

# Detekcija vezanja stanica algi na bioreceptore korištenjem kvarcne mikrovage

---

Vlašić, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:217:257139>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-18**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Ema Vlašić

**Detekcija vezanja stanica algi na bioreceptore korištenjem  
kvarcne mikrovage**

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za biofiziku, Instituta za fiziku, Zagreb, pod vodstvom dr. sc. Tomislava Vuletića, viši zn. sur. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra struke znanosti o okolišu.

## **Zahvale**

*Zahvaljujem se Mentoru dr.sc. Tomislavu Vuletiću na ukazanoj prilici za izradu ovog diplomskog rada i njegovom stručnom vođenju te strpljenju kroz izradu ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se dr.sc. Mariji Gligori Udovič, suvoditeljici rada, na korisnim savjetima i uloženom trudu za izradu ovog rada.*

*Zahvaljujem se mag. oecol. Nives Novosel na velikodušnoj pomoći i prenesenom znanju kroz izradu ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se dr.sc. Nadici Ivošević DeNardis na svim savjetima, pomoći i pruženim uvjetima za izradu ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se dr.sc. Tei Mišić Radić na savjetima i potpori pruženoj tokom rada u laboratoriju.*

*Zahvaljujem se mag. educ. biol. et chem. Andrei Čačković na savjetima, pomoći i ugodnoj atmosferi tokom rada u laboratoriju.*

*Zahvaljujem se mag. phys. Blažu Ivšiću na nesebičnoj pomoći u izradi ovog diplomskog rada.*

*Diplomski rad izrađen je uz financijsku potporu projekta pod nazivom „Od površinskih svojstava stanica alga do pokazatelja stresa u vodenim ekosustavima“ (IP-2018-01-5840, N. Ivošević DeNardis, voditelj projekta) financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.*

*Posebice se zahvaljujem svojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci, brizi i strpljenju kroz desetljeća.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Detekcija vezanja stanica algi na bioreceptore korištenjem kvarcne mikrovage

EMA VLAŠIĆ

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U ovom diplomskom radu istraženo je vezanje stanica morskog fitoplanktona na senzor kvarcne mikrovage s praćenjem disipacije (QCM-D) funkcionaliziran polietileniminom. Istraživane su dvije vrste morskog fitoplanktona različitih morfoloških svojstava. Jednostanična mikroalga: *Dunaliella tertiolecta* Butcher karakteriziranu nedostatkom stanične stijenske i *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & J.C. Lewin, alga s čvrstom staničnom stijenkama inkrustiranom silicijevim dioksidom. Monokulture algi uspoređene su u uvjetima normalnog rasta te pri povišenoj temperaturi. Ustanovljeno je da nema korelacije koncentracije algi u otopini s brojem algi vezanih na biosenzor dok je potvrđena korelacija vrijednosti pada frekvencije ( $\Delta f$ ), kao temeljnog parametra koji daje QCM-D s brojem algi očitanih na kvarcnom biosenzoru. Praćena su viskoelastična svojstva (rigidnost) algi tako da su uspoređeni omjeri promjene rezonantne frekvencije [ $\Delta f$ ] i disipacije [D] biosenzora čime je ustanovljeno da istraživane vrste imaju različita viskoelastična svojstva, odnosno vrsta *D. tertiolecta* ima svojstvo veće viskoelastičnosti od *C. closterium*. No vrijednosti se rasipaju u velikom rasponu te se rezultati za dvije vrste preklapaju. Stoga nije mogla biti dokazana pretpostavka da bi se usporedbom monokultura u normalnim uvjetima rasta i pri povišenoj temperaturi pokazalo da stresni uvjeti utječu na viskoelastičnost stanica. Dobiveni rezultati doprinose razumijevanju primjene kvarcne mikrovage (QCM-D) u površinskoj karakterizaciji staničnog materijala i mogućem proširenju metoda bioloških istraživanja.

(53 stranica, 22 slika, 72 bibliografskih referenci; izvornik na hrvatskom jeziku)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: adhezija, bioreceptor, *Cylindrotheca closterium*, *Dunaliella tertiolecta*, fitoplankton, kvarcna mikrovaga, viskoelastičnost

**Voditelj:** Dr. sc. Tomislav Vuletić, viši zn. suradnik

**Suvoditelj:** Dr. sc. Marija Gligora Udovič, izv. prof

**Ocjenitelji:** Dr. sc. Marija Gligora Udovič, izv. prof

Doc. dr. sc. Sandra Hudina

Doc. dr. sc. Ivan Čanjevac

Doc. dr. sc. Borna Lužar-Oberiter

Rad prihvaćen: 09. rujna 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Division of Biology

Graduation Thesis

### **Detection of algal cell binding to bioreceptors using quartz crystal microbalance**

Ema Vlašić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

In this Thesis, the binding of marine phytoplankton cells to a quartz microbalance sensor with dissipation monitoring (QCM-D) was investigated. The sensor was functionalized with polyethyleneimine. Two species of marine phytoplankton with different physio-morphological properties were investigated. Unicellular microalgae: *Dunaliella tertiolecta* Butcher characterized by lack of cell-wall and *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & J.C. Lewin, alga with solid cell wall inlaid with silica. Algae were grown at normal and elevated temperatures. It was found that there is no correlation of the concentration of algae in solution to the number of algae bound to the biosensor while the correlation of the resonant frequency shift [ $\Delta f$ ] to the number of algae read on the quartz biosensor was confirmed. Also, the viscoelastic properties (rigidity) of algae were examined. It was established that the investigated species have different viscoelastic properties, i.e. *D. tertiolecta* has lower rigidity than *C. closterium*. However, the values vary widely and the results for the two species overlap. Therefore, it could not be proven that a comparison of monocultures grown at 18°C and 30°C affect the viscoelasticity of cells. The results of this work contribute to a better understanding of the usefulness of QCM-D devices for extending biological research methods.

(53 pages, 22 figures, 72 references; original in Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Keywords: adhesion, bioreceptor, *Cylindrotheca closterium*, *Dunaliella tertiolecta*, phytoplankton, quartz crystal microbalance, viscoelastic properties

**Supervisor:** Dr. sc. Tomislav Vuletić, senior research associate

**Co-supervisor:** Dr. sc. Marija Gligora Udovič, associate professor

**Reviewers:** Dr. sc. Marija Gligora Udovič, assoc.prof.

Dr. sc. Sandra Hudina, assoc.prof.

Dr. sc. Ivan Čanjevac, assoc.prof.

Dr. sc. Borna Lužar-Oberiter, assoc.prof.

Thesis accepted: September 9, 2020

# Sadržaj

|                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. UVOD</b> .....                                                                                          | 2  |
| <b>1.1</b> Rod <i>Dunaliella</i> Teodoresco .....                                                             | 3  |
| <b>1.2</b> Rod <i>Cylindrotheca</i> Rabenhorst .....                                                          | 6  |
| <b>1.3</b> Kvarcna mikrovaga s praćenjem disipacije (QCM-D) .....                                             | 8  |
| <b>2 CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....                                                                              | 12 |
| <b>3 MATERIJALI I METODE</b> .....                                                                            | 13 |
| <b>3.1</b> Istraživane vrste.....                                                                             | 13 |
| <b>3.2</b> Stanični uzgoj.....                                                                                | 14 |
| <b>3.2.1.</b> Izolacija stanica .....                                                                         | 15 |
| <b>3.3</b> Mikroskopska mjerenja: određivanje koncentracije stanica .....                                     | 16 |
| <b>3.3.1</b> Određivanje volumne koncentracije i dinamike rasta fitoplanktona.....                            | 16 |
| <b>3.3.2</b> Određivanje površinske koncentracije fitoplanktona.....                                          | 17 |
| <b>3.4</b> Mjerenja kvarcnom mikrovagom uz praćenje disipacije (QCM-D).....                                   | 18 |
| <b>3.4.1</b> QCM-D instrumentacija.....                                                                       | 18 |
| <b>3.4.2</b> Funkcionalizacija senzora bioreceptorima .....                                                   | 20 |
| <b>3.4.3</b> QCM-D mjerenje .....                                                                             | 21 |
| <b>4. REZULTATI</b> .....                                                                                     | 23 |
| <b>4.1</b> Dinamika rasta monokultura <i>D. tertiolecta</i> i <i>C. closterium</i> .....                      | 23 |
| <b>4.2</b> Površinska koncentracija monokultura <i>D. tertiolecta</i> i <i>C. closterium</i> .....            | 24 |
| <b>4.3</b> Ovisnost odaziva QCM-D instrumenta o koncentraciji stanica u otopini i na površini biosenzora..... | 28 |
| <b>5. RASPRAVA</b> .....                                                                                      | 35 |
| <b>6. ZAKLJUČAK</b> .....                                                                                     | 39 |
| <b>7. LITERATURA</b> .....                                                                                    | 40 |
| <b>8. PRILOZI</b> .....                                                                                       | 46 |
| <b>8.1.</b> Računalna analiza slike.....                                                                      | 46 |
| <b>9. ŽIVOTOPIS</b> .....                                                                                     | 53 |

# 1. UVOD

Fitoplankton predstavlja fotosintetske prokariote i eukariote na dnu morske i slatkovodne hranidbene mreže. Morski fitoplanktonski organizmi predstavljaju više od 45% fotosintetske neto primarne proizvodnje na Zemlji. Eukariotske fitoplanktonske vrste, među koje spadaju istraživane mikroalge, rasprostranjene su u mnogim glavnim monofiletskim skupinama te uključuju fotosintetske organizme koji su fotosintezu stekli procesom endosimbioze (Simon i sur. 2009). Produktivnost fitoplanktona kontrolira niz okolišnih čimbenika, od kojih su mnogi trenutno podvrgnuti značajnim promjenama zbog globalnih klimatskih promjena (Fischetti 2013). Morski ekosustavi predstavljaju veliki rezervoar ugljika i posljedično pohranjuju jednaku količinu ugljikovog dioksida kao svi kopneni ekosustavi zajedno (Falkowski i sur. 2000; Zepp i sur. 2007). Zbog toga imaju ključnu ulogu u reguliranju atmosferske koncentracije CO<sub>2</sub> te ublažavanju ekstremnih temperatura i vremenskih pojava (Chester i Jickells 2012). Zagrijavanje oceana rezultira promjenom sastava vrsta i pogoduje cvjetanju toksičnih vrsta fitoplanktona, dok povećavanje zagađenja od izlivanja sirove nafte, trajnih organskih zagađivača, teških metala, kao i industrijskih i komunalnih voda, negativno utječe na sveukupan fitoplankton (Qian i sur. 2015). Primjerice programirana stanična smrt može nastupiti zbog starosti ili kao odgovor na stres u okolišu, poput nedostatka hranjivih tvari, izlaganja jakoj svjetlosti ili prekomjerne koncentracije soli ili oksidacijskog stresa (Bronk i Steinberg 2008). Fitoplanktonske vrste imaju kratko generacijsko vrijeme i lako se mogu uzgajati u laboratoriju, zatvorenim fotobioreaktorima ili u otvorenim bazenima (Lauritano 2020). Promjenom brojnosti i sastava vrsta pokazuju brz odgovor na promijene u okolišu u što ih čini pouzdanim biološkim pokazateljima stanja okoliša. Stoga eksperimentalni testovi utjecaja antropogenih stresora pod stvarnom sunčevom svjetlošću ili realnim uvjetima omogućuju pouzdanija predviđanja utjecaja budućih promjena u oceanu na primarnu proizvodnju u moru (Häder i Gao 2015). Svjetlosni mikroskop najčešće je korišteno sredstvo za kvalitativnu i kvantitativnu analizu fitoplanktona (Thronsen 1997). Ipak, od interesa su i druge tehnike, koje bi na osnovi transdukcije nekog biološkog procesa u fizikalni fenomen mogle omogućiti kontinuirano i automatizirano praćenje stresa i vijabilnosti bioindikatorskih vrsta. Posljednjih godina naglo je narastao broj znanstvenih istraživanja u kojima je tehnika kvarcne mikrovage (QCM – quartz crystal microbalance) imala ključnu ulogu u rasvjetljavanju različitih aspekata bioloških materijala i njihovih interakcija (Dixon 2008). Jedna od glavnih primjena QCM-a je mjerenje količine adsorbiranog uzorka na različitim površinama kako bi se utvrdilo da li materijal na površini odolijeva ili potiče adsorpciju uzorka. Ovaj početni korak adsorpcije uzorka može kasnije posredovati u staničnom



odgovoru. Osim što mogu mjeriti masena i viskoelastična svojstva adsorbiranih filmova, velika prednost QCM-a kao analitičke tehnike je fleksibilnost u izboru supstrata. Pokazalo se da je tehnologija dosegla točku u kojoj postoje komercijalno dostupni instrumenti kao i pridruženi teorijski modeli potrebni za tumačenje podataka u smislu značajnih fizičkih parametara poput mase, debljine, gustoće ili viskoznosti (Dixon 2008). Ova dostignuća mogu pomoći u postavljanju temelja za prelazak QCM tehnologije u standardizirani pristup za rješavanje pitanja o biološkim sustavima i njihovoj interakciji.

### 1.1 Rod *Dunaliella* Teodoresco

Prošlo je stotinu godina od opisa roda *Dunaliella*, zelene alge koja je odgovorna za većinu primarne proizvodnje u hipersalinim sredinama širom svijeta, bile su predmet opsežnih istraživanja na poljima fiziologije, biokemije, ekologije, molekularne biologije te u svrhu komercijalne primjene (Oren 2005). Vrste roda *Dunaliella* su jednostanični biflagelatni organizmi s jednom jezgrom i jednim kloroplastom. Nemaju staničnu stijenku, već izlučuju glikoproteinski omotač, kojega nazivamo glikokaliks i služi kao potpora plazmalemi. Stanice mogu biti elipsoidne, sferične, piriformne ili fuziformne te su radijalno simetrične, bilateralno simetrične ili asimetrične. Prosječna veličina stanice je 9–11  $\mu\text{m}$ . Pojavljuju se u hipersalinim ili bočatim vodenim staništima. S obzirom na to da stanicama nedostaje kruta stanična stijenka, razmnožavaju se nespolno uzdužnom diobom ili spolno izogamijom. Građa stanice prikazana je na slici 1.



**Slika 1.** Elektronsko-mikroskopska slika prereza kroz stanicu *D. tertiolecta* (povećanje 3525x); 1-baza bičeva, 2-stanična jezgra s jezgrićom, 3-vakuola, 4-kloroplast, 5-pirenoid, 6-škrobna zrnca, 7-plazmalema (preuzeto iz Science Photo Library).

Teodoresco (1905) je na temelju stanične morfologije prvi opisao rod *Dunaliella*, pod redom Volvocales i unutar porodice Polyblepharidaceae. Mnogo kasnije Massjuk (1973) je rod premjestila u već postojeću porodicu Dunaliellaceae. Butcher (1959) je proveo taksonomska istraživanja temeljene na staničnoj morfologiji opisujući četiri nove vrste (*Dunaliella tertiolecta* Butcher, *D. primolecta* Butcher, *D. quartolecta* Butcher, *D. polymorpha* Butcher). Koristio je samo citološke atribute koji su visoko varijabilni kriteriji kod zelenih jednostaničnih algi. Većina se taksonomskih istraživanja temeljila isključivo na morfološkim kriterijima (tj. veličini i obliku stanice, simetriji stanica, obliku kloroplasta, prisutnosti pirenoida i očne pjege, prisutnosti refraktilnih granula). No opće je poznato da je oblik stanica vrlo promjenjiv zbog nepostojanja krutog staničnog pokrova (Oliveira i sur. 1980). Također je poznato da veličina

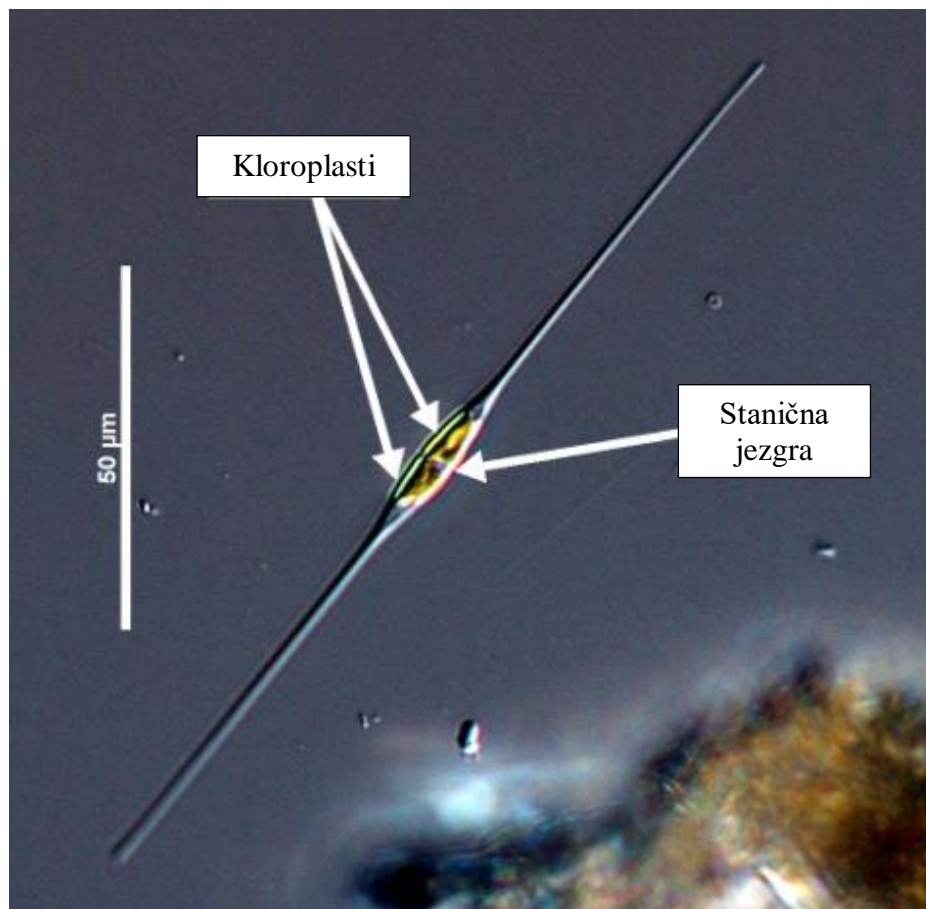
stanice i oblik stanice ovise o vanjskim čimbenicima kao što su primjerice hranjive tvari (Brown i Borowitzka 1979, Riisgard 1981, Ginzburg 1987).

Trenutni taksonomski pojmovi temelje se uglavnom na morfološkim i fiziološkim karakteristikama (Borowitzka i Siva 2007). Takav je način klasificiranja nedostatan stoga daljnja molekularna istraživanja počinju pružati nove uvide koji rezultiraju u nizu taksonomskih preinaka (Borowitzka 2018). Iz molekularnih je istraživanja zaključeno da je rod *Dunaliella* polifiletska skupina te da je filogenetski povezana s flagelatima iz reda Chlamydomonadales koji posjeduju stijenku. Nakayama i suradnici (1996) tvrde da je priroda nedostatka stijenke ovog taksona odvedeno svojstvo koje se sekundarno gubi. Massjuk (1973) je pretpostavila da je glavni evolucijski smjer roda, prema prilagodbi na okruženja s visokom salinitetom, razvijanje svestranog metabolizma i brza morfološka reakcija olakšana nedostatkom stanične stijenke, praćena i gubitkom kontraktilnih vakuola. Ustvrdila je da se prisutnost heksokinaze kod *D. tertiolecte*, bez mogućnosti iskorištavanja glukoze (kao što to može većina drugih morskih algi), također može smatrati neizravnim dokazom slatkovodnog podrijetla roda (González i sur. 2019). *Dunaliella* je postala prikladan model organizma za proučavanje prilagodbe alga na okoliš. Znatno nakupljanje  $\beta$ -karotena kod nekih sojeva u pogodnim uvjetima rasta dovelo je do zanimljivih biotehnoških primjena. Adaptivan organizam kao što je *Dunaliella* koji se može prilagoditi širokom rasponu koncentracija soli može se upotrijebiti kao modelni organizam za proučavanje formiranja specifičnih proteina koji reagiraju na promjene slanosti u mediju (Oran 2005).

## 1.2 Rod *Cylindrotheca* Rabenhorst

Dijatomeje predstavljaju jednu od glavnih komponenti morskog fitoplanktona, čine do 40% godišnje produktivnosti u morima i predstavljaju 25% globalne fiksacije ugljika (Lauritano i sur. 2020). Ekološki su značajne kao osnova morskih hranidbenih lanaca, često su ekološki najzapaženije vrste u oceanima i zahvaljujući svojoj ulozi u oblikovanju dna, uglavnom su odgovorne za geokemijski ciklus silicija (Volcani 1981).

U razred Bacillariophyceae (sin. Diatomeae, Diatomophyceae) spada relativno mali rod *Cylindrotheca* sa samo četiri vrste među kojima je istraživana vrsta *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & J.C. Lewin. Rod uglavnom obitava u bočatoj vodi ili morskim staništima (Christensen i Reimer 1968). Stanice roda *Cylindrotheca* karakteristične su po svom cilindričnom uzdužnom presjeku. Jednostanični su organizmi, jezgra je centralna i razdvaja dva kloroplasta, ne posjeduju bič te su slabo pokretne. Stanice imaju dva do nekoliko pločastih plastida, Golgijev aparat, mitohondrije, a staničnu stijenku zamjenjuje modifikacija periplasta. Nekoliko je pirenoida raspoređeno duž stanice. Kod većine vrsta može se primijetiti uočljiva terminalna vakuola koja sadrži kristale barijevog sulfata (Brook i Williamson 2010). Veličina stanica ovisi o vrsti, od 10 µm do 1 mm. Stanice se nespolno razmnožavaju binarnom diobom, čime se uzastopno smanjuju. Kada stanice dosegnu kritičnu veličinu, binarnu diobu zamjenjuje spolna reprodukcija. Prepoznatljive su po svojoj dvodijelnoj silificiranoj ljušturici (frustuli). Frustule *Cylindrotheca* su izduljene i sužene prema rubovima. Gornji dio frustule naziva se epiteka, dok je donji dio hipoteka. I gornji i donji dio ljuštire podijeljen je na valve (epivalva i hipovalva) koje su lateralno povezane pojasom. Rafa je prerez koji se pruža duljinom stanice te je često omeđen silicijevim mostovima fibulama. Površina stanice može biti glatka, točkasta, prugasta ili kostasta, uzorci na površini su genetski uvjetovani te se razlikuju od vrste do vrste. Kroz rafa i ornamente na ljušturi stanice izlučuju organski materijal koji štiti kremen od rastapanja (Round i sur. 1990). Frustule se lagano silificiraju pa su podložne uništavanju tijekom čišćenja uzoraka kiselinom ili peroksidom (Lowe 2003). Građa stanice prikazana je na slici 2.



**Slika 2.** Slika svjetlosnim mikroskopom stanice *C. closterium* (povećanje 1000 x); na slici su prikazana dva kloroplasta u sredini stanice između kojih je smještena jezgra, krajevi silikatne ljušturice su izduljeni te se nazivaju rostre (preuzeto s Phyto'pedia).

Proučavanje dijatomeja započelo je u 18. stoljeću. Naziv razreda Bacillariophyceae potječe iz roda Bacillaria Gmelin 1791, dok se naziv dijatomeje odnosi na rod Diatoma De Candolle 1805. Unatoč više od stoljeća morfoloških i taksonomskih istraživanja tek su sredinom 20. stoljeća, uvođenjem elektronske mikroskopije, otkrivene dodatne informacije o algama kremenjašicama (Halse i Syvertsen 1996). Simonsen (1979) je sistematizirao dijatomeje temeljem rezultata svjetlosne i elektronske mikroskopije, te konstruirao ključ za razred dijatomeja. Na temelju novih saznanja uslijedile su ideje o klasifikaciji, evoluciji i kritičkim procjenama na višim taksonomskim razinama, danas je prihvaćena podjela koja dijatomeje prema simetriji svrstava u tri razreda: Coscinodiscophyceae, Mediophyceae i Bacillariophyceae (Medlin i Kaczmarska 2004).

Evolucijska putanja dijatomeja spojila je kombinaciju gena dobivenu endosimbiontskim prijenosom gena iz dva sekundarna simbionta te horizontalnim prijenosom gena čime su stečene neke karakteristike bakterija i Archaea (Prihoda i sur. 2012). Jedna od posljedica raznolikog genskog zapisa je morfogeneza proteina silafina i poliamina stvorenih iz ciklusa uree, koji omogućava izgradnju ljušturice od silicijevog dioksida (Gross 2012).

Dijatomeje postaju sve istaknutije mikroalge, a napredno znanje o njima povećalo je njihovu važnost i korisnost u komercijalnim i industrijskim primjenama kao što su biogoriva, lijekovi, zdrava hrana, biomolekule, materijali relevantni za nanotehnologiju i kao bioremedijatori zagađene vode (Bozarth i sur. 2009).

### 1.3 Kvarcna mikrovaga s praćenjem disipacije (QCM-D)

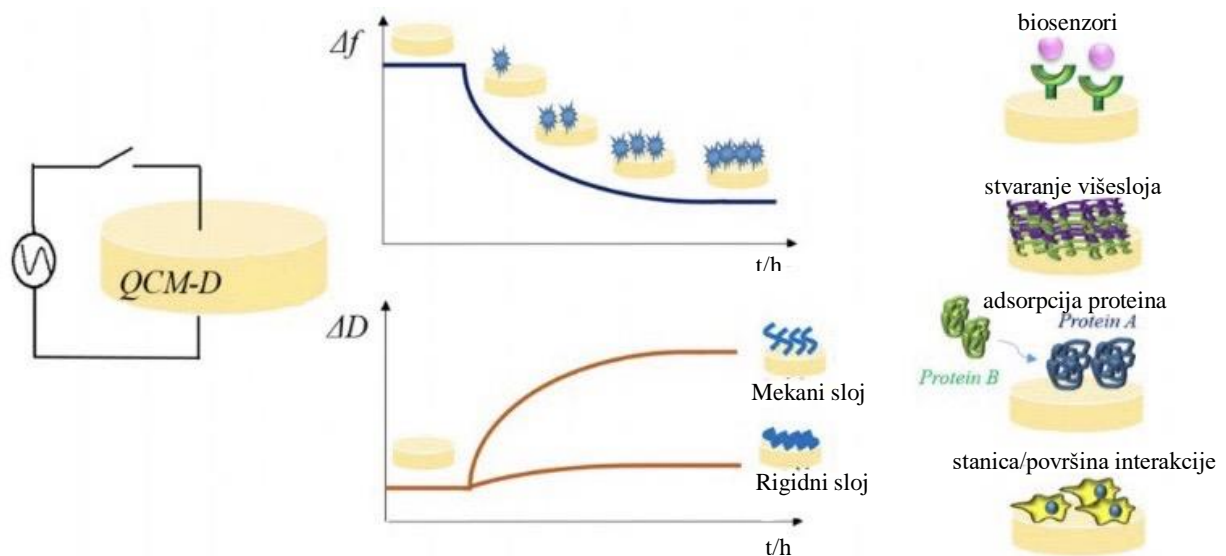
Praćenje svojstava živih, bioloških sustava od ključnog je značaja u različitim područjima, uključujući medicinsku dijagnostiku, industriju hrane i praćenje okoliša (Pihíková i sur. 2015). Razvoj pouzdanih i osjetljivih molekularnih elektroničkih uređaja važan je jer su konvencionalne mikrobiološke i biokemijske metode skupe, zahtijevaju dulje vrijeme analize, sofisticiranu opremu i uvježbane korisnike. Stoga, kako bi se postigla brza, jeftina, točna i osjetljiva detekcija ciljanih svojstava, u zadnjih dvadeset godina intenzivno se razvija tehnologija biosenzora (Ahmed i sur. 2014).

Biosenzor je analitički uređaj koji pretvara biološki odgovor bioreceptora u mjerljivi signal (Morales i Halpern 2018). Izbor bioreceptora vrlo je važan za učinkovitost biosenzora jer određuje osjetljivost i specifičnost analize. Antitijela, enzimi, nukleinske kiseline, lektini i biomimetički materijali poput molekularnih utisaka na polimerima (engl. molecularly imprinted polymers, MIPs) su neki primjeri korištenih bioreceptora (Templier i sur. 2016). Bioreceptor, koji specifično veže analit imobilizira se na površinu transduktora, gdje će se događaj prepoznavanja bioreceptora i analita manifestirati kao promjena nekog fizikalnog svojstva koje se može elektronički detektirati. Po svojoj fizikalnoj osnovi transduktori se mogu svrstati u elektrokemijske, optičke, piezoelektrične i termičke. Piezoelektrični biosenzori baziraju se na povezivanju bioreceptora s piezoelektričnom komponentom, koja je najčešće kvarcni kristal obložen zlatnim elektrodama (Perumal i Hashim 2014).

Senzori kvarc-kristalne mikrovage (engl. quartz crystal microbalance, QCM) su piezoelektrični senzori koji prate promjene rezonantne frekvencije kvarcnog kristala uslijed promijene mase na njegovoj površini (Campos i sur. 2015). Dakle, specifična interakcija između analita i

imobiliziranog bioreceptora na površini QCM senzora rezultira porastom mase i tako dovodi do smanjenja rezonantne frekvencije kvarcnog kristala. Naprednija izvedba uređaja, QCM-D istovremeno prati viskoelastična svojstva vezane mase bilježeći promjene u energiji disipacije ( $\Delta D$ ). QCM se uglavnom primjenjuje u proučavanju biosenzora, adsorpcije proteina, samoorganizirajućih slojeva te u proučavanju interakcija između stanica i površina (Slika 3) (Tonda-Turo i sur. 2018).

Iako se prema literaturi piezoelektričnim sensorima ne pridaje toliko pozornosti kao elektrokemijskim i optičkim biosenzorima, QCM biosenzori imaju brojne prednosti, uključujući jednostavnost korištenja, niske troškove, zadovoljavajuću osjetljivost, detekciju u stvarnom vremenu, kraće vrijeme analize i mjerenje bez obilježavanja analita (Chen i Cheng 2018).



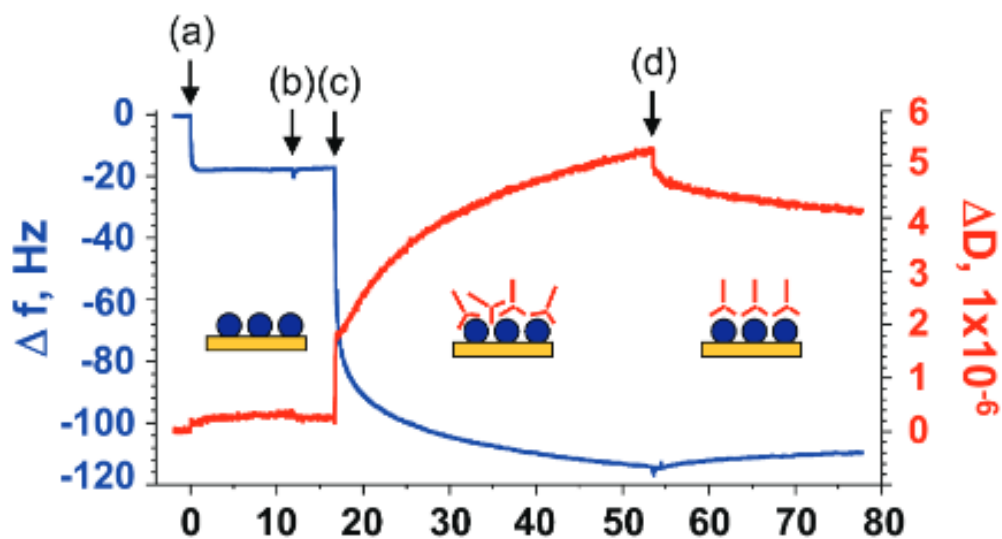
**Slika 3.** Shematski prikaz parametara koji se dobivaju QCM-D tehnikom i sustava koje se može analizirati i istraživati (preuzeto iz Tonda-Turo i sur. 2018).

Tehnološki razvoj novih metoda kao što su mikroskopija atomske sile (AFM) ili kvarcna mikrovaga (QCM) otvorio je nove perspektive za otkrivanje melanoma i njegovo otkrivanje biomarkera (Huber i sur. 2015). Biosenzori u sklopu QCM primijenjeni su za proučavanje prepoznavanja lektin-ugljikohidrata i za proučavanje učinaka lijekova na ljudske stanice (Sobiepanek i sur. 2017).

Aktivna komponenta kvarcne mikrovage je tanki kristal kvarca prekriven zlatnim elektrodama s imobiliziranim bioreceptorima. Biosenzor je elektrodama spojen na izvor struje koja uzrokuje rezonantnu oscilaciju kvarcnog kristala (obično 5 ili 10 MHz). Biološki sustav od interesa

detektira se vezanjem na površinu biosenzora, gdje adsorbirana masa mijenja rezonantnu frekvenciju (Slika 4). Uređaj omogućuje istovremeno mjerenje rezonantne frekvencije (mase) i gušenje titranja-disipacije (viskoelastičnosti) kao funkcije vremena. Ova tehnika omogućuje kinetičke i termodinamičke analize interakcije u stvarnom vremenu, gdje je jedna molekula imobilizirana na površini, a druga u protoku. Adhezija stanica složen je proces, koji započinje sedimentacijom stanica nakon čega slijedi stvaranje nespecifičnih interakcija stanica i supstrata praćeno uspostavljanjem specifičnih molekularnih veza npr. ligand-receptor. (Tan i sur. 2014). Nekovalentne veze uključene su u mnoge specifične interakcije između supstrata i bioreceptora, a mogu se temeljiti na vodikovim vezama, van der Waalsovima silama i hidrofobnim interakcijama (Coelho i sur. 2017). Površinska modifikacija kvarcnog senzora igra važnu ulogu u boljoj ili lošijoj regulaciji fizioloških procesa stanica kao što je adhezija. Ono što je važno, neka od mjerenja na QCM-D uređaju mogu se izvršiti na živim ili fiksnim stanicama i mogu pružiti informacije o viskoelastičnim svojstvima novonastale biomolekularne površine (Sobiepanek i Kobiela 2018).





**Slika 4.** Primjer podataka dobivenih adsorpcijom uzorka na površini biosenzora. Aktivne čestice iz uzorka se naglo adsorbiraju na biosenzor (a) te dolazi do sedimentacije svih bioaktivnih molekula u otopini. Dodaje se nova otopina pa ponovno dolazi do adsorpcije (c) i konačno zasićenja sustava na biosenzoru. Koraci b i d odgovaraju promjeni gustoće različitih otopina. Promjena frekvencije je označena plavom bojom, dok je disipacija označena crvenom. Slaba promjena disipacije kao odgovor na promjenu frekvencije u koraku a ukazuje na veću rigidnost molekula iz prvog uzorka. S druge strane adsorpcija uzorka c daje veliku promjenu frekvencije i disipacije, ukazujući na povišena viskoelastična svojstva (preuzeto iz Dixon 2008).

## 2 CILJ ISTRAŽIVANJA

U okviru ovog diplomskog rada upotrebljena je kvarcna mikrovaga s praćenjem disipacije (QCM-D) u svrhu provjere mogućnosti korištenja QCM-D tehnike za određivanje koncentracije algi u tekućem mediju i viskoelastičnih svojstava odabranih fitoplanktonskih vrsta *D. tertiolecta* i *C. closterium*.

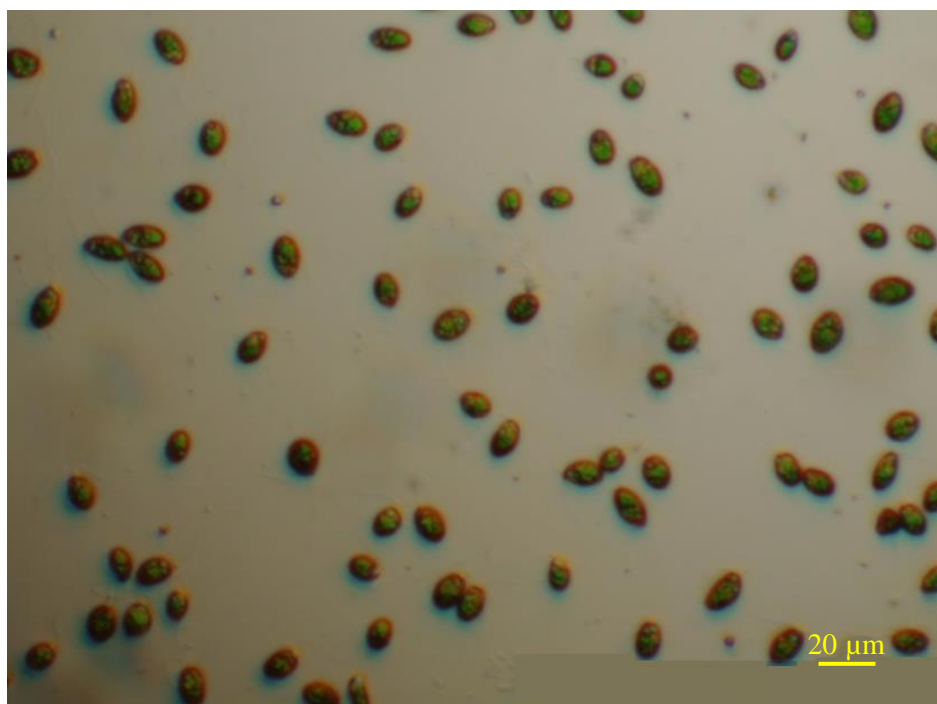
Ciljevi diplomskog rada su:

- odrediti krivulje rasta fitoplanktonskih vrsta *Dunaliella tertiolecta* i *Cylindrotheca closterium* u uzorku
- odrediti korelaciju gustoće stanica u uzorku s površinskom brojnošću stanica na senzoru pri QCM-D mjerenima
- odrediti omjer disipacije i promjene mase kao indikatora viskoelastičnih svojstava vezanih stanica koje su uzgajane bez i uvjetima stresa, odnosno povišene temperature
- ustanoviti postojanje veze QCM-D viskoelastičnog parametra vrste i/ili uvjeta rasta stanica u svrhu dobivanja metode kojom bi se jednostavno moglo pratiti promijene površinskih svojstava zelenih algi i algi kremenjašica u morskom ekosustavu kao odgovor na stres.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Istraživane vrste

U ovom istraživanju korištene su dvije monokulture stanica. Prva korištena monokultura je *D. tertiolecta* (Slika 5). Monokultura je nabavljena iz zbirke fitoplanktona od Provasoli-Guillard Center of Marine Phytoplankton, Bigelow Laboratory for Ocean Sciences, West Boothbay Harbour, Maine, USA.



**Slika 5.** Kultura stanica *D. tertiolecta* uzgajana u f/2 mediju, snimljeno video-mikroskopom Newport M-423 pod povećanjem 400x.

Druga korištena monokultura je *C. closterium* (Slika 6). Kultura je nabavljena iz zbirke fitoplanktona od Provasoli-Guillard Center of Marine Phytoplankton, Bigelow Laboratory for Ocean Sciences, West Boothbay Harbour, Maine, USA.



**Slika 6.** Kultura stanica *C. closterium* uzgajana u f/2 mediju, snimljeno video-mikroskopom Newport M-423 pod povećanjem 400x.

### 3.2 Stanični uzgoj

Medij za uzgoj dijatomeja je f/2, dok je za *D. tertiolectu* pripremljen f/2-Si (tj. f/2 bez dodatka  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) jer kod algi koje ne zahtijevaju silicijev dioksid prilikom uzgoja dolazi do taloženja silicija u slučaju njegovog dodavanja. Medij f/2 koji je uobičajen i široko korišten, u osnovi je obogaćena morska voda namijenjena za uzgoj morskih algi, posebice dijatomeja. Koncentracija originalne recepture, nazvana „f medij“ (Guillard i Ryther 1962), umanjena je za polovicu. Medij je pripremljen tako što je hladna morska voda filtrirana kroz Milipore filtere veličine pora  $0,22 \mu\text{m}$  radi uklanjanja bakterija. Na Erlenmayer tikvicu od 250 mL označeni su podaci o kulturi, alikvotu i datumu precjepljivanja. Zatim je u tikvicu dodano 100 mL filtriranog mora te  $100 \mu\text{L NaNO}_3$ ,  $100 \mu\text{L}$  otopine tragova metala i kod pripreve dijatomeja još  $100 \mu\text{L Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ . Pripremljene otopine poklopljene su staklenom čašicom te zagrijavane u mikrovalnoj pećnici, 3 minute. Erlenmayer tikvice s otopinama prebačene su u inox komoru gdje su dodatno sterilizirane UV lampom još 10 minuta. Nakon otprilike 3 h, kada se medij u tikvicama ohladio, dodano je 3 kapi vitamina preko sterilnog akrodiska i  $100 \mu\text{L NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (koristi se sterilni pribor). Nakon navedenih postupaka, mediji su spremni za dodatak fitoplanktonskih kultura koje su u stacionarnoj fazi rasta. Alikvoti kultura dodani su mediju također sterilnim priborom. Nakon

nasadivanja sterilnom tehnikom rada, tikvice su začepljene sterilnim čepom od vate koji se dodatno obložio aluminijskom folijom. Kulture su stavljene u komoru za uzgoj (GFL 1086) pri temperaturama od 18 °C u prvom slučaju i 30 °C u drugom slučaju, uz 20 okretaja/minuti i ciklusu osvjetljenja (1500 luxa) dan-noć 12-12 h. Svakih drugi dan korištene su tehnike optičke mikroskopije u svrhu kvantitativnog praćenja dinamike rasta.

**Tablica 1.** Kemijski sastav medija korištenog za uzgoj monokultura *D. tertiolecta* i *C. closterium*.

| Sastav medija                                        | <i>Medij Dunaliella tertiolecta</i> | <i>Medij Cyndrotheca closterium</i> | c/mol dm <sup>-3</sup>  |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| <b>Filtrirana morska voda</b>                        | 100 mL                              | 100 mL                              | /                       |
| <b>NaNO<sub>3</sub></b>                              | 100 µL                              | 100 µL                              | 8,83 x 10 <sup>-4</sup> |
| <b>Otopina tragova metala</b>                        | 100 µL                              | 100 µL                              | /                       |
| <b>Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O</b> | /                                   | 100 µL                              | 1,06 x 10 <sup>-4</sup> |
| <b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O</b> | 100 µL                              | 100 µL                              | 3,63 x 10 <sup>-5</sup> |
| <b>Otopina vitamina</b>                              | 3 kapi*                             | 3 kapi*                             | /                       |
| *Kapi su dodane sterilnim akrodiskom 0,22 µm.        |                                     |                                     |                         |

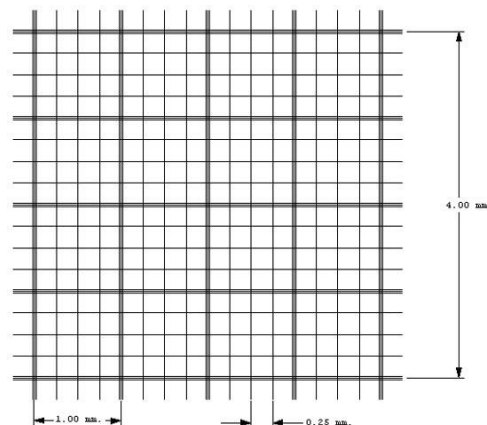
### 3.2.1. Izolacija stanica

Uzorci fitoplanktonskih stanica *D. tertiolecte* i *C. closterium* za mjerenje QCM-D tehnikom izolirane su iz hranjive podloge centrifugiranjem (2000 g, 3 min, Minicentrifuga, ROTILABO). Kulture su izolirane odvojeno kako ne bi došlo do kontaminacije uzorka drugom kulturom. Pipetom je odvojen supernatant od stanica te je čistom pipetom dodan jednaki volumen filtrirane morske vode. S obzirom na to da su centrifugirane alge nakon centrifugiranja istaložene na dno epice u obliku peleta, nakon ispiranja su resuspendirane pomoću vrtložne miješalice te ponovno oborene centrifugiranjem od filtrirane morske vode. Navedeni postupak ponovljen je još dva puta. Suspenzija stanica u filtriranoj morskoj vodi sadrži otprilike  $3-6 \times 10^6$  stanica/mL (izbrojano Fuchs-Rosenthal hemocitometrom), koncentracija ovisi o fazi rasta stanica korištenih prilikom mjerenja QCM-D instrumentom. Konačni uzorak korišten za mjerenje ima volumen 6 mL.

### 3.3 Mikroskopska mjerenja: određivanje koncentracije stanica

#### 3.3.1 Određivanje volumne koncentracije i dinamike rasta fitoplanktona

Za određivanje dinamike rasta *D. tertiolecta* i *C. closterium*, stanice su brojane tijekom 30-o dnevnog eksperimenta svaki drugi dan, u svrhu određivanja početka i trajanja pojedinih faza rasta: početna lag, eksponencijalna (logaritamska) i stacionarna. Za potrebe određivanja volumne koncentracije stanica korišteni su: svjetlosni mikroskop Olympus BX51 i hemocitometar Fuchs-Rosenthal, Fein-Optik Jena, Germany, dubine jažice 0,2 mm. Alikvotu uzorka stanica *D. tertiolecta* od 1mL u sterilnim uvjetima dodano 20  $\mu$ L otopine formaldehida za fiksaciju (dijatomeje nisu bile fiksirane). Uzorak je pipetom nanesen na Fuchs-Rosenthalovu komoru, prekriven pokrovnim stakalcem i stavljen pod svjetlosni mikroskop Olympus BX51. Fuchs-Rosenthalova komora (slika 7.) ima površinu od 16 mm<sup>2</sup> (4 x 4) i dubinu od 0,2 mm stoga je ukupni volumen komore 3,2 mm<sup>3</sup>.

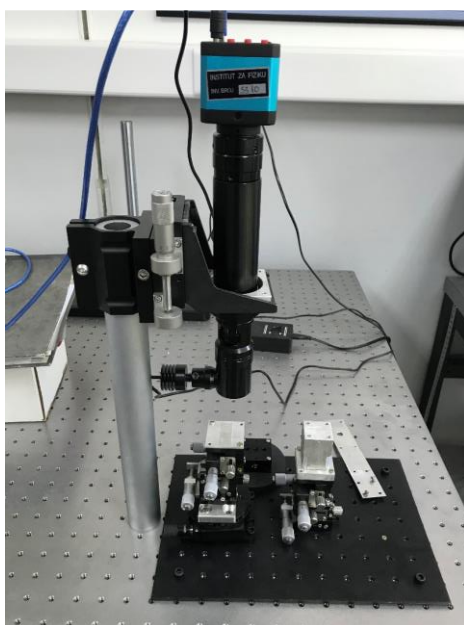


**Slika 7.** Fuchs-Rosenthalov hemocitometar s označenim veličinama ćelija (preuzeto iz kataloga Electron microscopy sciences....).

Stanice su brojane metodom nasumično odabranih polja pod povećanjem 40 i 100 x. Prilikom brojanja uzete su u obzir i stanice koje se nalaze na rubovima ćelije, te se brojanje ponavljalo 3 puta radi statističke točnosti rezultata. Abundancija stanica u otopini izračunata je iz brojnosti stanica po ćelijama prema Fuchs-Rosenthal formuli za hemocitometar. Na temelju dobivenih abundancija nacrtana je krivulja rasta i određene su pojedine faze rasta stanica.

### 3.3.2 Određivanje površinske koncentracije fitoplanktona

Kroz vremenski period od više od 30 dana, zajedno s dinamikom rasta stanica, praćena je površinska koncentracija stanica na kvarcnom biosenzoru. Po završetku mjerenja na instrumentu Q-Sense E1, kvarcni biosenzor s adsorbiranim stanicama pažljivo je postavljen na predmetno stakalce (BioGnost, 26x76 mm), u sterilnim uvjetima. Nasumično odabrana područja na biosenzoru snimljena su video-mikroskopom Newport M-423 (slika 8), pod povećanjem 10x. Program korišten za pohranu slika je IP Camera Viewer 4. Brojnost stanica izračunata je uporabom programa ImageJ s modulom QuimP. Normiranjem na površinu koja je snimana, dobivene su vrijednosti površinske brojnosti po  $\text{mm}^2$  za pojedini dan ili eksperiment u danu. Jedna snimka videomikroskopom (0,2x0,3 mm) predstavlja ~0,1% površine biosenzora. Za pojedinu vrijednost površinske brojnosti uziman je prosjek od 10 snimki po biosenzoru. Dobivene vrijednosti smatraju se dovoljno reprezentativnim za površinsku koncentraciju na cijelom senzoru. Primjenom student t-testa (Pavlić 1988) određena je vjerojatnost od 95% kako se vrijednost površinske koncentracije stanica nalazi u rasponu +/- dvostruka vrijednost standardne greške vrijednosti broja stanica u nasumično odabranim područja. Student t-test koristi se za ocjenu uzorkovanja s konačnim brojem uzoraka, ovdje snimki površine senzora. Standardna greška je vrijednost standardne devijacije mjerenih vrijednosti podijeljena s korijenom broja uzoraka, tj. broja mjerenja. Ovom automatiziranom metodom procjenjuje se ukupna koncentracija stanica koja se nalazi na površini elektrode.



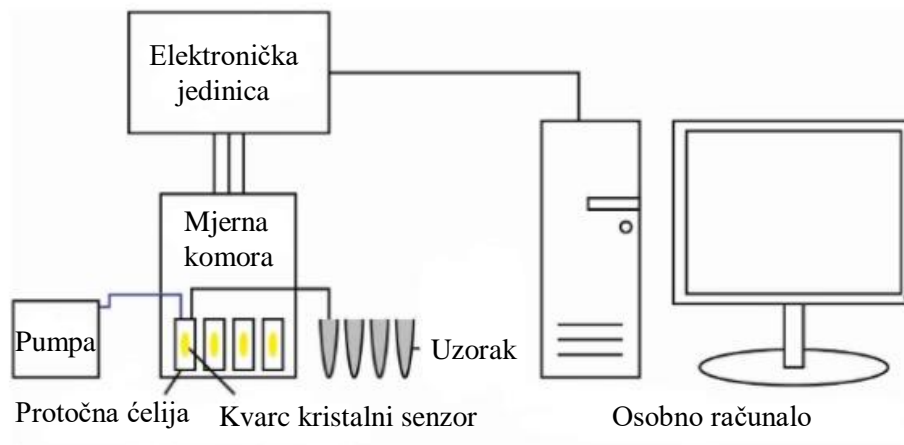
**Slika 8.** Video-mikroskop Newport M-423.

### 3.4 Mjerenja kvarcnom mikrovagom uz praćenje disipacije (QCM-D)

#### 3.4.1 QCM-D instrumentacija

Aparatura osnovnog QCM-D instrumenta (slika 9) sastoji se od sljedećih komponenti:

1. kvarcni kristal s elektrodama za pobudu titranja,
2. protočna ćelija koji drži kvarcni kristal i omogućuje protok tekućeg medija (otopina i staničnih preparata) preko gornje strane kristala, preko ćelije se ostvaruje električni kontakt s elektrodama na senzoru,
3. peristaltička pumpa za kontrolirani protok tekućeg medija,
4. mjerna komora koja regulira temperaturu protočne ćelije i time temperaturu eksperimenta,
5. elektronička jedinica koja pobuđuje kristal na rezonantno titranje primjenom odgovarajućeg napona i bilježi promjene rezonantne frekvencije i disipacije.



**Slika 9.** Shematski prikaz QCM-D instrumenta sa svojim sastavnim dijelovima. Preuzeto s: <https://www.nanoscience.com/techniques/quartz-crystal-microbalance/> (23.07.2020.)

Mjerenja kvarcnom mikrovagom uz praćenje disipacije napravljena su u standardnoj protočnoj ćeliji, prikazano na slici 10.





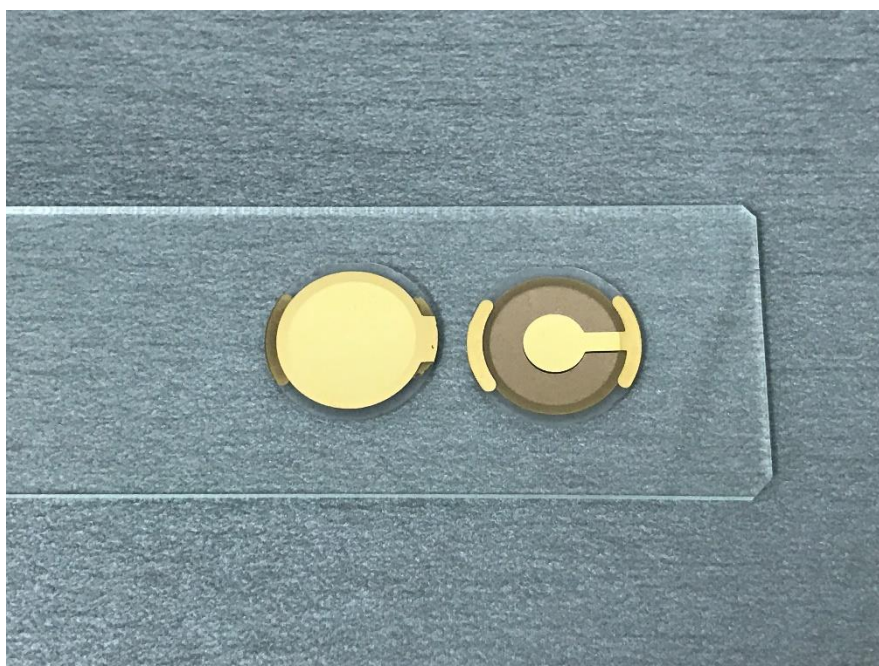
**Slika 10.** Protočna ćelija, Q-Sense E1, Biolin Scientific, Švedska.

Rasipanje (disipacija) energije senzora mjeri se tako što uređaj bilježi gušenje, atenuaciju oscilacija senzora po prestanku pobude rezonantnom frekvencijom (Irwin i sur. 2005). Rasipanje energije zabilježeno tijekom adsorpcije odražava viskoelastičnost materijala koji dodiruje površinu senzora. Varijacija frekvencije u QCM-u proporcionalna je gustoći mase ( $\Delta m$ ) u  $\text{ng cm}^{-2}$  adsorbiranog materijala prema Sauerbreyjevoj jednadžbi:  $\Delta f = -C\Delta m$  gdje je  $C$  konstanta koja ovisi o karakteristikama instrumenta, tj. fizičkim dimenzijama senzora iz koje proizlazi njegova rezonantna frekvencija (Huang i sur. 2017). Za QCM-D uređaj korišten u ovom radu vrijedi  $C=17,7 \text{ ng/cm}^2/\text{Hz}$ . Korišteni senzor je kružnog oblika, promjera 14 mm, s 50 nm  $\text{SiO}_2$  nanesenog na Au-elektrode (Slika 11) (MicroVacuum Ltd., Mađarska). Pomak od 1 Hz u rezonantnoj frekvenciji kristala-senzora posljedica je depozicije i vezanja  $\sim 20 \text{ ng}$  materijala na površini senzora funkcionaliziranim polietileniminom. Napomenimo kao linearni odnos između frekvencije i mase, kako je definirao Sauerbrey, ne uspijeva za uzorke manje krutosti odnosno za materijale koji nisu čvrsto vezani za površinu, jer se ne uspijeva u potpunosti vezati titranje uzorka s oscilacijom podloge tj. kvarcnog kristala (Dunham i sur. 1995). U takvim slučajevima može doći do podcjenjivanja mase na površini kristala. Dakle, važno je uzeti u obzir rasipanje ili disipaciju prilikom kvantifikacije viskoelastične mase, no

apsolutno određivanje mase u većini slučajeva neće biti moguće bez nekog vanjskog načina određivanja koji bi potvrdio primijenjeni viskoelastični model (Voinova i sur. 1999).

### 3.4.2 Funkcionalizacija senzora bioreceptorima

Senzori s površinom čistog zlata, uobičajeni za QCM metode, nisu primarni odabir površine za eksperimente na staničnoj kulturi zbog nespecifične adsorpcije mnogih biomolekula (Sobiepanek i Kobiela 2018). Uobičajeni su senzori gdje su elektrode obložene polistirenom ili silicijevim dioksidom na koje se zatim nanose bioreceptorske molekule odgovarajućim kemijskim postupcima. Za potrebe ovog rada je ipak korišten sustav relativno nespecifične adsorpcije – senzor je funkcionaliziran s polietileniminom (PEI). Polietilenimin je vodotopljiv, kationski polimer koji se sastoji od primarnih, sekundarnih i tercijarnih amino skupina (Pandey i Sawant 2016) i odlikuje se stvaranjem površine koja je elektrostatički pozitivno nabijena. Depozicija PEI je izvedena tako da je 20  $\mu\text{L}$  otopine PEI-a nakapano tako da bude prekrivena cijela površina senzora. Senzori su ostavljeni 1h u sterilnim uvjetima te nakon toga ispirani MiliQ vodom i osušeni plinom dušikom. Tako pripremljeni biosenzori spremni su za korištenje u QCM-D mjerenjima.



**Slika 11.** QCM-D 5 MHz kvarcni senzor s 50 nm debelim slojem  $\text{SiO}_2$ , MicroVacuum Ltd., Mađarska.

### 3.4.3 QCM-D mjerenje

QCM-D mjerenje čini praćenje pomaka vrijednosti frekvencije,  $\Delta f$  i disipacije,  $\Delta D$  za nekoliko odabranih harmonika rezonantne frekvencije QCM biosenzora (prvi harmonik se ne prati jer je potisnut zbog mehaničkog vezanja biosenzora u komori). Jedan mjerni ciklus sastoji se od slijeda depozicija različitih preparata (čiste vode, puferskih i drugih otopina ili suspenzija sa stanicama) tijekom kojih se u vremenu bilježe parametri  $\Delta f$  i  $\Delta D$ . Korištena su dva različita slijeda preparata prilikom mjerenja. Prvi započinje s MilliQ vodom, nakon čega je primijenjena filtrirana morska voda da se uspostavi početna rezonantna frekvencija biosenzora. Naime, frekvencija je osjetljiva čak i na gustoću, tj. molarnost otopine te je potrebno samu otopinu, bez stanica koristiti kao baznu vrijednost. Za mjerenje osnovne frekvencije QCM treba koristiti istu otopinu kao onu koja se koristi za resuspenziju fitoplanktona, kako bi se uskladila gustoća otopina. Protok je reguliran pomoću pumpe čija je brzina protoka postavljena na  $150 \mu\text{L min}^{-1}$ . Ovaj relativno snažni protok osiguravao je da se na biosenzoru bilježe samo zaista vezane stanice, nevezane se ne bi mogle zadržati na površini. Praćena je adsorpcija na površinu kvarcnog senzora funkcionaliziranu otopinom polietilenimina. QCM mjerenja provedena su na  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon određivanja početne rezonantne frekvencije, u protočnu ćeliju dodaje se uzorak s monokulturom algi u koncentracijama ovisnima o danu i fazi rasta. Mjerenja su vršena zasebno na vrstama *D. tertiolecta* i *C. closterium*, uzorkovanim u eksponencijalnoj i stacionarnoj fazi rasta, a uzgajanim na temperaturama  $18$  i  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Slijedi praćenje promjene frekvencije (i disipacije) uslijed adsorpcije mikroalgi na površinu biosenzora. Adsorpcija uzrokuje prigušenje oscilacija pri čemu je masa adsorbiranog materijala proporcionalna promjeni frekvencije kvarca (Salopek 2017). Promjene frekvencije i disipacije viših harmonika (3., 5., 7.) tijekom nastajanja jednosloja mikroalgi, nadgledane su i spremene pomoću programa Qsoft, dok su podatci nakon mjerenja obrađeni u programu Qtools. Količina algi izračunata je prema Sauerbreyjevoj jednadžbi. Nakon završetka mjerenja, biosenzor i mjerni sustav je opran protokom 2% otopine Deconex-a, 5 minuta te ispran MilliQ vodom također 5 min, kako bi se očistili zaostaci algi u dovodnim i odvodnim cjevčicama te protočnoj ćeliji. Nakon uporabe i vađenja iz mjerne komore, senzori obloženi  $\text{SiO}_2$  su očišćeni pomoću 2% otopine SDS-a tijekom 30 minuta, zatim 30 minuta na  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  u 2% otopini Deconex u ultrazvučnoj kupki. Isprani su MilliQ vodom i osušen plinom  $\text{N}_2$  te dodatno obrađeni  $\text{O}_2$  plazmom u Plasma-cleaneru, 5 minuta. Svi tragovi organske tvari uklonjeni su sa senzora prije ponovne funkcionalizacije površine i mjerenja. Na slici 12 prikazana je potpuna instrumentacija kvarc-kristalne mikrovage uz praćenje disipacije.

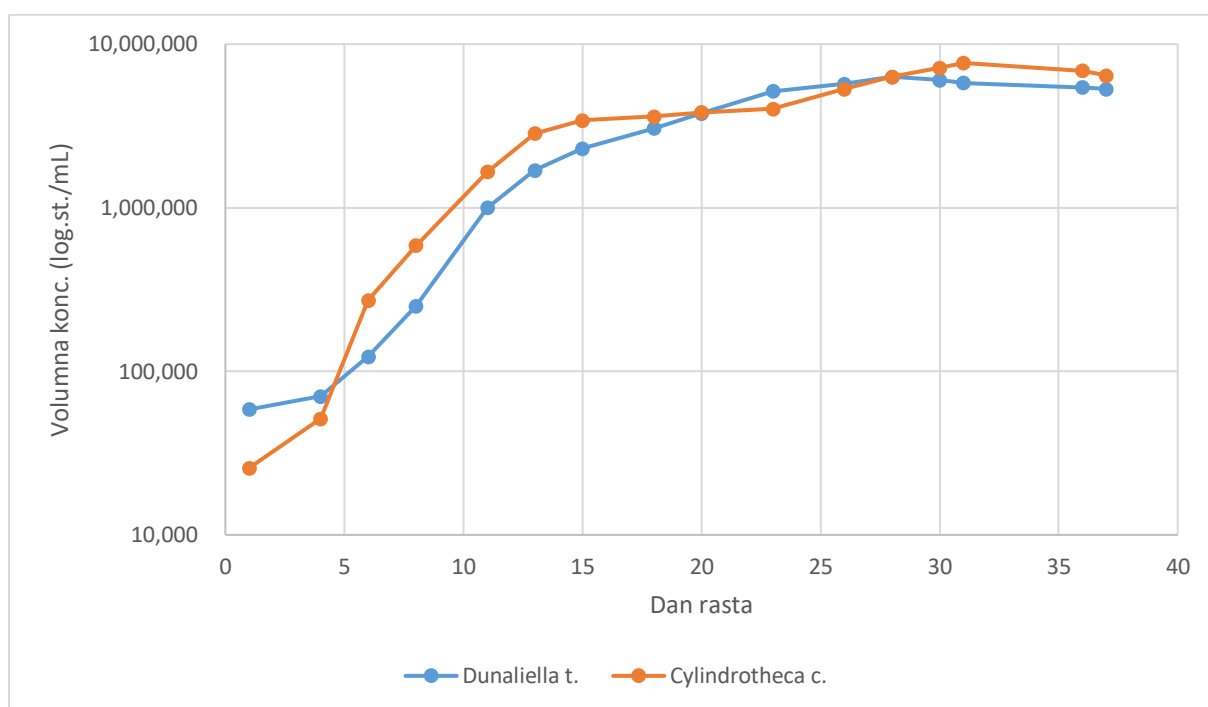


**Slika 12.** Kvarc kristalna mikrovaga s praćenjem disipacije, Q-Sense E1, Biolin Scientific, Švedska.

## 4. REZULTATI

### 4.1 Dinamika rasta monokultura *D. tertiolecta* i *C. closterium*

Dinamika rasta algi *D. tertiolecta* i *C. closterium* praćena je u periodu od 30 dana. Stanice su brojane otprilike svaka 2 dana kako bi se izračunala abundancija stanica (prema Fuchs-Rosenthal formuli za hemocitometar) na temelju kojih je dobivena krivulja rasta (Slika 13) za obje vrste mikroalgi.

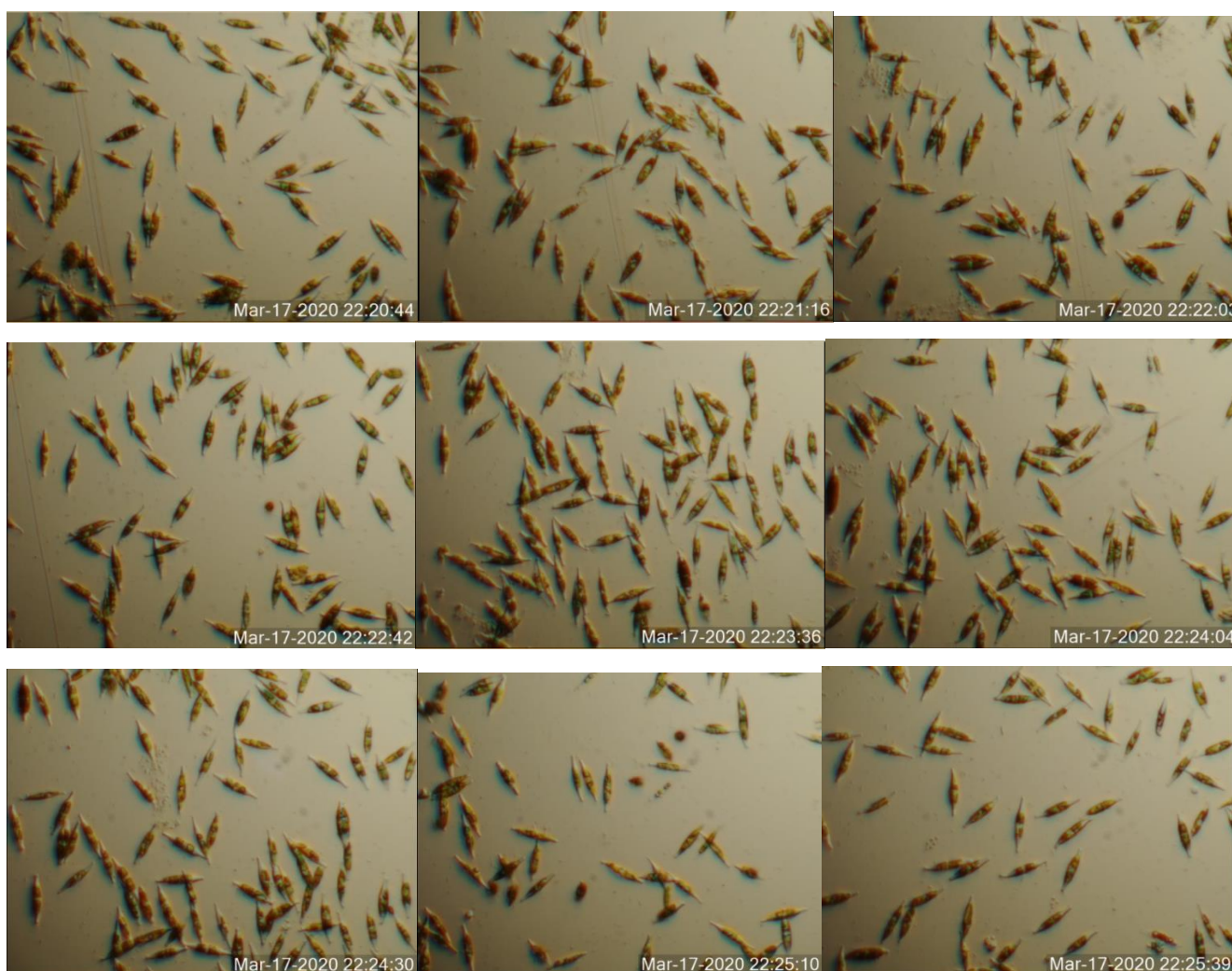


**Slika 13.** Krivulja rasta vrsta *D. tertiolecta* i *C. closterium* u mediju f/2 kroz 30 dana rasta.

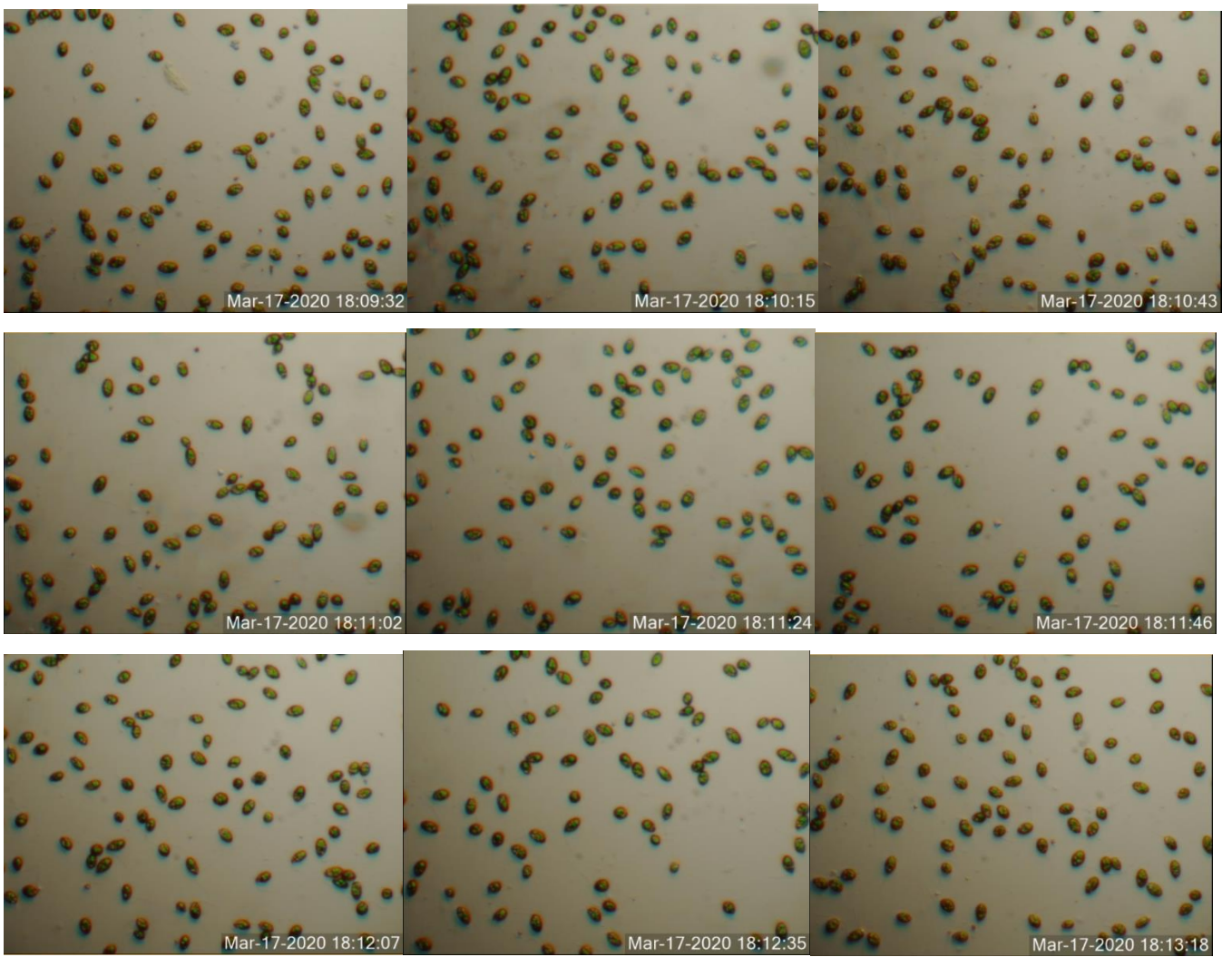
Krivulja rasta podijeljena je u tri faze. Prva je faza početna lag faza, trajala je do 4. dana rasta prilikom čega se abundancija obje vrste algi povećala za  $6 \times 10^4$  stanica/mL. Sljedeća faza je eksponencijalna ili logaritamska faza koja je trajala do 16. dana i za to vrijeme brojnost stanica porasla je s  $7,0 \times 10^4$  stanica/mL na  $3,05 \times 10^6$  stanica/mL. Posljednja faza je stacionarna faza te je trajala od šesnaestog dana pa sve do kraja mjerenja, kada je brojnost stanica iznosila  $6,0 \times 10^6$  stanica/mL u slučaju *D. tertiolecte* te  $7,1 \times 10^6$  stanica/mL za vrstu *C. closterium*.

## 4.2 Površinska koncentracija monokultura *D. tertiolecta* i *C. closterium*

Za pojedinu vrijednost površinske brojnosti uziman je prosjek od 10 snimki po biosenzoru. U tablici 2 dan je primjer za vrijednosti brojanja za stanice u 16. danu rasta, na 18 °C - u ovom primjeru prikazano je 9 snimki površine senzora za pojedinu vrstu. Reprezentativne snimke na kojima je bazirano brojanje dane su na slikama 14 i 15. Za vrstu *D.tertiolecta* standardna greška iznosi  $9/3=3$ , te se stoga vrijednost broja stanica nalazi unutar raspona  $98 \pm 6$  s 95% vjerojatnošću. Za vrstu *C.closterium*, standardna greška je  $21/3=7$ , tako da se vrijednost broja stanica nalazi unutar  $100 \pm 14$ .



**Slika 14.** Stanice *C. closterium* (Ehrenberg) na QCM-D biosenzoru, snimljeno video-mikroskopom, 16. dan rasta.



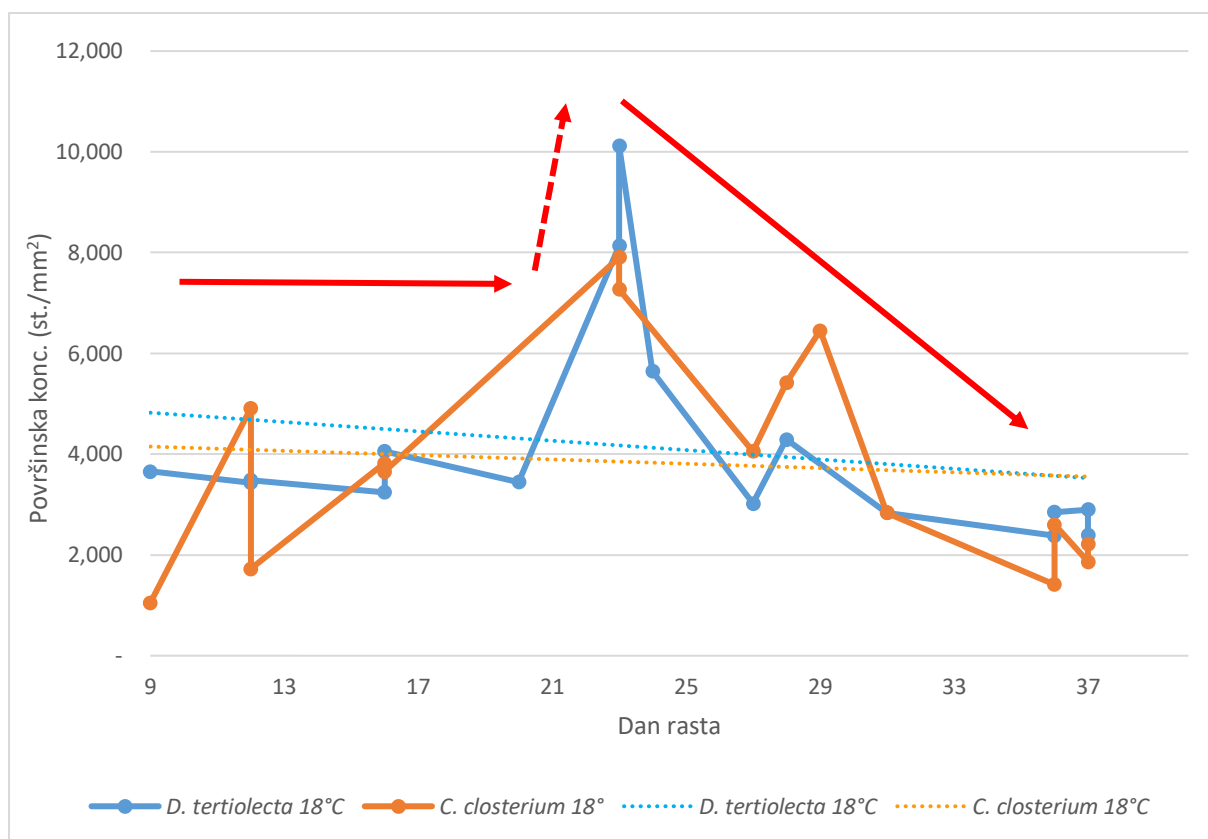
**Slika 15.** Stanice *D. tertiolecta* (Butcher) na QCM-D biosenzoru, snimljeno video-mikroskopom, 16. dan rasta.

**Tablica 2.** Broj stanica na slikama 14. i 15. za stanice u 16. danu rasta, na 18 °C ((S) srednja vrijednost, (SD) standardna devijacija i (SG) standardna greška))

|          | <i>Broj stanica</i>        |                           |
|----------|----------------------------|---------------------------|
|          | <i>D. tertiolecta</i> 18°C | <i>C. closterium</i> 18°C |
| slika 1  | 100                        | 119                       |
| slika 2  | 116                        | 109                       |
| slika 3  | 99                         | 90                        |
| slika 4  | 103                        | 90                        |
| slika 5  | 100                        | 133                       |
| slika 6  | 92                         | 101                       |
| slika 7  | 94                         | 115                       |
| slika 8  | 84                         | 79                        |
| slika 9  | 94                         | 65                        |
| slika 10 | 89                         | 116                       |
| S        | 97                         | 102                       |
| SD       | 9                          | 21                        |
| SG       | 3                          | 7                         |

Na temelju srednjih vrijednosti digitalnih snimaka zabilježenih nakon svakog seta mjerenja na QCM-D uređaju, izrađena je krivulja ovisnost površinske koncentracije (brojnosti) vrsta *D.tertiolecta* i *C. closterium* po danima rasta (slika 16).



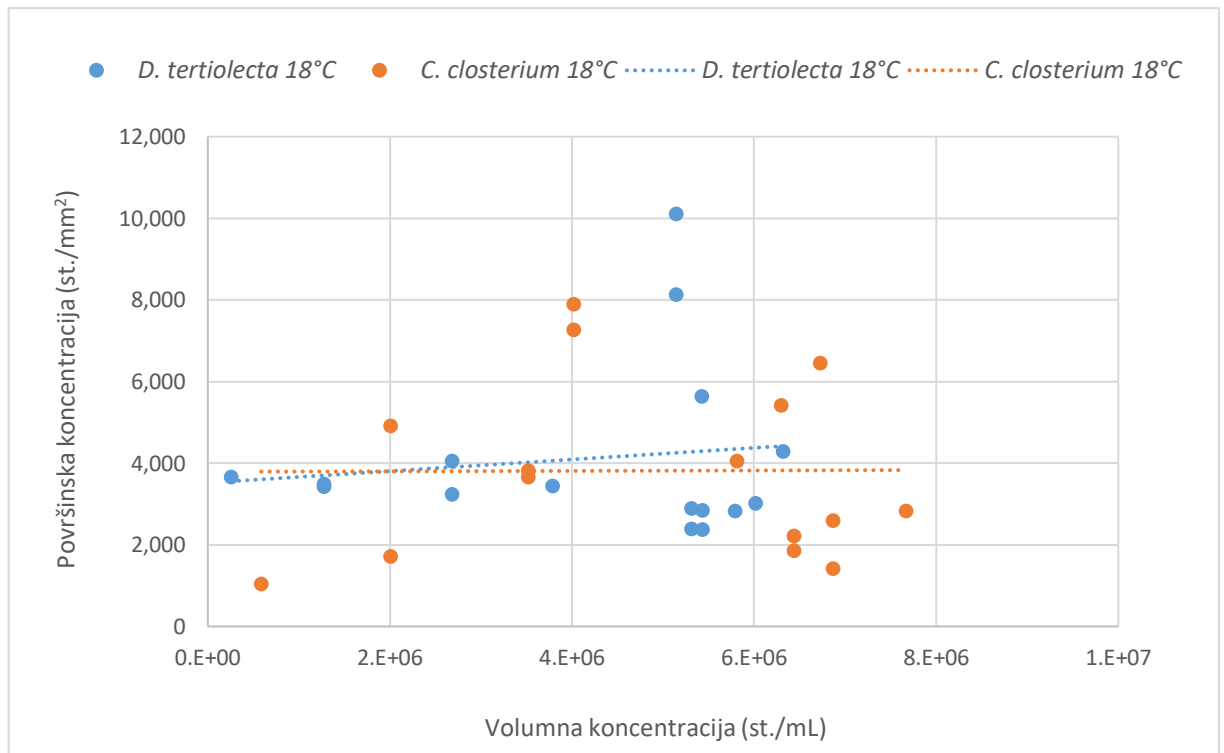


**Slika 16.** Površinske (st. po mm<sup>2</sup>) koncentracije vrsta *D. tertiolecta* i *C. closterium* nakon depozicije na kvarcnom biosenzoru. Strelicama su prikazane moguće tendencije u podacima.

U razdoblju od 20-og do 30-og dana rasta, za vrijeme stacionarne faze, stanice pokazuju veći afinitet za adsorpciju koji protokom vremena pada, moguće zbog gubitka vijabilnosti (odumiranja) stanica u stacionarnoj fazi. Ipak, ove promjene ne mogu se pouzdano identificirati. Potrebno je povećati broj mjerenja kako bi se osigurala pouzdanost ovdje naznačene pojave povećanja adsorpcije u stacionarnoj fazi. Prelazak stanica iz jedne u drugu fazu ne može se jasno uočiti i ne prati krivulju dinamike rasta prikazanu na slici 13.

Na kraju, podaci dobiveni praćenjem volumne koncentracije uzorka uspoređeni su s podacima površinske koncentracije kako bi se pokazalo utječe li brojnost stanica koja ulazi u sustav na količinu depozicije u komori, odnosno brojnost stanica koja je zabilježena na površini biosenzora. Na slici 17 prikazana je korelacija između volumne koncentracije stanica (st./mL) u uzorku korištenom prilikom mjerenja i površinske koncentracije stanica (st./mm<sup>2</sup>) na kvarcnom biosenzoru nakon mjerenja. Uporabom statističke metode Spearmanov  $\rho$  koji za vrstu *D. tertiolecta* iznosi -0,29 te za vrstu *C. closterium* -0,04 dokazano je da ne postoji ovisnost površinske koncentracije (broja algi na senzoru) o volumnoj koncentraciji algi u primijenjenom uzorku. Korelacija se pokazala kao slaba i negativna te je usporedbom s

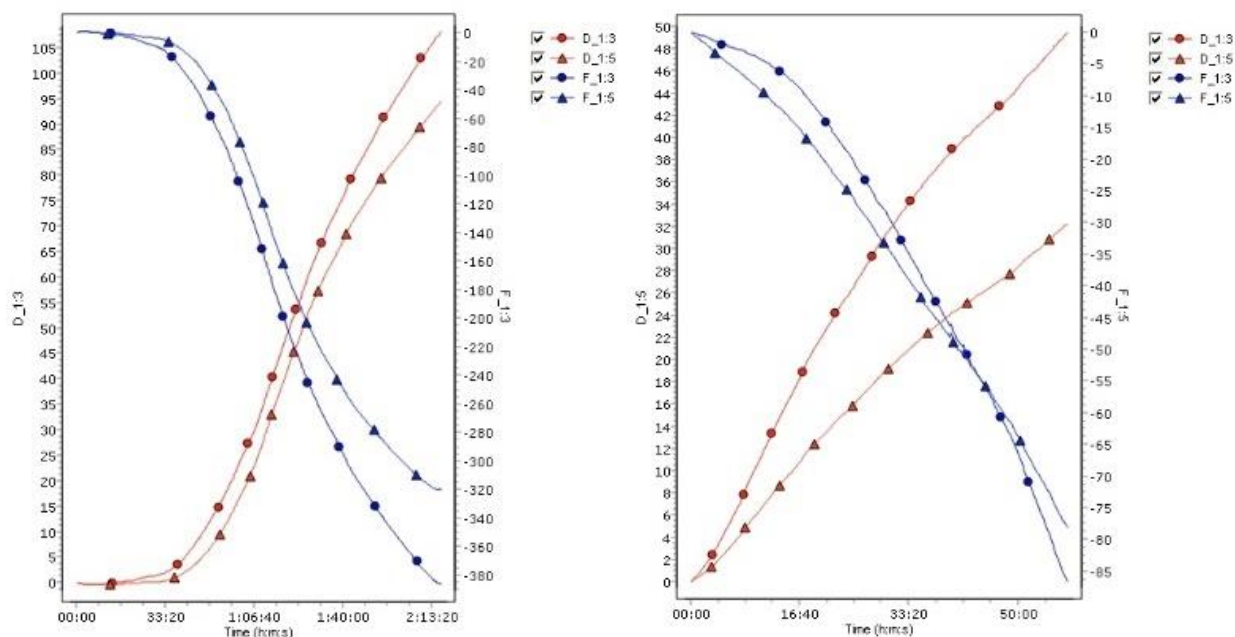
Pearsonovom r korelacijom, čiji su koeficijenti bili niži, zaključeno kako su ove dvije varijable u nelinearnoj ovisnosti te da je Spearmanov koeficijent korelacije ranga bolji izbor (Rebekić i sur. 2015). Negativna korelacija može biti rezultat niske brojnosti stanica na površini (zauzeto manje od 10% površine biosenzora), no potrebno je istražiti mehanizme adsorpcije koji tome mogu biti uzrok.



**Slika 17.** Ovisnost površinske i volumne koncentracije vrsta *D. tertiolecta* i *C. closterium*. Iscrtano linijom prikazane su linearne regresije.

#### 4.3 Ovisnost odaziva QCM-D instrumenta o koncentraciji stanica u otopini i na površini biosenzora

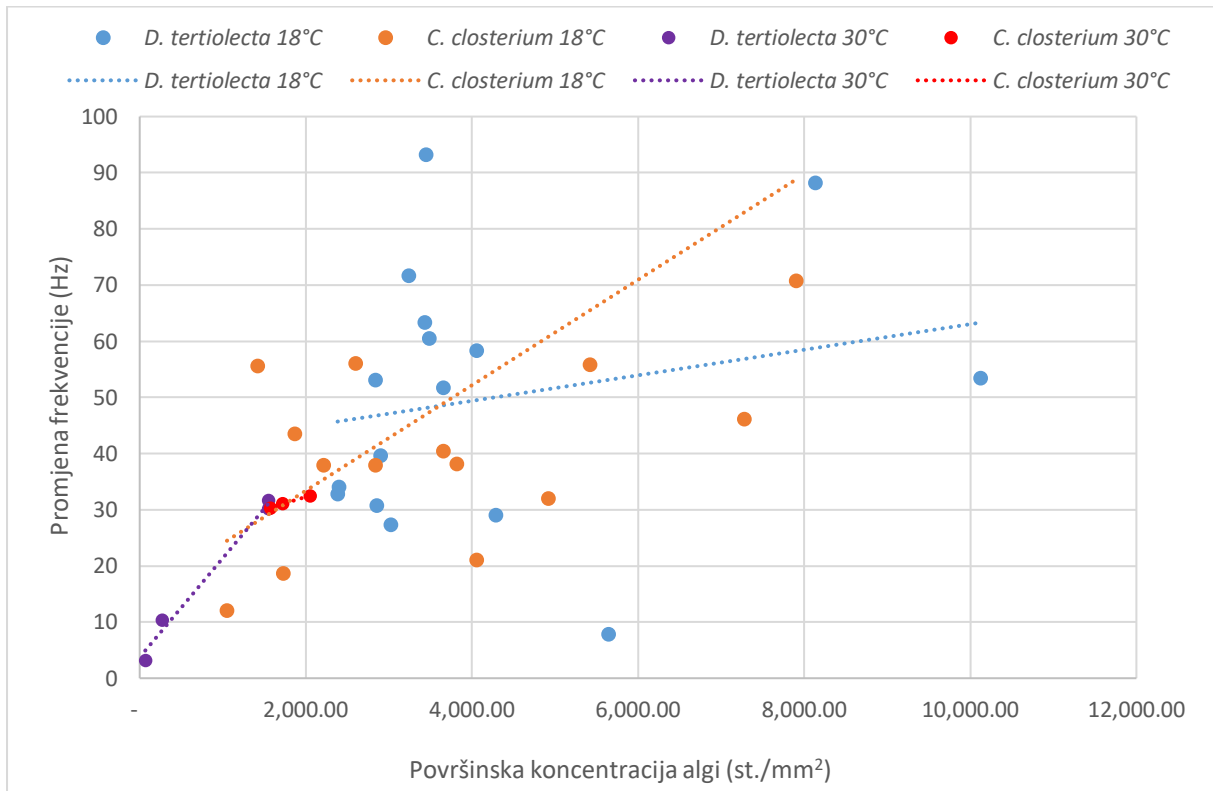
QCM instrument nam daje vremensku dinamiku procesa vezanja stanica na površinu biosenzora tako da parametar promjene rezonantne frekvencije možemo izravno povezati s količinom stanica deponiranih na biosenzor. Slika 18. prikazuje rezultate pokusa gdje su na površini elektrode deponirane stanice vrste *D. tertiolecta* i *C. closterium* iste faze rasta. Po uvođenju preparata stanica u komoru s biosenzorom i *D. tertiolecta* i *C. closterium* pokazuju smanjenje frekvencije i povećanje disipacije s vremenom.



**Slika 18.** Krivulja promjene frekvencije (plavo) i disipacije (crveno) prilikom adsorpcije *D. tertiolecte* i *C. closterium* u stacionarnoj fazi, promatrani su 3. i 5. harmonik.

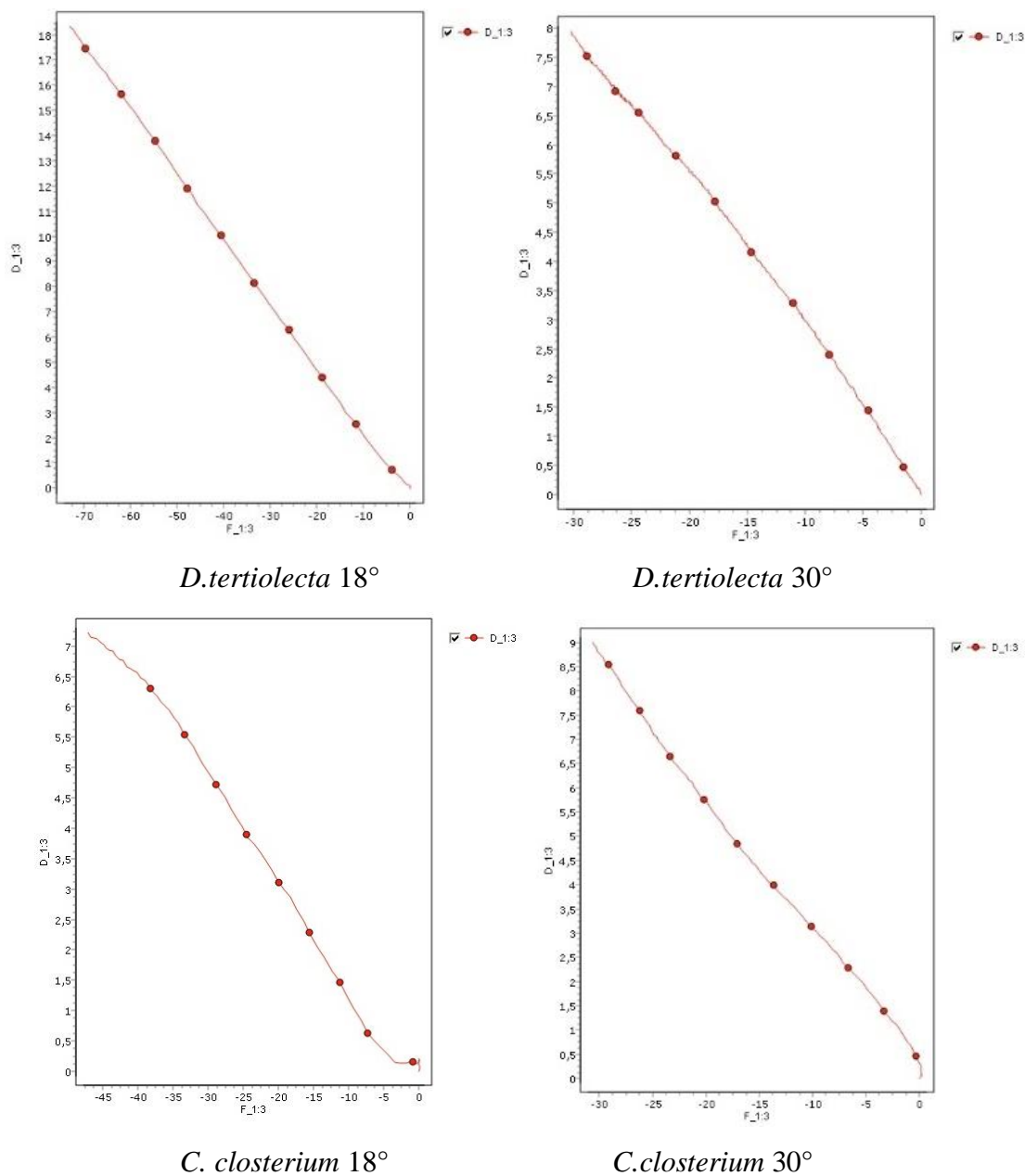
Na slici 18. vidljivo je kako se neposredno nakon uvođenja stanica u QCM komoru bilježi nagli pad frekvencije ( $f$ ) i porast disipacije ( $D$ ). Nakon naglog pada frekvencije (plave točke i linije) slijedi zaustavljanje pada praćeno zaravnjenjem krivulje zbog usporavanja adsorpcije, nakon prvog sata mjerenja. Usporedno, disipacijska vrijednost  $D$  (crvene točke i linije) povećava se nakon početka adhezije i ponaša ekvivalentno parametru  $\Delta f$ . Odnosno, dok masa deponirana na biosenzor nastavlja rasti, viskoelastična svojstva strukture koja je deponirana na senzor se nastavljaju mijenjati. Mjerenje u trajanju od sat vremena je ukazalo na relativno veliku brzinu vezanja (vremenske konstante reakcije reda minuta), kao i na to da su sve primijenjene koncentracije preparata stanica toliko visoke da se vrlo brzo postiže maksimalna zasićenost površine biosenzora stanicama.

Također, razmotrena je povezanost broja algi na biosenzoru s parametrom  $\Delta f$  QCM mjerenja (slika 19). Iz rezultata se može zaključiti kako postoji linearna korelacija mase detektirane QCM-D uređajem kao pomak frekvencije i površinske koncentracije algi.



**Slika 19.** Povezanost pada rezonantne frekvencije biosenzora  $\Delta f$  i površinske koncentracije algi.

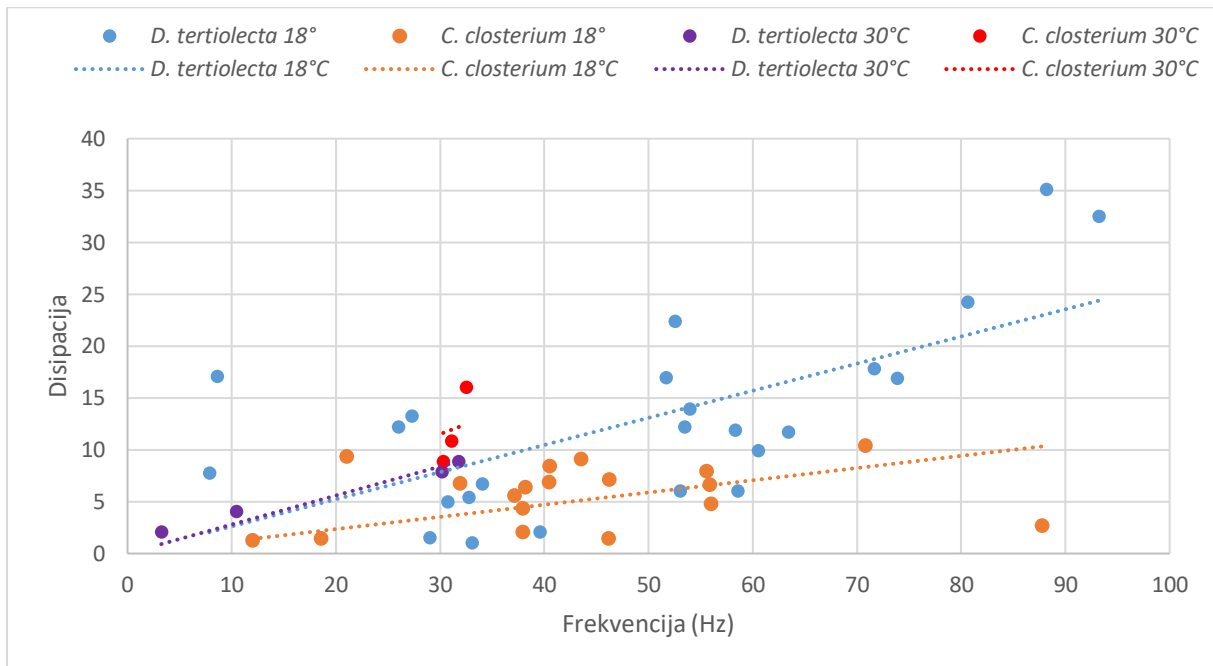
Viskoelastična svojstva adsorbiranih mikroalgi obje vrste analizirana su pomoću  $\Delta f / D$  grafa (slika 18). Razlike u nagibima krivulja istraživanih monokultura ukazuju na različite interakcije između vrste i površine biosenzora. Stoga graf ovisnosti disipacije o frekvenciji može prikazati razlike u disipacijskom odgovoru ovisno o tome da li je adsorbirana tvar fleksibilna i ljepljiva ili kruta i neljepljiva (Berglin i sur. 2008). Pored utjecaja vrste i koncentracije uzoraka, ispitan je i utjecaj temperature na viskoelastična svojstva. Kako je prikazano na slici 20. za prvih 20 Hz promjene frekvencije odgovori disipacije su različiti za obje vrste u svim uvjetima rasta. *D. tertiolecta* pri 18°C ima nešto manju vrijednost disipacije (~5) od *D. tertiolecte* pri 30°C (~6), s druge strane vrsta *C. closterium* pri 18 °C ima dvostruko manju vrijednost (~3) od *C. closterium* uzgajane pri 30°C (~6). Viskoelastična svojstva *D. tertiolecte* i *C. closterium* pokazale su varijacije u viskoelastičnom odgovoru između mjerenja po danima tijekom različitih faza rasta. Obe vrste pri uvjetima rasta u visokim temperaturama pokazuju veću viskoelastičnost od vrsta uzgajanih u normalnim uvjetima rasta, dok sveukupno stanice vrste *D. tertiolecta* pokazuje veću viskoelastičnost od stanica *C. closterium*.



**Slika 20.** Grafički prikaz omjera disipacije i frekvencije (3. harmonik) za vrste *D. tertiolecta* i *C. closterium* pri 18° i 30° istog dana rasta.

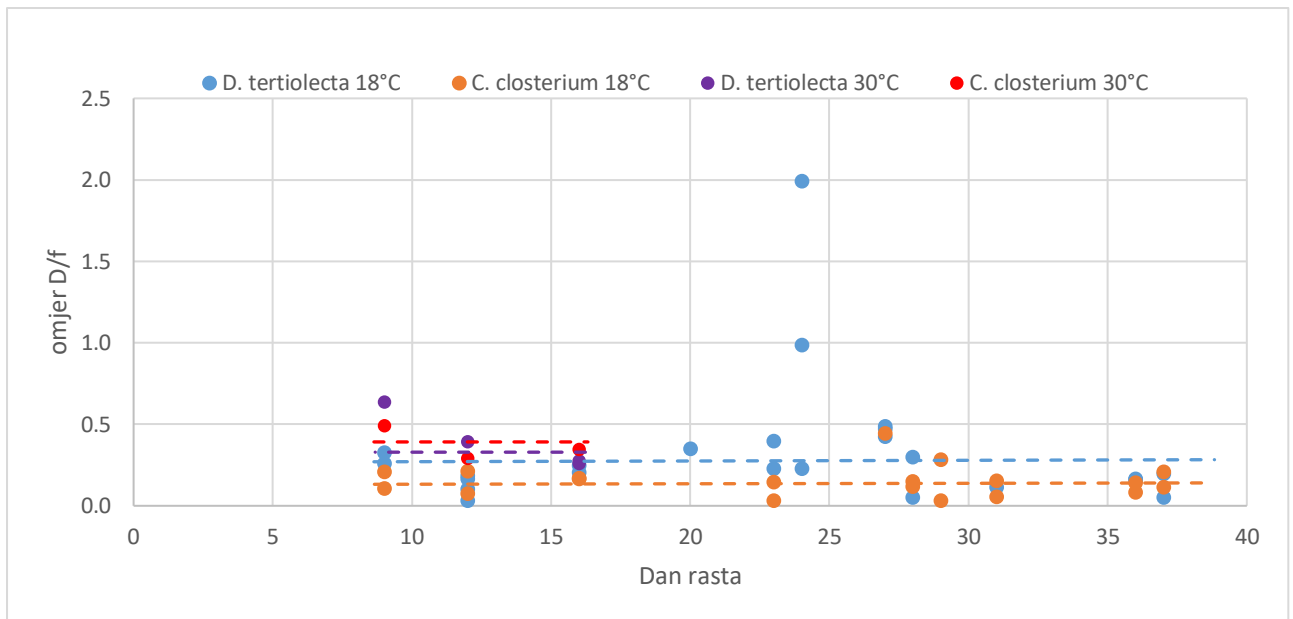
Na slici 21. prikazani su parovi maksimalnih vrijednosti ( $\Delta f$ ,  $\Delta D$ ) disipacije i frekvencije ( $\Delta D$ ,  $\Delta f$ ) za svako pojedino mjerenje adsorpcije mikroalgi na biosenzor. Svaka točka na grafu predstavlja rezultat za određeni dan rasta stanica. Eksperimentalne točke modelirane

kolinearnim modelom, gdje vrijednosti polaze iz ishodišta budući da je disipacija nula u točki gdje je frekvencija nula. Statistička analiza za mjerenja u uvjetima normalnog rasta (18°C) ukazuje na vjerojatnost linearne veze tih parametara, Spearmanov koeficijent korelacije za *D. tertiolecta* iznosi 0,50, dok je za *C. closterium* 0,41, što predstavlja srednje do snažnu pozitivnu korelaciju između parametara disipacije i frekvencije za istraživane vrste, dok su rezultati Pearsonove r korelacije viši, 0,55 za *D. tertiolecta* i 0,44 za *C. closterium* (Akoglu 2018).



**Slika 21.** Omjer frekvencije i disipacije za kulture *D. tertiolecta* i *C. closterium* uzgajane u uvjetima normalnog rasta (18°C) i pri povišenoj temperaturi (30°C) u f/2 mediju.

U dobivenim rezultatima moguće je uočiti da je razlika u viskoelastičnim svojstvima po uzgoju pri 18°C i 30°C zanemariva, naime oba seta točaka mogu se modelirati pravcem sličnog koeficijenta nagiba, tj. omjera  $\Delta D/\Delta f \approx 0,3$  za vrstu *D. tertiolecta* pri 18°C i 30°C. Stanice *C. closterium* pokazuju viši omjer  $\Delta D/\Delta f \approx 0,4$  pri višoj temperaturi uzgoja od uzgoja u standardnim uvjetima gdje je vrijednost omjera  $\Delta D/\Delta f \approx 0,15$ . Valja istaknuti da na frekvenciju oscilacije čistog kvarca utječe temperatura, stoga je stabilizacija signala (i kalibracija biosenzora) otežana pri višim temperaturama (Molino i sur. 2006). Prvenstveno ipak može se primijetiti da točke ( $\Delta f$ ,  $\Delta D$ ) pokazuju varijaciju u širokom rasponu i da se rasponi za dvije vrste preklapaju. Kako bi se dodatno ilustriralo, točke ( $\Delta f$ ,  $\Delta D$ ) iz prikaza na slici 21. prikazane su kao omjeri  $\Delta D/\Delta f$  prema danu rasta stanice (slika 22).



**Slika 22.** Grafički prikaz omjera  $\Delta D / \Delta f$  po danima rasta za vrste *D. tertiolecta* i *C. closterium* pri uvjetima rasta od 18 °C i 30 °C u f/2 mediju.

Pravci kojima su modelirani podaci na Slici 21. ovdje su prikazani kao horizontalne linije, prema vrijednostima omjera koje su navedene gore (  $\sim 0,3$  za *D. tertiolectu* i  $\sim 0,15$  za *C. closterium* pri 18 °C;  $\sim 0,3$  za *D. tertiolectu* i  $\sim 0,4$  za *C. closterium* pri 30 °C).



## 5. RASPRAVA

Na površini biosenzora kvarcne mikrovage (s monitoringom disipacije) praćena je adsorpcija dviju fitoplanktonskih vrsta s potpuno različitim morfološkim karakteristikama. Različiti uvjeti prilikom uzgoja algi bile su temperature 18 °C i 30 °C, niža temperatura odgovara uvjetima prirodnog staništa u kojima obje vrste žive i rastu, dok povišena temperatura predstavlja stresor. Alge su praćene tokom eksponencijalne i stacionarne faze rasta.

Morfologija dijatomeja, uključujući vrstu *Cylindrotheca closterium*, podrazumijeva ćvrstu silikatnu frustulu sprječavajući bilo kakve izmjene u obliku stanica, stoga stanićna plastićnost ne utjeće na parametre nakon adhezije (Zhou i sur. 2000). S druge strane, vrsta zelene alge *Dunaliella tertiolecta* ne posjeduje stanićnu stijanku, omogućujući stanici da mijenja svoju morfologiju u svrhu osmoregulacije i širi se na površini biosenzora. Na taj se naćin vremenski ovisno povećanje dodirne plohe stanice i površine biosenzora oćituje u povećanju adsorbirane mase ( $f$ ), te porastu disipacijske energije ( $D$ ). Marx i sur. (2003) pretpostavili su da stvarna stanićna masa znaćajno doprinosi konaćnim rezultatima za stanice ćija se morfologija mijenja nakon adhezije. U slućaju frustula *C. closterium*, izvanstanićni matriks uspješno pomiće stanicu s površine tijekom adhezije, smanjujući dodirnu površinu izmeću stanice i elektrode pa je samo dio stvarne stanićne mase izložen unutar granica detekcije instrumenta (QCM detektira samo površinski sloj uz biosenzor, oko 0,25  $\mu\text{m}$  u vodi) (Kanazawa i Gordon 1985). S obzirom na ćinjenicu da se mogu detektirati samo fragmenti stanice u sloju najblićem površini senzora (Nimeri i sur. 1998) te da je cijela stanica prevelika da je QCM-D instrument registrira, stvarna stanićna masa vjerojatno ne utjeće na ukupan zabilježeni signal. QCM-D odgovor moće se pripisati iskljućivo interakcijama izmeću stanica/matriksa i površine elektrode zbog kalibracije instrumenta filtriranom morskom vodom u trajanju od 10 minuta (odrećena je osnovna rezonantna frekvencija), nakon ćega su stanice pumpane kroz QCM-D komoru u suspenziji istog medija koji je korišćen za postizanje osnovne krivulje. Kako su gore navedene zamjetne fizikalne razlike meću vrstama algi te postoje razlike u rigidnosti istraćivanih vrsta, dolazimo do pitanja što zapravo QCM-D urećaj detektira pri depoziciji algi na biosenzor, koji dio sustava „površina senzora – bioreceptor – ekstracelularni matriks – stanica“ se odaziva na rezonantno titranje biosenzora.

Praćenjem dinamike rasta stanica, odrećena je volumna koncentracija algi prema broju stanica po mililitru uzorka korišćenog pri svakom QCM-D mjerenju. Takoćer, nakon mjerenja je mikroskopski odrećena površinska koncentracija algi na biosenzoru. Koncentracija stanica u

otopini i onih na površini svakako su povezane, iako se korelacija ne očituje uporabom statističkih metoda. S druge strane promjena frekvencije ovisi o broju algi izmjerenih na površini biosenzora. Stoga se postavlja pitanje je li koncentracija na površini ravnotežna (zasićena) već nakon sat vremena koliko je mjerena depozicija s QCM-D instrumentom ili do zasićenja možda neće ni doći dugotrajnijim mjerenjem. S obzirom da se stanice nespecifično vežu u višesloj- stanica na stanicu ili postoji limitirajući faktor za adsorpciju. Prema Molinu i sur. (2006), zasićenje biosenzora može biti uzrokovano ekstracelularnim matriksom kojeg luče obje vrste mikroalgi. Ovo je moguća naznaka kako postoji fizikalno ograničenje u vezanju stanica, dakle dok je površina senzora isključivo prekrivena polietileniminom stanice se vežu, no zasićenjem te površine ekstracelularnim matriksom vezanje prestaje i ne dolazi do daljnje adsorpcije stanica. Tome pridonosi i činjenica da istraživane fitoplanktonske vrste zauzimaju manji dio raspoložive površine supstrata (~1-10% za obje vrste).

Ispitana je korelacija između površinske koncentracije i promjene u frekvenciji prilikom adsorpcije algi na senzor. Ustanovljen je problem u primjeni ove metode za detekciju vezanja stanica; sloj materijala na QCM-D senzoru ne bi trebao biti deblji od 100-200 nm jer je titranje mase udaljenije od površine prigušeno medijem (vodom, otapalom) (Wegener i sur. 2000). Dakle, u takvoj situaciji QCM-D neće detektirati ukupnu masu stanica vezanih na senzoru što je vidljivo iz relativno malih pomaka frekvencije koji su bili izmjereni. Naime, promjena frekvencije, po Sauerbrey jednakosti za pomak od 1Hz indicira depoziciju ~20 ng na ukupnoj površini senzora od oko 1 cm<sup>2</sup>. Za stanicu vrste *D. tertiolecta* okvirnih dimenzija 9x6x6 μm, volumen stanice je oko 0,3x10<sup>-15</sup> m<sup>3</sup>, dok je za vrstu *C. closterium* duljine 23,5 μm i promjera 3,5 μm, volumen stanice oko 0,2x10<sup>-15</sup> m<sup>3</sup> (Olenina i sur. 2006). Uzimajući u obzir da gustoća stanice nije znatno drugačija od gustoće vode, masa stanice jednaka je ~ 3 stanice po nanogramu, stoga svaki Hz pomaka frekvencije predstavlja depoziciju 60 stanica. Kako su obično detektirani pomaci od 50 Hz, to bi na biosenzoru, prema QCM mjerenju bilo ukupno 3000 stanica na ukupnoj površini od 1 cm<sup>2</sup> senzora. Istovremeno, stvarna brojnost stanica dobivena mikroskopiranjem bila je oko 3000/mm<sup>2</sup> (prekrivenost senzora stanicama oko 10%), dakle 2 reda veličine veća. Očito QCM metoda ne detektira ukupnu masu stanica na površini biosenzora, iako pak postoji linearna korelacija mase koju detektira QCM kroz pomak frekvencije i površinske koncentracije algi.

Kako su utvrdili Fatisson i sur. (2011), prostorna raspodjela stanica na kvarcnom senzoru može utjecati na ponovljivost mjerenja, no sugeriraju da je promjena disipacije  $\Delta D$  u ovisnosti o

pomaku rezonantne frekvenciji  $\Delta f$  kvalitativno neovisna o broju stanica i prostornoj raspodjeli stanica te umanjuje učinak neponovljivosti između svakog mjerenja. Stoga su praćene vrijednosti  $\Delta D$ , disipacije i  $\Delta f$ , frekvencije kako bi se provjerilo reflektiraju li temeljna svojstva viskoelastičnosti za vrste *D. tertiolecta* i *C. closterium*. Za po dvije vrste stanica i po dvije temperature uzgoja, dobivene su  $\Delta D$  vs.  $\Delta f$  krivulje u vremenu depozicije stanica algi na senzor - općenita je slika ukazivala na korelaciju tih varijabli, porast  $\Delta D$  uvijek prati porast pomaka frekvencije  $\Delta f$ . Povećanje disipacije zajedno sa smanjenjem rezonantne frekvencije ukazalo je na povećanje količine viskoelastične tvari na površini biosenzora. Izrađen je i grafički prikaz ovisnosti maksimalnih vrijednosti  $\Delta D$  i  $\Delta f$  za svaku vrstu i temperaturu rasta. Točke ( $\Delta D$ ,  $\Delta f$ ) pokazuju linearnu korelaciju, tj.  $\Delta D \sim \Delta f$ . Pravci linearne regresije zadano polaze iz ishodišta, jer gdje nema deponirane mase, nema ni pomaka frekvencije ni porasta disipacije. No, rasipanje točaka ( $\Delta D$ ,  $\Delta f$ ) pokazalo je varijacije u podacima, tj. omjer  $\Delta D/\Delta f$  varira u širokom rasponu i vrijednosti tog omjera za dvije vrste se preklapaju. Linearna regresija pokazala je vrijednosti „potpisa“  $\Delta D / \Delta f$  za svaku vrstu i temperaturu rasta. S obzirom da taj omjer varira u širokom rasponu i da se rasponi za dvije vrste preklapaju, ustanovljeno je da „potpis“  $\Delta D / \Delta f$  nije dobar indikator vrste, time ni okolišnog stresa, iako postoji nominalna, statistička razlika u vrijednostima koja se javlja nakon dugotrajnih mjerenja tijekom cijelog ciklusa rasta algi.

Omjer parametara disipacije i frekvencije za obje vrste zbog velikog rasapa vrijednosti ne otkriva promjene tijekom proteka vremena rasta, odnosno nema razlike u viskoelastičnim svojstvima između ekspanzionalne i stacionarne faze rasta. Stoga ne možemo zaključiti imaju li istraživane vrste viskoelastična svojstva koja se mijenjaju u vremenu i utjecajem stresora na stanice. Prema istraživanju Pillet i sur. (2019) površinska svojstva stanica *D. tertiolecte* se mijenjaju tijekom rasta što bi ukazivalo na promjenu adsorpcijskih karakteristika u ekspanzionalnoj i stacionarnoj fazi, no one nisu zabilježene QCM-D uređajem.

Prema radu Hollanda i sur. (2004) može se zaključiti da je razlika između QCM-D odgovora zabilježenih za istraživane vrste vjerojatno rezultat prirode interakcija između polietilenimina na površini elektrode i stanice s ekstracelularnim matriksom i/ili razlike između fizikalnih svojstava površine dviju mikroalgi. Drugim riječima, QCM-D je detektirao razlike u prirodi vezanja istraživanih vrsta na biosenzor i/ili razlike između fizikalnih svojstava izlučevina algi na površinu biosenzora, no prema dobivenim rezultatima nije specificirano koji dio stanice vrši interakcije s biosenzorom te utječe na promjenu praćenih parametara, s obzirom da se adhezija može vršiti ili površinom stanice ili ekstracelularnim matriksom. U svrhu kvalitativne analize,

QCM metoda je često nadopunjena skenirajućom elektronskom mikroskopijom kako bi se dodatno procijenile morfološke promjene i širenje stanice duž senzora tijekom adhezije (Fatisson i sur. 2011). Podatci o omjeru disipacije i frekvencije dobiveni QCM-D metodom, mogu biti korisni za razumijevanje snage interakcija površine supstrata i mikročestica te utjecaja veličine dodirne površine između stanice i kvarcnog senzora (Elwing 2008), no u ovom slučaju potrebno je više eksperimenata kako bi se dobili dodatni uvidi o staničnim svojstvima. Zbog složene prirode fizioloških procesa, čak i u uvjetima *in vitro*, eksperimentalne tehnike koje prikazuju više od jednog parametra od znanstvenog su (Wegener i sur. 2001). Stoga daljnje usavršavanje postojeće tehnike i njezina primjena važan su dio budućih istraživanja.

## 6. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu pokazana je mogućnost uporabe QCM-D tehnike pri istraživanju interakcija površine stanica s bioreceptorima. Mikroskopski je zapaženo da površinska koncentracija tj. brojnost algi adsorbiranih na površini biosenzora ne ovisi o volumnoj koncentraciji algi u uzorku koji je korišten prilikom mjerenja. Uzorak je u svim slučajevima bio dovoljno zasićen algama da je sama dostupnost površine biosenzora bila limitirajući faktor za adsorpciju. Ustanovljena je linearna korelacija površinske koncentracije algi s masom algi koju je detektirao QCM-D uređaj, dok apsolutni brojevi nisu bili sukladni, tj. QCM-D sustav je nalazio i do 100x manje mase nego što bi se moglo odrediti iz brojnosti algi dobivenih mikroskopiranjem.

Određena je krivulja omjera disipacije i frekvencije koja prikazuje podatke o viskoelastičnosti adsorbiranih stanica iz koje je vidljivo da nema razlike u viskoelastičnim svojstvima među vrstama *D. tertiolecta* i *C. closterium* niti da postoji razlika u različitim uvjetima rasta. Ustanovljeno je da omjer temeljnih parametara koje daje QCM-D tehnika,  $\Delta D/\Delta f$  nije dobar indikator vrste, iako postoji nominalna razlika u vrijednostima ( $\sim 0,3$  za *D. tertiolectu* pri 18 °C,  $\sim 0,3$  za *D. tertiolectu* pri 30 °C,  $\sim 0,15$  za *C. closterium* pri 18 °C,  $\sim 0,4$  za *C. closterium* pri 30 °C). Vrijednosti su pokazivale varijaciju kroz dane mjerenja, a razlika između vrsta ili uvjeta rasta nije značajna da bi omjer  $\Delta D/\Delta f$  mogao postati indikator okolišnih utjecaja, dakle ne može biti indikator manjih promjena u fizikalnim svojstvima algi ako nije u mogućnosti razlikovati dvije morfološki različite vrste.

## 7. LITERATURA

1. Ahmed A., Rushworth J.V., Hirst N.A., Millner P.A. (2014): Biosensors for Whole-Cell Bacterial Detection. *Clinical Microbiology Reviews* **27**: 631–646.
2. Akoglu H. (2018): User's guide to correlation coefficients. *Turkish Journal of Emergency Medicine* **18**(3): 91-93.
3. Berglin M., Olsson A., Elwing H. (2008): The Interaction Between Model Biomaterial Coatings and Nylon Microparticles as Measured with a Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring. *Macromolecular bioscience* **8**: 410-416.
4. Borowitzka, M.A. (2018): Biology of Microalgae. *Microalgae in Health and Disease Prevention*. Cambridge, Elsevier Academic press, str. 23-72.
5. Borowitzka M.A., Siva C.J. (2007): The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *Journal of Applied Phycology* **19**: 567–590.
6. Bozarth A., Maier U.G., Zauner S. (2009): Diatoms in biotechnology - Modern tools and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **82**: 195–201.
7. Bronk D.A., Steinberg D.K. (2008): Nitrogen regeneration. U: Capone, D., Bronk, D., Mulholland, M., Carpenter, E. (ur.) *Nitrogen in Marine Environment*. Elsevier Academic press, str. 385-467.
8. Brook A.J., Williamson, D.B. (2010): A monograph on some British desmids. Order Zygnematales Suborder Zygonemoidiineae Family Zygnemataceae Subfamily Mesotaenioideae (Saccoderm desmids) and Suborder Closteriineae Family Peniaceae and Family Closteriaceae. The Ray Society, London.
9. Brow A.D., Borowitzka L.J. (1979): Halotolerance of *Dunaliella*. U: Levandowsky, M., Hunter, S.H. (ur.) *Biochemistry and Physiology of Protozoa*. New York, Academia Press, str. 139-190.
10. Butcher R.W. (1959): An undescribed species of *Dunaliella* from the Cambridge Collection of Algae. *Hydrobiologia* **12**: 249-250.
11. Campos J., Jiménez C., Trigo C., Ibarra P., Rana D., Thiruganesh R., Ramalingam M., Haidar Z. S. (2015): Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring: A Powerful Tool for BioNanoScience and Drug Discovery. *Journal of Bionanoscience* **9**: 249-260.
12. Chen S., Cheng Y. F. (2017): Biosensors for bacterial detection. *International Journal of Biosensors and Bioelectronics* **2**: 197–199.

13. Christensen C. L. and Reimer, C. W. (1968): Notes on the Diatom *Cylindrotheca gracilis* (Breh. ex Kutz) Grun: Its Ecology and Distribution. *Proceedings of the Iowa Academy of Science* **75**(1): 36-41.
14. Dixon M.C. (2008): Quartz-Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring: Enabling Real-Time Characterization of Biological Materials and Their Interactions. *Journal of biomolecular techniques* **19**(3): 151-158.
15. Doney S. C., Schimel D. S. (2007): Carbon and climate system coupling on timescales from the Precambrian to the Anthropocene. *Annual Review of Environment and Resources*, **32**: 31-66.
16. Dunham G.C., Benson N.H., Petelenz D., Janata J. (1995): Dual Quartz Crystal Microbalance. *Analytical Chemistry* **67**(2): 267-272.
17. Elwing H. (2008): The Interaction Between Model Biomaterial Coatings and Nylon Microparticles as Measured with a Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring. *Macromolecular Bioscience* **8**: 410-416.
18. Falkowski P.G., Katz M. E., Knoll A.H., Quigg A., Raven J.A., Schofield O., Taylor F.J.R. (2004): The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science* **305**: 354-360.
19. Fatisson J., Mansouri S, Yacoub D., Merhi Y., Tabrizan M. (2011): Determination of surface-induced platelet activation by applying time-dependency dissipation factor versus frequency using quartz crystal microbalance with dissipation. *Journal of the royal society interface* **8**: 988-997.
20. Field, C.B., Behrenfeld M.J., Randerson J.T., Falkowski P. (1998): Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* **281**: 237–240.
21. Fischetti M. (2013): Deep heat threatens marine life. *Scientific American* **308**:92.
22. Ginzburg M. (1987): *Dunaliella*: a green alga adapted to salt. *Advances in Botanical Research* **14**: 95-183.
23. González, M.A., Gómez P.I., Polle J.E.W. (2019): Taxonomy and phylogeny of the genus *Dunaliella*. U: Ben-Amotz A. (ur.) *The alga Dunaliella: Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton.
24. Gross M. (2012): The mysteries of the diatoms. *Current Biology* **22**(15): 581-585.
25. Häder D.P., Gao K. (2015): Interactions of anthropogenic stress factors on marine phytoplankton. *Frontiers in Environmental Science* **3**: 1–14.
26. Hall J.D., McCourt R.M. (2015): Conjugating green algae Including Desmids. U: John D. Wehr, Robert G. Sheath, J. Patrick Kociolek (ur.) *Aquatic Ecology: Freshwater*

- algae of North America (Second Edition). Academic Press, str. 429-457.
27. Halse G.R., Syvertsen E.E. (1996): Chapter 2 - Marine Diatoms, U: Tomas, C.R. (ur.) Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates. Cambridge, Academic Press, str. 5-385.
  28. Holland R., Dugdale T. M., Wetherbee R., Brennan A.B., Finlay J.A., Callow J.A., Callow M.E. (2004): Adhesion and motility of fouling diatoms on a silicone elastomer. *Biofouling* **20**: 323-329.
  29. Huang X., Bai Q., Hu J., Hou D. (2017): A Practical Model of Quartz Cristal Microbalance in Actual Applications. *Sensors* **17**: 1785-1794.
  30. Huber F., Lang H.P., Zhang J., Rimoldi D., Gerber C. (2015): Nanosensors for cancer detection. *Swiss Medical Weekly* **145**: 1-8.
  31. Irwin E.F., Ho J.E., Kane S.R., Healy K.E. (2005): Analysis of interpenetrating polymer networks via quartz crystal microbalance with dissipation monitoring. *Langmuir* **21**(12): 5529-5536.
  32. Kanazawa K.K., Gordon J.G. (1985): Frequency of a quartz crystal microbalance in liquid. *Analytical Chemistry* **57**: 1770-1771.
  33. Kuczynska P.; Jemiola-Rzeminska, M.; Strzalka, K. (2015): Photosynthetic pigments in diatoms. *Marine Drugs* **13**(9): 5847–5881.
  34. Lauritano C., Helland K., Riccio G., Andersen J. H., Ianora A., Hansen E.H. (2020): Lysophosphatidylcholines and Chlorophyll-Derived Molecules from the Diatom *Cylindrotheca closterium* with Anti-Inflammatory Activity. *Marine drugs* **18**(3): 166.
  35. Lawrimore J.H., Menne M.J., Gleason B.E., Williams C. N., Wuertz D.B., Vose R.S. (2011): An overview of the Global Historical Climatology Network monthly mean temperature data set, version 3. *Journal of Geophysical Research* **116**: 1-18.
  36. Lu W., Ling M., Jia M., Huang P., Li C., Yan B. (2014): Facile Synthesis and Characterization of Polyethylenimin-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Superparamagnetic Nanoparticles for Cancer Cell Separation. *Molecular Medicine Reports* **9**: 1080-1084.
  37. Marx K.A., Zhou T., Warren M., Braunhut S.J. (2003): Quartz crystal microbalance study of endothelial cell number dependent differences in initial adhesion and steady-state behaviour: evidence for cell cell cooperativity in initial adhesion and spreading. *Biotechnology Progress* **19**: 987-999.
  38. Massjuk N.P. (1973): Morphology, Taxonomy, Ecology and Geographic Distribution of the Genus *Dunaliella* Teod. And Prospects for Its Potential Utilization. *Naukova Dumka*, Kiev.



39. Melkonian M, Preisig H.R. (1984): An ultrastructural comparison between Spermatozopsis and Dunaliella (Chlorophyceae). *Plant Systematics and Evolution* **146**: 31–46.
40. Molino P. J., Hodson O.M., Quinn J.F., Wetherbee R. (2006): Utilizing QCM-D To Characterize the Adhesive Mucilage Secreted by Two Marine Diatom Species in-Situ and in Real-Time. *Biomacromolecules* **7**: 3276-3282.
41. Morales M.A., Halpern J.M. (2018): Guide to selecting a biorecognition element for biosensors. *Bioconjugate Chemistry* **29**: 3231-3239.
42. Nakayama T., Watanabe S., Inouye I. (1996): Phylogeny of wall-less green flagellates inferred from 18SrDNA sequence data. *Phycological Research* **44**: 151-161.
43. Nimeri G., Fredriksson C., Elwing H., Liu L., Rodahl M., Kasemo B. (1998): Neutrophil interaction with protein-coated surfaces studied by an extended quartz crystal microbalance technique. *Colloids and Surfaces: Biointerfaces* **11**: 255–264.
44. Olenina I., Hajdu S., Edler L., Andersson A., Wasmund N., Busch S., Göbel J., Gromisz S., Huseby S., Huttunen M., Jaanus A., Kokkonen P., Ledaine I., Niemkiewicz E. (2006): Biovolumes and size-classes of phytoplankton in the Baltic Sea. *Baltic Sea Environment Proceedings* **106**: 144.
45. Oliveira L., Bisalputra T., Antia. N.J. (1980): Ultrastructural observation of the surface coat of *Dunaliella tertiolecta* from staining with cationic dyes and enzyme treatments. *New Phytologist* **85**: 385-392.
46. Oren A. (2005): A hundred years of Dunaliella research: 1905-2005. *Saline Systems*.
47. Pandey A.P., Sawant K.K. (2016): Polyethylenimine: A versatile, multifunctional non-viral vector for nucleic acid delivery. *Materials Science and Engineering: C* **68**: 904-918.
48. Pavlić I. (1988): *Statistička teorija i primjena*. Tehnička knjiga, Zagreb.
49. Perumal V., Hashim U. (2014): Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *Journal of Applied Biomedicine* **12**: 1-15.
50. Pihíková D., Kasák P., Tkac J. (2015): Glycoprofiling of cancer biomarkers: Label-free electrochemical lectinbased biosensors. *Open Chemistry* **13**: 636-655.
51. Pillet F., Dague E., Pečar Ilić J., Ružić I., Rols M.P., Ivošević DeNardis N. (2019): Changes in nanometrical properties and adhesion dynamics of algal cells during their growth. *Bioelectrochemistry* **127**: 154-162.
52. Prihoda J., Tanaka A., De Paula W.B.M., Allen J.F., Tirichine L., Bowler C. (2012): Chloroplast-mitochondria cross-talk in diatoms. *Journal of Experimental Botany* **63**(4):

- 1543–1557.
53. Qian Z.J., Kang K.H., Ryu B.M. (2015): Microalgae-Derived Toxic Compounds Handbook of Marine Microalgae Biotechnology Advances. Elsevier academic press str. 527-537.
  54. Rebekić A., Lončarić Z., Petrović S., Marić S. (2015): Pearson's or Spearman's correlation coefficient - which one to use? *Poljoprivreda* **21**(2): 47-54.
  55. Riisgard H.U. (1981): Cell-volume responses in the naked marine flagellate *Dunaliella marina* transferred from darkness to light of different intensities. *Botanica Marina* **24**: 657-659.
  56. Salopek J. (2017): Interakcije suprotno nabijenih polielektrolita u otopini i na površini. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu.
  57. Sekimoto H., Abe J., Tsuchikane Y. (2012): Chapter Nine- New Insights Regulation of Sexual Reproduction in *Closterium*. *International Review of Cell and Molecular Biology* **297**: 309-338.
  58. Simon N., Cras A.-L., Foulon E. i Lemée R. (2009): Diversity and Evolution of Marine Phytoplankton. *Comptes Rendus-Biologies* **332**: 159-70.
  59. Sobiepanek A., Milner-Krawczyk M., Lekka M., Kobiela T. (2017): AFM and QCM-D as tools for the distinction of melanoma cells with a different metastatic potential. *Biosensors and Bioelectronics*, **93**: 274-281.
  60. Sobiepanek A., Kobiela T. (2018): Application of biosensors in cancer research. *Review and Research on Cancer Treatment* **4**: 1-9.
  61. Soto J.O. (2015): *Dunaliella* Identification Using DNA Fingerprinting Intron-Sizing Method and Species-Specific Oligonucleotides: New Insights on *Dunaliella* Molecular Identification. *Handbook of Marine Microalgae. Biotechnology advances. Elsevier Academic press*, str. 559-568.
  62. Tan L., Lin P., Pezeshkian B., Rehman A., Madlambayan G., Zeng X. (2014): Real-Time Monitoring of Cell Mechanical Changes Induced by Endothelial Cell Activation and their Subsequent Binding with Leukemic Cell Lines. *Biosensors and Bioelectronics* **56**: 151-158.
  63. Throndsen J. (1997): The Planktonic Marine Fllagelates. *Identifying Marine Phytoplankton. Elsevier Academic press*, str. 591-729.
  64. Templier V., Roux A., Roupioz Y., Livache T. (2016): Ligands for label-free detection of whole bacteria on biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **79**: 71-79.
  65. Teodoresco, E.C. (1905). *Organization et development du Dunaliella, nouveau genre*

- de Volvocacée-Polyblépharidée. Beihefte zum botanischen Centralblatt **18**: 215-232.
66. Tonda-Turo C., Carmagnola I., Ciardelli G. (2018): Quartz Crystal Microbalance With Dissipation Monitoring: A Powerful Method to Predict the in vivo Behavior of Bioengineered Surfaces. *Frontiers in Bioengineering Biotechnology* **6** (158): 1-7.
67. Voinova M.V., Rodahl M., Jonson M., Kasemo B. (1999): Viscoelastic Acoustic Response of Layered Polymer Films at Fluid-Solid Interfaces : Continuum Mechanics Approach. *Physica Scripta* **59**: 391-396.
68. Volcani B.E. (1981): Cell Wall Formation in Diatoms: Morphogenesis and Biochemistry. U: Simpson T.L., Volcani B.E. (ur.) Silicon and Siliceous Structures in Biological Systems. Springer, New York.
69. Wang J.L., Ren K.F., Chang H., Jia F., Li B.C., Ji Y., Ji J. (2013): Direct Adhesion of Endothelial Cells to Bioinspired Poly(dopamine) Coating Through Endogenous Fibronectin and Integrin  $\alpha 5\beta 1$ . *Macromolecular Bioscience*, **13**(4): 483-493.
70. Wegener J., Seebach J., Janshoff A., Galla H.J. (2000): Analysis of the Composite Response of Shear Wave Resonators to the Attachment of Mammalian Cells. *Biophysical Journal* **78**(6): 2821-2833.
71. Wegener J., Janshoff A., Steinem C. (2001): The Quartz Cristal Microbalance as a Novel Means to Study Cell-Substrate Interactions In Situ. *Cell Biochemistry and Biophysics* **34**(1): 121-151.
72. Zhou T., Marx K. A., Warren M., Schulze H., Braunhut S. J. (2000): The quartz crystal microbalance as a continuous monitoring tool for the study of endothelial cell surface attachment and growth. *Biotechnology Progress* **16**: 268-277.

## 8. PRILOZI

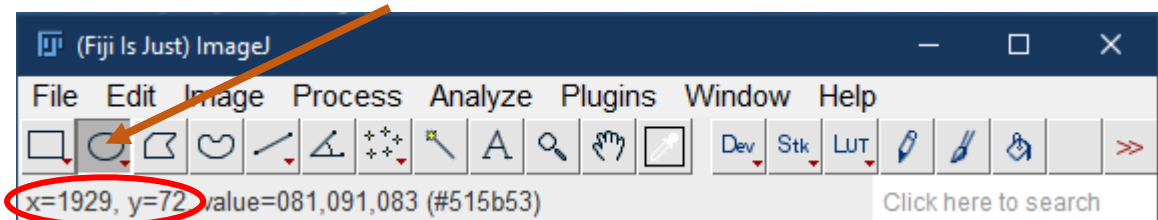
### 8.1. Računalna analiza slike

Snimke stanica dobivene mikroskopom po završetku mjerenja na QCM-D uređaju, obrađene su u programu ImageJ s modulom QuimP na sljedeći način:

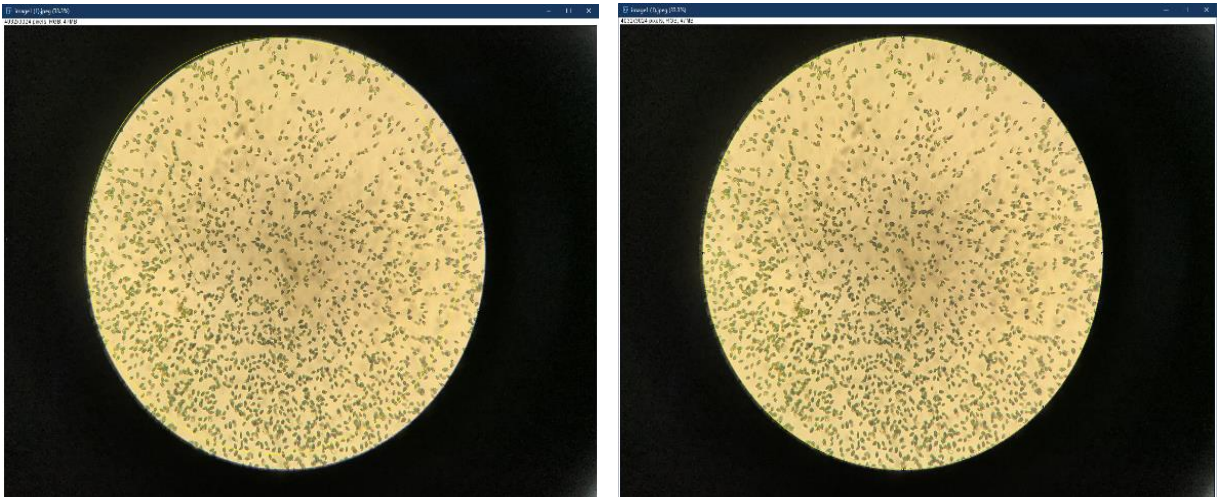
1. Otvaranje početne slike stanica.



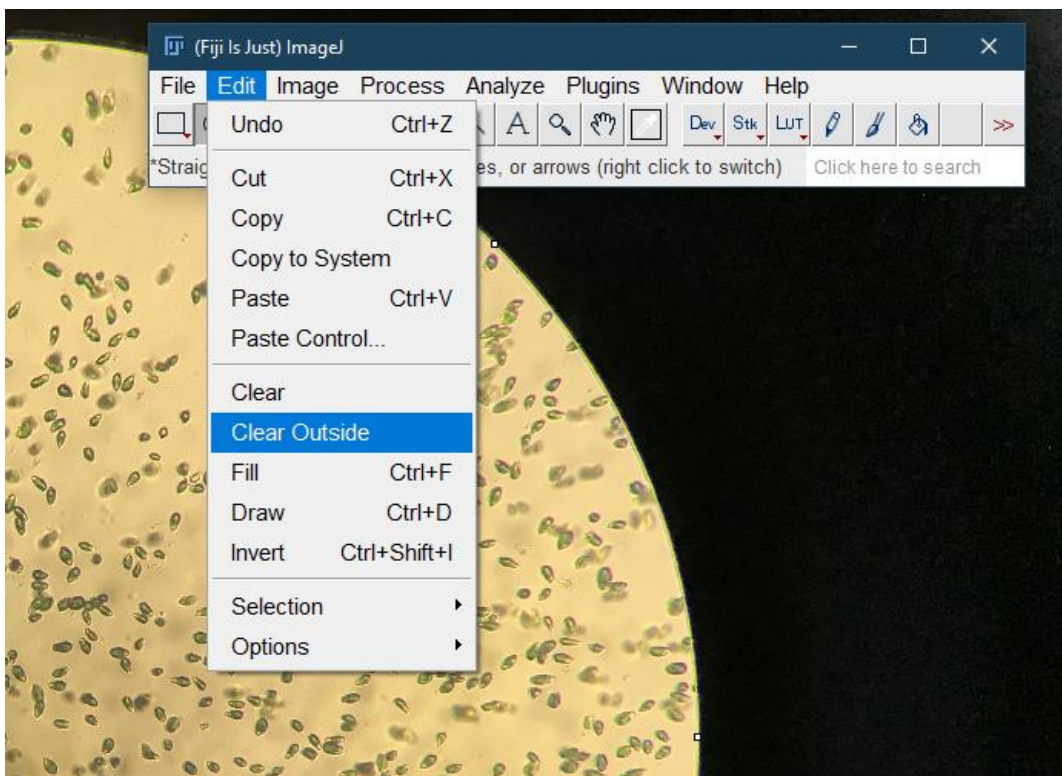
2. Prelaskom miša preko slike, na drugom prozoru ImageJ prikazuju se x i y koordinate u pikselima. Miš se postavlja na sve rubove kruga i zapišu se vrijednosti. Za ovu konkretnu sliku x i y koordinate se nalaze u crvenoj kružnici. Zatim se odabere „Oval selections“ koji je drugi po redu s lijeva. Na donjoj slici je već odabran.



3. S odabranom postavkom određuje se ovalni oblik koji će obuhvatiti sve stanice na slici.

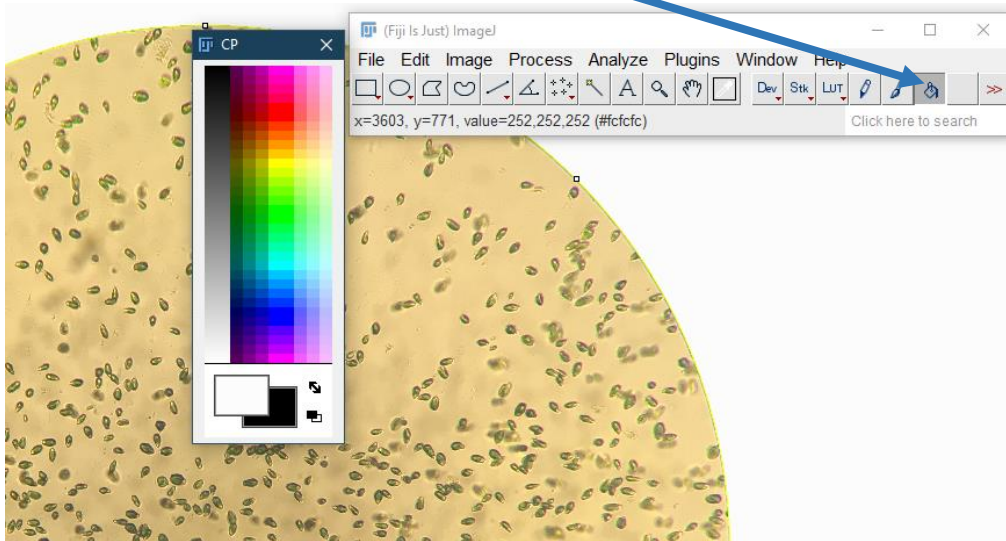


4. Kada je područje od interesa označeno, u izborniku se odabere **Edit** i **Clear Outside**.

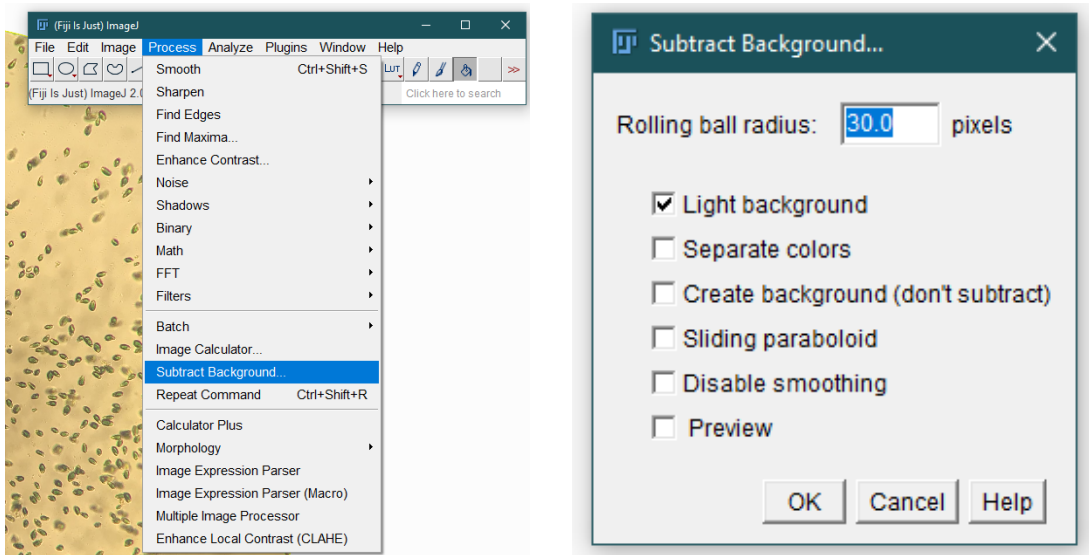


5. Sve što je izvan kruga će postati crno. U principu bi htjeli da nam je pozadina izvan označene kružnice bijela pa se odabere naredba **Color Picker** (dva puta lijevi klik),

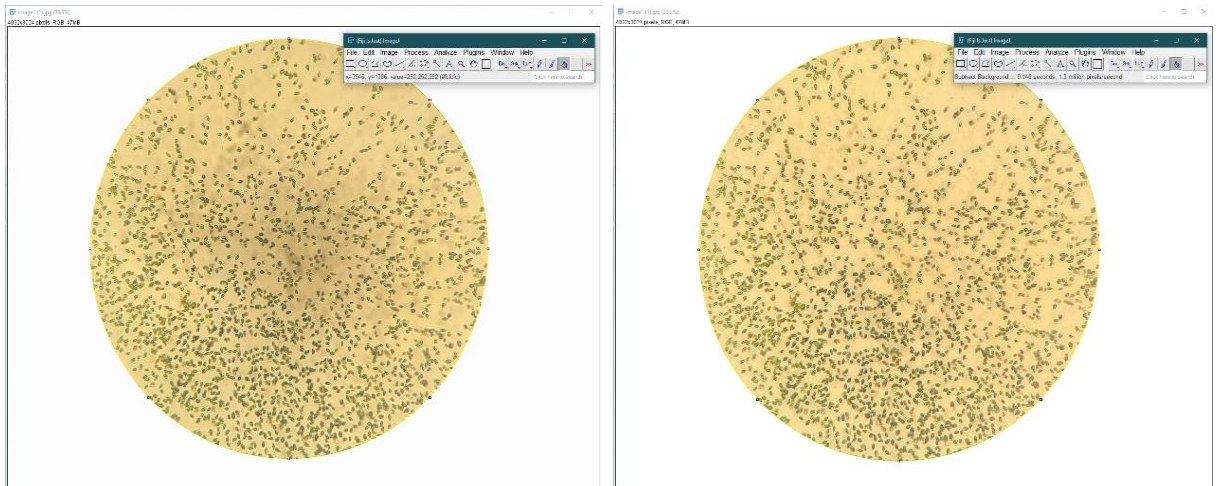
izabere bijela boja i oboji naredbom **Flood Fill Tool**.



6. Sada kad imamo izolirano područje od interesa, odabere se opcija **Process** i naredba **Subtract Background**. Otvorit će se prozor u kojem se upiše broj piksela. Za ovaj je primjer odabran broj 30. Potrebno je isprobati nekoliko različitih vrijednosti piksela radi usporedbe efekata na slici te uzeti onaj broj piksela koji nam najbolje odgovara.



7. Efekt se očituje na donje dvije slike. (Lijevo prije, desno poslije.)

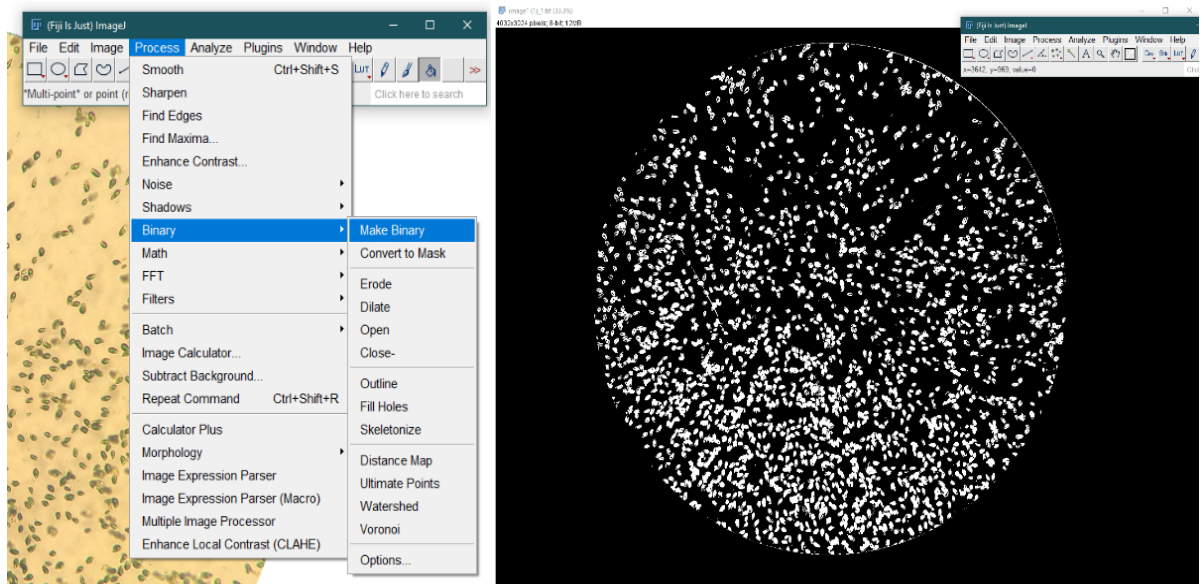


8. Pod naredbom **Process** pa **Binary**, odabere se **Make Binary**. Ova opcija pretvara sliku

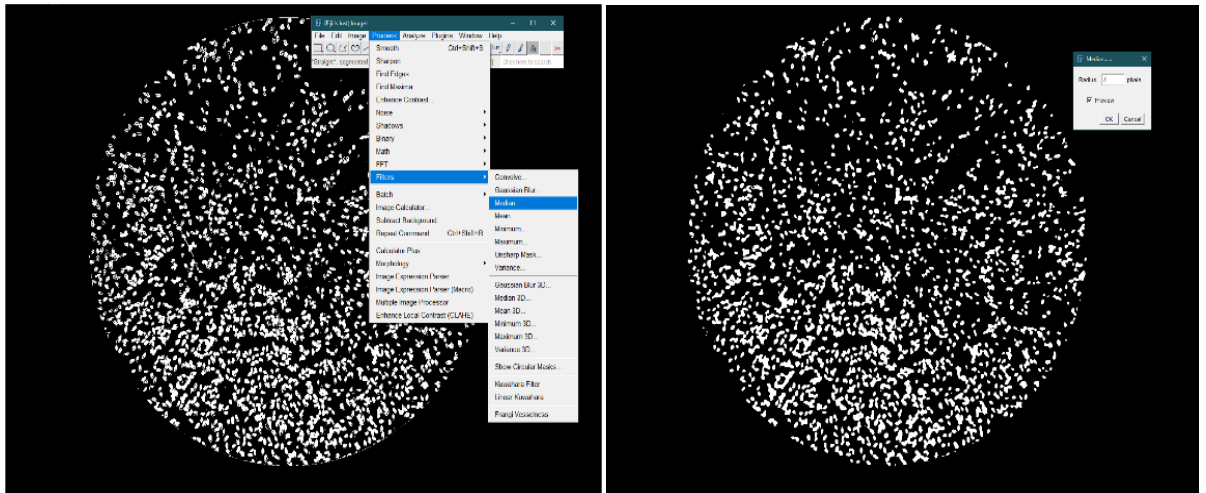
u

crno

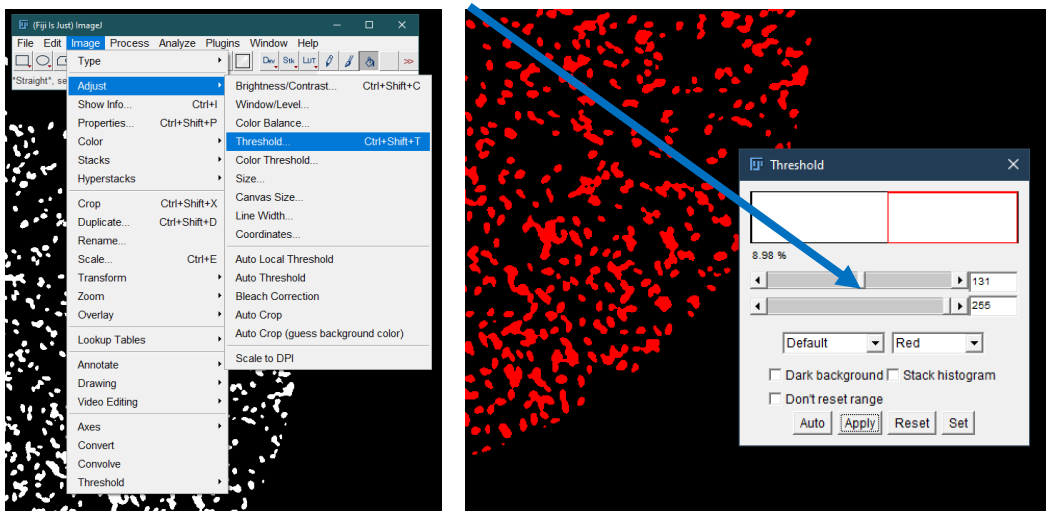
bijelu.



9. Neke stanice iako su bijele imaju crne rupice po sebi. To će smetati pri brojanju jer brojač broji samo ono što je bijelo. Zato se naredbama **Process**, **Filters** pa **Median**, otvorimo prozor u kojem treba označiti **Preview** i mijenjati broj dok ne dobijemo zadovoljavajuću sliku. Svrha ovih naredbi je ukloniti rupe u stanicama i crte koje sigurno nisu stanice.



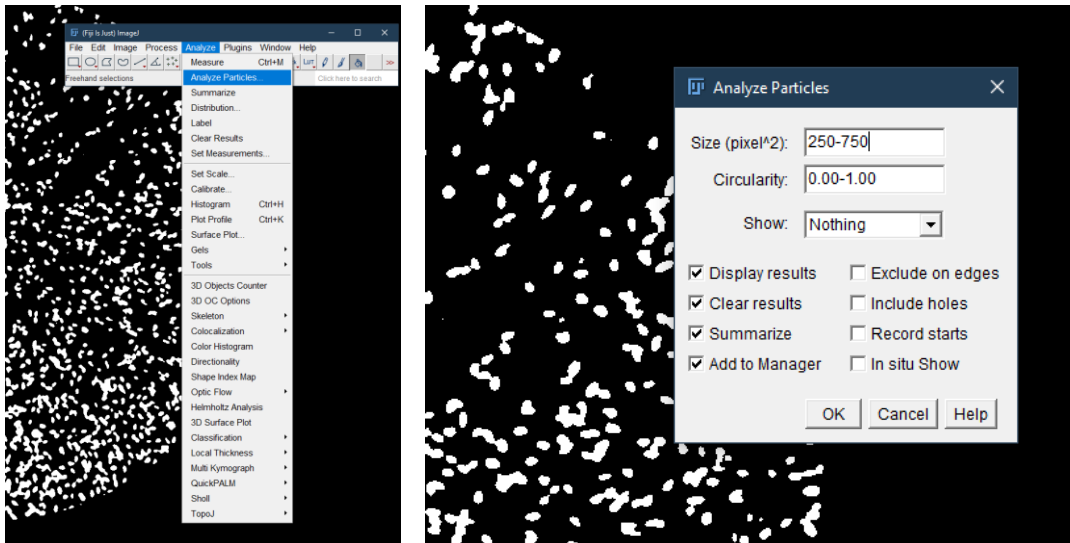
10. Sada treba namjestiti **Threshold** kako bismo istaknuli sve strukture koje želimo prebrojati. Pod naredbama **Image**, **Adjust** pa **Threshold**. Otvorit će se prozor u kojem namještamo podatke tako da su stanice crvene. I završimo izmjene opcijom **Apply**.



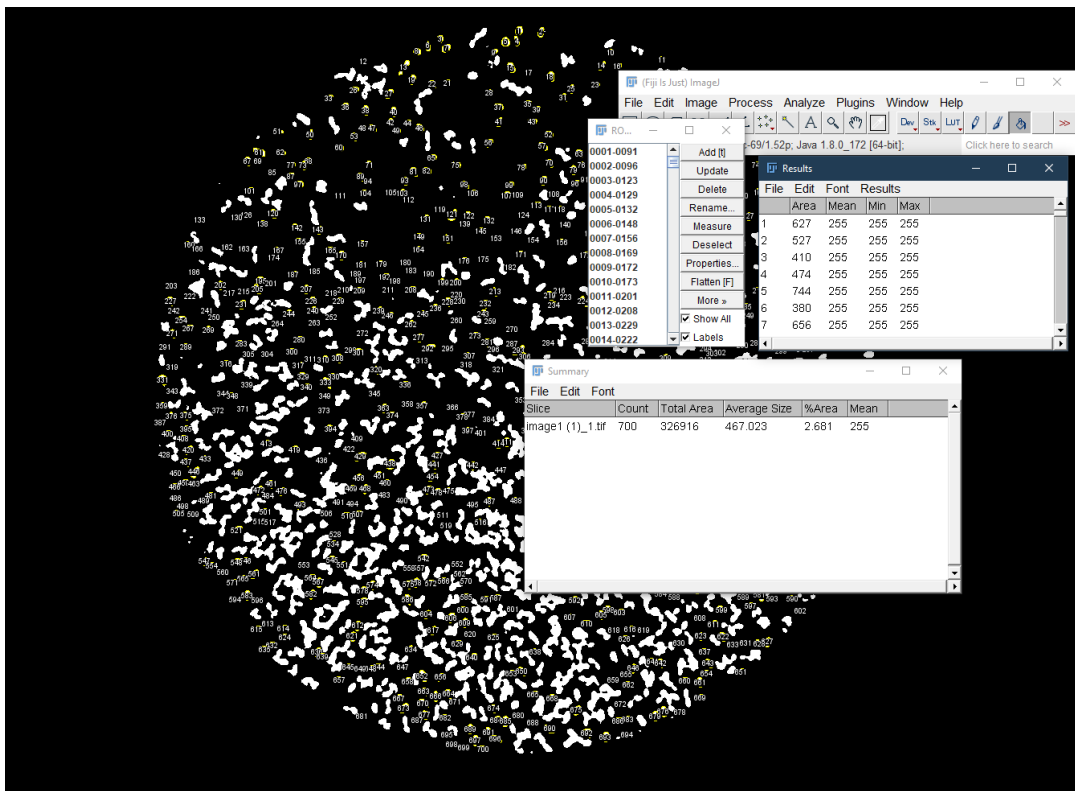
11. Kreirana slika je binarna sa samo dva intenziteta piksela: bijele stanice i crna pozadina.
12. Naredbama **Analyze** pa **Analyze Particles** otvori se prozor i odabere raspon veličina kojeg želimo da sustav broji, u ovom slučaju je raspon 250-750 jer je procijenjena



površina jedne stanice je  $500 \times \text{pixel}^2$ . Radnja se izvršava tipkom **OK**.



13. U prozoru **Summary** nalaze se podaci o broju stanica i površini stanice. U drugom prozoru **Results** pišu podaci za pojedine stanice.



14. U sljedećem koraku odabire se naredba **Analyze Particles** i ponavljamo korake 12. i 13. samo što sad izabiremo raspon **750-1250**. To bi trebalo odgovarati slučajevima kada se dvije stanice dodiruju pa se broje kao jedna pa se konačni rezultat pomnoži s 2.

15. Ovaj postupak se ponavlja dok se ne izbroje sve stanice. Idući raspon bi bio 1250-1750. Rezultat množimo s 3.

Ovoj metodi bi se moglo pristupiti i tako da se izbroje sve stanice veće od 250 i spremne rezultati kao .csv file, u prozoru **Results** pod **File** pa **Save As**. .csv file se može otvoriti u Excel tablici pa bi se brojanje po površinama može obaviti i putem Excela.

## 9. ŽIVOTOPIS

### **Osobni podaci**

Ema Vlašić

Datum i mjesto rođenja: 26. travnja 1996., Zagreb

### **Obrazovanje**

2017.-2020. Diplomski studij znanosti o okolišu, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2014.-2017. Preddiplomski studij znanosti o okolišu, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2010.-2014. I. Gimnazija–Jezični smjer, Split

2002.-2010. Osnovna škola Strožanac, Podstrana

### **Sudjelovanja na kongresima, radionicama**

kolovoz 2019. sudjelovanje na International congress of construction and demolition waste recycling (C and D waste)

ožujak 2019. sudjelovanje na kongresu Molecular biophysics: ABC of the puzzle of Life

prosinac 2018. sudjelovanje na kongresu o obnovljivim izvorima energije CRES, Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu

lipanj 2017. sudjelovanje na 1. studentskom kongresu okolišnog zdravlja s međunarodnim sudjelovanjem, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

### **Sudjelovanja u manifestacijama popularizacije znanosti**

travanj 2019. Noć biologije, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet

travanj 2018. Noć biologije, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet

### **Stipendije**

2019.-2020. dobitnica Erasmus+ stipendije za studijski boravak u Madridu (2019./2020. godina)

2019. dobitnica CEPUS stipendije za 9. Internacionalnu GeoRegNet ljetnu školu u Ljubljani

2017.-2018. dobitnica Stipendije općine Podstrana temeljem izuzetnog uspjeha u školovanju