Adhezija stanica fitoplanktona na nabijenoj međupovršini elektroda/vodena otopina elektrolita

Grubeša, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:846376

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

IVANA GRUBEŠA

ADHEZIJA STANICA FITOPLANKTONA NA NABIJENOJ MEĐUPOVRŠINI ELEKTRODA/VODENA OTOPINA ELEKTROLITA

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog stupnja
magistre kemije

Zagreb
2016.

Ovaj diplomski rad je izrađen na Institutu Ruđer Bošković u Zavodu za istraživanje mora i okoliša, Laboratoriju za biogeokemiju mora i atmosfere, pod vodstvom dr. sc. Nadice Ivošević DeNardis, viši znanstveni suradnik i nastavnika dr. sc. Marka Močiboba, docent na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, Kemijski odsjek.

Svesrdno se zahvaljujem mojoj mentorici dr. sc. Nadici Ivošević DeNardis na pruženoj prilici, velikom trudu i strpljenju. Njezino nesebično prenošenje znanja i korisni savjeti uvelike su olakšali izradu ovoga rada. Hvala Vam što ste uvijek našli vremena za mene.

Zahvaljujem se svome mentoru s Kemijskog odsjeka doc. dr. sc. Marku Močibobu na ispravkama i savjetima.

Zahvaljujem se dr. sc. Blaženki Gašparović na pomoći prilikom interpretacije rezultata analize lipidnih klasa.

Veliko hvala dragoj Tihani Sesar na pomoći pri analizi lipida, razgovorima, savjetima i smijehu.

Dragi Mama i Tata hvala vam na svemu što ste mi omogućili i što uvijek stojite uz mene. Dragi Tata hvala ti na svim savjetima. Draga Mama hvala ti na beskonačno dugim razgovorima i vječitom bodrenju.

Hvala moj braći i baki Anki na podršci i razumijevanju.

Hvala mojoj Mirni i Ivi koje se uvijek raduju mojim uspjesima i bodre me u onim malo lošijim trenucima.

Dragoj Ivani i Ani hvala na podršci, razgovorima i odličnom društvu.

Hvala mome Martinu na strpljenju i bezuvjetnoj podršci. Hvala Ti što uvijek vjeruješ u mene.

SADRŽAJ

SAŽETAK V

ABSTRACT VI

1. UVOD 1

2. LITERATURNI PREGLED 2

2.1. Morski fitoplankton: *D. tertiolecta* 2

2.2. Metode 5

2.2.1. Elektrokemijska metoda 5

2.2.1.1. Kapajuća živina elektroda 7

2.2.1.2. Električni dvosloj 8

2.2.1.3. Elektrokapilarna krivulja 9

2.2.1.4. Mehanizam adhezije stanice na nabijenoj elektrodi 10

2.2.2. Kromatografija 12

2.2.2.1. Tankoslojna kromatografija 13

3. EKSPERIMENTALNI DIO 14

3.1. Instrumentacija 14

3.2. Ćelija i elektrode 14

3.3. Kemikalije 15

3.4. Priprema otopina 15

3.5. Laboratorijska monokultura fitoplanktona *D. tertiolecta* 15

3.6. Postupak elektrokemijskog mjerenja 17

3.7. Priprema uzorka za ekstrakciju lipidnog materijala 18

3.8. Postupak mjerenja i analiza na IATROSCANU 18

4. REZULTATI 20

4.1. Rast stanica *D. tertiolecta* u kulturi 20

4.2. Elektrokemijska karakterizacija suspenzije stanica fitoplanktona u prisutnosti kisika 21

4.3. Elektrokemijska karakterizacija stanica fitoplanktona bez prisutnosti kisika 26

4.4. Određivanje sastava lipida tankoslojnom kromatografijom 31

5. RASPRAVA 34

6. ZAKLJUČAK 38

7. LITERATURNA VRELA 39

ŽIVOTOPIS 42

SAŽETAK

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

Adhezija stanica fitoplanktona na nabijenoj međupovršini elektroda/vodena otopina elektrolita

Ivana Grubeša

Laboratorij za biogeokemiju mora i atmosfere, Zavod za istraživanje mora i okoliša,
Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, Zagreb, Hrvatska

U ovom radu ispitan je rast i prilagodba morskog fitoplanktona *Dunaliella tertiolecta* u dva vodena medija različitog saliniteta primjenom elektrokemijske metode, i tankoslojne kromatografije. Elektrokemijska karakterizacija staničnih suspenzija ukazuje na slična adhezijska ponašanja stanica u širokom području potencijala na elektrodi za oba medija. Veća fiziološka aktivnost stanica u smislu izlučenih biomolekula i mikrometarskih čestica detektirana je u mediju nižeg saliniteta. Tankoslojnom kromatografijom dobiven je porast koncentracije ukupnih lipida s porastom gustoće stanica za oba medija. Veća koncentracija ukupnih lipida određena je u mediju nižeg saliniteta. Najzastupljeniji membranski lipidi su glikolipidi koji variraju sa starošću kulture kod višeg i nižeg saliniteta. Kombinacijom dviju metoda omogućuje se bolje razumijevanje ponašanja stanica u vodenom sustavu u uvjetima okolišnog stresa (npr. kod promjene saliniteta).

Ključne riječi: adhezija/ *D. tertiolecta*/ fitoplankton/ lipidi/ kronoamperometrija/ kromatografija

Rad sadrži: 48 stranica, 25 slika, 1 tablicu i 67 literaturnih navoda, izvornik je napisan hrvatskim jezikom. Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Hrvatska.

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

Ocjenjivači rada: dr. sc. Marko Močibob, docent
dr. sc. Davor Kovačević, redoviti profesor
dr. sc. Iva Juranović Cindrić, izvanredni profesor

Zamjena: dr. sc. Morana Dulić, docent

Tema prihvaćena: 13. srpnja 2016.

ABSTRACT

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma thesis

Adhesion of phytoplankton cells at a charged electrode/aqueous electrolyte interface

Ivana Grubeša

Laboratory for marine and atmospheric biogeochemistry, Division for Marine and Environmental Research, Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, Zagreb, Croatia

In this thesis growth and adaptation of marine phytoplankton *Dunaliella tertiolecta* was examined in two media of different salinity using electrochemical methods and thin layer chromatography. Electrochemical characterization of cell suspensions showed similar adhesion behavior of cells in the wide range of applied potentials at the electrode in the both media. Higher physiological activity of cells due to the presence of exudates of biomolecules and micrometer sized particles was detected in the lower salinity medium. Thin layer chromatography showed increase in concentration of the total lipids with the cell density, for the both media. Higher concentration of total lipids was found in the lower ionic strength. Determined predominant membrane lipids were glycolipids that varied with aging of the cell culture at lower and higher salinity. Combination of electrochemical methods and thin layer chromatography enables better understanding of behavior of phytoplankton cells in aquatic system under environmental stress condition (e.g. variation of salinity).

Keywords: adhesion/ chromatography/ chronoamperometry / *D. tertiolecta*/ lipids/ phytoplankton

The thesis contains: 48 pages, 25 figures, 1 table and 67 references, original is written in Croatian. Thesis deposited with Central Chemical Library, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Croatia.

Supervisors: dr. sc. Nadica Ivošević DeNardis, Senior Research Associate
dr. sc. Marko Močibob, Assistant professor

Reviewers: dr. sc. Marko Močibob, Assistant professor
dr. sc. Davor Kovačević, Full Professor
dr. sc. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor

Substitute: dr. sc. Morana Dulić, Assistant professor

Thesis accepted: 13th July 2016

1. UVOD

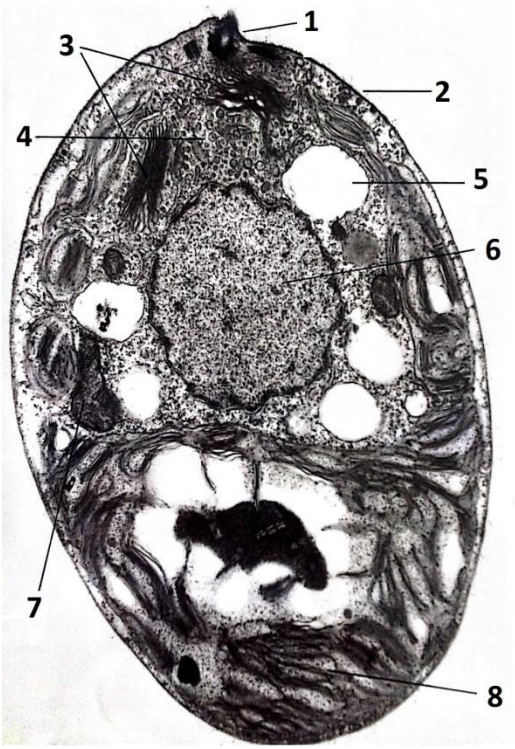
Fitoplankton je velika skupina jednostaničnih mikroorganizama koji je zaslužan za najveći udio primarne produkcije u vodenom okolišu. U današnje vrijeme fitoplankton se sve više koristi kao modelni organizam u istraživanjima, te zbog svojih jedinstvenih značajki pronalazi primjenu u području biotehnologije. U vodenom okolišu različiti uzročnici stresa (antropogena aktivnost) utječu na rast i adaptaciju stanica fitoplanktona što može kaskadno utjecati na viši nivo hranidbenog lanca. Kao modelni jednostanični organizam u ovom radu korištena je monokultura morskog fitoplanktona *Dunaliella tertiolecta (D. tertiolecta)* koja se kontinuirano uzgaja već dugi niz godina u laboratoriju, kao standard za elektrokemijsku karakterizaciju uzoraka prirodnih voda za potrebe monitoring programa. Stanica *Dunaliella* je „gola“, tj. posjeduje samo staničnu membranu, te je stoga osjetljiva na promjene u okolišu, koje će se prvo manifestirati na njenoj vanjskoj membrani. Svojstva stanične membrane su od presudne važnosti za istraživanje procesa adhezije na modelnoj međupovršini elektroda/vodena otopina elektrolita. U ovom radu ispitan je rast monokulture stanica *D. tertiolecta* u uvjetima rasta kod višeg i nižeg saliniteta, te kako se ta promjena u načinu uzgoja stanica odražava na svojstva adhezije stanice na elektrodu i na lipidni profil cjelokupnog staničnog sadržaja stanice na molekularnom nivou. Rezultati ovoga rada doprinijet će razumijevanju ponašanja stanica fitoplanktona u uvjetima stresa u vodenom okolišu na staničnom i molekularnom nivou te u cilju predviđanja njene sudbine u moru.

U radu će se primijeniti elektroanalitičke metode polarografije i kronoamperometrije na kapajućoj živinoj elektrodi (KŽE) u cilju ispitivanja svojstva adhezije stanice na modelnoj površini. Nadalje, tankoslojnom kromatografijom će se odrediti sastav i koncentracija glavnih skupina lipida u staničnom materijalu što može doprinijeti dinamici međupovršinskih procesa (adheziji) stanice na elektrodi.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Morski fitoplankton: *D. tertiolecta*

Morski fitoplankton (alga) je ključni faktor u primarnoj proizvodnji i morskom ekosustavu u cjelini.[1] Gotovo polovica primarne proizvodnje te više od polovice proizvedenog kisika na Zemlji pripisuje se morskom fitoplanktonu.[2] Fitoplankton sudjeluje u globalnim ciklusima elemenata: ugljika, fosfora, dušika, silicija i sumpora u moru.[3] Jednostanična, zelena alga *D. tertiolecta* taksonomski je klasificirana u odjel *Chlorophyta*-zelene alge, razred *Chlorophyceae*, red *Volvocales*, porodica *Chlamydomonaceae*, rod *Dunaliella*, vrsta *Dunaliella tertiolecta*.[4] Stanice *Dunaliella* su većinom radijalno simetrične. Oblik stanice varira od elipsoidnog pa sve do sferičnog oblika. Stanice *D. tertiolecta* nemaju staničnu stijenku, već samo fleksibilnu staničnu membranu, pa se često nazivaju „golim stanicama". Elektronskim mikroskopom je određena debljina membranske ovojnice *D. tertiolecta* od 9 nm.[5] Takvoj relativno velikoj debljini membrane vjerojatno doprinosi visoki sadržaj glikoproteina što je identificirano kationskim bojanjem (Ruthenium Red, Alcian Blue).[6] Izolacijom plazma membrane *D. tertiolecta* vizulizirano je na površini mnoštvo globularnih struktura visine 5-15 nm što vjerojatno doprinosi debljini membrane.[7] Dužina stanice je između 6 μm i 10 μm, ima aktivno kretanje s dva biča te spada u skupinu nanoflagelata. Stanica *D. tertiolecta* je široko rasprostanjena u vodenom sistemu, tj. od morskih do slatkovodnih voda, što je posljedica visoke tolerancije rasta u širokom rasponu saliniteta.[8] Slika 1 prikazuje poprečni presjek stanice *D. tertiolecta* elektronskim mikroskopom. Vidljivo je da je Golgijev aparat koji transportira tvari prema periferiji stanice vrlo aktivan po brojnim vezikulama.



Slika 1. Elektronsko-mikroskopska snimka prereza kroz *D. tertiolecta* (povećanje 18000:1); 1-baza biča, 2-plazma membrana, 3-Golgijev aparat, 4-vezikule, 5-vaukola, 6-jezgra, 7-mitohondrij, 8-kloroplast (preuzeto iz: Svetličić i sur., 2001).[9]

Stanice *Dunaliella* su halotolerantne i nalazimo ih u morskoj vodi, solanama, pa čak i zasićenim slanim vodama kao u Mrtvom moru u Izraelu. S obzirom da stanica *Dunaliella* tolerira širok raspon saliniteta, pH, intenzitet svjetla i temperature zbog tih je značajki u središtu interesa za temeljna i biokemijska istraživanja. Do sada većina studija na stanici *Dunaliella* uključivale su istraživanja vezana za proizvodnju, ekstrakciju i izolaciju bioaktivnih komponenti (glicerol, karotenoidi, masne kiseline) te njihov potencijal kao izvor biogoriva.[10] Naime, neke mikroalge uslijed stresnih uvjeta uzgoja, (npr. manjak hranjivih tvari dušika ili silicija) kao odgovor akumuliraju neutralne lipide koji se mogu nakon ekstrakcije prevesti trans-esterifikacijom s metanolom u biodizel. Objavljena je nekolicina radova o proizvodnji biogoriva iz fitoplanktonskih kultura te isplativosti takve proizvodnje.[11-13] S obzirom da *Dunaliella* obiluje pigmentima β-karotena koji su također od važnosti za ljudsko zdravlje, zadnjih godina se istražuje biotehnološki potencijal u svrhu proizvodnje sredstava za zaštitu od UV zračenja.[14]

U vodenom okolišu uslijed antropogene aktivnosti postoje različiti uzročnici staničnog stresa, npr. promjena saliniteta, pH, temperature, nedostatak hranjivih tvari, prisutnost nanočestica i raznih organskih zagađivala (kapljica nafte) koji mogu utjecati na rast i adaptaciju stanica fitoplanktona, što se može kaskadno manifestirati na viši nivo hranidbenog lanca. Stanica *Dunaliella* je „gola“, te je stoga osjetljiva na promjene u vodenom mediju, koje će se prvo manifestirati na njenoj vanjskoj membrani, tj. biomeđupovršini. Biomeđupovršina je vanjska granica faza stanice prema mediju, te tako prva u kontaktu s mogućim uzročnicima stresa. Dosadašnja istraživanja su pokazala da stanice fitoplanktona u uvjetima stresa u vodenom okolišu mogu reagirati promjenom površinskih svojstava membrane ili stanične stijenke, ili fiziološki lučenjem ekstracelularnih biopolimera, lipidnih vezikula ili lipidnih kapljica sintezom biološki važnih molekula (masnih kiselina, lipida, glicerola).[15,16] Najčešća promjena zamijećena prilikom smanjenja temperature u okolišu je veća zastupljenost nezasićenih masnih kiselina.[17,18] Uočeno je i skraćivanje lanaca masnih kiselina.[19] Promjena saliniteta u vodenom okolišu može dovesti do povećanja koncentracije lipida. Zamijećeno je da je povećanje saliniteta kod uzgoja alge *Amphora subtropica*, te smanjenje saliniteta kod uzgoja *Dunaliella sp.* dovelo do povećanja koncentracije lipida oko dva puta.[20] U slučaju nedostatka hranjivih tvari, rast stanica je znatno sporiji zato što se koriste masne kiseline za stvaranje skladišnih lipida npr. triglicerida umjesto za stvaranje novih membrana. Unatoč tome, neke alge u takvim uvjetima udvostručuju sadržaj lipida u stanici.[17]

Membrane su asimetrične, fluidne i permeabilne strukture koje spriječavaju izlazak molekula proizvedenih u stanici, kao i ulazak neželjenih molekula u stanicu. Sadržavaju transportne sustave koje im daju svojstvo selektivne permeabilnosti. Zahvaljujući transportnim sustavima, stanica se može opskrbiti željenim molekulama kao i odstraniti neželjene molekule.

Membrane se sastoje od dvosloja lipida i proteina te ugljikohidrata vezanih na njih. Lipidi kao biomolekule imaju različitu ulogu u stanici; mogu služiti kao zaliha energije, kao gradivne komponente membrana, te kao signalne molekule ili glasnici u prijenosu signala. U morskim mikroorganizmima sadržaj lipida ovisi o starosti organizma, o fiziološkom stanju, te o ekološkim faktorima (npr. dostupnost hrane).[21] Fosfolipidi su esencijalni sastojci membrana gdje, kao i steroli, obnašaju strukturnu funkciju. Steroli su neutralni lipidi koji su odgovorni za regulaciju membranske fluidnosti i utječu na membranske funkcije i enzime vezane s membranama.[22] Glikolipidi sadrže jednu ili dvije molekule šećera vezanih na glicerol.

Glikolipidi zajedno s fosfolipidima predstavljaju glavne lipide bioloških membrana. Posebno su rasprostranjeni u membranama eukariotskih stanica.[23] Glikolipidi se općenito nalaze na izvanstaničnoj strani membrana, gdje im je funkcija održavanje stabilnosti membrane i olakšavanje interakcija među stanicama.

2.2. Metode

2.2.1. Elektrokemijska metoda

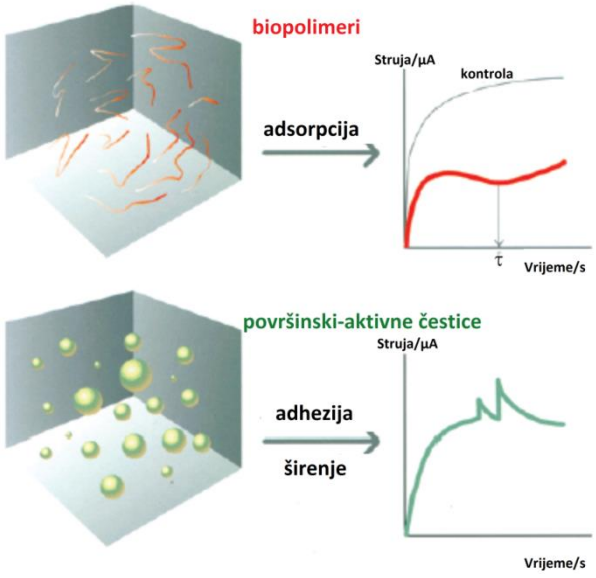
Polarografija na KŽE je elektrokemijska metoda koju je prvi primjenio J. Heyrovskỳ što je dovelo do naglog razvoja elektroanalize. J. Heyrovskỳ je za to okriće dobio Nobelovu nagradu 1959. godine.[24] U polarografiji pobuda je linearna promjena potencijala na radnoj elektrodi u vremenu, dok je odziv ovisnost struje o primjenjenom potencijalu. Kronoamperometrija je elektrokemijska metoda gdje je pobuda konstantan potencijal na kojem dolazi do elektrodne reakcije, a odziv je ovisnost struje o vremenu. U prisutnosti elektroaktivne vrste u mjernoj otopini kao npr. otopljenog kisika dolazi do redoks procesa na međupovršini. U lužnatom mediju (pH=8,2), kisik kao elektroaktivna vrsta reducira se u dva stupnja:

$O_2 + 2H_2O \rightarrow H_2O_2 + 2OH$ E= od 0 V do -0,2 V (1)

$H_2O_2 + 2e^- \rightarrow 2OH^-$ E= od -0,6 V do 1,3 V (prema NKE) (2)

Metode koje koriste živinu elektrodu su od velike važnosti za istraživanje membrana zbog jedinstvene prednosti žive kao tekuće i vodljive površine koja idealno oponaša fluidnu međupovršinu poznatih površinskih svojstava. Elektrokemijska detekcija temelji se na međupovršinskim svojstvima, hidrofobnosti i supramolekularnoj organizaciji čestica, a ne na kemijskom sastavu.[25] Kronoamperometrija na KŽE u prisutnosti kisika ima mogućnost direktnog razlikovanja adsorpcije otopljene organske tvari od adhezije organskih čestica (kapljica, stanica, lipidnih vezikula) dok se anorganske čestice pri tome ne detektiraju.[26-29] Adsorpcija organskih molekula na elektrodi uzrokuje smanjenje gradijenta površinske napetosti na međupovršini, a time i vrtložnih strujanja što se bilježi kumulativno kao postupno sniženje struje redukcije kisika tijekom života živine kapi.[30] Na slici 2 shematski je prikazana adsorpcija biopolimera i njezin utjecaj na struju redukcije kisika na KŽE. Adhezija površinski-aktivnih mikročestica na elektrodi bilježi se kao dobro definirani signal prianjanja koji nastaje kao posljedica potiskivanja naboja dvosloja, što je pojednostavljeno prikazano na slici 2. U načelu prije dolaska čestice do elektrode, struja je kontrolirana vrtložnim transportom. Prilikom slučajnog sudara čestice s elektrodom, na površini se stvara lokalna

mrlja niže površinske napetosti koja se širi prema mjestu veće napetosti površine. To uzrokuje turbulenciju u sloju otopine u blizini elektrode i dopremu elektroaktivne vrste (kisika) do površine, što se očitava kao nagli porast struje. Nakon sudara, čestica se razlije po elektrodi, smanjuje se površinska napetost a time i vrtložna strujanja i doprema elektroaktivne vrste, što rezultira sniženjem struje redukcije kisika na kraju svakog signala. Amplituda signala prianjanja odražava veličinu čestice dok je brojnost signala prianjanja odraz koncentracije čestica u mjernoj otopini.[9,31,32] Moguće je detektirati meke mikrometarske čestice u području veličine 1-500 μm i koncentracije 10^5-10^8 čestica/L. Kronoamperometrijska metoda omogućuje jednostavnu i brzu analizu uzorka (100 sekundi) te nema predobrade uzorka (npr. filtriranja, bojanja, fiksiranja) kako bi se sačuvala heterogena distribucija i primarna struktura organskih čestica u morskoj vodi. Osim direktne karakterizacije uzoraka morske vode ili suspenzije mekih čestica (organskih kapljica, stanica, lipidnih vezikula), metoda je prikladna za analizu pojedinačnih čestica (engl. „single particle analysis“) u smislu volumena kapljice, kontaktne površine, broja molekula u monosloju, detekcija specifičnih elektrostatskih interakcija, kinetike procesa.[7, 33-36]

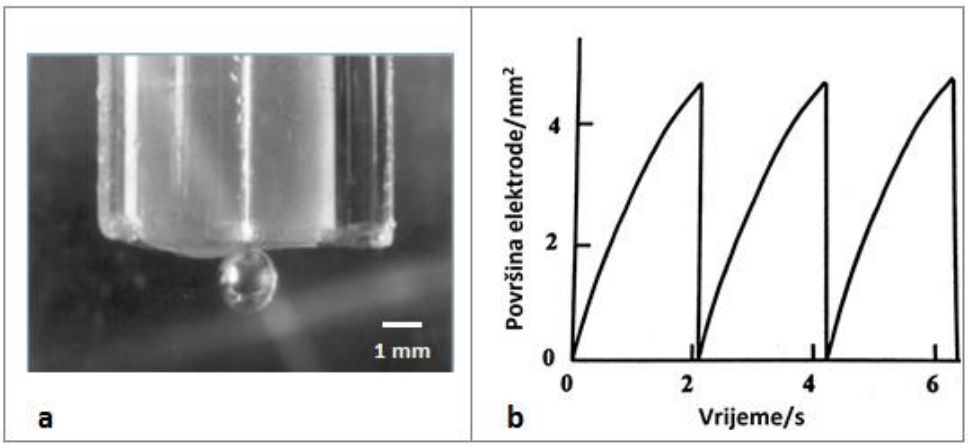


Slika 2. Shematski prikaz adsorpcije polimera i adhezije stanica te njihov utjecaj na struju redukcije kisika na KŽE (preuzeto iz: Svetličić i sur., 2006).[37]

2.2.1.1. Kapajuća živina elektroda

Živa ima široku upotrebu u elektroanalitičkoj kemiji bilo kao radna ili referentna elektroda drugog reda. Važna značajka živine elektrode je veliki prenapon izlučivanja vodika na živi u odnosu na druge krute elektrode,[38] što omogućava njenu upotrebu u širokom području potencijala: u kiselim otopinama do -1,0 V (prema zasićenoj kalomel elektrodi, ZKE), a u neutralnim otopinama do -2,6 V (tj. do raspada vode).[39] Glavni nedostatak živine elektrode je relativno nizak potencijal oksidacije žive kod 0,4 V (prema ZKE) pri čemu se živa otapa i nastaju Hg(I) ioni. Stoga živa se može koristiti za praćenje oksidacije elektroaktivnih vrsta koje se oksidiraju do potencijala od oko 0,4 V. Otrovnost živinih para zahtijeva posebne postupke zaštite na radu.

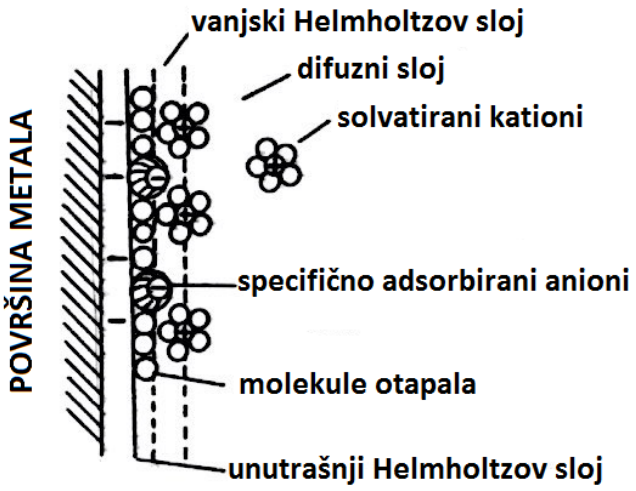
Živa se nalazi u tekućem stanju u širokom temperaturnom području tako da se mogu prirediti elektrode različitog oblika, od tankih filmova do visećih, sjedećih i periodički obnovljivih kapi. Kapajuća živina elektroda (KŽE) ima idealno glatku, homogenu i kemijski inertnu površinu hidrofobnog karaktera, čije periodično kapanje u pravilnim vremenskim intervalima omogućuje neovisna elektrokemijska mjerenja na obnovljivoj elektrodi. Kapajuća živina elektroda sastoji se od staklene kapilare koja je povezana fleksibilnom cijevi s rezervoarom za živu. Zbog tlaka živinog stupca kroz kapilaru protječe živa. Na otvoru kapilare stvara se kap koja nakon što dosegne određenu veličinu pada u mjernu otopinu. Promjenom visine stupca žive mijenja se tlak potiskivanja žive kroz kapilaru, a time i brzina istjecanja žive. Živa potisnuta tlakom živinog stupca oblikuje se na vrhu kapilare kao kap praktički pravilnog kuglastog oblika (slika 3a). Kap se drži na otvoru zbog površine napetosti. Kada masa kapi poraste toliko da je napetost površine više ne može zadržati, kap otpadne u ćeliju s mjernom otopinom. Svake dvije sekunde formira se na otvoru kapilare nova kap žive koja je jednaka prethodnoj. Prije otkidanja živine kapi površina kapi dostiže maksimalnu vrijednost (4,7 mm^2, slika 3b). Mjerenja se mogu ponoviti u istoj otopini više puta jer je promjena koncentracije u glavnini otopine zanemariva zbog male površine KŽE.



Slika 3. a) Otvor staklene kapilare s živinom kapi (stvarni promjer živine kapi je oko 1,2 mm); b) periodična promjena površine živine kapi.

2.2.1.2. Električni dvosloj

Kada se KŽE uroni u vodenu otopinu elektrolita te narine potencijal, stvara se nabijena međupovršina elektroda/elektrolit. Uređenje iona i dipola molekula vode koji se nalaze na međupovršini elektroda/otopina naziva se električnim dvoslojem. Električni dvosloj nastaje kao rezultat ravnoteže između sila u električnom polju i nereda uzrokovanog termalnim kretanjem iona. Postoji nekoliko klasičnih modela električnog dvosloja. U suštini naboj po jedinici površine elektrode kompenziran je suviškom jednako velikog naboja suprotnog predznaka od strane otopine. Suvišak naboja suprotnog predznaka od strane otopine podijeljen je na ione koji kompenziraju naboj površine na udaljenosti dimenzije molekule i ione čiji višak postupno opada prema unutrašnjosti otopine (difuzni sloj). Kompaktni sloj specifično adsorbiranih iona osnovnog elektrolita (pr. klorida) i orijentiranih dipola molekula vode nalazi se tik uz elektrodu i predstavlja unutarnju Helmholtzovu ravninu (IHP, slika 4). Na nju se nadovezuje vanjska Helmholtzova ravnina (OHP) koja se sastoji od hidratiziranih kationa, aniona i molekula vode.[40]

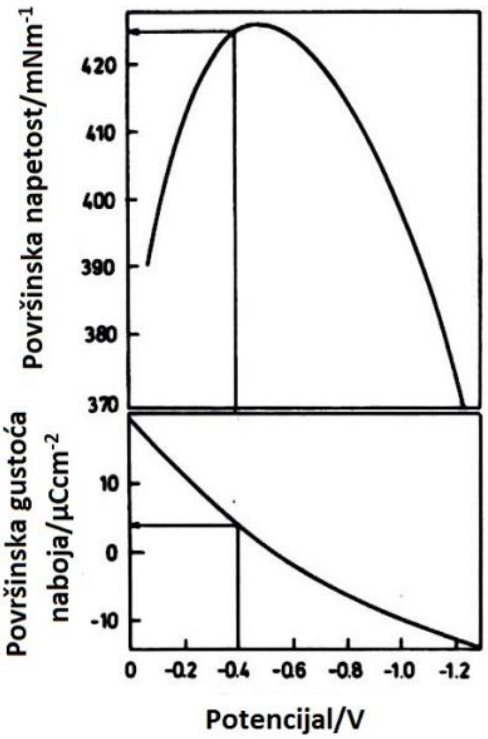


Slika 4. Shematski prikaz strukture električnog dvosloja u prisutnosti specifične adsorpcije aniona (preuzeto iz: Bard, Faulkner, 1980).[40]

Debljina i struktura električnog dvosloja ovisi o ionskoj jakosti i sastavu elektrolita. Struktura dvosloja utječe na brzinu elektrodne reakcije. Da bi elektroaktivna čestica sudjelovala u elektrodnom procesu mora se približiti elektrodi na udaljenost OHP.

2.2.1.3. Elektrokapilarna krivulja

Mijenjanjem narinutog potencijala na KŽE dolazi do promjene međupovršinskih svojstava u smislu gustoće površinskog naboja i napetosti međupovršine elektroda/elektrolit (slika 5). Ta međupovršinska svojstva na elektrodi utječu na termodinamiku i kinetiku međupovršinskih procesa (adsorpcije, adhezije) na KŽE. Elektrokapilarna krivulja paraboličnog oblika prikazuje ovisnost napetosti međupovršine elektroda/elektrolit o narinutom potencijalu.[24] Maksimum u elektrokapilarnoj krivulji zove se elektrokapilarni maksimum ili izoelektrična točka jer je površinska gustoća naboja na živi nula i prema tome nema dvosloja (slika 5).



Slika 5. Ovisnost površinske napetosti i površinske gustoće naboja o potencijalu na međupovršini živa/0,1 mol dm^{-3} NaCl.

2.2.1.4. Mehanizam adhezije stanice na nabijenoj elektrodi

Istraživanje procesa adhezije i širenja na nabijenoj živinoj elektrodi prvotno je ispitano na modelnim sistemima dispergiranih kapljica organskih tekućina (ugljikovodika), za koje postoje literaturni podatci o napetostima na međupovršinama[41] s ciljem da se metoda verificira, te istraže termodinamički uvjeti u kojima se proces odvija spontano. Dobiveno je dobro slaganje između eksperimentalno određenih kritičnih međupovršinskih napetosti adhezije ugljikovodika na živinoj elektrodi i izračunatih vrijednosti putem Young-Dupré izraza. Spontanost procesa adhezije i širenja ovisi o međupovršinskim napetostima na tri faze u kontaktu (organska kapljica-živa-voda). Svaka interakcija kapljice s nabijenom površinom žive neće rezultirati adhezijom i širenjem po površini. Po površini će se razliti samo one kapljice za koje je $\Delta G<0$. Promjena Gibsove energije dana je izrazom izvedenim u skladu s jednadžbom Young-Dupré[42];

$$-\Delta G = A(\gamma_{12-}\gamma_{13-}\gamma_{23}) \quad (3)$$

gdje je A specifična površina, γ_{12}, γ_{13} i γ_{23} su međupovršinske napetosti živa/vodena otopina, živa/nepolarna organska tekućina i nepolarna organska tekućina/vodena otopina. Izraz u zagradi predstavlja koeficijent širenja, S_{132}.[43]

$$S_{132} = \gamma_{12} - \gamma_{13} - \gamma_{32} \quad (4)$$

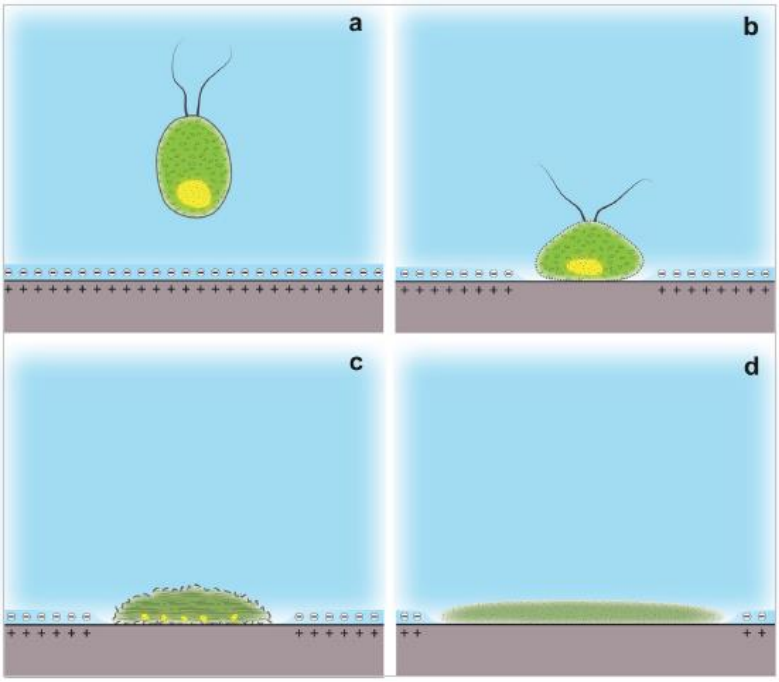
Kada je S>0 dolazi do spontanog širenja kapljice po međupovršini. Što je koeficijent širenja veći (blizina elektrokapilarnog maksimuma), proces je brži. Kada je S=0, postignuti su kritični uvjeti da dođe do adhezije i širenja kapljica po međupovršini ali je proces spor. Ova saznanja su omogućila da se ispita adhezijsko ponašanje sistema većeg stupnja kompleksnosti kao npr. suspenzija živih stanica. Slika 6 ilustrira predloženi mehanizam adhezije i širenja stanice fitoplanktona na pozitivno nabijenoj međupovršini. Stanica fitoplanktona dolazi u neposrednu blizinu nabijene međupovršine te uslijed jakih privlačnih sila dolazi do uspostave izravnog kontakta stanice i elektrode (tj. prianjanja). Stanica se deformira, kontaktna površina raste, membrana postaje permeabilzirana. Kada brojnost i veličina pora dosegne neku kritičnu vrijednost, dolazi do oslobađanja i širenja unutarstaničnog materijala te do nastanka filma na elektrodi. Adhezijom stanice na elektrodu i njenim širenjem dolazi do potiskivanja naboja dvosloja te uspostave kompenzirajuće struje što predstavlja vremenski dobro definirani amperometrijski odziv tj. signal prianjanja stanice koji traje svega nekoliko milisekundi. Struja potiskivanja naboja (I_D) definirana je izrazom:

$$I_D = \frac{dA}{dt}\sigma_E \quad (5)$$

$\frac{dA}{dt}$ - promjena površine živine kapi u vremenskom intervalu

σ_E - gustoća površinskog naboja na živinoj elektrodi

Analizom signala prianjanja stanica, nedavno je postignut napredak u razumijevanju dinamike procesa adhezije i širenja na nabijenoj elektrodi. Razvojem i primjenom reakcijsko-kinetičkog modela višestupanjskog procesa na signale prianjanja stanica omogućena je ekstrakcija kinetičkih parametara procesa. Ujedno, matematički je omogućeno da se vremenski rekonstruira transformacija mekih čestica na elektrodi, što daje uvid u mehanizam adhezije na međupovršini.[7,34,35]



Slika 6. Mehanizam prianjanja i širenja stanice alge po nabijenoj međupovršini (preuzeto iz: Ivošević DeNardis i sur., 2015).[7]

2.2.2. Kromatografija

Kromatografija je fizikalna metoda separacije u kojoj se sastojci raspodjeljuju između dviju faza. Jedna faza je nepokretna (stacionarna) dok je druga faza pokretna (mobilna). Nepokretna faza može bit gel, krutina ili tekućina jednoliko raspoređena na čvrstom nosaču. Pokretna faza može biti plin, tekućina ili fluid. Prema obliku kromatografske podloge dijelimo ih na kolonsku (kromatografija na stupcu) i plošnu kromatografiju. Kod kolonske kromatografije stacionarna faza je nanesena na usku cijev kojom se kreće mobilna faza pod utjecajem gravitacije ili tlaka, a razdvajanje se vrši eluiranjem. Kod plošne kromatografije stacionarna faza nanesena je na ravnu plohu ili pore papira, a mobilna faza prolazi kroz

stacionarnu pod utjecajem kapilarnih sila ili gravitacije. Kod plošne kromatografije upotrebljava se tehnika frontalne analize.

Prema mehanizmu odvajanja kromatografske tehnike dijele se na: adsorpcijsku kromatografiju, razdjelnu kromatografiju, ionsko-izmjenjivačku kromatografiju, kromatografiju isključenjem i afinitetnu kromatografiju. Kao rezultat kromatografije nastaje kromatogram koji predstavlja grafički prikaz odnosa odziva detektora, koncentracije sastojka ili neke druge veličine koja se uzima kao mjera za koncentraciju sastojka, prema vremenu potrebnom da sastojak prođe kroz stacionarnu fazu sustava. Kromatografska krivulja ili pik prikazuje dio kromatograma u kojem je obilježen odziv detektora pri ispiranju jednog sastojka iz kolone. Ako želimo napraviti kvalitativnu analizu određuje se položaj pika, a za kvantitativnu analizu visina ili površina pika.

2.2.2.1. Tankoslojna kromatografija

Tankoslojna kromatografija je plošna tehnika tekućinske kromatografije koja omogućuje istovremenu analizu više uzoraka. Izvodi se na plohi na koju je nanesen sloj sorbensa (silikagel, celuloza). Nakon što je otopljeni uzorak nanesen ploča se stavlja u komoru zasićenu parama otapala. Zasićenost se postiže filter papirom namočenim u razvijač koji se nalazi uz stijenku komore za razvijanje. Otapalo prolazi kroz stacionarnu fazu pod djelovanjem kapilarnih sila pri čemu dolazi do odjeljivanja sastojaka uzorka. Sastojci se detektiraju prskanjem s reagensom, fluoresecencijom pod UV svjetlom ili gašenjem fluorescencije ako je nepokretnoj fazi dodan reagens koji fluorescira.

Kvalitativna analiza provodi se tako da se položaji odjeljenih sastojaka uspoređuju s položajem standarda koji se obično razvijaju paralelno s uzorcima. Za kvantitativnu analizu mjeri se intenzitet obojenja detektirane mrlje, fluorescencije ili gašenje fluorescencije denzitometrom. Ova se kromatografska tehnika može povezati i s plameno ionizirajućim i plameno fotometrijskim detektorom, što je korisno u analizi organskih spojeva, uključujući i lipida u prirodnim vodama, tj . u moru.[44]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Instrumentacija

Elektrokemijska mjerenja napravljena su na polarografskom analizatoru Princeton Applied Research, model 174A koji je bio povezan s računalom. Kartica DAQ AI-16-XE-50 (National Instruments) omogućila je prihvat analognih podataka, dok su dobiveni podaci analizirani korištenjem aplikacije koja je razvijena u LabView 6,1 programu.

Stanice fitoplanktona uzgajane su u termostatiranoj vodenoj kupelji s miješanjem GFL 1086. Stanice su odvojene od hranjive podloge korištenjem centrifuge HiCen 21, Herolab. Gustoća stanica fitoplanktona određena je pomoću epifluorescencijskog mikroskopa Olympus, BX 51 i hemacitometra Fuchs-Rosenthal, Fein-Optik Jena, Germany, dubine jažice 0,2 mm.

Kako bi se napravila kvalitativna i kvantitativna karakterizacija lipida korištena je tankoslojna kromatografija s plameno ionizirajućim detektorom (TLC-FID). Uređaj IATROSCAN MK-VI (Iatron, Japan) koristi protok vodika 160 mL/min i zraka 2000 mL/min.

3.2. Ćelija i elektrode

Elektrokemijska mjerenja napravljena su u standardnoj Methromovoj ćeliji volumena 50 mL.

Sustav je troelektrodni i sastoji se od:

radne elektrode - kapajuća živina elektroda (KŽE)

referentne elektrode - Ag/AgCl (0,1 M NaCl)

protuelektrode - platinska žica

Mjerenja su napravljena na kapajućoj živinoj elektrodi s vremenom života kapi 2,08 s (kod potencijala -0,3 V), protokom žive kroz kapilaru 6,1 mg/s uz visinu stupca žive 36 cm. Maksimalna površina živine kapi je 4,7 mm^2. Referentna elektroda Ag/AgCl sadržavala je 0,1 mol dm^{-3} NaCl, a od mjerene otopine bila je odvojena keramičkom fritom. Potencijal je izražen s obzirom na referentnu elektrodu Ag/AgCl (0,1 mol dm^{-3} NaCl).

3.3. Kemikalije

Korištene su slijedeće kemikalije:

- Natrij klorid (NaCl) Kemika p.a.
- Natrij hidrogenkarbonat ($NaHCO_3$) Kemika p.a.
- Živa (Hg) Kemika p.a.
- Formaldehid (CH_2O) 36% Kemika p.a.

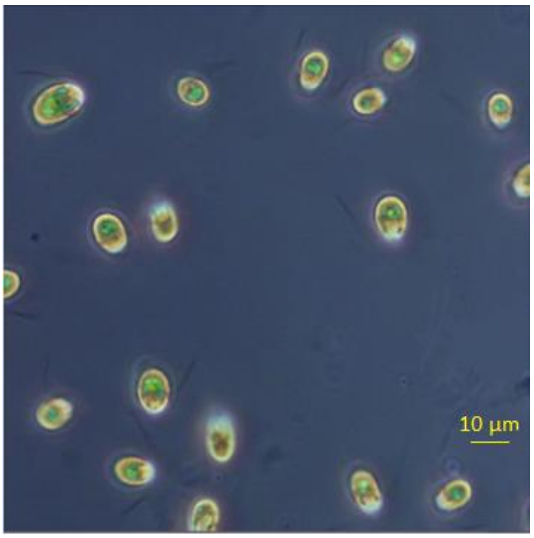
NaCl je pročišćavan žarenjem 5 sati na temperaturi od 450^oC da se uklone organske nečistoće. Metalna živa korištena u radnoj elektrodi dodatno je filtrirana kroz naborani filter papir kako bi se uklonili tragovi oksida. Voda koja se koristila u eksperimentalnom radu dobivena je pročišćavanjem bidestilirane vode kroz sistem Millipore-MilliQ (sadržaj otopljene organske tvari nalazi se u granicama 100-200 µg/L, vodljivost ~18 MΩ/cm). Posebno čisti dušik korišten je u radu za uklanjanje kisika iz otopine elektrolita.

3.4. Priprema otopina

Elektrokemijska mjerenja napravljena su u osnovnom elektrolitu 0,1 mol dm^{-3} NaCl. Osnovni elektrolit je priređen razrijeđivanjem zasićene otopine NaCl (5,5 mol dm^{-3}) s MilliQ H_20, a pH otopine je modificiran dodatkom odgovarajućeg volumena 0,5 mol dm^{-3} $NaHC0_3$ do pH mora (8,2).

3.5. Laboratorijska monokultura fitoplanktona *D. tertiolecta*

Laboratorijska monokultura fitoplanktona *D. tertiolecta* korištena je kao modelni stanični organizam. Slika 7 prikazuje fotomikrografiju stanica *D. tertiolecta*. Pojedinačne stanice su jednolike raspodjele veličina, ovalnog oblika, te su vidljivi bičevi. Stanice su nabavljene iz zbirke fitoplanktona od Provasoli-Guillard Center of Marine Phytoplankton, Bigelow Laboratory for Ocean Sciences, West Boothbay Harbour, Maine, USA.



Slika 7. Fotomikrografija pojedinačnih stanica *D. tertiolecta* u morskoj vodi.

Uzgoj stanica

Za uzgoj stanica korištena je F-2 podloga pripremljena po Guillard-ovoj recepturi. Sastav podloge je opisan u Guillard, 1975.[45] Ukratko: osnovne otopine hranjivih soli, tragova metala i vitamina koje su unaprijed bile priređene i čuvane na hladnom dodane su u filtriranu morsku vodu. Morska voda uzorkovana na sjevernom Jadranu na postaji SJ 107 na dubini od 20 m, datuma 20. veljače 2016., profiltrirana je kroz Millipore filter veličine pora 0,22 µm, kako bi se uklonile žive i nežive čestice. U Erlenmeyerove tikvice od 250 mL stavljeno je 100 mL profiltrirane morske vode. Mikropipetom su dodani odgovarajući alikvoti otopina nitrata i teških metala. Nakon sterilizacije podloge u poklopljenim Erlenmeyerovim tikvicama u trajanju od 3 minute u mikrovalnoj pećnici, podloga je ohlađena na sobnoj temperaturi pod UV lampom u komori za rad sa stanicama oko dva sata. U sterilnim uvjetima dodan je alikvot otopine fosfata, nekoliko kapi vitamina kroz sterilni akrodisk filter 0,22 mm te alikvot kulture stanica *D. tertiolecta.* Erlenmeyerove tikvice zatvorene su sterilnim vatenim čepom kako bi se omogućio protok zraka. Stanice su uzgajane u triplikatu u vodenoj kupelji na temperaturi 18,2^{o}C uz ciklus osvijetljenja (12h dan:12h noć) i miješanja kod 20 rpm (engl. round per minute). Kako bi se održao kontinuirani rast fitoplanktonske kulture, svakih 14-21 dana stanice su ponovno sterilno presađene.

Izolacija stanica

Stanice fitoplanktona su odvojene od hranjive podloge pažljivim centrifugiranjem (1000 g, 5 minuta) s obzirom na osjetljivost ovojnice i staničnu pokretljivost. Supernatant je odijeljen od ugušćenih stanica. Ugušćene stanice isprane su s filtriranom morskom vodom te stavljene na uređaj Vortex i ponovo centrifugirane. Postupak je ponovljen dva puta. Stanice su resuspendirane u 2 mL filtrirane morske vode, te je takvoj ugušćenoj suspenziiji stanica određena gustoća koja je iznosila od $5x10^5$/mL do $3x10^7$/mL.

Određivanje gustoće stanica

Gustoća stanica u kulturi određivana je tijekom njihovog rasta. Mikroskopski je praćen oblik, veličina i pokretljivost stanica u kulturi. Gustoća stanica *D. tertiolecta* određivana je u alikvotima ugušćenih suspenzija. Neposredno prije određivanja gustoće stanica dodan je alikvot neutraliziranog 36% formaldehida (neutraliziran dodatkom $CaCO_3$) u količini 2% od ukupnog volumena suspenzije kako stanice ne bi bile pokretne. Gustoća stanica određena je na način da je promatrano osam polja hemacitometra, tj. 1‰ćelija. Svako polje sastoji se od 16 ćelija. Dimenzija jedne ćelije je 250 x 250 x 200 μm, a volumen je 1,25 $x10^7$ μm^3.

3.6. Postupak elektrokemijskog mjerenja

Prije početka svakog elektrokemijskog mjerenja bilo je potrebno obratiti posebnu pažnju na čistoću sistema (voda, ćelija, elektrode, stakleno posuđe). Elektrokemijski sistem i posuđe prano je s MQ H_2O i s 10 % HNO_3. Čistoća sistema provjeravala se snimanjem polarograma redukcije kisika u čistom elektrolitu (0,1 mol dm^{-3} NaCl) tako da struja maksimuma iznosi 23 ± 1μA. Dodatno je čistoća sistema provjeravana snimanjem kronoamperometrijskih krivulja kod konstantnih potencijala. Kada je postignuta zadovoljavajuća čistoća sistema pristupilo se mjerenju staničnih suspenzija.

Suspenzija stanica za elektrokemijsko mjerenje je priređena na način da se određeni alikvot ugušćene suspenzije stanica doda u osnovni elektrolit, dopuni do oznake po potrebi, lagano promiješa, stavi u elektrokemijsku ćeliju i izravno snima polarogram redukcije kisika i kronoamperometrijske krivulje u prisutnosti kisika kod konstantnih potencijala. Nakon toga suspenzija stanica karakterizira se u odsutnosti kisika, na način da se kroz elektrokemijsku ćeliju propušta struja dušika u trajanju od dvije minute te se snimaju krivulje struja nabijanja površine o potencijalu i kronoampetrometrijske krivulje kod konstantnih potencijala na 50 uzastopnih živinih kapi. Sva mjerenja napravljena su pri 20°C.

3.7. Priprema uzorka za ekstrakciju lipidnog materijala

Određeni volumeni uzoraka stanične kulture (35-50 mL) poznate gustoće profiltrirani su na Milipore sustavu za filtraciju kroz GF/F veličine pora 0,7 µm. Lipidi zaostali na filteru pohranjeni su na -20^{o}C do ekstrakcije i analize. Dan prije ekstrakcije filter papir na kojem se nalaze lipidi iscjekan je u epruvetu te je dodano 9,5 mL mono-fazne otopine (diklormetan-metanol-voda, 1:2:0,8, v:v:v) i 10 µL n-heksadekanona koji služi kao unutarnji standard. Lipidi su ekstrahirani s 9,5 mL mono-fazne otopine koju čine diklormetan-metanol-voda (1:2:0,8, v:v:v), zatim s 9,5 mL dvo-fazne otopine koju čine diklormetan-0,73% NaCl (1:1, v:v) i na kraju s 10 mL diklormetana. Dobiveni ekstrakti prebacuju se u epruvete i uparavaju se do suhog u struji dušika koji osigurava inertnu atmosferu.

3.8. Postupak mjerenja i analiza na IATROSCANU

Pojedine lipidne klase moguće je odrediti tankoslojnom kromatografijom na ploči[46,47] ili kromarodama.[48] Za kvantitativnu analizu na kromarodama koristi se IATROSCAN, instrument sa funkcijom djelomičnog snimanja čime se omogućava opširnija analiza uzorka na samo jednoj kromarodi. Kromarode su uske kvarcne cjevčice presvučene tankim uniformnim slojem sintetiranog anorganskog punila i silicijevog dioksida. Deset kromaroda postavljeno je u metalni držač (Chromarod Holder SD-5, Analysesystem, Bechenheim, Njemačka). Skladište se u komori (model DE-3, Analysesysteme, Bechenheim, Njemačka) koja je izrađena od jednog komada kvarcnog stakla s poklopcem. Prije prvog korištenja kromarode je potrebno očistiti od organskih nečistoća od transporta i pakiranja. Čiste se tako da se razvijaju u sustavu otapala, te se nakon svakog razvijanja skeniraju u IATROSCANU brzinom od 30 s/snimanju. Prije svake upotrebe kromarode je potrebno isprati s MQ H_2O i acetonom, posušiti ih i snimiti u IATROSCANu kako bi bili sigurni da su sve nečistoće uklonjene. Nakon što su kromarode očišćene, uzorak se nanosi injekcijom (Hamilton) koja je fiksirana u okomitom djelu uzorkivača. Uzorci naneseni na kromarode postavljaju se u sustav otapala prilikom čega dolazi do jednolikog razvijanja lipidnog materijala. U tu svrhu koriste se posebne komore (model DT-150, Analysesysteme, Bechenheim, Njemačka) napravljene od jednog komada kvarcnog stakla, poklopca i filter papira. Korišten je sustav otapala koji se sastoji od 8 otopina rastuće polarnosti.[44] U svakoj od otopina razvija se određena klasa lipida. U tablici 1 navedena su korištena otapala, njihovi volumni omjeri, vrijeme razvijanja, i klase lipida koje se pritom razvijaju.

Tablica 1. Sustavi otapala, volumni omjeri i vrijeme potrebno za razvijanje klasa lipida u uzorcima i standardima na kromarodama SIII.

otapala	volumni omjeri	$t_{razvijanja}$ / min	lipidna klasa
heksan-dietileter-mravlja kiselina	80:20:0,2	20	Nepolarna (ST)
kloroform-aceton	72:28	30	Glikolipidi (MGDG, DGDG)
aceton-kloroform-metanol-mravlja kiselina	33:33:33:0,6	40	Glikolipidi (SQDG)
aceton-kloroform-metanol-amonijev hidroksid	50:50:5	30	Fosfolipidi (PE, PC)

- ST- sterol, MGDG- monogalaktozildiglicerol, DGDG- digalaktozildiglicerol, SQDG-sulfokinovozildiglicerid, PE- fosfatidiletanolamin, PC- fosfatidilkolin

U uparene uzorke dodan je određeni volumen diklormetana (između 30 µL i 100 µL). Zatim je uzorak nanesen na kromarodu poluautomatskim uzorkivačem. Naneseno je 2 µL svakog uzorka po kromarodi. Uzorci se nanose na kromarode na način da su prve dvije kromarode sadržavale standardne otopine modelnih lipida, dok se na ostale kromarode nanose uzorci tako da se svaki uzorak snima u duplikatu.

Nakon što su svi uzorci naneseni na kromarode one se postavljaju u sustav otapala kako bi došlo do postepenog razdvajanja lipidnog materijala. Kromarode se postavljaju u osam različitih sustava otapala i u svakom provode točno određeno vrijeme (tablica 1). Nakon svakog sustava otapala kromarodu je potrebno najprije posušiti, a zatim snimiti u IATROSCANu. Snimaju se netom razvijene klase lipida dok naneseni uzorci ostaju netaknuti kako bi se preostali lipidni materijal mogao razvijati u idućim otapalima.

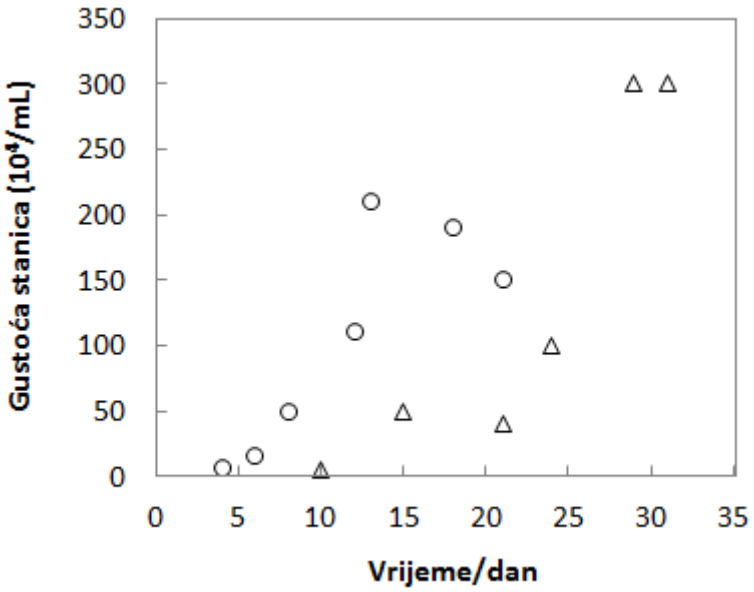
Dobiveni kromatogrami uspoređuju se sa standardima, te ih na taj način pripisujemo određenoj klasi lipida i određujemo površinu pika. Obradom prikupljenih podataka određene su točne količine pojedinih lipidnih klasa u analiziranim uzorcima na osnovu kalibracijskih krivulja za svaku klasu posebno.

4. REZULTATI

Ispitan je rast monokulture stanica *D. tertiolecta* u dva vodena medija različitog saliniteta: (i) morska voda (salinitet 38 ‰) i (ii) morska voda razrijeđena 5 puta (salinitet 8 ‰) što su uvjeti slični boćatim vodama. U vodeni medij dodane su komponente za F-2 hranjivu podlogu. Rast, oblik, veličina i pokretljivost stanica praćeni su mikroskopski. Uzorci staničnih suspenzija karakterizirani su dvojako: (i) elektrokemijski da se ispita adhezijsko ponašanje stanica na nabijenoj međupovršini, te (ii) tankoslojnom kromatografijom da se odredi sastav i koncentracija glavnih klasa lipida u cjelokupnom staničnom materijalu.

4.1. Rast stanica *D. tertiolecta* u kulturi

Slika 8 prikazuje krivulje rasta *D. tertiolecta* u vodenom mediju različitog saliniteta. Ovisnost gustoće stanica o vremenu praćena je svakih nekoliko dana. Krivulja rasta stanica sastoji se od tri faze: 1) početna lag faza do koje dolazi ubrzo nakon inokulacije stanica; 2) eksponencijalna log faza kada stanice ubrzano rastu; 3) stacionarna faza kada više ne dolazi do dijeljenja stanica (rast se usporava). Nakon stacionarne faze stanice počinju odumirati i gustoća se smanjuje. Vidljivo je da su stanice fitoplanktona brže rasle u boćatoj vodi, tj. kod nižeg saliniteta.



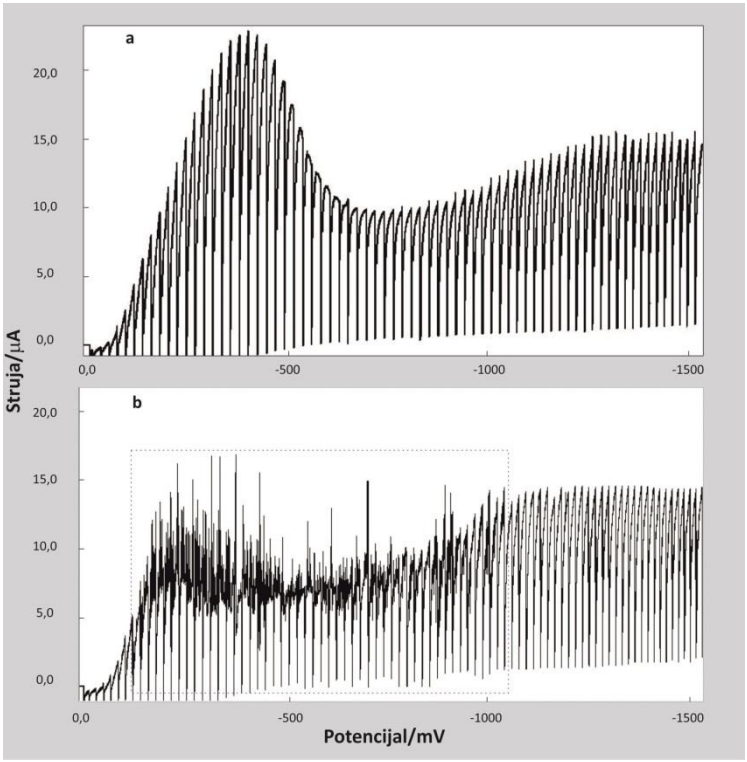
Slika 8. Krivulja rasta stanica fitoplanktona *D. tertiolecta* u kulturi kod a) Δ-višeg saliniteta; b) ○-nižeg saliniteta.

4.2. Elektrokemijska karakterizacija suspenzije stanica fitoplanktona u prisutnosti kisika

Elektrokemijska karakterizacija suspenzije stanica *D. tertiolecta* provedena je polarografskim i kronoamperometrijskim mjerenjima na KŽE u 0, 1 mol dm^{-3} NaCl. Osnovni elektrolit 0,1 mol dm^{-3} NaCl izabran je zbog opsežnih literaturnih podataka o napetosti međupovršine i gustoći naboja koji su od važnosti za analizu pojedinačnih signala prianjanja.[49-51] Ispitivane suspenzije živih stanica bile su karakterizirane direktno tj. uranjanjem KŽE u mjernu otopinu poznate gustoće stanica, bez dodatne manipulacije uzorka, kako bi se sačuvao integritet stanica i njena pokretljivost.

Polarografska mjerenja

Interakciju stanica fitoplanktona s KŽE možemo elektrokemijski pratiti snimanjem polarograma redukcije kisika gdje se potencijal mijenja linearno u vremenu. Slika 9 prikazuje polarogram redukcije kisika snimljen prije (a) i nakon dodatka stanične suspenzije u otopinu elektrolita (b). Snimanje jednog polarograma traje približno dvije minute. Prije dodatka stanica, polarogram je savršeno gladak, pravilan, maksimalna struja je zadovoljavajuća, što upućuje da je sistem čist (nema mikrometarskih čestica niti organskih tragova). Stanice su izolirane od hranjive podloge nakon 20 dana rasta, te je mjerna suspenzija priređena razrijeđivanjem ugušćenih stanica s 0,1 mol dm^{-3} NaCl. Prisutnost stanica fitoplanktona u osnovnom elektrolitu uzrokuje pojavu nepravilnih perturbacija (signala) na polarogramu redukcije kisika (slika 9b). Nepravilne perturbacije na polarogramu pojavljuju se samo u području kritičnih potencijala od -150 mV do -1050 mV što je označeno okvirom na slici 9b. Izvan tog područja potencijala (pozitivnije i negativnije) nema adhezije stanica na elektrodi te je polarogram pravilan kao u otopini osnovnog elektrolita (slika 9a).

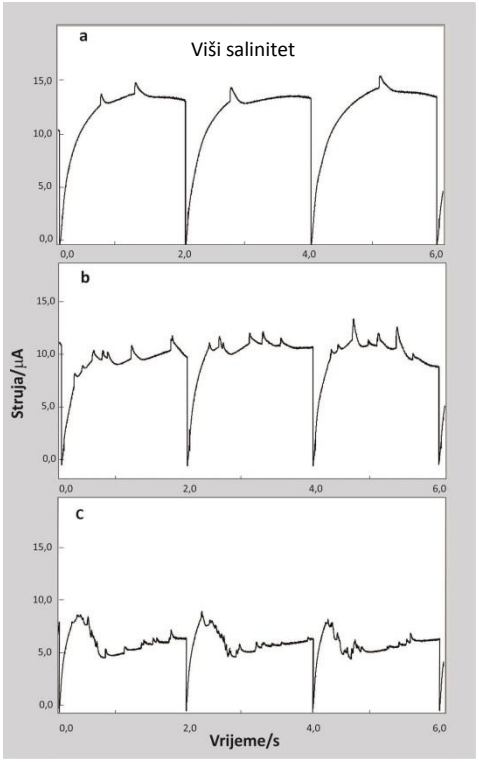


Slika 9. Polarogrami redukcije kisika snimljeni u a) 0,1 mol dm^{-3} NaCl**,** b) suspenziji stanica *D. tertiolecta* 1x10^6/mL.

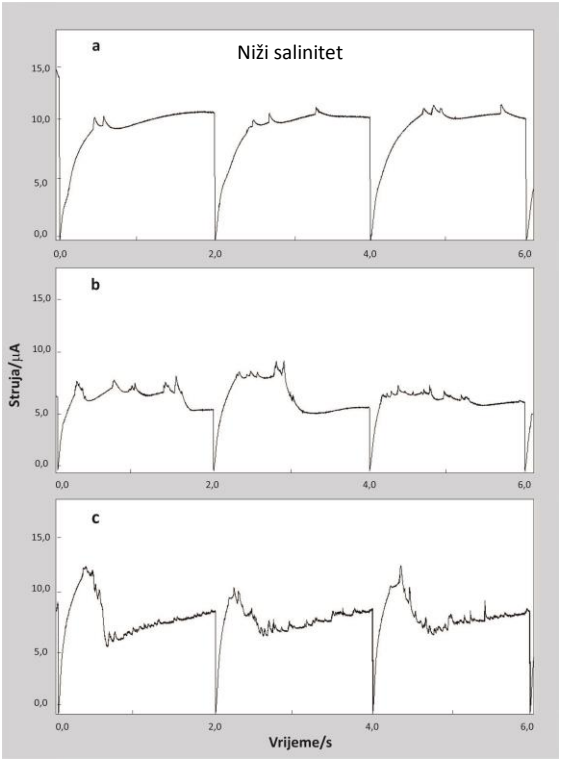
Kronoamperometrijska mjerenja

U cilju preciznije karakterizacije stanične suspenzije, nakon polarograma snimljene su kronoamperometrijske krivulje kod konstantnog potencijala. Sve krivulje *I-t* snimane su s vremenskim razlučivanjem od 1 ms. Slika 10 i slika 11 prikazuju tri uzastopne kronoamperometrijske krivulje snimljene kod različitih koncentracija staničnih suspenzija u 0,1 mol dm^{-3} NaCl pri potencijalu od -400 mV. Kronoamperometrijske krivulje na slici 10 odnose se na stanice fitoplanktona koje su rasle u morskoj vodi, dok se krivulje na slici 11 odnose na stanice fitoplanktona koje su rasle u razrijeđenoj morskoj vodi. Potencijal od -400 mV je izabran zato što je: (i) struja redukcije kisika najosjetljivija na adsorpciju organskih molekula i adheziju organskih mikročestica; (ii) elektroda nabijena pozitivno i (iii) napetost međupovšine kod potencijala -400 mV je vrlo blizu maksimalnoj napetosti površine kod -505 mV. Na krivuljama *I-t* vidljivi su dobro definirani signali prianjanja pojedinačnih stanica fitoplanktona. Učestalost adhezijskih signala povećava se s porastom koncentracije stanica u mjernoj suspenziji. Različita učestalost pojave signala na pojedinim *I-t* krivuljama iz iste suspenzije ukazuje na stohastičku prirodu procesa. Sa slika možemo uočiti da ne postoji značajnija razlika u obliku i trajanju signala prianjanja stanica.

Međutim, vidljivo je da je struja redukcije kisika različita na kraju kronoamperometrijskih krivulja snimljenih kod sličnih gustoća stanica, što se pripisuje različitom sadržaju submikronske organske frakcije (produkti lučenja stanica) koja se istovremeno adsorbiraju na elektrodu.

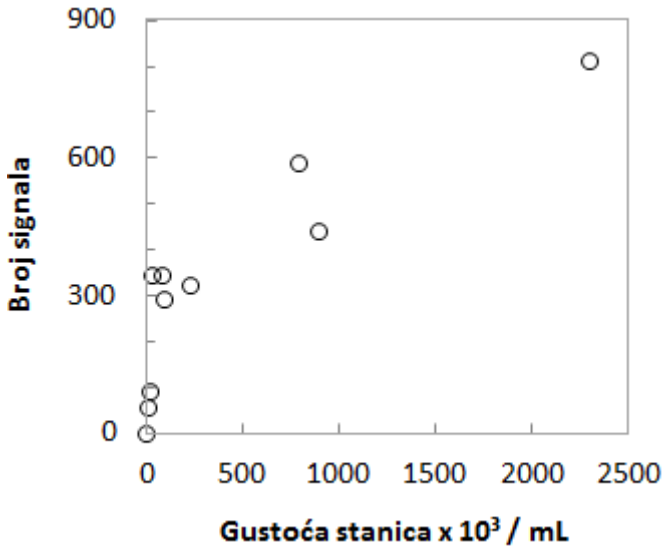


Slika 10. Uzastopne krivulje *I-t* snimljene u prisutnosti kisika u suspenzijama stanica *D. tertiolecta*: a) 2,3x10^4/mL, b) 2,3x10^5/mL, c) 2,3x10^6/mL u 0,1 mol dm^{-3} NaCl kod potencijala -400 mV.



Slika 11. Uzastopne krivulje *I-t* snimljene u prisutnosti kisika u suspenzijama stanica *D. tertiolecta*: a) 9,0x10^3/mL, b) 9,0x10^4/mL, c) 9,0x10^5/mL u 0,1 mol dm^{-3} NaCl kod potencijala -400 mV.

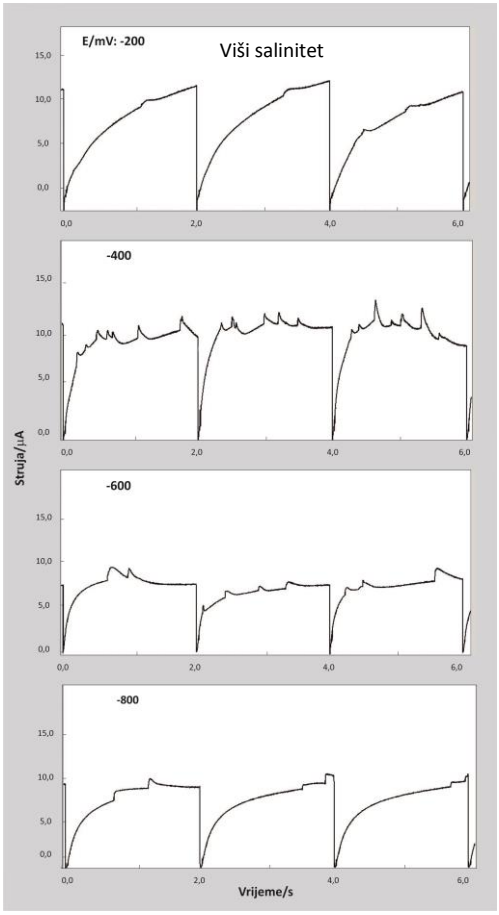
Ispitana je ovisnost brojnosti signala stanica o rastućoj gustoći suspenzije (u području od 10^3 do 10^6 stanica/mL) kod potencijala -400 mV. Praćen je broj signala na 50 uzastopnih *I-t* krivulja snimljenih u prisutnosti kisika, tj. u periodu od oko 100 sekundi. Slika 12 prikazuje da se s porastom gustoće stanica do 10^6/mL povećava brojnost signala prianjanja stanica, te da vrijedi linearnost kod nižih gustoća stanica**.**



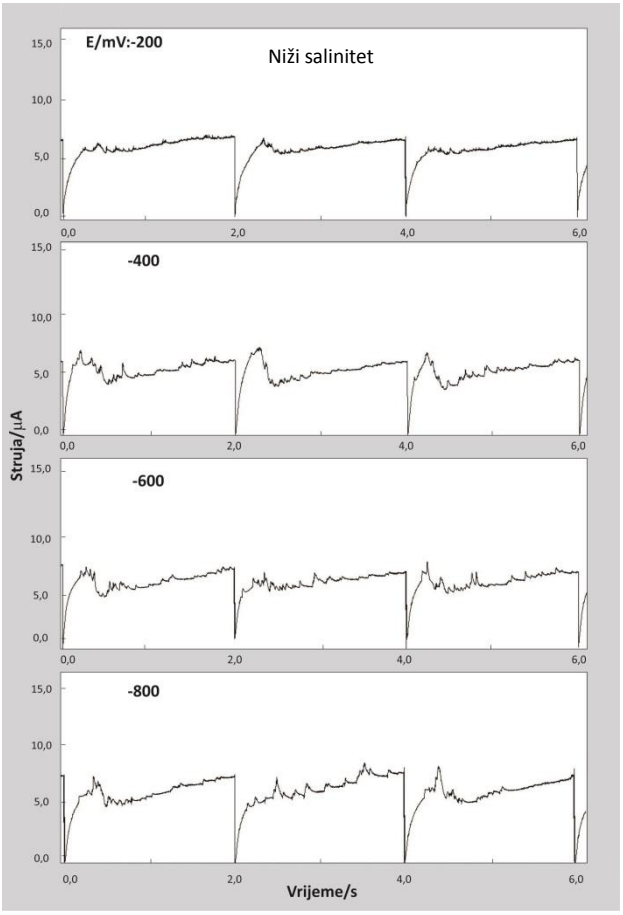
Slika 12. Ovisnost broja signala stanica *D. tertiolecta* o gustoći suspenzije kod potencijala -400 mV.

Slika 13 i slika 14 prikazuju tri uzastopne krivulje *I-t* snimljene u suspenziji stanica kod različitih potencijala. Signali na slici 13 odnose se na stanice fitoplanktona koje su rasle u morskoj vodi, a signali na slici 14 odnose se na signale prianjanja stanica koje su rasle u razrijeđenoj morskoj vodi. Najviše signala prianjanja stanica je zabilježeno kod potencijala -400 mV. Pomakom potencijala znatno pozitivnije ili znatno negativnije od -400 mV brojnost signala prianjanja se smanjuje. Kod potencijala koji su blizu kritičnih potencijala kao kod -200 mV (elektroda nabijena pozitivno) i -800 mV (elektroda nabijena negativno), brojnost signala prianjanja stanica se smanjuje.

Uočavamo da su signali prianjanja stanica koje su rasle u razrijeđenoj morskoj vodi manjih amplituda u odnosu na signale prianjanja stanica koje su rasle u morskoj vodi (veće sniženje struje redukcije kisika na kraju kronoamperometrijske krivulje) što je vjerojatno posljedica većeg sadržaja otopljene organske tvari. Brojnost signala prianjanja stanica veća je na slici 14 za sličnu koncentraciju stanica kod različitih potencijala.



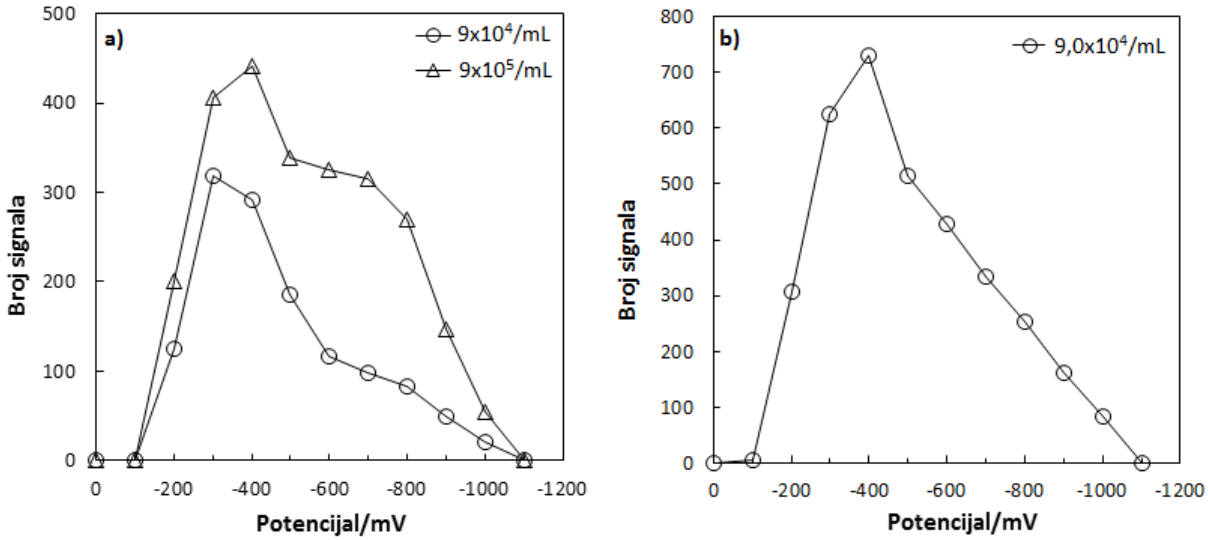
Slika 13. Uzastopne krivulje *I-t* snimljene u prisutnosti kisika u suspenziji stanica *D. tertiolecta* 2,3x10^5/mL u 0,1 mol dm^{-3} NaCl kod različitih potencijala.



Slika 14. Uzastopne krivulje *I-t* snimljene u prisutnosti kisika u suspenziji stanica *D. tertiolecta* 9,0x10^5/mL u 0,1 mol dm^{-3} NaCl kod različitih potencijala.

Slika 15 prikazuje ovisnost broja signala stanica u suspenzijama različitih koncentracija o potencijalu. Slika 15a prikazuje podatke koji se odnose na stanice *D. tertiolecta* koje su rasle u morskoj vodi, a slika 15b se odnosi na stanice koje su rasle u razrijeđenoj morskoj vodi. Vidljivo je da s porastom koncentracije stanica fitoplanktona u mjerenoj suspenziji dolazi do povećanja broja signala u širokom području potencijala. Ispitano je kako brojnost signala ovisi o primjenjenom potencijalu na elektrodi. Najveće prianjanje stanica je zabilježeno u području potencijala blizu elektrokapilarnog maksimuma. Brojnost signala prianjanja je oko dva puta veća na pozitivno nabijenoj elektrodi (-400 mV) nego na negativno nabijenoj elektrodi (-800 mV), što ukazuje na utjecaj elektrostatskih interakcija između pozitivno nabijene elektrode i negativno nabijene stanice. Zabilježeni su signali prianjanja stanica kod potencijala -500 mV (naboj na elektrodi nula, maksimalna napetost međupovršine) zbog doprinosa Faradayske struje uslijed redukcije molekularnog kisika iz otopine.

Važno je napomenuti da adheziju stanica ne ometa transportni proces redoks vrste iz otopine. Sa slike uočavamo jednako područje potencijala prianjanja stanica *D. tertiolecta* u uvjetima rasta u morskoj vodi i u razrijeđenoj morskoj vodi. Jedina je razlika što je u slučaju rasta stanica *D. tertiolecta* u mediju s razrijeđenom morskom vodom uočen veći broj signala kod konstantnog potencijala -400 mV, što je vjerojatno doprinos izlučenih mikrometarskih čestica uslijed fiziološke aktivnosti stanica.



Slika 15. Ovisnost broja signala prianjanja stanica *D. tertiolecta* o potencijalu snimljena pri različitim koncentracijama suspenzija u prisutnosti kisika. Stanice koje su rasle kod a) višeg saliniteta, b) nižeg saliniteta.

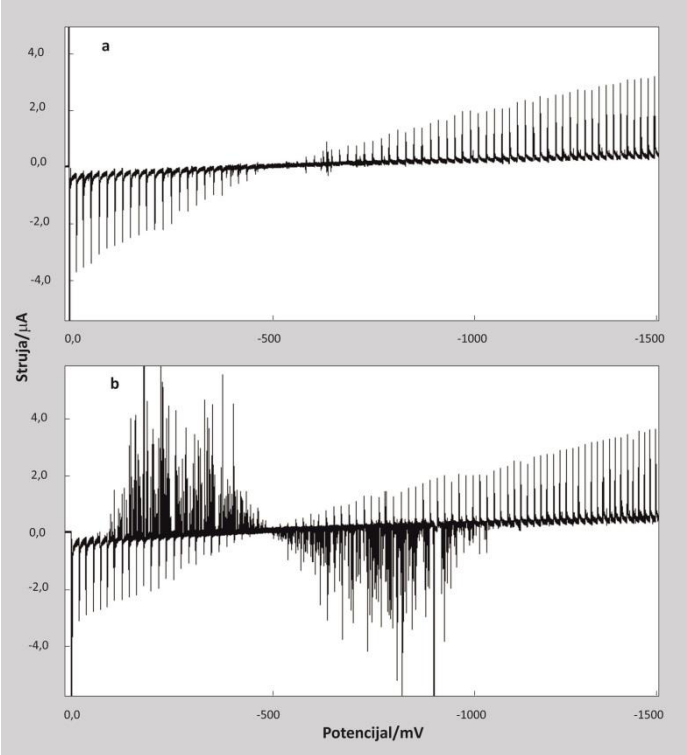
4.3. Elektrokemijska karakterizacija stanica fitoplanktona bez prisutnosti kisika

Svježe pripremljena suspenzija stanica poznate gustoće je propuhivana strujom dušika u elektrokemijskoj ćeliji oko 1 minutu da se ukloni otopljeni kisik. Nakon toga su snimane krivulje struje nabijanja živine elektrode i kronoamperometrijske krivulje.

Krivulja struje nabijanja živine elektrode

Kad se ukloni kisik iz mjerne otopine, tada se bilježi krivulja koja prati ovisnost struje nabijanja živine elektrode o potencijalu. Slika 16 prikazuje krivulju struje nabijanja živine elektrode snimljene prije dodatka stanica (a) te nakon dodatka alikvota stanične suspenzije koja je postala perturbirana (b). Područje potencijala na kojem su vidljive perturbacije na krivulji (-100 mV do -1050 mV) je područje u kojem dolazi do adhezije stanica na elektrodi, za razliku od prvotne struje nabijanja koja je bila pravilna i glatka. Na potencijalima koji su pozitivniji od potencijala elektrokapilarnog maksimuma gdje je površina živine elektrode

nabijena pozitivno, signali prianjanja su u smjeru struje redukcije (tj. prema gore). Na negativnijim potencijalima od potencijala elektrokapilarnog maksimuma gdje je površina žive nabijena negativno, signali prianjanja su u smjeru struje oksidacije (tj. mijenjaju smjer prema dolje). Kod potencijala elektrokapilarnog maksimuma gdje je naboj na elektrodi nula, broj signala pada na minimum jer nema naboja za potisnuti pa se adhezija stanice ne može registrirati.

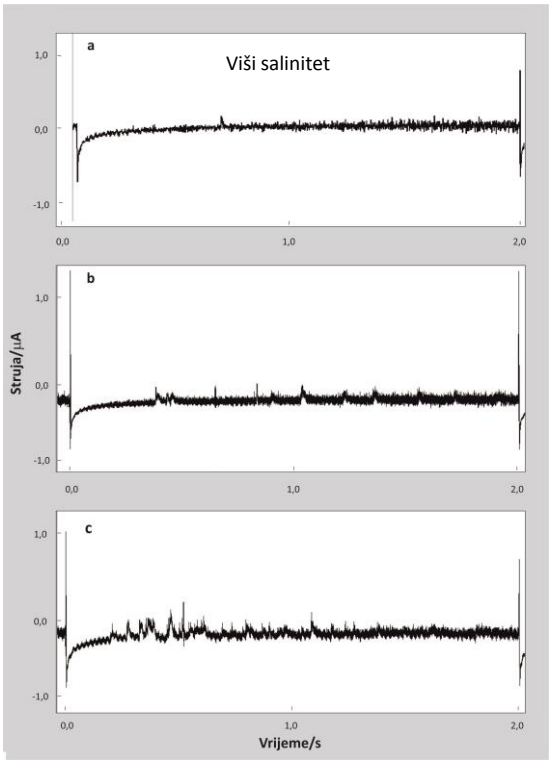


Slika 16. Krivulje struje nabijanja živine površine u (a) 0,1 mol dm^{-3} NaCl, (b) suspenziji stanica *D. tertiolecta* $1x10^6$/mL.

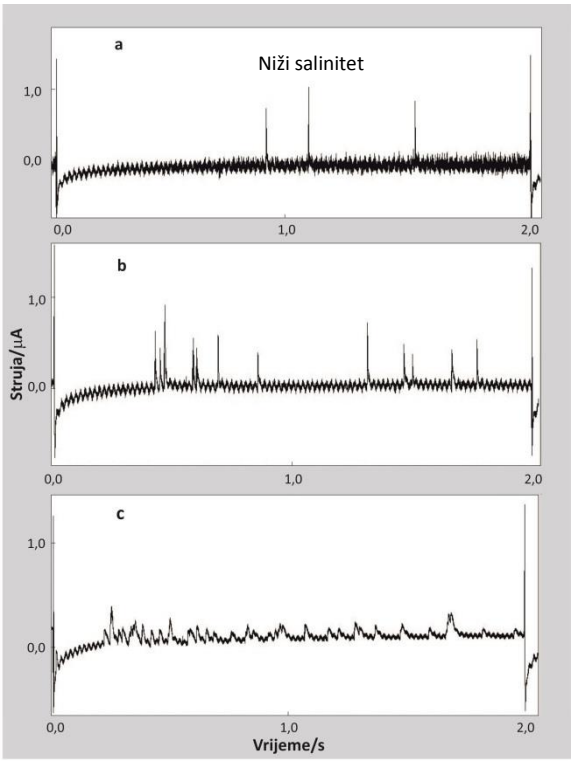
Kronoamperometrijska mjerenja

U cilju preciznije karakterizacije stanične suspenzije, snimljene su kronoamperometrijske krivulje u odsutnosti kisika kod konstantnog potencijala. Slika 17 i slika 18 prikazuju uzastopne *I-t* krivulje snimljene u suspenzijama stanica različitih koncentracija kod potencijala -400 mV. Kod potencijala -400 mV elektroda je pozitivno nabijena te signali prianjanja imaju smjer struje redukcije. Signali prianjanja stanica su sličnog oblika i amplitude što je u skladu s detekcijom u monodisperznom sistemu. Signali prianjanja stanica snimljeni u odsutnosti kisika sadržavaju samo struju potiskivanja naboja dvosloja, stoga je amplituda signala znatno manja u odnosu na signale prianjanja stanica snimljene u prisutnosti kisika.

Razlog tomu je što je kisik uklonjen iz mjerne otopine pa nema niti redoks reakcije otopljenog kisika koja pojačava signal prianjanja (slika 10, 11, 13, 14). Brojnost signala prianjanja ovisi o gustoći stanica u mjernoj suspenziji. Što je veća gustoća stanica fitoplanktona u suspenziji detektiramo više perturbacija na *I-t* krivuljama.[48] Slika 17 odnosi se na signale prianjanja stanica fitoplanktona koje su rasle u morskoj vodi, a slika 18 odnosi se na stanice fitoplanktona koje su rasle u razrijeđenoj morskoj vodi. Dobiveni signali prianjanja snimljeni na -400 mV (slika 18) su izraženiji su od signala prianjanja na slici 17. Porastom gustoće stanica raste i broj signala prianjanja stanica.



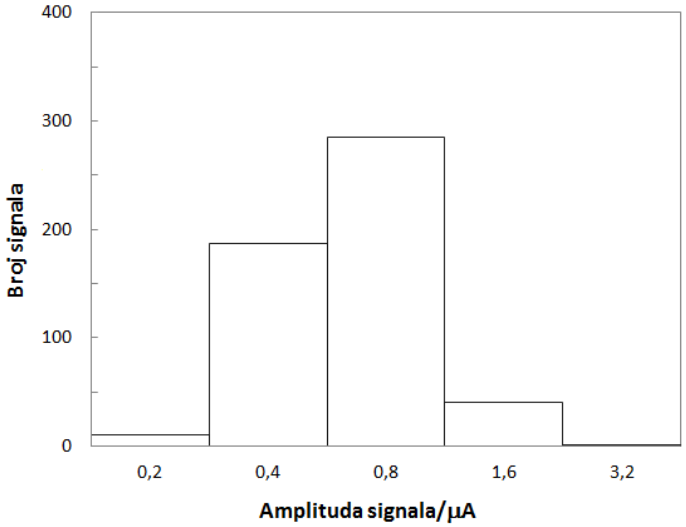
Slika 17. Uzastopne krivulje *I-t* snimljene bez prisutnosti kisika u suspenzijama stanica *D. tertiolecta*: a) 2,3x10^4/mL, b) 2,3x10^5/mL, c) 2,3x10^6/mL u 0,1 mol dm^{-3} NaCl kod potencijala -400 mV.



Slika 18. Uzastopne krivulje *I-t* snimljene bez prisutnosti kisika u suspenzijama stanica *D. tertiolecta*: a) 7,0x10^3/mL, b) 3,5x10^4/mL, c) 7,0x10^5/mL u 0,1 mol dm^{-3} NaCl kod potencijala -400 mV.

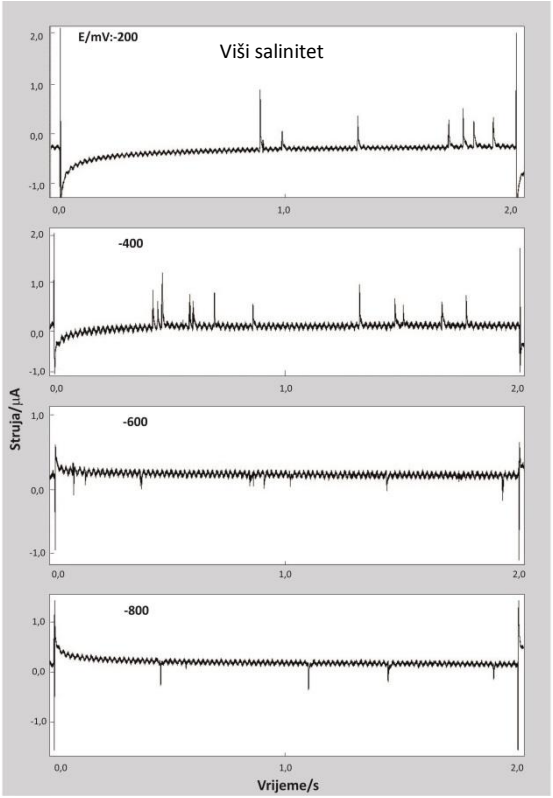
Analizom amplitude signala prianjanja možemo dobiti informaciju o stupnju polidisperznosti ispitivanog sistema. Slika 19 prikazuje ovisnost broja signala prianjanja stanica o amplitudi signala. Za primjer su uzete *I-t* krivulje snimljene u suspenziji stanica 2,3x10^5/mL kod potencijala -400 mV u uvjetima bez prisutnosti kisika. Iz slike je vidljivo da je 90 % signala u rasponu amplitude od 0,4-0,8 μA, za stanice koje su rasle kod višeg saliniteta.

Mala frakcija ostalih čestica može se pripisati agregaciji produkata staničnog lučenja. Možemo reći da je naš sustav monodisperzan zbog uske raspodjele amplituda što je u slaganju s rasponom veličine same stanice 6-10 μm. Amplituda signala prianjanja proporcionalna je veličini čestice.[31]

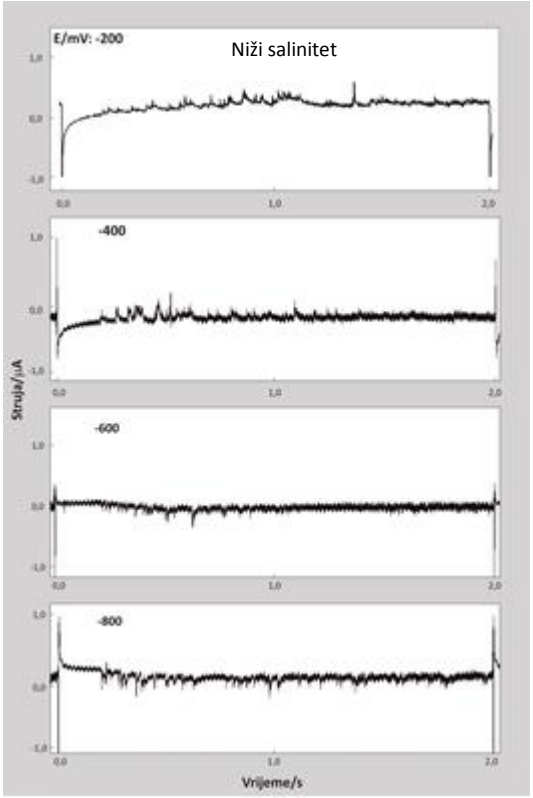


Slika 19. Ovisnost broja signala prianjanja stanica *D. tertiolecta* 2,3x10^5/mL o amplitudi signala snimljeno kod potencijala -400 mV u uvjetima bez prisutnosti kisika.

Slika 20 i slika 21 prikazuju krivulje *I-t* snimljene u mjernoj otopini poznate gustoće stanica kod različitih potencijala. Slika 20 odnosi se na signale prianjanja stanica fitoplanktona koje su rasle u morskoj vodi, a signali na slici 21 odnose se na stanice koje su rasle u razrijeđenoj morskoj vodi. Iz slika je vidljivo da na pozitivno nabijenoj elektrodi (-200 mV, -400 mV) signali prianjanja imaju isti smjer. Promjenom polariteta elektrode tj. kada je elektroda negativno nabijena (-600 mV, -800 mV) signali prianjanja mijenjaju smjer. Činjenica da signali prianjanja stanica mijenjaju smjer je dokaz da signal nastaje uslijed potiskivanja naboja električnog dvosloja zbog adhezije i širenja stanice po nabijenoj međupovršini. Brojnost signala prianjanja je veća kod potencijala -400 mV i -600 mV, nego kod -200 mV (blizina kritičnog potencijala) i -800 mV (uslijed elektrostatskog odbijanja).

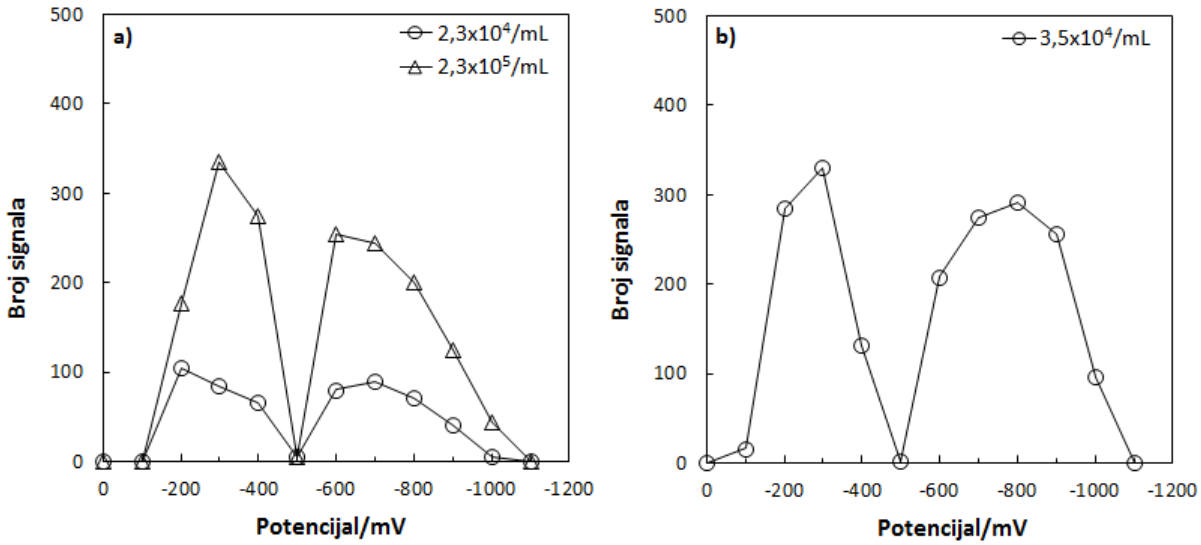


Slika 20. Uzastopne krivulje *I-t* snimljene bez prisutnosti kisika u suspenziji stanica *D. tertiolecta* 2,3x10^5/mL u 0,1 mol dm^{-3} NaCl kod različitih potencijala.



Slika 21. Uzastopne krivulje *I-t* snimljene bez prisutnosti kisika u suspenziji stanica *D. tertiolecta* 7,0x10^5/mL u 0,1 mol dm^{-3} NaCl kod različitih potencijala.

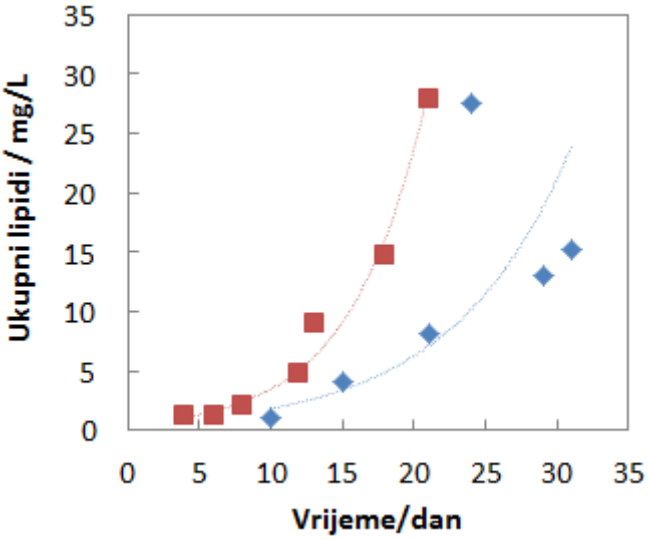
Slika 22 prikazuje ovisnost broja signala prianjanja stanica o potencijalu pri različitim koncentracijama. Brojnost signala prianjanja na slici 22a se odnosi na stanice koje su rasle u morskoj vodi, dok su na slici b prikazani rezultati koji se odnose na razrijeđenu morsku vodu. U području potencijala kod kojeg dolazi do adhezije stanica (-100 mV do -1100 mv) brojnost signala prianjanja se mijenja. Brojnost signala prianjanja stanica je blizu maksimalne vrijednosti kod potencijala -300 mV (blizina elektrokapilarnog maksimuma). Kod potencijala -500 mV kada je naboj na elektrodi blizu nula (elektrokapilarni maksimum), brojnost signala prianjanja pada na minimum. Pri potencijalima pozitivnijim od -500 mV uočen je veći broj signala, a pri potencijalima negativnijim od -500 mV uočavamo manji broj signala. Razlog tomu je doprinos elektrostatskih interakcija u procesu adhezije negativno nabijenih stanica na negativno nabijenoj elektrodi. Porastom gustoće stanica raste brojnost signala prianjanja stanica.



Slika 22. Ovisnost broja signala prianjanja stanica *D. tertiolecta* o potencijalu snimljena pri različitim koncentracijama suspenzija bez prisutnosti kisika. Stanice koje su rasle kod a) višeg saliniteta, b) nižeg saliniteta.

4.4. Određivanje sastava lipida tankoslojnom kromatografijom

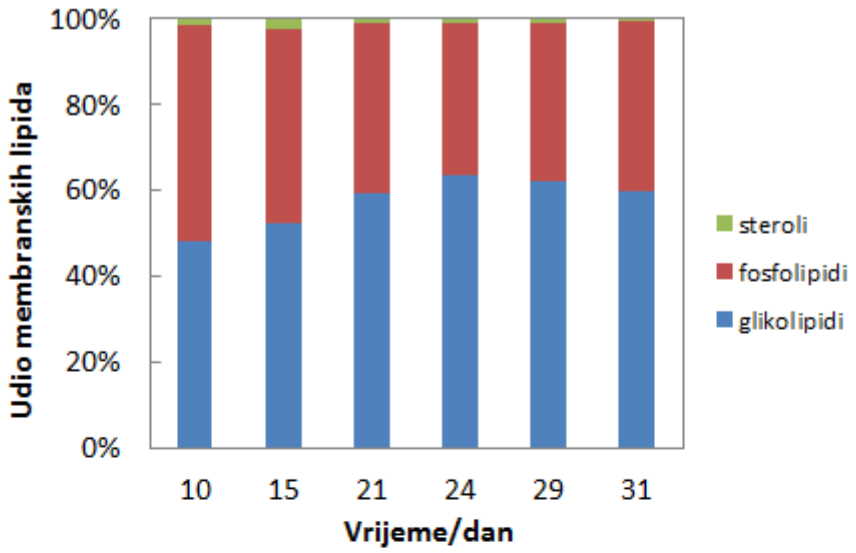
Lipidi su biološki važne molekule bogate ugljikom koje sudjeluju u izgradnji i funkcioniranju stanica. Obzirom na polarnost, lipide dijelimo na nepolarne (npr. steroli, ugljikovodici) i polarne (npr. glikolipidi, fosfolipidi). Slika 23 prikazuje ovisnost ukupne koncentracije lipida tijekom rasta stanične kulture kod dva različita saliniteta. Vidljivo je da s vremenom dolazi do porasta koncentracije ukupnih lipida u oba slučaja. U početnoj fazi rasta dolazi po blagog porasta koncentracije lipida dok najveći porast uočavamo za vrijeme eksponencijalne faze rasta stanične kulture. Dobiven je veći porast koncentracije ukupnih lipida tijekom rasta stanica kod nižeg saliniteta.



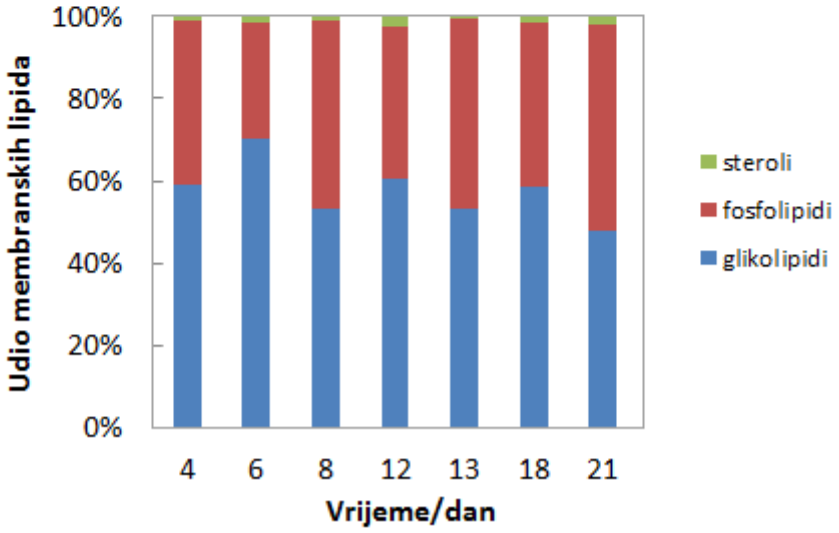
Slika 23. Promjena koncentracije ukupnih lipida stanica fitoplanktona *D. tertiolecta* tijekom životnog ciklusa u mediju ◊-višeg saliniteta; □-nižeg saliniteta.

Analizirane su pojedine komponente unutar polarne i nepolarne skupine lipida. Zamijećeno je da polarni lipidi (fosfolipidi i glikolipidi) čine velik udio u ukupnoj koncentraciji lipida u odnosu na nepolarne lipide (steroli). Na slikama 24 i 25 prikazana je promjena udjela membranskih lipida fosfolipida, glikolipida i sterola tijekom rasta stanične kulture. Udio glikolipida je najveći u svim fazama rasta što je primjećeno u oba medija neovisno o salinitetu. Sa slike 24 vidimo da tijekom rasta stanične kulture udio glikolipida raste. Kada je riječ o fosfolipidima uočavamo suprotan trend u odnosu na glikolipide. Udio fosfolipida se smanjenjuje tijekom rasta stanične kulture.

Sa slike 25 vidimo da dolazi do porasta udjela fosfolipida u membranskim lipidima tijekom rasta stanične kulture kod nižeg saliniteta dok se udio glikolipida smanjuje. Udio sterola podjednako je prisutan u svim fazama rasta stanica.



Slika 24. Udio membranskih lipida tijekom rasta stanica *D. tertiolecta* u mediju višeg saliniteta.



Slika 25. Udio membranskih lipida tijekom rasta stanica *D. tertiolecta* u mediju nižeg saliniteta.

5. RASPRAVA

Morski fitoplankton *Dunaliella* je široko rasprostranjen u vodenom okolišu te predstavlja jedan od najpoznatijih halotolerantnih organizama koji pokazuje zapanjujuću prilagodbu u širokom rasponu koncentracija soli.[52] U vodenom okolišu različiti uzročnici stresa (salinitet, temperatura, pH, prisutnost zagađivala i nanočestica) utječu na rast i prilagodbu stanice što se posljedično odražava na površinska svojstva stanice, njenu fiziološku aktivnost te složene biokemijske procese unutar stanice.

Kultura stanica *D. tertiolecta* istraživana u ovom radu vrlo je podložna vanjskim uzročnicima stresa iz medija jer stanica nema staničnu stijenku nego samo fleksibilnu staničnu membranu koja ju odvaja od okoline. Kultura stanice *D*. *tertiolecta* uspješno je rasla u mediju kod nižeg i višeg saliniteta što je u slaganju s literaturom. Zamijećen je brži rast kulture stanice *D. tertiolecta* u mediju nižeg saliniteta (8 ‰) nego u mediju višeg saliniteta (38‰, ionska jakost 0,7 M) dok su ostali eksperimentalni parametri ostali nepromijenjeni. U literaturi je opisano ispitivanje stanica *D. tertiolecta* u širokom području ionske jakosti. Kultura stanica *D. tertiolecta* ima optimalan rast pri ionskim jakostima između 0,2 M i 0,5 M.[53] U slučaju kada je kultura stanica *D. tertiolecta* rasla u 0,5 M NaCl i zatim bila transferirana na veće salinitete (3,5 M) bilo je potrebno određeno vrijeme adaptacije.[54] Pri salinitetu manjem od 0,02 M rast stanica *Dunalielle* je ograničen dok je kod saliniteta većih od 2,5 M stanicama potrebno konstantno osvjetljenje.[55] Međutim ako se stanica *D. tertiolecta* izloži ekstremnim uvjetima na način da se izloži samo vodi, dolazi do osmotskog šoka te ispuštanja unutarstaničnog materijala i fuzije membrane. Takva membrana je idealno rekonstruirana prirodna membrana jer posjeduje lipidne, proteinske i šećerne komponente. Rekonstruirana membrana smatra se kao dobar model za istraživanje međupovršinskih procesa na izoliranoj membrani kada su kompleksni procesi unutar stanice isključeni.[7]

Poznato je da *Dunaliella* posjeduje posebni mehanizam osmoregulacije za prilagdbu na različite koncentracije soli u mediju mijenjanjem unutarstanične koncentracije glicerola.[56] Unutarstanična koncentracija glicerola izravno je proporcionalna koncentraciji soli u mediju. Prva indikacija koja je pokazivala da se glicerol akumulira u stanici *Dunaliella* i osigurava osmotsku ravnotežu diskutirali su Craigie i McLachlan (1964).[57]

Biosinteza ili eliminacija glicerola može se odvijati i na svjetlosti i u tami zahvaljujući posebnim enzimima koji stvaraju i degradiraju glicerol u citoplazmi.[58] Zapaženo je da kod stanice *Dunaliella* koje su rasle u mediju visoke koncentracije soli dolazi do ubrzavanja fotosintetske aktivnosti, te se nastali ugljik koristi kao izvor energije za sintezu glicerola. Sposobnost stanice *Dunaliella* da ubrza fotosintetsku aktivnost kod visokih koncentracija soli je zapanjujuća, jer u većini biljaka i cijanobakterija visoke koncentracije soli inhibiraju fotosintezu.[59]

Elektrokemijskim pristupom ispitana su svojstva adhezije stanica na nabijenoj međupovršini. Za proces adhezije važna su površinska svojstva stanice te svojstva ostalih međupovršina u kontaktu. Zapaženo je da stanica prianja u širokom području potencijala i na pozitivnoj i negativno nabijenoj međupovršini. Nisu uočene razlike u području potencijala prianjanja za stanice koje su rasle kod ispitivanih saliniteta. To upućuje da su površinska svojstva stanične membrane vjerojatno ostala sačuvana barem na mikrometarskom nivou. Doprinos gustoće površinskog naboja na stanici (koji u 0,1 mol dm^{-3} NaCl iznosi -0,63 $\mu C/cm^2$)[60] reflektira se na manju efikasnost prianjanja stanica na negativno nabijenoj elektrodi uslijed elektrostatskog odbijanja (slika 22). Ovakvo ponašanje je u skladu s prethodno istraženim sistemima kapljica organskih tekućina različite polarnosti na KŽE. Nepolarni ugljikovodici pokazivali su podjednaku interakciju na pozitivno i negativno nabijenoj elektrodi dok su kapljice polarnih organskih spojeva pokazale su nižu efikasnost prianjanja na negativno nabijenoj elektrodi.[41,61]

Adhezija stanica na nabijenoj elektrodi detektira se preko dobro definiranih signala prianjanja. Proces adhezije i širenja stanice *Dunaliella* na elektrodi traje svega oko 4 ms. Razlog vrlo brzom procesu je fleksibilnost stanične membrane koja se brzo deformira i širi na fluidnoj i rastućoj površini KŽE. U nezavisnim preeliminarnim mjerenjima karakterizirana je stanica *Dunaliella* na nanomehaničkom nivou primjenom mikroskopije atomskih sila (AFM, neobjavljeni rezultati) gdje je po prvi puta određeno da je stanica *Dunaliella* vrlo mekana a time i deformabilna, što je u skladu s brzom dinamikom procesa adhezije stanica na elektrodi.[7]

S obzirom na linearnu ovisnost brojnosti signala prianjanja kod niže gustoće stanica, stanica *Dunaliella* se može koristiti kao unutarnji standard za analizu morskih uzoraka. Kod većih koncentracija stanične suspenzije dolazi do preklapanja višestrukih signala tj. „zasićenja" krivulje, što nije pouzdano za određivanje koncentracije čestica u nepoznatim uzorcima. Slika 11 prikazuje primjer *I-t* krivulja snimljenih kod konstantnog potencijala u prisutnosti kisika gdje dolazi do kompetitivnih površinskih procesa, kao što su npr. adsorpcija submikronske frakcije (biomolekula) koja rezultira sniženjem struje redukcije kisika što utječe na proces adhezije stanica i izlučenih mikrometarskih čestica kao produkata aktivnosti stanice (granica detekcije na elektrodi, 1 μm). Adsorpcija biomolekula na međupovršini utječe na amplitudu signala prianjanja stanica, tj. dolazi do smanjenja amplitude (slika 11). Takvo adhezijsko ponašanje stanica na modificiranoj površini u skladu je s prethodno istraženim modelnim sistemima adhezije organskih kapljica i adsorpcije dekstrana.[27,62]

Nadalje, prilagodba stanica u uvjetima rasta kod različitog saliniteta paralelno s elektrokemijskim mjerenjima ispitana je tankoslojnom kromatografijom u smislu kemijske karakterizacije lipidnog materijala stanice. Za pretpostaviti je da prilikom promjene saliniteta važan doprinos u očuvanju integriteta stanice imaju membranski lipidi. Udio glikolipida je najveći u membranskim lipidima u svim fazama rasta stanice *D. tertiolecta*. Međutim zamijećeno je da se sa snižavanjem saliniteta udio glikolipida smanjuje, a fosfolipida povećava. Dok je prilikom rasta stanica *D. tertiolecta* u mediju višeg saliniteta zamijećen suprotan trend. Udio sterola ostaje podjednak. Prisutnost sterola u membrani utječe na permeabilnost membrane. Membrane su uglavnom vrlo propusne, međutim stanična membrana *Dunaliella* manje je permeabilna za glicerol u čemu vjerojatno ulogu imaju steroli.[63] Koncentracija ukupnih lipida tijekom rasta stanične kulture *D. tertiolecta* kretala se između 1000-30 000 μg/L. Gašparović i suradnici odredili su da je koncentracija lipida u istočnom dijelu Atlantskog oceana u području između 3,0-30 μg/L, dok u Jadranu ta koncentracija može biti do 3 puta veća.[64-66] Njihovo porijeklo u moru vezano je uz aktivnost morskih organizama te kao produkata njihovog raspada.

Prema Ben Moussa-Dahmen nađeno je da sa smanjenjem saliniteta s 3,0 M na 2,0 M NaCl u uzgoju stanica *Dunaliella* također dolazi do povećanja ukupne koncentracije lipida što je u skladu s rezultatima u ovom radu.[20] Upravo zbog visoke koncentracije lipida u stanici, postoji rastući interes za korištenje staničnih kultura stanica *Dunaliella* u proizvodnji biodizela. U novije vrijeme primjenom postupka elektroporacije omogućena je efikasnija ekstrakcija staničnih lipida, gdje električno polje utječe na otvaranje pora na membrani.[67]

6. ZAKLJUČAK

1. Ispitan je rast i prilagodba morskog fitoplanktona *D. tertiolecta* kao modela u dva vodena medija različitog saliniteta (38‰ i 8‰).

2. Primjenjena je elektrokemijska metoda polarografije i kronoamperometrije na KŽE, te tankoslojna kromatografija.

3. Rezultati elektrokemijske karakterizacije staničnih suspenzija ukazuju na slična adhezijska ponašanja stanica u širokom području potencijala na elektrodi za stanice koje su rasle kod nižeg i višeg saliniteta. Stanice *D. tertiolecta* koje su rasle u mediju nižeg saliniteta pokazuju veću fiziološku aktivnost zabilježenu preko adsorpcije izlučenih biomolekula i adhezije izlučenih mikrometarskih čestica na elektrodi.

4. Rezultati tankoslojne kromatografije pokazali su da koncentracija ukupnih lipida raste s porastom gustoće stanica u oba medija. Veća koncentracija ukupnih lipida primjećena je u mediju nižeg saliniteta. Najzastupljeniji membranski lipidi u oba medija su glikolipidi koji variraju sa starošću kulture.

5. Kombinacijom dviju metoda, elektrokemijske kojoj su u fokusu površinska svojstva živih stanica na elektrodi i tankoslojne kromatografije kojom se ekstrahiraju podaci o kemijskom sastavu staničnih lipida, te povezivanjem dobivenih rezultata omogućuje se bolje razumijevanje ponašanja stanica fitoplanktona u vodenom sustavu u uvjetima okolišnog stresa, npr. promjena saliniteta.

7. LITERATURNA VRELA

1. A-L Cras, E. Foulon, R. Lemée, N. Simon, *C. R. Biologies* **332** (2009) 159-170.

2. C. B. Field, M. J. Behrenfeld, J. T. Randerson, P. G. Falkowski, *Science* **281** (1998) 237-240.

3. K. R. Arrigo, *Nature* **437** (2005) 349-355.

4. J. M. Sieburth, V. Smetacek, J. Lenz, *Limnol. Oceanogr.* **23** (1978) 1256-1263.

5. A. Jokela, Ph.D. Dissertation, University of California, San Diego, USA, 1969

6. L. Oliveira, T. Bisalputra, J.A. Naval, *New Phytologist* **85** (1980) 385-392.

7. N. Ivošević DeNardis, J. Pečar Ilić, I. Ružić, G. Pletikapić, *Electrochimica Acta* **176** (2015) 743–754.

8. M. Ginzburg, *Adv. Bot. Res.* **14** (1987) 95-183.

9. V. Svetličić, N. Ivošević, S. Kovač, V. Žutić, *Bioelectrochemistry* **53** (2001) 79–86.

10. M. Goettel, C. Eing, C. Gusbeth, W. Frey, *Algal Research* **2** (2013) 401-408.

11. J. R. Benemann, R.P. Goebel, J.C. Weissman, J.C. Augenstein, *Microalgae as a source of liquid fuels,* Fairfield, California, 1982, p. 97.

12. J. C. Weissman, R. P. Goebel, *Design and analysis of microalgal open pondcsystems for the purpose of producing fuels*, Fairfield, California, 1987, p. 22.

13. J. R. Benemann, W.J. Oswald, *Systems and economic analysis of microalgaecponds for conversion of CO_2 to biomass,* Univerity of Berkley, Berkley, 1996, p. 20.

14. L. von Oppen-Bezalel, E. Lerner, D.G. Kern, B. Fuller, E. Soudant, A. Shaish*, Fragrance Journal* **34** (2006) 48-53.

15. G. Pletikapić, A. Berquand, T. Mišić Radić, V. Svetličić, *J. Phycol*. **48** (2012) 175-184.

16. A. Ben-Amootz, J. E. W. Polle, D. V. Subba Rao, *The Alga Dunaliella,* Science Publishers, Enfield, New Hampshire, 2009, p. 1-555.

17. G. A. Thompson, *Biochimica et Biophysica Acta* **1302** (1996) 17-45.

18. N. N. Sushchik, G. S. Kalacheva, N. O. Zhila, M. I. Gladyshev, T. G. Volova, *Russian Journal of Plant Physiology* **50** (2003) 374-380.

19. J. L. Harwood, A. L. Jones, *Advances in Botanical Research* **16** (1989) 1-53.

20. I. Ben Moussa-Dahmen, H. Chtourou, F. Rezgui, S. Sayadi, A. Dhouib, *Bioresource Technology* **218** (2016) 816-825.

21. N. V. Zhukova, N. A. Aizdaicher, *Botanica Marina* **44** (2001) 287-293.

22. Z. A. Wojciechowski, *Physiology and biochemistry of sterols*, AOCS, Warsaw, 1991, p. 361.

23. H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, J. Darnell, *J. Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman and Company, New York, 2004, p. 174-178.

24. J. Heyrovskỳ, J. Kůta, *Principles of Polarography*, Czechslovak Academy of Science, Prague, 1965, p. 24.

25. V. Žutić, V. Svetličić, N. Ivošević, A. Hozić, O. Pečar, *Period. Biolog.* **106** (2004) 67-74.

26. V. Svetličić, E. Balnois, V. Žutić, J. Chevalet, A. Hozić Zimmermann, S. Kovač, N. Vidović, *Croat. Chem. Acta* **79** (2006) 107-113.

27**.** S. Kovač, V. Svetličić, V. Žutić, *Colloids Surf. A* **149** (1999) 481-489.

28. N. Ivošević, V. Žutić, *Croat. Chem. Acta* **70** (1997) 167-178.

29. R. G. Barradas, F. M. Kimmele, *J. Electroanal. Chem.* **11** (1966) 163-170.

30. V. Žutić, N. Ivošević, V. Svetličić, R. A. Long, F. Azam, *Aquat.Microb.Ecol.* **17** (1999) 231-238.

31. V. Žutić, S. Kovač, J. Tomaić, V. Svetličić, *J. Electroanal. Chem.* **349** (1993) 173-186.

32. S. Kovač, R. Kraus, S. Geček, V. Žutić, Croat. Chem. Acta **73** (2000) 279.

33. N. Ivošević, V. Žutić, *Effect of electical potential on adhesion, spreading, and detachment of organic droplets at an aqueous electrolyte/metal interface*, in: K. L. Mittal, *Contact angle, wettability and andhesion*, AH Zeist, Utrecht, 2002, p. 549-561.

34. N. Ivošević DeNardis, I. Ružić, J. Pečar Ilić, S. El Shawish, P. Ziherl, *Bioelectrochemistry* **88** (2012) 48-56.

35. I. Ružić, J. Pečar-Ilić, N. Ivošević DeNardis, *J. Electroanal. Chem.* 642 (2006) 120-126.

36. N. Ivošević DeNardis, V. Žutić, V. Svetličić, R. Frkanec, *J. Membrane Biology* **245** (2012) 573-582.

37. V. Svetličić, E. Balnois, V. Žutić, J. Chevalet, A. Hozić Zimmermann, S. Kovač, N. Vidović, *Croat. Chem. Acta* **79** (2006) 107-113.

38. I. Piljac, *Elektroanalitičke metode: Teorijske osnove, mjerne naprave i primjena,* RMC, Zagreb, 1995, str. 187.

39. D. A. Skoog, *Principles of Instrumental analysis,* Saunders College Publishing, 1985, p. 567.

40. A. L. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, 1980, p. 146-158.

41. N. Ivošević, V. Žutić, J. Tomaić, *Langmuir* **15** (1999) 7063-7068.

42. J. N. Israelachvili, *Intermolecular & Surface Forces,* Academy Press, New York, 1991.

43. F. Heslot, A. M. Cabazat, N. Fraysse, P. Levinson, *Adv. Colloid Inter. Sci.* **39** (1992) p. 129-145.

44. B. Gašparović, S. P. Kazazić, A. Cvitešić, A. Penezić, S. Frka, *Journal of Chromatography A* **1409** (2015) 259–267.

45. R. R. L. Guillard, *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates*, Plenum Press, New York, 1975.

46. R. E. Olsen, R. J. Henderson, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*. **129** (1989) 189-197.

47. M. H. Conte, J. K. B. Bishop, *Lipids* **23** (1988) 493-500.

48. C. C. Parrish, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **44** (1987) 722-731.

49. N. H. Cuong, C. V. D'Alkaine, A. Jenard, H. D. Hurwitz, *J. Electroanal. Chem.* **51** (1974) 377-393.

50. M. A. V. Devanathan, P. Peries, *Trans. Farday Soc*. **50** (1954) 1236-1243.

51. D. C. Grahame, *J. Amer. Chem Soc.* **80** (1958) 4201-4210.

52. M. A. Borowitzka, L. J. Borowitzka, *Dunaliella*, in: M A. Borowitzka, L. J. Borowitzka, *Microalgal Biotechnology*, Cambridge Press, Cambridge, 1988, p. 27-58.

53. L. S. Jahnke, A.L. White, *Journal of Plant Physiology* **160** (2003) 1193-1202.

54. A. H. Latorella, R.L. Vadas, *Journal of Phycology* **9** (1973) 273-277.

55. A. Ben-Amotz, B. Z Ginzburg, *Biochim. Biophys. Acta* **183** (1969) 144-154.

56. A. Ben-Amotz, M. Avron, *Plant Physiol* **51** (1973) 875-878.

57. J. S. Craigie, J. McLachlan, *Can. J. Bot.* **42** (1964) 777-778.

58. M. Avron, *Osmoregulation*, in: M. Avron, A. Ben-Amotz, *Dunaliella: Physiology, Biochemistry and Biotechnology,* CRC Press. Boca Raton, FL, USA, 1992, p. 135-164.

59. A. J. Liska, A. Shevchenko, U. Pick, A. Katz, *Plant Physiol* **136** (2004) 2806-2817.

60. V. Svetličić, A. Hozić, *Electrophoresis* **23** (2002) 2080-2086.

61. N. Ivošević, V. Žutić, J. Tomcic, *Langmuir* **10** (1994) 2415-2418.

62. N. Ivošević, V. Žutić, *Croat. Chem. Acta* **70** (1997) 167-178.

63. A. Oren, *Microbial and Melecular Biology Rewievs* **63** (1999) 334-348.

64. B. Gašparović, S. Frka, B. P. Koch, Z. Y. Zhu, A. Bracher, O. J. Lechtenfeld, S. B. Neogi, R. J. Lara, G. Kattner, *Deep-Sea Research I* **89** (2014) 56–67.

65. D. Marić, S. Frka, J. Godrijan, I. Tomažić, A. Penezić, T. Djakovac, V. Vojvodić, R. Precali, B. Gašparović, *Cont. Shelf Res.* **55** (2013) 52–65.

66. S. Frka, B. Gašparović, D. Marić, J. Godrijan, T. Djakovac, V. Vojvodić, J. Dautović, Z. Kozarac, *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **93** (2011) 290-304.

67. https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-016-0508-z, 02. 12. 2016, 13:50 h

ŽIVOTOPIS

Osobni podatci: Ivana Grubeša

Datum rođenja: 17. ožujka 1993.
Mjesto rođenja: Našice

Obrazovanje

2014.–2016. Diplomski studij - istraživački smjer (smjer: analitička kemija i biokemija) Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2014. Sveučilišna prvostupnica kemije sa završnim radom Voltametrijsko određivanje (1E)-1-N}4-(4-{[(E) -N- (2-aminofenil) karboksiimidoil] fenoksi} butoksi) fenil] metiliden} benzen-1,2-diamina uporabom diferencijalne pulsne voltametrije, pod vodstvom doc. dr. sc. Martine Medvidović-Kosanović

2011.–2014. Preddiplomski studij kemije, Odjel za kemiju, Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku

2007.–2011. Opća gimnazija A. G. Matoša, Đakovo

1999.-2007. Osnovna škola Matije Gupca, Piškorevci

Sudjelovanje na znanstvenim skupovima

travanj 2014. 4. skup društva elektrokemičara, IRB, Zagreb, M. Medvidović-Kosanović, T. Balić, M. Gavran, I. Grubeša, Ispitivanje elektrokemijskih svojstava ((1E)-1-N-{[4-(4-{[(E)-N-(2-aminofenil)karboksiimidol]fenoksi}butoksi)fenil]metiliden}benzen-1,2-diamina uporabom cikličke i diferencijalne pulsne votametrije.

Popularizacija znanosti

travanj, 2016. Otvoreni dan PMF-a, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

svibanj, 2016. Morski mikrosvijet: Fitoplankton, Zaklada znanje na djelu, Institut Ruđer Bošković, suradnik u organizaciji radionice

prosinac, 2015. Znanstveni piknik, Zagrebački Velesajam, Zagreb

studeni, 2015. Znanstveni kvart, Interliber, Zagreb

2015., 2016. Sudjelovanje u radionicama u osnovnim školama i vrtićima kao član Znanstvenih čarolija

Članstvo u strukovnim udrugama

Hrvatsko kemijsko društvo

Ostalo

Strani jezici: engleski i njemački (aktivno)