vode dodaje se u pelet stanica mikroalga. Otopina se blago vorteksira i ostavi stajati pola sata na sobnoj temperaturi. Stanice pod osmotskim šokom puknu te nastaju vezikule plazmatske membrane u dezintegriranom materijalu. Dobivena smjesa se centrifugira (1500 g, 4 min), kako bi se odvojio dezintegrirani stanični materijal od vezikula plazmatskih membrana. Slika 9 prikazuje postupak pripreme vezikula plazmatske membrane.

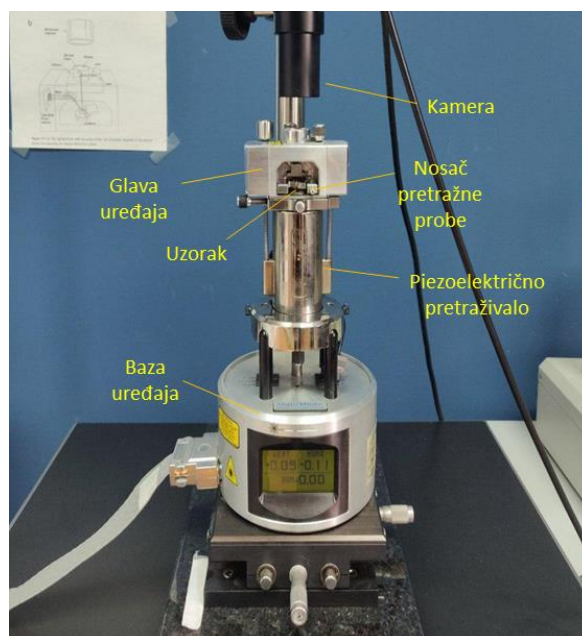


Slika 9. Shema postupka izolacije vezikula plazmatskih membrana (DT- *Dunaliella tertiolecta*, PEL-pelet, SUP-supernatant)

Postupak separacije vezikula provodi se pri različitim brzinama centrifugiranja. Uz pomoć optičkog mikroskopa vizualizirane su vezikule te je kontrolirana efikasnost odvajanja vezikula od zaostalog staničnog materijala. Dodavanjem fluorescentne boje DiI detektiran je lipofilni materijal. Volumen gustih vezikula vidljiv je kao sloj neposredno uz ili iznad peleta. Sloj je pažljivo odvojen i stabiliziran u puferskoj otopini 1 mol L⁻¹ Tris-HCl uz dodatak 1 mol L⁻¹ MgCl₂ pri čemu je njihova konačna koncentracija iznosila 10 mmol L⁻¹ u uzorku vezikula. Uzorak se čuva u frižideru na 4 °C te je bio stabilan oko dva tjedna.⁵

3.6. Priprema uzorka za karakterizaciju AFM-om i analiza podataka

Tinjac je pričvršćen na čeličnu pločicu promjera 30 mm pomoću dvostruko ljepljive trake te se kalao s ljepljivom trakom kako bi se otklonile nečistoće i dobila atomski glatka površina koja jednoliko reflektira svjetlost. Volumen uzorka od 5 μL nanesen je na podlogu tinjca, te su uzorci pripremljeni u triplikatima. Nakon sat vremena sušenja na sobnoj temperaturi u Petrijevoj zdjelici, uzorak je karakteriziran mikroskopom atomskih sila (slika 10).



Slika 10. Mikroskop atomskih sila s navedenim komponentama u Laboratoriju za biogeokemiju mora i atmosfere Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković

Pomoću kamere na mikroskopu određuje se područje za karakterizaciju. Mjerenja su provedena na zraku pri sobnoj temperaturi i vlažnosti od 40–50 %, kako bi se sačuvao hidratacijski sloj uz sami materijal što omogućava da se sačuva struktura organskog materijala. Karakterizacija je provedena u kontaktnom režimu rada s pretražnim probama izrađenim od silicijeva nitrida (Bruker, DNP-10 (D), nominalna frekvencija 18 kHz, nominalna konstanta opruge $0,06 \text{ N m}^{-1}$). Mjerenja su provedena uz pomoću piezoelektričnog pretraživala AS-130V (lateralni raspon $125 \mu\text{m} \times 125 \mu\text{m}$ te vertikalni raspon $5 \mu\text{m}$). Primijenjena sila je bila na minimalnoj vrijednosti da se uzorci ne oštete. Brzina skeniranja iznosi između 1–2 Hz po liniji.

Veličina skeniranog područja bila je od $500 \text{ nm} \times 500 \text{ nm}$ do $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$, a slike su snimane s najvećom rezolucijom 512×512 točaka po slici. Karakterizirano je 18 vezikula plazmatske membrane kod saliniteta 27 ‰ i 15 vezikula plazmatske membrane kod saliniteta 38 ‰.

Obrada i analiza slika izvršena je pomoću programskog paketa *NanoScope Analysis 1.9* (Bruker). Slike su obrađene dvodimenzijским poravnavanjem prvog reda kako bi se uklonio prividni nagib površine. Na topografskim slikama napravljena je analiza vertikalnih presjeka, te trodimenzionalni prikaz.

3.7. Priprema uzorka za karakterizaciju CLSM-om i analiza podataka

Predmetno stakalce za konfokalni mikroskop debljine $0,170 \pm 0,005$ mm očisti se uranjanjem u etanol tri puta, a zatim uranjanjem u vodu 10 puta. Stakalce se osuši u struji dušika. Na stakalce se stavi volumen od 50 μL 2% otopine polietilenimina za imobilizaciju materijala. Nakon 30 minuta višak otopine se ukloni s mikropipetom i ispere se mjesto na kojem se nalazi polietilenimin tri puta s 50 μL vodom. U uzorak vezikula plazmatskih membrana dodana je fluorescentna boja DiI u konačnoj koncentraciji 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ te se zatim stavi 20 μL uzorka na predmetno stakalce koje se čuva u zatvorenoj Petrijevoj zdjelici s navlaženom staničevinom, kako ne bi došlo do sušenja uzorka. Također paralelno je pripremljen i uzorak vezikula bez dodatka DiI. Nakon 30 minuta vezikule su imobilizirane na modificiranoj staklenoj površini te se doda odabrana fluorescentna boja kojom se testira propusnost membrane. Kalcein koncentracije 200 mmol L^{-1} dodaje se u suspenziju vezikula plazmatskih membrana u razrijeđenju 40 x dok se konkanavalin A-FITC koncentracije 1 g L^{-1} dodaje u volumnom omjeru 1:1 suspenziji vezikula plazmatskih membrana. Valne duljine pobude/emisije su iznosile: 650 nm/700–750 nm za klorofil, 552 nm/560–610 za DiI, 488 nm/500–540 nm za kalcein i konkanavalin A-FITC. Intenzitet fluorescencije unutar i izvan vezikule određen je pomoću programa *ImageJ*. To se postiže putem prebacivanja RGB formata snimljenih slika dobivenih iz konfokalnog laserskog pretražnog mikroskopa u crno-bijelu sliku (engl. *gray scale*) te se svakom pikselu pridodaje vrijednost intenziteta prema boji piksela.

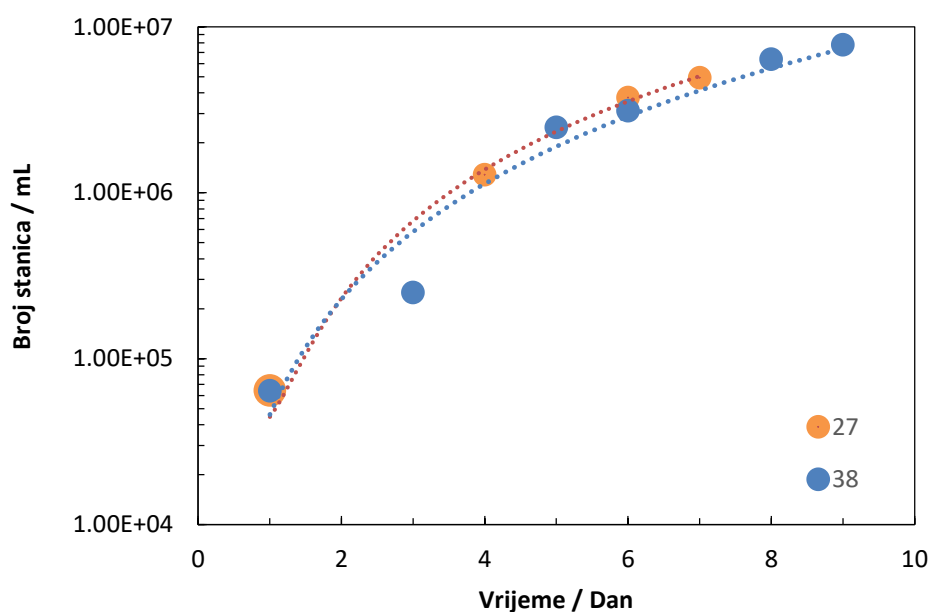


Slika 11. Konfokalni laserski pretražni mikroskop *Leica SP8 X FLIM* u Laboratoriju za biofiziku stanice Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković³⁷

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

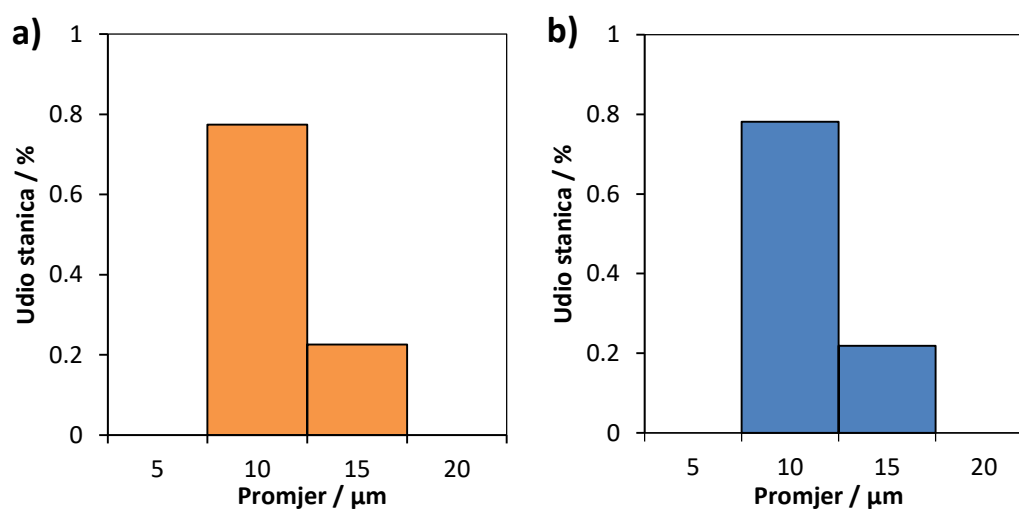
4.1. Rast stanica *D. tertiolecta* kod dvaju saliniteta hranjivoga medija

Rast stanica mikroalga *D. tertiolecta* praćen je u vremenu kod dvaju saliniteta hranjivoga medija (slika 12).



Slika 12. Krivulja rasta mikroalga *D. tertiolecta* u hranjivom mediju f/2 kod saliniteta 27 ‰ i 38 ‰

Krivulja rasta stanica sastoji se 1) lag faze 2) eksponencijalne faze 3) stacionarne faze 4) faze odumiranja. Lag faza odnosi se na vrijeme privikavanja stanica, eksponencijalna faza u kojoj je brzina rasta stanica najveća pri čemu više stanica raste nego umire te stacionarna faza u kojoj su rast stanica i odumiranje stanica jednaki. U fazi odumiranja brojnost stanica se smanjuje. Stanice *D. tertiolecta* uzgajane su od 7 - 9 dana, do točke u kojoj se brojnost ne mijenja značajno što znači da su stanice u stacionarnoj fazi. Stanice su rasle kod oba saliniteta hranjivog medija bez značajnih razlika. U stacionarnoj fazi rasta određena je dimenzija za 30 stanica. Raspodjelu veličina stanica u stacionarnoj fazi rasta kod dva saliniteta prikazuje slika 13.

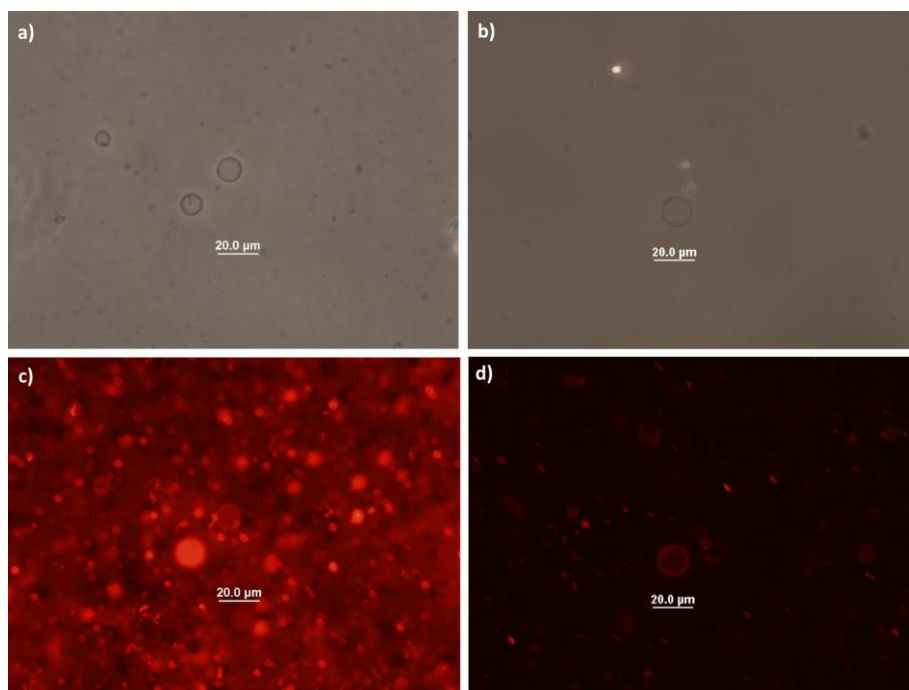


Slika 13. Raspodjela veličina stanica mikroalga *D. tertiolecta* kod saliniteta
a) 27 ‰ i b) 38 ‰

Stanice su bile u rasponu veličina od 6-12 μm kod oba saliniteta što se može pripisati povoljnijim uvjetima rasta.

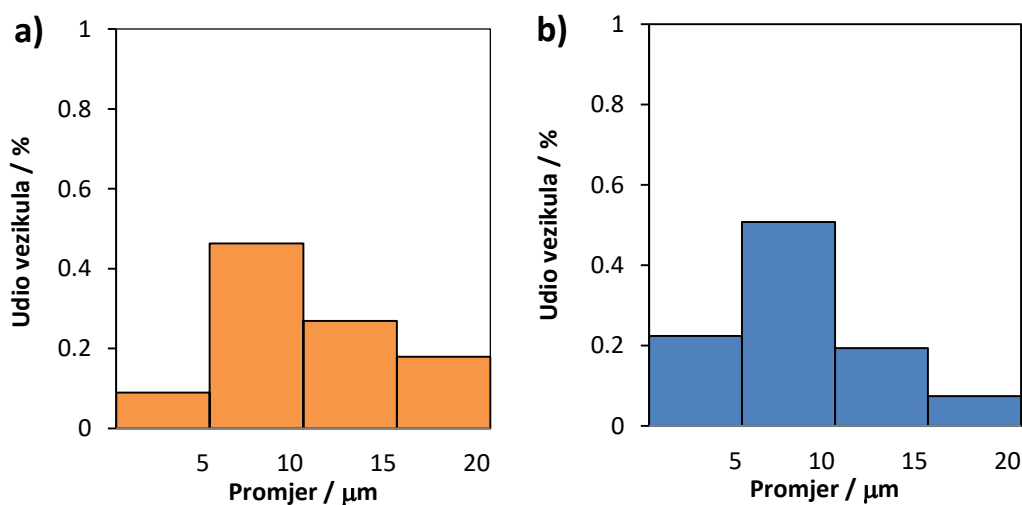
4.2. Karakterizacija vezikula optičkom mikroskopijom

Vezikule plazmatske membrane priređene su osmotskim šokom stanica mikroalga u stacionarnoj fazi rasta prema postupku opisanom u poglavlju 3.5. Slika 14 prikazuje vezikule plazmatske membrane kod oba saliniteta prije i nakon dodatka lipofilne fluorescentne boje DiI.



Slika 14. Optička i fluorescencijska mikrografija vezikula plazmatske membrane kod saliniteta a) 27 ‰ i b) 38 ‰ prije (a, b) i nakon dodatka fluorescentne boje DiI (c, d)

Vezikule se pojavljuju kao pojedinačne, sfernog oblika i mikrometarskih veličina. Molekularnim bojanjem uzoraka s DiI vidljivo je da su multilamelarne vezikule deblje te da postoji dosta zaostalog dispergiranog staničnog materijala u uzorku. Slika 15 prikazuje raspodjelu veličina vezikula plazmatske membrane kod saliniteta 27 ‰ i 38 ‰ na temelju analize promjera 30 vezikula.



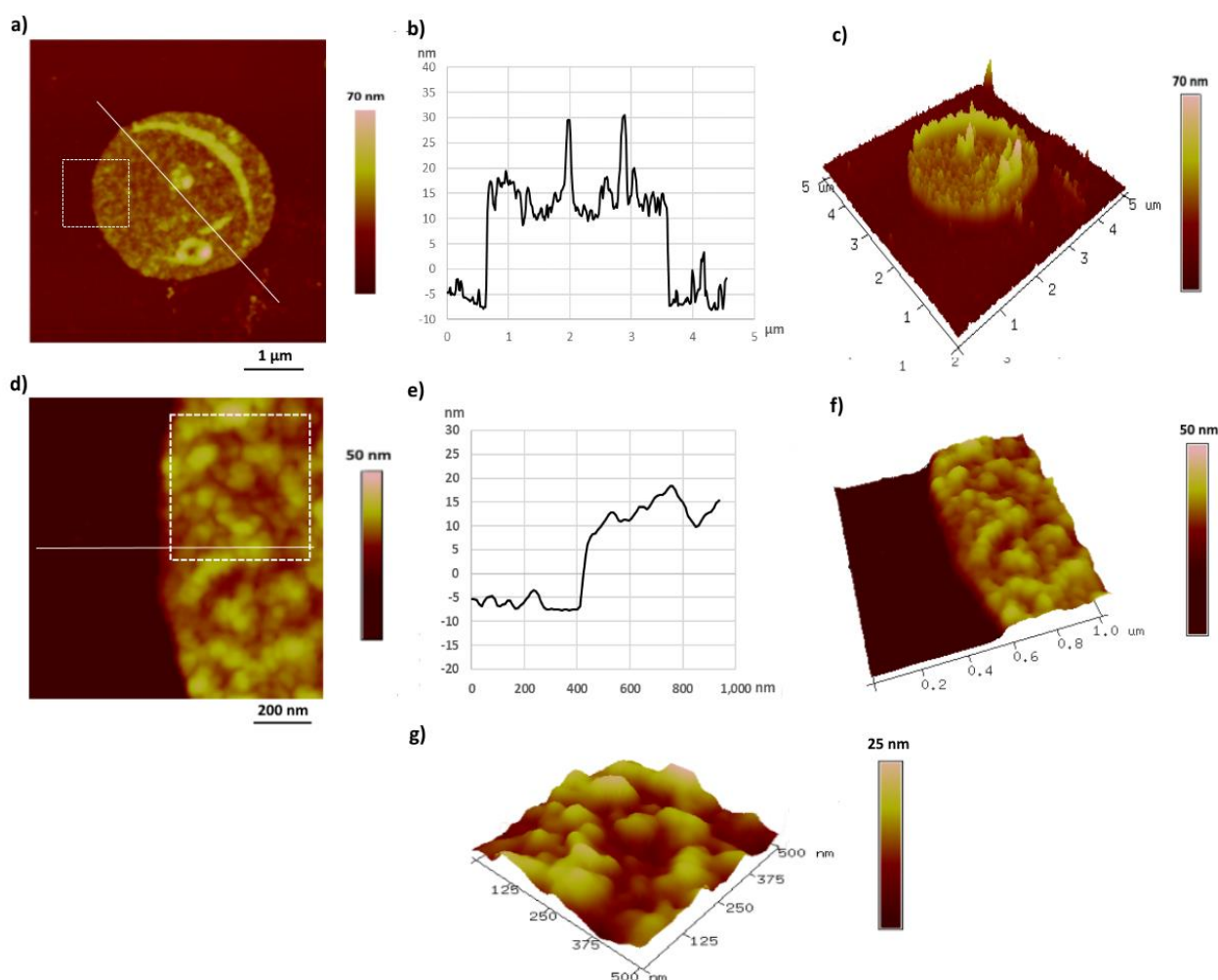
Slika 15. Raspodjela veličina vezikula plazmatskih membrana kod saliniteta

a) 27 ‰ i b) 38 ‰

Pripremljene vezikule promjera su do 20 μm , dok je najbrojnija populacija vezikula u oba uzorka bila u rasponu veličine od 5 - 10 μm . Vezikula u rasponu veličine 15-20 μm ima više kod saliniteta 27 ‰ u odnosu na salinitet 38 ‰.

4.3. Karakterizacija vezikula plazmatske membrane AFM-om

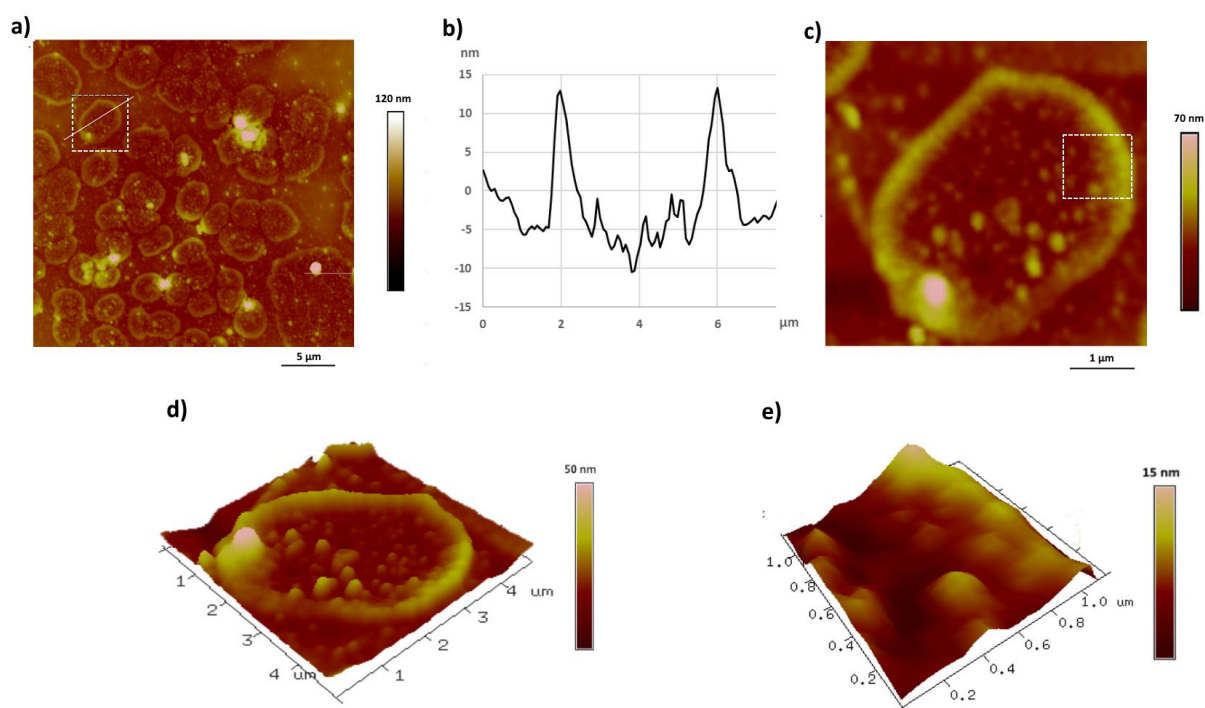
Kamerom je odabrano područje na površini tinjca za oslikavanje AFM-om kako bi se dobio uvid u morfološku strukturu vezikula plazmatske membrane na nanometarskoj skali. Slika 16 prikazuje topografski prikaz vezikula plazmatske membrane s pripadajućim vertikalnim presjekom te trodimenzionalnim prikazom odabrane vezikule i njezine membrane.



Slika 16. a) Topografski prikaz vezikule plazmatske membrane kod saliniteta 27 ‰ (veličina područja 5 x 5 μm), b) vertikalni presjek vezikule plazmatske membrane duž linije na a), c) trodimenzionalni prikaz vezikule plazmatske membrane (veličina područja 5 x 5 μm), d)

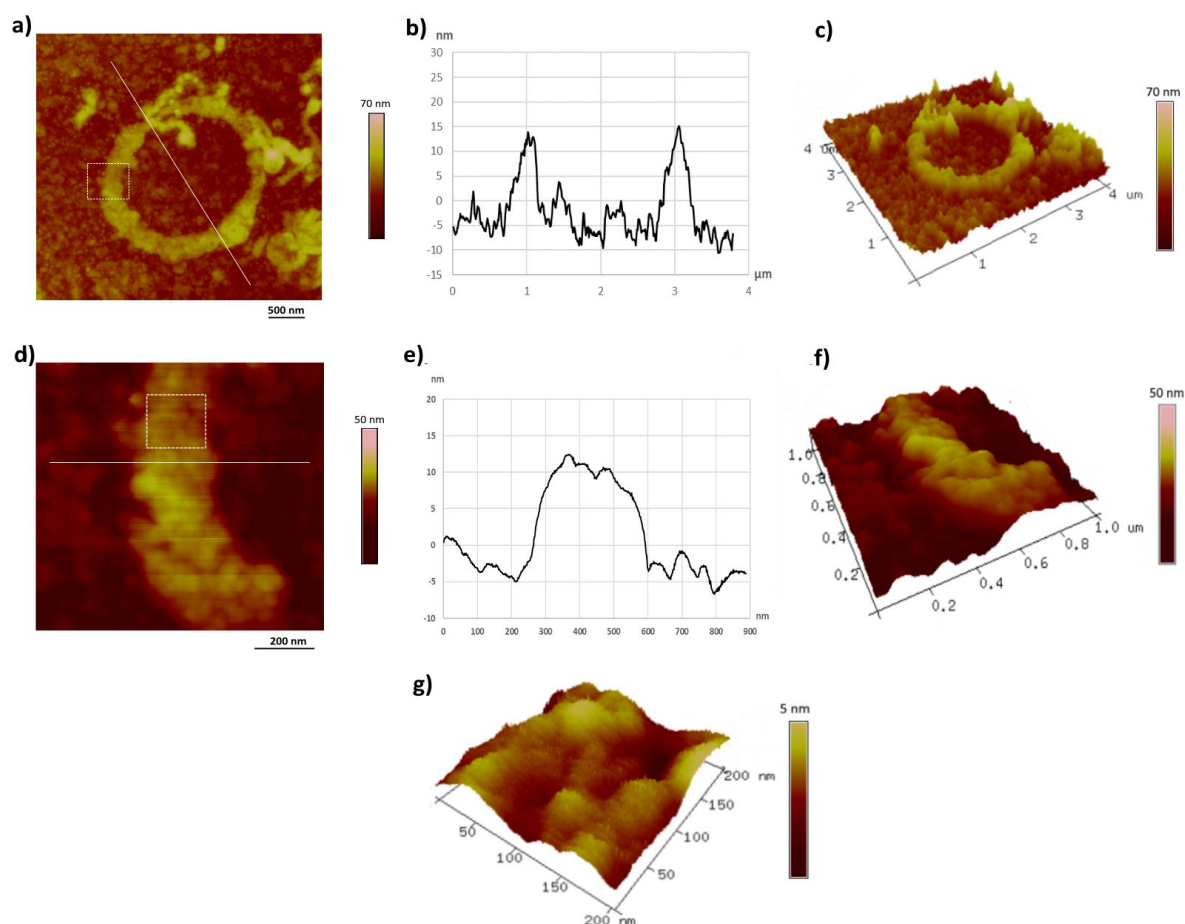
topografski prikaz membrane u okviru kvadrata na a) (veličina područja $1 \times 1 \mu\text{m}$), e) vertikalni presjek membrane duž linije na slici d), f) trodimenzionalni prikaz membrane (veličina područja $1 \times 1 \mu\text{m}$) pod e), g) globularne strukture na površini membrane u okviru kvadrata na d) (veličina područja $500 \times 500 \text{ nm}$)

Vezikula plazmatske membrane sadrži stanični materijal i čestice unutar vezikule kao na membrani. Vezikula je sfernog oblika i dijametra od $2,9 \mu\text{m}$. Visina vezikule je 20 nm gotovo po cijeloj površini što ukazuje da nije prazna, a prisutno je i nekoliko čestica visine oko 15 nm na njoj. Sama vezikula se sastoji od dva sloja, te je debljina membrane oko 10 nm . Na površini su oslikane globularne strukture a između njih su zamjetne dubine što sugerira postojanje nanopora na rekonstruiranoj vezikuli. Slika 17 prikazuje topografski prikaz vezikula plazmatske membrane s pripadajućim vertikalnim presjekom te trodimenzionalnim prikazom odabrane vezikule.



Slika 17. a) Topografski prikaz vezikula plazmatske membrane kod saliniteta 38 ‰ (veličina područja $30 \times 30 \mu\text{m}$), b) vertikalni presjek vezikule plazmatske membrane duž linije na a), c) trodimenzionalni prikaz vezikule plazmatske membrane (veličina područja $30 \times 30 \mu\text{m}$), d) trodimenzionalni prikaz vezikule plazmatske membrane (veličina područja $5 \times 5 \mu\text{m}$) pod c), e) globularne strukture vezikule plazmatske membrane u okviru kvadrata na c) (veličina područja $1 \times 1 \mu\text{m}$)

Na slici 17 prikazana je gusta populacija gotovo praznih vezikula, nepravilnog sfernog oblika, različitih mikrometarskih veličina na površini tinjca. Nepravilni sferni oblik vezikule na površini tinjca posljedica je adhezije i sušenja mekanog, fluidnog membranskog materijala, te mjerenja na zraku. Vertikalnim presjekom odabrane vezikule određena je debljina membrane od oko 10 nm, te je promjer vezikule iznosio oko 4,2 μm . Unutrašnjost vezikule je gotovo prazna uz nekoliko čestica koje se vide na trodimenzionalnom prikazu (slika 16d). Na površini membrane vizualizirane su sferne globularne strukture, između kojih su šupljine nanometarske veličine. Vezikule izolirane kod saliniteta 38 ‰, nisu se po morfologiji značajno razlikovale od vezikula nastalih kod saliniteta od 27 ‰. Na slici 18 prikazana je prazna vezikula plazmatske membrane izolirana kod saliniteta 38 ‰.

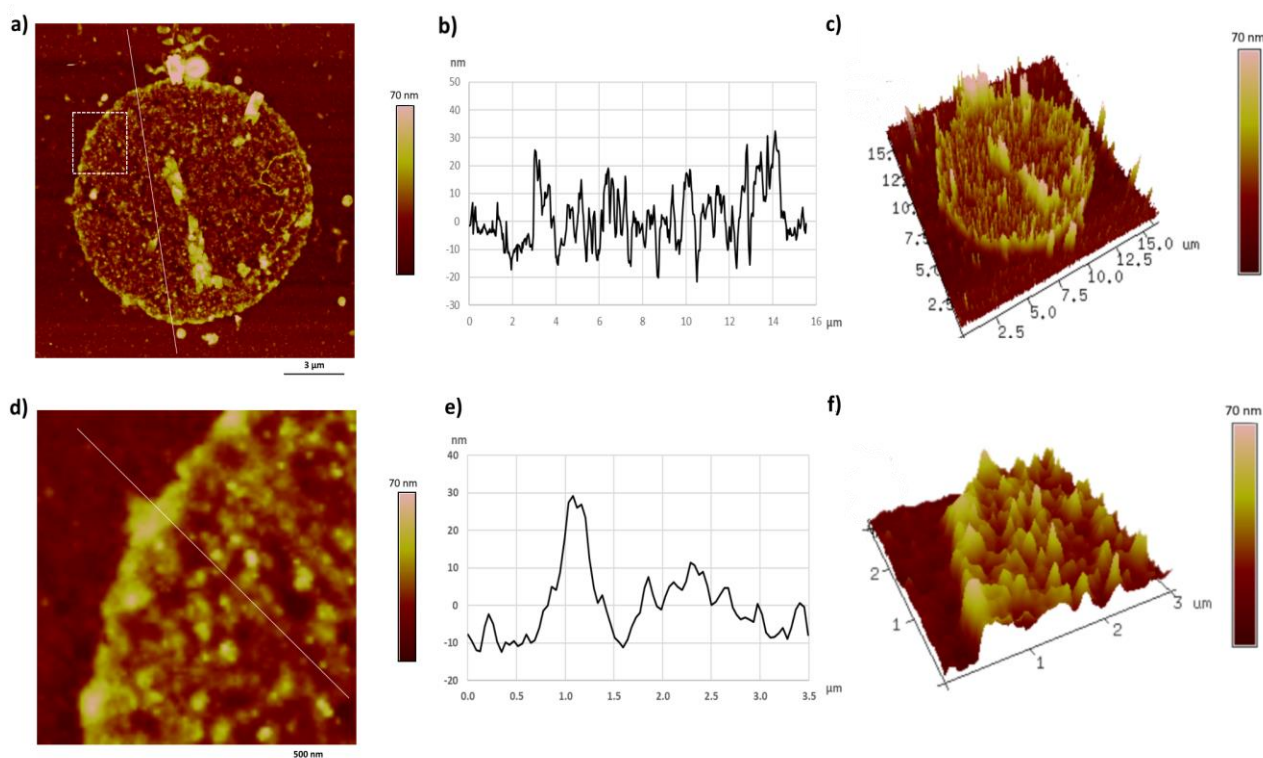


Slika 18. a) Topografski prikaz vezikule plazmatske membrane kod saliniteta 38 ‰ (veličina područja 4 x 4 μm), b) vertikalni presjek vezikule plazmatske membrane duž linije na a), c) trodimenzionalni prikaz vezikule plazmatske membrane (veličina područja 4 x 4 μm), d)

topografski prikaz membrane u okviru kvadrata na a) (veličina područja 1 x 1 μm), e) vertikalni presjek vezikule plazmatske membrane duž linije na slici d), f) trodimenzionalni prikazi plazmatske membrane (veličina područja 1 x 1 μm), te g) veličina područja 200 x 200 nm u okviru kvadrata pod d)

Vezikula je sfernog oblika, promjera oko 2,0 μm . Debljina membrane je 12-15 nm dok je u sredini vezikula gotovo potpuno prazna s obzirom na visinu površine samog tinjca. Uvećanjem membrane vidljiva je heterogena distribucija površinskih globularnih struktura što može odgovarati površinskim proteinima različitih funkcija karakterističnih za alge.^{4,5,38,39}

Globularne strukture su visine od 5 - 10 nm. Između globularnih struktura postoje nejednoliko raspoređene šupljine nanometarske veličine što ukazuje na postojanje pora koje su odgovorne za propusnost rekonstruirane membrane. Vezikula na slici 19 je poluprazna zbog čestica unutar vezikule.



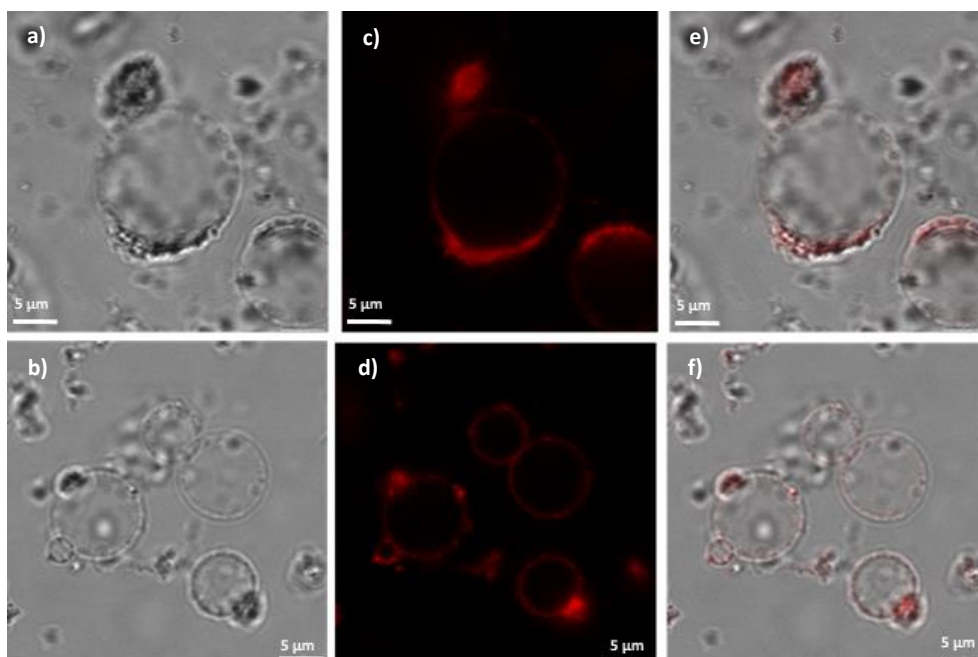
Slika 19. a) Topografski prikaz vezikule plazmatske membrane kod saliniteta 38 ‰ (veličina područja 16 x 16 μm), b) vertikalni presjek vezikule plazmatske membrane duž linije na a), c) trodimenzionalni prikaz vezikule plazmatske membrane (veličina područja 16 x 16 μm) d)

topografski prikaz membrane u okviru kvadrata pod a) (veličina područja 3 x 3 μm), e) vertikalni presjek vezikule plazmatske membrane duž linije na slici d), f) trodimenzionalni prikaz plazmatske membrane (veličina područja 3 x 3 μm) pod d)

Vezikula sadržava čestice 5-10 nm visine koje su heterogeno raspoređene unutar vezikule. Vezikula je sfernog oblika, promjera oko 12 μm , dok je ukupna visina vezikule oko 20 nm što odgovara debljini dvije membrane.

4.4. Karakterizacija vezikula plazmatske membrane CLSM-om

Slika 20 prikazuje tipične konfokalne slike intaktnih, imobiliziranih vezikula plazmatske membrane, pri čemu je detektirana autofluorescencija pri valnoj duljini fluorescencije klorofila.



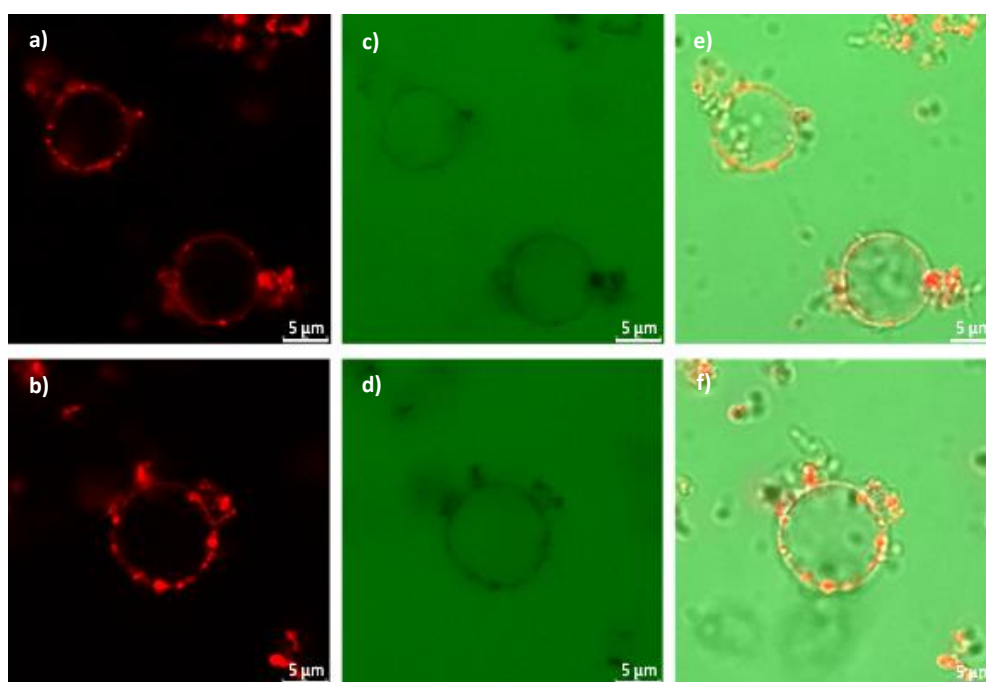
Slika 20. Reprezentativne konfokalne slike vezikula plazmatskih membrana kod saliniteta 27 ‰ i 38 ‰ snimljenih u modu (a, b) transmisije, (c, d) fluorescencije te (e, f) preklopljeni prikaz

Pigment klorofila vjerojatno je ugrađen u vezikulu plazmatske membrane tijekom osmotskog šoka i rekonstrukcije tilakoidnih membrana stanica *D. tertiolecta* koje sadrže klorofil. Vezikule su sfernog oblika s nešto čestica na samoj membrani, mikrometarskih veličina, te se mogu

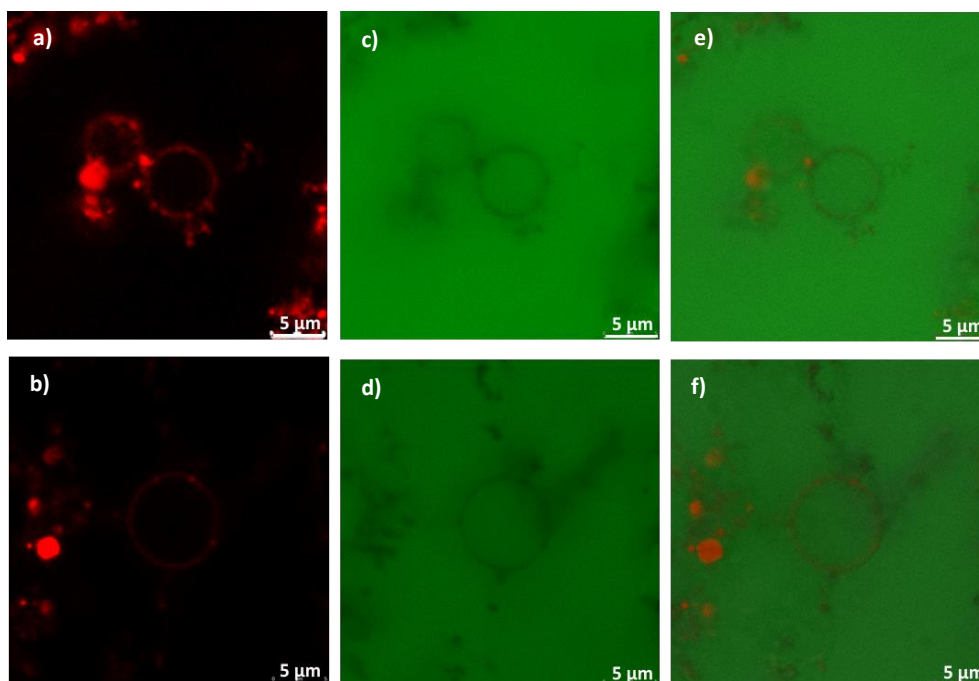
smatrati gotovo praznima. Nema fluorescencije unutar vezikula u odnosu na autofluorescenciju koja je uočena kod cjelokupne stanice *D. tertiolecta* (slika 6b).

4.4.1. Propusnost vezikula plazmatske membrane kalceinom

Konfokalne slike snimljene prije i nakon dodatka fluorescentne boje kalcein u suspenziju vezikula plazmatske membrane kod saliniteta 27 ‰ i 38 ‰ prikazane su na slikama 21 i 22.



Slika 21. Reprezentativne konfokalne slike imobiliziranih vezikula plazmatskih membrana kod saliniteta 27 ‰, nakon dodatka fluorescentne boje (a, b) DiI te (c, d) kalceina. Slike su snimljene u fluorescentnom modu zasebno za DiI i kalcein. Slike (e, f) su preklopljeni prikazi za obje boje



Slika 22. Reprezentativne konfokalne slike imobiliziranih vezikula plazmatskih membrana kod saliniteta 38 ‰ nakon dodatka fluorescentne boje (a, b) DiI te (c, d) kalceina. Slike su snimljene u fluorescentnom modu zasebno za DiI i kalcein. Slike (e, f) su preklopljeni prikazi za obje boje

Dodatkom fluorescentne boje DiI, vezikule plazmatske membrane su identificirane zbog interakcije boje s lipofilnim dijelovima membrane. Dodatkom kalceina neposredno prije samog mjerenja, intenzitet fluorescencije se vrlo brzo mijenja i postaje gotovo jednak unutar i izvan vezikule kod oba saliniteta, što kvalitativno ukazuje da je membrana propusna za kalcein. Postojanje zaostalog staničnog materijala oko ili u sloju ispod vezikula stvara zasjenjenja koja nisu uzeta u obzir.

Intenzitet fluorescencije kvantificiran je pomoću programa *ImageJ*. Analizirana je fluorescencija na 10 konfokalnih slika za svaki salinitet. U tablici 2 uspoređene su srednje vrijednosti fluorescencije s kalceinom unutar i izvan vezikule kod dvaju saliniteta.

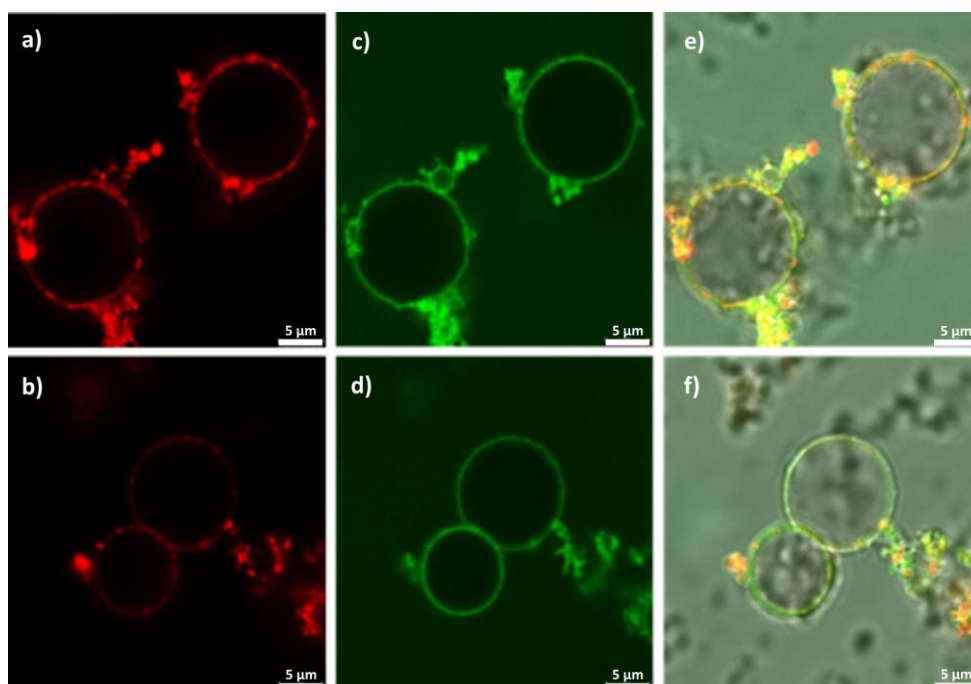
Tablica 2. Srednje vrijednosti intenziteta fluorescencije s kalceinom određene unutar i izvan vezikule plazmatske membrane kod dvaju saliniteta.

Salinitet/ ‰	Srednja vrijednost intenziteta fluorescencije	
	Unutar vezikule	Izvan vezikule
27	33,5	37,9
38	43,0	48,9

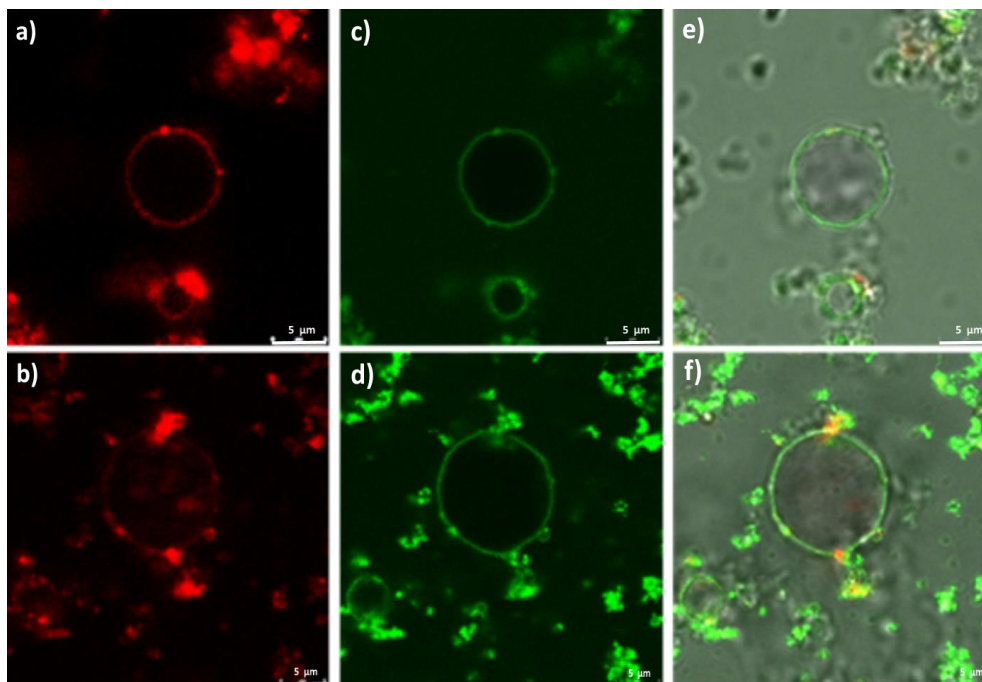
Rezultati pokazuju da nema veće razlike u intenzitetu fluorescencije s kalceinom unutar i izvan vezikule plazmatske membrane. Dakle, vezikula plazmatske membrane je propusna za kalcein i ponaša se slično kod oba saliniteta što ukazuje na postojanje pora. Za analizu fluorescencije nisu uzete u obzir vezikule koje su bile u kontaktu ili blizini staničnog materijala, jer on uzrokuje smanjenje fluorescencije.

4.4.2. Propusnost vezikula plazmatske membrane konkanavalin A-FITC-om

Konfokalne slike snimljene prije i nakon dodatka konkanavalin A-FITC-a u suspenziju vezikula plazmatske membrane kod saliniteta 27 ‰ i 38 ‰ prikazane su na slikama 23 i 24.



Slika 23. Reprezentativne konfokalne slike imobiliziranih vezikula plazmatskih membrana kod saliniteta 27 % nakon dodatka fluorescentne boje (a, b) DiI te (c, d) kalceina. Slike su snimljene u fluorescentnom modu zasebno za DiI i kalcein. Slike (e, f) su preklopljeni prikazi za obje boje



Slika 24. Reprezentativne konfokalne slike imobiliziranih vezikula plazmatskih membrana kod saliniteta 38 % nakon dodatka fluorescentne boje (a, b) DiI te (c, d) kalceina. Slike su snimljene u fluorescentnom modu zasebno za DiI i kalcein. Slike (e, f) su preklopljeni prikazi za obje boje

Membrana je obilježena s lipofilnom bojom DiI te je vidljivo da su vezikule gotovo prazne. Nakon dodatka fluorescentne boje konkanavalin A-FITC neposredno prije samog mjerenja, membrana postaje obilježena intenzivno zeleno u odnosu na otopinu i unutrašnjost vezikule. Uspoređujući unutrašnjost vezikule na preklopljenim slikama 20 e, f (prije dodatka boje) i 24 e, f (nakon dodatka boje), kvalitativno ukazuje da je membrana polupropusna za konkanavalin A-FITC. Stanični materijal i vezikule vezale su konkanavalin A-FITC zbog svojstva konkanavalina A da se veže za manozne i glukozne jedinice.

Pomoću programa *ImageJ* kvantificiran je intenzitet fluorescencije na 10 konfokalnih slika za salinitet 27 % i 38 %. Za analizu fluorescencije nisu uzete u obzir vezikule koje su bile u kontaktu ili blizini staničnog materijala, jer uzrokuje smanjenje fluorescencije. Srednje

vrijednosti fluorescencije s konkanavalin A-FITC unutar i izvan vezikule plazmatskih membrana kod dvaju saliniteta prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Srednje vrijednosti intenziteta fluorescencije određenih unutar i izvan vezikule plazmatske membrane u prisutnosti konkanavalin A-FITC kod dvaju saliniteta.

Salinitet / ‰	Srednja vrijednost intenziteta fluorescencije	
	Unutar vezikule	Izvan vezikule
27	7,6	12,0
38	6,4	9,3

Rezultati pokazuju da postoji razlika u intenzitetu fluorescencije s konkanavalin A-FITC unutar i izvan vezikule plazmatske membrane. Dakle, vezikula plazmatske membrane je polupropusna za konkanavalin A-FITC i ponaša se slično kod dvaju saliniteta.

4.5. Od stanica do vezikula te usporedba s ostalim nosačima aktivnih komponenti

Stanice *D. tertiolecta* kao halotolerantne, dobro rastu u širokom rasponu saliniteta gdje se putem osmoregulacije prilagođavaju na promjene u koncentraciji soli u mediju mijenjanjem unutarstanične koncentracije glicerola.⁴⁰ Glicerol je glavni osmolit s kojim se stanica prilagođava na osmotski stres, te njegova unutarstanična koncentracija raste kad je stanica izložena mediju s visokom koncentracijom soli.^{41,42} S druge strane, kada je stanica izložena mediju s niskom koncentracijom soli, dolazi do otpuštanja glicerola kroz propusnu staničnu membranu.

Plazma membrana stanice *Dunalielle* predstavlja biopovršinu preko koje se odvijaju kompleksni membranski procesi (transport, adhezija, fuzija). Za fundamentalno razumijevanje površinskih procesa od važnosti je poznavanje površinskih svojstva stanica. Površinska svojstva stanice ovise o fazi rasta. Stanice *Dunalielle* u eksponencijalnoj fazi rasta su tvrđe i

hidrofobnije dok su u stacionarnoj fazi mekše i hidrofilnije što ukazuje na molekularnu modifikaciju stanične barijere tokom procesa starenja.⁶ Nadalje, površinska svojstva stanice ovise i uvjetima rasta npr. temperaturi i salinitetu gdje dolazi do mjerljive kemijske promjene na molekularnom nivou u sastavu lipida, koja za posljedicu ima promjenu mehaničkih svojstava.⁷ Stanice *Dunaliella* kod saliniteta 38 ‰ su mekše i hidrofilnije u odnosu na salinitet od 27 ‰ kada postaju tvrđe i hidrofobnije, te imaju veću koncentraciju sterola.⁸ Preliminarna mjerenja ukazuju da stanice *Dunaliella* kod odabranih saliniteta imaju od staničnih lipida dominantne glikolipide (43–46 %), zatim fosfolipide (19–21 %), najmanje imaju sterola (1,4%), a ostatak čine lipidi kao produkti degradacije.

Strukturne karakteristike stanične barijere predstavljaju važan kriterij za odabir mikroalga za pripremu vezikula. Stanice *D. tertiolecte* su izrazito mekane (nekoliko kPa) te imaju poznata površinska svojstva kod odabranih saliniteta 27 ‰ i 38 ‰. Izlaganjem izoliranih mekih stanica osmotskom šoku prilikom kontakta s vodom dolazi do promjene volumena stanice, promjene površinske napetosti na membrani, stvaraju se pore koje postaju sve veće, te kod kritične koncentracije pora stanica puca i oslobađa unutarstanični materijal⁴ dok se ostatak membrane zbog hidrofobnosti samoorganizira u vezikulu koja u unutrašnjosti sadrži vodenu otopinu pufera.

Primjenom metoda oslikavanja u ovom radu istražene su morfološke karakteristike vezikula plazmatskih membrana kod saliniteta 27 ‰ i 38 ‰. Rekonstruirane vezikule plazma membrane većinom su sfernog oblika, mikrometarske veličine te mogu biti prazne, poluprazne i pune. Rezultati su pokazali da membrane mogu biti do 20 nm visine (preklapanjem dvije membrane) što je u skladu s debljinom pojedinačne stanične membrane od 9 nm koja je određena elektronskim mikroskopom.⁴³ Oslikavanjem membrane na nanometarskoj skali vizualizirane su površinske globularne strukture 5-10 nm visine što bi moglo odgovarati glikoproteinima različitih funkcija^{38,39} između kojih se nalaze šupljine nalik nanoporama koje su od važnosti za propusnost membrane.^{4,5}

Rezultati pokazuju da vezikule plazma membrane imaju svojstvo autofluorescencije. U nedavnim istraživanjima potvrđeno je da se valna duljina signala emisije snimljene u uzorku vezikula i stanica *Dunaliella* poklapa s valnom duljinom emisije pigmenta klorofila, što potvrđuje da je autofluorescencija vezana za klorofil koji se tijekom rekonstrukcije ugradio u membranu.⁵

Nadalje, konfokalnom mikroskopijom ispitana je propusnost membrane uz pomoć dvije odabrane fluorescentne boje različitih veličina: kalcein (promjer 1,3 nm, 622 Da)⁴⁴, te konkanavalin A-FITC (tetramer pri pH 7,5 dimenzija: 6 nm x 4,5 nm x 7,5 nm, 100 kDa).⁴⁵ Vezikule plazmatske membrane bile su propusne za male molekule kalceina koji su hidrofilne i ne reagiraju s membranom. Vezikule plazmatske membrane bile su polupropusne za konkanavalin A-FITC koji je veći od kalceina pri čemu je identificirana specifična interakcija konkanavalin A-FITC s površinskim α -D-gluko- ili α -D-manoznim- skupinama. Stoga propusnost ovisi o fizičko-kemijskim svojstvima molekularne boje.

Za razliku od morskih vezikula plazmatske membrane, kao tradicionalni nosači aktivnih komponenti najviše su korištene lipidne vezikule (liposomi). Lipidne vezikule mogu biti mikrometarske ili nanometarske veličine i građene od prirodnih ili sintetskih amfifilnih molekula koje se organiziraju u vodenom mediju. Ovisno o sastavu fosfolipida, hidrofobna ili hidrofilna aktivna komponenta može se ugraditi unutar membrane, adsorbirati na površinu, usidriti u području polarnih glava ili biti zarobljena u vodenom mediju unutar vezikule. Lipidne vezikule mogu biti jednoslojne i višeslojne ovisno o samoj metodi pripreme (metoda tankog filma, brza evaporacijska metoda⁴⁶, elektroformacija⁴⁷). Lipidne vezikule proizvedene iz DOPC (1,2-Dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfokolin) imaju oko 2 reda veću čvrstoću od plazma membranskih vezikula, te stoga ne dolazi do spontane propusnosti malih molekula kalceina kroz lipidnu membranu.⁵ Također, rigidnost DOPC vezikula utječe na sporiju kinetiku procesa adhezije na modelnoj međupovršini u odnosu na adheziju mekših vezikula plazmatskih membrana.⁴ Membrane DOPC vezikula postaju propusne tek kod primjene jakog električnog stresa pri čemu nastaju pore te dolazi do difuzije boje unutar vezikule. Kao posljedica električnog stresa dolazi do smanjenja veličine lipidnih vezikula.^{5,48,49} Niti fosfolipidne membrane s usidrenim i ugrađenim komponentama ne postižu složenost i svojstva prirodnih staničnih membrana. S druge strane, egzosomi (ekstracelularne vezikule) su sustavi veće složenosti. Egzozomi nastaju unutar stanice te se egzocitozom oslobađaju u medij i mogu služiti za imunski odgovor te za staničnu signalizaciju.^{50,51} Poteškoća u njihovoj detekciji standardnim analitičkim tehnikama predstavlja veličinska frakcija do 100 nm. Metoda izolacije egzosoma nije rutinski prihvaćena. Dodatno mehanizam nastanka egzosoma nije u potpunosti jasan.

Mogućnosti za iskorištavanje morskih bioinspiriranih vezikula plazma membrana nisu istražene, no zbog predominantnog udjela proteina²² mogle bi poslužiti za potrebe marikulture,

te kao proteinski dodaci prehrani specifičnog sastava. Rekonstruirane vezikule će imati specifičan sastav i svojstva originalnog staničnog materijala koje je rastao u specifičnim uvjetima gdje se kroz adaptacijski odgovor stanica mijenja kemijski i mehanički. Preliminarni rezultati ukazuju da sastav staničnih lipida plazma membranskih vezikula kod oba saliniteta odgovara sastavu staničnih lipida *Dunaliella*. Prednosti sustava dostave baziranog na mikroalgama u usporedbi s laboratorijski sintetiziranim sustavima za dostavu temelje se na održivosti, ekološki prihvatljivom postupku pripreme i vjerojatno nižoj cijeni.

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu pripravljene su i karakterizirane vezikule plazmatske membrane te je ispitana ugradnja odabranih fluorescentnih boja. Kao modelni organizam korištena je jednostanična mikroalga bez stanične stijenke *D. tertiolecta*. Mikroalge su uzgajane kod dvaju saliniteta kako bi stanica adaptacijskim odgovorom na nove uvjete rasta promijenila površinska svojstva. Osmotskim šokom izoliranih stanica mikroalga pripravljene su vezikule plazmatske membrane. Vezikule su karakterizirane metodama oslikavanja pomoću epifluorescencijske mikroskopije, konfokalne mikroskopije i mikroskopije atomskih sila. Priređene vezikule bile su pojedinačne, u veličinskoj frakciji do 20 μm , uglavnom sferičnog oblika te su prevladavale prazne, poluprazne s nešto staničnog materijala ili pune. Intaktne vezikule pokazale su svojstvo autofluorescencije uslijed prisutnosti klorofila koji je ugrađen tijekom rekonstrukcije tilakoidalne membrane. Oslikavanjem na nanometarskoj skali dobiven je uvid u strukturnu organizaciju membrane, visina membrane iznosila je do 20 nm, oslikane su površinske globularne strukture koje mogu upućivati na glikoproteine između kojih su nanometarske pore. Rezultati su pokazali da propusnost membrane ovisi o strukturnim značajkama membrane i fizičko-kemijskim svojstvima molekularne boje. Vezikule plazma membrane su propusne za male hidrofilne molekule kalceina, dok su polupropusne za veće molekule konkanavalin A-FITC uz specifičnu interakciju s glukozil i manozil površinskim skupinama na membrani. Rezultati nisu pokazali značajnu razliku između vezikula plazma membrana kod dva saliniteta u smislu morfologije i propusnosti. Ova istraživanja mogu doprinijeti daljnjem razvoju vezikula na bazi mikroalga kao morskog bioinspiriranog sustava za dostavu aktivnih komponenti.

§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. M. Aziz, I. N. Zaini, *Energy Procedia* **142** (2017) 210–215.
2. A. Rotter, M. Barbier, F. Bertoni, A. M. Bones, M. Leonor Cancela, J. Carlsson, M. F. Carvalho, M. Cegłowska, J. Chirivella-Martorell, M. Conk Dalay, M. Cueto, T. Dailianis, I. Dezin, A. R. Diaz-Marrero, D. Drakulović, A. Dubnika, C. Edwards., H. Einarsson, A. Erdoğan, O. T. Eroldoğan, D. Ezra, S. Fazi, R. J. FitzGerald, L. M. Gargan, S. P. Gaudêncio, M. Gligora Udovič, N. Ivošević DeNardis, R. Jónsdóttir, M. Kataržytė, K. Klun, J. Kotta, L. Ktari, Z. Ljubešić, L. Lukić Bilela, M. Mandalakis, A. Massa-Gallucci, I. Matijošytė, H. Mazur-Marzec, M. Mehiri, S. Laurentius Nielsen, L. Novoveská, D. Overlingè, Giuseppe Perale, P. Ramasamy, C. Rebours, T. Reinsch, F. Reyes, B. Rinkevich, J. Robbens, E. Röttinger, V. Rudovica, J. Sabotič, I. Safarik, S. Talve, D. Tasdemir, X. Theodotou Schneider, O. P. Thomas, A. Toruńska-Sitarz, G. Cristina Varese, M. I. Vasquez, *Front. Mar. Sci.* **8** (2021) 629629.
3. P. Sharma, N. Sharma, *J. Adv. Plant. Biol.* **1** (2017) 1-26.
4. N. Ivošević DeNardis, J. Pečar Ilić, I. Ružić, G. Pletikapić, *Electrochim. acta* **176** (2015) 743–754.
5. N. Ivošević DeNardis, G. Pletikapić, R. Frkanec, L. Horvat, P. T. Vernier, *Bioelectrochemistry* **134** (2020) 105724.
6. F. Pillet, E. Dague, J. Pečar Ilić, Ivica Ružić, M.-P. Rols, N. Ivošević DeNardis *Bioelectrochemistry* **127** (2019) 154–162.
7. N. Novosel, N. Ivošević DeNardis, *Electroanalysis* **33** (2021) 1436–1443.
8. N. Novosel, T. Mišić Radić, J. Zemła, M. Lekka, A. Čačković, D. Kasum, T. Legović, P. Žutinić, M. Gligora Udovič, N. Ivošević DeNardis, *J. Appl. Phycol.* **34** (2022) 1–17.
9. T. Mišić Radić, A. Čačković, A. Penezic, J. Dautović, J. Lončar, J. D. Omanović, K. Juraić, Z. Ljubešić, *Eur. J. Phycol.* **56** (2021) 24–36.
10. T. Novak, J. Godrijan, D. Marić Pfannkuchen, T. Đakovac, N. Medić, I. Ivančić, M. Mlakar, B. Gašparović, *Sci. Total Environ.* **668** (2019) 171–183.
11. W. Pultz, O. Gross, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65** (2004) 635-648.
12. <https://www.fao.org/3/cb4579en/cb4579en.pdf> (Datum pristupa 5. siječnja 2022.)
13. S. K. Ratha, N. Renuka, I. Rawat, F. Bux, *Nutrition* **83** (2021) 111089.

14. B. Singh, Y. Liu, Y. C. Sharma u F. Bux(ur.), *Biotechnological applications of microalgae: biodiesel and value-added products*, CRC Press, Boca Raton, 2013, str. 99–12.
15. A. L. Alvarez, S. L. Weyers, H. M. Goemann, B. M. Peyton, R. D. Gardner, *Algal Res.* **52** (2021) 102200.
16. A. Ben-Amotz, J. E. W. Polle, D. V. S. Rao, *The alga Dunaliella – Biodiversity, physiology, genomics and biotechnology*, Enfield: Science Publishers, 2009, str. 1–555.
17. M. I. Khan, J. H. Shin, J. D. Kim, *Microb. Cell Fact.* **17** (2018) 36.
18. T. Niederwieser, P. Kociolek, A. Hoehn, D. Klaus, *Algal Res.* **41** (2019) 101543–101554.
19. I. Wagner, M. Braun, K. Slenzka, C. Posten, u C. Posten, S. F. Chen (ur.), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Microalgae biotechnology*, Springer, Švicarska, 2016, str. 143–184.
20. N. Ivošević DeNardis, J. Pečar Ilić, I. Ružić, N. Novosel, T. Mišić Radić, A. Weber, D. Kasum, Z. Pavlinska, R. K. Balogh, H. Balint, A. Marček Chorvátová, B. Gyuresik. *Eur. Biophys. J.* **48** (2019) 124–142.
21. N. Novosel, D. Kasum, P. Žutinić, T. Legović, N. Ivošević DeNardis, *J. Appl. Phycol.* **32** (2020) 4057–4067.
22. A. C.-C. T. Jokela, *Outer Membrane of Dunaliella Tertiolecta: isolation and properties*, Doktorski rad, Sveučilište Kalifornije, San Diego, 1969. 1–93.
23. http://www.bio.utexas.edu/research/utex/photogallery/d-l/Dunaliella_tertiolecta_999.htm (Datum pristupa 6. veljače 2022.)
24. W. Gray Jerome, R. L. Price, *Basic Confocal Microscopy*, Springer, Švicarska, 2018, str. 21–33.
25. A. Ambriović Ristov, A. Brozović, B. Bruvo Mađarić, B. H. Četković, M. Herak Bosnar, D. Hranilović, S. Katušić Hećimović, N. Meštrović Radan, S. Mihaljević, N. Slade, D. Vujaklija, *Metode u molekularnoj biologiji*, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 2007, str. 735–770.
26. <https://microbeonline.com/fluorescence-microscope-principle-types-applications/> (Datum pristupa 10. siječnja 2022.)
27. A. D. Elliot, *Curr. Protoc. Cytom.* **92** (2020) e68

28. S. Inoue u J. B. Pawley (ur.), *Biological Confocal Microscopy*, Springer, New York, str. 1–16.
29. G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber C. *Phys. Rev. Lett.* **56** (1986) 930–933.
30. I. Demir-Yilmaz, P. Guiraud, C. Formosa-Dague, *Algal. Res.* **60** (2021) 102506.
31. G. Pletikapić, A. Berquand A, T. Mišić Radić, V. Svetličić, *J. Phycol.* **48** (2012) 174–185.
32. S. Bosak, G. Pletikapić, A. Hozić, V. Svetličić, D. Sarno, D. Viličić, *PLoS One* **7** (2012) e44851.
33. G. Pletikapić, N. Ivošević DeNardis, *Nat. Hazards Earth Syst. Sci.* **17** (2017) 31–44.
34. T. Mišić Radić, V. Svetličić, V. Žutić, B. Boulgaropoulos, *J. Mol. Recognit.* **24** (2011) 397–405.
35. P. Eaton, P. West, *Atomic Force Microscopy*, Oxford University Press, New York, 2010, str. 50–66.
36. R. R. L. Guillard, u Smith W. L. i Chanley M. H. (ur.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*, Plenum Press, New York, 1975 str. 26–60.
37. <https://www.irb.hr/Istrazivanja/Kapitalna-oprema/Laserski-pretrazni-konfokalni-mikroskop-Leica-SP8-X-FLIM> (Datum pristupa 5. siječnja 2022.)
38. A. Katz, P. Waridel, A. Shevchenko, U. Pick, *Mol. Cell. Proteomics* **6** (2007) 1459.
39. M. A. Borowitzka, L. J. Borowitzka, u M. A. Borowitzka, L. J. Borowitzka (ur.), *Microalgal biotechnology*, Cambridge University Press, Cambridge, Velika Britanija, 1988, str. 27.
40. R. Raja, S. Hemaiswarya, R. Rengasamy, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74** (2007) 517–523.
41. M. Shariati, *Iranian J. Sci. Technol.* **27** (2003) 185–190.
42. M. R. Hadi, M. Shariati, S. Afsharzadeh, *Iran. Biotechnol. Bioprocess Eng.* **13** (2008) 540–544.
43. V. Svetličić, N. Ivošević, S. Kovač, V. Žutić, *Bioelectrochemistry* **53** (2001) 79–86.
44. E. Tambutté, S. Tambutté, N. Segonds, D. Zoccola, A. Venn, J. Erez, D. Allemand, *Proc. Biol. Sci.* **279** (2012) 19–27.
45. M. J. Waner, M. Gilchrist, M. Schindler, M. Dantus, *J. Phys. Chem. B* **102** (1998) 1649–1657.

46. A. Moscho, O. Orwar, D.T. Chiu, B. P. Modi, R. N. Zare, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93** (1996) 11443–11447.
47. E. Teckle, R. D. Astumian, W. A. Friauf, P. B. Chock, *Biophys. J.* **81** (2001) 960–968.
48. T. Portet, F. Camps Febrer, J. M. Escoffre, C. Favard, M.-P. Rolls, D. S. Dean, *Biophys. J.* **96** (2009) 4109–4121.
49. T. Portet, C. Favard, J. Teissie, D. S. Dean, M.-P. Rols, *Soft Matter.* **7** (2011) 3872–3881.
50. I. K. Herrmann, M. J. A. Wood, G. Fuhrmann, *Nat. Nanotechnol.* **7** (2021) 748–759.
51. G. Raposo, W. Stoorvogel, *J. Cell Biol.* **200** (2013) 373–383.

§ 7. DODATAK

Tablica D1. Sastav otopine metala u tragovima za pripremu f/2 medija.

Kemijski spoj	Masena koncentracija / g L ⁻¹	Volumen / mL	Masa / g	Molarna koncentracija / mol L ⁻¹
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	–	–	3,15	1,17 x 10 ⁻⁵
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	–	–	4,36	1,17 x 10 ⁻⁵
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	9,8	1	–	3,93 x 10 ⁻⁸
NaMoO ₄ x 2 H ₂ O	6,3	1	–	2,60 x 10 ⁻⁸
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	22,0	1	–	7,65 x 10 ⁻⁸
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	10,0	1	–	4,20 x 10 ⁻⁸
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	180,0	1	–	9,10 x 10 ⁻⁷

Tablica D2. Sastav otopine vitamina za pripremu f/2 medija.

Kemijski spoj	Masena koncentracija / g L ⁻¹	Volumen / mL	Masa / mg	Molarna koncentracija / mol L ⁻¹
Tiamin-HCl	–	–	200	2,96 x 10 ⁻⁷
Biotin	0,1	10	–	2,05 x 10 ⁻⁹
Vitamin B ₁₂	1,0	1	–	3,69 x 10 ⁻¹⁰

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Tomo Balen

Datum rođenja: 29.12.1995.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2002–2010 Osnovna škola Petra Preradovića, Zagreb

2010–2014 Sedma Gimnazija, Zagreb

2014–2019 Preddiplomski studij Kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

2019–2022 Diplomski studij Kemije, smjer Analitička-organska Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2016-2019 Otvoreni dani kemije