

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET



Snežana D. Vojvodić

**Ispitivanje interakcije jona Cu(II) i Mn(II) sa
strukturnim jedinicama polimera ćelijskog zida i
mukusa jednoćelijske alge *Chlorella sorokiniana*
izložene abiotičkom stresu**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY



Snežana D. Vojvodić

Investigation of the interaction of Cu(II) and Mn(II) ions with the structural polymer of the cell wall and mucilage of the unicellular alga *Chlorella sorokiniana* exposed to abiotic stress

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

Mentori:

dr Dalibor Stanković, docent

Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet

dr Marina Stanić, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za multidisciplinarna istraživanja

Članovi komisije:

dr Dragan Manojlović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet

dr Milica Milenković, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet

dr Ivan Spasojević, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za multidisciplinarna istraživanja

Datum odbrane doktorske disertacije:

Zahvalnica:

Ova doktorska disertacija urađena je u laboratoriji Odseka za nauke o živim sistemima Instituta za multidisciplinarna istraživanja (IMSI), Univerzitet u Beogradu. Doktorska disertacija je realizovana u okviru projekta NATO, Nauka za mir i bezbednost, projekat broj G5320.

Zahvaljujem se svojim mentorima, **dr Marini Stanić**, na ukazanom poverenju, aktivnom učešću, sugestijama i velikoj podršci u svim fazama izrade disertacije i **dr Daliboru Stankoviću**, na podršci i savetima tokom izrade i pisanja doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem **dr Ivanu Spasojeviću** što mi je omogućio da budem deo njegovog projekta i grupe, kao i na nesebičnim savetima, trudu i vremenu koje je uložio u svim fazama izrade disertacije.

Zahvaljujem se **dr Milici Milenković** na savetima i pomoći tokom trajanja doktorskih studija, pažljivom čitanju i dragocenim sugestijama koje su mi pomogle u pisanju disertacije i **dr Draganu Manojloviću** na pažljivom čitanju i sugestijama.

Zahvaljujem se i članovima grupe koji su učestvovali na projektu i bili značajan deo mog života, rada i usavršavanja:

dr Mileni Dimitrijević na prijateljstvu, nesebično podeljenom znanju i pomoći tokom izrade eksperimenata preimenom fluorescentne spektroskopije i pri obradi dobijenih rezultata, aktivnom učestvovanju u izradi i pisanju disertacije, divnom druženju i entuzijazmu koji je činio rad u laboratoriji lakšim, lepšim i produktivnijim;

dr Jeleni Danilović Luković na prenesenom znanju i ljubavi prema elektronskoj mikroskopiji, pomoći tokom pripreme uzoraka izrade eksperimenata, dragocenim savetima tokom pisanja disertacije, podršci i pozitivnoj energiji;

Najpoštovanijem, **dr Milanu Žižiću** na prilici da učestvujem u eksperimentima na Elettra sinhrotronu, pomoći pri obradi rezultata, nesebičnim savetima i sugestijama tokom pisanja disertacije;

dr Bernd Zechmann-u na gostoprimstvu, prenesenom znanju i pomoći tokom izrade eksperimenata na Bejlor Univerzitetu;

dr Tanji Dučić na snimanju uzoraka i pomoći pri obradi dobijenih rezultata na ALBA sinhrotronu primenom SR-FTIR metode;

Milošu Opačiću, **dr Jeleni Korać Jačić** i **dr Mimi Jevtović** hvala na prijateljstvu, divnom druženju i tome što su bili spremni da pomognu kad god je to bilo potrebno.

Zahvaljujem se svim kolegama Odseka za nauke o živim sistemima Instituta za multidisciplinarna istraživanja na prijatnoj atmosferi koja je rad u laboratoriji činila zabavnim.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici i prijateljima na pruženoj podršci, ljubavi, razumevanju, strpljenju i brizi, bez kojih mnoge stvari ne bi bile moguće.

Naslov doktorske disertacije: „Ispitivanje interakcije jona Cu(II) i Mn(II) sa strukturnim jedinicama polimera ćelijskog zida i mukusa jednoćelijske alge *Chlorella sorokiniana* izložene abiotičkom stresu“

SAŽETAK

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitane su interakcije jona Cu(II) i Mn(II) sa strukturnim polimerima ćelijskog zida i mukusa kod jednoćelijske zelene alge *Chlorella sorokiniana* izložene abiotičkim stresorima. Primenom različitih metoda pokazano je da mikroalga *C. sorokiniana* ima brz adaptivni odgovor na visoke, netoksične, koncentracije jona Cu(II) i Mn(II) i da se odgovor menja tokom vremena, odnosno da postoje faze. Osnovne komponente odgovora obuhvataju oslobađanje mukusa, akumulaciju polifosfata unutar mukusa, promene unutarćelijskih redoks uslova i hemijske i strukturne promene ćelijskog zida. Predloženo je da dolazi i do redukcije Cu(II) do Cu(I) i do oksidacije Mn(II) do Mn(III) i Mn(IV). Ovi rezultati pružaju mogućnost za bolje razumevanje fizioloških i biohemijskih mehanizama mikroalgi da se prilagode visokim spoljnjim koncentracijama metala, ali i razumevanju metabolizma metala u mikroalgama. Dobijeni rezultati važni su za razumevanje metabolizma mikroalgi, tolerancije na hemijska zagađenja vodenih ekosistema, modulacije biorasploživosti metala i njihove toksičnosti za druge organizme, upotrebe mikroalgi i mikroalgalne biomase kao biosorbenta. Takođe, ispitivan je i uticaj jonizujućeg zračenja u kontekstu interakcija sa jonima Cu(II) i Mn(II). Pokazano je da *C. sorokiniana* ima brz odgovor na abiotički stres izazvan ovim zračenjem. U roku od jednog dana nakon izlaganja jonizujućem zračenju, fibrilarni sloj ćelijskog zida postao je deblji, udeo uronskih kiselina bio je veći, a kapacitet ćelijskog zida za uklanjanje hidroksilnog radikala, glavnog reaktivnog proizvoda radiolize vode se povećao. Izlaganje mikroalgi jonizujućem zračenju dovelo je i do povećanja kapaciteta za vezivanje jona Cu(II) za polimere ćelijskog zida, pre svega za ostatke glukozamina u polimeru sličnom hitozanu koji čini spoljni rigidni sloj zida. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ćelijski zid algi predstavlja dinamičnu strukturu uključenu u zaštitu ćelije od jonizujućeg zračenja, da mikroalge imaju značajnu kontrolu biorasploživosti jona bakra i mangana u vodenim ekosistemima i značajan potencijal za prečišćavanje voda zagađenih ovim metalima, posredstvom vezivanja za mukus i ćelijski zid, što predhodi daljim procesima u metaboličkom i adaptivnom odgovoru na povećano prisustvo metala.

Ključne reči: *C. sorokiniana*, Cu(II), Mn(II), jonizujuće zračenje, metabolizam metala, ćelijski zid, bioneorganski kompleksi, spektroskopija, koordinaciona hemija.

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Analitička hemija

UDK broj:

Title of doctoral dissertation: "Investigation of the interaction of Cu (II) and Mn (II) ions with the structural polymer of the cell wall and mucilage of the unicellular alga *Chlorella sorokiniana* exposed to abiotic stress"

ABSTRACT

In this doctoral dissertation, we investigated interactions of Cu(II) and Mn(II) ions with structural polymers of the cell wall and mucilage in single-cell green alga *Chlorella sorokiniana* that was exposed to abiotic stressors. Using different methods, it was shown that microalga *C. sorokiniana* shows rapid adaptive response to high, non-toxic, concentrations of Cu(II) and Mn(II) ions and that the response changes over time, *i.e.* the process shows several phases. The fundamental changes include mucilage release, accumulation of polyphosphates within the mucilage, changes in intracellular redox status, and chemical and structural changes in the cell wall. Reduction of Cu(II) to Cu(I) and the oxidation of Mn(II) to Mn(III) and Mn(IV) are implicated. These results enable better understanding of the physiological and biochemical mechanisms of adaptation of microalgae to high concentrations of metals and the metabolism of metals in microalgae. The obtained results are important for understanding the metabolism of microalgae, tolerance to chemical pollution of aquatic ecosystems, modulation of bioavailability of metals and their toxicity to other organisms and use of microalgae and microalgal biomass as a biosorbent. Also, the influence of ionizing radiation in the context of interaction with Cu(II) and Mn(II) ions was investigated. It was shown that *C. sorokiniana* exhibits a rapid response to radiation-induced stress. One day after exposure to ionizing radiation, the fibrillar layer of the cell wall became thicker, the fraction of uronic acid was higher, and the capacity of the cell wall to remove hydroxyl radical, the main reactive product of water radiolysis, increased. The exposure of microalgae to ionizing radiation also led to significant increase in the binding capacity of the cell wall for Cu(II). This is related to the increase in the amount of glucosamine residues in the chitosan-like polymer that forms the external rigid layer of the cell wall. In summary, our results demonstrate that microalgal cell wall is a dynamic structure which is involved in protecting cells from ionizing radiation, that microalgae have a significant control over bioavailability of copper and manganese ions in aquatic ecosystems and a significant potential for removing Cu and Mn from contaminated water by binding them to mucus and cell wall, which precedes further processes in the metabolic and adaptive response to the increased presence of metals.

Keywords: *C.sorokiniana*, Cu(II), Mn(II), ionising radiation, metabolism of metals, cell wall, bioinorganic complexes, spectroscopy, coordination chemistry.

Scientific Field: Chemistry

Scientific discipline: Analytical chemistry

UDK number:

SKRAĆENICE

3N-BBM+V	<i>Bold Basal Medium with 3 fold Nitrogen and Vitamins</i>
ATP	adenozintrifosfat
CV	ciklična voltometrija
DEPMPO	5-dietoksifosforil-5-metil-1-pirolin-N-oksidi
DMPO	5,5-dimetil-1-pirolin-N-oksidi
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DTNB	5,5'-ditiobis (2-nitrobenzojeva kiselina)
EDS	energetski disperzivna spektroskopija X-zraka (<i>engl. energy dispersive X-ray spectroscopy</i>)
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
Eh	redukcionni potencijal
EPR	elektronska paramagnetna rezonancija (<i>engl. electron paramagnetic resonance</i>)
EtOH	etanol
EXAFS	<i>engl. Extended X - ray absorption fine structure</i>
FTIR	infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (<i>engl. Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
GR	glutation-reduktaza
GSH	redukovani glutacion
GSSG	glutation-disulfid, oksidovani glutacion
HSAB	tvrdi i meki Luisove kiseline i baze (<i>engl. Hard and Soft (Lewis) Acids and Bases</i>)
I	jačina električne struje
IC	infracrveno zračenje, elektromagnetno zračenje talasne dužine 780 nm - 1 mm.
KPP	kalijum-fosfatni pufer

NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
OD	optička gustina (<i>engl. optical density</i>)
PBS	fosfatni pufer sa natrijum-hloridom
R ₁ S-SR ₁	tiol-biradikalni disulfidni spinski obeleživač
ROS	reaktivne vrste kiseonika (<i>engl. reactive oxygen species</i>)
RR	radni rastvor
RuBisCO	ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza oksigenaze
SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija (<i>engl. scanning electron microscopy</i>)
SH	tiolna grupa
SR-FTIR	infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom zasnovana na sinhrotronskom zračenju (<i>engl. synchrotron radiation-based Fourier transform mid-infrared spectroscopy</i>)
SSA	sulfosalicilna kiselina
TEM	transmisiona elektronska mikroskopija (<i>engl. transmission electron microscopy</i>)
tGSH	ukupni glutation
TNB	2-nitro-5-tiobenzoeva kiselina
UV	ultraljubičasto zračenje, elektromagnetno zračenje u opsegu: 200 - 400 nm (<i>engl. ultraviolet</i>)
UV/Vis	ultraljubičasta i vidljiva oblast spektra elektromagnetnog zračenja (<i>engl. Ultraviolet/Visible</i>)
XAFS	apsorpciona spektroskopija X-zraka (<i>engl. X-ray Absorption Fine Structure</i>)
XANES	<i>engl. X - ray absorption near edge structure</i>

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1. Teški metali u životnoj sredini i njihova toksičnost.....	3
1.1.1. Nalaženje bakra u prirodi.....	3
1.1.2. Hemijske karakteristike bakra	4
1.1.3. Nalaženje mangana u prirodi	8
1.1.4. Hemijske karakteristike mangana.....	9
1.2. Zagađenje životne sredine zračenjem	11
1.2.1. Jonizujuće zračenje	11
1.2.2. Efekat jonizujućeg zračenja na žive organizme.....	12
1.3. Zelena mikroalga <i>Chlorella sorokiniana</i>.....	14
1.3.1. Mikroalge kao biosorbent teških metala.....	15
1.3.2. Građa ćelijskog zida.....	16
1.3.2.1. Hemijski sastav ćelijskog zida.....	17
1.3.3. Vanćelijski matriks	18
1.3.3.1. Hemijski sastav vanćelijskog matriksa	18
1.4. Reaktivne vrste kiseonika	19
1.4.1. Antioksidativni sistemi.....	21
1.4.1.1. Glutation	22
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	23
3. EKSPERIMENTALNI DEO	24
3.1. Hemikalije	24
3.2. Eksperimentalni objekat.....	26
3.2.1. Uzgajanje mikroalge <i>Chlorella sorokiniana</i>	26
3.2.1.1. Agarske podloge.....	27
3.2.1.2. Tečne podloge	28
3.2.2. Priprema kulture mikroalge <i>C. sorokiniana</i> za eksperimente.....	28
3.2.2.1. Određivanje gustine kulture	29
3.2.2.2. Određivanje stacionarne faze.....	30
3.2.2.2.1. Optička gustina	30
3.2.2.2.2. Biomasa	30
3.3. Izolacija ćelijskog zida	30

3.4. Abiotički stresogeni faktori.....	31
3.4.1. Tretman rastvorima soli metala.....	32
3.4.2. Tretman jonizujućim zračenjem	32
3.4.3. Određivanje vijabilnosti ćelija kao odgovora na abiotički stres.....	34
3.5. Primjenjene metode, instrumenti i uslovi snimanja	35
3.5.1. Elektronska mikroskopija.....	35
3.5.1.1. SEM-EDS	36
3.5.1.2. TEM	37
3.5.2. Infracrvena spektroskopija.....	38
3.5.2.1. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR).....	38
3.5.2.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom koja koristi sinhrotronski izvor zračenja (SR-FTIR)	39
3.5.3. Elektronska paramagnetna rezonancija (EPR)	40
3.5.3.1. Koordinaciono vezivanje jona Cu(II) i Mn(II) u biomasi	41
3.5.3.2. Određivanje koncentracije redukovanih tiola	42
3.5.3.3. Određivanje koordinacionog okruženja i redoks stanja bakra i mangana u izolatu ćelijskog zida	44
3.5.3.4. Određivanje antioksidativnog kapaciteta izolovanog ćelijskog zida.....	44
3.5.4. UV/Vis spektroskopija	45
3.5.4.1. Određivanje koncentracije ukupnog glutationa (tGSH)	45
3.5.4.2. Kapacitet vezivanja jona Mn(II) za izolovan ćelijski zid mikroalgi.....	47
3.5.5. Ciklična voltametrijia	47
3.5.6. Fluorescentna spektroskopija.....	48
3.5.6.1. Određivanje porasta ROS kao parametra oksidativnog stresa	48
3.5.6.2. Kapacitet vezivanja jona Cu(II) za izolovan ćelijski zid mikroalgi.....	50
3.5.7. XAFS- spektroskopija.....	50
3.5.7.1. Određivanje simetrije kompleksa, oksidacionog stanja i koordinacione geometrije jona bakra u biomasi.....	51
3.6. Statistička obrada rezultata	53
4. REZULTATI I DISKUSIJA	55
4.1. Ispitivanje uticaja Cu(II) jona na mikroalgu <i>C.sorokiniana</i>	55
4.1.1. Određivanje subletalne koncentracije jona Cu(II).....	55
4.1.2. Ispitivanje strukturnih i hemijskih promena u biomasi mikroalgi u prisustvu povećane koncentracije jona Cu(II).....	57
4.1.2.1. Analiza SEM mikroskopijom i EDS metodom	57

4.1.2.2. SR-FTIR analiza promena u strukturnim komponentama i interakcija jona bakra u biomasi	60
4.1.3. Redoks stanje i koordinaciono okruženje jona bakra u biomasi mikroalgi	65
4.1.3.1. EPR analiza interakcije jona Cu(II) sa biomasom mikroalgi	65
4.1.3.2. XAFS analiza redoks forme jona bakra i interakcije sa ligandima	66
4.2. Ispitivanje uticaja jona Mn(II) na mikroalgu <i>C.sorokiniana</i>	70
4.2.1. Određivanje subletalne koncentracije jona Mn(II)	70
4.2.2. Ispitivanje strukturnih i hemijskih promena u biomasi mikroalgi u prisustvu povećane koncentracije jona Mn(II)	72
4.2.2.1. Analiza SEM mikroskopijom i EDS metodom	72
4.2.2.2. SR-FTIR analiza interakcija jona mangana sa strukturnim komponentama biomase	74
4.2.3. Analiza redoks stanja ćelije	79
4.2.3. Promena unutarćelijske koncentracije ROS	79
4.2.3.2. Određivanje koncentracije redukovanih tiola	80
4.2.3.3. Koncentracija tGSH	81
4.2.4. Redoks stanje jona mangana u biomasi mikroalgi	83
4.2.4.1. EPR analiza interakcija jona Mn(II) sa biomasom mikroalgi	83
4.2.5. Analiza promene redoks stanja jona mangana	85
4.3. Efekat jonizujućeg zračenja na hemijske i strukturne promene ćelijskog zida <i>C. sorokiniana</i>	87
4.3.1. Određivanje optimalnih doza jonizujućeg zračenja	87
4.3.2. Analiza strukture ćelijskog zida -TEM mikroskopija	88
4.3.3. Promene u hemijskom sastavu ćelijskog zida kao posledica delovanja X- zračenja	90
4.3.3.1. FTIR analiza promena hemijskog sastava izolovanog ćelijskog zida	91
4.3.3.2. EPR analiza antioksidativne aktivnosti ćelijskog zida	93
4.4. Vezivanje jona Cu(II) i Mn(II) za polimere izolovanog ćelijskog zida	94
4.4.1. Kapacitet polimera izolovanog ćelijskog zida za vezivanja jona metala	94
4.4.2. EPR analiza interakcije jona Cu(II) sa polimerima ćelijskog zida	96
4.4.3. EPR analiza interakcija jona Mn(II) sa polimerima ćelijskog zida	97
5. ZAKLJUČAK	99
6. LITERATURA	101

1. UVOD

Razvoj industrijalizacije i intenzivna eksploatacija ruda doveli su do pojave otpadnih voda koje sadrže visoke koncentracije bakra, mangana i drugih prelaznih metala. Kako nisu biorazgradivi, metali su često prisutni u vodi, zemljištu, sedimentima i živim organizmima (Dung i sar., 2013). Zagađenje vodenih ekosistema metalima ima višestruki negativni uticaj na živi svet (Morina i sar., 2016; Rzymiski i sar., 2017; Li i sar., 2019). U živim organizmima rastvoreni joni metala mogu da se akumuliraju direktnom apsorpcijom preko površine tela, dok se u obliku čestica mogu uneti ingestijom posredstvom kontaminirane hrane (Wang i Fisher, 1999). Budući da su fotosintetske mikroalge primarni proizvođači kiseonika i biomase na Zemlji, štetni uticaj metala na ove mikroorganizme utiče na funkciju kompletnih vodenih ekosistema (Roussel i sar., 2007). Zato postoji sve veće interesovanje za razumevanje hemijskih osnova adaptacije i tolerancije ovih organizama na visoke koncentracije metala kao i mehanizama kojima se regulišu bioraspoloživost mikroelemenata u vodenim ekosistemima (Roussel i sar., 2007). U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivane su interakcije jona Cu(II) i Mn(II) sa polimerima ćelijskog zida i mukusa kod zelene mikroalge *Chlorella sorokiniana*, a zatim analizirane hemijske promene nastale kao posledica izlaganja povećanim koncentracijama ovih metala. Rezultati istraživanja doprineće boljoj i efikasnijoj upotrebi mikroalgi u remedijaciji vodenih ekosistema kao i boljem razumevanju metabolizma metala i adaptivnih mehanizama mikroalgi.

Bakar i mangan bili su predmet istraživanja iz više razloga. Primena bakra i mangana kao osnovnih hranljivih sastojaka medijuma za uzgajanje mikroalgi je česta, međutim, kada su prisutni u visokim koncentracijama imaju toksične efekte, a bakar se upotrebljava i kao algicid. (Kemp i sar., 1966; Jahnke i Soulen, 1978; Levy i sar., 2007). U zagađenim vodenim ekosistemima i otpadnim vodama mikroalge mogu biti izložene visokim koncentracijama ovih metala (Howe i sar., 2004; Rzymiski i sar., 2017). Dosadašnja ispitivanja interakcija mikroalgi sa jonima bakra i mangana ukazuju na njihovu moguću upotrebu u prečišćavanju otpadnih voda (kao biosorbenta), kao i upotrebu otpadnih voda za dobijanje biomase iz mikroalgi (Kumar i sar., 2015). S druge strane, mikroalge mogu uticati na bioraspoloživost, a samim tim i na toksičnost metala za druge organizme (Van den Berg i sar., 1979; Bishop i sar., 2018). Međutim, metabolizam ovih metala u mikroalgama, kao i adaptivni odgovor mikroalgi na uslove povećanih koncentracija jona Cu(II) i Mn(II) nisu u potpunosti razjašnjeni. Stoga je važno razjasniti mehanizme toksičnosti, adaptacije i tolerancije mikroalgi na visoke koncentracije jona metala (Wilde i sar., 2006; Dean i sar., 2019). Dosadašnja istraživanja predlažu nekoliko mehanizama koje mikroalge koriste za adaptaciju na uslove povećanih koncentracija teških metala: (i)

adsorpcija jona metala na površini ćelijskog zida i vanćelijskog matriksa (McKnight i Morel, 1979; Van den Berg i sar., 1979; Kaplan, 2013); (ii) apsorpcija u citoplazmi i skladištenje u vakuolama ili polifosfatnim telima (acidokalcizomima) (Hashemi i sar., 1994; Mehta i Gaur, 2005; Adams i sar., 2016; Sanz-Luque i sar., 2020); i (iii) Formiranje depozita u ćelijskom zidu i različitim organelama (Volland i sar., 2011). Kada se transportuju u ćeliju, ovi metali mogu da formiraju koordinacione veze sa fosfatima i/ili različitim N i S ligandima (kao što su plastocijanini, fitohelatini, glutation) (Smith i sar., 2014; Kropat i sar., 2015; Adams i sar., 2016). Takođe, kada su prisutni u višku joni bakra i mangana mogu biti u kompeticiji za aktivna ili regulaciona mesta u metaloproteinima sa drugim esencijalnim metalima slične strukture ili uloge što dovodi do gubitka funkcija datih enzima i oštećenja ćelija (Küpper i sar., 2003).

Izlaganja mikroalgi povećanim koncentracijama jona metala, često je praćeno i drugim tipovima abiotičkog stresa, što uključuje i jonizujuće zračenje, koje može da potiče iz prirodnih izvora (kao što su radionuklidi iz tla i stena) i antropogenih izvora (radioaktivni otpad, radionuklidi iz rudnika i akcidenata u nuklearnim elektranama) (UNSCEAR, 2011). Prisustvo radioaktivnog materijala u vodenim ekosistemima ima višestruki štetni uticaj na živi svet (samim tim i na mikroalge) i na celokupni ekosistem. Visokoenergetsko elektromagnetno zračenje (poput gama i X zračenja) najrelevantnije je jonizujuće zračenje u vodenim ekosistemima, ima veliku prodornu snagu i energiju koja je dovoljna da izazove radiolizu vode i da direktno oksiduje/ošteti biomolekule (LaVerne, 2000). Dosadašnja istraživanja rađena na mikroalgama govore u prilog tome da one mogu biti otporne na stres izazvan zračenjem i da mogu biti efikasne u sanaciji slatkovodnih ekosistema koje su zagađeni radioaktivnim metalima poput stroncijuma, uranijuma i cezijuma (Kalin i sar., 2005; Fukuda i sar., 2014; Vanhoudt i sar., 2018), što predstavlja dobru osnovu za dalja ispitivanja. Zagađenje vode nastalo kao posledica nesreće koja se dogodila sa nuklearnom elektranom *Fukushima-Daiichi* jasno pokazuje da su efekti jonizujućeg zračenja na mikroalge i mehanizmi njihove adaptacije od fundamentalnog značaja za obnovljivost zagađenog ekosistema (Fukuda i sar., 2014). Primeri koji pokazuju da neke vrste mikroalgi mogu da naseljavaju napuštena skladišta nuklearnog goriva i ruda uranijuma gde je prisutan visok nivo zagađenja radijacijom i teškim metalima takođe objašnjavaju potencijal mikroalgi da se prilagode zračenju i opstanu u zagađenim ekosistemima (Rivasseau i sar., 2016; Baselga-Cervera i sar., 2018; McGraw i sar., 2018). Izlaganje jonizujućem zračenju može rezultirati oksidativnim oštećenjem lipida i DNK, smanjenom fotosintetskom efikasnošću i može uticati na rast i preživljavanje mikroalgi (Boreham i Mitchel, 1993; Rea i sar., 2008; Gomes i sar., 2017). Takođe, može dovesti i do povećane antioksidativne aktivnosti, promene u profilu ugljenih hidrata i opštem metaboličkom profilu kao i u drugim osobinama radiorezistencije (Santier i sar., 1985; McGraw i sar., 2018; Bradshaw i sar., 2019; Golz i Bradshaw, 2019; Foster i sar., 2020). Međutim, odgovor na nivou ćelijskog zida još uvek nije ispitan. U ovoj doktorskoj disertaciji analiziran je efekat jonizujućeg X-zračenja na promene u strukturi ćelijskog zida i kapaciteta vezivanja jona metala za izolovane frakcije ćelijskog zida kod *C. sorokiniana*. Ćelijski zid mikroalgi predstavlja međuprostor između citosola i spoljašnje sredine i prvu liniju hemijske i fizičke odbrane (Macfie i Welbourn, 2000; Baudelet i sar., 2017). Kao dinamična višeslojna struktura aktivno je uključen u adaptivni odgovor ćelije na različite vrste stresora (Beacham i sar., 2014; Yap i sar., 2016; Jeong i sar., 2017a). Ćelijski zid predstavlja glavnu komponentu za vezivanje jona metala u biomasi mikroalgi (Horikoshi i sar., 1979; Hadjoudja i sar., 2010; Vanhoudt i sar., 2018). Osim navedenih osobina, debljina

i struktura ćelijskog zida mikroalgi ima i tehnološki značaj, jer predstavlja ključni biološki parametar za efikasnu ekstrakciju lipida tokom proizvodnje biodizela iz mikroalgi (Yap i sar., 2016; Anto i sar., 2020), kao i drugih biomolekula od komercijalnog značaja (npr. pigmenti). Pored toga, od velike je važnosti i kao izvor ugljenih hidrata za proizvodnju bioetanola iz mikroalgi (Hernández i sar., 2015).

1.1. Teški metali u životnoj sredini i njihova toksičnost

U prirodi se metali mogu javiti prirodno kao posledica erozije, vulkanskih aktivnosti, aktivnosti termalnih izvora, ili dospeti iz antropogenih izvora (industrijski i kanalizacioni otpad, postrojenja za prečišćavanje kanalizacionih voda, poljoprivredni fungicidni otpad, deponije rudarskog otpada) što je usko povezano sa zagađenjem ekosistema. Metali kao zagađivači imaju progresivni, štetni, uticaj na sve veći broj ekosistema (Pinto i sar., 2003), pa tako i vodene ekosisteme (Kovacik i sar., 2010). Metali se u prirodi mogu javiti u širokom spektru oksidacionih stanja u kompleksima različitih koordinacionih brojeva, što utiče na njihove hemijske karakteristike, bioraspoloživost i toksičnost (Pinto i sar., 2003; Verbruggen i sar., 2009). U vodi se mogu naći u rastvorenom, koloidnom ili obliku suspenzije. U kojem od navedenih oblika će se naći zavisi od fizičko-hemijskih karakteristika vode i prirode samog metala (Vicente-Martorell i sar., 2009). U okeanima, teški metali su prisutni u niskim koncentracijama i tamo dospevaju iz atmosfere, dok se veći nivoi zagađenja javljaju u priobalnim vodama koje se nalaze u blizini urbanih gradskih i industrijskih zona. U ovim oblastima zagađenje je uglavnom povezano sa otpadnim vodama koje sadrže visoke koncentracije teških metala (Pinto i sar., 2003; Yang i sar., 2006; Li i sar., 2019).

1.1.1. Nalaženje bakra u prirodi

Bakar je element koji se u tragovima javlja u Zemljinoj kori i površinskim vodama i neophodan je za normalno funkcionisanje živih sistema. U biološkim procesima bakar ima važnu ulogu u redoks reakcijama, fotosintetskom transportu elektrona, procesu vezivanja kiseonika (Yruela, 2005) i uključen je u aktivnost mnogih enzima (katalaze, superoksid dismutaze, peroksidaze, citohrom C oksidaze) (Harvey i McArdle, 2008; Stern, 2010) itd. Raznovrsna uloga bakra u živim organizmima vezana je, s jedne strane, za njegovu polivalentnost, a sa druge za sklonost njegovih jona da grade komplekse. Koncentracija bakra u prirodi i njegova biološka dostupnost jako su važni. U vodenim ekosistemima jedinjenja bakra se uglavnom nalaze u obliku soli Cu(II) čije koncentracije mogu varirati od 0,03 do 0,23 µg/L u površinskim morskim vodama i od 0,20 do 30µg/L u slatkovodnim ekosistemima (EPA, 2014). Na mestima gde bakar dospeva iz antropogenih izvora

koncentracije mogu dostizati vrednosti do 100 $\mu\text{g/L}$ i više (EPA, 2007) i tada je jako toksičan, kroz čitav niz mehanizama koji se oslanjaju na prooksidativnu aktivnost bakra i gubitak aktivnosti metaloproteina usled zamene metala. (Nussey i sar., 1995; More i sar., 2003). Pokazano je da toksičnost bakra značajno varira zbog različitih fizičko-hemijskih karakteristika vode: temperature, vrste rastvorenih organskih jedinjenja, suspendovanih čestica, pH vrednosti, prisustva različitih neorganskih katjona i anjona (EPA, 2007). Mnogi od ovih fizičko-hemijskih parametara utiču i na osobine rastvorenog bakra, a samim tim i na njegovu bioraspoloživost.

Sa ekonomskog aspekta bakar je jedan od najznačajnijih metala (Elshkaki i sar., 2016). Kao posledica proizvodnje velikih količina bakra u rudnicima nastaju ogromne količine otpadnog materijala koji ima negativan uticaj na životnu sredinu (Rzymiski i sar., 2017). Pored rudnika, antropogeni izvori bakra uključuju i proizvodnju električne energije, upotrebu pesticida, boje koje se koriste kao premazi za trupove broda (EPA, 2014) itd. Velika eksploatacija metala (uključujući bakar) postala je jedan od vodećih problema na svetskom nivou i sve više pažnje se posvećuje pronalasku rešenja, kako bi se sprečile ekološke katastrofe i smanjila opasnost po zdravlje ljudi.

1.1.2. Hemijske karakteristike bakra

Bakar se zbog svoje gustine ($8,96 \text{ g/cm}^3$) i negativnog efekta na životnu sredinu svrstava u kategoriju "teških metala" (O'Connell i sar., 2008). Poznato je 18 izotopa bakra atomske mase između 58 i 73, međutim, u prirodi postojana su samo dva ^{63}Cu i ^{65}Cu (Stern, 2010). U hemijskom smislu, raznovrsna uloga bakra ogleda se u mogućnosti javljanja u više oksidacionih stanja i sposobnosti da u živim sistemima formira komplekse. U kompleksima bakra koordinacioni brojevi, geometrija i mesta vezivanja variraju u zavisnosti od oksidacionih stanja (tabela 1.1).

Tabela 1.1. Geometrija bakra, u zavisnosti od oksidacionog stanja i koordinacionog broja.

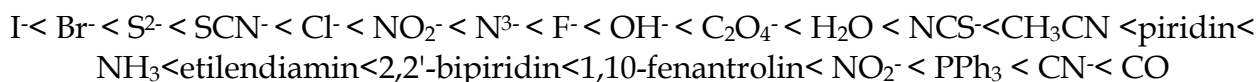
Oksidaciono stanje	Koordinacioni broj	Geometrija
Cu(I), d^{10}	2	Linearna
	3	Planarna
	4	Tetraedarska, Iskrivljena kvadratno-planarna
	5	Kvadratno-piramidalna
Cu(II), d^9	4	Tetraedarska, Kvadratno-planarna
	5	Trigonalna-bipiramida, Kvadratno-piramidalna
	6	Iskrivljena oktaedarska, Oktaedarska
	7	Pentagonalno-bipiramidalna
	8	Iskrivljena dodekaedarska
Cu(III), d^8	4	Kvadratno-planarna
	6	Oktaedarska
Cu(IV), d^7	6	nije poznata

Bakar se u kompleksima može javiti u oksidacionim stanjima od 0 do +4. Najstabilnija jedinjenja bakra u vodenom rastvoru su ona u kojima se bakar nalazi u obliku Cu(II) (Araya i sar., 2002). Jedinjenja u kojima bakar ima oksidaciono stanje +2 i oksidaciono stanje +1 često se javljaju, dok su kompleksi u kojima bakar ima oksidaciono stanje +3 retki. Oksidaciona stanja 0 i +4 izuzetno su retka (Conry, 2011). Stabilna jedinjenja u kojima bakar ima oksidaciono stanje 0 nisu poznata (Cotton i sar., 1999). Koordinacioni brojevi i geometrija kompleksa bakra pored oksidacionog stanja zavise i od tipa liganda koji su za njega koordinovani.

U prirodnim vodenim ekosistemima, bakar se može javiti u dva različita oksidaciona stanja: Cu(I) i Cu(II). Oksidaciono stanje +2 je dominantno u većini prirodnih voda. U ovom oksidacionom stanju, bakar formira veoma stabilne komplekse i sa organskim i sa neorganskim ligandima. Nasuprot tome, Cu(I) je nestabilan u vodenom rastvoru i ima tendenciju da se brzo oksiduje do Cu(II). Pokazano je da se kompleksi Cu(I) mogu nastati u prirodnim vodenim sredinama u fotohemijskim procesima i da mogu biti stabilni nekoliko sati. U aerobnim, alkalnim vodama mogu nastati različiti oksihidroksidi bakra. U kiselim ($pH < 6,5$) i aerobnim ($Eh > 200$ mV) sredinama bakar je stabilan u obliku jona Cu(II). Generalno, u opsegu pH od 6 - 8,5 (uobičajena vrednost pH za prirodne vode) bakar je prisutan u obliku $Cu(OH)_2$. Međutim, pri višim pH vrednostima, dominantan oblik će biti $Cu(CO_3)_2^{-2}$ (Mansilla-Rivera i Nriagu, 1999).

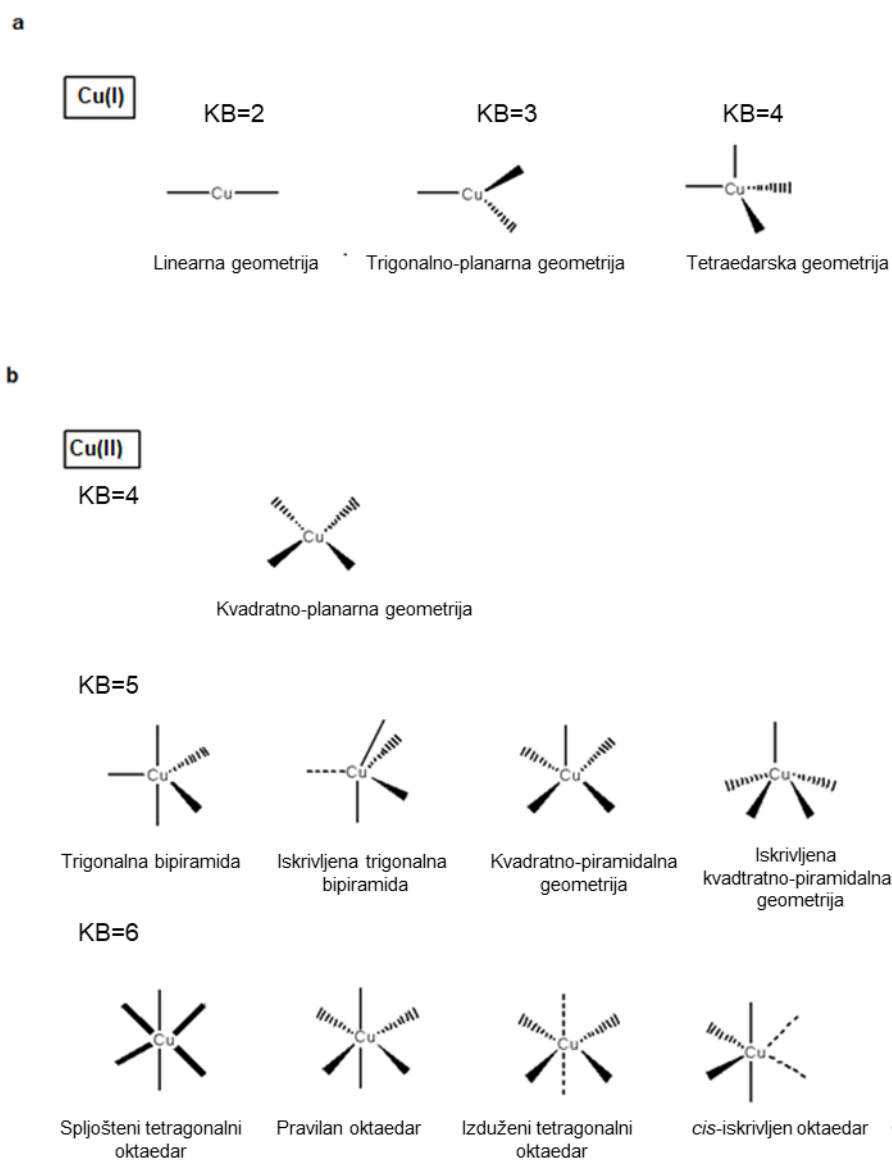
Koordinacioni brojevi i geometrija kompleksa bakra pored oksidacionog stanja zavisi i od tipa ligandnog polja u kojem se kompleks nalazi. Energija cepanja oktaedarskog ligandnog polja (Δ_o), koja predstavlja razliku u energiji između dva skupa orbitala definiše

jačinu ligandnog polja. Ligandi koji stvaraju jako ligandno polje grade komplekse sa velikom razlikom u energiji između t_{2g} orbitala (između osa) i e_g orbitala (duž osa), odnosno velikim Δ_o . Dok, ligandi koji stvaraju slabo ligandno polje, grade komplekse sa malom razlikom u energiji između t_{2g} i e_g orbitala, tj. sa malim Δ_o . Na osnovu jačine ligandnog polja oni se mogu poređati u spektrohemijski niz liganada (od onih koji grade slabo ligandno polje ka jakom ligandnom polju):



Gore pomenuti spektrohemijski niz liganada je uvek isti, nezavisno od toga za koji je metal ligand vezan (Zarić, 2008). Takođe, jačina ligandnog polja zavisi i od centralnog jona metala. Vrednosti parametra cepanja ligandnog polja Δ_o rastu u grupi Periodnog sistema elemenata i sa porastom oksidacionog broja jona metala. Ovo može biti posledica toga što su 4d i 5d orbitale značajno veće od 3d orbitala i zbog toga jače interaguju sa ligandima. Dakle, Δ_o zavisi i od liganada i od metala (Zarić, 2008).

Kada se Cu(II) nađe u jakom ligandnom polju postoji mogućnost formiranja kompleksa kvadratno-planarne ili tetraedarske geometrije sa koordinacionim brojem 4. U slučaju slabog ligandnog polja može nastati bilo koja geometrija. Kompleksi Cu(II) najčešće imaju koordinacione brojeve 4, 5 i 6 (Conry, 2011). Na slici 1.1 predstavljeni su koordinacioni brojevi i geometrija kompleksa Cu (I) i Cu(II).

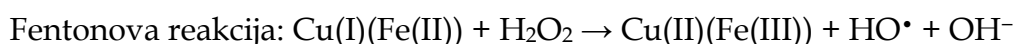
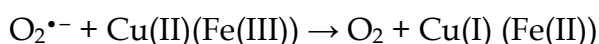


Slika 1.1. Koordinacioni brojevi (KB) i geometrija kompleksnih jedinjenja Cu(I) i Cu(II).

Stabilnost jona Cu(I) i Cu(II) u vodenom rastvoru zavisi od prirode anjona, prisutnih liganada, vrste rastvarača i prirode susednih atoma (Cotton i sar., 1999). Kako je jon Cu(II) manji, a više naelektrisan od jona Cu(I), jače interaguje sa molekulima vode. Iz tog razloga su joni Cu(II) stabilniji u vodenim rastvorima od jona Cu(I). Međutim, stabilnost jona Cu(I) u odnosu na jone Cu(II) menja se u prisustvu "mekih" liganada koji favorizuju stabilizaciju jona Cu(I) (kao što su nezasićeni ligandi azota i sumpora kao donori) (Conry, 2011). Prema Pirsonovom principu "tvrdih i mekih" kiselina i baza (*Hard and Soft Acid-Base* (HSAB)), Cu(I) klasifikovan je kao meka kiselina, dok je Cu(II) klasifikovan kao granična tvrda kiselina (Ho, 1957). Iz tog razloga, u koordinacionoj hemiji Cu(II), dominantni su ligandi azota i kiseonika kao donori, a zatim ligandi koji sadrže hlor i sumpor kao donore (Conry, 2011). Bakar(II) u vodenim rastvorima lako gradi kompleksna jedinjenja sa neutralnim (H₂O, NH₃) i jonskim (Cl⁻, CN⁻) ligandima (Cotton i

sar., 1999). Fosfati su jedni od najboljih liganada za bakar i danas je okarakterisano puno bakar-fosfatnih kompleksa (Conry, 2011).

Pored nabrojanih svojstava, važna uloga bakra je i u reakciji sličnoj Fentonovoj reakciji (*Fenton-Like reaction*) u kojoj se generiše hidroksil radikal ($\text{HO}\cdot$) iz vodonik-peroksida (H_2O_2). U biološkim sistemima Fentonova reakcija može biti početna reakcija u složenim mehanizmima slobodno-radikalskih lančanih reakcija, koje mogu uključivati redukciju Cu(II) od strane superoksid radikal anjona ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Nordberg i sar., 2014). Joni bakra imaju i ulogu kofaktora brojnih metaloenzima u različitim metaboličkim reakcijama (shema 1.1) (Valko i sar., 2005):



Shema: 1.1. Fentonova reakcija modifikovano (Valko i sar., 2005).

1.1.3. Nalaženje mangana u prirodi

Količine mangana prisutne u tragovima su neophodne za odvijanje esencijalnih bioloških funkcija kao što su: pravilno funkcionisanje širokog spektra enzima koji regulišu osnovne metaboličke procese, uključujući dismutaciju/uklanjanje $\text{O}_2^{\cdot-}$, oksidaciju molekula vode u procesu fotosinteze (Nies, 1999; Pittman, 2005; Ushizaka i sar., 2008). Dozvoljene vrednosti za koncentraciju rastvorenog mangana u prirodnim vodama, koje nemaju antropogeni unos ovog metala, su od 10 do $> 10\,000 \mu\text{g/L}$. Obično koncentracije rastvorenog manganu prirodnim površinskim vodama ne prelaze $200 \mu\text{g/L}$ (EPA, 2004). Kontaminacija vodenih ekosistema manganom u najvećoj meri je povezana sa otpadnim vodama iz rudnika koje sadrže visoke koncentracije rastvorenog mangana (Li i sar., 2019), ali i kroz promenu pH i redoks osobina vodenih sistema koji dovode do redukcije prirodnih depozita oksida mangana. Poslednjih godina prekomerno zagađenje pijaće vode manganom postaje sve veći problem, jer dolazi do njegove akumulacije u centralnom nervnom sistemu (Rahman i sar., 2017). Na osnovu navedenih razloga od velike je važnosti da se pronađe način uklanjanja toksičnih koncentracija mangana u zagađenim ekosistemima.

1.1.4. Hemijske karakteristike mangana

Mangan se kao i bakar ubraja u teške metale. U prirodi se može javiti u više oksidacionih stanja: Mn(II), Mn(III), Mn(IV), Mn(V), Mn(VI) i Mn(VII), pri čemu su najstabilniji kompleksi oni u kojima je mangan, kao centralni metalni jon u oksidacionom stanju +2. Kompleksi Mn(II) mogu biti visoko i nisko-spinski d^5 kompleksi. Od redoks stanja metala zavise i njegove hemijske osobine, jer različita oksidaciona stanja imaju različite hemijske karakteristike kao što su: jonsko naelektrisanje, rastvorljivost, kinetika razmene liganda i stabilnost koordinacionih kompleksa (Sunda i Huntsman, 1998). U zavisnosti od oksidacionog stanja i koordinacionog broja mogu se formirati kompleksi mangana prikazani u tabeli 1.2. Koordinacioni broj i geometrija kompleksa mangana promenljivi su usled slabe stabilizacije energije ligandnog polja za visokospinske konfiguracije i čini se da u velikoj meri zavise od sternih i elektronskih efekata liganda. Mangan (II) ima veći jonski ili kovalentni poluprečnik, ili rastojanje metal-ligand od ostalih prelaznih metala prvog reda (+2) i dužine veza metal-ligand su prilično promenljive u odgovoru na sterne efekte liganda. Najčešće se javlja geometrija sa koordinacionim brojem 6. Niži koordinacioni brojevi (3, 4 i 5) prilično su retki, dok su veći koordinacioni brojevi (7 i 8) češći nego za ostale prelazne elemente prvog reda, što je posledica veličine jona Mn(II) (Collomb i Deronzier, 2005).

Rastvorljivost mangana varira u zavisnosti od oksidacionog stanja. Soli Mn(II) lako se rastvaraju u vodi, za razliku od Mn(III) i Mn(IV). Rastvoreni Mn(III) može se dobiti samo oksidacijom Mn(II) (Madison i sar., 2013). Prema HSAB teoriji Mn(II) je „tvrda“ kiselina (Ho, 1957) i iz tog razloga ima veliki afinitet za ligande koji kao donorske atome imaju kiseonik, dok za ligande koji kao donorske atome imaju azot ima nešto manji afinitet (Collomb i Deronzier, 2005). Mangan ima veliki broj izotopa atomske mase između 49-62. U prirodi je postojan samo ^{55}Mn (Hem, 1963).

U prirodi su najčešće zastupljena oksidaciona stanja +2, +3, +4, pri čemu je oksidaciono stanje +4 najmanje stabilno (Marschner, 2012). Oksidaciono stanje +6 javlja samo iznad pH 13,5 (Hem, 1963), dok je oksidaciono stanje +7 stabilnije u kiseljoj sredini. Redoks potencijal i pH vrednost utiču na bioraspoloživost jona mangana u rastvoru. Divalentni oblik mangana preovlađuje na vrednostima pH 4 - 7, dok se druga oksidaciona stanja mogu javiti pri višim pH vrednostima (Madison i sar., 2013). U neutralnim i kiselim vodenim rastvorima, mangan je prisutan kao heksaakva jon ako drugi ligandi nisu dostupni. Međutim, na pH > 8, formira se Mn(OH)₂. Mn(II) u ovom hidroksidu pokazuje veoma niske redukcionne potencijale i može se oksidovati do Mn(III) i dalje do Mn(IV) u oblicima Mn₂O₃ i MnO₂ koji su slabo rastvorljivi u vodi (Cotton i sar., 1999).

Tabela 1.2. Geometrija kompleksa mangana u zavisnosti od oksidacionog stanja i koordinacionog broja

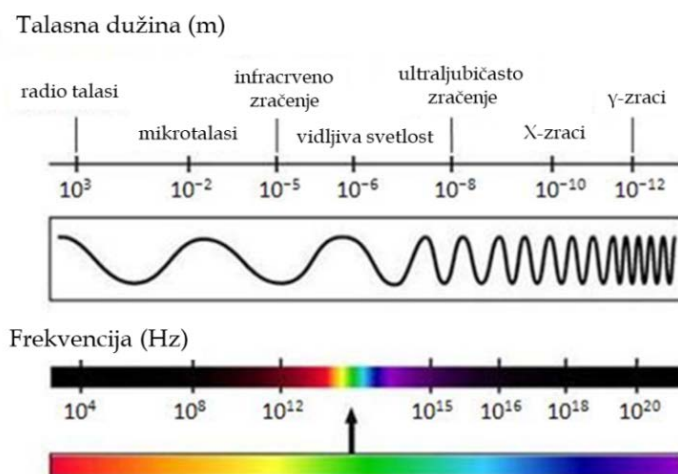
Oksidaciono stanje	Koordinacioni broj	Geometrija
Mn(II), d⁵	2	Linearna
	3	Trigonalno-planarna
	4	Tetraedarska; Kvadratno-planarna
	5	Trigonalno-bipiramidalna; Iskrivljena trigonalno-bipiramidalna
	6	Oktaedarska; Iskrivljena oktaedarska
	7	Pentagonalno-bipiramidalna; Iskrivljena pentagonalno-bipiramidalna
	8	Dodekaedarska
	Mn(III), d⁴	3
4		Kvadratno-planarna
5		Kvadratno-piramidalna; Trigonalno-bipiramidalna
6		Oktaedarska; Iskrivljena oktaedarska
Mn(IV), d³	4	Tetraedarska
	6	Oktaedarska
Mn(V), d²	4	Tertraedarska
Mn(VI), d¹	4	Tetraedarska
Mn(VII), d⁰	3	Trigonalno-planarna
	4	Tetraedarska

1.2. Zagađenje životne sredine zračenjem

Zračenje se može definisati kao prostiranje čestica ili fotona u prostoru. Živa bića su konstantno izložena dejstvu različitih vidova radijacije koji mogu biti prirodnog porekla ili su pak posledica ljudske delatnosti. U prirodne izvore radijacije ubrajaju se kosmičko zračenje i radijacija iz zemlje koja potiče od prirodnih radionuklida (^{238}U ; ^{234}U ; ^{222}Rn ; ^{226}Ra). U vodenim ekosistemima ovi radionuklidi mogu dospeti erozijom tla (Nuccetelli i sar., 2012). Pojava radionuklida prirodnog porekla u prekomernim količinama na Zemlji posledica je ljudske aktivnosti kao što su: upotreba medicinskih aparata koji emituju X i gama zrake, upotreba nuklearnog oružja i radiofarmaceutika, sagorevanje uglja, proizvodnja đubriva (Altikulać i sar., 2015).

1.2.1. Jonizujuće zračenje

Jonizujuće zračenje je elektromagnetno ili čestično zračenje koje ima dovoljno visoku energiju koja može da jonizuje materiju kroz koju prolazi i kod živih organizama izazove oštećenje ćelije. Prilikom prolaska kroz materiju jonizujuće zračenje interaguje sa atomima i molekulima predajući im energiju. Kao posledica interakcije dolazi do apsorpcije energije što može izazvati hemijske i fizičke promene sredine, dok se kod živih organizama javljaju i biološke promene (Nikčević i Anđelić, 2011). Jonizacija materije može se odigrati na dva načina: direktnim dejstvom na samu materiju ili dejstvom sekundarne radijacije. Postoji više vidova interakcije X-zraka sa materijom: (i) koherentno rasejanje; (ii) fotoelektrični efekat – apsorpcija fotona; (iii) Komptonov efekat – rasejanje fotona; (iv) stvaranje elektronskog para; (v) fotodezintegracija (Sethi, 2006). Jonizujuće zračenje ima veću energiju od nejonizujućeg zračenja (UV zračenje, IC zračenje, radio ili mikrotalasi) i može se podeliti na: čestično zračenje (α i β zračenje) i fotonsko zračenje (X i γ zraci) (Nikčević i Anđelić, 2011). U elektromagnetnom spektru X-zračenje nalazi se između UV i γ zračenja, ima visoku frekvenciju (od 3×10^{16} do 3×10^{19} Hz), kratku talasnu dužinu (od 10 do 0,01 nm) i energiju u rasponu od 0,12 do 120 keV (slika 1.2). Oni X-zraci koji imaju energiju u rasponu od 0,12 do 12 keV klasifikovani su kao meki rendgenski zraci, a od 12 do 120 keV kao tvrdi rendgenski zraci zbog svojih prodornih sposobnosti.

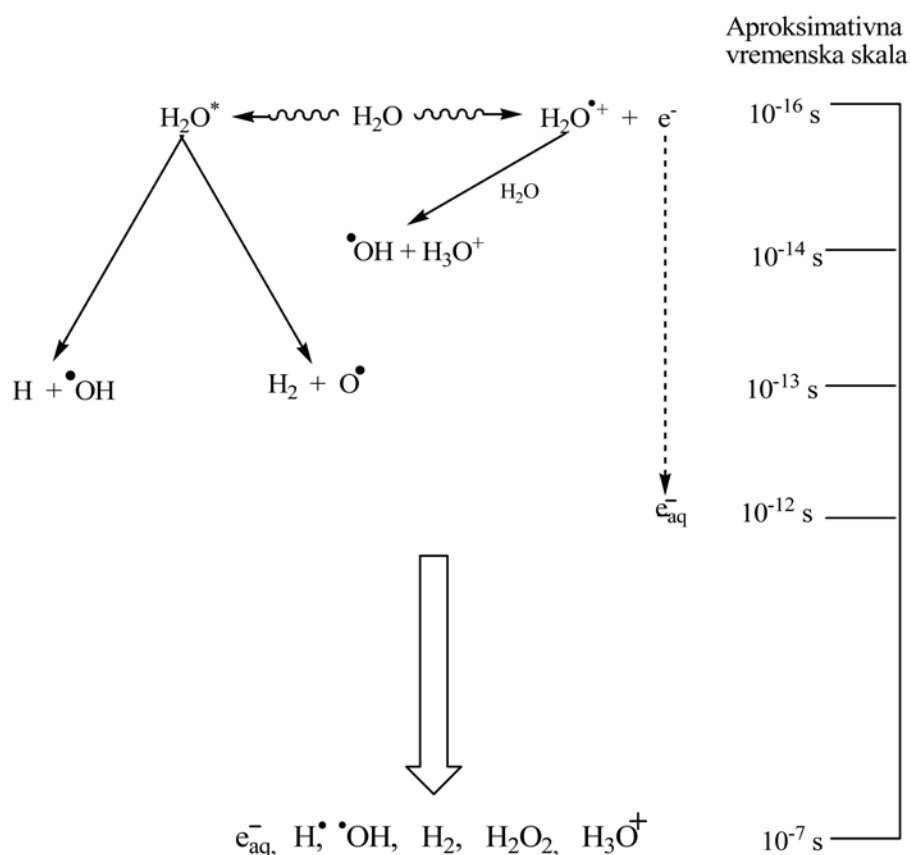


Slika 1.2. Elektromagnetni spektar modifikovano (Kot i sar., 2014).

Osnovna primena X-zraka je u dijagnostičkoj radiografiji i kristalografiji (Aichinger i sar., 2004; Ooi, 2010). Pored ove primene, može se upotrebljavati u analitičke i industrijske svrhe (Drobny, 2012). Treba napomenuti da materija koja se ozrači X-zracima ne postaje radioaktivna.

1.2.2. Efekat jonizujućeg zračenja na žive organizme

Kao posledica izlaganja živih organizama jonizujućem zračenju dolazi do hemijskih promena molekula usled raskidanja hemijskih veza (Hutchinson, 1985). S obzirom na činjenicu da se živi sistemi najvećim delom sastoje od vode, ključni način na koji jonizujuće zračenje ostvaruje efekte je kroz radiolizu (razlaganja) molekula vode i stvaranja slobodnih radikala (slika 1.3) (Buxton, 2004). Fotonsko jonizujuće zračenje lako prolazi biološke barijere, pa do hidrolize vode dolazi i u vanćelijskom i u unutarćelijskom prostoru.



Slika 1.3. Shematski prikaz radiolize vode i aproksimativna vremenska skala procesa koji se odigravaju pri radiolizi vode. $\text{H}_2\text{O}^{\bullet+}$ - radikal katjon vode nastao povuđivanjem molekula vode elektronom (Buxton, 2004).

Visokoreaktivni intermedijeri nastali radiolizom vode mogu dovesti do oštećenja ćelijskog zida, organela, uticati na aktivnost enzima i ćelijski ciklus, dovesti do destrukcije molekula DNK i na kraju do destrukcije same ćelije (Riley, 1994; Bernhard i sar., 1995). Niskoenergetski X-zraci - meko zračenje, koristi se za analizu hrane i manje su štetni za razliku od visokoenergetskih rendgenskih zraka koji se koriste u medicinskoj dijagnostici. Međutim, efekat niskih doza visokoenergetskog jonizujućeg X-zračenja (10 - 100 Gy) može imati pozitivan, stimulatorni, efekat na ozračene organizme, uključujući i mikroalge (Luckey, 1982; Chen, 2011; Jeong i sar., 2017a). Ovaj biološki fenomen naziva se hormezis. Radiacioni hormezis predstavlja stimulatorni efekat nastao kao posledica izlaganja živih organizama niskim dozama jonizujućeg zračenja (Macklis i Beresfold, 1991). Radiacioni hormezis često je proučavan fenomen, međutim, većina studija se fokusirala na životinjske modele i insekte (Vaiserman i sar., 2021). Iako su neke studije proširene tako da uključuju kopnene biljke (Jan i sar., 2012) i mikrobe, kao što su bakterije i kvasci (Petin i sar., 2003; Kudryasheva i Rozhko, 2015), malo istraživanja je odrađeno na mikroalgama za koje je takođe pokazano da mogu opstati u uslovima povećane radijacije (Kalin i sar., 2005). Dosadašnja istraživanja pokazuju da niske doze jonizujućeg zračenja imaju pozitivan efekat na proliferaciju i rast ćelije, proizvodnju biomase i povećanu sintezu lipida kod mikroalgi (Jeong i sar., 2017a). Međutim, efekat jonizujućeg X-zračenja na promene u strukturi ćelijskog zida i kapacitet vezivanja metala za izolovane frakcije ćelijskog zida, što je bio predmet istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji, do sada nije ispitan.

1.3. Zelena mikroalga *Chlorella sorokiniana*

Domen: *Eukaryota*

Carstvo: *Plantae*

Razdeo: *Chlorophyta*

Klasa: *Trebouxiophyceae*

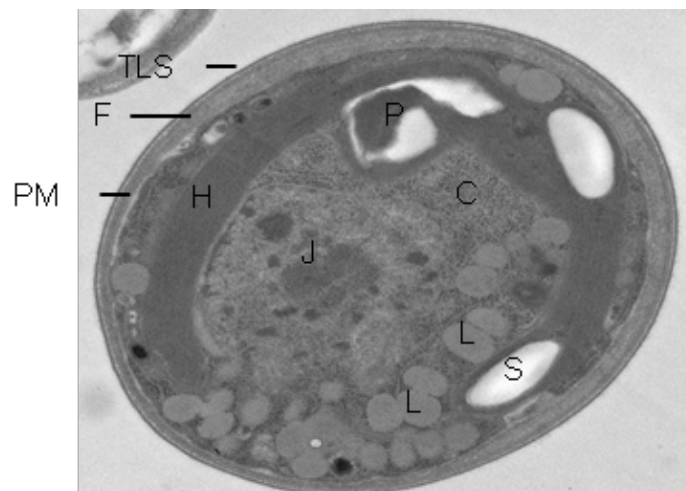
Red: *Chlorellales*

Familija: *Oocystaceae*

Rod: *Chlorella*

Vrsta: *Chlorella sorokiniana*

C. sorokiniana spada u eukariotske, zelene, slatkovodne, jednoćelijske alge (mikroalge). Osnovne morfološke karakteristike uključuju glatki ćelijski zid, odsustvo biča i sferni oblik ćelije čiji je prečnik u rasponu od 2–5 μm . Razmnožava se bespolno, prostom deobom ćelije (Liu i Hu, 2013). Tipična ćelija izgrađena je od dvoslojnog ćelijskog zida i citoplazme sa organelama: jedrom, velikim hloroplastom sa pirenomidom, mitohondrijama, škrobnim zrnima i lipidnim kapima (slika 1.4).



Slika 1.4. TEM mikrografija poprečnog preseka ćelije *C. sorokiniana*. Na mikrografijama se mogu uočiti: trilaminarni (TLS) i fibrilarni (F) sloj ćelijskog zida, plazma membrana (PM), citoplazma (C) u kojoj se nalaze jedro (J), hloroplast (H) sa pirenomidom (P), lipidne kapi (L) i škrobna zrna (S).

Jedro je smešteno u središtu ćelije. Hloroplast ima oblik čaše, periferno je postavljen u citoplazmi i u njegovoj blizini lokalizovane su mitohondrije. Pored navedenih organela, može se uočiti i pirenoid, prisutan kod većine algi roda *Chlorella* (Ikeda i Takeda, 1995; Goncalves i sar., 2013), obično lokalizovan centralno u hloroplastu i okružen škrobnim omotačem (Goncalves i sar., 2013). Pirenoid ima ulogu u Krebsovom ciklusu, odnosno, u skladištenju CO_2 , neophodnog za odvijanje procesa fotosinteze, pomoću enzima ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza oksigenaze (RuBisCO), lokalizovanog u pirenoidu (Zhan i sar., 2018). Mikroalge roda *Chlorella* imaju debeo i krut ćelijski zid čija se struktura može razlikovati među vrstama (Yamada i Sakaguchi, 1982; Gerken i sar., 2013). Većina algi

pripada autotrofnim organizmima. Stoga su važan izvor pigmenata: hlorofila a, b, i karotenoida (astaksantin, β -karoten i lutein) (Liu i Hu, 2013). Hlorofili su primarni fotosintetički pigmeni zelene boje, dok su karotenoidi pigmenati žute, narandžaste ili crvene boje.

Mikroalge su veoma korisne jer vrše fotosintezu i obogaćuju staništa u kojima žive kiseonikom. Kao fitoplankton, predstavljaju izvor hrane za primarne potrošače. Pokazano je da pripadnici roda *Chlorella* imaju značajan industrijski potencijal, delom zbog njihovih relativno brzih i robusnih karakteristika rasta (Ahmad i sar., 2020). Ove mikroalge sadrže i značajnu količinu proteina, ugljenih hidrata, lipida, vitamina C, β -karotena i vitamina B (B1, B2, B6 i B12), zbog čega mogu koristiti kao dodatak ishrani, u farmaceutskoj industriji za proizvodnju kozmetike (Coronado-Reyes i sar., 2020). Trenutne globalne potrebe za energijom dovele su do potrebe za pronalaženjem alternativnih izvora energije. Kako mikroalge sadrže visok procenat lipida, jedna od potencijalnih upotreba je u proizvodnji biodizela i biogasa (González-González, 2018). Prethodna istraživanja pokazala su da mikroalga *C. sorokiniana*, koja je predmet istraživanja ove disertacije, može da raste u otpadnim vodama u uslovima koji bi bili nepovoljni za druge vrste algi (Carfagna i sar., 2013; Escapa i sar., 2017; Lv i sar., 2017).

1.3.1. Mikroalge kao biosorbent teških metala

Poslednjih godina, sa porastom zagađenja vodenih ekosistema teškim metalima, sve više pažnje se posvećuje pronalasku adekvatnog rešenja. Upotreba bioloških materijala u tu svrhu sve češće privlači pažnju naučnika. Sposobnost bioloških materijala da uklone metale, metaloide, jedinjenja i čestice iz rastvora naziva se biosorpcija (Gok i Aytas, 2014). Biosorpcija je fizičko-hemijski proces koji podrazumeva uklanjanje jona metala iz rastvora ili kroz različite procese od strane živih mikroalgi ili kroz vezivanje za komponente biomase, gde ćelijski zid igra ključnu ulogu (Das i sar., 2008). Biosorpcija predstavlja dobar mehanizam za uklanjanje jona metala koji se nalaze u industrijskim ili otpadnim vodama i na taj način dovodi do smanjenja zagađenja vodenih ekosistema. Ostale metode koje se koriste za uklanjanje teških metala kao što su precipitacija, jonska razmena, membranska filtracija, hemijska i elektrohemijska sedimentacija imaju određene nedostatke kao što su: (i) velika početna ulaganja; (ii) visoki troškovi održavanja; (iii) manja efikasnost u odnosu na biosorbent; (iv) proizvodnja velike količine mulja koji sadrži visoke koncentracije metala (Fu i Wang, 2011; Wu i sar., 2018). Stoga je pažnja sve više usmerena na alternativnu tehnologiju koja kao biosorbent koristi prirodne materijale ili nusproizvode prerade materijala iz poljoprivrednih i industrijskih izvora. Biosorbenti, posebno oni bazirani na algama bili su u fokusu istraživanja iz više razloga: (i) izvanredan kapacitet usvajanja metala; (ii) odsustvo stvaranja toksičnog otpada; (iii) niski troškovi održavanja; (iv) ušteda vremena i energije; (v) mogućnosti rasta tokom cele godine; (vi) jednostavno uzgajanje i manipulacija; (vii) obnovljivost (Cheng i sar., 2019).

Razumevanje mehanizama kojima mikroalge apsorbuju jone metala nije jednostavno zbog kompleksne strukture njihovog ćelijskog zida (Baudalet i sar., 2017) i

vanćeliskog matriksa (mukusa) koji alge sintetisu kao deo odgovora na stres (Casano i sar., 2015). Biosorpcija teških metala može zavisiti od različitih faktora i uslova sredine: (i) temperature i pH (utiče na rastvorljivost i stabilnost jona metala, liganada i metal–ligand kompleksa) (Lau i sar., 1999); (ii) vrste teških metala; (iii) vrste funkcionalnih grupa prisutnih u ćelijskom zidu i mukusu (Greene i Darnall, 1990; Tien, 2002); (iv) vrste mikroalgi (Radway i sar., 2001) i (v) vremena inkubacije (Pérez-Rama i sar., 2002). Proces vezivanja jona metala može se opisati u dva koraka: prvi korak podrazumeva pasivno vezivanje jona metala na površini ćelijskog zida i izlučenog mukusa (adsorpcija), što je relativno brz proces; drugi korak podrazumeva heliranje i transport vezanih jona metala u unutrašnjost ćelije (apsorpcija) (Khummongkol i sar., 1982; Cho i sar., 1994; Sabatini i sar., 2009). Adsorpcija je nemetabolički proces koji ne zavisi od energije (Kotrba, 2011). Unošenje jona metala u ćeliju odvija se uglavnom aktivnim transportom, tj. joni metala se prenose kroz ćelijsku membranu posredstvom trans-membranskih proteina (Campbell i sar., 2002; Kaplan, 2013; Moenne i sar., 2016). Nakon ulaska u ćeliju joni metala mogu se vezati za peptide kao što su fitohelatini ili metalotioneini (Mehta i Gaur, 2005). Za razliku od prvog koraka, drugi korak može da zavisi od temperature ili samog metaboličkog stanja ćelije, ovaj korak je zavisian i od energije (Perales-Vela i sar., 2006). Biosorpcija teških metala posredstvom mukusa je takođe proces koji zavisi od fizičko-hemijskih faktora (Comte i sar., 2008), metabolizma i vrste polimera i funkcionalnih grupa prisutnih u mukusu (Abdi i Kazemi, 2015).

1.3.2. Građa ćelijskog zida

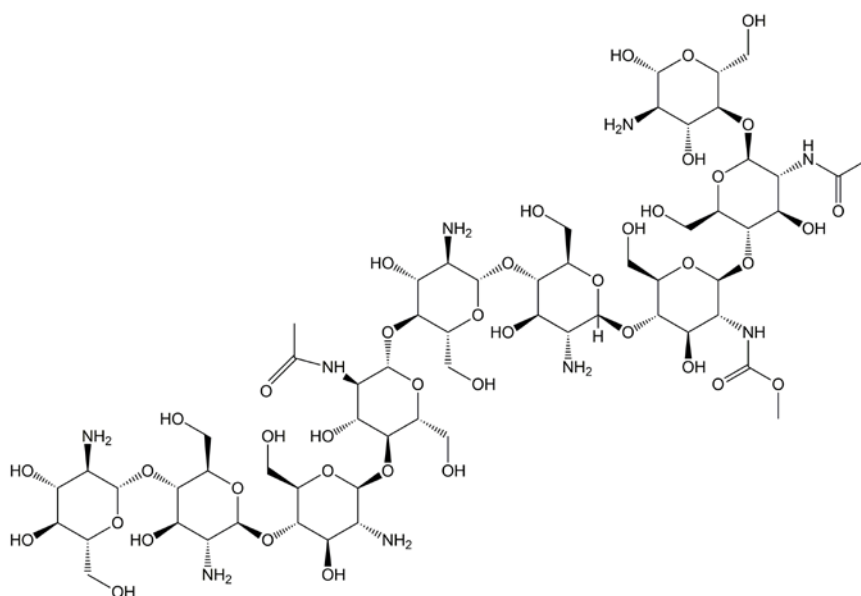
Kako je već pomenuto, kod mikroalgi kao biosorbenta ćelijski zid igra važnu ulogu (Macfie i Welbourn, 2000). Građa ćelijskog zida kod različitih vrsta algi može značajno varirati. Iz tog razloga i efikasnost same biosorpcije varira u zavisnosti od roda i vrste mikroalgi (Kumar i sar., 2015). Neretko, vrste istog roda mogu pokazivati i varijacije u sastavu svojih ćelijskih zidova (Rodrigues i Bon, 2011; Rashidi i Trindade, 2018). Alge roda *Chlorella*, u koje spada i *C. sorokiniana*, imaju čvrst ćelijski zid. Čvrsti ćelijski zidovi imaju ulogu u očuvanju ćelije i preživljavanju nepovoljnih uslova spoljašnje sredine. Debljina ćelijskog zida varira tokom rasta same ćelije, a zavisi i od brzine rasta (Nemcova i Kalina, 2000).

Do sada je pokazano da postoji 3 tipa građe ćelijskog zida kod *Chlorella*: ćelijski zidovi tip 1 su dvoslojni, sastavljeni od spoljašnjeg trilaminarnog sloja i unutrašnjeg fibrilarnog sloja. Tip 2 takođe čine dvoslojni zidovi, ali spoljašnji sloj nije trilaminarni, dok ćelijski zidovi tip 3 čine zidovi građeni samo od fibrilarnog sloja (Yamada i Sakaguchi, 1982). Debljina ćelijskog zida je između 120 i 130 nm, unutrašnji mikrofibrilarni sloj debljine je oko 100-110 nm, dok je spoljašnji trilaminarni sli (TLS) debljine oko 20-30 nm (Martinez i sar., 1991). Mikroalga *C. sorokiniana* koja je predmet istraživanja ove doktorske disertacije ima ćelijske zidove tip 1 (Baudalet i sar., 2017). Spoljašnji trilaminarni sloj je rigidan i sastoji se iz dva sloja koja su prostorno razdvojena (odatle „tri“ vidljive lamine). Spoljni od dva sloja rigidnog ćelijskog zida predstavlja zreli zid majke ćelije, dok je unutrašnji rigidni sloj zid ćerke ćelije. Između njega i plazma membrane se nalazi rastresit

fibrilarni ćelijski zid. U pripremi za deobu, rigidni ćelijski zid ćerki ćelija zadebljava, zid majke ćelije puca, i oslobađaju se nove ćelije. Struktura ćelijskog zida zajednička za različite alge roda *Chlorella* ukazuje na taksonomsku povezanost (Russell, 1995).

1.3.2.1. Hemijski sastav ćelijskog zida

Mikroalge roda *Chlorella* se dele u dve grupe prema sastavu rigidnog slaja ćelijskog zida, koji može biti sastavljen ili iz glukoze i manoze ili iz glukozamina (Russell, 1995). Spoljašnji rigidni trilaminarni ćelijski zid kod *C. sorokiniana* se sastoji iz glukozamina i N-acetilglukozamina u formi hitozanu-sličnog polimera (slika 1.5). Unutrašnji fibrilarni ćelijski zid je polisaharidne strukture sastavljen of ramnoze, ksiloze, manoze, galaktoze i glukoze (šećeri su poređani prema zastupljenosti), kao i uronskih kiselina (glukuronska kiselina kod *C. sorokiniana*) (Takeda, 1991; Russell, 1995; Baudalet i sar., 2017).



Slika 1.5. Hemijska struktura hitozana koji čini rigidni spoljašnji ćelijski zid *C. sorokiniana*. Polimer je sastavljen iz glukozamina i N-acetilglukozamina.

Navedeni polimeri ćelijskog zida mikroalgi sadrže različite funkcionalne grupe kao što su amino, amidna, hidroksilna, karbonilna, karboksilna, sulfhidrilna, fosfatna grupa (Tüzün i sar., 2005), koje učestvuju u formiranju kompleksa sa jonima metala (Wu i sar., 2017). Ove funkcionalne grupe mogu vezati i ukloniti jone metala iz okoline, čineći ćelijski zid mikroalgi glavnom komponentom u procesu uklanjanja teških metala. Stoga je poznavanje strukture i sastava ćelijskog zida od izuzetne važnosti kako bi se razumeli mehanizmi biosorpcije teških metala uz pomoć mikroalgi. Osim kao mehanizam odbrane od visokih koncentracija metala, prisustvo ovih funkcionalnih grupa koje može biti izmenjeno i koje mogu biti modifikovane, ima ulogu i u formiranju rezervi metala u svrhu održavanja normalnog ćelijskog metabolizma. Ove grupe “drže” metale blizu ćelije, formirajući rezerve esencijalnih nutrijenata.

1.3.3. Vanćelijski matriks

Kao posledica izloženosti visokim koncentracijama jona metala u otpadnim i industrijskim vodama, mikroorganizmi sintetišu vanćelijski matriks koji pored ćelijskog zida predstavlja prvu liniju odbrane, sprečavajući ulazak jona metala u ćeliju i na taj način omogućava adaptaciju u stresnim uslovima sredine (Borah i sar., 2018). Kako je do sada pokazano, vanćelijski matriks mogu proizvesti različiti mikroorganizmi (Mikes i sar., 2005), uključujući i mikroalge (Babiak i Krzemińska, 2021). Postoje četiri opšte kategorije vanćelijskog matriksa: (i) rastvorljivi u medijumima za rast; (ii) čvrsto pričvršćen za površinu ćelijskog zida; (iii) slabo pričvršćeni za površinu ćelijskog zida; (iv) vanćelijski matriks koji predstavlja gelasti premaz na površini ćelijskog zida (Xu i sar., 2013; Wei i sar., 2016; Shen i sar., 2018). Dosadašnja istraživanja pokazuju da hemijski sastav i zastupljenost određenih polimera u vanćelijskom matriksu variraju u zavisnosti od vrste mikroalgi i uslova životne sredine kao što su: povećana i smanjena osvetljenost, visoka i niska temperatura, promene pH vrednosti sredine, nedostatak hranljivih materija neophodnih za normalan rast i preživljavanje, promena saliniteta medijuma, stres izazvan povećanim koncentracijama jona metala (Steele i sar., 2014; Angelaalincy i sar., 2017; Hou i sar., 2017; Babiak i Krzemińska, 2021; Li i sar., 2021).

1.3.3.1. Hemijski sastav vanćelijskog matriksa

Kako je već rečeno, vanćelijski matriks mikroalgi ima značajnu ulogu u heliranju jona metala (Shen i sar., 2018; Li i sar., 2021) i preživljavanju stresnih uslova sredine (Kumar i sar., 2018). Vanćelijski matriks mikroalgi (mukus) predstavlja gelastu strukturu na površini ćelija mikroalgi. Iako sastav mukusa varira kod različitih vrsta mikroalgi glavne komponente su polisaharidi i proteini (Xiao i Zheng, 2016). Alge roda *Chlorella* oslobađaju mukus koji se dominantno (90%) sastoji od polisaharida (dugačkih linearnih ili razgranatih molekula velike molekulske mase) (Naveed i sar., 2019). Najzastupljenije komponente polisaharida koji ulaze u sastav mukusa mikroalgi su: D-glukoza, D-galaktoza, D-manoza, D-glukuronska kiselina, D-manuronska kiselina, L-ramnoza i N-acetil-D-galaktozamin (Xiao i Zheng, 2016; Halaj i sar., 2018). Polisaharidi mukusa koji proizvodi *C. sorokiniana* sastoje iz se glukoze, fruktoze, galakturonske kiseline, ksilitola, inozitola, manoze, arabinoze, galaktoze i ramnoze (niz je poredan prema zastupljenosti u biomasi) (Watanabe i sar., 2006).

Posle polisaharida, proteini su druga najzastupljenija komponenta mukusa mikroalgi (Ge i sar., 2012). Analiza sadržaja aminokiselina pokazala je da sastav proteina varira među vrstama, ali dominantne aminokiseline koje ulaze u sastav proteina koji čine mukus su alanin, glicin, valin, serin, asparaginska kiselina i glutaminska kiselina. Proteini i šećeri mukusa mogu biti fosforilisani (Naveed i sar., 2019). Količina i sastav izlučenog mukusa variraju i u zavisnosti od tipa stresora kojem su alge izložene. Tako na primer, u

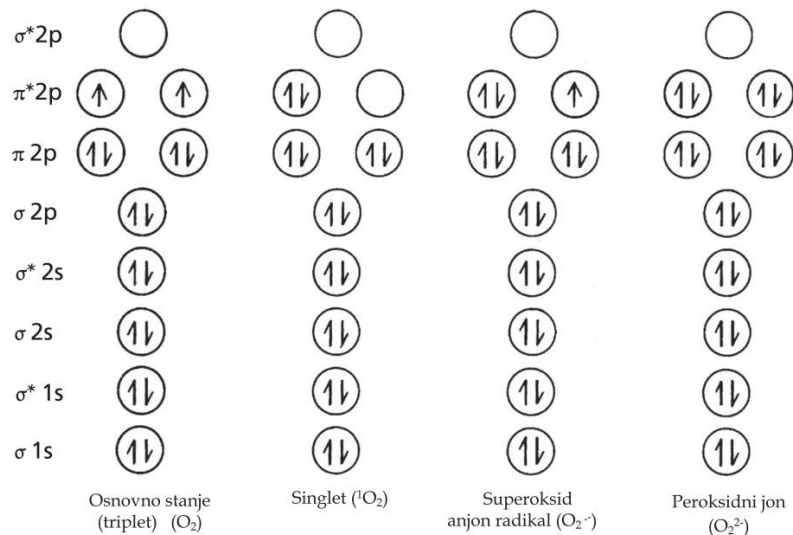
zavisnosti od koncentracije soli kojima su alge izložene može doći do promena u količini izlučenog mukusa (Rao i sar., 2007; Bayona i Garcés, 2014). Utvrđeno je i da koncentracija azota ima značajnu ulogu u proizvodnji mukusa (Domozych, 2007; Bayona i Garcés, 2014).

Kapacitet vezivanja jona metala za polimere mukusa može zavisiti od hemijskog sastava samog mukusa i karakteristika biopolimera (dostupnosti funkcionalnih grupa) i od prirode i vrste jona metala (Sheng i sar., 2013; Wei i sar., 2017). Sorpcija mukusa i metala zasniva se na interakciji funkcionalnih grupa polimera koji ulaze u sastav mukusa (karboksilne, fosforne, hidroksilne grupe) sa jonima metala. Funkcionalne grupe uglavnom imaju afinitet za vezivanje dvovalentnih katjona kao što su Cu(II), Fe(II), Cd(II), Zn(II) (Yan i sar., 2017). Apsorpcioni kapacitet mukusa može zavisiti od drugih faktora, kao što su temperatura, pH rastvora i prisustvo kompetitivnih jona (Dobrowolski i sar., 2017; Zhou i sar., 2017). Dosadašnja istraživanja rađena na bakterijama pokazuju da kada se one tretiraju povećanim koncentracijama jona arsena dolazi do promene u zastupljenosti određenih polimera vanćelijskog matriksa (Deepika i sar., 2016). Međutim, kako dolazi do promene u sastavu mukusa u zavisnosti od tipa stresora kod mikroalgi još uvek je nejasno i potrebno je dodatno istraživanje kako bi se ovi mehanizmi razjasnili.

1.4. Reaktivne vrste kiseonika

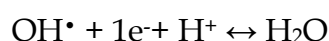
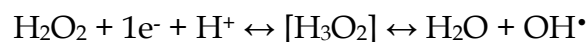
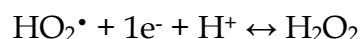
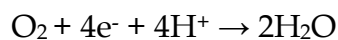
Abiotički stresogeni faktori, kao što su povećane koncentracije jona metala i jonizujuće zračenje, dovode do proizvodnje reaktivnih vrsta kiseonika - ROS (*eng. reactive oxygen species*) i pojave oksidativnog stresa (Pinto i sar., 2003; Azzam i sar., 2012; Gomes i sar., 2017). Kao posledica prekomerne proizvodnje ROS, od kojih neki imaju funkciju sekundarnih glasnika u biološkim procesima (Valko i sar., 2005), dolazi do različitih poremećaja u normalnom funkcionisanju ćelije. ROS mogu interagovati sa biomolekulima tako što će ih deaktivirati ili izmeniti i na taj način prouzrokovati oštećenje ćelijskih komponenti i disfunkciju organela (Halliwell i Gutteridge, 2015). Kako nastaju u procesu metabolizma, kada imaju ulogu u normalnom odvijanju bioloških funkcija, ali i u drugim procesim indukovanim različitim stresorima, kada imaju negativne posledice na biomolekule kroz oksidativna oštećenja, produkcija ROS u ćeliji mora biti stogo kontrolisana (Halliwell i Gutteridge, 2015).

Algama, kao i drugim aerobnim organizmima kiseonik je neophodan u procesu stvaranja energije potrebne za održavanje različitih fizioloških procesa ćelije. Molekulski kiseonik (O₂) je glavni biološki akceptor elektrona koji ima fundamentalnu ulogu u osnovnim ćelijskim funkcijama. Određeni oblici kiseonika, koji nastaju redukcijom O₂, koji se aktivira u stresnim uslovima, mogu biti jako štetni za sve organizme, uključujući i mikroalge (Halliwell i Gutteridge, 2015). U osnovnom stanju O₂ je triplet i nije reaktivan u interakciji sa organskim molekulima jer poseduje po jedan nespareni elektron paralelnih spinova u dve odvojene orbitale (slika 1.6).



Slika 1.6. Elektronska konfiguracija kiseonika i njegovih oblika nakon sukcesivnog dodavanja elektrona (Halliwell i Gutteridge, 2015). Peroxidni jon protonacijom dalje daje H₂O₂.

Kako je za potpunu redukciju O₂ do molekula vode u procesu respiracije potrebno četiri elektrona, a po Paulijevom principu, O₂ ne može da primi sva četiri elektrona odjednom, već jedan po jedan, O₂ se procesom višestepene monovalentne redukcije nepotpuno redukuje što dovodi do formiranja ROS (Mallick i Mohn, 2000) (shema 1.2). Molekulski kiseonik može da primi jedan elektron i da stvori O₂^{•-}. Ovaj prvi korak je termodinamički nepovoljan i objašnjava nisku reaktivnost samog O₂. Superoksidni radikal će primiti jedan elektron i dva protona što dovodi do stvaranja H₂O₂. Za razliku od O₂^{•-}, H₂O₂ lako može da difunduje kroz biološke membrane i izazove oksidativni stres daleko od mesta nastanka. Kad H₂O₂ primi treći elektron i jedan proton, dolazi do formiranja HO[•] i OH⁻. Najreaktivnija vrsta kiseonika je HO[•], izuzetno je moćan oksidans i reaguje sa organskim molekulima neposredno nakon difuzije (Mallick i Mohn, 2000; Scandalios, 2005; Buonocore i sar., 2010).



Shema 1.2. Višestepena monovalentna redukcija O₂ do vode i formiranje ROS (Buonocore i sar., 2010).

Lipidi, kao ključne komponente ćelijske membrane, primarni su ciljni molekuli sa kojima interaguju ROS. Lipidna peroksidacija može se definisati kao oksidaciono oštećenje izazvano delovanjem ROS na lipide pri čemu se indukuje lančana reakcija u kojoj se lipidni peroksidi nagomilavaju. Kao posledica lipidne peroksidacije dolazi do promene u strukturi i funkciji membrane, promene u radu jonskih kanala, dok mnogobrojni enzimi i receptori gube aktivnost (Halliwell i Gutteridge, 2015). Stoga, peroksidacija lipida nastala kao posledica oksidacionog oštećenja ROS predstavlja važan pokazatelj oštećenja ćelija u živim organizmima.

Oksidacija proteina je jedna od kovalentnih modifikacija proteina izazvanih prekomernim koncentracijama ROS i drugim proizvodima oksidativnog stresa (Kosourov i sar., 2017). Karbonilacija proteina je post-translaciona modifikacija u kojoj dolazi do uvođenja karbonilnih grupa u bočne lance aminokiselina kao što su: arginin, lizin, treonin ili prolin (Stadtman, 1990. Thomas i sar., 2009). Kao posledica modifikacija dolazi do promene u aktivnosti, stabilnosti, lokaciji i interakcijama sa drugim proteinima (Matamoros i Becana, 2021). Oksidacija katalizovana metalom je uobičajeni mehanizam karbonilacije proteina u ćeliji. Pokreće je HO• dobijen u Fentonovoj reakciji (Thomas i sar., 2009). Ovako dobijen HO• reaguje sa bočnim lancima lizina, prolina, arginina, treonina, što dovodi do njihovog cepanja i formiranja karbonilne/ih grupe/a na bočnim lancima (Dean i sar., 1997; Droge, 2002), čime se inhibira ili menja njihova aktivnost i povećava podložnost proteolitičkom napadu (Rivett i Levine, 1990; Berlett i Stadtman, 1997; Dukan i sar., 2000).

1.4.1. Antioksidativni sistemi

Živi organizmi su razvili širok spektar zaštitnih mehanizama sačinjenih od enzima i molekula direktno uključenih u održavanje redoks homeostaze i uklanjanje ROS kako ne bi došlo do oštećenja ćelije (Apel i Hirt, 2004; Rodriguez-Garcia i Guil-Guerrero, 2008). Ti molekuli nazvani su antioksidanti i mogu se definisati kao bilo koja supstanca koja kada je prisutna u nižoj koncentraciji u odnosu na supstrat podložan oksidaciji može da spreči ili odloži oksidaciju tog supstrata (Halliwell i Gutteridge, 2015). Antioksidanti održavaju koncentraciju ROS u ćeliji na prihvatljivom nivou, čime sprečavaju štetnu oksidaciju ciljnih molekula. Kod algi je pokazano da poseduju enzimske i neenzimske antioksidativne odbrambene mehanizme koji im omogućavaju da se izbore sa štetnim efektima ROS i opstanu u stresnim uslovima (Pikula i sar., 2019).

- i. enzimski sistem čine antioksidativni enzimi velike molekulske mase, kao što su superoksid dismutaza, glutation reduktaza, glutation peroksidaza, katalaza, askorbat peroksidaza, glutation-S-transferaza;
- ii. neenzimski antioksidativni sistem (male molekulske mase) čine antioksidanti neophodni za reparaciju i uklanjanje oštećenih makromolekula: glutation, flavonoidi, karotenoidi, tokoferoli i fenoli.

1.4.1.1. Glutation

Glutation (*L-γ-glutamyl-L-cisteinyl-glicin*) predstavlja najzastupljeniji neenzimski antioksidant u mikroalgama (Morelli i Scarano, 2004; McDermott i sar., 2011), što ga čini dobrim indikatorom unutarćelijskog redoks stanja (Schafer i Buettner, 2001; Foyer i Noctor, 2011). Poznato je da ima ulogu u detoksikaciji ćelije redukcijom ROS pre svega H_2O_2 , heliranjem jona metala, kao i redukcijom i zaštitom tiola na proteinima. On je tiol male molekulske mase koji se nalazi u većini prokariotskih i eukariotskih ćelija (Mendoza-Cozatl i sar., 2005). Sintetiše se u dva koraka zavisna od ATP-a, katalizovana enzimom γ -glutamylcistein-sintetazom i glutation sintetazom (Cameron i Pakrasi, 2010). Obično se sintetiše u citosolu, hloroplastima, mitohondrijama i vakuolama (Noctor i Foyer, 1998). U ćeliji se može javiti u dva oblika, redukovanom tiolnom (GSH) i oksidovanom disulfidnom (GSSG). U većini ćelijskih procesa glutation se koristi u obliku GSH (koji čini više od 95% ukupnog glutaciona u ćeliji) dok GSSG u zdravim ćelijama retko dostiže 10%. Redukovani oblik glutaciona ima važnu ulogu u procesima heliranja jona metala i kao prekursor u sintezi fitohelatina (Cobbett i Goldsbrough, 2002). Pored toga, ima važnu ulogu u redoks regulaciji, zaštiti i signalizaciji ćelije kroz glutationilaciju i deglutationilaciju specifičnih ciljnih proteina (Zaffagnini i sar., 2012). Niska koncentracija GSSG u ćeliji reguliše se posredstvom glutation-reduktaze, redukcijom disulfida u reakciji u kojoj se NADPH koristi kao donor elektrona (Cameron i Pakrasi, 2010), jer previsoka koncentracija GSSG može oštetiti mnoge enzime u ćeliji. Odnos GSH/GSSG predstavlja dobar parametar oksidativnog stresa u organizmu, ima fundamentalnu ulogu u ćelijskoj homeostazi i takođe je uključen u procese ćelijske signalizacije (Monostori i sar., 2009). Ćelije mogu sintetisati više GSH kada je to potrebno, međutim ova sinteza se pokreće kada drugi ćelijski procesi troše ili uklanjaju GSH, umesto da ga samo oksiduju, jer se čini da granični nivoi GSH i GSSG zajedno deluju kao inhibitor puta sinteze (Mendoza-Cozatl i sar., 2005). Glutation je takođe i prekursor za sintezu fitohelatina, proteinskih molekula koji imaju značajnu ulogu u heliranju jona teških metala (Cobbett, 2000; Pawlik-Skowrońska., 2001).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

U ovoj doktorskoj disertaciji cilj je bio da se ispituju i objasne interakcije jona Cu(II) i Mn(II) sa jednoćelijskom algom *Chlorella sorokiniana* (soj CCAP 211/8K), kao i promene koje nastaju u tim interakcijama nakon izlaganja alge abiotičkom stresu u obliku elektromagnetnog jonizujućeg zračenja (X-zračenje). Ispitivanja su obuhvatila:

- (i) Određivanje najviših koncentracija jona Cu(II) i Mn(II) koje nemaju citotoksični/citostatički efekat na kulturu mikroalgi. Tako određene koncentracije su korišćene u daljim ispitivanjima interakcija;
- (ii) Promene na nivou strukture i sastava mikroalgalne ćelije - promene u ćelijskom zidu, sinteza i otpuštanje mukusa, promene u glavnim tipovima biomolekula - lipidima, proteinima, ugljenim hidratima, biće ispitivane upotrebom skening elektronskog mikroskopa (SEM) sa EDS detektorom i infracrvenom spektroskopijom sa Furijeovom transformacijom koja koristi sinhrotronski izvor zračenja (SR-FTIR);
- (iii) Promene u redoks statusu mikroalgalne ćelije - produkcija ROS, nivo i oksidacija tiola, biće ispitivane primenom biohemijskih i strukturnih markera i metodom elektronske paramagnetne rezonancije (EPR) spinskih obeleživača;
- (iv) Koordinacione interakcije i promene redoks stanja jona bakra i mangana u mikroalgalnoj ćeliji - vezivanje za ćelijski zid i mukus, polifosfate i druge strukture i molekule, biće ispitivane primenom EPR metode, ciklične voltimetrije i apsorpcione spektroskopije X-zraka (XAFS). Posebna pažnja je usmerena na identifikaciju liganada i određivanje strukture nastalih kompleksa (oksidacionog stanja vezanih jona metala, donorskih atoma liganada kao i geometrije dobijenih kompleksa);
- (v) Uticaj zračenja na interakcije mikroalge sa jonima Cu(II) i Mn(II) biće ispitan na nivou ćelijskog zida primenom metoda: transmisiona elektronske mikroskopije (TEM), infracrvene spektroskopije sa Furijerovom transformacijom (FTIR), EPR spektroskopije spinskih hvatača, esejima za određivanje kapaciteta vezivanja metala i EPR spektroskopije.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

U ovom odeljku prikazan je spisak hemikalija koje su korišćene u eksperimentima, protokoli gajenja eksperimentalnog objekta i opisane sve metode i uslovi rada koji su korišćeni u ovoj doktorskoj disertaciji.

3.1. Hemikalije

Sve hemikalije bile su "PA" ili "HPLC" stepena čistoće. Svi rastvori su pravljani sa 18 MΩ dejonizovanom ultračistom vodom kao rastvaračem.

Spisak hemikalija:

1. Agar, Torlak, Beograd, Srbija
2. Natrijum-nitrat (NaNO_3), *Sigma-Aldrich, Sent Luis, SAD*
3. Kalcijum-hlorid dihidrat ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$), *Sigma-Aldrich*
4. Magnezijum-sulfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), *Sigma-Aldrich*
5. Kalijum-hidrogenfosfat trihidrat ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$), *Sigma-Aldrich*
6. Kalijum-dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), *Sigma-Aldrich*
7. Etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA), *Sigma-Aldrich*
8. Gvožđe(III)-hlorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), *Sigma-Aldrich*
9. Mangan(II)-hlorid tetrahidrat ($\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$), *Sigma-Aldrich*
10. Cink-hlorid (ZnCl_2), *Sigma-Aldrich*
11. Kobalt(II)-hlorid heksahidrat ($\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$), *Sigma-Aldrich*
12. Natrijum-molibdat dihidrat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), *Sigma-Aldrich*
13. Vitamin B1 (Tiaminhidrohlorid), *Carl Roth, Karlushe, Nemačka*
14. Vitamin B12 (Cijanokobalamin), *Carl Roth*
15. Lugolov rastvor, *Sigma-Aldrich*
16. Hloroform, *Sigma-Aldrich*
17. Metanol, *Fisher Scientific, Lugborou, Engleska*

18. Natrijum-hlorid (NaCl), *Sigma-Aldrich*
19. Triton X-100, *Sigma-Aldrich*
20. Aceton, *Sigma-Aldrich*
21. α -Amilaza, *Sigma-Aldrich*
22. Bakar(II)-hlorid dihidrat ($\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$), *Sigma-Aldrich*
23. *Evans Blue*, *Sigma-Aldrich*
24. Glutaraldehid, Serva, Hajdelberg, Nemačka
25. Paraformalaldehid, Serva
26. Etanol, *Sigma-Aldrich*
27. Dinatrijum-hidrogenfosfat (Na_2HPO_4), *Sigma-Aldrich*
28. Natrijum-fosfat (NaH_2PO_4), *Sigma-Aldrich*
29. Osmijum-tetroksid (OsO_4), Serva
30. Uranil-acetat, *Sigma-Aldrich*
31. Olovo-citrat, *Sigma-Aldrich*
32. Dimetil sulfoksid (DMSO), *Sigma-Aldrich*
33. Hepes, Serva
34. Hitozan, *Sigma-Aldrich*
35. 5-dietoksifosforil-5-metil-1-pirolin-N-oksidi (DEPMPO), *Santa Cruz Biotechnologies*,
Dalas, Teksas, SAD
36. Gvožđe(II)-sulfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), *Sigma-Aldrich*
37. Vodonik-peroksid (H_2O_2), *Carlo Erba Reagents*, Milano, Italija
38. Sulfosalicilna kiselina, *Sigma-Aldrich*
39. Dietilentriamin pentanska kiselina (DTPA, *Sigma Aldrich*)
40. Elmanov reagens (DTNB), *Sigma-Aldrich*
41. Glutation reduktaza, *Sigma-Aldrich*
42. β -dihidronikotinamid-adenin dinukleotid fosfat (β -NADPH), *Sigma-Aldrich*
43. Glutation (GSH), *Sigma-Aldrich*
44. Azotna kiselina (HNO_3), *Sigma-Aldrich*
45. Mangan(IV)-oksid (MnO_2), *Sigma-Aldrich*
46. Mangan(III)-oksid (Mn_2O_3), *Sigma-Aldrich*
47. Magnan(II,III)-oksid (Mn_3O_4), *Sigma-Aldrich*
48. Kalijum-permanganat (KMnO_4), *Sigma-Aldrich*
49. 2',7'-dihlorodihidrofluorescein diacetat (DCFH-DA), *Sigma-Aldrich*
50. Fura-2, *Sigma-Aldrich*
51. Hidroksilamin hidrohlorid ($\text{NH}_2\text{OH} \times \text{HCl}$), *Sigma-Aldrich*
52. Formaldehid, *Sigma-Aldrich*
53. Bakar(II)-oksid (CuO), *Sigma-Aldrich*
54. Bakar(I)-oksid (Cu_2O), *Sigma-Aldrich*

3.2. Eksperimentalni objekat

Kao model organizam korišćena je zelena jednoćelijska alga (mikroalga) *Chlorella sorokiniana* (CCAP 211/8K; alternativna oznaka UTEX 1230, *Culture Collection of Algae and Protozoa*, Velika Britanija), dobijena ljubaznošću profesora *Jon Pittman*-a sa Univerziteta u Mančesteru, Velika Britanija.

3.2.1. Uzgajanje mikroalge *Chlorella sorokiniana*

Za potrebe eksperimenata mikroalga *C. sorokiniana* gajena je u tečnoj kulturi, dok je štok mikroalgi čuvan na čvrstim agarskim podlogama na 4 °C do zasejavanja za eksperimentalni rad. U oba slučaja je korišćen hranljivi medijum 3N-BBM+V (*Bold Basal Medium with 3 fold Nitrogen and Vitamins*)¹. Medijum u kojem raste mikroalga *C. sorokiniana* pravljen je tako što su iz koncentrovanih rastvora odgovarajućih nutrijenata (tabele 3.1 i 3.2) dodate odgovarajuće zapremine, ovde prikazane za 1 L medijuma. Za agarske podloge, u medijum je pored osnovnih hemikalija navedenih u tabelama ispod dodavan agar u koncentraciji od 1,5%.

Tabela 3.1. Receptura za pripremu tečnog medijuma 3N-BBM.

Koncentracija soli/vitamina g/1000 mL vode	Potrebna zapremina u mL za pripremu 1L medijuma
25 g NaNO ₃	30
2,5 g CaCl ₂ ·2H ₂ O	10
7,5 g MgSO ₄ ·7H ₂ O	10
7,5 g K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	10
17,5 g KH ₂ PO ₄	10
2,5 g NaCl	10
rastvor mikroelemenata*(tabela 4.2)	6
12 g vitamina B ₁	1
1 g vitamina B ₁₂	1

¹https://www.ccap.ac.uk/media/documents/3N_BBM_V.pdf

Tabela 3.2. Receptura za pripremu koncentrovanog rastvora koji se koristi za pripremu tečnog medijuma 3N-BBM. Mase su izražene u mg, preračunate za 1 L rastvora.

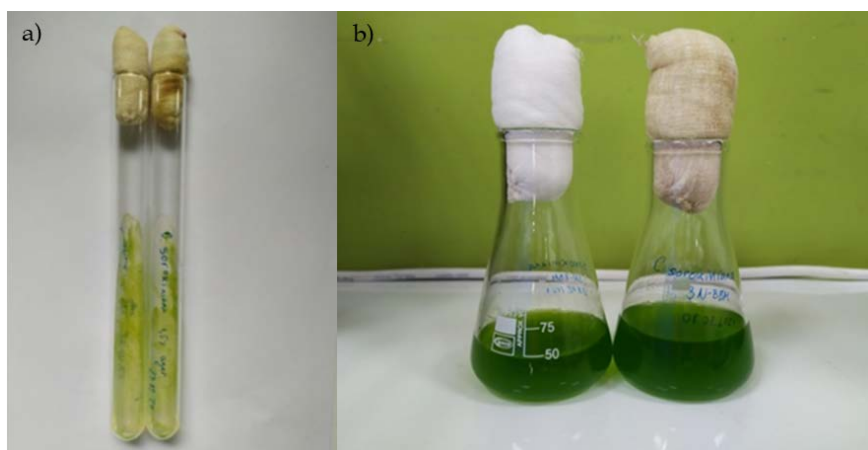
*Rastvor mikroelemenata	Masa potrebna za pripremu 1L koncentrovanog rastvora mikroelemenata
Na ₂ EDTA	750 mg
FeCl ₃ x6H ₂ O	97 mg
MnCl ₂ x4H ₂ O	41 mg
ZnCl ₂	5 mg
CoCl ₂ x6H ₂ O	2 mg
Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	4 mg

3.2.1.1. Agarske podloge

Mikroalga *C. sorokiniana* gajena je na 3N-BBM+V medijumu, u koji je dodat 1,5 % agar, koji predstavlja hranljivu podlogu za gajenje mikroalgi *C. sorokiniana*. Ovako napravljen medijum sterilisan je u autoklavu na 114 °C, u trajanju od 25 min. Dok je medijum vruć i tečan, razliven je u staklene epruvete (kosi agar) u sterilnim uslovima u laminaru (*Vertical Clean Bench and Filtered PCR Cabinet, "MaXtream"*, Daihan, Džakarta, Indonezija). Razliveni medijum ostavljen je u laminaru dok ne očvrсне (~1 h). Nakon hlađenja i očvršćavanja medijuma, sterilnom ezom je iz postojeće tečne kulture mikroalgi *C. sorokiniana* prenet na agarsku hranljivu podlogu. Epruvete su zatvorene sterilnim čepom i držane u komori (fitotronu) sa kontrolisanom temperaturom od 21 ± 2 °C i osvetljenjem sa kontinuiranim fluksom fotona od 120 μmol/m²s (MST TL-D *Reflex 36W840 1 SLV/ 25 sijalice, Philips*, Amsterdam, Holandija). Nakon 2 - 3 dana, kada se na agarskoj ploči pojavio "tepih" algi, epruvete su prebačene u frižider na 4 °C kako bi se usporio rast, a samim tim i potrošnja nutrijenata iz medijuma (slika 3.1a). Ovako pripremljene kulture mikroalgi korišćene su kao početni štok za sve dalje eksperimente. Maksimalno vreme čuvanja algi u frižideru je bilo mesec dana i u tom periodu su se mogle iskoristiti za presejavanje u tečnu kulturu za eksperimente. Presejavanje algi za eksperimente uvek je rađeno u sterilnim uslovima, u laminaru.

3.2.1.2. Tečne podloge

Za eksperimente, mikroalga *C. sorokiniana* gajena je u staklenim erlenmajerima u tečnom 3N-BBM + V medijumu, pH= 7 (slika 3.1b). Nakon autoklaviranja medijumi se hlade na sobnoj temperaturi najmanje 24 h, a vitamini se dodaju pred samu upotrebu medijuma. Razlog dodavanja vitamina nakon autoklaviranja je održavanje njihove stabilnosti i funkcije, koja bi prilikom sterilizacije bila narušena (Horner, 2006).



Slika 3.1. Kultura mikroalgi *C. sorokiniana*: a) epruvete sa mikroalgama gajenim na hranljivim agarским podlogama (3N-BBM+V + 1,5% agar), b) erlenmajeri sa mikroalgama gajenim na tečnim podlogama 3N-BBM+V.

3.2.2. Priprema kulture mikroalge *C. sorokiniana* za eksperimente

Sa agarских podloga, kultura mikroalgi *C. sorokiniana*, preneti je u sterilne erlenmajere. U prvom koraku, u 50 mL tečnog 3N-BBM+V medijuma sterilnom ezom je preneti proizvodna koncentracija algi sa agarских plodloga. Nakon nekoliko dana rasta, *C. sorokiniana* je iz dobijene kulture dalje presejavana u nove erlenmajere za eksperimente sa početnom gustom od 5×10^5 ćelija/mL. Za sve eksperimente, mikroalge su držane u fitotronu sa kontinuiranim fluksom fotona od $120 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, na orbitalnom šejkeru na 120rpm^2 do dostizanja stacionarne faze rasta, odnosno do 20-og dana. Zapremine kulture bile su 50 mL u erlenmajeru od 100 mL ili 150 mL u erlenmajeru od 250 mL, u zavisnosti od potreba eksperimenta. Zapremina uzoraka je korigovana na isparavanje tokom perioda rasta dodavanjem sterilne dejonizovane vode 15. dan. Svaki erlenmajer predstavljao je

² Obrtaji u minuti (*revolutions per minute*- rpm).

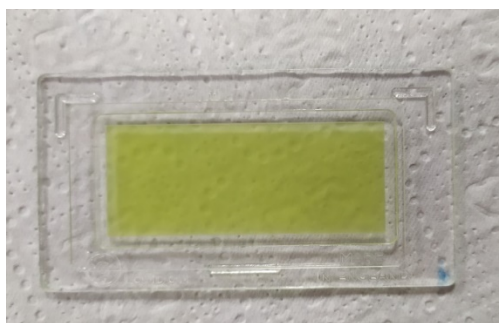
jedan uzorak. Svi eksperimenti rađeni su u dve ili tri serije, sa tri ili četiri biološka ponavljanja po grupi.

3.2.2.1. Određivanje gustine kulture

Gustina kulture mikroalgi određena je brojanjem ćelija po mL uzorka. Uzorku mikroalgi (0,5 mL) dodato je 50 μ L Lugolovog rastvora³, nakon čega je uzorak inkubiran 10 min na sobnoj temperaturi. U zavisnosti od postignute gustine za brojanje kulture mikroalgi pravljena su odgovarajuća sukcesivna razblaženja uzorka od 10 \times , 100 \times , 1000 \times , 2000 \times i dalje koliko je potrebno.

Za brojanje ćelija mikroalgi korišćena je *Sedgewick–Rafter* komora za brojanje, zapremine 1 mL (slika 3.2), podeljena na 1000 kvadrata zapremine 1 μ L. Uzorak je ostavljen da odstoji oko 5 min, kako bi se staložio, a zatim postavljen pod objektiv optičkog mikroskopa (*Optika B-292 Microscope, Optika Microscopes, Ponteranica, Italija*) na uveličanju od 100 \times . Odgovarajućim razblaženjem postiže se optimalna gustina mikroalgi za brojanje (ne treba da bude manje od 10 ili više od 30 mikroalgi po kvadratu). Ćelije se broje u 10 različitih i nasumično odabranih kvadrata, a zatim se odredi srednja vrednost. (Karlson i sar., 2010). Gustina kulture mikroalgi određena je sledećom formulom (1):

$$\frac{\text{Br.ćelija}}{\text{mL}} = \text{Srednja vrednost izbrojanih ćelija} \times 1000 \text{ kvadrata} \times \text{faktor razblaženja} \quad (1)$$



Slika 3.2. *Sedgewick–Rafter* komora za brojanje.

³ Lugolov rastvor sadrži jod koji povećava specifičnu težinu organizama, što rezultira bržim taloženjem, onemogućava kretanje i boji ćelije u plavo, što čini brojanje lakšim (Anderson i Karlson, 2017).

3.2.2.2. Određivanje stacionarne faze

Tokom rasta mikroalgi, kulture pokazuju ranu lag fazu, eksponencijalnu fazu rasta, stacionarnu fazu i fazu lize/smrti. Za određivanje stacionarne faze kultura mikroalgi praćena je kriva rasta. Stacionarna faza postiže se kada kultura prestane da raste. Analizirani parametri koji opisuju krivu rasta su: optička gustina – OD (*engl. optical density*) i biomasa. Uzorkovanje i analize su rađene svakog drugog dana.

3.2.2.2.1. Optička gustina

Parametar OD određen je primenom metode ultraljubičaste/vidljive spektroskopije (UV/Vis spektroskopija) (*engl. Ultraviolet/Visible spectroscopy*) (UV/Vis spectrophotometar *Jenway Genova Plus*, Stafordšir, Engleska), praćenjem inteziteta apsorpcije na talasnoj dužini $\lambda = 750$ nm, za 10× razblaženi uzorak. Razblaženja su rađena u dejonizovanoj vodi.

3.2.2.2.2. Biomasa

Za određivanje biomase uzorci su centrifugirani 5 min na brzini od $5000 \times g^4$. Supernatant je odliven, a pelet sušen u sušnici 2 dana na 50 °C. Biomasa je izražena kao mg/mL.

3.3. Izolacija ćelijskog zida

Izolacija ćelijskog zida rađena je kod algi koje su prethodno ozraćene različitim dozama X-zraka (tabela 3.3) i kontrolnih uzoraka. Biomasa mikroalgi dobijena je centrifugiranjem iz 150 mL uzoraka. Uzorci su isprani dva puta sa 50 mL dejonizovane vode centrifugiranjem 5 min na $2300 \times g$. Izolacija ćelijskog zida sprovedena je prema protokolu (Simonović i sar., 2011), sa manjim modifikacijama. Svi koraci protokola su izvedeni na sobnoj temperaturi ako nije drugačije naznačeno.

⁴G sila, odnosno, relativna centrifugalna sila (*relative centrifugal force - rcf*).

Uzorci su zamrznuti u tečnom azotu, homogenizovani u avanu, pomoću tučka i preneti u tubu za centrifugiranje uz ispiranje suda sa 5 mL dejonizovane vode (~0,5 g sveže mase, m:V 1:10). Nakon toga je primenjena serija rastvarača u zapremini od 5 mL, kako je navedeno ispod. Nakon svakog koraka primenjeno je centrifugiranje u trajanju od 5 min, $800 \times g$.

- dejonizovana voda ispiranje 2 ×;
- 1:1 smeša hloroform:metanol – šejker 10×5 min;
- 1:1 smeša hloroform:metanol – preko noći na $4 \text{ }^\circ\text{C}$;
- 1 M NaCl – šejker 1 h;
- resuspendovati u 0,5% Triton X-100;
- dejonizovana voda (ispiranje Triton X-100) – 10 ×;
- dejonizovana voda – šejker 20 min;
- resuspendovati u metanolu;
- aceton - šejker 4×20 min;
- sušnica preko noći na $30 \text{ }^\circ\text{C}$;
- α -amilaza (5000 jedinica na 1 g ćelijskog zida) inkubacija 2 × (α -amilaza rastvorena je u 50 mM kalijum-fosfatnom puferu (KPP), pH 7,2);
- sušnica 24 h na $30 \text{ }^\circ\text{C}$;
- ispiranje u KPP dok supernatant ne postane bistar;
- aceton- šejker 2×20 min;
- uzorci su ostavljeni da se osuše na sobnoj temperaturi u digestoru.

Inkubacija u α -amilazi služi za uklanjanje skroba. Primenjeni protokol odabran je sa ciljem očuvanja strukture svih polimera ćelijskog zida (Hall i Moore, 1983; Chen i sar., 2000). Izolovane frakcije ćelijskog zida korišćene su dalje u eksperimentima za ispitivanje kapaciteta vezivanja jona teških metala na netretiranim algama (kontrola) i na algama koje su prethodno izložene jonizujućem zračenju.

3.4. Abiotički stresogeni faktori

Kultura mikroalgi 20. dana tretirana je rastvorima soli metala Cu(II) i Mn(II) u širem opsegu koncentracija, i/ili primenom različitih doza jonizujućeg X-zračenja. Nakon tretmana analiziranje uticaj ovih stresogenih faktora na rast i preživljavanje kulture mikroalgi.

3.4.1. Tretman rastvorima soli metala

Nakon dostizanja stacionarne faze, kulture mikroalgi zapremine 150 mL, početne koncentracije 5×10^5 ćelija/mL, tretirane su rastvorima soli metala Cu(II) i Mn(II). U eksperimentu su korišćene soli: $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ i $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$. Opseg koncentracija rastvora soli Cu(II) bio je 0,1 mM; 1 mM; 2 mM; 5 mM i 10 mM. Opseg koncentracija rastvora soli Mn(II) bio je 0,1 mM; 1 mM; 2 mM; 5 mM; 10 mM i 20 mM.

Subletalne koncentracije rastvora jona metala određene su praćenjem vrednosti za OD, biomasu i vijabilnost. OD merenaje na isti način kao i za krivu rasta (određivanje stacionarne faze odeljak 3.2.2.2.1). Protokol za određivanje vijabilnost predstavljen je u odeljku 3.4.3.

3.4.2. Tretman jonizujućim zračenjem

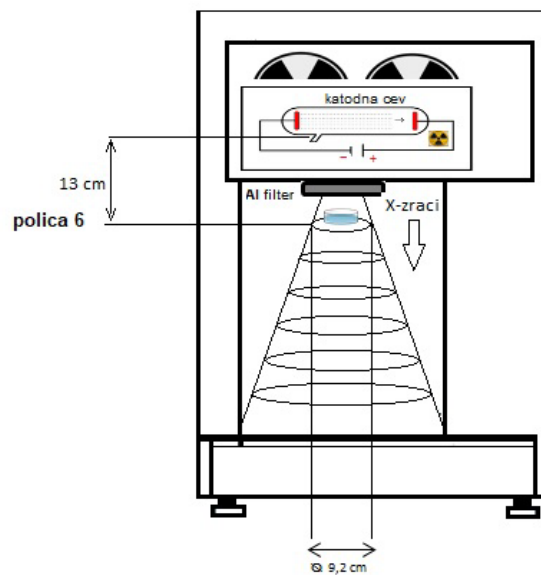
U eksperimentima je primenjeno jonizujuće X-zračenje niskog intenziteta (do 100 Gy). Analizirano je više različitih doza (10, 20, 50 Gy) i dve različite brzine ozračivanja (2,290 Gy/min i 5,057 Gy/min) sa odgovarajućim pratećim parametrima predstavljenim u tabeli 3.2. Apsorbovane doze zračenja od strane uzorka su bile oko 10 puta manje od oslobođenih, odnosno: 1,09 Gy, 2,21 Gy, 5,45 Gy. Da bi se pojednostavilo objašnjenje, navedene doze pisaće se zaokrugljenim vrednostima 1 Gy, 2 Gy i 5 Gy.

Tabela 3.2. Primenjene doze jonizujućeg zračenja (Gy), brzina (Gy/min), struja (mA) i vreme ozračivanja (min).

Doza (Gy)	Brzina (Gy/min)	Struja(I); (mA)	Vreme (t); (min)
1	2,290	2	4 min i 22 s
2	2,290	2	8 min i 44 s
5	5,057	4,5	9 min i 54 s

Za određivanje optimalnih doza i brzina ozračivanja, koje ne dovode do smrti ćelija i oštećenja tkiva, analizirane su OD, biomasa i vijabilnost jedan dan nakon ozračivanja mikroalgi.

Intenzitet primenjene doze zavisi od različitih dozimetrijskih faktora kao što su izvor zračenja, udaljenost uzorka od izvora zračenja, veličina polja zračenja, vrsta filtera (Desrosiers i sar., 2013). Shema aparata za ozračivanje prikazana je na slici 3.3. Tretman jonizujućim zračenjem izvođen je tako što su alikvoti mikroalgi zapremine 50 mL prebačeni u staklene Petri šolje i postavljeni na policu 6 (najviša polica). Položaj uzorka na ovoj polici podrazumeva izloženost celom snopu zračenja. Ova polica odgovarala je veličini polja zračenja koje zauzima Petri šolja. Udaljenost uzorka od izvora zračenja je 13 cm. Prečnik ozračenog polja: 9,2 cm. Zračenje je izvršeno u komori za ozračivanje (*CellRad*, *Faxitron Bioptics LLC*, Tucson, AZ, SAD) gde su uzorci mikroalgi izloženi X-zracima odgovarajući vremenski period (tabela 3.2).



Slika 3.3. *CellRad*, *Faxitron Bioptics LLC*, Tucson, AZ, SAD. Shematski prikaz položaja i dijametra polica u *Faxitronu* (gornja slika). Prikaz aparata i položaja police (donja slika).

Zadati eksperimentalni uslovi bili su: snaga: 750 W; dimenzije otvora (*pinhole*): 1,0 × 1,4 mm; filteri: 1,6 mm Be i 0,5 mm Al; ugao zraka: 40° divergencije. Održavan je konstantan napon od 120 kV. Kao dozimetar korišćena je jonska komora. Doze i brzine podešavane su primenom različitih vrednosti intenziteta struje. Brzina i vreme ozračivanja određuju se primenom jednačina 1 i 2:

$$\text{Brzina ozračivanja (Gy/min)} = 1,12779 \times I \text{ (mA)} \quad (1)$$

$$\text{Vreme ozračivanja (s)} = \text{Doza/brzina ozračivanja} \times 60 \text{ (s)} \quad (2)$$

3.4.3. Određivanje vijabilnosti ćelija kao odgovora na abiotički stres

Efekte određenih koncentracija jona teških metala kao i efekat akutnog zračenja na preživljavanje ćelija testirani su korišćenjem *Evans Blue* boje (po ranije opisanom protokolu (Zuppini i sar., 2007) sa manjim modifikacijama. U eksperimentu je korišćena *Evans Blue* boja koja se uobičajeno koristi za određivanje procenta živih ćelija u uzorku. Mrtve ćelije gube membransku selektivnost i akumuliraju boju. Stoga, procentualno povećanje broja ćelija obojenih *Evans Blue* bojom u populaciji ukazuje na povećani procenat nevijabilnih ćelija. Vijabilnost je predstavljena kao procenat neobojenih ćelija. Analizirano je najmanje 50 ćelija po uzorku.

U eksperimentu je korišćen 1% rastvor *Evans Blue* boje pripremljen u dejonizovanoj vodi. U 0,5 mL uzorka mikroalgi dodato je 100 µL boje. Uzorci su uvijeni u aluminijumsku foliju kako bi bili zaštićeni od svetlosti i postavljeni u vodoravni položaj na šejkeru u trajanju od 2 h. Zatim, su isprani 3–4 puta u 3N-BBM medijumu bez vitamina centrifugiranjem 1 min na 10 000 × g, dok supernatant ne postane bezbojan. Talog je resuspendovan u 2 mL medijuma i zatim analiziran na svetlosnom mikroskopu pri uveličanju od 100 puta. Za svaki uzorak su proizvoljno odabrana i slikana 3 do 4 vidna polja u okviru kojih su zatim brojane žive i mrtve ćelije.

U cilju procene opsega koncentracija koje nemaju citotoksične efekte, osim vijabilnosti, određivani su i parametri OD i biomase.

3.5. Primenjene metode, instrumenti i uslovi snimanja

U okviru istraživanja ove doktorske disertacije primenjene su sledeće metode: ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija, elektronska mikroskopija, infracrvena spektroskopija, EPR spektroskopija, ciklična voltometrija, adsorpciona rendgenska spektroskopija i fluorescentna spektroskopija. Analize su rađene na celim ćelijama mikroalgi ili izolovanim frakcijama ćelijskog zida. U tabeli 3.4. dat je prikaz tipa uzorka i primenjenih metoda.

Tabela 3.4. Prikaz korišćenih metoda i tip uzorka mikroalgi na kojima su rađeni eksperimenti

Cele ćelije mikroalgi	Izolovane frakcije ćelijskog zida
UV/Vis spektroskopija	UV/Vis spektroskopija
EPR	EPR
SR-FTIR	FTIR
Fluorescentna spektroskopija	Fluorescentna spektroskopija
SEM-EDS	
TEM	
Ciklična voltometrija	
XANES/EXAFS	

3.5.1. Elektronska mikroskopija

Metode elektronske mikroskopije koriste snop elektrona visokih energija za analizu uzoraka. Osnovna prednost elektronskih mikroskopa je njihova velika rezolucija, koja omogućava da se uzorci analiziraju na izuzetno velikom uvećanju bez prevelikog gubitka oštine slike.

Za analizu strukturnih promena ćelijskog zida kod celih ćelija algi korišćena je SEM (*engl. scanning electron microscopy*) i TEM (*engl. transmission electron microscopy*) mikroskopija. Neke osnovne razlike između SEM i TEM elektronske mikroskopije predstavljene su u tabeli 3.5 (Inkson, 2016). Snimanja na elektronskim mikroskopima rađena su na Bejlor Univerzitetu, Vako, Teksas (USA).

Tabela 3.5. Prikaz osnovne razlike između SEM i TEM mikroskopije.

SEM	TEM
Analiza površine uzorka (hemijski sastav, tekstura)	Analiza preseka, unutarćelijske strukture uzoraka
Snop elektrona fokusira se na jednom mestu na površini uzorka i skeniranje se vrši uzastopno na više tačaka na uzorku	Relativno velika površina uzorka se neprekidno zrači snopom elektrona
Uveličanje je u opsegu od 10 do 500 000 puta	Uveličanje je u opsegu od 2000 do 1 000 000 000 puta
Nije potrebno praviti tanke preseke uzoraka	Neophodno je praviti tanke preseke uzoraka
Priprema uzorka je jednostavna	Priprema uzorka je složena

3.5.1.1. SEM-EDS

Za analizu morfoloških promena ćelija mikroalgi i otpuštanja mukusa, kao i za promene u elementarnom sastavu biomase (u površinskom sloju uzorka) i analizu samog vezivanja jona Cu(II) i Mn(II) za ćelijski zid i oslobođeni mukus korišćena je SEM mikroskopija sa EDS detektorom.

Alikvoti mikroalgi (1,5 mL) netretiranih (kontrola) ili tretiranih jonima Cu(II) finalne koncentracije 1 mM u trajanju od 15 min, 1 h ili 24 h u 3N-BBM+V medijumu isprani su jednom u medijumu bez vitamina⁵ i sakupljeni za dalju analizu centrifugiranjem 5 min na 5000 × g. Fiksiranje je sprovedeno 2,5% glutaraldehydom u medijumu u trajanju od 15 min, a zatim 2,5% glutaraldehydom u 60 mM rastvoru PBS-a, pH 7,2 u trajanju od 30 min. Između fiksiranja uzorci su centrifugirani 5 min na 5000 × g. Nakon fiksacije uzorci su ispirani 3 puta sa 60 mM PBS-om, pH 7,2. Dehidracija je sprovedena ispiranjem uzoraka serijom rastućih koncentracija rastvora etanola (50%; 70%; 90% i 100% EtOH) uz inkubaciju od 15 min na sobnoj temperaturi i centrifugiranje 5 min na 5000 × g. Ovako pripremljeni uzorci sušeni su u *Critical Point Dryer* CPD300 (*Leica, Vetcler, Nemačka*), napareni slojem ugljenika pomoću neparivača uzoraka za elektronsku mikroskopiju (*ACE600 Leica*) i analizirani SEM mikroskopom (*Versa 3D, FEI, Hillsboro, OR, SAD*).

EDS analiza je izvedena pomoću *Octane Pro* silikonskog detektora (*EDAX/AMTEK, Mahwah, Njujork, SAD*) na 20 kV i radnom rastojanju od 10 mm. *Monte Carlo* simulacija (*Casino v2.48*; 8 simulacija sa po 1000 interakcija uzoraka elektrona) (*Drouin i sar., 2007*) pokazala je da je EDS detektovao rendgenske signale do 1 μm u biomasi sa x/y

⁵Ispiranje je od ovog koraka pa nadalje uvek rađeno u istoj zapremini kao što je bila i početna zapremina uzorka (1,5 mL). Ukupna zapremina rastvora fiksativa (glutaraldehyd) u odgovarajućem medijumu/puferu je takođe bila 1,5mL po uzorku.

rezolucijom od 2,2 μm . Rezultati EDS-a predstavljeni su kao molski udeo elementa (označavaju procenat molova određenog elementa u ukupnom broju molova u uzorku). Treba napomenuti da je prečnik ćelija mikroalgi *C. sorokiniana* 3–4 μm i da snop EDS detektora prodire u dubinu od oko 1 μm u uzorak. Na osnovu toga može se reći da je upotrebom ovog detektora dobijena pre svega informacija o hemijskom sastavu mukusa i ćelijskog zida, ali i određenog dela unutarćelijskog prostora.

3.5.1.2. TEM

Kako bi se utvrdile ultrastrukturne promene ćelijskog zida mikroalgi koje su nastale kao posledica izlaganja abiotičkim stresnim faktorima, sa akcentom na morfološke promene ćelijskog zida primenjena je TEM mikroskopija.

Ćelije mikroalgi u alikvotu zapremine 2 mL centrifugirane su 5 min na $5000 \times g$ i fiksirane u 3% rastvoru (V/V) glutaraldehida i 1% rastvoru (V/V) paraformaldehida u 100 mM PBS-u (pH 7,2), preko noći na 4 °C. Postfiksacija je izvedena u 0,4 mL, 1% (V/V) rastvora OsO_4 rastvorenog u 100 mM PBS-u, 2 h na sobnoj temperaturi, u mraku. Nakon toga, uzorci su dehidrirani serijom rastućih koncentracija rastvora acetona (50%, 70% i 96%) uz inkubaciju od 15 min na sobnoj temperaturi i centrifugiranje 5 min na $5000 \times g$. Nakon toga, uzorci su ukalupljeni u smolu (AGR1031, *Agar Scientific*, Stansted, Engleska). Za kalupljenje uzoraka korišćena je mekana smola pripremljena prema recepturi proizvođača⁶. Kalupljenje je rađeno u nekoliko koraka, uvek je dodavano 0,45 mL mešavine smole i acetona, gde udeo smole raste u svakom sledećem koraku (30%, 50% i 70%) i periodom inkubacije od 1 h, 2 h i preko noći, na sobnoj temperaturi. Sutradan su uzorci centrifugirani 5 min na $5000 \times g$ i zatim prebačeni u čistu smolu, inkubirani 4 h na sobnoj temperaturi i centrifugirani 5 min na $1000 \times g$. Nakon toga ponovo su prebačeni u čistu smolu i sušeni u sušnici 48 h na 60 °C. Ultratanki preseki (70 μm) dobijeni su na ultramikrotomu *Leica UC7* (*Leica Microsystems*, Vetcler, Nemačka). Nakon montiranja na bakarne mrežice, uzorci sukontrastirani 1% rastvorom uranil-acetata u trajanju od 15 min i 3% rastvorom olovo-citrata u trajanju od 5 min. Ultrastrukturna analiza je sprovedena na transmissionom elektronskom mikroskopu na 60 kV (JEOL JEM-1010 TEM (*Jeol*, Tokio, Japan)). Debljina slojeva ćelijskog zida utvrđena je pomoću softvera *ImageJ* (NIH). Analizirano je 25 ćelija presečenih u nivou jedra za kontrolnu i svaku tretiranu grupu. Debljina slojeva ćelijskog zida merena je u četiri tačke koje položajem odgovoraju položaju male kazaljke na satu kada je 12 h, 3 h, 6 h i 9 h (na x i y osi mikrografije sa tačkom preseka u centru ćelije).

⁶https://www.agarscientific.com/media/import/AGR1031_Feb14.pdf

3.5.2. Infracrvena spektroskopija

Infracrvena (IC) spektroskopija je analitička metoda koja se koristi za identifikovanje i strukturnu analizu molekula. Zasniva se na merenju apsorpcije (A) i transmitancije (T) u funkciji talasnog broja (ν). Energija (frekvencija) IC zračenja poklapa se sa oblašću energija (frekvencija) vibracije hemijskih veza, ukoliko se frekvencija upadnog zračenja poklapa sa frekvencijom vibracije veze prisutne u uzorku, tada dolazi do apsorpcije zračenja. Apsorbujući energiju zračenja iz IC oblasti, organski molekuli je pretvaraju u vibracionu energiju molekula. Kao rezultat primene IC metode, dobija se grafikon zavisnosti transmitancije ili apsorpcije IC zračenja od frekvencije. Položaj, intenzitet, oblik i broj maksimuma u IC spektru daje nam informacije o strukturi molekula - tipu veza u molekulu i funkcionalnim grupama i karakterističan je za svako jedinjenje. IC spektroskopija može se koristiti pored kvalitativne i za kvantitativnu analizu, tj. koncentracija molekula proporcionalna je intenzitetu apsorbovanog IC zračenja (Ismail i sar., 1997).

3.5.2.1. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

FTIR je tehnika u kojoj su spojene dve metode: Interferometrija (koristi se *Micheilson*-ov interferometar umesto difrakcione rešetke) i Furijerova transformacija (matematička operacija). Uzorak se izlaže infracrvenoj svetlosti čitavog opsega različitih frekvencija, a zatim Furijeovom transformacijom dobijeni signal dekonvoluiru i prevodi se u spektralne linije/trake. FTIR je široko primenjivana metoda prvenstveno zato što je nedestruktivna i u kombinaciji sa drugim analitičkim metodama daje informacije o strukturnim promenama molekula. U našim eksperimentima FTIR metoda korišćena je za ispitivanje strukturnih promena u funkcionalnim grupama izolovanih frakcija ćelijskog zida koje su nastale kao posledica izlaganja ćelija mikroalgi jonizujućem X-zračenju. Nedostatak FTIR-a je veoma velika osetljivost na vodu koja apsorbuje u toj oblasti.

Sastav izolovanog ćelijskog zida analiziran je u srednjem opsegu ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) primenom spektrometra *Nicolet 6700* (*Thermo Scientific, Waltham, Masačusec, SAD*). Rezolucija spektra bila je 1 cm^{-1} .

3.5.2.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom koja koristi sinhrotronski izvor zračenja (SR-FTIR)

SR-FTIR (*engl. synchrotron radiation-based Fourier transform mid-infrared spectroscopy*), je metoda koja se primenjuje u studijama koje zahtevaju dobru rezoluciju i bolji odnos signal/šum u odnosu na konvencionalni FTIR. Ovo je prikladna metoda za analizu uzoraka mikroalgi iz razloga što se kvalitetan spektar može dobiti iz veoma heterogenog i amorfnog uzorka. Atomi koji grade hemijske veze unutar funkcionalnih grupa biomolekula imaju različita vibraciona svojstva, što omogućava efikasnu identifikaciju biomolekula poput ugljenih hidrata, lipida i proteina koji se nalaze u uzorku (Driver i sar., 2015). SR-FTIR metoda pruža informacije o prisustvu i promenama u koncentraciji različitih hemijskih grupa, interakcijama sa metalima i drugim promenama, kao što je na primer uređenost lipida u biološkim membranama (Driver i sar., 2015). Vredi napomenuti da SR-FTIR metoda ima više od 1000 puta veću osvetljenost (broj fotona emitovanih od strane cirkulišućih snopova elektrona po jediničnoj površini i jediničnom uglu u jednoj sekundi u opsegu od 0,1% centralne energije) od konvencionalnih izvora, što poboljšava odnos signal/šum, omogućavajući preciznu detekciju apsorpcionog maksimuma sa prostornom rezolucijom koja dostiže granicu difrakcije (Bakeri sar., 2014; Diem i sar., 2004).

Na osnovu navedenih osobina, u ovoj disertaciji SR-FTIR je bila metoda izbora za analizu promena u hemijskom sastavu i identifikaciju funkcionalnih grupa u biomasi mikroalgi.

Primenom SR-FTIR metode analizirane su cele ćelije mikroalgi tretirane jonima Cu(II) ili jonima Mn(II). Priprema uzoraka za oba tretmana rađena je na isti način. Uzorci mikroalgi zapremine 150 mL sastojali su se od kontrolne grupe i uzoraka tretiranih sa 1 mM Cu(II) u trajanju od 1 h, ili tretiranih sa 1mM Mn(II) 1 h i 24 h. Ćelije su isprane 3 puta na $5000 \times g$ u trajanju od 5 min vodom i zatim liofilizovane preko noći kako bi se dobio prah. Spektri su dobijeni iz tri biološke replike kontrolnih i tretiranih uzoraka mikroalgi. Analizirani su regioni "otisaka prstiju"⁷ za glavne klase biomolekula u odgovarajućoj oblasti talasnih brojeva: ugljeni hidrati, nukleinske kiseline i fosfati ($1480-900\text{ cm}^{-1}$), proteini ($1790-1480\text{ cm}^{-1}$) i lipidi ($3030-2800\text{ cm}^{-1}$).

Pored toga, izračunat je odnos intenziteta trake C=O grupe koji potiče od simetrično istežuće vibracije sa maksimumom na 1740 cm^{-1} i zbira apsorbcija vibracija asimetričnih istežanja metilenskih (CH_2) i metil (CH_3) grupa u opsegu od 2990 cm^{-1} do 2900 cm^{-1} . Odnos CH_2/CH_3 grupa ustanovljen je na osnovu promene intenziteta pikova koji predstavljaju asimetrično istežanje ovih grupa, koji se javljaju između 2920 i 2960 cm^{-1} (Smith, 2015), dok je relativni nivo C=C veza utvrđen na osnovu intenziteta trake na $\sim 3010\text{ cm}^{-1}$ (koja predstavlja vibracije istežanje grupe C=C-H u nezasićenim lipidima) (Smith, 2016). Ovaj odnos predstavlja parametar oksidativnog stresa, gde količina C=O grupa oslikava lipidnu peroksidaciju, a metilenske i metil grupe oslikavaju količinu lipida (Muik

⁷Položaj, broj, oblik i intenzitet apsorpcionog maksimuma nekog IC spektra zavisi od strukture samog molekula i karakterističan je za svako jedinjenje iz tog razloga naziva se „otisakom prsta“ molekula.

i sar., 2007; Fuchs i sar., 2011). Na odnos CH_2/CH_3 grupa utiče pre svega stepen zasićenosti masnih kiselina, pa stoga promena odnosa ovih grupa podrazumeva oksidativno oštećenje lanaca masnih kiselina koje rezultira gubitkom dvostrukih veza, tako da CH grupe prelaze u CH_2 grupe (Savage i sar., 2019).

Svi spektri su korigovani na baznu liniju i normalizovani pre nego što su usrednjeni iz 11 ponavljanja. Drugi izvod vibracija amidnih i estarskih grupa predstavljen je za oblast talasnih brojeva između 1800 cm^{-1} i 1480 cm^{-1} nakon usrednjavanja 15 ponavljanja i nakon normalizacije vektora.

Merenja su izvršena u FTIR spektroskopskoj laboratoriji MIRAS *beamline* na ALBA sinhrotronu (Barselona, Španija). Spektri su snimani u transmissionom režimu primenom infracrvenog mikroskopa povezanog sa spektrometrom FTIR *Hiperion 3000* (Bruker, Etlingen, Nemačka) primenom $36 \times$ *Schwarzschild* objektiva. Spektri su dobijeni korišćenjem živa-kadmijum-telurid detektora koji je hlađen tečnim azotom sa akumulacijom od 128 skeniranja i rezolucijom spektra od 4 cm^{-1} . Otvor blende je postavljen na veličinu $20 \times 20\ \mu\text{m}$.

3.5.3. Elektronska paramagnetna rezonancija (EPR)

EPR (*engl. electron paramagnetic resonance*) je spektroskopska metoda koja se zasniva na detektovanju apsorpcije mikrotalasnog zračenja od strane uzoraka koji imaju paramagnetne osobine i koji se nalaze u homogenom magnetnom polju. EPR se koristi za analizu molekula, atoma i jona kao što su organski i neorganski radikali, prelazni metali i različiti kompleksi prelaznih metala. EPR spektar je u osnovi grafikon apsorpcije mikrotalasa (pri konstantnoj frekvenciji) u funkciji primenjenog magnetnog polja. Snimljeni spektar prikazuje se kao prvi izvod i ima određeni broj linija, intenzitet i širinu. Na izgled EPR spektara kompleksa prelaznih metala utiče broj i tip paramagnetnih centara, priroda koordinovanih liganada, temperatura uzorka, itd. Položaj EPR spektra se opisuje g -vrednošću, koja predstavlja meru uticaja jezgra na hiperfino cepanje EPR linija, dok parametar A predstavlja konstantu hiperfinog cepanja. Do cepanja dolazi usled interakcije spina nesparenih elektrona sa spinovima okolnih jezgara. Tako na primer, jedan nespareni elektron ($S= 1/2$) koji interaguje sa jezgrom azota ($I= 1$), će dati tri EPR linije za slučajeve da se nađe uz jezgro sa svakim od mogućih spinova $-1, 0, \text{ i } 1$. Uobičajena frekvencija X-opsega je $\sim 9,5\text{ GHz}$ i često se koristi za *in vitro* ili *ex vivo* eksperimente na biološkim uzorcima. Na ovoj frekvenciji prodor primenjenog radiofrekventnog zračenja je ograničen i mogu se proučavati samo mali uzorci čiji je prečnik reda veličine mm ili manje, kakve su i mikroalge *C.sorokiniana*. Količina vode u uzorku predstavlja važan limitirajući faktor kod rada u X-opsegu, zbog velikog kapaciteta vode da apsorbuje mikrotalase. Kod uzoraka koji su anizotropni i pod uslovom da sporo rotiraju, uočava se različita g -vrednost duž različitih osa (x, y i z), s tim da se sa g_{\parallel} obeležava vrednost koja se dobija kada je z osa paralelna sa pravcem primenjenog polja. Kod sistema sa aksijalnom simetrijom vrednosti g -faktora za x i y ose obeležava se sa g_{\perp} jer su obe normalne na pravac polja i imaju iste

vrednosti. Merenjem ugaonih promena kod g -faktora dobijaju se informacije o orijentaciji glavnih osa molekula.

U ovoj disertaciji EPR spektroskopija korišćena je za analizu koordinacionog vezivanja jona Cu(II) i Mn(II) (oba jona metala su paramagnetici) i biomolekula ćelijskog zida i mukusa, i određivanje koncentracije redukovanih tiola. Ovi eksperimenti rađeni su na celim ćelijama mikroalgi. Pored ovih analiza, EPR metoda korišćena je za analizu vezivanja jona Cu(II) i Mn(II) od strane izolovanog ćelijskog zida *C. sorokiniana*, kao i ispitivanje njegove antioksidativne aktivnosti.

3.5.3.1. Koordinaciono vezivanje jona Cu(II) i Mn(II) u biomasi

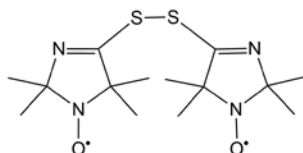
Priprema uzoraka celih ćelija algi za EPR merenja sa vezanim jonima Cu(II) ili Mn(II) rađena su na isti način. Kulture mikroalgi zapremine 150 mL tretirane su 1 mM rastvorom Cu(II) ili Mn(II), 1 h, zatim centrifugirane 5 min na $5000 \times g$, isprane jednom u 50 mL medijuma, nakon čega su uzorci podeljeni u dva dela. Jedan deo je ispran tri puta vodom, a drugi je ispran tri puta 20 mM rastvorom etilendiamintetrasirćetne kiseline (EDTA), da bi se uklonili joni Cu(II), odnosno joni Mn(II), koji su slabo vezani, za površinu ćelije. Supernatant je uklonjen, a ćelije su liofilizovane dok se ne dobije prah.

Važno je napomenuti da kompleksi Cu(II) velike mase (npr. Cu(II) vezan za ćelijski zid) daju slične EPR spektre na sobnoj i niskoj temperaturi. Brzina relaksacije na sobnoj temperaturi je veća ali ne dovoljno da dovede do značajnog proširenja spektra (Hagen, 2008). Cu(I) ima $S=0$ i nema EPR signal. Takođe, EPR omogućava određivanje slabo vezanog Mn(II). Signal jako vezanog Mn(II) se ne detektuje zbog širenja linija do kojeg dolazi zbog anizotropije cepanja linija nultog polja (*zero field splitting anisotropy*) usled spore rotacije, u kombinaciji sa velikim brojem prelaza. Mn(III) i Mn(IV) se ne mogu detektovati korišćenjem standardnog EPR pristupa.

Eksperimenti su rađeni na Bruker EMX Nano EPR spektrometru koji radi na frekvenciji od 9,65 GHz (X-opseg). Uzorci (10–15 mg liofilizovane mase) su pakovani i mereni u kvarcnim kivetama. EPR merenja su izvršena na sobnoj temperaturi na 293 K i sledećim podešavanjima: atenuacija 13 dB, modulaciona amplituda 0,4 mT, modulaciona frekvencija 100 kHz, vreme skeniranja/snimanja uzorka 2 min, broj skeniranja 10. Dobijeni spektri normalizovani su na biomasu. Kako bi se utvrdile g - vrednosti i hiperfino cepanje rađene su simulacije EPR spektara, primenom programa *Hiperfine Spectrum Software* (V.F. Hagen, TU Delft, Holandija) (Hagen, 2008).

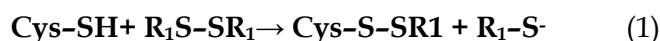
3.5.3.2. Određivanje koncentracije redukovanih tiola

EPR metoda korišćena za određivanje ukupne koncentracije redukovanih tiola u ćelijama mikroalgi zasniva se na upotrebi biradikalnog disulfidnog spinskog obeleživača (R_1S-SR_1) koja je paramagnetni analog Elmanovog reagensa⁸ (Weiner, 2012), gde R predstavlja imidazolin (struktura prikazana na slici 3.4) (Khramtsov i sar., 2004).



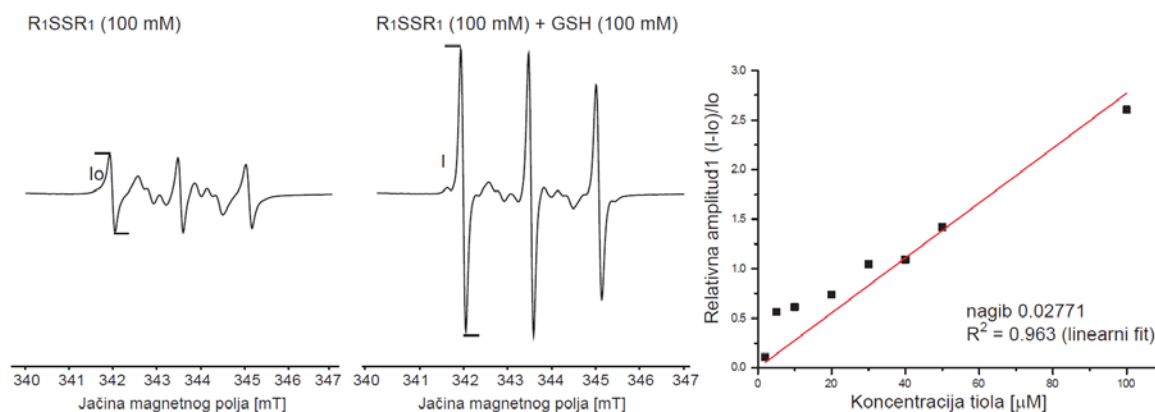
Slika 3.4. Struktura biradikala R_1S-SR_1 koji je korišćen za određivanje koncentracije tiola.

Kao lipofilno jedinjenje, ovaj paramagnetni disulfid lako difunduje kroz ćelijsku membranu i u citoplazmi brzo reaguje sa unutarćelijskim tiolima. Reakcija R_1S-SR_1 biradikala zasniva se na interakciji sa molekulima koji sadrže SH grupe, kao što su cisteinski ostaci u proteinima i glutationu (reakcija 1).



Kao posledica interakcije spinskog obeleživača sa SH grupom dolazi do promene u EPR spektru (Spasojević, 2011). Pri nastajanju monoradikala dolazi do smanjenja intenziteta u EPR spektru koja potiče od biradikala i istovremeno dolazi do povećanja intenziteta pikova koji potiču od monoradikala. Ova promena EPR signala u skladu je sa cepanjem disulfidne veze biradikala i formiranjem dva monoradikala. Promene intenziteta pika EPR spektra pre reakcije R_1S-SR_1 spinskog obeleživača sa tiolnom grupom (I_0) i intenzitet pika nakon reakcije sa tiolnom grupom (I) u odnosu na koncentraciju tiola i biradikala određena je kalibracionom krivom (slika 3.5).

⁸Koristi se za spektrofotometrijsko određivanje tiola.



Slika 3.5. EPR spektar dobijeni primenom R_1S-SR_1 spinske probe: spektar levo: $R_1S-SR_1=100 \mu\text{M}$, u 100 mM kalijum-fosfatnom puferu, pH 7; spektar u sredini: promena signala nakon dodavanja 100 μM GSH. Desno- kalibraciona kriva GSH u opsegu od 10 – 100 μM .

Kalibraciona kriva napravljena je pomoću skupa različitih koncentracija GSH u opsegu od 10 – 100 μM , prema relativnom povećanju amplitude prvog pika EPR signala. Relativni porast redukovanih tiola izračunava se na sledeći način: $(I - I_0) / I_0$, gde je: I – intenzitet pika pre reakcije R_1S-SR_1 spinskog obeleživača sa tiolnom grupom; I – intenzitet pika nakon reakcije sa tiolnom grupom. Ova reakcija odvija se na fiziološkoj pH i sobnoj temperaturi, što čini upotrebu R_1S-SR_1 spinskog obeleživača brzom i pouzdanom metodom za određivanje koncentracije GSH odnosno redukovanih tiola u optički netransparentnim uzorcima (Khramtsovi sar., 2017). Jedna od prednosti EPR spektroskopije koja koristi R_1S-SR_1 spinski obeleživač u odnosu na biohemijske eseje, koji se takođe koriste za određivanje koncentracije redukovanih tiola u biološkim sistemima je izuzetno visoka osetljivost metode koja omogućava merenja na malom broju ćelija (~ 100) ili u uzorcima tkiva male mase. Donja granica detekcije tiola je oko 100 nmol/L, što predstavlja veliku osetljivost uzimajući u obzir da su koncentracije tiola u biološkim sistemima izražene u mmol/L (Spasojević, 2011). Pored toga što je visoko osetljiva, opisana metoda predstavlja brz, lak i pouzdan način merenja redukovanih tiola. Takođe, prilikom pripreme uzoraka za biohemijske eseje, lako može doći do oksidacije GSH u uzorku i samim tim do neadekvatnog određivanja koncentracije redukovanih tiola. Na osnovu navedenih osobina za određivanje promene koncentracije redukovanih tiola u uzorcima mikroalgi *C. sorokiniana* tretiranih jonima Mn(II) spinska proba R_1S-SR_1 bila je metoda izbora.

Uzorci mikroalgi u stacionarnoj fazi tretirani su rastvorom jona Mn(II) pri koncentraciji od 1 mM. Nakon određenog perioda inkubacije iz erlenmajera je uzeto 1 mL uzorka. Uzorci su centrifugirani 5 min na $5000 \times g$, supernatant je odliven, a pelet resuspendovan u 1 mL 100 mM KPP, pH 7. Iz ovako pripremljenog uzorka za EPR merenje uzeto je 48 μL (kako bi broj ćelija u uzorku bio 2×10^6 ćelija, i zatim dodato R_1S-SR_1 spinskog obeleživača (konačne koncentracije 2 mM). Početni rastvor R_1S-SR_1 (10 mM) napravljen je u DMSO. Nakon 10 min inkubacije koncentracija redukovanih tiola merena je na svakih 15 min tokom 2 h i nakon 24 h. Dobijeni rezultati predstavljaju promenu koncentracije redukovanih tiola u vremenu.

EPR spektri dobijeni su na *Bruker EMX Nano* EPR spektrometru koji radi na frekvenciji od 9,65 GHz (X-opseg). Uslovi snimanja bili su: atenuacija 20 dB, modulaciona amplituda 0,1 mT, centar polja 343,5 mT, širina polja 7 mT, vreme skeniranja 1 min.

3.5.3.3. Određivanje koordinacionog okruženja i redoks stanja bakra i mangana u izolatu ćelijskog zida

Izolati ćelijskog zida mikroalgi (0,5 mg) testirani su na sposobnost vezivanja jona Cu(II) i Mn(II). Izolati su stavljeni u 2 mL, 5 mM rastvora CuCl₂ ili MnCl₂, koji je pripreman u 20 mM Hepes puferu (pH 7,5). Uzorci su vorteksovani 10 min u polipropilenskim epruvetama i centrifugirani 10 min na 13000 × g. Supernatant je odvajan za fluorimetrijske testove (odjeljak 3.5.6.), dok je talog odvajan za dalju analizu primenom EPR spektroskopije. Izolati ćelijskog zida sa vezanim jonima metala prikupljeni centrifugiranjem rastvoreni su u 100 µL Hepes pufera. Uzorci su vorteksovani, stavljeni u kvarcne kivete i brzo zamrznuti u tečnom N₂. Spektri rastvora jona Cu(II) i Mn(II) konačne koncentracije 1,5 mM, u Hepes puferu snimljeni su za poređenje kao slepe probe. Takođe je snimljen i spektar 1,5 mM rastvora jona Cu(II) u prisustvu 10 mM hitozana u cilju analize interakcija ovog metala sa gradivnim polimerima ćelijskog zida.

Eksperimenti su rađeni na *Bruker EMX Nano* EPR spektrometru koji radi na frekvenciji od 9,65 GHz (X-opseg). Merenja su izvršena sa Djuarovim sudom napunjenim sa malom količinom tečnog azota radi održavanja konstantne temperature na 77 K. Primenjena su sledeća podešavanja: atenuacija 25 dB, modulaciona amplituda 0,8 mT, modulaciona frekvencija 100 kHz, vreme skeniranja/snimanja uzorka 1 min, broj skeniranja 10.

3.5.3.4. Određivanje antioksidativnog kapaciteta izolovanog ćelijskog zida

Slobodni radikal je vrsta koja sadrži nesparene elektrone i stoga je paramagnetan. Mnoge slobodnoradikalske vrste je teško detektovati zbog veoma kratkog vremena života i zato se koriste spinski hvatači. Ova tehnika se sastoji od upotrebe nitronskih ili nitrozo jedinjenja za "hvatanje" početnog nestabilnog slobodnog radikala čime se formiraju "dugoživeći"- spinski adukti, koji se mogu detektovati na sobnoj temperaturi pomoću konvencionalne EPR opreme. Analizom EPR spektara spin adukata dobijaju se kvalitativne i kvantitativne informacije o radikalima koji su prisutni u datom uzorku.

DEPMPO (5-dietoksifosforil-5-metil-1-pirolin-N-oksidi), je fosforilisani analog široko korišćenog DMPO spinskog hvatača, koji proizvodi spin adukte sa dužim životnim vekom. Spin adukti DEPMPO obično imaju veoma karakteristične EPR spektre, što omogućava nedvosmisleni identifikaciju "uhvaćenih" radikala (Frejville i sar., 1995).

U ovoj disertaciji antioksidativna aktivnost ćelijskog zida analizirana je EPR metodom tehnikom spregnutom sa DEPMPO spinskim hvatačem finalne koncentracije 5 mM. Izolati ćelijskog zida (0,5 mg rastvorenog ćelijskog zida u 50 mL dejonizovane vode) analizirani su na sposobnost uklanjanja HO• radikala.

Ovaj eksperiment rađen je upotrebom Fentonove reakcije, HO•- generišućeg sistema: Fe(II) (1 mM) + H₂O₂ (3 mM). U eksperimentima je korišćena dejonizovana ultračista voda od 18 MΩ, pH uzoraka je ~ 6,5. Spektri su snimljeni nakon dvominutne inkubacije na sobnoj temperaturi, primenom *Bruker EMX Nano* EPR spektrometra koji radi na frekvenciji od 9,65 GHz (X-opseg) i podešen je na sledeći način: atenuacija 25 dB, modulaciona amplituda 0,2 mT, amplituda frekvencije 100 kHz, vreme skeniranja 2 min, broj skeniranja 10. Antioksidativni kapacitet uklanjanja HO• izračunat je korišćenjem amplitude (A) DEPMPO/OH signala prema sledećoj jednačini (3) (Spasojević i sar., 2009):

$$\text{Antioksidativni kapacitet} = (A_{\text{Fenton}} - A_{\text{Fenton} + \text{ćelijski zid}}) / A_{\text{Fenton}} \quad (3)$$

3.5.4. UV/Vis spektroskopija

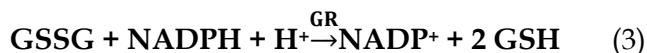
UV/Vis spektroskopija zasniva se na apsorpciji elektromagnetnog zračenja u UV i vidljivoj oblasti (200 do 800 nm) od strane uzorka, pri čemu dolazi do elektronskih energetskih prelaza. U okviru pomenutog opsega elektromagnetnog spektra mogu se razlikovati dve oblasti: ultraljubičasta (koja obuhvata opseg od 200 nm do 400 nm) i vidljiva oblast (koja obuhvata oblast od 400 nm do 800 nm). Primenom metode UV/Vis spektroskopije i odgovarajućih eseja određivane su koncentracije ukupnog glutaciona u ćelijama mikroalgi izloženih povećanim koncentracijama jona Mn(II) i koncentracije jona Mn(II) vezanih za izolovane frakcije ćelijskog zida.

3.5.4.1. Određivanje koncentracije ukupnog glutaciona (tGSH)

Koncentracija tGSH koji predstavlja redukovani i oksidovani glutation (GSH + GSSG) u ćeliji mikroalgi određena je spektrofotometrijskom metodom.

Metoda se zasniva na kinetičkoj analizi, odnosno merenju brzine oksidacije GSH u reakciji sa 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoevom kiselinom) (DTNB), pri čemu nastaje 2-nitro-5-tiobenzoeva kiselina (TNB) i oksidovani glutation (GSSG). Nastali oksidovani glutation redukuje se u enzimskoj reakciji katalizovanoj glutation-reduktazom (GR) uz pomoć NADPH kao donora elektrona (kako je predstavljeno u reakcijama 2 i 3). Brzina promene apsorpcije linearno je proporcionalna koncentraciji tGSH (Rahman i sar., 2006). Porast

apsorbancije uzrokovan nastankom promene intenziteta boje TNB proporcionalan je koncentraciji ukupnog GSH u uzorku. Protokoli za ekstrakciju i određivanje koncentracije tGSH predstavljeni su u daljem tekstu.



Pufer za ekstrakciju (pH= 2) (Rijstenbil i sar., 1998):

- 5% sulfosalicilna kiselina (SSA)
- 6,3 mM DTPA

SSA koristi se za taloženje proteina, dok se DTPA (dietilentriamin pentanska kiselina) koristi kao helator jona metala.

Priprema uzoraka vršena je kao za cikličnu voltometriju (odjeljak 4.5.5). Za određivanje koncentracije ukupnog glutationa (tGSH) uzeto je 5 mg liofilizovanih uzoraka mikroalgi smrznutih u tečnom azotu. U uzorke je dodato 250 μL ekstrakcionog pufera kako bi se tioli zadržali u redukovanom obliku (Rijstenbil i sar., 1998). Homogenizacija na mlinu (*RETSCH Mixer Mill MM 400, Retsch, Dizeldorf, Nemačka*) sa kuglicama od nerđajućeg čelika prečnika 5 mm rađena je u četiri ciklusa na frekvenciji od 30 Hz, u trajanju od po 15 s. Između svakog ciklusa homogenizacije uzorci su dodatno zamrzavani u tečnom azotu. Nakon inkubacije od 10 min na ledu uzorci su centrifugirani na 0 °C, 20 min na 12000 \times g, kako bi se uklonili ostaci ćelija algi. Dobijeni supernatant je izdvojen u nove mikrotube i korišćen u daljem eseju za određivanje tGSH.

Za merenje koncentracije tGSH reagensi su pripremani prema protokolu (Rahman i sar., 2006). Svi reagensi pripremani su u KPP-u.

Reagensi potrebni za esej tGSH:

- 100 mM KPP, pH 7,5 + 5 mM EDTA;
- 5 μM Ellman-ov reagens (DTNB);
- glutation reduktaza (GR) (250 U/mL);
- 2,3 μM β -NADPH;
- GSH standard je koncentracije 1 mg/mL KPP od koga se pravi 100 puta razblaženi radni rastvor (RR) koncentracije 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Koncentracija tGSH dobijena je merenjem apsorbance na $\lambda = 412 \text{ nm}$ na *TECAN Infinite 200 PRO* (*Tecan, Menedorf, Švajcarska*) u mikrotitar pločama. Zapremine reagenasa bile su: za slepu probu (20 μL KPP + 120 μL DTNB + GR u odnosu 1:1 (V:V)), za uzorke (20 μL uzorka + 120 μL DTNB + GR u odnosu 1:1 (V:V)), nakon inkubacije od 30 s u mraku dodato je 60 μL β -NADPH. Merenje je rađeno na svakih 30 s u toku 2 min. Dobijeni rezultati izraženi su u nmol tGSH/g suve mase uzorka.

3.5.4.2. Kapacitet vezivanja jona Mn(II) za izolovan ćelijski zid mikroalgi

Ispitivanje kapaciteta vezivanja jona Mn(II) za izolovane frakcije ćelijskog zida mikroalgi rađeno je primenom kolorimetrijskog testa. Test se zasniva na formiranju kompleksa formaldotsim–mangan, koji ima maksimum apsorpcije na talasnoj dužini od 450 nm. Smanjenje intenziteta apsorpcije u odnosu na uzorak bez ćelijskog zida daje podatke o kapacitetu istog za vezivanje mangana.

Koncentracija jona Mn(II) određena je sa hidroksilamin hidrohloridom i formaldehidom (Goto i sar., 1962). U ovom eseju korišćeno je 0,5 mg izolovanog ćelijskog zida mikroalgi i koncentracija rastvora MnCl₂ od 5 mM. Izolovan ćelijski zid resuspendovan je u 1800 µL 20 mM HEPES puferu (pH 7,5), a zatim dodat rastvor MnCl₂ finalne koncentracije 5 mM nakon čega su uzorci vorteksovani 10 min i centrifugirani 10 min na 13000 × g. Nakon centrifugiranja, kako bi se odredila koncentracija vezanog mangana supernatant je pomešan sa 10 mL 4% rastvora hidroksilamin hidrohlorida, a zatim je dodat formaldehid u konačnoj koncentraciji od 0,2 mM. Na kraju je dodato 25 µL amonijaka kako bi se ubrzalo formiranje kompleksa formaldotsim–mangan (Brewer i Spencer, 1971). Smanjenje koncentracije metala u puferu korišćeno je za izračunavanje vezivnog kapaciteta ćelijskog zida mikroalgi. Rastvori za kalibracione krive pripremani su sekvencijalnim razblaženjem koncentrovanog rastvora u opsegu od 5 do 100 µM Mn(II). Uzorci su razblaženi pre merenja kako bi odgovarali opsegu kalibracione krive. Finalna zapremina uzoraka uvek je bila 1 mL u kiveti dimenzija 1 cm × 1 cm × 5 cm. Apsorbanca je očitana na talasnoj dužini od 450 nm (2501 PC Shimadzu spektrofotometar) na kojoj kompleks formaldotsim–mangan ima maksimum apsorpcije. Kako je boja stabilna 30 min, uzorci su uvek sveže pripremani i snimani par minuta nakon pripreme. Za izračunavanje vezivnog kapaciteta ćelijskog zida analizirano je smanjenje koncentracije jona metala u puferu. Vrednosti su predstavljene kao µg vezanog metala po mg izolata ćelijskog zida.

3.5.5. Ciklična voltametrija

Ciklična voltametrija je elektrohemijaska tehnika koja se koristi za proučavanje redukcionih i oksidacionih karakteristika različitih molekulskih i jonskih vrsta (Elgrishi i sar., 2017). U ovoj doktorskoj disertaciji ciklična voltametrija je upotrebljena za ispitivanje redoks karakteristika jona mangana koje su ćelije alge akumulirale.

Uzorci mikroalgi zapremine 150 mL tretirani su rastvorom jona Mn(II) u ranoj stacionarnoj fazi u koncentraciji od 1 mM i 5 mM sa periodom inkubacije od 1 h, 24 h i 48 h. Nakon tretmana uzorci su isprani tri puta sa dejonizovanom vodom 5 min na 5000 × g, kako bi se uklonili joni mangana koji nisu vezani za ćelijski zid. Nakon toga uzorci su liofilizovani dok se ne dobije prah, a zatim homogenizovani u avanu sa tučkom kako bi se razbio ćelijski zid mikroalgi. Homogenizovani uzorci (0,5 mg biomase/mL) su neposredno

pre početka merenja resuspendovani u 5% azotnoj kiselini (V/V) i vorteksovani par sekundi. Standardi rastvora mangana različitih oksidacionih stanja (MnCl_2 , MnO_2 , Mn_2O_3 i KMnO_4) pripremani su u 5% azotnoj kiselini.

Merenja su vršena primenom potenciostata/galvanostata CHI 760b (CH Instruments, Inc, Austin, TKS, SAD). Čelije u voltometrijskim eksperimentima sadržale su tri elektrode: platinska elektroda model CHI 102, (CH Instruments, Bee Cave, TX, SAD), referentna elektroda -Ag/AgCl elektroda (3 M KCl), model CHI 111, i pomoćna elektroda - platinska elektroda model CHI 115, (CH Instruments, Bee Cave, TX, SAD). Spektri su snimani na sobnoj temperaturi, radni uslovi za potencijal bili su: početni napon, 0 V; konačni napon, 1,3 V; brzina skeniranja, 0,05 V/s. Sva merenja su rađena na sobnoj temperature. Merenja su rađena u laboratoriji za analitičku hemiju na Hemijskom fakultetu, Univerzitet u Beogradu.

3.5.6. Fluorescentna spektroskopija

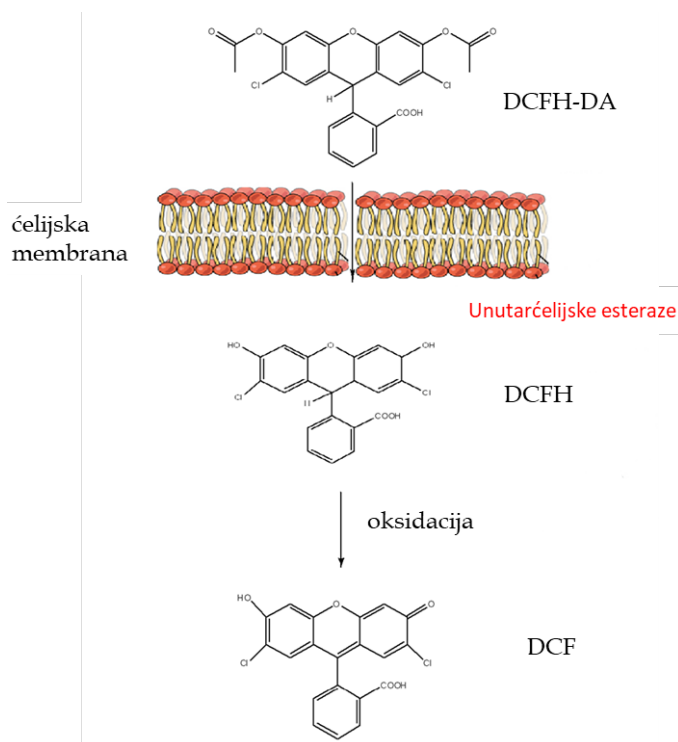
Fluorescentna spektroskopija je analitička metoda koja se može primeniti na različite biološke uzorke koji poseduju fluorofore ili su obeleženi fluorescentnim probama. Tehnikom fluorescentne spektroskopije praćenja fluorescencije u stabilnom stanju, dobija se grafik zavisnosti inteziteta fluorescencije u odnosu na pobudnu i emisionu talasnu dužinu (iz UV i vidljivog dela spektra) karakteristične za dati analit. Ova spektroskopska metoda je jako osetljiva, iz razloga što do emitovanja fluorescencije dolazi pri niskom koncentracijama (50 puta manje nego kod spektrofotometrijske metode). Za biološke uzorke često se upotrebljavaju različite fluorescentne probe koje vezivanjem za ciljna mesta u uzorku omogućavaju detekciju molekula od interesa.

U ovoj doktorskoj disertaciji fluorescentna spektroskopija korišćena je za određivanje parametara oksidativnog stresa kod mikroalgi tretiranih jonima Mn(II) i za određivanje kapaciteta vezivanja jona Cu(II) za izolovane frakcije ćelijskog zida primenom odgovarajućih fluorescentnih proba.

3.5.6.1. Određivanje porasta ROS kao parametra oksidativnog stresa

Za praćenje unutarćelijske akumulacije ROS, kao parametra oksidativnog stresa, u algama nakon izlaganja povećanim koncentracijama metala korišćena je fluorescentna proba 2',7'-dihlorodihidrofluorescein diacetat (DCFH-DA). Ćelijska membrana permeabilna je za ovu fluorescentnu probu. Nakon prolaska kroz ćelijsku membranu, esterase koje se nalaze u citoplazmi deacetiluju DCFH-DA na 2',7'-dihlorodihidrofluorescein (DCFH). Ovaj nefluorescentni proizvod u citoplazmi se oksiduje u prisustvu unutarćelijskih ROS, dajući fluorescentni proizvod 2',7'-dihlorofluorescein

(DCF) (slika 3.6). Pokazalo se da je DCFH fluorescentna proba dobar alat za detekciju ROS (Imrich i sar., 1999).



Slika 3.6. Detekcija ROS primenom DCFH-DA fluorescentne probe. DCFH-DA se unutarćelijskim esterazama cepa na DCFH, zatim dolazi do oksidacije posredstvom ROS do visoko fluorescentnog molekula DCF.

Uzorci mikroalgi zapremine 50 mL tretirani su 1 mM rastvorom Mn(II). Za merenje parametra oksidacionog stresa pravljeno je desetostruko razblaženje uzorka (finalna zapremina 1 mL) kako bi optička gustina bila oko 0,5. U svim vremenskim tačkama koje su merene tokom eksperimenta pravljeno je isto razblaženje uzorka iz erlenmajera početne zapremine 50 mL. Priprema uzoraka vršena je prema sledećem protokolu: uzorci mikroalgisu 2 puta isprani dejonizovanom vodom centrifugiranjem 5 min na $5000 \times g$. U ovako pripremljene uzorke dodato je 10 μL DCFH-DA (Sigma) (finalne koncentracije 20 μM) i dobro promešano. Koncentrovani rastvor DCFH-DA pripremljen je kao 20 mM rastvor u 96% EtOH i čuvan na 4 °C. Nakon 20 min inkubacije, na sobnoj temperaturi u mraku, 200 μL uzorka naneto je na mikrotitar ploču. Kao negativna kontrola korišćeni su uzorci mikroalgi u koje nije dodat fluorescentni obeleživač, kako bi se odredio intenzitet autofluorescencije. Intenzitet fluorescencije meren je na talasnim dužinama: ekscitacija na $\lambda = 485 \text{ nm}$, emisija na $\lambda = 530 \text{ nm}$. Snimanja su rađena na *TECAN Infinite 200 PRO* (Tecan, Manedorf, Švajcarska) na 15, 30, 45, 60, 90, 120 min i nakon 24 h.

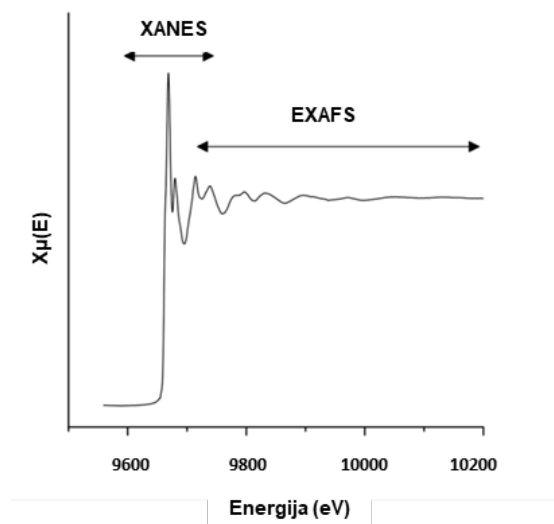
3.5.6.2. Kapacitet vezivanja jona Cu(II) za izolovan ćelijski zid mikroalgi

Primenom fluorescentne spektroskopije određivana je koncentracija jona Cu(II) u supernatantu upotrebom Fura-2, fluorescentne probe. Fura-2 je fluorofora koja može da formira kompleks sa dvovalentnim jonima metala kao što su joni Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II) i Cd(II) što dovodi do smanjenja (gašenja) fluorescencije, dok pri interakciji sa jonima Ca(II) dolazi do porasta fluorescencije, kako je prethodno opisano (McCall i Fierke, 2000).

Izolati ćelijskog zida mikroalgi testirani su na sposobnost vezivanja jona Cu(II). Izolati (0,5 mg) su stavljani u 2 mL 5 mM rastvora CuCl₂, koji je pripreman u 20 mM Hepes puferu (pH 7,5). Uzorci su vorteksovani 10 min u polipropilenskim epruvetama i centrifugirani na 13000 × g tokom 10 min. Supernatant je odvajan za fluorimetrijske testove, dok je talog odvajan za dalju analizu primenom EPR spektroskopije. Merenja su rađena na fluorimetru FluoroLog 3 (Horiba, Kjoto, Japan), tehnikom praćenja fluorescencije stabilnog stanja. Za snimanje spektara korišćena je ksenonska lampa snage 450 mW, a radni parametri su bili sledeći: ekscitacija na 340 nm, maksimum emisije očitavan je na 510 nm, (metoda *Single Point Acquisition*), ulazni i izlazni otvori na monohromatorima su podešeni na 5 nm. Spektri su snimani sa signalom u odnosu signal/referentni signal. Za obradu podataka korišćen je program *DataMax* verzija 2.20.

3.5.7. XAFS- spektroskopija

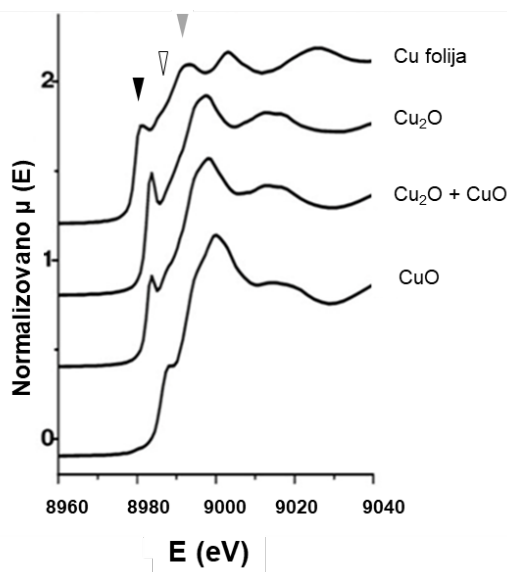
XAFS je apsorpciona spektroskopska tehnika koja koristi sinhrotron kao izvor zračenja za određivanje fizičko-hemijskih, elektronskih i strukturnih karakteristika nekog atoma u njegovom koordinacionom okruženju. Glavna prednost ove metode je što se može primeniti na sve vrste uzoraka, pa i na tečne i vrlo razblažene uzorke. Iz tog razloga je od posebnog značaja za nekristalne biološke materijale kakvi su uzorci mikroalgi. Merenja se mogu vršiti *in situ*, bez posebne obrade uzoraka koja može promeniti njihovu hemijsku strukturu (Ortega i sar., 2012). Primenom XAFS spektroskopije analizirana je interakcija fotona sa uzorkom merenjem energetski zavisnog koeficijenta apsorpcije X-zraka. Kada uzorak interaguje sa X-zracima, atom u svom osnovnom stanju apsorbuje X-zrake i dolazi do izbijanja elektrona putem fotoelektričnog efekta (tzv. fotoelektrona) (Koningsberger i sar., 2000). U zavisnosti sa kojeg se elektronskog nivoa elektron izbija, razlikuju se K, L, M, itd. elektronski prelazi, odnosno K- L- ili M- granice (*edge*), pri čemu K-granica odgovara izbacivanju elektrona iz 1s nivoa. U XAFS spektroskopiji prati se promena koeficijenta apsorpcije X-zraka (μ) u zavisnosti od energije u blizini apsorpcione granice koja se ispituje. Na slici 3.7. prikazani su XAFS spektri koji su podeljeni na dva energetska područja: XANES (*engl. X - ray absorption near edge structure*) (oblast od 30 do 50 eV od apsorpcione granice) i EXAFS (*engl. Extended X - ray absorption fine structure*) (od 50 do 1000 eV od apsorpcione granice).



Slika 3.7. Normalizovani K-egde apsorpcioni spektri bakra koji predstavljaju XANES, EXAFS regione i predapsorpcionu granicu (Luxton i sar., 2013).

3.5.7.1. Određivanje simetrije kompleksa, oksidacionog stanja i koordinacione gemetrije jona bakra u biomasi

XANES spektari predstavljaju jedinstveni „otisak prsta“ veze koja se ostvaruje između metala i liganda (slika 3.8).



Slika 3.8. Normalizovani XANES spektri standarda bakra. Siva strelica označava najintenzivniji pik koji se naziva „bela linija“. Bela strelica označava apsorpcionu granicu (1s-4p prelaz), crna strelica označava pred-apsorpcioni pik (1s-3d prelaz) (Gaur i sar., 2009).

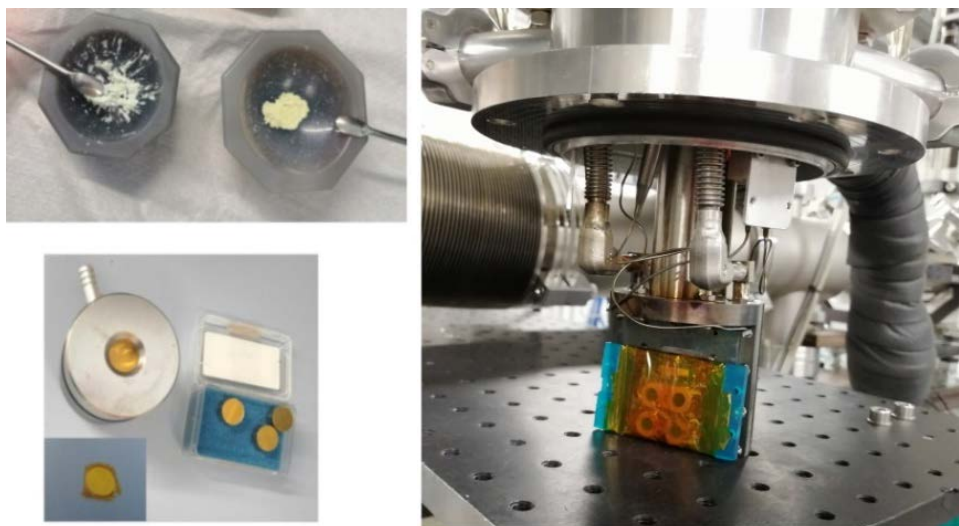
Najizraženiji pik spektra, predstavlja najveću vrednost apsorpcionog koeficijenta i naziva se „bela linija“ (*engl. white line*), zbog bele linije koja se kao rezultat pojavljivala na fotografskim pločama u prvim eksperimentima (siva strelica). Ona se uvek nalazi na nešto većim energijama od energije potrebne za izbijanje elektrona. Poređenjem spektara standarda bakra u kojima je poznato oksidaciono stanje i simetriji spektra uzorka dobija se uvid u prirodu veze uzorka. Nagib čija sredina aproksimativno predstavlja energiju 1s-4p prelaza naziva se apsorpciona granica (bela strelica), dok se pik koji predstavlja 1s-3d prelaze naziva pred apsorpcioni pik (crna strelica). XANES spektri omogućavaju određivanje oksidacionog stanja metala (pomeranjem apsorpcione granice ka većim energijama) i lokalne geometrije metala (izmenama u strukturi samog spektra u okolini apsorpcione granice). Pomeranje granice potiče od činjenice da dolazi do porasta energije jonizacije sa porastom oksidacionog stanja, usled porasta elektrostatičkog privlačenja jezgra i elektrona, indukovano porastom efektivnog pozitivnog neelektrisanja jezgra (Gaur i sar., 2013). Kod mnogih elemenata pomoću ovih prelaza možemo da odredimo i simetriju.

EXAFS spektri daju detaljniji uvid u strukturalna svojstva atoma koji se ispituju. Pomoću ove metode mogu se dobiti informacije o atomima - ligandima tj. njihova identifikacija i odrediti rastojanje od absorbera (*“scatter”* atomi) kao i njihov prostorni raspored (Gaur i sar., 2013). Podaci dobijeni za EXAFS spektar analizirani su pomoću računarskih softverskih paketa ATHENA i ARTEMIS (Ravel i Newville, 2005). EXAFS spektar zasniva se na kompjuterskoj simulaciji spektra konstruisanog na osnovu predviđenog model sistema podešavanjem parametara u EXAFS jednačini tako da fitovani spektar što bolje odgovara eksperimentalnom. Prema podacima modelovanja spektara u ARTEMIS softverskom paketu sa parametrima kristalnih rešetki jedinjenja čiji podaci su dobijeni u FEFF softverskom programu može se proceniti udaljenost najbližih liganada (Gaur i Shrivastava, 2012).

U ovoj doktorskoj disertaciji XAFS spektroskopija korišćena je za ispitivanje interakcija jona Cu(II) sa strukturnim jedinicama polimera ćelijskog zida i mukusa u liofilizovanoj biomasi mikroalgi *C. sorokiniana* kako bi se odredila simetrija kompleksa, oksidaciono stanje i koordinaciona geometrija vezanog jona bakra.

Alikvoti mikroalgi zapremine 150 mL, netretirane (kontrolne) ili izložene 1 mM jonima Cu(II) tokom 1 h, centrifugirane su 5 min na $5000 \times g$ i isprane trupa sa 50 mL 3N-BBM medijuma. Uzorci su liofilizovani dok se ne dobije prah. Zatim su ručnom mehaničkom mašinom za presovanje svi uzorci ispresovani u tablete koje se pakuju na nosače za dalja merenja. XANES spektri izmereni su za standarde jedinjenja bakra - CuO, Cu₂O i metalni bakar. XANES i EXAFS eksperimenti izvedeni su primenom snopa BL22 na ALBA sinhrotronu. Korišćen je fokusirani zrak veličine 500×500 mm. Spektri su dobijeni u fluorescentnom režimu u energetsom intervalu od 8870 do 9600 eV sa rezolucijom koraka energije od 0,2 eV. Uzorci standarda bakra pripremljeni su mešanjem male količine jedinjenja sa bor-nitridom. Spektri su dobijeni u transmissionom modu. Analiza XANES spektara urađena je u opsegu od 8900 do 9100 eV pomoću softverskog paketa ATHENA. U analizi su uzete prosečne vrednosti podataka iz tri uzastopna merenja i šest kanala detektora. Spektri su fitovani polinomom trećeg reda. Kao početna vrednost energije praga

fotoelektrona (E_0)⁹ izabrana je prva tačka pika u XANES spektru folije bakra na 8979,5 eV. Precizne energije prelaza elektrona indukovanih apsorpcijom rendgenskih zraka očitavane su sa derivativnih normalizovanih spektara biomase mikroalgi i spektara standarda bakra. Analiza EXAFS spektra izvršena je pomoću softverskog paketa ARTEMIS. Podaci za k su pomnoženi sa Hanovom prozorskom funkcijom u intervalu od 3 do 10,4 Å⁻¹ zbog glatkog prelaza sa nenultih na nulte vrednosti prozorske funkcije, dok se množenjem $\chi(k)$ sa k^3 faktorom¹⁰ postiže relativna konstantnost u amplitudi oscilacija u k prostoru. Furijeova transformacija u prostornom domenu predstavljena je u opsegu od 1 – 4,8 Å. Na taj način dobijena je udaljenost između apsorbera i liganda (R) sa odstupanjem manjim od 0,1 Å i vrednosti *Debye-Waller*-ovog faktora ($\Delta\sigma^2$) ispod 0,03 Å², redukcionni faktor bio je između 0,7-1. Značaj dobijanja podataka iz ove oblasti je utoliko veći, s obzirom na to da je analiza ovog dela spektra u razblaženim biološkim uzorcima sa često nepravilnom kristalnom strukturom jedinjenja, neretko neizvodljiva zbog utapanja značajnih signala u šum spektra. Priprema uzorka prikazana je na slici 3.9.



Slika 3.9. Priprema uzorka mikroalgi *C. sorokiniana* za merenje na ALBA sinhrotronu, Barselona, Španija.

3.6. Statistička obrada rezultata

Statistička analiza je izvođena pomoću neparametarskog dvosmernog *Mann-Witney* U-testa na 5% nivoa značajnosti ($p \leq 0.05$) koristeći Sigma Stat program V2 (*Aspire Software International*, Ashburn, SAD). Razlike između varijansi sa više od dve promenljive u

⁹ Energija (E_0) koja predstavlja vrednost *edge* energije u modelu, ne sme odstupati više od 3 eV u odnosu na energiju datu u eksperimentalnom spektru za taj molekul.

¹⁰ Množenje ima za cilj da kod velikih vrednosti za k - funkciju, amplituda signala bude veća. Značajno je samo kod dobrih spektara, jer sa porastom amplitude raste i šum.

okviru jedne grupe ispitivane su ANOVA testom uz Dankanov *post hoc* test. Svi eksperimenti su rađeni u najmanje tri ponavljanja. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška (SE, *standard error*).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

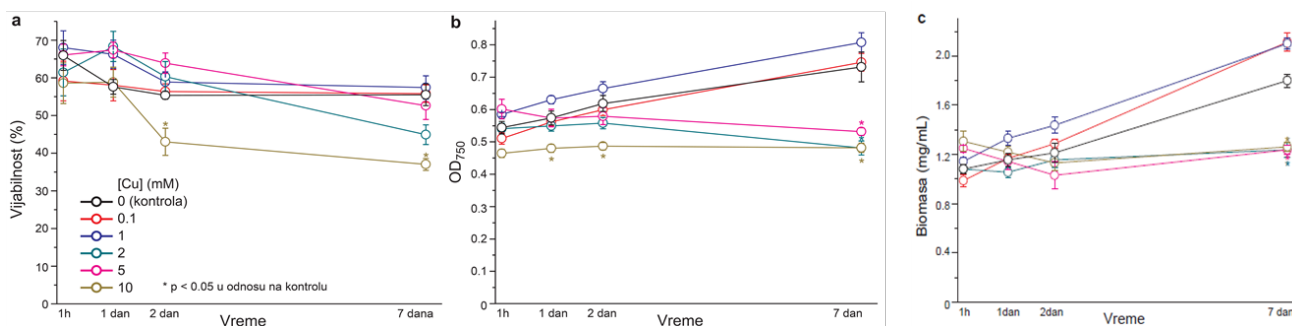
U ovom odeljku predstavljani su dobijeni rezultati i njihova diskusija. Redosled prikaza uticaja abiotičkih stresogenih faktora (povećane koncentracije jona Cu(II), jona Mn(II) i jonizujućeg X-zračenja) u skladu je sa izloženim ciljevima rada i eksperimentalnim delom ove disertacije. Efekti su ispitivani korišćenjem različitih analitičkih metoda adekvatnih za određivanje strukturnih promena, određivanja oksidacionog stanja i koordinativog okruženja jona metala, kapaciteta ćelijskog zida za vezivanje jona metala i ispitivanja antioksidativne aktivnosti.

4.1. Ispitivanje uticaja Cu(II) jona na mikroalgu *C.sorokiniana*

Ovaj deo istraživanja odnosi se na ispitivanje interakcija jona bakra sa mikroalgom *C. sorokiniana* u smislu strukturnih i hemijskih promena do kojih dolazi kada su alge izložene povišenim, ali subletalnim koncentracijama jona Cu(II), i načina na koje joni bakra interaguju sa ćelijama mikroalgi. U prvom koraku određena je subletalna koncentracija jona Cu(II) koja je dalje korišćena u svim eksperimentima. Zatim su ispitivane strukturne i hemijske promene u biomasi mikroalgi. U poslednjoj fazi ispitivanja određeno je oksidaciono stanje jona bakra, geometrija kompleksa i ligandi za koje se jon bakra koordinuje.

4.1.1. Određivanje subletalne koncentracije jona Cu(II)

Na slici 4.1. prikazani su rezultati analize vijabilnosti, optičke gustine (OD_{750}) i biomase mikroalgi tretiranih rastvorom jona Cu(II) različitih koncentracija. Merenja su rađena u toku sedam dana u cilju određivanja subletalne doze jona Cu(II).



Slika 4.1. Promene u vijabilnosti, optičkoj gustini i biomasi mikroalge *C. sorokiniana* u ranoj stacionarnoj fazi rasta, tokom 7 dana izlaganja različitim koncentracijama jona Cu(II): (a) vijabilnost; (b) optička gustina (OD₇₅₀); (c) biomasa. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SE, (n= 4).

Uočeno je da koncentracije jona Cu(II) od 1 mM i manje nisu imale uticaj na vijabilnost i rast kulture (promena OD i biomase) u periodu od 7 dana u poređenju sa netretiranim, kontrolnim, uzorcima mikroalgi (slika 4.1). Veće koncentracije jona Cu(II), od 2 mM, 5 mM i 10 mM su pokazale statistički značajne efekte na OD i biomasu, dok je najveća koncentracija imala i značajan uticaj na vijabilnost. U tom smislu, može se reći da su koncentracije od 2 mM i 5 mM imale algostatički efekat (zaustavlja rast), dok je 10 mM imalo algicidni efekat (letalna doza). U svim daljim eksperimentima primenjivana je koncentracije jona Cu(II) od 1 mM, koja je bila na gornjoj granici netoksičnosti za kulturu *C. sorokiniana*, kako bi se sprečila smrtnost ćelija mikroalgi.

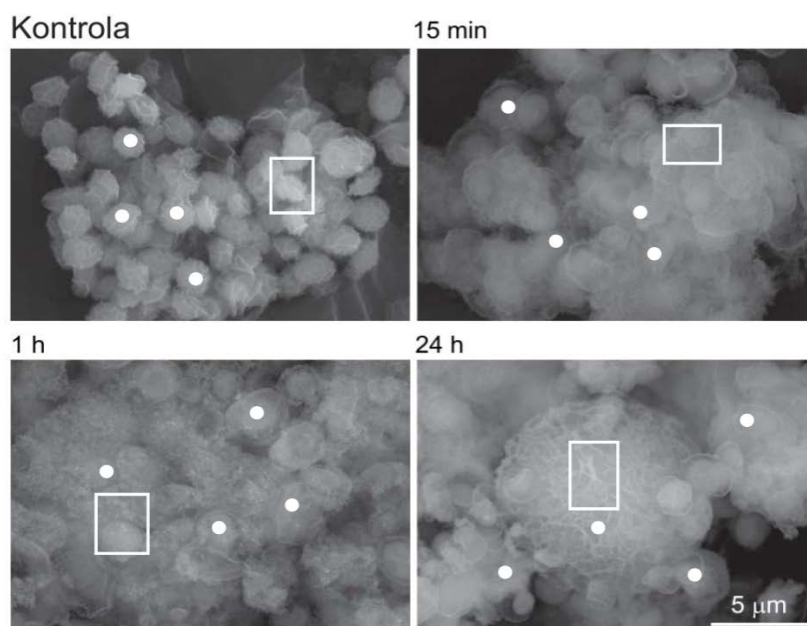
Važno je napomenuti da koncentracije jona bakra koje izazivaju toksične efekte u kulturama mikroalgi zavise od pH, prisustva različitih liganda u medijumu, ali i od gustine i starosti ćelija (Franklin i sar., 2002). Na primer, koncentracije bakra koje su pokazale toksične efekte na mikroalgu *C. vulgaris*, koja je bliska srodnica *C. sorokiniana* u medijumu za gajenje mikroalgi sa oznakom BG-11, su pet puta manje u odnosu na ovde utvrđene (Rugnini i sar., 2017). Jednostavno objašnjenje može ležati u tome što taj medijum sadrži značajno manje koncentracije bakar-vezujućeg agensa EDTA (Horner, 2006) i u tome što su u studiji sa *C. vulgaris* bile izložene jonima bakra u ekspanzijskoj fazi kada se aktivno dele. Kod drugih medijuma treba uzeti u obzir i koncentracije nekih drugih potencijalnih liganda, kao što su ortofosfati, nitrati, citrati i dr. Dalje, pri velikoj gustini ćelija, sam metabolizam algi može dovesti do promene pH vrednosti medijuma usled povećane potrošnje CO₂ što dovodi do brojnih hemijskih promena i može da utiče na rastvorljivost bakra (Nyholm i Källqvist, 1989), a pored toga, smanjuje se koncentracija raspoloživog bakra po ćeliji. Iz ovih razloga, kako bismo imali konstantne, ponovljive efekte abiotičkog stresa, stresogeni faktori aplicirani su uvek u 20. danu kada *C. sorokiniana* dostiže stacionarnu fazu, dok je, kako je već pomenuto, početna koncentracija mikroalgi uvek bila 5×10^5 ćelija/mL.

4.1.2. Ispitivanje strukturnih i hemijskih promena u biomasi mikroalgi u prisustvu povećane koncentracije jona Cu(II)

Rod *Chlorella* pokazuje visoku toleranciju na povišene koncentracije metala, što je osnova njihovog izuzetnog značaja za životnu sredinu i biotehnologiju (Krichen i sar., 2019). Deo adaptivnog odgovora može uključivati značajne strukturne promene na nivou ćelijskog zida i lipida, kao i aktivno menjanje okruženja ćelije kroz proizvodnju i oslobađanje mukusa. Strukturne promene koje nastaju u *C. sorokiniana* pod uticajem povišene koncentracije jona Cu(II) ispitivane su primenom SEM mikroskopije sa EDS metodom i SR-FTIR spektroskopije.

4.1.2.1. Analiza SEM mikroskopijom i EDS metodom

Na slici 4.2. prikazane su SEM mikrografije uzoraka mikroalge *C. sorokiniana* tretiranih rastvorom jona Cu(II) tokom različitog vremena inkubacije, kao i netretiranih uzoraka (kontrola).



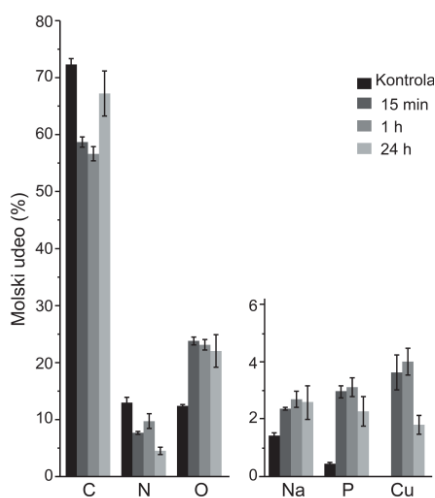
Slika 4.2. SEM mikrografije uzoraka netretiranih ćelija mikroalge *C. sorokiniana* (kontrola) i uzoraka tretiranih jonima Cu(II) koncentracije 1 mM tokom različitih vremena inkubacije. Beli krugovi i uokvireni delovi označavaju područja u kojima su prikupljeni EDS podaci. Skala= 5 μm, n= 4, uveličanje 8000 puta.

SEM mikroskopija korišćena je za prvi, vizuelni, nivo analize efekata jona Cu(II) na morfologiju ćelija mikroalgi. Poređenjem mikrografija uzoraka mikroalgi koje su tretirane Cu(II) jonima tokom različitih vremenskih intervala (slika 4.2), može se zaključiti da se

površina uzoraka mikroalgi nakon tretmana jonima Cu(II) znatno izmenila. U kontrolnim uzorcima pojedinačne ćelije mikroalgi jasno su vidljive, dok se utretiranim uzorcima može primetiti mukus koji oblaže pojedinačne ćelije kao i amorfni matriks između ćelija. Oslobađanje mukusa započeto je u roku od 15 min nakon izlaganja ćelija mikroalgi jonima Cu(II) i dalje se akumuliralo tokom 24 h. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da postoji brz adaptivni odgovor mikroalge *C. sorokiniana* na prisustvo 1 mM jona Cu(II), u smislu formiranja ekstracelularne barijere.

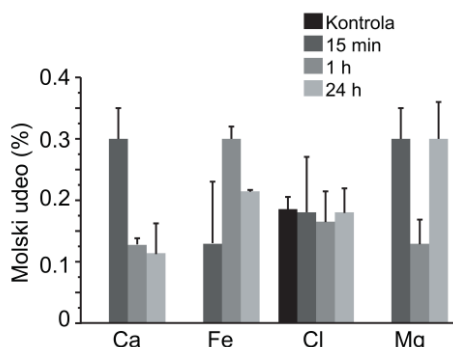
Od ranije je poznato da bakar indukuje morfološke promene na mikroalgama (Melegari i sar., 2013), koje su blisko povezane sa toksičnošću, koncentracijom i vremenom izlaganja jonima metala. Ove promene mogu se koristiti kao indikator za praćenje nivoa toksičnosti teških metala u vodenim ekosistemima (Lupi i sar., 1998; Hee i sar., 2021). Kao jedan od odgovora na abiotički stres, mikroalge mogu da “pojačaju” svoju odbranu oslobađanjem mukusa, složene amorfne, lepljive sluzi u koju su ćelije uronjene i koja može izmeniti njenu spoljašnju hemijsku sredinu (Watanabe i sar., 2006; Naveed i sar., 2019). Sposobnost mikroalgi da vežu jone metala i redukuju njihovu toksičnost predstavlja važan adaptivni mehanizam. S obzirom da se mikroalge u prirodi često suočavaju sa deficitom različitih jona (pre svega gvožđa), oslobađanje mukusa može predstavljati i oportuni mehanizam koji omogućava mikroalgi da napravi rezerve jona u periodu kada su oni dostupni (Tsednee i sar., 2019; Schmollinger i sar., 2021). Oslobađanje mukusa otvara mogućnost za primenu mikroalge *C. sorokiniana* u sanaciji vodenih ekosistema kontaminiranih jonima bakra i drugih metala. Mukus, kao i ćelijski zid, predstavlja mehaničku barijeru koja smanjuje prodor jona metala u unutrašnjost alge. Drugim rečima, povećanjem površine sposobne za adsorpciju, smanjuje se apsorpcija.

Brzi adaptivni odgovor na povećan nivo Cu(II) jona ogleda se i u promenama u hemijskom/elementarnom sastavu površine biomase koji smo analizirali kombinovanjem SEM mikroskopije sa EDS analizom (slika 4.3). Iz dobijenih rezultata vidi se da se bakar akumulirao u biomasi algi već nakon 15 min inkubacije. Takođe došlo je do brzog povećanja u udelu kiseonika i fosfora u sastavu biomase.



Slika 4.3. Molski udeo elemenata u biomasi *C. sorokiniana*, $n=4$. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SE.

Treba napomenuti, da je osim promena kod elemenata zastupljenih u visokom procentu u biomasi, došlo i do promena u koncentraciji elemenata prisutnih u značajno nižim koncentracijama (slika 4.4).



Slika 4.4. Molski udeo (%) elemenata *C. sorokiniana* prisutnih u nižim koncentracijama dobijen EDS-om nakon tretmana jonima Cu(II) koncentracije 1 mM sa različitim periodima inkubacije, $n=4$. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SE.

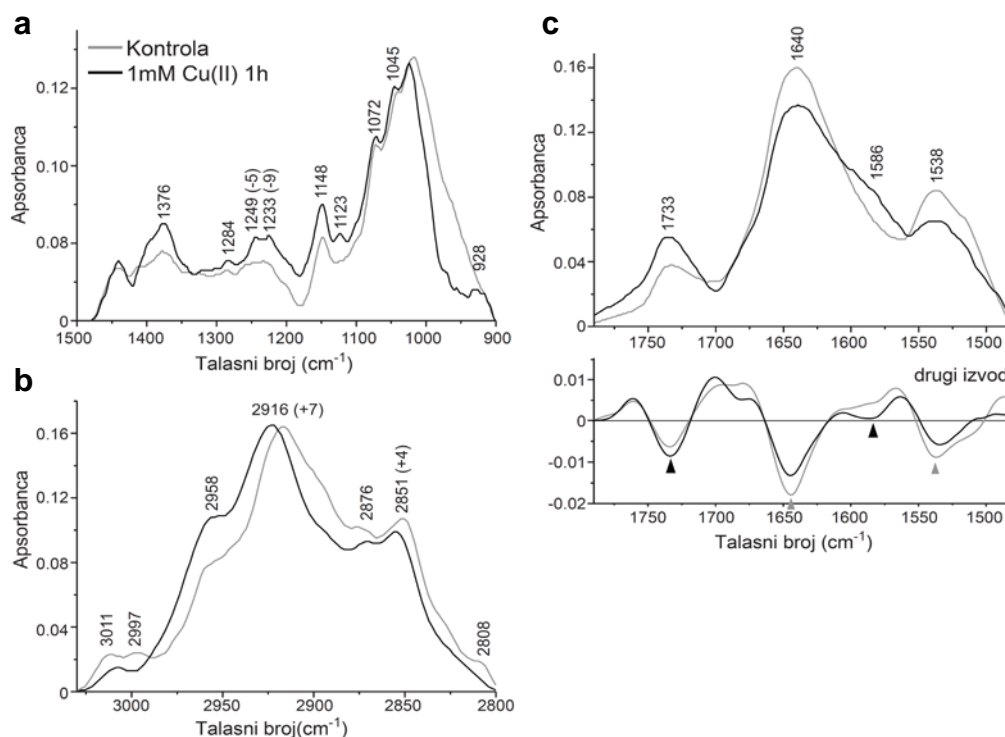
Ključna promena leži u drastičnom povećanju udela kiseonika (približno dvostruko) i povećanja udela fosfora na približno 2,5% u odnosu na kontrolne uzorke u kojima udeo fosfora oko 0,5%, što je povećanje od 4 puta. Ovaj trend uočen je nakon sva tri perioda inkubacije sa jonima Cu(II). Smanjenje udela ugljenika i azota najverovatnije je direktna posledica porasta udela kiseonika. Već nakon 15 min se uočava akumuliranje jona bakra, koji je u kontrolnim uzorcima bio ispod granice detektovanja. Ovo ukazuje da brza proizvodnja i otpuštanje mukusa upravo ima svrhu da inaktivira odnosno veže jone bakra. Osim toga, vidi se da mukus vezuje i druge katjone – natrijum, kalcijum, gvožđe i magnezijum koji su u kontrolnim uzorcima bili ispod granice detekcije. Na osnovu dobijenih rezultata, za sva dalja ispitivanja korišćena je 1 mM koncentracija jona Cu(II) sa periodom inkubacije od 1 h.

Uočeni porast udela atoma kiseonika i fosfora pokazuje da se oni nalaze u približno odnosu 4:1. To ukazuje da su mikroalge nakupljale ortofosfatne jone iz medijuma polimerizacijom i/ili fosforilacijom šećera i proteina. Već je pokazano da polifosfati predstavljaju dominantni oblik fosfora u mikroalgama (Sianoudis i sar., 1986), kao i da polifosfati u mikroalgama mogu biti zastupljeni u ćelijskom zidu i mukusu i/ili se mogu akumulirati unutar ćelije u polifosfatnim telima (Oh-hama i sar., 1986; Sianoudis i sar., 1986; Adams i sar., 2016), što se slaže sa dobijenim rezultatima. Takođe, polifosfati često imaju značajnu sposobnost vezivanja različitih jona metala kako je ranije pokazano (Rai i Gaur, 2012). Polifosfati prisutni u mukusu i ćelijskom zidu predstavljaju mesta vezivanja i drugih dvovalentnih katjona, kao što je Mg(II) (Sianoudis i sar., 1986). Mikroalge akumuliraju polifosfate i kao odgovor na neke druge vrste stresa poput smanjenih koncentracija sumpora (Ota i sar., 2016). Uz to, u mukusu mogu biti prisutni fosforilisani šećeri i proteini (Naveed i sar., 2019). Kod nekih vrsta mikroalgi u mukusu je uočeno i prisustvo uronskih kiselina koje su odgovorne za vezivanje jona Cu(II) i smanjenje toksičnosti ovog metala (Mangi i Schumacher, 1979). Ranija pretpostavka da mukus i polifosfati kod mikroalgi mogu da se koriste kao mesta za akumuliranje hranjivih

molekula i mesta na kojima se nakupljaju metalni katjoni (Jensen i sar., 1982; Watanabe i sar., 2006; Adams i sar., 2016) (ovde uočena povećanja u udelu natrijuma, magnezijuma i kalcijuma), uključujući i jone Cu(II) potvrđeno je dobijenim rezultatima. Porast udela atoma gvožđa takođe se može objasniti prisustvom siderofora (helatora gvožđa), koji se izlučuju na površini ćelije. U prisustvu malih koncentracija jona Fe(III) ovi helatori mogu da vezuju i druge jone metala (kao na primer bakar) i na taj način smanjuju toksičnost bakra, kako je pokazano (Clarke i sar., 1987). Osim u slučaju povećanih koncentracija metala, do sinteze mukusa dolazi i kada se alge nalaze u uslovima deficijencije hranljivih elemenata (Reynolds, 2007). U tretmanu nakon 24 h zabeležen je pad udela atoma bakra i fosfora, što ukazuje na mogućnost da je u tom trenutku ova komponenta procesa adaptacije završena ili se nalazi u završnoj fazi (Tien i sar., 2005).

4.1.2.2. SR-FTIR analiza promena u strukturnim komponentama i interakcija jona bakra u biomasi

Strukturne i hemijske promene na nivou funkcionalnih grupa, odnosno tipova jedinjenja, kao i interakcije jona bakra sa specifičnim funkcionalnim grupama dalje su ispitane SR-FTIR metodom. Karakteristični regioni "otiska prsta" FTIR spektra prikazani su na slici 4.4., dok su sve uočene promene traka za kontrolne uzorke i uzorke tretirane 1 mM Cu(II) 1 h date u tabeli 4.1. Identifikacija je izvršena na osnovu poznatih literaturnih podataka za FTIR analizu biomase mikroalgi (Khalil i Brown, 1964; Osman i Arof, 2003; Cardenas sar., 2004; Klähn i sar., 2004; D'Souza i sar., 2008; Derenne i sar., 2013; Pawlikowska-Pawlega i sar., 2013; Zhang i sar., 2013; Dahmane i sar., 2014; Dmytryk i sar., 2014; Fedorova i sar., 2014; Pawlikowska-Pawlega i sar., 2014; Driveri sar., 2015; Baudalet i sar., 2017; Müller i sar., 2017; Wiercigroch i sar., 2017; Charles i sar., 2019; Shivaji i Dronamaraju, 2019). Ukupna površina dobijenog infracrvenih spektra može se grubo podeliti na tri regiona u kojima apsorbuju karakteristične grupe molekula: ugljene hidrate, proteine i lipide, iako se u karakterističnim regionima jedne grupe makromolekula mogu pojaviti i vibracije druge vrste makromolekula.



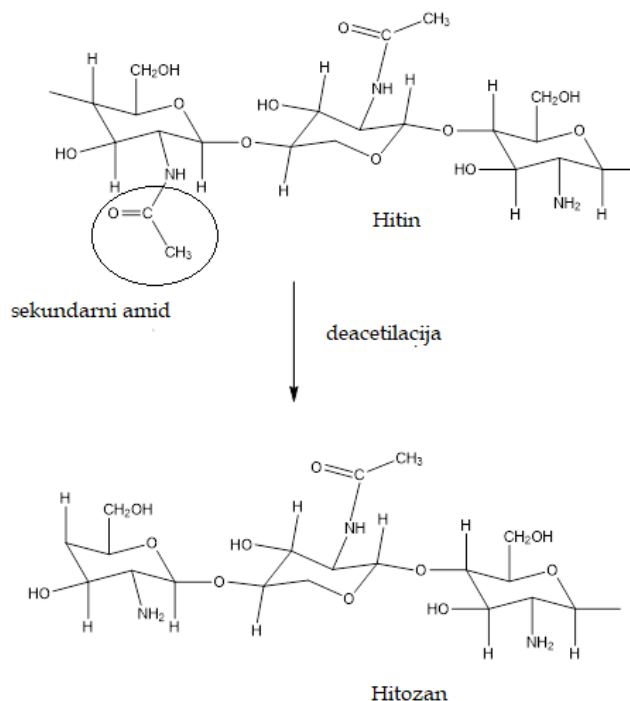
Slika 4.4. SR-FTIR spektri kontrolnih uzoraka mikroalgi *C. sorokiniana* i uzoraka tretiranih rastvorom jona Cu(II) (1 mM) 1 h. Regioni "otiska prsta" predstavljaju: (a) ugljene hidrate, nukleinske kiseline i fosfate, (b) lipide, (c) proteine i karbonilne grupe. Vrhovi strelica označavaju položaj traka od interesa predstavljenih drugim izvodom. Promena položaja traka tretiranih uzoraka mikroalgi u odnosu na kontrolne (netretirane) uzorke predstavljeni su u zagradama.

Poređenjem spektara kontrolnih uzoraka mikroalgi i uzoraka tretiranih rastvorom jona Cu(II) koncentracije 1 mM, uočen je niz razlika. Na slici 4.4a prikazan je deo SR-FTIR spektra kontrolnih i tretiranih uzoraka mikroalgi *C. sorokiniana* u opsegu od 1500 cm^{-1} do 900 cm^{-1} u kojem apsorbiraju ugljeni hidrati, nukleinske kiseline i fosfati. Najizraženije promene uočene su u oblasti između 970 i 900 cm^{-1} , gde dolazi do smanjenja intenziteta trake kao odgovor na tretman jonima Cu(II). Trake koje su se pojavile na ~ 928 i 1123 cm^{-1} mogu se povezati sa asimetričnim vibracijama istezanja P-O-P grupe u polifosfatima (Khalil i Brown, 1964). S druge strane, trake na 1072 i 1284 cm^{-1} , potiču od simetričnog i asimetričnog istezanja P=O grupe u HPO_4^{2-} (Klähn i sar., 2004), dok traka uočena na 1045 cm^{-1} koja nastaje od asimetričnog istezanja P=O grupe u H_2PO_4^- (Müller i sar., 2017) ima sličan intenzitet u kontrolnim i tretiranim uzorcima mikroalgi. Traka na 1123 cm^{-1} i traka na 1233 cm^{-1} (koja je pomaknuta do 1224 cm^{-1}), pokazuju pojačan intenzitet u tretiranim uzorcima mikroalgi i mogu biti povezane sa ksantatima i Cu-ksantatima (R-O-C=S)- $\text{S}^- \cdots \text{Cu}^+$ (D'Souza i sar., 2008; Zhang i sar., 2013). Pojačan intenzitet apsorpcione trake na 1376 cm^{-1} u tretiranim uzorcima može se povezati sa vibracijama C-CH₃ grupe hitozana (Cardenas i sar., 2004).

Dobijeni rezultati pokazuju da je došlo do promena i u lipidnoj oblasti SR-FTIR spektra (slika 4.4b). U spektru tretiranih uzoraka mikroalgi, trake na 2851 cm^{-1} i 2916 cm^{-1} koje potiču od simetričnog i asimetričnog istezanja CH₂ grupe pomerene su ka višim talasnim brojevima. Takođe, kod tretiranih uzoraka mikroalgi se može uočiti i gubitak trake na 2808 cm^{-1} i opadanje intenziteta trake na 2997 cm^{-1} koja potiče od vibracija

estarskih grupa (-O-CH₃) i trake na 3011 cm⁻¹ koja potiče od vibracija istezanja C=C-H grupe u nezasićenim lipidima.

Izlaganje mikroalgi povećanim koncentracijama jona Cu(II) dovelo je do promena i u oblasti SR-FTIR spektra koji je karakterističan za proteine i karbonilne grupe, a koje mogu biti vezane i za ugljene hidrate (slika 4.4c). Porast intenziteta trake na 1586 cm⁻¹ koja dolazi od savijanja NH₂ grupe u sekundarnim amidima, praćen je smanjenjem intenziteta trake na 1538 cm⁻¹ takođe pripisane sekundarnim amidima, što ukazuje da je došlo do delimične deacetilacije hitina u hitozan (slika 4.5.) (Osman i Arof, 2003; Dahmane i sar., 2014). Rezultat deacetilacije je i smanjenje intenziteta trake na 1640 cm⁻¹ koja potiče od asimetričnog istezanja karbonilne grupe (C=O) u primarnim amidima (Charles i sar., 2019). Takođe se može uočiti i porast intenziteta trake na 1733 cm⁻¹ u tretiranim uzorcima mikroalgi koji se može povezati sa istezanjem karbonilne grupe u proteinima i lipidima (Fedorova i sar., 2014).



Slika 4.5. Delimična deacetilacija hitina u hitozan. U hitinu prevladavaju acetilovane jedinice i stepen acetilacije je obično 0,90, dok je hitozan potpuno ili delimično N-deacetilovani derivat sa tipičnim stepenom deacetilovanja približno 0,65.

Rezultati SR-FTIR spektroskopije pokazali su dobro slaganje sa drugim studijama. U skladu sa indicijama dobijenim EDS analizom kao i sa dostupnim literaturnim podacima, može se zaključiti da fosfatne grupe imaju glavnu ulogu u vezivanju jona metala (D'Souza i sar., 2008). Na osnovu konstantnosti signala (traka) na 1045, 1072 i 1284 cm⁻¹ koje opisuju asimetrična istezanja P=O grupe fosfata, može se zaključiti da nivo slobodnih ortofosfatnih jona nije promenjen u tretiranim uzorcima mikroalgi i da se fosfor akumulirao u obliku polifosfata, jer su promene uočene za apsorpcionu oblast između 1150 i 1000 cm⁻¹, koje potiču od istezanja C-C, C-O-C i C-O veza u C-OH grupi, povezane

sa polifosfatnim i fosforilnim grupama na šećerima, odnosno proteinima (Driver i sar., 2015). Promene u trakama koje potiču od polisaharida, uključujući hitozan, osnovnu komponentu spoljnog rigidnog sloja zida kod *C. sorokiniana*, potvrđuje da dolazi do promena u strukturi ćelijskog zida kod mikroalgi koje su izložene jonima Cu(II) (Charles i sar., 2019). Pomeraji uočeni na 1233 i 1249 cm^{-1} (koje potiču od polifosfatnih i fosforilnih grupa na šećerima i proteinima) (D'Souza i sar., 2008; Driver i sar., 2015) ka nižim energijama u tretiranim uzorcima mikroalgi mogu se objasniti dužim i slabijim vezama nastalim kao rezultat vezivanja jona Cu(II) za fosfate (Dmytryk i sar., 2014). Promene koje potencijalno dolaze od sinteze ksantata su posebno interesantne. Naime, ksantani imaju veliki afinitet za vezivanje jona metala zbog prisustva sulfidnih grupa i taj afinitet za vezivanje jona metala je toliko veliki da ksantati nalaze industrijsku primenu (Kim i Lee, 1999).

Na osnovu dobijenih promena traka u oblasti od 1790 cm^{-1} do 1480 cm^{-1} čini se da je deacetilacija N-acetil-glukozaminskih ostataka u hitozanu deo adaptacije mikroalgi na visoke koncentracije jona Cu(II). Promena intenziteta apsorpcione trake koja se može povezati sa hitozanom u skladu je sa činjenicom da se deacetilacijom hitina dobija hitozan (glavna komponenta vanćelijskog čvrstog sloja ćelijskog zida kod roda *Chlorella*) (Baudeflet i sar., 2017). Povećanje intenziteta apsorpcije ovog dela spektra ukazuje na to da zadebljanje ćelijskog zida može predstavljati brz adaptivni odgovor izazvan povećanim koncentracijama jona Cu(II). Literaturni podaci takođe pokazuju da i kod drugih vrsta mikroalgi u prisustvu visokih koncentracija jona metala dolazi do promene u strukturi kao i povećanju kapaciteta ćelijskog zida za njihovo vezivanje (Shivaji i Dronamaraju, 2019). Takođe, deacetilacija može povećati kapacitet ćelijskog zida za vezivanje jona Cu(II). Do toga može doći ili zbog povećane rastvorljivosti hitozana ili zbog povećanog afiniteta za vezivanja jona metala (Li i sar., 1996; Franca i sar., 2011). U vezi sa ovim, prema HSAB teoriji, Cu(II) je granična kiselina, dok je azot na alifatičnom lancu generalno tvrda baza (Ho, 1975). Azot je mekši u amino grupi u odnosu na amidnu grupu gde kiseonik ima jak elektronegativni (*electron-withdrawing*) efekat (Hancock i Martell, 1996) i time bi trebalo da amino grupa ima veći afinitet za Cu(II) od amida. Povećan intenzitet trake koje se povezuju sa karbonilnim grupama u proteinima i lipidima može se pripisati karbonilaciji, odnosno akumulaciji karbonilnih grupa do koje dolazi kroz proces oksidacije proteina. Smanjenje intenziteta traka primarnih i sekundarnih amida ranije je primećeno kod mikroalgi kao odgovor na izloženost jonima Cu(II), ali samo kod onih algi koji su bile adaptirane na stres izazvan bakrom. Kod onih koje nisu bile dobro adaptirane, već osetljivije na jone Cu(II) uočene su trake većeg intenziteta (Charles i sar., 2019).

Pomeranje traka u lipidnom regionu koja potiče od istežanja CH_2 grupe u tretiranim uzorcima može se objasniti smanjenjem uređenosti acilnih lanaca u lipidnim membranama i lipidnim kapima (Boncheva i sar., 2008; Güler i sar., 2016). Vibracija trake na 2808 cm^{-1} koja nije uobičajna za FTIR spektar lipida, a koja je uočena kod tretiranih uzoraka mikroalgi od ranije je poznato da potiče od vibracija vodoničnih veza kojima su povezani lanci masnih kiselina i flavonoidi ($\text{C-H}\cdots\text{O}$) (Pawlikowska-Pawlega i sar., 2013; Pawlikowska-Pawlega i sar., 2014). Niži intenzitet ove "flavonoidne trake" u tretiranim uzorcima u skladu je sa smanjenom uređenošću acilnih lanaca, jer flavonoidi uopšteno povećavaju uređenost lipidnih slojeva u membranama (Hendrich, 2006). Opadanje intenziteta traka koje potiču od estarskih grupa u spektrima uzoraka izloženih jonima Cu(II) ukazuje da dolazi do promene u lipidnom profilu. Ovi rezultati impliciraju da

mikroalge akumuliraju triacilglicerole u obliku lipidnih kapi (unutarćelijsko skladište energije) kao deo odgovora na povećane koncentracije jona Cu(II). Ovo je u skladu sa ranijim studijama efekata abiotičkog stresa, uključujući i odgovor na povećane koncentracije jona metala (Chia i sar., 2013; Yang i sar., 2015). Upoređivanjem spektara kontrolnih i tretiranih uzoraka mikroalgi uočene su sličnosti u sastavu funkcionalnih grupa. Istovremeno, uočavanje malih razlika u talasnom broju, koje su primećene u određenom delu spektra potvrdile su efikasnost SR-FTIR analize u identifikaciji uzoraka biološkog materijala.

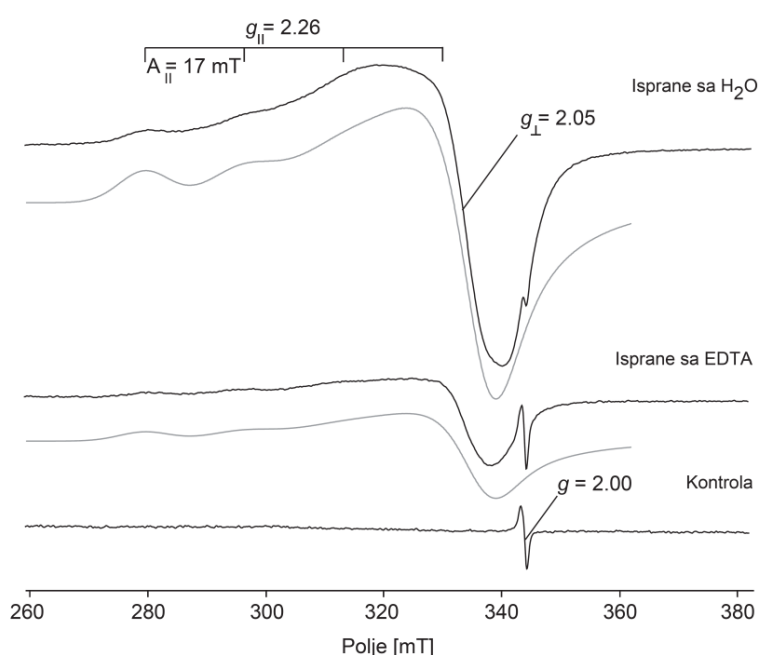
Tabela 4.1. Karakteristične trake dobijene SR-FTIR metodom za kontrolne i uzorke mikroalgi *C. sorokiniana* tretirane rastvorom jona Cu(II) koncentracije 1 mM. ν_{as} i ν_s – vibracije istezanja (asimetrične i simetrične), δ – vibracije savijanja u ravni.

Kontrola	1 mM Cu (II)	Asignacija
Region "otiska prsta" karakterističan za ugljene hidrate i fosfate		
1376	1376↑	δ CH ₂ grupa u polisaharidima
1284	1284	ν_{as} P=O u HPO ₄ ²⁻
1072	1072	
1249	1244↑	ν_{as} P=O u polifosfatima i fosforilisanim šećerima i proteinima
1233	1224↑	
1148	1148	
	1123 928	ν_{as} O-P-O u polifosfatima
1045	1045	ν_{as} P=O u H ₂ PO ₄ ⁻
Region "otiska prsta" karakterističan za proteine		
1733	1733↑	ν_s C=O u proteinima i lipidima
1640	1640↓	ν_{as} C=O ⋯ N-H u primarnim amidima
1586	1586↑	δ NH ₂ u sekundarnim amidima
1538	1538↓	δ N-H u sekundarnim amidima
Region "otiska prsta" karakterističan za lipide		
3011	3011↓	ν_s C=C-H u lipidima
2997	2997↓	ν_s -O-CH ₃ u estrima
2958	2958↑	ν_{as} CH ₃ u masnim kiselinama
2916	2923	ν_{as} CH ₂ u masnim kiselinama
2876	2876	ν_s CH ₃ u masnim kiselinama
2851	2855	ν_s CH ₂
2808		ν_s C-H ⋯ O veze između masnih kiselina i flavonoida

4.1.3. Redoks stanje i koordinaciono okruženje jona bakra u biomasi mikroalgi

4.1.3.1. EPR analiza interakcije jona Cu(II) sa biomasom mikroalgi

Za analizu koordinacionog vezivanja jona Cu(II) za polimere mukusa i ćelijskog zida mikroalgi *C. sorokiniana* korišćena je EPR spektroskopija. Na slici 4.6. predstavljeni su EPR spektri biomase mikroalgi koje su tretirane rastvorom jona Cu(II) koncentracije 1 mM sa periodom inkubacije od 1 h.



Slika 4.6. EPR spektri kontrolnih uzoraka mikroalgi ispranih vodom ili tretiranih jonima Cu(II) pri inicijalnoj koncentraciji od 1 mM tokom 1 h, ispranih vodom ili sa EDTA. Parametri snimanja bili su: atenuacija 13 dB; modulaciona amplituda 0,4 mT. Sive linije predstavljaju simulacije za vrednosti g i A . Signal na $g = 2$ dolazi od organskih radikala.

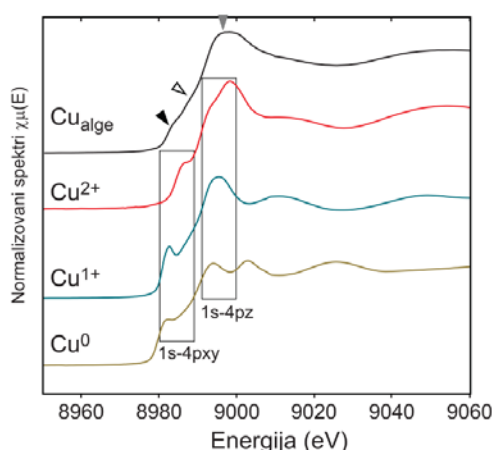
Kako Cu(II) ima jedan nesparen elektron ($S = 1/2$) i spin jezgra od $I = 3/2$, lako se može detektovati i identifikovati EPR spektroskopijom. Pomoću EPR eksperimenata pokazano je da mikroalga *C. sorokiniana* vezuje bakar u obliku jona Cu(II). Kod Cu(I) spin $S = 0$ i taj oblik je EPR neaktivan, tako da se ovom metodom ne može jednoznačno tvrditi da li se bakar vezuje samo u formi Cu(II) ili dolazi i do redukcije pri vezivanju za ćelijski zid i mukus. EPR signal Cu(II) pokazuje jednu liniju velike amplitude za $g_{\perp} = 2,05$ i četiri slabe linije koje proizilaze iz hiperfine interakcije sa jezgrima izotopa $^{63}\text{Cu} / ^{65}\text{Cu}$ ($I = 3/2$) duž $g_{\parallel} = 2,26$. Oblik spektra, široka g_{\perp} linija ($\Delta B_{\perp} = \sim 9,5$ mT) i vrednosti za g ($g_{\parallel} > g_{\perp} > g_{\text{slobodnog elektrona}}$) ukazuju da su joni Cu(II) pentakoordinovani, pri čemu grade komplekse kvadratno-piramidalne geometrije ili je okruženje oko centralnog metalnog jona kvadratno-planarno, tj. koordinacion broj je četiri (Bencini i Gatteschi, 1990; Garribba

i Micera, 2006). Da bi se odredilo mesto vezivanja jona metala (da li je vezan na površini ćelijskog zida ili je transportovan u unutrašnjost ćelije), uzorci su ispirani vodom ili sa 20 mM EDTA (sredstvom za heliranje jona metala). Ispiranje uzoraka sa EDTA, rezultiralo je smanjenim intenzitetom spektra Cu(II), što implicira da su joni Cu(II) nakon 1 h najvećim delom bili vezani za polimere mukusa i/ili polimere ćelijskog zida. Oni joni metala koji se ne mogu ukloniti sa EDTA apsorbirani su u ćeliji (Schenck i sar., 1988). Upoređivanjem spektara pre i nakon ispiranja sa EDTA može se zaključiti da su sličnog oblika sa istim vrednostima za g i hiperfino cepanje ($A_{||}$). To implicira da je prisutna jedna dominantna vrsta koordinacije jona Cu(II). Treba pomenuti da kompleksi Cu(II) velike molekulske mase, poput bakra vezanog za komponente suve biomase, uglavnom daju slične spektre na sobnoj i niskoj temperaturi (293 i 77 K), jer iako je relaksacija elektrona na sobnoj temperaturi brža, nedovoljno je da bi se spektar dalje značajno proširio (Hagen, 2008).

4.1.3.2. XAFS analiza redoks forme jona bakra i interakcije sa ligandima

Strukturne karakteristike bakra u biomasi *C. sorokiniana* koje obuhvataju određivanje njegovog oksidacionog stanja, lokalne geometrije kompleksa i detektovanje elemenata iz prvih koordinacionih sfera liganda mogu biti utvrđene primenom XAFS spektroskopije sa sinhrotronskim izvorom zračenja.

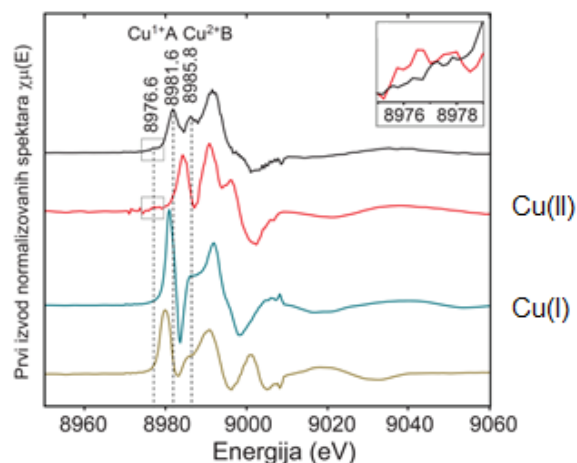
Na slici 4.7. prikazani su normalizovani XANES spektri uzoraka mikroalgi tretiranih jonima Cu(II), kao i spektri jedinjenja standarda u kojima je redoks stanje bakra 0, +1 i +2.



Slika 4.7. XANES spektri bakra iz uzoraka mikroalgi *C. sorokiniana* izloženih jonima Cu(II) početne koncentracije 1 mM tokom 1 h i spektri standarda Cu(II), Cu(I) i Cu(0), (CuO, Cu₂O i bakar folija), predstavljeni kao referentni spektri. Vrhovi strelica: crna – apsorpcioni maksimum koji odgovara 1s-4p_{xy}; bela – apsorpciona granica; siva – “bela linija”.

Na XANES spektrima referentnih standarda rastvora soli gde je Cu(I) i Cu(II) jasno se uočavaju apsorpcioni maksimumi koji odgovaraju 1s-4p_{xy} elektronskom prelazu (Gaur i Shrivastava, 2012). Apсорpcioni maksimumi spektara bakra uzorka biomase mikroalgi tretiranih jonima Cu(II) javljaju se na 8976,6 eV (pred apсорpcioni pik karakterističan za 1s-3d prelaz) dok se naslućuju intenzivnija dva signala na višim energijama u oblasti karakterističnoj za 1s-4p_{xy} elektronski prelaz) (slika 4.7).

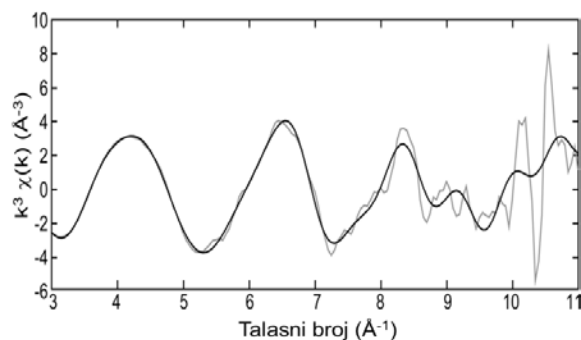
Signal na 8976,6 eV je moguće detektovati samo kod jona Cu(II), kod kojeg d-podnivo sadrži 9 elektrona i postoji upražnjeno mesto za elektron koji se izbija sa 1s nivoa. Iako je 1s-3d zabranjeni dipolni prelaz, on se javlja zbog delimičnog preklapanja 4p i delimično zauzetih 3d_{x²-y²} orbitala kod jona Cu(II) sa deformisanom simetrijom. Ta preklapanja indukuje odstupanje od idealne oktaedarske simetrije bakra u jedinjenju (iz razloga što ne postoji centar inverzije kod njih). Energija ove orbitale niža je od energije 4p orbitale, pa se apсорpcioni pik javlja na energiji koja je niža od one koja predstavlja apсорpcionu granicu (Hocking i Solomon, 2012). Sličan pik se ne može naći za jone Cu(I) zbog njene 3d¹⁰ konfiguracije. Sa druge strane, signal na nižoj energiji u energetske oblasti koja odgovara 1s-4p_{xy} prelazu evidentno potiče od jona Cu(I), dok drugi signal iz te oblasti odgovara istom prelazu kod jona Cu(II). Ovi rezultati ukazuju na prisustvo obe redoks forme bakra u uzorku (Cu(I) i Cu(II)). Razlika u energiji koja se uočava kod glavnih apсорpcionih maksimuma jona Cu(I) i jona Cu(II) potiče od činjenice da dolazi do porasta energije jonizacije sa porastom oksidacionog stanja bakra, usled porasta elektrostatičkog privlačenja jezgra i elektrona, indukovano porastom efektivnog pozitivnog neelektrisanja jezgra (Gaur i Shrivastava, 2012). Osim identifikovanja oksidacionih stanja bakra u uzorku mikroalgi primetno je da dolazi i do promene u prostornom rasporedu liganada u uzorku u odnosu na standard, na šta prvo ukazuju promene u obliku nagiba spektra u oblasti oko apсорpcione granice (slika 4.7). Naime, na XANES spektru kod Cu(I) referentnog standarda usled cepanja ligandnog polja dolazi do cepanja 4p orbitala na 4p_{xy} i 4p_z orbitale. Iz tog razloga u spektru jona Cu(I) se javljaju dva 1s-4p pika. Kod Cu₂O svaki atom Cu formira dve kolinearne veze sa atomom kiseonika, pri čemu antivezivna 4p_z orbitala ima veću energiju od 4p_{xy} orbitale zbog odbojne interakcije među elektronima duž z-ose (Gaur i Shrivastava, 2012). Odsustva jasno izraženih pikova za 1s-4p_{xy} elektronski prelaz u tretiranim uzorcima mikroalgi ukazuje da se geometrija kompleksa bakra ovde razlikuje u odnosu na standarde bakra (kod CuO prisutna je kvadratno-planarna geometrija, dok je kod Cu₂O prisutna tetraedarska geometrija). Oblik dobijenog spektra tretiranih uzoraka mikroalgi ukazuje da se centralni metalni jon Cu(II) nalazi u deformisanoj oktaedarskoj ili tetraedarskoj geometriji kod Cu(I) (Hocking i Solomon, 2012; Khemthong i sar., 2013; Hsiao i sar., 2001). Precizne energije prelaza elektrona indukovanih apсорpcijom rendgenskih zraka očitavaju se sa spektara prvih izvoda osnovnih spektara biomase mikroalgi tretiranih rastvorom jona Cu(II) i spektara standarda jedinjenja Cu(II), Cu(I) i Cu(0) (slika 4.8).



Slika 4.8. Prvi izvodi normalizovanih XANES spektara uzoraka *C. sorokiniana* izloženih jonima Cu(II) početne koncentracije 1 mM tokom 1 h. Isprekidane linije označavaju karakteristične pikove dobijene za jone bakra u biomasi mikroalgi. Uokvireni deo: deo derivatnog spektra uzorka mikroalgi i Cu(II) u opsegu od 8975–8979 eV.

Na osnovu ovih spektara mogu se odrediti minimalne energije apsorpcije elektromagnetnog zračenja neophodnog za izbijanje elektrona iz 1s nivoa (apsorpciona granica) kod uzoraka, što jednoznačno potvrđuje prisustvo bakra različitih oksidacionih stanja. Derivativni XANES spektri pokazali su postojanja obe redoks forme bakra (Cu(I) i Cu(II)) u uzorku. Potvrda o postojanju bakra u obliku Cu(I) se ogleda u položaju apsorpcione granice na energiji od 8981,6 eV. Takođe, uočava se i pred apsorpcioni pik niskog intenziteta na 8976,6 eV koji odgovara 1s-3d prelazu, koji je moguć zbog hibridizacije sa 4p orbitalom liganda koja 3d orbitali daje p karakter, kao i pik na 8985,8 eV koji se u literaturi definiše kao “bela linija”, odnosno 1s-4p_z elektronski prelaz. Položaj ova dva pika ukazuje na prisustvo Cu(II) u tretiranim uzorcima mikroalgi (Garribba i Micera, 2006). Bliski položaji apsorpcionih granica uzorka i standarda jona Cu(I) impliciraju da ligandi koji ga heliraju imaju sličnu elektronegativnost iako su različite geometrije. Prethodno je potvrđeno da se Cu(I) akumulira unutar ćelija i da se stvara glutation posredovanom redukcijom Cu(II) na površini ćelije (Stauber i Florence, 1986; Walsh i sar., 2015). Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima prethodne XANES studije o prisustvu jona bakra u morskim mikroalgama (Adams i sar., 2016), kao i sa rezultatima dobijenim EPR metodom koji su pokazali prisustvo jona Cu(II) u uzorcima mikroalgi koji su tretirani rastvorom Cu(II) jona, a zatim ispirani vodom ili vodenim rastvorom EDTA. Pored toga, potvrđeno je da dolazi do delimične redukcije Cu(II) do Cu(I) što nije bilo moguće utvrditi EPR-om.

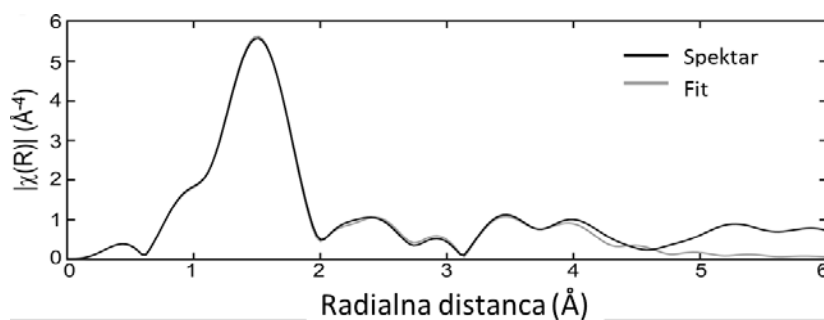
Identifikacija i rastojanja atoma liganada su dobijeni iz EXAFS oblasti spektra na energijama oko 50-1000 eV iznad apsorpcione granice. Na slici 4.9. prikazan je originalni zapis težinskog koeficijenta k^3 , K-granice EXAFS spektra bakra zajedno sa parametrima fitovanja u k prostoru, predstavljen kao zavisnost modifikacije u apsorpcionom koeficijentu apsorbera (odnosno talasne funkcije fotoelektrona oslobođenog iz jezgra najbliže orbitale).



Slika 4.9. Težinski koeficijent k^3 , K-granice EXAFS spektra bakra i odgovarajući fit u k-prostoru.

Može se uočiti odlično slaganje dobijenog signala K-granice bakra sa simulacijama.

Furijerova transformacija EXAFS spektra jona bakra u biomasi mikroalgi i odgovarajući fit prikazani su na slici 4.10.



Slika 4.10. EXAFS spektar uzoraka mikroalgi koje su bile tretirane rastvorom jona Cu(II) (1 mM) tokom 1 h (crna linija) i fit kojim je modelovana struktura bakra u biomasi (siva linija). Odstupanje brojnih vrednosti od onih koje se mogu očitati sa grafika iznose oko 0,5Å i posledica su faznog pomeraja koji odlikuje fotoelektron pri prolasku kroz potencijal absorbera i liganada.

Najintenzivniji pik koji oslikava svojstvo najbližeg liganda i koji je posledica jednostrukog elastičnog odbijanja fotoelektrona ("single scattering") od tog atoma, je asimetričan (predstavlja strukturu zavisnu od k u funkciji fazne korekcije EXAFS jednačine) (Hsiao i sar., 2001), što govori u prilog složenoj prostornoj geometriji bakra u sistemu. Udaljenost najbližih liganada je procenjena na 1,927 Å, 2,345 Å, 2,966 i 2,983 Å. Na spektru je lako uočljivo da dolazi do brzog smanjenje amplitude sa povećanjem vrednosti talasnog broja (slika 4.10). Brzina smanjenja amplitude govori u prilog da su ligandi za koje su vezani joni bakra, atomi sa malim atomskim brojem (Z) (Bunker i sar., 1991). Treba naglasiti složenost ispitivanog biološkog sistema koja se ogleda u prisutnosti jona bakra u dva oksidaciona stanja, niskoj koncentraciji jona bakra i prividnom odsustvu kristalne strukture. Najbolji fit dobijen je na osnovu parametara za jon Cu(II) koji je vezan za fosfatne jone u molekulu $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ i parametara za jon Cu(I) koji je vezan za kiseonik kao ligand u molekulu Cu_2O . Dobijeni rezultati ukazuju na prisustvo atoma kiseonika

direktno vezanih za bakar. Na sam EXAFS spektar osim jednostrukih elastičnih rasejanja koja potiču od najbližeg atoma utiču i višestruka rasejanja atoma liganada („*multi scattering*“). Rezultati takvih rasejanja ukazuju da je dužina Cu-Cu i Cu-P veze 2,966 Å i 2,983 Å. Proračunom je dobijan pentakoordinovani bakar ($4,98 \pm 1,20$) (Shoemaker i sar., 1977). Ovi rezultati u skladu su sa rezultatima dobijenim na EPR-u koji takođe ukazuju na to da je centralni metalni jon pentakoordinovan. Takođe, dobijeni rezultati potvrđuju da su joni Cu(II) vezani za polifosfate, što je u skladu sa rezultatima dobijenim SR-FTIR i EDS metodama na istom uzorku koji podrazumevaju prisustvo fosfata u izlučenom mukusu za koje se vezuju joni bakra.

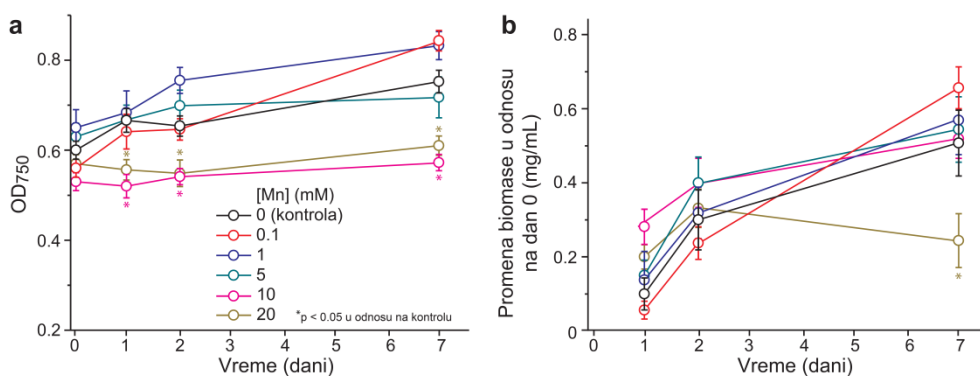
Predloženi rezultati u skladu su sa ranijim podacima iz literature koji pokazuju da dolazi do interakcije polifosfata i jona bakra u mikroalgama u cilju smanjenja toksičnih efekata (Jensen i sar., 1982). Takođe, ranije je pokazano da dolazi do akumulacije polifosfata u sojevima algi koje su otporne na stres izazvan jonima bakra (Hashemi i sar., 1994) i do smanjenja osetljivosti algi na jone bakra u prisustvu fosfata (Verma i sar., 1993; Serra i sar., 2010). Prisustvo sumpora kao liganda za jone bakra se ovom metodom, i na osnovu spektra i na osnovu mogućih parametara fita isključuje. Ovo je važno istaći jer je intracelularni Cu(I) najčešće koordinovan sa S liganadima, kao što je glutation.

4.2. Ispitivanje uticaja jona Mn(II) na mikroalgu *C.sorokiniana*

U narednom poglavlju predstavljani su rezultati ispitivanja strukturnih i hemijskih promena u ćelijama odnosno kulturi mikroalge *C. sorokiniana* pri izlaganju povećanim koncentracijama jona Mn(II), redoks promena u ćelijama mikroalgi, kao i samih interakcija jona mangana sa mikroalgama. U prvom koraku određena je subletalna koncentracija jona Mn(II) koja je dalje korišćena u svim eksperimentima. Zatim su ispitivane strukturne, hemijske promene biomase mikroalgi i redoks status ćelija nastali kao posledica izloženosti jonima Mn(II).

4.2.1. Određivanje subletalne koncentracije jona Mn(II)

Na slici 4.11. prikazani su rezultati optičke gustine i biomase u periodu od 7 dana kod kontrolnih uzoraka i uzoraka mikroalgi tretiranih rastvorom jona Mn(II) različitih koncentracija.



Slika 4.11. Rast kulture *C. sorokiniana* tokom 7 dana izlaganja različitim koncentracijama jona Mn(II): (a) promene optičke gustine na 750 nm (OD_{750}) proporcionalne su gustini kulture ćelije; (b) promena biomase u odnosu na početnu (dan 0) biomasu u istom uzorku. Ćelije mikroalgi su bile izložene različitim koncentracijama jona Mn(II) u ranoj stacionarnoj fazi. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SE. Statistička značajnost u poređenju sa kontrolnim vrednostima u istoj vremenskoj tački određena je korišćenjem Man-Vitnijevog (Mann Whitney) testa sa dva nezavisna uzorka (* $p < 0,05$; $n = 4$).

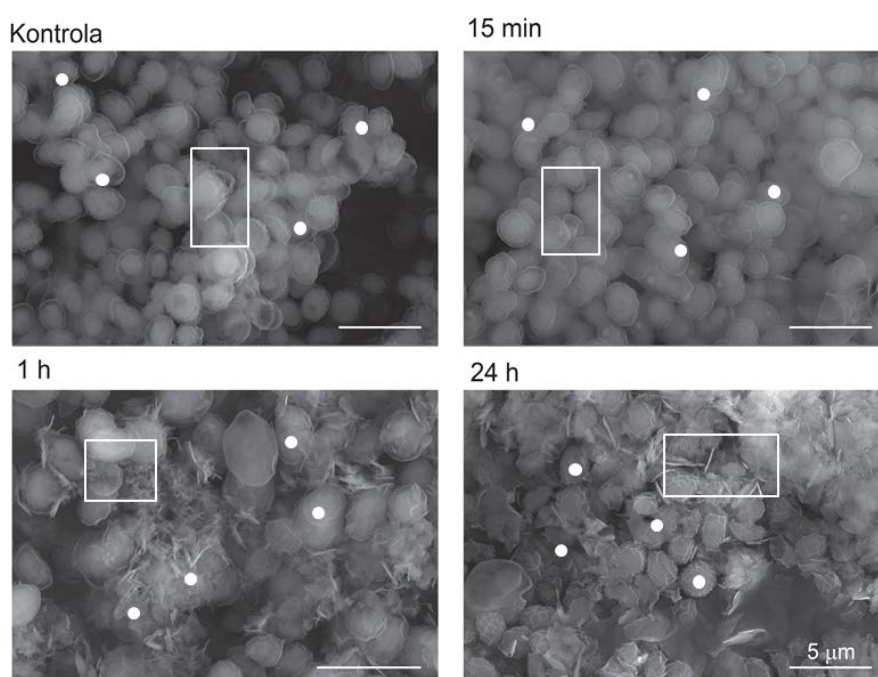
Prvi korak u ovom eksperimentu bio je utvrđivanje gornje granice netoksičnih koncentracija jona Mn(II). U odnosu na kontrolne (netretirane) uzorke, velike koncentracije jona Mn(II) (od 10 mM i 20 mM) izazivale su značajan pad u gustini ćelija (OD_{750}) tokom svih 7 dana eksperimenta, kao i smanjenje biomase u odnosu na početnu biomasu. Koncentracije jona Mn(II) od 1 mM i 5 mM nisu imale značajan uticaj na pomenute parametre. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da koncentracija jona Mn(II) od 1 mM nije imala negativne efekte na rast i preživljavanje mikroalgi *C. sorokiniana*. U skladu sa navedenim zapažanjima u daljim eksperimentima korišćena je koncentracija jona Mn(II) od 1 mM.

Mangan je kofaktor prisutan u više od 30 enzima u mikroalgama, uključujući centralne komponente fotosintetskog (*oxygen-evolving complex*) i redoks (Mn superoksid dismutaza) kompleksa (Liu i sar., 2018). Međutim, kada je prisutan u višku mangan može interagovati sa funkcionalnim grupama na površini ćelije mikroalgi što može dovesti do gubitka biološke aktivnosti ćelije (Yan i sar., 2001). Osim toga, mangan prisutan u višku u kompeticiji je za mesta vezivanja sa drugim dvovalentnim katjonima, kao što su Fe(II), Ca(II) i Mg(II) (Ni i sar., 2007). Ovaj proces (*mismetallation*) primećen je i u mikroalgama i predstavlja zamenu drugih jona metala sa jonima Mn(II) u aktivnom centru metaloproteina što dovodi do gubitka aktivnosti i promena redoks metabolizma ćelije (Eisenhut, 2019; Liu i sar., 2018). Toksičnost metala zavisi od biološke raspoloživosti samog metala (Sunda i Huntsman, 1998), količine helirajućih agensa koji su prisutni u medijumu (Horner, 2006), kao i od koncentracija ćelije mikroalgi (Nakajima i sar., 1979). Povećane koncentracije jona mangana mogu uticati na promenu pH medijuma u kojima alge rastu što direktno utiče na vijabilnost ćelije (Rousch i Sommerfeld, 1999). Takođe, alge pokazuju veću osetljivost na povećane koncentracije jona mangana pri višim vrednostima pH (Peters i sar., 2011). Kako bi se obezbedili konstantni uslovi u eksperimentima, pH medijuma ili pufera prilikom apliciranja jona Mn(II), uvek je bila oko 7. Analize su rađene, kako je i ranije naznačeno, u ranoj stacionarnoj fazi (20. dan rasta kulture), pri inicijalnoj koncentraciji ćelija mikroalgi od 5×10^5 ćelija/mL.

4.2.2. Ispitivanje strukturnih i hemijskih promena u biomasi mikroalgi u prisustvu povećane koncentracije jona Mn(II)

4.2.2.1. Analiza SEM mikroskopijom i EDS metodom

Na slici 4.12. prikazane su SEM mikrografija kontrolnih (netretiranih) uzoraka *C. sorokiniana* i uzoraka tretiranih rastvorom jona Mn(II) koncentracije 1 mM u periodu od 15 min, 1 h i 24 h.

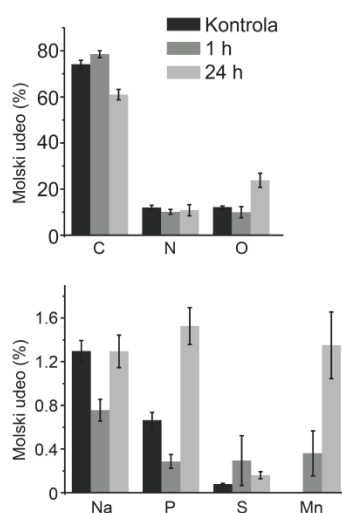


Slika 4.12. SEM mikrografije kontrolnih (netretiranih) uzoraka mikroalgi *C. sorokiniana* i uzoraka tretiranih rastvorom jona Mn(II) koncentracije 1 mM pri različitim vremenima inkubacije (15 min, 1 h i 24 h). Uveličanje za kontrole i tretmane od 15 min i 24 h je 8000 \times ; za tretman od 1 h uveličanje je 10000 \times . Beli krugovi i uokvireni delovi označavaju područja u kojima su prikupljeni EDS podaci. Skala= 5 μ m, n= 4. Oslobodeni mukus se može posmatrati kao „igličaste ljuspice“ koje pokrivaju ćelije *C. sorokiniana* tretirane jonima Mn(II) 1 h i 24 h.

Na osnovu dobijenih SEM mikrografija može se zaključiti da su kod kontrolnih uzoraka i tretmana nakon 15 min, pojedinačne ćelije mikroalgi jasno vidljive. U periodu između 15 min i 1 h izloženosti jonima jona Mn(II) može se uočiti promena na površini ćelija u vidu oslobodjenog mukusa i akumuliranja jona mangana na površini ćelijskog zida, koje se dalje nastavilo tokom 24 h.

Kako je od ranije poznato, mikroalge oslobađaju mukus kao odgovor na različite vrste stresora (Watanabe i sar., 2006; Naveed i sar., 2019). Dosadašnja istraživanja pokazala su da je uloga mukusa da formira zaštitni sloj na površini ćelijskog zida, heliranjem jona metala i sprečavanjem transporta metala u unutrašnjost ćelije (Watanabe i sar., 2006; Sutak i sar., 2012). Stoga je oslobađanje mukusa jedan od mehanizama koji omogućava opstanak i adaptaciju ćelija na stres izazvan povećanim koncentracijama jona metala (Hou i sar., 2016; Naveed i sar., 2019). Interakcija jona metala sa mukusom ostvaruje se posredstvom funkcionalnih grupa (Li i sar., 2015; Zhang i sar., 2020). Pored mukusa i ćelijski zid ima ulogu barijere koja sprečava ulazak jona metala u ćeliju. Ćelijski zidovi mikroalgi uglavnom se sastoje od polisaharida, lipida i proteina koji sadrže različite funkcionalne grupe. Ove funkcionalne grupe kao i kod mukusa omogućavaju mikroalgama da adsorbuju jone metala (Deng i sar., 2007). Od ranije je poznato da se joni Mn(II), kao i drugi joni metala, mogu akumulirati u mukusu mikroalgi (Lombardi i Vieira, 2000; Tieni sar., 2005; Watanabe i sar., 2016) i da vezivanje jona metala pomoću oslobođenog mukusa smanjuje njihovu toksičnost (Lombardi i sar., 2002).

SEM mikroskopija kombinovana sa EDS analizom korišćena je kako bi se odredila promena udela elemenata koji ulaze u sastav biomase mikroalginakon tretmana jonima Mn(II) (slika 4.13).



Slika 4.13. EDS analiza ćelija *C. sorokiniana*: molski udeo elemenata u biomasi mikroalgi. Na grafiku su predstavljeni rezultati za kontrolne (netretirane) uzorke i uzorke mikroalgi tretirane jonima Mn(II) koncentracije 1 mM, 1 h i 24 h, n= 4. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SE.

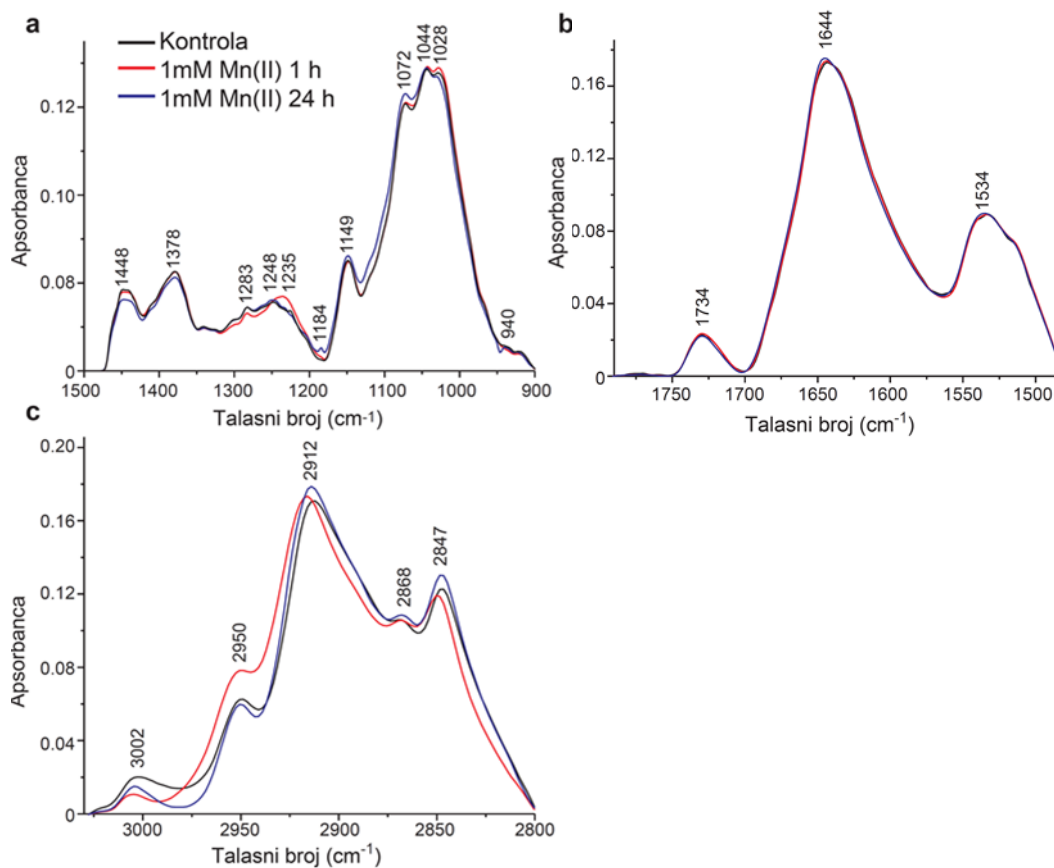
Izloženost mikroalge *C. sorokiniana* jonima Mn(II) koncentracije 1 mM tokom različitog vremena inkubacije omogućava praćenje brzine odgovora na povećane koncentracije primenjenog metala. Upoređivanjem kontrolnih i tretiranih uzoraka nakon perioda inkubacije od 1 h može se zaključiti da nema značajnih promena u molskom udelu elemenata, izuzev manjih količina mangana (udeo od 0,4%) (slika 4.13). Koncentracija mangana u kontrolnim uzorcima je bila ispod praga detekcije. Značajne promene molskog udela elemenata u biomasi mikroalgi primećene su u tretiranim uzorcima nakon 24 h.

Kako se može videti došlo je do dvostrukog povećanja udela kiseonika (sa oko 10% na 20%), dok se udeo fosfora povećao za oko 1% (u kontrolama je bilo ~0,5%). Kao posledica povećanja molskog udela fosfora i kiseonika dolazi do smanjenja udela ugljenika za oko 15%. Molski udeo mangana nakon tretmana od 24 h je bio oko 1,3%.

Kod *Chlorella* je pokazano da se smanjenje toksičnog efekta jona metala omogućava njegovim vezivanjem za oslobođeni mukus (Zhang i sar., 2015). Upoređivanjem mikroalgi *C. pirenoidosa* sa i bez oslobođenog mukusa zaključeno je da kod onih algi kod kojih je bio prisutan mukus kapacitet adsorpcije metala bolji (Zhang i sar., 2020). Dobijeni rezultati govore u prilog tome da je inicijalna akumulacija jona Mn(II) kod *C. sorokiniana* omogućena zahvaljujući njihovom brzom vezivanju za ćelijski zid i/ili oslobođeni mukus dok se značajna akumulacija jona mangana dešava u kasnoj fazi odgovora. U mikroalgama polifosfati predstavljaju dominantan oblik fosfata (Sianoudis i sar., 1986), koji mogu biti vezani za ćelijski zid i mukus ili skladišteni unutar ćelija u polifosfatnim telima (Oh-hama i sar., 1986; Sianoudis i sar., 1986). Uočeni porast molskog udela fosfora kod tretiranih uzoraka *C. sorokiniana* u skladu je sa navedenim podacima. Pored toga, u mukusu mogu biti prisutni i fosforilisani šećeri i proteini (Naveed i sar., 2019). Uočene promene udela kiseonika i fosfora nakon tretmana od 24 h pokazale su odnos od ~10:1. Ovakve vredenosti impliciraju da su mikroalge akumulirale fosfate iz medijuma polimerizacijom šećera i proteina. Nakon povećanja udela fosfora u tretmanu od 24 h može se uočiti i povećanje udela mangana, što dovodi do zaključka da je mangan vezan za fosfate u izlučenom mukusu. Dobijeni rezultati ukazuju da prisustvo jona metala indukuje izlučivanje mukusa i polifosfata na površini ćelije koji svoju odbrambenu ulogu ostvaruju vezivanjem samih jona Mn(II). S druge strane, čini se da kod algi roda *Chlamydomonas* ne dolazi do akumuliranja fosfora kada je mangan prisutan u višku (Tsednee i sar., 2019). Vredi napomenuti da pored različitih transportera za mangan, joni Mn(II) mogu ući u ćelije mikroalgi i u obliku MnHPO₄ preko fosfatnih transportera (Blaby-Haas i Merchant, 2012). Sporija akumulacija jona mangana i sporije formiranje mukusa uočena u ovim eksperimentima, kod *C. sorokiniana*, u odnosu na jone bakra u skladu je sa činjenicom da mikroalge pokazuju veću osetljivost na jone bakra nego na jone mangana (Rosko i Rachlin, 1975; Hong-Hermesdorf, 2014; Tsednee i sar., 2019).

4.2.2.2. SR-FTIR analiza interakcija jona mangana sa strukturnim komponentama biomase

Strukturne i hemijske promene u biomasi mikroalgi *C. sorokiniana* nastale kao posledica izlaganja povećanim koncentracijama jona Mn(II) dalje su ispitivane korišćenjem SR-FTIR metode. Analizirana je liofilizovana biomasa ćelija mikroalgi. Identifikacija traka izvršena je na osnovu poznatih literaturnih podataka (D'Souza i sar. 2008; Derenne i sar. 2013; Driver i sar., 2015). Na slici 4. 14. prikazani su karakteristični regioni "otiska prsta" FTIR spektra za ugljene hidrate, proteine i lipide kao i uočene promene traka za kontrolne uzorke mikroalgi i uzorke tretirane rastvorom jona Mn(II) koncentracije 1 mM tokom 1 h i 24 h. U tabeli 4. 2. data je asignacija pojedinačnih traka, kao i promene u pogledu talasnog broja i intenziteta u mikroalgama izloženim 1 mM Mn(II).



Slika 4.14. SR-FTIR spektri kontrolnih uzoraka *C. sorokiniana* i uzoraka tretiranih 1 mM MnCl₂ tokom 1 h ili 24 h, n= 3. Prikazani spektri predstavljaju region „otiska prsta“ u kome apsorbiraju: (a) ugljeni hidrati, fosfati i nukleinske kiseline, (b) proteini i karbonilne grupe, (c) lipidi. Na slici su prikazani talasni brojevi za trake dobijene u kontrolnim uzorcima.

U regionu SR-FTIR spektra u kojem apsorbiraju ugljeni hidrati, nukleinske kiseline i fosfati (slika 4.14a) uočen je niz promena. Nakon tretmana od 1 h traka na 1248 cm⁻¹ pomeren je na niži talasni broj, dok se nakon 24 h ponovo vraća na početni položaj. Kod tretmana od 24 h dolazi do sledećih promena: pojave novih traka na 1184 cm⁻¹ i 940 cm⁻¹, smanjenje intenziteta traka na 1448 i 1378 cm⁻¹ koje potiču od vibracija savijanja CH₂ grupa i povećanja intenziteta traka na 1149 i 1072 cm⁻¹ koje predstavljaju vibracije istezanja C-C i C-O veze. U regionu karakterističnom za proteine uočeno je pomeranje položaja trake sa 1644 cm⁻¹ na više energije u tretiranim uzorcima. Ova traka predstavlja vibracije istezanja C=O··H-N veze u primarnim amidima (slika 4.14b). U lipidnom regionu mogu se uočiti najznačajnije promene vibracionih traka u tretiranim uzorcima mikroalgi u odnosu na kontrolne (slika 4.14c). Smanjenje intenziteta trake na 3002 cm⁻¹ nakon tretmana od 1 h predstavlja vibracije C=C-H veze, dok se pojačan intenzitet trake na 2912 i 2847 cm⁻¹ nakon tretmana od 1 h može se povezati sa smanjenjem uređenosti acilnih lanaca koji ulaze u sastav ćelijske membrane (Boncheva i sar., 2008, Güler i sar., 2016).

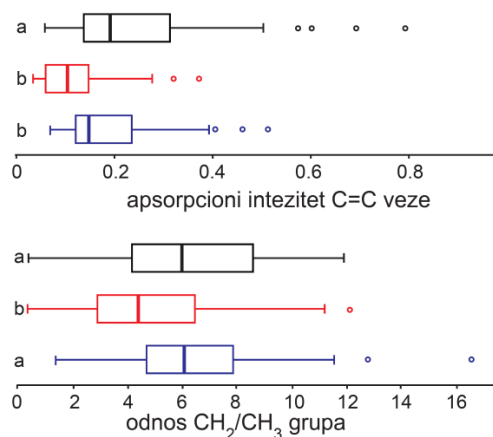
Promena položaja trake na 1248 cm⁻¹ tokom tretmana može se objasniti vezivanjem jona Mn(II) za fosfatne grupe na membranskim fosfolipidima, što rezultira dužim i slabijim vezama, dok se vraćanje na početni položaj ukazuje da je zabeležen pomerač u ranoj fazi odgovora na stres. Pojava novih traka nakon tretmana od 24 h implicira da dolazi

do promene u lancima ugljenih hidrata, što je u skladu sa rezultatima dobijenim EDS-om. Pored toga, promene intenziteta traka koje potiču od vibracija savijanja CH₂ grupa implicira da dolazi do promene profila ugljenih hidrata u kasnijoj fazi odgovora. Ova promena može biti povezana sa strukturnim promenama fibrilarnog sloja ćelijskog zida, koji se kod *C. sorokiniana* sastoji od ramnoze, galaktoze, glukuronske kiseline, arabinoze, manoze i drugih šećera (Russell, 1995).

Osim proteina, kod algi roda *Chlorella* amidne grupe su prisutne i u polimerima sličnim hitozanu koji čine spoljašnji „kruti“ sloj ćelijskog zida (Baudeflet i sar., 2017). Ranije je pokazano da se jačina vodonične veze u C=O··H-N strukturi kod primarnih amida povećava kada je hitozan čvršće upakovan, ili kada se nenaelektrisani ligandi koje se nalaze u blizini koordinuju sa metalima, uključujući jone Mn(II) (Husberg i Ride, 2013). Prema tome, uočeni pomak trake u proteinskom regionu implicira da dolazi do reorganizacije stukture proteina i spoljašnjeg sloja ćelijskog zida ili vezivanje jona Mn(II) za ćelijski zid.

Smanjenje intenziteta trake na 3002 cm⁻¹ implicira da je izlaganje povećanim koncentracijama jona Mn(II) dovelo do brzog smanjenja stepena nezasićenosti masnih kiselina, što može biti povezano sa promenama u profilu masnih kiselina ili sa peroksidacijom lipida. Porast intenziteta traka koje predstavljaju istežanje CH₂ grupe u prisustvu jona Mn(II) nakon 1 h može biti izazvano interakcijama jona Mn(II) sa ćelijskom membranom. U pogledu efekta koji imaju na membranu, joni Mn(II) dosta se razlikuje od jona drugih prelaznih metala, kao što su Cu(II), Zn(II) i Ni(II), koji se vezuju za membranu kako bi se poboljšala uređenost membranskih lipida (Sule, 2020). Kako je poznato joni Mn(II) indukuju strukturne promene lipidnog dvosloja, što je povezano sa malim jonskim radijusom koji omogućava vezivanje jonima Mn(II) za fosfatne ostatke fosfolipida (Lindberg, 2003; Suwalsky i sar. 2010), čemu u prilog ide i pomeranje položaja trake uočene na 1248 cm⁻¹. Nakon tretmana od 24 h te promene više nisu uočljive, što ukazuje da su joni Mn(II) uklonjeni sa membrane. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su u ranoj fazi izlaganja jonima Mn(II), oni vezani za vanćelijske barijere, kao što su: (i) fosfati u oslobođenom mukusu; (ii) hitozan u ćelijskom zidu; i (iii) fosfatne grupe na površini membrane; dok se u kasnijoj fazi odbrane od povećanih koncentracija jona metala u ćelijama mikroalgi pokreću specifičniji mehanizmi koji dovode do akumulacije/inaktivacije jona Mn(II).

U skladu sa uočenim promenama u lipidnom regionu SR-FTIR spektra dva markera oksidativnog stresa, odnosno, lipidne peroksidacije pokazala su da je tretman jonima Mn(II) od 1 h doveo do prooksidativnih promena u ćelijama mikroalgi (slika 4.15). U dobijenim rezutatima može se uočiti smanjenje intenziteta trake koja predstavlja vibracije C=C-H veze, kao i smanjenje odnosa CH₂/CH₃ grupa, koji predstavljaju značajan marker oksidativnog stresa, odnosno lipidne peroksidacije (Smith, 2016).



Slika 4.15. Parametri oksidativnog stresa - promena intenziteta trake koja predstavlja C=C veze i odnos CH₂/CH₃ grupa. Rezultati su prikazani u formi box-plot-a. Vertikalne stranice pravougaonika predstavljaju prvi i treći kvartil, a vertikalna linija unutar pravougaonika predstavlja medijalnu vrednost. Vertikalne crtice levo i desno od pravougaonika predstavljaju procene minimalne i maksimalne vrednosti. Kružići iznad maksimalne vrednosti su ekstremne vrednosti. Slova (a i b) predstavljaju rezultate dobijene one-way ANOVA, pri čemu ista slova znače da nema statistički značajne razlike, ($p < 0.05$) između srednjih vrednosti. Za post hoc analizu korišćen je Dankanov test.

Porast intenzitet traka koje predstavljaju asimetrično istežanje CH₃ i CH₂ grupa nakon tretmana od 1 h i traka koje predstavljaju simetrično istežanje CH₃ i CH₂ grupa nakon tretmana od 24 h pokazuju da ćelije *C. sorokiniana* akumuliraju lipide kao odgovor na stres izazvan povećanim koncentracijama jona Mn(II) i da se promene u organizaciji ili sastavu lipida do kojih je došlo menja tokom vremena. Pojava akumulacije lipida u skladu je sa prethodnim nalazima da stres izazvan metalima može dovesti do akumulacije lipida u mikroalgama (Ren i sar., 2014; Battah i sar., 2015).

Tabela 4.2. Karakteristične trake dobijene SR-FTIR metodom za kontrolne (netretirane) uzorke i uzorke mikroalge *C. sorokiniana* tretirane rastvorom jona Mn(II) (1mM) tokom 1 h i 24 h. Promene intenziteta traka označeni su strelicama nagore/nadole. U tabeli su predstavljene i uočene vibracije: ν_{as} and ν_s – vibracije istezanja (asimetrične i simetrične), δ – vibracije savijanja u ravni.

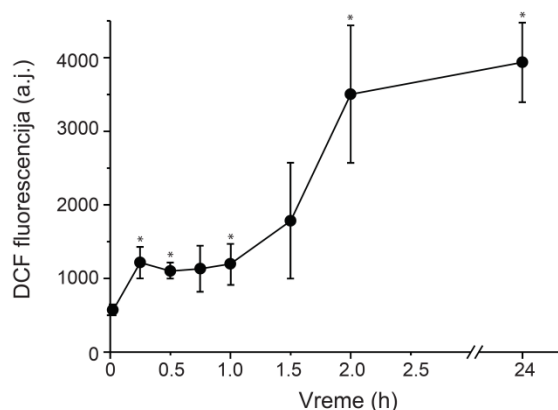
Kontrola	1 mM Mn(II) 1 h	1 mM Mn(II) 24 h	Asignacija
Region "otiska prsta" karakterističan za ugljene hidrate i fosfate			
1448	1448	1448↓	δ CH ₂ i CH ₃
1378	1378	1378↓	δ CH ₂ i CH ₃
1283	1283	1283	ν_{as} i ν_s P=O u HPO ₄ ²⁻
1248	1235	1248	ν_{as} P=O u fosforilnim grupama na ugljenim hidratima, fosfolipidima i proteinima
		1184	ν_{as} O-P-O i P-OH u polifosfatima
1149	1149	1149↑	ν_s C-C, C-O, C-O-C i C-O-P karbohidrata
1072	1072	1072↑	ν_s C-C, C-O, C-O-C i C-O-P karbohidrata
1044	1044	1044	ν_{as} P=O u HPO ₄ ²⁻
1028	1028↑	1030	ν_s C-C, C-O, C-O-C i C-O-P karbohidrata
		940	ν_{as} O-P-O i P-OH u polifosfatima
Region "otiska prsta" karakterističan za proteine			
1734	1734	1734	ν C=O
1644	1647	1648	ν C=O···H-N u primarnim amidima
1535	1535	1535	δ N-H u sekundarnim amidima
Region "otiska prsta" karakterističan za lipide			
3002	3004↓	3004↓	ν C-H i C=C-H u nezasićenim masnim kiselinama
2950	2950↑	2950	ν_{as} CH ₃ grupe u masnim kiselinama
2912	2916↑	2912↑	ν_{as} CH ₂ grupe u masnim kiselinama
2868	2868	2868↑	ν_s CH ₃ grupe u masnim kiselinama
2847	2849	2847↑	ν_s CH ₂ grupe u masnim kiselinama

4.2.3. Analiza redoks stanja ćelije

Kako je SR-FTIR metodom pokazano da kao posledica izloženosti visokim koncentracijama jona Mn(II) dolazi do povećanog stepena oksidacije u ćelijama *C. sorokiniana*, u daljim eksperimentima ispitan je redoks status ćelija.

4.2.3. Promena unutarćelijske koncentracije ROS

Na slici 4.16. prikazan je grafik promene koncentracije ROS u ćelijama mikroalgi *C. sorokiniana* nastalih kao posledica izlaganja 1 mM jonima Mn(II) tokom 24 h. Nivo unutarćelijskog ROS praćen je primenom fluorescentne probe DCFH-DA.



Slika 4.16. Intenzitet fluorescencije DCF - proizvoda oksidacije DCFH-DA fluorescentne probe koji ukazuje na unutarćelijski nivo ROS nakon izlaganja ćelija *C. sorokiniana* 1 mM Mn(II) tokom 24 h: Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SE. * - statistički značajno ($p < 0,05$) u poređenju sa početnom vrednošću (0 h), $n = 3$.

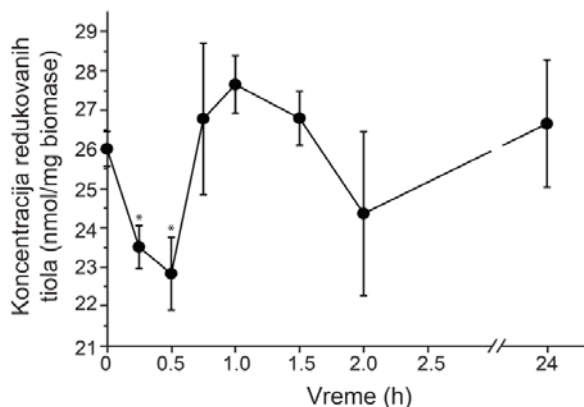
Povećanje koncentracije ROS može se podeliti u dve faze - u prvih 15 min i između 1 h i 2 h. Dok je između ove dve faze koncentracija ROS konstantna. Nakon 24 h koncentracija ROS dostiže plato koji je bio oko sedam puta veći nego pre tretmana i tri puta veći nego nakon tretmana od 1 h (slika 4.16). Dobijeni rezultati pokazali su značajno povećanje nivoa ROS u tretiranim uzorcima u odnosu na netretirane (0 h).

U normalnim fiziološkim uslovima u ćelijama mikroalgi nivo ROS održava se na stabilnom nivou (Foyer i Noctor, 2005). Međutim, kao posledica delovanja različitih stresora dolazi do povećanja koncentracije ROS, što dovodi do pojave „oksidativnog

stresa“ u ćeliji (García-Ríos i sar., 2016; Chokshi i sar., 2017). Kod *C. vulgaris* je pokazano da unutarćelijski nivo ROS može poslužiti kao opšti kvantitativni marker oksidativnog stresa ćelije, bez obzira na vrstu izazvanog stresa (Menon i sar., 2013). Važno je napomenuti da oksidativni stres može podstaći sintezu polifosfata (Dai i sar., 2021), a od ranije je poznato da se kod mikroalgi javlja dinamički redoks odgovor kada su izložene jonima Cr(VI) (Volland i sar., 2012). Takođe treba napomenuti da je redukcionni potencijal jona Mn(II) previsok da bi dozvolio reakciju sličnu Fentonu, iako se potencijal može značajno smanjiti koordinacijom. Redukcionni potencijal Mn(III)/Mn(II) para na pH 7 je 830 mV, (a standardni redukcionni potencijal ~1600 mV). Međutim Mn(II) podleže autooksidaciji u rastvorima bogatim kiseonikom i u prisustvu snažnih helirajućih agenasa koji mogu da stabilišu rezultujući Mn(III) (Bao i Burnap, 2016). Pored toga, Mn(II) formira hidrokside pri pH > 8 (kao što je u stromi hloroplasta i mitohondrijama) (Höhner i sar., 2016). Sve ovo dovodi do smanjenja redukcionnog potencijala i olakšava oksidaciju Mn(II) do Mn(III) i dalje do Mn(VI) u obliku slabo rastvorljivih oksida (Cotton i sar., 1999). Prethodne studije TEM-EELS i rendgenske fluorescentne mikroskopije otkrile su da se metali mogu akumulirati u ćelijskom zidu, skrobnim zrnima, hloroplastima, vakuolama, mukusu, acidokalcizomima i autofagozomima (Volland i sar., 2011; Andosch i sar., 2015; Shivaji i Dronamaraju, 2019). Potencijalni mehanizmi oksidativnog stresa izazvanog jonima Mn(II) uključuju povećanu proizvodnju $O_2^{\cdot-}$ u mitohondrijama zbog inhibicije fotosintetskog kompleksa I (Erikson i sar., 2004), povećanu proizvodnju $O_2^{\cdot-}$ i/ili singletnog kiseonika u hloroplastima zbog smetnji u ekspresiji i svetlost-zavisnog formiranja kompleksa koji oslobađa kiseonik u fotosistemu II (*oxygen-evolving complex*), koji sadrži Mn_4CaO_5 (Vinyard i sar., 2019; Rajpoot i sar., 2021) i proizvodnju H_2O_2 kroz aktivnost koordinovanog mangana koji oponaša aktivnost superoksid dismutaze (Culotta i Daly, 2013).

4.2.3.2. Određivanje koncentracije redukovanih tiola

Da bi se dobila kompletnija slika o redoks statusu mikroalgi, analizirana je koncentracija redukovanih tiola primenom biradikalnog spinskog obeleživača R_1S-SR_1 . Na slici 4.17. prikazana je promena unutarćelijske koncentracije redukovanih tiola kod *C. sorokiniana* nakon izlaganja 1 mM jonima Mn(II) tokom 24 h.



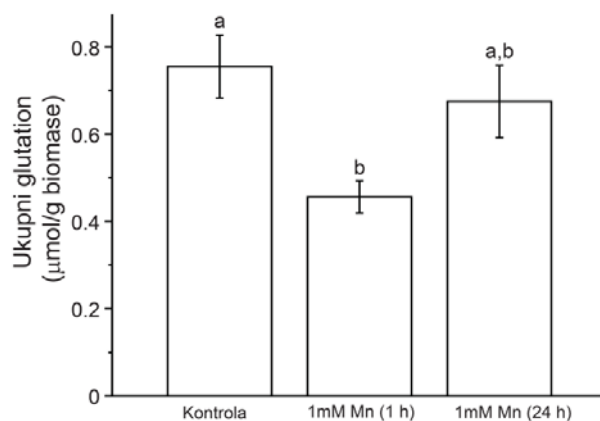
Slika 4.17. Promena unutarćelijske koncentracije redukovanih tiola kod *C. sorokiniana* tretiranih rastvorom jona Mn(II) (1 mM) tokom 24 h određena pomoću EPR metode i R_1S-SR_1 spinskog obeleživača. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SE. *- statistički značajno ($p < 0,05$) u poređenju sa početnom vrednošću (0 h), $n=3$.

Nakon 30 min i 2 h tretmana uočava se pad koncentracije redukovanih tiola. Ove fluktuacije u skladu su sa promenom nivoa ROS (odjeljak 4.2.3.1.) tj. porast nivoa ROS dovela je do oksidacije tiola u ćeliji. Nakon 24 h, koncentracija redukovanih tiola vratila se na početne vrednosti. Na osnovu navedenog može se zaključiti da su se mikroalge prilagodile prooksidativnim uslovima sredine.

Informacije o koncentraciji redukovanih tiola važne su za razumevanje redoks metabolizma mikroalgi. Smanjenje koncentracije redukovanih tiola u prvih 30 min tretmana može ukazivati na to da dolazi do oksidacije GSH ili glutathionilizacije proteina. Osim pomenutih, predloženi su i brojni drugi mehanizmi kao mogući putevi detoksikacije kod mikroalgi u odgovoru na stres (Bräutigam i sar., 2009). Na osnovi dobijenih rezultata može se zaključiti da je nivo oksidacije bio izraženiji u ranim fazama tretmana jonima Mn(II). Upoređivanjem rezultata o unutarćelijskim koncentracijama ROS i koncentraciji redukovanih tiola može se zaključiti da ove promene međusobno prate i da je vremenski okviri u kojem su se desile promena unutarćelijskog nivoa ROS i redukovanih tiola u skladu sa dobijenim SR-FTIR markerima oksidativnog stresa.

4.2.3.3. Koncentracija tGSH

Na slici 4.18. prikazani su rezultati koncentracije ukupnog glutationa (tGSH) kod kontrolnih (netretiranih) uzoraka mikroalgi *C. sorokiniana* i uzoraka tretiranih rastvorom 1 mM jona Mn(II) 1 h i 24 h.



Slika 4.18. Koncentracija ukupnog (oksidovanog + redukovano) glutationa kod kontrolnih (netretiranih) uzoraka *C. sorokiniana* i uzoraka tretiranih 1 mM jonima Mn(II) 1 h i 24 h: rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SE. Slova iznad stubića ukazuju na statistički značajne razlike između uzoraka ($p < 0,05$) dobijene ANOVA i post hoc Dankanovim testom, $n = 3$.

Koncentracija ukupnog glutationa, koji je ključni redoks pufer u mikroalgama (Balzano i sar., 2020), kod tretiranih uzoraka mikroalgi razlikovala se u odnosu na kontrolne uzorke. Kako se može videti sa grafika nakon 1 h dolazi do pada koncentracije tGSH ($0,47 \pm 0,07 \mu\text{mol/g}$ biomase), a zatim, nakon 24 h, povratka na vrednosti koje su približne kontrolnim ($0,67 \pm 0,08 \mu\text{mol/g}$). Kod kontrolnih uzoraka vrednosti za tGSH bile su $0,78 \pm 0,1 \mu\text{mol/g}$.

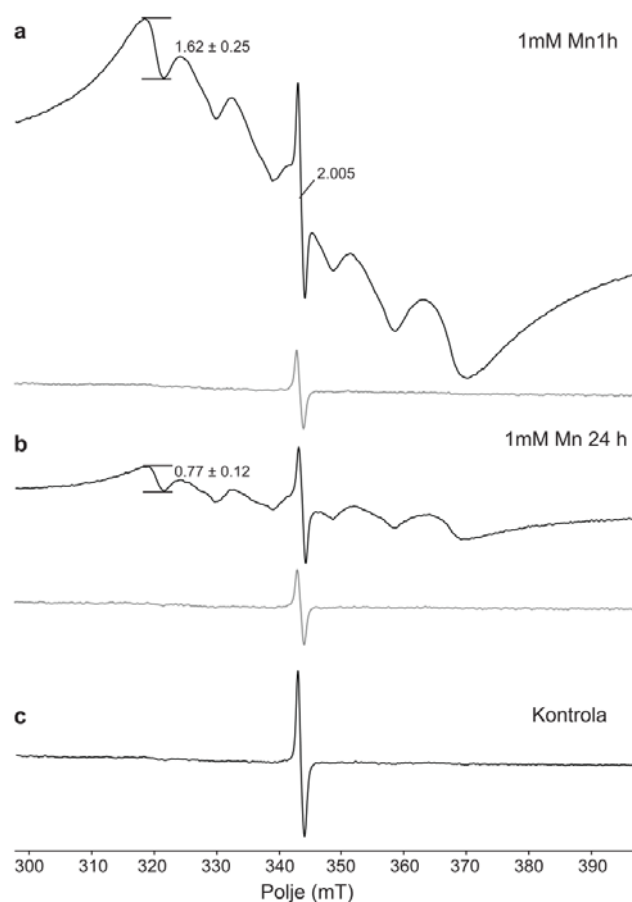
U eukariotskim ćelijama GSH ima ulogu u odbranu od oksidativnog stresa (Meister i Anderson, 1983). Takođe je poznato i da GSH igra važnu ulogu i u procesu detoksikacije metala kod algi. Povećane koncentracije jona Mn(II) mogu se akumulirati unutar ćelija što dovodi do aktivacije brojnih odbrambenih unutarćelijskih mehanizama (Ahner i sar., 2002). Pad koncentracije tGSH koja se javlja kao posledica stresa može biti uzrokovan degradacijom glutationa, glutationilacijom proteina ili sintezom fitohelatina (oligomera glutationa) (Zaffagnini i sar., 2012, Balzano i sar., 2020, Bachhawat i Kaur, 2017). Glutacionilacija proteina je redoks post-translaciona modifikacija koja se javlja u uslovima oksidativnog stresa, odnosno, povećane koncentracije ROS (Rouhier i sar., 2008), kako je pokazano i kod *C. reinhardtii* (Zaffagnini i sar., 2012). GSH je takođe i prekursor za sintezu fitohelatina (Le Faucheur i sar., 2006), koji imaju važnu ulogu u procesu adaptacije alge na stres. Imajući u vidu da fitohelatini predstavljaju uobičajenu komponentu mehanizama odgovora mikroalgi na višak metala (Balzano i sar., 2020), indukcija sinteze fitohelatina u tretmanu može biti povezan sa smanjenjem koncentracije tGSH. S druge strane, glutacionilacija ili degradacija glutationa bi rezultirala padom redukovanih tiola nakon 1 h, što ovde nije bio slučaj. Porast koncentracije tGSH nakon tretmana od 24 h u odnosu na 1 h ukazuje na smanjenje unutarćelijskog oksidativnog stresa, odnosno, može se objasniti prilagođavanjem mikroalge na stresne uslove sredine. Pokazano je da nivo ROS i proizvodnja fitohelatina zavisi od toga da li su ćelije izložene abiotičkom stresu akutno (< od 24 h) ili hronično (24 - 48 h) (Smith, 2014). Hronična izloženost ćelija algi stresnim uslovima dovodi do pojačane antioksidativne odbrane kako bi se popravila neravnoteža u koncentraciji ROS izazvana oksidativnim stresom. Takođe, proizvodnja fitohelatina u algama je fenomen koji je vrlo specifičan za vrstu (Pawlik-Skowrońska i sar., 2007).

Dobijeni rezultati ukazuju na uključenost GSH u antioksidativni odgovora kod mikroalge *C. sorokiniana* kao posledica stresa izazvanog povećanim koncentracijama jona Mn(II).

4.2.4. Redoks stanje jona mangana u biomasi mikroalgi

4.2.4.1. EPR analiza interakcija jona Mn(II) sa biomasom mikroalgi

Koordinaciono vezivanje jona Mn(II) za strukturne polimere ćelijskog zida i mukusa kod *C. sorokiniana* ispitano je primenom EPR spektroskopije. Na slici 4.19. predstavljeni su EPR spektri biomase mikroalgi tretirane rastvorom jona Mn(II) koncentracije 1 mM, 1 h i 24 h.



Slika 4.19. EPR spektri kontrolnih (netretiranih) i tretiranih uzorka mikroalgi *C. sorokiniana*: (a) uzorci mikroalgi tretirani rastvorom jona Mn(II) (1 mM), tokom 1 h (b) uzorci mikroalgi tretirani rastvorom jona Mn(II) (1 mM), tokom 24 h, (c) kontrola. Pre liofilizacije uzorci su isprani dejonizovanom vodom (crni spektri) ili sa EDTA (sivi spektri). Parametri snimanja bili su: atenuacija 20 dB; modulaciona amplituda 0,4 mT; vreme skeniranja 2 min. Na slici su prikazane srednje vrednosti (\pm SE) amplitude prve linije u signalu Mn(II) od šest linija koje su normalizovane na masu uzorka. Maksimum na $g=2,005$ dolazi od organskih radikala.

EPR metoda primenjena je u cilju procene količine slabo vezanih jona Mn(II) sa ćelijama mikroalgi. Čvrsto vezani Mn(II) se ne može opisivati EPR-om zbog anizotropije cepanja pri nultom polju (*zero-field splitting anisotropy*) koja je izražena zbog gubitka slobodne rotacije Mn(II) čvrsto vezanog za velike molekule i supramolekulske strukture, a sve to u kombinaciji sa velikim brojem prelaza, odnosno linija (Sigel i Sigel, 2020). Valja napomenuti da u ovde primenjenim uslovima, EPR ne može da detektuje Mn(III) i Mn(IV). Ova karakteristika čini EPR tehniku dobrim alatom za analizu svojstava kompleksa mangana sa ligandima od biološkog interesa (Freire-Nordi i sar., 2005).

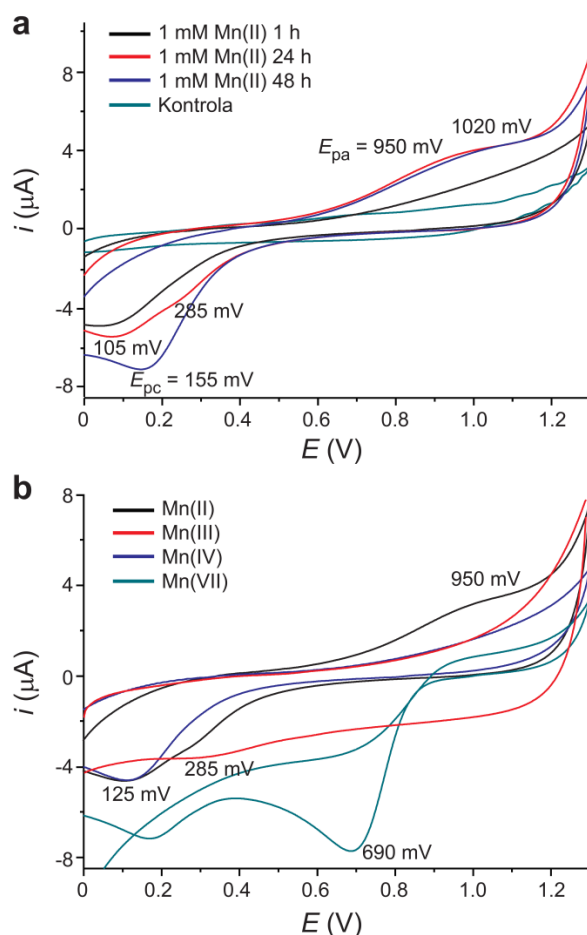
Na sobnoj temperaturi u vodenom rastvoru Mn(II) ima karakterističan EPR spektar od 6 linija koje odgovaraju hiperfinoj interakciji između nesparenih elektronskih spinova, $S=5/2$ i spina jezgra, $I=5/2$. Uzorci mikroalgi nakon tretmana Mn(II) isprani su vodom ili sa 20 mM ekstracelularnim agensom za helatiranje metala - EDTA. Upoređivanjem spektara može se zaključiti da kod tretiranih uzoraka koji su isprani sa EDTA (slika 4.19a i b, sivi spektri) dolazi do gubitka karakterističnog signala za Mn(II), odnosno da je isti kao kod kontrolnih uzoraka (slika 4.19c). Poređenjem amplituda linija karakterističnih za

Mn(II) može se videti da je nakon 24 h količina ovako vezanog Mn(II) manja u odnosu na 1 h (slika 4.19a i b, crni spektri).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da u prvih sat vremena mangan nije čvrsto vezan za polimere mukusa i/ili polimere ćelijskog zida i da se lako može ukloniti pomoću helirajičih agensa (Schencki sar., 1988.). Kod tretmana od 24 h, joni mangana transportovani su u unutrašnjost ćelije ili su čvršće vezani za polimere ćelijskog zida i mukusa, ili je došlo do promene redoks stanja mangana i samim tim ne mogu biti detektovani EPR-om. Literaturni podaci ukazuju na to da se tokom brzog usvajanja mangana od strane ćelija mikroalgi *C. sorokiniana* tokom 1 h veći deo apsorbovao na površini ćelije i da se odnos jona Mn(II) unešenih u unutrašnjost ćelija povećava tokom vremena (Nakajima i sar., 1979).

4.2.5. Analiza promene redoks stanja jona mangana

Kao što je rečeno, EPR metoda u ovde primenjenoj postavi ne može da detektuje druga oksidaciona stanja mangana, osim Mn(II). Zato je primenjena ciklična voltometrija na kiselim ekstraktima biomase algi tretiranih sa Mn(II). Na slici 4.20. prikazani su dobijeni ciklični voltamogrami koji pokazuju promenu redoks stanja mangana akumuliranog u ćelijama *C. sorokiniana* nakon tretmana 1 mM Mn(II) tokom 1 h, 24 h i 48 h.



Slika 4.20. Ciklični voltamogrami jona mangana u 5% HNO_3 (v/v): (a) ekstrakt biomase mikroalgi tretiranih rastvorom jona Mn(II) koncentracije 1 mM tokom 1 h, 24 h i 48 h, (b) standardi jona Mn(II) , Mn(III) , Mn(IV) i Mn(VII) (MnCl_2 , Mn_2O_3 , MnO_2 i KMnO_4), koncentracije 1 mM. Oksidacioni/anodni i redukcionni/katodni potencijal (E_{pa} i E_{pc}) na kojima se pojavljuju strujni pikovi označeni su na voltamogramima.

Da bi se iz biomase mikroalgi, koje su tretirane sa 1 mM Mn(II) tokom 1 h, 24 h ili 48 h, vezani magan oslobodio korišćena je 5% azotna kiselina. Dobijeni voltamogrami uzoraka mikroalgi upoređeni su sa referentnim voltamogramima standardnih rastvora jedinjenja mangana različitih redoks stanja (Mn(II) , Mn(III) , Mn(IV) i Mn(VII)) (slika 4.20b). Voltamogram Mn(II) pokazao je sledeće pikove: (i) široki oksidacioni pik ($E_{pa} = 950$ mV), što se može objasniti oksidacijom Mn(II) do Mn(III) i Mn(IV) ; (ii) dva redukciona pika sa E_{pc} na 285 mV, koji potiče od redukcije Mn(III) , i na 125 mV. Ovi isti pikovi su uočeni u voltamogramima soli mangana sa oksidacionim stanjem Mn(III) i Mn(IV) , (Mn_2O_3 i MnO_2). Voltamogram koji predstavlja Mn(VII) pokazao je karakterističan redukcionni pik na $E_{pc} = 690$ mV. Redoks oblik mangana u biomasi mikroalgi menjao se u zavisnosti od dužine tretmana (slika 4.20a). Nakon inkubacije od 1 h, voltamogram je pokazao slabe strujne pikove na potencijalima koji su karakteristični za Mn(II) . Nakon tretmana od 24 h struje Mn(II) bile su mnogo jače, što je u skladu sa akumulacijom mangana u ćelijama mikroalgi, kako je pokazano i EDS analizom (odjeljak 4.2.2.1). Nije se moglo isključiti ni prisustvo drugih struja. Nakon 48 h došlo je do drastične promene u redoks stanju mangana. Široki pik koji predstavlja oksidacionu struju pomeren je sa 950 mV na 1020 mV, dok se jak redukcionni pik uočava na $E_{pc} = 155$ mV. Ovaj potencijal se

nalazi između E_{pc} za Mn(III) i Mn(IV). Dobijeni rezultati ukazuju na to da u ranoj fazi mikroalge vezuju mangan u obliku Mn(II), ovo je Mn(II) koji je slabo vezan za mukus i ćelijski zid, uočen EPR spektroskopijom. U kasnijoj fazi mikroalge skladište mangan u obliku jona Mn(II) ali i u nekom drugom redoks obliku koji uključuje Mn(III) ili Mn(IV). Dobijeni rezultati su u skladu sa ranijim nalazima po kojima usvajanje mangana od strane mikroalgi podrazumeva višefazni proces. Za *C. reinhardtii* je uočeno da se Mn(II) prvo vezuje za ćelijski zid i membranu, da bi se zatim vezao za sintetisane polifosfate koji ga akumuliraju u acidokalcizomima (raniji naziv fosfatna tela) (Tsednee i sar., 2019; Schmollinger i sar., 2021). Međutim, ustanovljeno je da polifosfati predstavljaju privremene ligande za mangan koji ga isporučuju do finalnih liganda odnosno depozita (Tsednee i sar., 2019). Ranije studije koje su kombinovale TEM mikroskopiju sa metodama za analizu metala, pokazale su da se metali mogu akumulirati u ćelijskom zidu, skrobnim zrnima, hloroplastima, vakuolama, vezikulama sa mukusom, acidokalcizomima i autofagozomima (Volland i sar., 2011). Ovde prikazani rezultati ukazuju da je put mangana u *C. sorokiniana* sličan i da uključuje prvo samo vezivanje, zatim internalizaciju odnosno ligandiranje u ćeliji u formi Mn(II) sa verovatnom ulogom akumuliranih polifosfata, koji nisu finalni ligand, već dolazi do oksidacije Mn(II) i formiranja depozita. Redoks procesi predstavljaju važan deo mehanizama interakcije mikroalgi sa prelaznim metalima. Kod mikroalgi, koje mogu da oksiduju mangan, uočeno je da dolazi do oslobađanja mukusa i da je pojava fosfora u mukusu u korelaciji sa pojavom mangan oksida (Chaput i sar., 2019), što je u skladu sa našim rezultatima dobijenim na EDS-u.

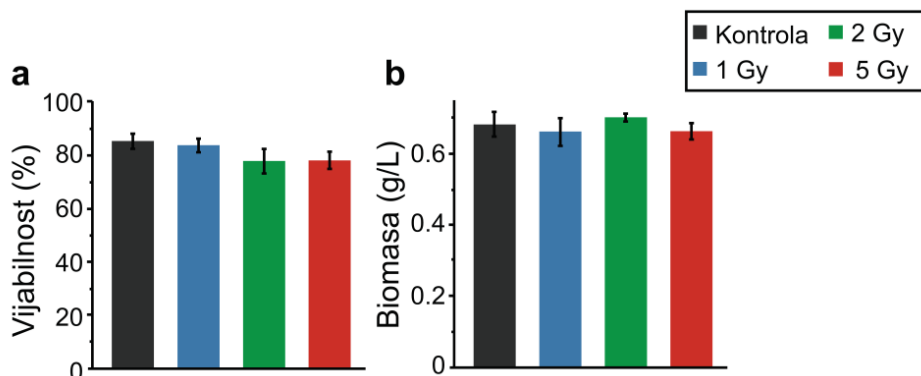
4.3. Efekat jonizujućeg zračenja na hemijske i strukturne promene ćelijskog zida *C. sorokiniana*

Dalje je bilo od interesa ustanoviti kako drugi stresori utiču na interakcije *C. sorokiniana* sa jonima Cu(II) i Mn(II), odnosno koji su mehanizmi kros-adaptacije. Kao česti stresor koji prati visoke koncentracije metala, jonizujuće zračenje je bilo od posebnog interesa. Ekosistemi su često izloženi jonizujućem zračenju koje potiče iz prirodnih izvora poput prirodnih radionuklida koji se nalaze u zemljištu i stenama kao i iz antropogenih izvora (UNSCEAR, 2008).

4.3.1. Određivanje optimalnih doza jonizujućeg zračenja

Kako bi se odredile optimalne doze i brzina zračenja, koje ne dovode do lize ćelija i značajnih oštećenja mikroalgi, prvo su ispitani efekti X-zračenja u širem opsegu (do 10-100 Gy) na vijabilnost ćelija i biomasu. Apsorbovane doze zračenja od strane uzorka su bile oko 10 puta manje od oslobođenih, odnosno: 1,09 Gy, 2,21 Gy, 5,45 Gy. Da bi se

pojednostavilo objašnjenje, navedene doze pisane se zaokrugljenim vrednostima 1 Gy, 2 Gy i 5 Gy. Rezultati su predstavljeni za one doze koje su se pokazale kao neletalne za *C. sorokiniana* (slika 4.21).

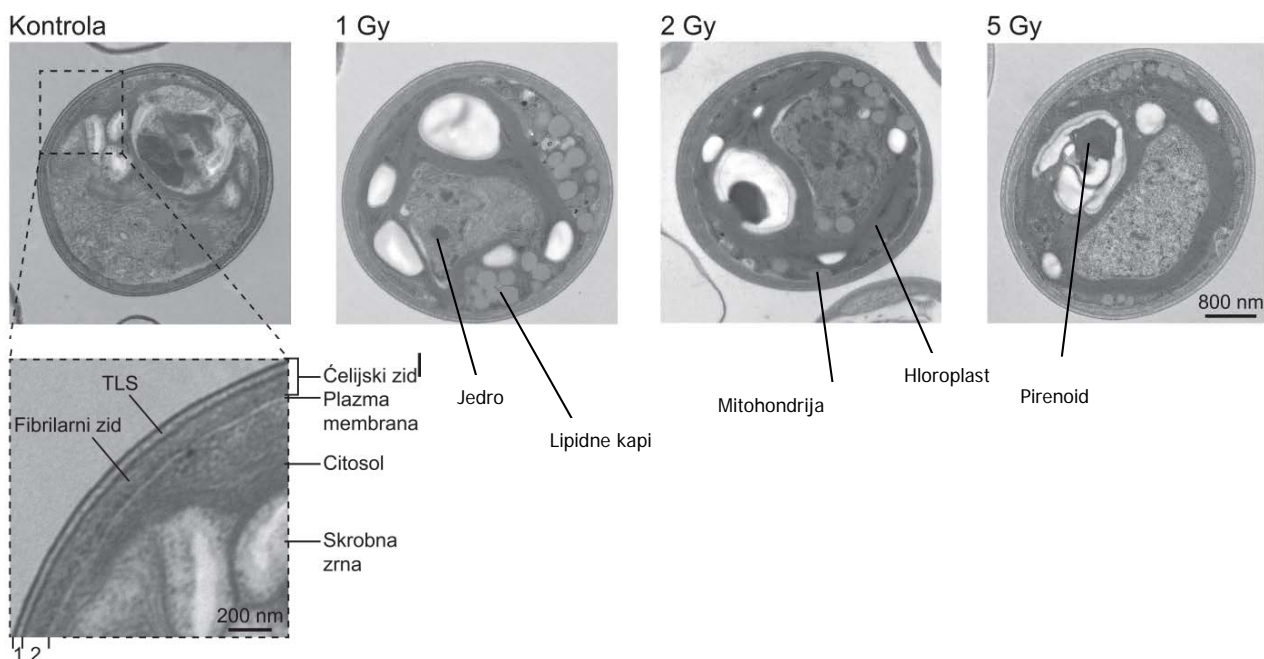


Slika 4.21. Trend vijabilnosti i biomase *C. sorokiniana* 24 h nakon ozračivanja: (a) vijabilnost, (b) biomasa. Primjenjene apsorbirane doze jonizujućeg zračenja (brzine ozračivanja) bile su: 1 Gy (0,25 Gy/min), 2 Gy (0,25 Gy/min), i 5 Gy (0,55 Gy/min). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SE, $n=4$.

Uzorci mikroalgi zračeni su u ranoj stacionarnoj fazi (dan 20 od zasejavanja), trend parametara koji pokazuju rast i održivost ćelija mikroalgi (biomasa i vijabilnost) analizirani su jedan dan nakon ozračivanja u cilju detektovanja brzine adaptivnog odgovora na jonizujuće X-zračenje. Kako se može videti na grafiku primenjene doze od 1, 2 i 5 Gy, nisu dovele do značajnih promena vijabilnosti ćelija kao odgovor na zračenje: vrednosti za kontrole bile su $90,8 \pm 0,7\%$; za alge izložene dozi od 1 Gy $84,1 \pm 4,1\%$; za 2 Gy $74,7 \pm 1,4\%$; i za 5 Gy $75,4 \pm 1,1\%$. Biomasa se takođe nije izmenila.

4.3.2. Analiza strukture ćelijskog zida -TEM miroskopija

U cilju utvrđivanja ultrastrukturne promene koje nastaje kao posledica delovanja jonizujućeg X-zračenja korišćena je TEM miroskopija. Na slici 4.22. prikazane su TEM mikrografije kontrolnih (nezračenih) ćelija i ćelija *C. sorokiniana* na koje su primenjene različite doze X-zračenja.

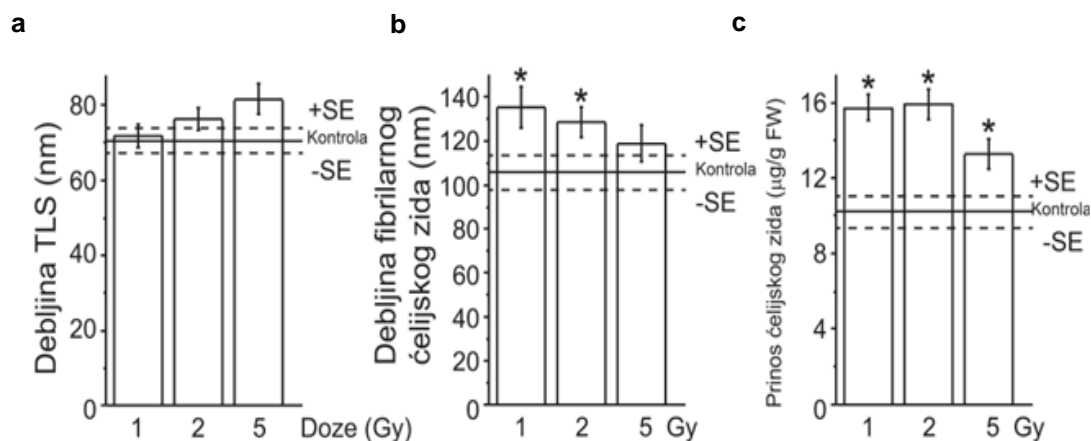


Slika 4.22. TEM mikrografije ćelija *C. sorokiniana*: kontrolne ćelije i ćelije izložene različitim dozama X-zračenja. Analize su rađene 24 h nakon tretmana zračenjem. Jasno se može uočiti da struktura ćelijskog zida ima dva sloja: trilaminarni spoljni sloj (obeležen sa 1) i unutrašnji fibrilarni sloj (2).

Na poprečnom preseku ćelija mikroalgi *C. sorokiniana* može se uočiti ćelijski zid i membrana, dok se u citoplazmi mogu uočiti: jedro, skrobna zrna, hloroplast, lipidne kapi, mitohondrije i pirenoid (slika 4.22). Kao posledica delovanja X-zračenja kod mikroalgi *C. sorokiniana* mogu se javiti brojne ultrastrukturne promene. Upoređivanjem kontrolnih i ozračenih ćelija mikroalgi može se zaključiti da dolazi do zadebljavanja ćelijskog zida i povećanja broja i veličine skrobnih zrna i lipidnih kapi kod ozračenih ćelija u odnosu na kontrolne.

Očuvana struktura organela i ćelijskog zida ukazuju da nije došlo do destrukcije ćelije pod uticajem primenjenih doza jonizujućeg zračenja (Pacelli i sar., 2017). Čelijski zid *C. sorokiniana* sastoji se od TLS-a i fibrilarnog sloja zida što se može uočiti i na našim mikrografijama (slika 4.22). TLS pojavljuje se kao prozirna traka umetnuta između dve sloja veće elektronske gustine: spoljašnjeg i unutrašnjeg. Spoljašnji sloj predstavlja zreli zid mikroalge i javlja se u ranoj fazi rasta ćelije, dok tanak unutrašnji sloj predstavlja novosintetisani zid i javlja se u kasnijoj fazi rasta. Fibrilarni sloj nalazi se između TLS-a i plazma membrane (Baudelet i sar., 2017).

Na slici 4.23. predstavljene su promene u debljini TLS-a, promene u debljini fibrilarnog sloja ćelijskog zida i ukupnog prinosa izolovanog ćelijskog zida tretiranih uzoraka *C. sorokiniana* u odnosu na kontrolne.



Slika 4.23. Analiza parametara ćelijskog zida: (a) podaci o debljini TLS, (b) podaci o debljini fibrilarnog sloja, (c) prinos ćelijskog zida ($\mu\text{g/g}$ sveže mase). Srednje vrednosti kontrolnih uzoraka prikazane su kao puna linija \pm SE (isprekidana linija). Statistička značajnost - * $p < 0,05$, $n = 4$.

Može se zaključiti da zračenje nije izazvalo značajne promene u debljini TLS-a kod ozračenih uzoraka u odnosu na kontrolne (slika 4.23a). S druge strane, debljina fibrilarnog sloja ćelijskog zida značajno je povećana kod onih uzoraka kod kojih je primenjena doza od 1 i 2 Gy. Promena fibrilarnog sloja ćelijskog zida nakon zračenja, kod uzoraka koji su bili ozračeni dozom od 5 Gy nije bila statistički značajna (slika 4.23b). U skladu sa ovim opažanjima, ukupan prinos ćelijskog zida povećan je za $\sim 50\%$ u ozračenim mikroalgama (slika 4.23c).

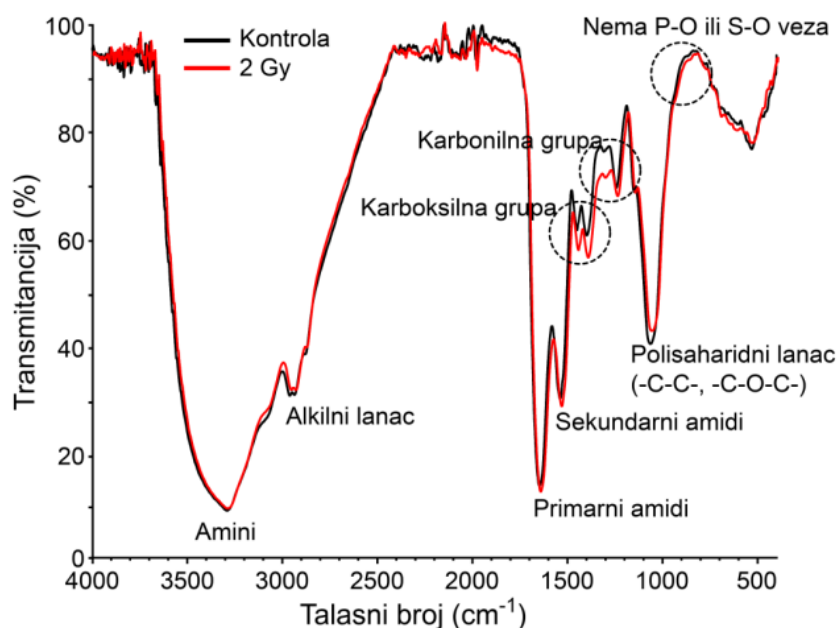
Debljina ćelijskog zida važan je biološki i tehnološki parametar. Ćelijski zid pruža hemijsku (uključujući antioksidativnu) i mehaničku zaštitu od okoline i utiče na ekstrakciju lipida i pigmenata kao i na druga industrijski značajna svojstva biomase mikroalgi (Baudalet i sar., 2017; Jeong i sar., 2017b; Anto i sar., 2020). Proces zadebljavanja ćelijskog zida uobičajeni je odgovor mikroalgi na različite stresore iz okoline (Beacham i sar., 2014; Yap i sar., 2016; Jeong i sar., 2017b). Zabeleženo je da izlaganje mikroalge roda *Nannochloropsis* stresnim uslovima (kao što je smanjena koncentracija azota) rezultira zadebljanjem unutarćelijskog omotača izgrađenog od celuloze (strukturnog polimera koji se odlikuje velikom otpornošću) i koji je sastavni deo dvoslojnog ćelijskog zida ovih algi (Jeong i sar., 2017b.). Ovakva zapažanja u skladu su sa našim rezultatima dobijenim za *C. sorokiniana* na koje je primenjeno jonizujuće X-zračenje.

4.3.3. Promene u hemijskom sastavu ćelijskog zida kao posledica delovanja X- zračenja

U cilju ispitivanja promena koje nastaju u ćelijskom zidu kao posledica izlaganja mikroalgi jonizujućem zračenju urađena je izolacija ćelijskog zida. U narednim poglavljima opisani su eksperimenti rađeni na izolovanim frakcijama ćelijskog zida mikroalge *C. sorokiniana*.

4.3.3.1. FTIR analiza promena hemijskog sastava izolovanog ćelijskog zida

Kako bi se razumele promene u hemijskoj strukturi ćelijskog zida kod *C. sorokiniana* nakon primene jonizujućeg zračenja korišćena je FTIR metoda. Na slici 4.24. prikazani su FTIR spektri izolata ćelijskog zida kontrolnih uzoraka i uzoraka mikroalgi ozračenih dozom od 2 Gy pri brzini od 2,290 Gy/min. Ova doza je izabrana jer je dovela do najvećih promena u smislu povećanja prinosa izolovanog ćelijskog zida.



Slika 4.24. FTIR spektri izolata ćelijskog zida *C. sorokiniana*. Na slici su predstavljeni rezultati za nezraćene (kontrolne) uzorke i uzorke ozraćene dozom od 2 Gy. Krugovi oznaćavaju podrućja od interesa.

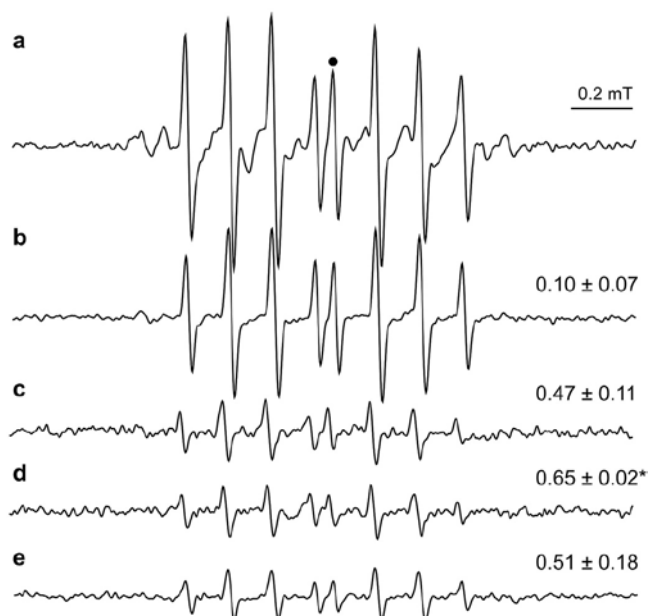
FTIR spektri snimljeni su u opsegu od 4000 cm^{-1} do 400 cm^{-1} . Uoćene apsorpcijske trake na 3290, 2940, 1645, 1535, 1446, 1385, 1237, 1147 i 1055 cm^{-1} mogu se povezati sa razlićitim funkcionalnim grupama prisutnim u ćelijskom zidu *C. sorokiniana*: traka uoćena na 3290 cm^{-1} moće se povezati sa istezanjem N-H grupa u glukozaminu i O-H i C-O grupa u neutralnim šećerima (Petrović i Simonić, 2016). Trake uoćene na 1645, 1535 i 1055 cm^{-1} potiću od polisaharida slićnog hitozanu (Dmytryk i sar., 2014). Trake na 1446 i 1385 cm^{-1} potiću od karboksilne i karbonilne grupe (Driver i sar., 2015), dok se trake na 1243 i 1147 cm^{-1} mogu povezati sa asimetrićnim istezanjem C-O / C-O-C veza kod estara (Venkatesan i sar., 2011).

Neznatne promene intenziteta traka koje potiću od hitozana i neutralnih šećera u skladu su sa rezultatima dobijenih TEM mikroskopijom za promenu debljine TLS ćelijskog zida izgrađenog od glukozamina. Traka na 1055 cm^{-1} bila je slabijeg intenziteta kod ozraćenih uzoraka mikroalgi. Smatra se da ona moće da potiće od raskidanja polimernih

lanaca izazvanih oksidacijom (Wasikiewicz i sar., 2005). Trake dobijene za karboksilne i karbonilne grupe bile su jačeg intenziteta kod ozračenih uzoraka ćelijskog zida mikroalgi. To implicira da *C. sorokiniana* akumulira uronske kiseline kao odgovor na stres izazvan jonizirajućim zračenjem, što dovodi do zaključka da se promena u debljini fibrilarnog sloja ćelijskog zida uočena na TEM mikrografijama posledica sintetisanja uronske kiseline kod *C. sorokiniana*. Ova zapažanja u skladu su sa podacima poznatim od ranije, koji kažu da kod *Chlorella* uronska kiselina ima ulogu u odgovoru na stres, kao što su npr. povećanje koncentracije jona metala (Mangi i Schumacher, 1979). Promena intenziteta traka koje odgovaraju fosforilnoj ili sulfatnoj grupi kod ozračenih u odnosu na kontrolne uzorke nisu uočene, što govori u prilog tome da je ćelijski zid dobro izolovan i da nema signala tipičnih za proteine. Kako je već napomenuto, sastav ćelijskog zida *C. sorokiniana* nije u potpunosti poznat i često može varirati u okviru istog roda algi. Dobijeni rezultati FTIR analize u skladu su sa dostupnim podacima o sastavu ćelijskog zida kod algi roda *Chlorella* navodeći da se ćelijski zid ovih algi sastoji od "krutog sloja zida" koji predstavlja ovojnicu u TLS-u, koja sadrži glukozamin i N-acetilglukozamin u obliku polimera sličnom hitozanu (Baudelet i sar., 2017). Dok se čvrsti polimerni matriks (fibrilarni sloj zida), sastoji se od ramnoze, galaktoze, uronskih kiselina (glukuronska kiselina kod *C. sorokiniana*), arabinoze, manoze i drugih šećera (Takeda, 1991; Russell, 1997; Baudelet i sar., 2017). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ne dolazi do formiranja novih funkcionalnih grupa kao posledica izlaganja mikroalge *C. sorokiniana* jonizujućem X-zračenju već samo do povećanja broja već postojećih grupa, što je u skladu sa povećanjem same debljine ćelijskog zida.

4.3.3.2. EPR analiza antioksidativne aktivnosti ćelijskog zida

Uticaj jonizujućeg zračenja na sposobnost ćelijskog zida *C. sorokiniana* da ukloni HO•, ispitan je EPR spektroskopijom (slika 4.25).



Slika 4.25. EPR spektri DEPMPO spin-adukta sa radikalom HO• (proizveden u Fentonovoj reakciji 1 mM Fe(II) + 3 mM H₂O₂), koji nastaju u odsustvu ili u prisustvu izolata ćelijskog zida: (a) Fentonova reakcija, crni krug - amplituda ovog vrha korišćena je za izračunavanje antioksidativnog kapaciteta, (b) ćelijski zid netretiranih algi (kontrola), (c) ćelijski zid algi izložen zračenju od 1 Gy, (d) ćelijski zid algi izložen zračenju od 2 Gy, (e) ćelijski zid algi izložen zračenju od 5 Gy. Antioksidativni kapacitet predstavljen je kao srednja vrednost ± SE. * - statistički značajno u odnosu na Fentonovu reakciju ($p < 0,05$), $n = 3$. Brojevi na zapisima označavaju smanjenje amplitude odabranog vrha.

Analiza antioksidativnog kapaciteta izolovanog ćelijskog zida rađena je primenom DEPMPO spinskog hvatača. Dobijene vrednosti smanjenja amplitude DEPMPO - OH spin adukta za kontrolne uzorke bila je $0,10 \pm 0,07$, za uzorke ozračene dozom od 1 Gy: $0,47 \pm 0,11$; za 2 Gy: $0,65 \pm 0,02$ i za 5 Gy: $0,51 \pm 0,18$. Doza od 2 Gy indukovala je statistički značajno povećanje kapaciteta antioksidativne aktivnosti ćelijskog zida mikroalgi. Upoređivanjem spektara dobijenih za Fentonovu reakciju sa spektrima dobijenim za kontrolne i ozračene uzorke, može se zaključiti da kod ozračenih uzoraka dolazi do smanjenja intenziteta spektra u odnosu na kontrole i na Fentonovu reakciju, što implicira da izloženost alge *C. sorokiniana* jonizujućem zračenju dovodi do značajnog povećanja antioksidativnog kapaciteta ćelijskog zida.

Kao posledica radiolize vode dolazi do formiranja HO• radikala (LaVerne, 2000). Biljke se „oslanjaju“ na neenzimsku antioksidativnu odbranu od radikala HO•, poput ugljenih hidrata i polimera prisutnih u ćelijskom zidu (Spasojević i sar., 2009; Bogdanović

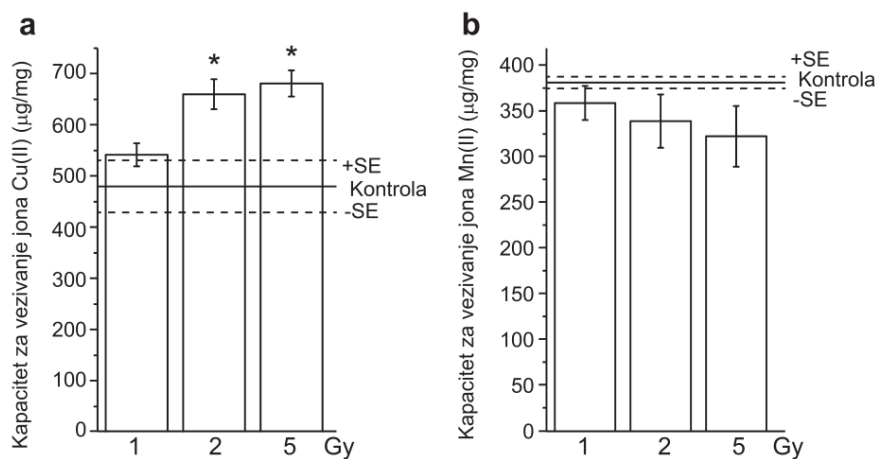
Pristov i sar., 2011). Kako kod algi ne postoje enzimski sistemi za uklanjanje ovog radikala, smatra se da polisaharidi imaju tu ulogu kod *Chlorella* (Yuan i sar., 2020), a povećani antioksidativni kapacitet može se objasniti povećanim udelom uronskih kiselina u ćelijskom zidu algi (He i sar., 2016). Brojna istraživanja otkrila su da su makromolekuli bogati uronskom kiselinom, poput ksilana (glukuronska kiselina) i pektina (galakturonska kiselina), osetljivi na interakcije sa radikalima, uključujući i radikal HO• (Akhlaq i sar., 1990; Fry, 1998; Zegota, 2002). U studiji antioksidativnih aktivnosti polimera ćelijskog zidakod biljaka zaključeno je da su pektin i ksilan najefikasnija sredstva za uklanjanje radikala HO• (Bogdanović Pristov i sar., 2011). Alternativno, veći antioksidativni kapacitet može biti povezan sa fragmentacijom polimera sličnog hitozanu izazvanom zračenjem. Nekoliko studija pokazalo je da takva fragmentacija rezultira poboljšanim antioksidativnim svojstvima (Feng i sar., 2008; Chmielewski, 2010; Abd El-Rehim i sar., 2012.; Muley i sar., 2019). Poznato je da sa smanjenjem molekulske mase hitozana i njegovih derivata, raste antioksidativna aktivnost, što je povezano sa povećanom rastvorljivošću fragmenata hitozana u odnosu na polimer veće molekulske mase (Chmielewski, 2010). Uočeni porast biomase i antioksidativnog kapaciteta ćelijskog zida *C. sorokiniana* predstavlja brzi mehanizam prilagođavanja koji može objasniti prethodna zapažanja da su mikroalge manje osetljive na hronične nego na akutne izloženosti jonizirajućem zračenju (Fuma i sar., 2012.).

4.4. Vezivanje jona Cu(II) i Mn(II) za polimere izolovanog ćelijskog zida

Primenjene doze jonizujućeg X-zračenja od 1 Gy, 2 Gy i 5 Gy, koje su se pokazale kao neletalne za *C. sorokiniana* i koje su dovele do promene u debljini ćelijskog zida, korišćene su u narednim eksperimentima za analizu promene kapaciteta vezivanja teških metala za polimere izolovanog ćelijskog zida kod *C. sorokiniana*.

4.4.1. Kapacitet polimera izolovanog ćelijskog zida za vezivanja jona metala

Na slici 4.26. prikazani su grafici koji predstavljaju kapacit ćelijskog zida za vezivanje jona Cu(II) i Mn(II).



Slika 4.26. Kapacitet izolata ćelijskog zida *C. sorokiniana* za vezivanje jona metala: (a) Cu(II), (b) Mn(II). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost u odnosu na kontrole. Srednje vrijednosti kontrola prikazane su kao puna linija \pm SE (isprekidana linija). * - statistička značajnost u odnosu na nezračene kulture ($p < 0,05$), $n = 3$.

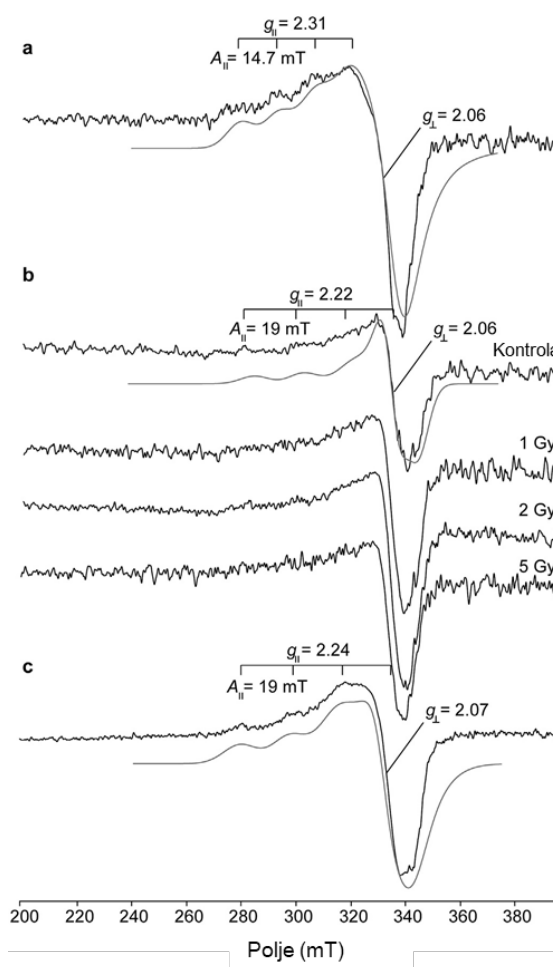
Dobijeni vrednosti za kontrolne uzorke bili su: 480 $\mu\text{g}/\text{mg}$ za Cu(II) i 380 $\mu\text{g}/\text{mg}$ za Mn(II). Jonizujuće zračenje je kod kulture *C. sorokiniana* izazvalo značajano povećanje sposobnosti ćelijskog zida da veže jone Cu(II) (slika 4.26a), dok su kapaciteti za vezivanje jona Mn(II) ostali nepromenjeni (slike 4.26b).

Pripadnici roda *Chlorella*, koja ima izuzetan ekološki i ekonomski značaj, a koja uključuje i *C. sorokiniana*, su u različitim studijama pokazali visok potencijal za akumuliranje različitih jona metala poput bakra, kadmijuma, nikla pa čak i uranijuma (Wilde i Benemann, 1993). Iako su iznete pretpostavke da je ćelijski zid odgovoran za najveći deo kapaciteta mikroalgi za akumulaciju metala (Wehrheim i Wettern, 1994), do ove studije nije postojao direktan dokaz na izolovanom ćelijskom zidu. Postoji niz podataka o kapacitetu vezivanja jona metala za netretiranu biomasu mikroalgi (Wilde i Benemann, 1993; Mehta i Gaur, 2005), koji su bili niži nego što je navedeno u ovoj doktorskoj disertaciji. Na primer, kapacitet biomase mikroalge *C. vulgaris* za vezivanje jona Cu(II) kretao se od 0,01 do 0,19 mg/mg u prethodnim studijama (Mehta i Gaur, 2005). Naši rezultati u skladu su sa podacima koji identifikuju ćelijski zid kao glavnu biosorpcionu komponentu biomase mikroalgi (Horikoshi i sar., 1979; Klimmek i sar., 2001; Mehta i Gaur, 2005). Veći afinitet ćelijskog zida za vezivanje jona Cu(II) od jona Mn(II) verovatno je povezan sa razlikama u koordinacionoj hemiji ovih metala. Prema HSAB teoriji, Cu(II) je granična kiselina, dok je Mn(II) tvrda kiselina (Hancock i Martell, 1996). To znači da preferiraju različite vrste liganada, odnosno mesta vezivanja za polimere ćelijskog zida. Povećanje kapaciteta vezivanja jona Cu(II) nakon zračenja može biti povezano sa prilagođavanjem mikroalgi na ekstremne uslove sredine. Pokazano je da radiološku kontaminaciju vodenih ekosistema obično prati i zagađenje metalima, uključujući i bakar, i obrnuto, otpadne vode iz rudnika bakra obično pokazuju povećan nivo radioaktivnog zračenja (Dessouki i sar., 2005; Fuma i sar., 2012.). Postoje brojna istraživanja koja se zasnivaju na upotrebi biomase mikroalgi kao biosorbenta za sanaciju rudarskih, industrijskih i radioaktivnih otpadnih voda (Dessouki, 2005; Kaplan, 2013; Bradshaw i sar., 2019), međutim, ovaj vid biosorbenta zahteva dodatna ispitivanja. Naši rezultati

impliciraju da bi se primena mikroalgi u tehnologiji biosorbenta mogla poboljšati primenom izolovanih frakcija ćelijskog zida kao sorbenta, a ne kao živih ćelija. Međutim, komercijalna strana prerade biomase se takođe mora proceniti i uzeti u obzir.

4.4.2. EPR analiza interakcije jona Cu(II) sa polimerima ćelijskog zida

Kako bi se ispitala redoks svojstva jona Cu(II) vezanih za polimere ćelijskog zida korišćena je EPR spektroskopija. Poređenje EPR spektara jona Cu(II) vezanih za izolovane frakcije ćelijskog zida i jone Cu(II) vezanih za hitozan, oba u Hapes puferu prikazani su na slici 4.27.

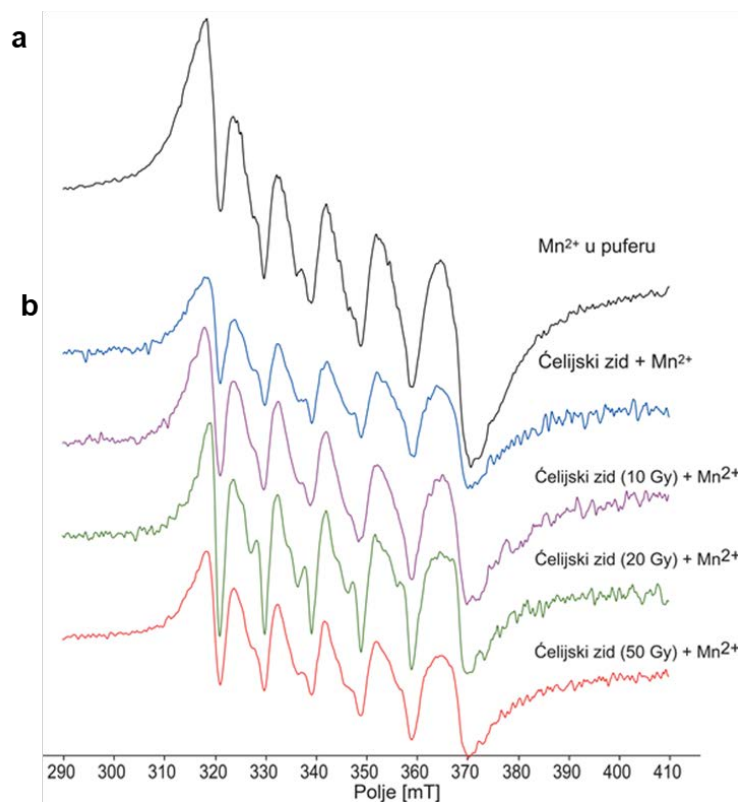


Slika 4.27. EPR spektri jona Cu(II) (1,5 mM) (a) Cu(II) u Hapes puferu (20 mM; pH 7,5); (b) Cu(II) + izolovan ćelijski zid kontrolnih i zračenih mikroalgi u Hapes puferu; (c) Cu(II) + hitozan. Parametri snimanja su bili: atenuacija 25 dB; modulaciona amplituda 0,8 mT; broj skeniranja 10. Sive linije - simulacija dobijena na osnovu prikazanih vrednosti za g i A.

EPR spektar jona Cu(II) u Hepes puferu pokazao je EPR signal sa jednom linijom velike amplitude za g_{\perp} i četiri slabe linije koje dolaze od hiperfine interakcije sa jezgrima izotopa ^{63}Cu / ^{65}Cu koji imaju spin jezgra ($I= 3/2$) duž g_{\parallel} . Oblik spektra i vrednosti za g ($g_{\parallel} > g_{\perp} > g_{\text{slobodan elektron}}$), ukazuje da su joni Cu(II) u Hepes puferu u oktaedarskom koordinacionom okruženju sa tetragonalnim distorzijom u svim analiziranim sistemima (Garribba i Micera, 2006). Međutim, vrednosti hiperfinog cepanja (A_{\parallel}) i g_{\parallel} ukazuju na različitu prirodu liganada za koje su vezani joni Cu(II) (Peisach i Blumberg, 1974). Analiza spektara jona Cu(II) u Hepes puferu (slika 4.27a), pokazala je vrednosti za $g_{\parallel} = 2,31$ i $A_{\parallel} = 14,7$ mT, koje su karakteristične kada su za Cu(II) vezani za 3 O i 1 N ligandi, a u skladu sa prethodnom studijom o koordinacionom vezivanju jona Cu(II) sa Hepes-om i OH⁻ jonima (Sokołowski Bal, 2005). S druge strane, spektar jona Cu(II) koji je vezan za polimere izolovanog ćelijskog zida (slika 4.27b), pokazao je vrednosti za $g_{\parallel} = 2,22$ i $A_{\parallel} = 19$ mT. Ove vrednosti ukazuju da je Cu(II) vezan za 3 N i 1 O, ili za 4 N kao liganade. Ovi rezultati dovode do zaključka da glukozaminski ostaci hitozana odnosno polimera sličnog hitozanu iz spoljašnjeg rigidnog sloja ćelijskog zida *C. sorokiniana*, predstavljaju glavna mesta koordinacionih veza jona Cu(II). To je dalje potkrepljeno sličnim vrednostima za g_{\parallel} i A_{\parallel} za jone Cu(II) koji su vezani za hitozan (slika 4.27c), koji se sastoji od glukozamina i N-acetilglukozamina. Način vezivanja je sličan kao kod *Spirulina*, za koju je pokazano da amini, sekundarni amidi i karboksilne grupe predstavljaju najvažnije komponente za vezivanje jona Cu(II) na površini ćelije (Dmytryk i sar., 2014). EPR spektri koji predstavljaju vezivanje jona Cu(II) za polimere izolovanog ćelijskog zida kod ozračenih algi nisu se značajno promenili u odnosu na kontrolu (slika 4.27b). Na osnovu dobijenih podataka možemo pretpostaviti da je povećanje kapaciteta vezivanja jona Cu(II) moglo biti rezultat povećane dostupnosti liganada koji poseduju azot kao mesto vezivanja u oštećenoj, odnosno, oslabljenoj strukturi polimera sličnog hitozanu u TLS-u. Na sličan način, povećan kapacitet biomase roda *Chlorella* za vezivanje uranijuma prilikom zagrevanja pripisan je denaturaciji ćelijskog zida i povećanoj dostupnosti mesta vezivanja (Horikoshi i sar., 1979).

4.4.3. EPR analiza interakcija jona Mn(II) sa polimerima ćelijskog zida

Na slici 4.28. predstavljeni su EPR spektri jona Mn(II) vezanih za izolovane frakcije ćelijskog zida u Hepes puferu. Pre izolacije ćelijskog zida mikroalge *C. sorokiniana* ozračene su jonizujućim X-zračenjem. Apsorbovane doze bile su: 1 Gy , 2 Gy i 5 Gy.



Slika 4.28. EPR spektri jona Mn(II): (a) Mn(II) (finalna koncentracija 1,5 mM) u Hepes puferu (20 mM; pH 7,5); (b) izolati ćelijskog zida (kontrolnih i ozračenih ćelija mikroalgi) koji su inkubirani sa jonima Mn(II). Parametri snimanja su bili: atenuacija 25 dB; modulaciona amplituda 0,8 mT; broj skeniranja 10.

Dobijeni EPR spaktar (slika 4.28a) predstavlja karakterističan spektar za jone Mn(II) u rastvoru, od šest linija sa spinom elektrona ($S= 5/2$) i spinom jezgra ($I= 5/2$). Za izolate ćelijskog zida sa vezanim jonima Mn(II) dobijeni su slični spektri ali slabijeg intenziteta (slika 4.28b). Dobijeni rezultati impliciraju da je došlo do otpuštanja jona Mn(II) vezanih za polimere ćelijskog zida u Hepes pufer. Preostali, vezani, joni Mn(II) nisu pokazivali prepoznatljivi EPR signal. Glavni razlog tome je velika anizotropija cepanja nultog polja koja potiče od gubitka brze rotacije molekula, u kombinaciji sa velikim brojem prelaza, tj. složenim višelinijским spektrom (Sigel i Sigel, 2000; Ignjatovići sar., 2012). Empirijski, odnos signal/šum koji je potreban za detektovanje vezanih jona Mn(II) dobija se kada je koncentracija jona Mn(II) u rastvoru 10–50 puta niža od vezanog Mn(II) (Sigel i Sigel, 2000), što ovde nije bio slučaj. Dobijeni rezultati EPR-a pokazuju da su joni Mn(II) slabo vezani za polimere ćelijskog zida i da zračenje nije promenilo kapacitet vezanja jona Mn(II), što je u skladu sa dobijenim biohemijskim merenjima.

Na kraju, može se zaključiti da afinitet različitih ćelijskih površina za vezivanje jona metala zavisi od prisustva funkcionalnih grupa i samog metala, a prema Pirsonovom HSAB principu (Hancock i Martell, 1996) molekuli koji sadrže amino grupe (poput glukozamina) imaju jak afinitet za Cu(II) koji predstavlja graničnu kiselinu, dok Mn(II) koji je tvrda baza pokazuje veći afinitet za tvrde baze, kao što su karboksilne grupe. Ovo i struktura ćelijskog zida pružaju objašnjenje zbog čega je kapacitet za vezivanje jona Cu(II) veći nego za jone Mn(II).

5. ZAKLJUČAK

U skladu sa definisanim ciljevima, analizama i tumačenjem dobijenih rezultata ispitivanja interakcije jona Cu(II) sa jednoćelijskom zelenom algom *Chlorella sorokiniana* mogu se izvesti sledeći zaključci:

- (i) *C. sorokiniana* ima brz adaptivni odgovor koji podrazumeva oslobađanja mukusa na površini ćelijskog zida. Oslobođeni mukus, zajedno sa ćelijskim zidom ima ulogu u akumuliranju jona metala, smanjujući njihov toksični efekat;
- (ii) Dolazi do značajnog povećanja udela kiseonika i fosfora u biomasi, na osnovu čega se može zaključiti da su mikroalge nakupile ortofosfatne jone iz medijuma polimerizacijom i/ili fosforilacijom šećera i proteina;
- (iii) Dolazi do strukturnih promena u ugljenim hidratima i fosfatima, proteinima i lipidima, koji ulaze u sastav biomase. Može se zaključiti da fosfatne grupe imaju glavnu ulogu u vezivanju jona metala, kao i da je fosfor akumuliran u obliku polifosfata. Produkcija polisaharida potvrđuje da kod mikroalgi koje su izložene jonima Cu(II) dolazi do promena u strukturi ćelijskog zida. Deacetilacija hitozana u ćelijskom zidu predstavlja adaptivni odgovor mikroalgi na visoke koncentracije jona Cu(II) u smislu povećanja apsorpcionog kapaciteta ćelijskog zida. Smanjenje uređenosti acilnih lanaca u lipidnim membranama i akumulacija triacilglicerola u obliku lipidnih kapi takođe predstavlja odgovor mikroalgi na povišene koncentracije jona Cu(II);
- (iv) Cu(II) koordinovan za polifosfate formira kompleks kvadratno-piramidalne geometrije. Osim toga XAFS analiza ukazuje na prisustvo Cu(I).

Na osnovu analize i tumačenja dobijenih rezultata ispitivanja interakcije jona Mn(II) sa jednoćelijskom zelenom algom *Chlorella sorokiniana* pokazala su da:

- (i) Nakon perioda inkubacije od 1 h dolazi do promena na površini ćelija u vidu oslobođenog mukusa i akumuliranja jona Mn(II) na površini ćelije;

- (ii) Porast masenog udela fosfora i kiseonika kao i SR-FTIR analiza pokazali su da polifosfati predstavljaju dominantan oblik fosfata koji su vezani za ćelijski zid i oslobođeni mukus ili su skladišteni unutar ćelija;
- (iii) Promena u redoks statusu ćelije potvrđena je primenom DCFH-DA fluorescentne probe koje je pokazala da se porasta nivoa ROS u ćeliji odvija u dve faze (u prvih 15 min i između 1 h i 2 h). Porasti u koncentraciji ROS su praćeni padom u nivou redukovanih tiola. Nakon 24 h dolazi do stabilizacije redoks uslova u ćelijama, odnosno do adaptacije na stresne uslove sredine.
- (iv) Na osnovu EPR analize koordinacionog vezivanja jona Mn(II) može se zaključiti da u prvih sat vremena joni Mn(II) nisu čvrsto vezani za ćelijski zid i mukus, dok se nakon 24 h akumuliraju u unutrašnjost ćelije ili se čvrsto vezuju za mukus i ćelijski zid ili dolazi do promene u redoks stanja mangana;
- (v) Metodom ciklične voltametrije potvrđeno je da se u ranoj fazi tretmana mangan vezuje za ćelijski zid i mukus u obliku Mn(II), dok u kasnijoj fazi mikroalge skladište mangan u obliku Mn(II), da bi u finalnoj fazi došlo do oksidacije i akumulacije mangana u obliku Mn(III) ili Mn(IV).

Rezultati primenjenog jonizujućeg zračenja na promenu u strukturi ćelijskog zida doveli su do sledećih zaključaka:

- (i) U roku od jednog dana nakon izlaganja mikroalgi *C. sorokiniana* jonizirajućem zračenju fibrilarni sloj ćelijskog zida postaje deblji;
- (ii) Ćelijski zid ozračenih mikroalgi pokazao je povećanu sposobnost za uklanjanje OH• radikala u odnosu na kontrolne;
- (iii) Izolovane frakcije ćelijskog zida ozračenih mikroalgi pokazivale su povećanu sposobnost vezivanja jona Cu(II) u odnosu na kontrolne uzorke.

Ovi mehanizmi brze adaptacije kod mikroalgi deo su složenog mehanizma odgovora na različite vrste stresora. Poznavanje navedenih odgovora omogućice razumevanje hemijskih mehanizama koji predstavljaju osnovu za toleranciju i adaptaciju mikroalgi na visoke koncentracije jona Cu(II) i Mn(II), a koji mogu poslužiti za optimizaciju primene mikroalgi i mikroalgalnih biopolimera u uklanjanju ovih metala iz zagađenih i otpadnih voda ili za razvoj novih materijala koje se zasnivaju na istim hemijskim principima.

6. LITERATURA

Abd El-Rehim, H. A., El-Sawy, N. M., Hegazy, E. S. A., Soliman, E. S. A., i Elbarbary, A. M. (2012). Improvement of antioxidant activity of chitosan by chemical treatment and ionizing radiation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(2), 403-413.

Abdi, O., i Kazemi, M. (2015). A review study of biosorption of heavy metals and comparison between different biosorbents. *Journal of Materials and Environmental Science*, 6(5), 1386-1399.

Adams, M. S., Dillon, C. T., Vogt, S., Lai, B., Stauber, J., i Jolley, D. F. (2016). Copper uptake, intracellular localization, and speciation in marine microalgae measured by synchrotron radiation X-ray fluorescence and absorption microspectroscopy. *Environmental Science and Technology*, 50, 8827-8839.

Ahmad, M. T., Shariff, M., Md. Yusoff, F., Goh, Y. M., i Banerjee, S. (2020). Applications of microalga *Chlorella vulgaris* in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 12(1), 328-346.

Ahner, B.A., Wei, L.P., Oleson, J.R., i Ogura, N. (2002). Glutathione and other low-molecular weight thiols in marine phytoplankton under metal stress. *Marine Ecology Progress Series*, 232, 93-103.

Aichinger, H., Dierker, J., Joite-Barfuß, S., i Säbel, M. (2004). Radiation exposure and image quality in X-ray diagnostic radiology: physical principles and clinical applications. Berlin, Springer.

Akhlaq, M. S., Schuchmann, H. P., i Von Sonntag, C. (1990). Degradation of the polysaccharide alginic acid: a comparison of the effects of UV light and ozone. *Environmental Science and Technology*, 24(3), 379-383.

Allen, M. D., Kropat, J., Tottey, S., Campo, J. A. D., i Merchant, S. S. (2007). Manganese deficiency in *Chlamydomonas* results in loss of photosystem II and MnSOD function, sensitivity to peroxides, and secondary phosphorus and iron deficiency. *Plant Physiology*, 143, 263-277.

Altıkulaç, A., Turhan, Ş., i Gümüş, H. (2015). The natural and artificial radionuclides in drinking water samples and consequent population doses. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(4), 578-582.

Anderson, D. M., i Karlson, B. (2017). Appendix 4. Preservatives and methods for algal cell enumeration, 509-517.

Andosch, A., Höftberger, M., Lütz, C., i Lütz-Meindl, U. (2015). Subcellular Sequestration and Impact of Heavy Metals on the Ultrastructure and Physiology of the Multicellular Freshwater Alga *Desmidium swartzii*. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 10389-10410.

Angelaalincy, M., Senthilkumar, N., Karpagam, R., Kumar, G. G., Ashokkumar, B., i Varalakshmi, P. (2017). Enhanced extracellular polysaccharide production and self-sustainable electricity generation for PAMFCs by *Scenedesmus* sp. SB1. *ACS omega*, 2(7), 3754-3765.

Anto, S., Mukherjee, S. S., Muthappa, R., Mathimani, T., Deviram, G., Kumar, S. S., Verma, T.N., i Pugazhendhi, A. (2020). Algae as green energy reserve: Technological outlook on biofuel production. *Chemosphere*, 242, 125079.

Apel, K., i Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.

Araya, M., González, M., Olivares, M., i Uauy, R. (2002). Biological effects of chronic copper exposure. In *Handbook of Copper Pharmacology and Toxicology* (pp. 385-396). Humana Press, Totowa, New York.

Azzam, E. I., Jay-Gerin, J. P., i Pain, D. (2012). Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer letters*, 327(1-2), 48-60.

Babiak, W., i Krzemińska, I. (2021). Extracellular polymeric substances (EPS) as microalgal bioproducts: a review of factors affecting EPS synthesis and application in flocculation processes. *Energies*, 14(13), 4007.

Bachhawat, A. K., i Kaur, A. (2017). Glutathione degradation. *Antioxidants and Redox Signaling*, 27, 1200-1216.

Baker, M. J., Trevisan, J., Bassan, P., Bhargava, R., Butler, H. J., Dorling, K. M., Fielden, P. R., Fogarty, S. W., Fullwood, N. J., Heys, K. A., Hughes, C., Lasch, P., Martin-Hirsch, P. L., Obinaju, B., Sockalingum, G. D., Sulé-Suso, J., Strong, R. J., Walsh, M. J., Wood, B. R., Gardner, P., i Martin, F. L. (2014). Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nature Protocols*, 9, 1771-1791.

Balzano, S., Sardo, A., Blasio, M., Chahine, T. B., Dell'Anno, F., Sansone, C., i Brunet, C. (2020). Microalgal Metallothioneins and Phytochelatins and Their Potential Use in Bioremediation. *Frontiers in Microbiology*, 11, 517.

Bao, H., i Burnap, R. L. (2016). Photoactivation: The light-driven assembly of the water oxidation complex of photosystem II. *Frontiers in plant science*, 7, 578.

Barge, A., Cravotto, G., Gianolio, E., i Fedeli, F. (2006). How to determine free Gd and free ligand in solution of Gd chelates. A technical note. *Contrast media and molecular imaging*, 1(5), 184-188.

Baselga-Cervera, B., Romero-Lopez, J., Garcia-Balboa, C., Costas, E., i Lopez-Rodas, V. (2018). Improvement of the uranium sequestration ability of a *Chlamydomonas* sp. (ChlSP strain) isolated from extreme uranium mine tailings through selection for potential bioremediation application. *Frontiers in microbiology*, 9, 523.

Battah, M., El-Ayoty, Y., Abomohra, A. E. F., Abd El-Ghany, S., i Esmael, A. (2015). Effect of Mn²⁺, Co²⁺ and H₂O₂ on biomass and lipids of the green microalga *Chlorella*

vulgaris as a potential candidate for biodiesel production. *Annals of Microbiology*, 65(1), 155-162.

Baudelet, P., Ricochon, G., Linder, M., i Muniglia, L. (2017). A new insight into cell walls of *Chlorophyta*. *Algal Research*, 25, 333-371.

Bayona, K. C. D., i Garcés, L. A. (2014). Effect of different media on exopolysaccharide and biomass production by the green microalga *Botryococcus braunii*. *Journal of Applied Phycology*, 26(5), 2087-2095.

Beacham, T. A., Bradley, C., White, D. A., Bond, P., i Ali, S. T. (2014). Lipid productivity and cell wall ultrastructure of six strains of *Nannochloropsis*: implications for biofuel production and downstream processing. *Algal research*, 6, 64-69.

Bencini, A., i Gatteschi, D. (1990). *Electron Paramagnetic Resonance of Exchange Coupled Systems*, Springer Verlag, Berlin, DEU.

Berlett, B. S., i Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20313-20316.

Bernhard, E. J., Maity, A., Muschel, R. J., i McKenna, W. G. (1995). Effects of ionizing radiation on cell cycle progression. *Radiation and Environmental Biophysics*, 34(2), 79-83.

Bishop, W. M., Willis, B. E., Richardson, R. J., i Cope, W. G. (2018). The presence of algae mitigates the toxicity of copper-based algaecides to a nontarget organism. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37, 2132-2142.

Blaby-Haas, C. E., i Merchant, S. S. (2012). The ins and outs of algal metal transport. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823(9), 1531-1552.

Bogdanović Pristov, J., Mitrović, A., i Spasojević, I. (2011). A comparative study of antioxidative activities of cell-wall polysaccharides. *Carbohydrate research*, 346(14), 2255-2259.

Boncheva, M., Damien, F., i Normand, V. (2008). Molecular organization of the lipid matrix in intact stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, 1344-1355.

Borah, D., Nainamalai, S., Gopalakrishnan, S., Rout, J., Alharbi, N. S., Alharbi, S. A., i Nooruddin, T. (2018). Biolubricant potential of exopolysaccharides from the cyanobacterium *Cyanothece epiphytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(8), 3635-3647.

Boreham, D. R., i Mitchel, R. E. J. (1993). DNA repair in *Chlamydomonas reinhardtii* induced by heat shock and gamma radiation. *Radiation Research*, 135, 365-371.

Bradshaw, C., Meseh, D. A., Alasawi, H., Qiang, M., Snoeijs-Leijonmalm, P., i Nascimento, F. J. A. (2019). Joint effects of gamma radiation and cadmium on subcellular-, individual and population-level endpoints of the green microalga *Raphidocelis subcapitata*. *Aquatic Toxicology*, 211, 217-226.

Bräutigam, A., Schaumlöffel, D., Krauss, G. J., i Wesenberg, D. (2009). Analytical approach for characterization of cadmium induced thiol peptides – a case study using *Chlamydomonas reinhardtii*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 1737-1747.

Brewer, P. G., i Spencer, D. W. (1971). Colorimetric determination of manganese in anoxic waters. *Limnology and Oceanography*, 16(1), 107-110.

Bunker, G., Hasnain, S., i Sayers, D. (1991). *X-ray Absorption Fine Structure*, Ellis Horwood, New York.

Buonocore, G., Perrone, S., i Tataranni, M. L. (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 15, 186-190.

Buxton, G. V. (2004). *The Radiation Chemistry of Liquid Water: Principles and Applications*, In: *Charged Particle and Photon Interactions with Matter*, Marcel Dekker, New York.

Cameron, J. C., i Pakrasi, H. B. (2010). Essential role of glutathione in acclimation to environmental and redox perturbations in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant physiology*, 154(4), 1672-1685.

Campbell, P. G., Errécalde, O., Fortin, C., Hiriart-Baer, V. P., i Vigneault, B. (2002). Metal bioavailability to phytoplankton—applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133(1-2), 189-206.

Cardenas, G., Cabrera, G., Taboada, E., i Miranda, P. (2004). Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and ¹³C cross polarization/mass angle spinning NMR. *Journal of Applied Polymer Science*, 93, 1876-1885.

Carfagna, S., Lanza, N., Salbitani, G., Basile, A., Sorbo, S., i Vona, V. (2013). Physiological and morphological responses of Lead or Cadmium exposed *Chlorella sorokiniana* 211-8K (*Chlorophyceae*). *SpringerPlus*. 2(1), 1-7.

Casano, L. M., Braga, M. R., Alvarez, R., Campo, E. M. D., i Barreno, E. (2015). Differences in the cell walls and extracellular polymers of the two *Trebouxia* microalgae coexisting in the lichen *Ramalina farinacea* are consistent with their distinct capacity to immobilize extracellular Pb. *Plant Science*, 236, 195-204.

Chaput, D. L., Fowler, A. J., Seo, O., Duhn, K., Hansel, C. M., i Santelli, C. M. (2019). Mn oxide formation by phototrophs: Spatial and temporal patterns, with evidence of an enzymatic superoxide-mediated pathway. *Scientific Reports*, 9, 18244.

Charles, E. D., Muhamadali, H., Goodacre, R., i Pittman, J. K. (2019). Biochemical signatures of acclimation by *Chlamydomonas reinhardtii* to different ionic stresses. *Algal Research*, 37, 83-91.

Chen, M., Sommer, A. J., i McClure, J. W. (2000). Fourier transform IR determination of protein contamination in thioglycolic acid lignin from radish seedlings and improved methods for extractive-free cell wall preparation. *Phytochemical Analysis*, 11, 153-159.

Chen, Y. C. (2011). The hormesis of the green macroalga *Ulva fasciata* with low-dose 60 cobalt gamma radiation 1. *Journal of phycology*, 47(4), 939-943.

Cheng, S. Y., Show, P. L., Lau, B. F., Chang, J. S., i Ling, T. C. (2019). New prospects for modified algae in heavy metal adsorption. *Trends in biotechnology*, 37(11), 1255-1268.

Chia, M. A., Lombardi, A. T., Melão Mda G., i Parrish, C. C. (2013). Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (*Trebouxiophyceae*) as a function of different cadmium and phosphate concentrations. *Aquatic Toxicology*, 128, 171-182.

Chmielewski, A. G. (2010). Chitosan and radiation chemistry. *Radiation Physics and Chemistry*, 79(3), 272-275.

Cho, D. Y., Lee, S. T., Park, S. W., i Chung, A. S. (1994). Studies on the biosorption of heavy metals onto *Chlorella vulgaris*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 29, 389-409.

Chokshi, K., Pancha, I., Ghosh, A., i Mishra, S. (2017). Nitrogen starvation-induced cellular crosstalk of ROS-scavenging antioxidants and phytohormone enhanced the biofuel potential of green microalga *Acutodesmus dimorphus*. *Biotechnology for biofuels*, 10(1), 1-12.

Clarke, S. E., Stuart, J. A. N. I. C. E., i Sanders-Loehr, J. O. A. N. N. (1987). Induction of siderophore activity in *Anabaena* spp. and its moderation of copper toxicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(5), 917-922.

Cobbett, C. S. (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant physiology*, 123(3), 825-832.

Cobbett, C., i Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 159-182.

Collomb, M. N., i Deronzier, A. (2006). Manganese: Inorganic and Coordination Chemistry. *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*.

Comte, S., Guibaud, G., i Baudu, M. (2008). Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) towards Cd, Cu and Pb for different pH values. *Journal of hazardous materials*, 151(1), 185-193.

Conry, R. R. (2011). Copper: inorganic & coordination chemistry. *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*.

Coronado-Reyes, J. A., Salazar-Torres, J. A., Juárez-Campos, B., i González-Hernández, J. C. (2020). *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review. *Food Science and Technology*.

Cotton, F. A., Wilkinson, G., Murillo, C. A, i Bochmann, M. (1999). *Advanced Inorganic Chemistry*. Wiley-Interscience.

Culotta, V. C., i Daly, M. J. (2013). Manganese complexes: diverse metabolic routes to oxidative stress resistance in prokaryotes and yeast. *Antioxidants and Redox Signaling*, 19(9), 933-944.

D'Souza, L., Devi, P., Shridhar, D. M., i Naik, C. G. (2008). Use of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy to study cadmium-induced changes in *Padina tetrastratica* (Hauck). *Analytical Chemistry Insights*, 3, 135-143.

Dahmane, E. M., Taourirte, M., Eladlani, N., i Rhazi, M. (2014). Extraction and characterization of chitin and chitosan from *Parapenaeus longirostris* from Moroccan local sources. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 19, 342-351.

Dai, S., Xie, Z., Wang, B., Yu, N., Zhao, J., Zhou, Y., Hua, Y., i Tian, B. (2021). Dynamic polyphosphate metabolism coordinating with manganese ions defends against oxidative stress in the extreme bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 87, e02785-20.

Das, N., Vimala, R., i Karthika, P. (2008). Biosorption of heavy metals—an overview.

Dean, A. P., Hartley, A., McIntosh, O. A., Smith, A., Feord, H. K., Holmberg, N. H. King, T., Yardley, E., White, K. N., i Pittman, J. K. (2019). Metabolic adaptation of a *Chlamydomonas acidophila* strain isolated from acid mine drainage ponds with low eukaryotic diversity. *Science of the Total Environment*, 647, 75-87.

Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R., i Davies, M. J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal*, 324, 1-18.

Deepika, K. V., Raghuram, M., Kariali, E., i Bramhachari, P. V. (2016). Biological responses of symbiotic *Rhizobium radiobacter* strain VBCK1062 to the arsenic contaminated rhizosphere soils of mung bean. *Ecotoxicology and environmental safety*, 134, 1-10.

Deng, L., Zhu, X., Wang, X., Su, Y., i Su, H. (2007). Biosorption of copper (II) from aqueous solutions by green alga *Cladophora fascicularis*. *Biodegradation*, 18(4), 393-402.

Derenne, A., Claessens, T., Conus, C., i Goormaghtigh, E. (2013). Infrared Spectroscopy of Membrane Lipids. *Encyclopedia of Biophysics*, 1074-1081.

Desrosiers, M., DeWerd, L., Deye, J., Lindsay, P., Murphy, M. K., Mitch, M., Macchiarini, F., Stojadinovic, S., i Stone, H. (2013). The importance of dosimetry standardization in radiobiology. *Journal of research of the National Institute of Standards and Technology*, 118, 403-418.

Dessouki, T. C., Hudson, J. J., Neal, B. R., i Bogard, M. J. (2005). The effects of phosphorus additions on the sedimentation of contaminants in a uranium mine pit-lake. *Water Research*, 39(13), 3055-3061.

Diem, M., Romeo, M., Matthäus, C., Miljkovic, M., Miller, L. i Lesch, P. (2004). Comparison of Fourier transform infrared (FTIR) spectra of individual cells acquired using synchrotron and conventional sources. *Infrared Physics and Technology*, 45, 331-338.

Dmytryk, A., Saeid, A. i Chojnacka, K. (2014). Biosorption of microelements by *Spirulina*: towards technology of mineral feed supplements. *ScientificWorld Journal*, 2014, 356328.

Dobrowolski, R., Szczes, A., Czemińska, M., i Jarosz-Wikołazka, A. (2017). Studies of cadmium(II), lead(II), nickel(II), cobalt(II) and chromium(VI) sorption on extracellular polymeric substances produced by *Rhodococcus opacus* and *Rhodococcus rhodochrous*. *Bioresource Technology*, 225, 113-120.

Domozych, D. S. (2007). Exopolymer production by the green alga *Penium margaritaceum*: implications for biofilm residency. *International Journal of Plant Sciences*, 168(6), 763-774.

Driver, T., Bajhaiya, A. K., Allwood, J. W., Goodacre, R., Pittman, J. K., i Dean, A. P. (2015). Metabolic responses of eukaryotic microalgae to environmental stress limit the ability of FT-IR spectroscopy for species identification. *Algal research*, 11, 148-155.

Drobny, J. G. (2012). Ionizing radiation and polymers: principles, technology, and applications. William Andrew.

Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82, 47-95.

Drouin, D., Couture, A. R., Joly, D., Tastet, X., Aimez, V. i Gauvin, R. (2007). CASINO v2.42 - a fast and easy- to - use modeling tool for scanning electron microscopy and microanalysis users. *Scanning*, 29, 92-101.

Dukan, S., Farewell, A., Ballesteros M., Taddei, F., Radman, M., Nystrom, T. (2000). Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 5746-5749.

Dung, T. T. T., Cappuyns, V., Swennen, R., i Phung, N. K. (2013). From geochemical background determination to pollution assessment of heavy metals in sediments and soils. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12, 335-353.

Eisenhut, M. (2019). Manganese Homeostasis in *Cyanobacteria*. *Plants (Basel)*, 9(1), 18.

Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., i Dempsey, J. L. (2018). A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *Journal of chemical education*, 95(2), 197-206.

Elshkaki, A., Graedel, T. E., Ciacci, L., i Reck, B. K. (2016). Copper demand, supply, and associated energy use to 2050. *Global environmental change*, 39, 305-315.

Environmental Protection Agency (EPA). (2004). Drinking Water Health Advisory for Manganese. https://www.epa.gov/sites/default/files/201409/documents/support_cc1_magnese_dw_report_0.pdf.

Environmental Protection Agency (EPA). (2007). Aquatic Life Ambient Freshwater. Quality Criteria – Copper. <https://www.epa.gov/wqc/aquatic-life-criteria-copper>.

Environmental Protection Agency (EPA). (2014). Aquatic life criteria-copper. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/priority-pollutant-list-epa.pdf>.

Erikson, K. M., Dobson, A.W., Dorman, D.C., i Aschner, M. (2004). Manganese exposure and induced oxidative stress in the rat brain. *Science of the Total Environment*, 334, 409-416.

Escapa, C., Coimbra, R. N., Paniagua, S., García, A. I., i Otero, M. (2017). Paracetamol and salicylic acid removal from contaminated water by microalgae. *Journal of environmental management*, 203, 799-806.

Fedorova, M., Bollineni, R. C., i Hoffmann, R. (2014). Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrometry Reviews*, 33, 79-97.

Feng, T., Du, Y., Li, J., Hu, Y., i Kennedy, J. F. (2008). Enhancement of antioxidant activity of chitosan by irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 73(1), 126-132.

Foster, L., Muhamadali, H., Boothman, C., Sigeo, D., Pittman, K. J., Goodacre, R., Morris, K., i Lloyd R. J. (2020). Radiation tolerance of *Pseudanabaena catenata*, a cyanobacterium relevant to the first generation magnox storage Pond. *Frontiers in Microbiology*, 11, 515.

Foyer, C. H., i Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, 17(7), 1866-1875.

Foyer, C. H., i Shigeoka, S. (2011). Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology*, 155, 93-100.

Franca, E. F., Freitas, L. C., i Lins, R. D. (2011). Chitosan molecular structure as a function of N-acetylation. *Biopolymers*, 95, 448-460.

Franklin, N. M., Stauber, J. L., Apte, S.C., i Lim, R. P. (2002). Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 742-751.

Freire-Nordi, C. S., Vieira, A. A. H., i Nascimento, O. R. (2005). The metal binding capacity of *Anabaena spiroides* extracellular polysaccharide: an EPR study. *Process Biochemistry*, 40(6), 2215-2224.

Frejaville, C., Karoui, H., Tuccio, B., Moigne, F. L., Culcasi, M., Pietri, S., Lauricella, R., Tordo, P. (1995). 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide: a new efficient phosphorylated nitron for the in vitro and in vivo spin trapping of oxygen-centered radicals. *Journal of medicinal chemistry*, 38(2), 258-265.

Fry, S. C. (1998). Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochemical Journal*, 332(2), 507-515.

Fu, F., i Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. *Journal of environmental management*, 92(3), 407-418.

Fuchs, B., Bresler, K., i Schiller, J. (2011). Oxidative changes of lipids monitored by MALDI MS. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164, 782-795.

Fukuda, S. Y., Iwamoto, K., Atsumi, M., Yokoyama, A., Nakayama, T., Ishida, K. I., Inouye, I., i Shiraiwa, Y. (2014). Global searches for microalgae and aquatic plants that can eliminate radioactive cesium, iodine and strontium from the radio-polluted aquatic environment: a bioremediation strategy. *Journal of Plant Research*, 127(1), 79-89.

Fuma, S., Kawaguchi, I., Kubota, Y., Yoshida, S., Kawabata, Z. I., i Polikarpov, G. G. (2012). Effects of chronic γ -irradiation on the aquatic microbial microcosm: equi-dosimetric comparison with effects of heavy metals. *Journal of environmental radioactivity*, 104, 81-86.

García-Ríos, E., Ramos-Alonso, L., i Guillamon, J. M. (2016). Correlation between low temperature adaptation and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1199.

Garribba, E. i Micera, G. (2006). The determination of the geometry of Cu(II) complexes. *Journal of Chemical Education*, 83, 1229-1232.

Gaur, A., i Shrivastava, B. D. (2012). A comparative study of the methods of speciation using X-ray absorption fine structure. *Acta Physica Polonica*, 121, 647-652.

Gaur, A., Shrivastava, B. D., i Joshi, S. K. (2009). Copper K-edge XANES of Cu(I) and Cu(II) oxide mixtures. In *Journal of Physics: Conference Series*, 190 (1), 012084.

Gaur, A., Shrivastava, B. D., Srivastava, K., Prasad, J., i Raghuwanshi, V. S. (2013). X-ray absorption fine structure study of multinuclear copper (I) thiourea mixed ligand complexes. *The Journal of chemical physics*, 139(3), 034303.

Ge, L. Y., Huang, Y. G., Gao, D. X., i Deng, H. H. (2012). Comparison of Extraction Methods for Quantifying Extracellular Polymers of Marine Algae. *Applied Mechanics and Materials*, 260, 1173-1178.

Gerken, H., Donohoe, B., i Knoshaug, E. (2013). Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. *Planta*, 237, 239-253.

Gok, C., i Aytas, S. (2014). Biosorption of uranium and thorium by biopolymers. The role of colloidal systems in environmental protection, 363-395.

Golz, A. L., i Bradshaw, C. (2019). Gamma radiation induced changes in the biochemical composition of aquatic primary producers and their effect on grazers. *Frontiers in Environmental Science*, 7, 100.

Gomes, T., Xie, L., Brede, D., Lind, O. C., Solhaug, K. A., Salbu, B., i Tollefsen, K. E. (2017). Sensitivity of the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* to gamma radiation: photosynthetic performance and ROS formation. *Aquatic toxicology*, 183, 1-10.

Goncalves, E., Johnson, J., i Rathinasabapathi, B. (2013). Conversion of membrane lipid acyl groups to triacylglycerol and formation of lipid bodies upon nitrogen starvation in biofuel green algae *Chlorella* UTEX29. *Planta*, 238, 895-906.

González-González, L. M., Correa, D. F., Ryan, S., Jensen, P. D., Pratt, S., i Schenk, P. M. (2018). Integrated biodiesel and biogas production from microalgae: towards a sustainable closed loop through nutrient recycling. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, 1137-1148.

Goto, K., Komatsu, T., i Furukawa, T. (1962). Rapid colorimetric determination of manganese in waters containing iron: a modification of the formaldoxime method. *Analytica Chimica Acta*, 27, 331-334.

Greene, B., i Darnall, D. W. (1990). Microbial oxygenic photoautotrophs (Cyanobacteria and algae) for metal binding. In Ehrlich M, Brierley CL (eds), *Microbial Mineral Recovery*, McGraw-Hill, New York, 277-302.

Güler, G., Gärtner, R. M., Ziegler, C., i Mäntele, W. (2016). Lipid-protein interactions in the regulated betaine symporter BetP probed by infrared spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 291, 4295-4307.

Hadjoudja, S., Deluchat, V., i Baudu, M. (2010). Cell surface characterisation of *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 342, 293-299.

Hagen, W. R. (2008). *Biomolecular EPR Spectroscopy*, CRC Press, Boca Raton, Florida.

Halaj, M., Paulovičová, E., Paulovičová, L., Jantová, S., Cepák, V., Lukavský, J., i Capek, P. (2018). Biopolymer of *Dictyosphaerium chlorelloides*-chemical characterization and biological effects. *International journal of biological macromolecules*, 113, 1248-1257.

Hall, J. L., i Moore, A. L., (1983). *Isolation of Membranes and Organelles from Plant Cells*. Academic Press, Cambridge.

Halliwell, B., i Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.

Hancock, R. D., i Martell, A. E. (1996). Hard and soft acid-base behavior in aqueous solution: Steric effects make some metal ions hard: A quantitative scale of hardness-softness for acids and bases. *Journal of chemical education*, 73(7), 654-661.

Harvey L. J., i McArdle H. J. (2008). Biomarkers of copper status: a brief update. *Journal of Nutrition Cambridge Journals*, 9910-9913.

Hashemi, F., Leppard, G. G., i Kushnert, D. J. (1994). Copper resistance in *Anabaena variabilis*: effects of phosphate nutrition and polyphosphate bodies. *Microbial Ecology*, 27, 159-176.

He, P., Zhang, A., Zhang, F., Linhardt, R. J., i Sun, P. (2016). Structure and bioactivity of a polysaccharide containing uronic acid from *Polyporus umbellatus* sclerotia. *Carbohydrate polymers*, 152, 222-230.

Hee, C. W., Shing, W. L., i Chi, C. K. (2021). Effect of Lead (Pb) exposure towards green microalgae (*Chlorella vulgaris*) on the changes of physicochemical parameters in water. *South African Journal of Chemical Engineering*, 37, 252-255.

Hem, J. D. (1963). Chemical equilibria affecting the behavior of manganese in natural water. *Hydrological Sciences Journal*, 8(3), 30-37.

Hendrich, A. B. (2006). Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27, 27-40.

Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., i García-González, M. C. (2015). Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. *Chemical Engineering Journal*, 262, 939-945.

Ho, T. L. (1975). Hard soft acids bases (HSAB) principle and organic chemistry. *Chemical Reviews*, 75(1), 1-20.

Hocking, R. K., i Solomon, E. I. (2012). Ligand field and molecular orbital theories of transition metal X-ray absorption edge transitions. In *Molecular Electronic Structures of Transition Metal Complexes I*, Springer, New York, New York, 155-184.

Höhner, R., Aboukila, A., Kunz, H. H., i Venema, K. (2016). Proton Gradients and Proton-Dependent Transport Processes in the Chloroplast. *Frontiers in Plant Science*, 7, 218.

Hong-Hermesdorf, A., Miethke, M., Gallaher, S. D., Kropat, J., Dodani, S. C., Chan, J., Barupala, D., Domaille, D. W., Shirasaki, D. I., Loo, J. A., Weber, P. K., Pett-Ridge, J., Stemmler, T. L., Chang, C. J., i Merchant, S. S. (2014). Subcellular metal imaging identifies dynamic sites of Cu accumulation in *Chlamydomonas*. *Nature Chemical Biology*, 10, 1034-1042.

Horikoshi, T., Nakajima, A., i Sakaguchi, T. (1979). Uptake of uranium by various cell fractions of *Chlorella regularis*. *Radioisotopes*, 28, 485-488.

Horner, R. A. (2006). *Algal Culturing Techniques*, Robert A. Andersen (Ed.), Elsevier Academic Press, Oxford, 450, 620-621.

Hou, J., Yang, Y., Wang, P., Wang, C., i Miao, L. (2016). Effects of CeO₂, CuO, and ZnO nanoparticles on physiological features of *Microcystis aeruginosa* and the production and composition of extracellular polymeric substances. *Environmental Science and Pollution Research*, 24 (1), 226-235.

Howe, P., Malcolm, H., i Dobson, S. (2004). Manganese and its compounds: environmental aspects. World Health Organization.

Hsiao, M. C., Wang, H. P., i Yang, Y. W. (2001). EXAFS and XANES studies of copper in a solidified fly ash. *Environmental Science and Technology*, 35, 2532-2535.

Husberg, C., i Ryde, U. (2013). How are hydrogen bonds modified by metal binding? *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 18(5), 499-522.

Hutchinson, F. (1985). Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 32, 115-154.

Ignjatović, A., Stević, Z., Lavrnić, D., Nikolić-Kokić, A., Blagojević, D., Spasić, M., i Spasojević, I. (2012). Inappropriately chelated iron in the cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 13(4), 357-362.

Ikeda, T., i Takeda, H. (1995). Species-specific differences of pyrenoids in *Chlorella* (*Chlorophyta*) 1. *Journal of Phycology*, 31(5), 813-818.

Imrich, A., Ning, Y., i Kobzik, L. (1999). Intracellular oxidant production and cytokine responses in lung macrophages: evaluation of fluorescent probes. *Journal of leukocyte biology*, 65(4), 499-507.

Inkson, B. J. (2016). Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. In *Materials characterization using nondestructive evaluation (NDE) methods*, Woodhead Publishing, 17-43.

Ismail, A. A., van de Voort, F. R., i Sedman, J. (1997). Fourier transform infrared spectroscopy: principles and applications. In *Techniques and instrumentation in analytical chemistry*, 18, 93-139.

Jahnke, L. S., i Soulen, T. K. (1978). Effects of manganese on growth and restoration of photosynthesis in manganese deficient algae. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 88(1), 83-93.

Jan, S., Parween, T., i Siddiqi, T. O. (2012). Effect of gamma radiation on morphological, biochemical, and physiological aspects of plants and plant products. *Environmental Reviews*, 20(1), 17-39.

Jensen, T. E., Baxter, M., Rachlin, J. W. i Jani, V. (1982). Uptake of heavy metals by *Plectonema boryanum* (*Cyanophyceae*) into cellular components, especially polyphosphate bodies: an X-ray energy dispersive study. *Environmental Pollution*, 27, 119-127.

Jeong, D. H., Jeong, M. H., Jeong, S. K., Yang, K., i Jo, W. S. (2017a). Effect of continuous exposure to low-dose-rate gamma irradiation on cell growth and lipid accumulation of marine microalgae. *Aquaculture international*, 25(2), 589-601.

Jeong, S. W., Nam, S. W., HwangBo, K., Jeong, W. J., Jeong, B. R., Chang, Y. K., i Park, Y. I. (2017b). Transcriptional regulation of cellulose biosynthesis during the early phase of nitrogen deprivation in *Nannochloropsis salina*. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.

Kalin, M., Wheeler, W. N., i Meinrath, G. (2005). The removal of uranium from mining waste water using algal/microbial biomass. *Journal of environmental radioactivity*, 78(2), 151-177.

Kaplan, D. (2013). Absorption and adsorption of heavy metals by microalgae. *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*, 2, 602-611.

Karlson, B., Cusack, C., i Bresnan, E. (2010). Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis.

Kemp, H. T., Fuller, R. G., i Davidson, R. S. (1966). Potassium permanganate as an algicide. *Journal-American Water Works Association*, 58(2), 255-263.

Khalil, F. L., i Brown, T. L. (1964). Infrared spectra of adenosine triphosphate complexes in deuterium oxide solution. *Journal of the American Chemical Society*, 86, 5113-5117.

Khemthong, P., Photai, P., i Grisdanurak, N. (2013). Structural properties of CuO/TiO₂ nanorod in relation to their catalytic activity for simultaneous hydrogen production under solar light. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 15992-16001.

Khramtsov, V. V., Bobko, A. A., Tseytlin, M., i Driesschaert, B. (2017). Exchange phenomena in the electron paramagnetic resonance spectra of the nitroxyl and trityl radicals: multifunctional spectroscopy and imaging of local chemical microenvironment. *Analytical chemistry*, 89(9), 4758-4771.

Khramtsov, V. V., Grigor'ev, I. A., Foster, M. A., i Lurie, D. J. (2004). *In vitro* and *in vivo* measurement of pH and thiols by EPR-based techniques. *Antioxidants and Redox Signaling*, 6(3), 667-676.

Khummongkol, D., Canterford, G. S., i Fryer, C. (1982). Accumulation of heavy metals in unicellular algae. *Biotechnology and Bioengineering*, 14, 2643-2660.

Klähn, M., Mathias, G., Kötting, C., Nonella, M., Schlitter, J., Gerwert, K., i Tavan, P. (2004). IR spectra of phosphate ions in aqueous solution: predictions of a DFT/MM approach compared with observations. *Journal of Physical Chemistry A*, 108, 6186-6194.

Klimmek, S., Stan, H. J., Wilke, A., Bunke, G., i Buchholz, R. (2001). Comparative analysis of the biosorption of cadmium, lead, nickel, and zinc by algae. *Environmental science and technology*, 35(21), 4283-4288.

Koningsberger, D. C., Mojet, B. L., Van Dorssen, G. E., i Ramaker, D. E. (2000). XAFS spectroscopy; fundamental principles and data analysis. *Topics in catalysis*, 10(3), 143-155.

Kosourov, S., Murukesan, G., Seibert, M., i Allahverdiyeva, Y. (2017). Evaluation of light energy to H₂ energy conversion efficiency in thin films of cyanobacteria and green alga under photoautotrophic conditions. *Algal research*, 28, 253-263.

Kot, P., Shaw, A., Jones, K. O., Cullen, J., Mason, A., i Al-Shamma'a, A. (2014). The feasibility of using electromagnetic waves in determining the moisture content of building

fabrics and the cause of the water ingress. *International Journal on Smart Sensing and Intelligent Systems*, 7(5), 604-608.

Kotrba, P. (2011). Microbial biosorption of metals – general introduction. In *Microbial biosorption of metals*, Springer, Dordrecht, 1-6.

Kovacik, J., Klejdus, B., Hedbavny, J., i Backor, M. (2010). Effect of copper and salicylic acid on phenolic metabolites and free amino acids in *Scenedesmus quadricauda* (*Chlorophyceae*). *Plant Science*, 178(3), 307-311.

Krichen, E., Rapaport, A., Floc'h, L., i Fouilland, E. (2019). Demonstration of facilitation between microalgae to face environmental stress. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.

Kropat, J., Gallaher, S. D., Urzica, E. I., Nakamoto, S. S., Strenkert, D., Tottey, S. Mason, A. Z., i Merchant, S. S. (2015). Copper economy in *Chlamydomonas*: prioritized allocation and reallocation of copper to respiration vs. photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 2644-2651.

Kudryasheva, N. S., i Rozhko, T. V. (2015). Effect of low-dose ionizing radiation on luminous marine bacteria: radiation hormesis and toxicity. *Journal of Environmental Radioactivity*, 142, 68-77.

Kumar, D., Kastanek, P., i Adhikary, S. P. (2018). Exopolysaccharides from cyanobacteria and microalgae and their commercial application. *Current Science*, 115(2), 234-241.

Kumar, K. S., Dahms, H. U., Won, E. J., Lee, J. S., i Shin, K. H. (2015). Microalgae—a promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and environmental safety*, 113, 329-352.

Küpper, H., Šetlík, I., Šetliková, E., Ferimazova, N., Spiller, M., i Küpper, F. C. (2003). Copper-induced inhibition of photosynthesis: limiting steps of *in vivo* copper chlorophyll formation in *Scenedesmus quadricauda*. *Functional Plant Biology*, 30, 1187-1196.

Lau, P. S., Lee, H. Y., Tsang, C. C. K., Tam, N. F. Y., i Wong, Y. S. (1999). Effect of metal interference, pH and temperature on Cu and Ni biosorption by *Chlorella vulgaris* and *Chlorella miniata*. *Environmental technology*, 20(9), 953-961.

LaVerne, J. A. (2000). OH radicals and oxidizing products in the gamma radiolysis of water. *Radiation research*, 153(2), 196-200.

Le Faucheur, S., Schildknecht, F., Behra, R., i Sigg, L. (2006) Thiols in *Scenedesmus vacuolatus* upon exposure to metals and metalloids. *Aquatic Toxicology*, 80, 355-361.

Levy, J. L., Stauber, J. L., i Jolley, D. F. (2007). Sensitivity of marine microalgae to copper: the effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. *Science of the Total Environment*, 387, 141-154.

Li, C., Zheng, C., Fu, H., Zhai, S., Hu, F., Naveed, S., Zhang, C., i Ge, Y. (2021). Contrasting detoxification mechanisms of *Chlamydomonas reinhardtii* under Cd and Pb stress. *Chemosphere*, 274, 129771.

Li, Q., Dunn, E. T., Grandmaison, E. W., i Goosen, M. F. A. (1996). Applications and properties of chitosan. In *Application of Chitan and Chitosan* (Goosen, M.F.A., ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, 3-29.

Li, Y., Li, Q., Yang, F., Bao, J., Hu, Z., Zhu, W., Zhao, Y., Lin, Z., i Dong, Q. (2015). Chromium (VI) detoxification by oxidation and flocculation of exopolysaccharides from *Arthrobacter* sp. B4. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 235-240.

Li, Y., Xu, Z., Ma, H., i S Hursthouse, A. (2019). Removal of manganese (II) from acid mine wastewater: A review of the challenges and opportunities with special emphasis on Mn-oxidizing bacteria and microalgae. *Water*, 11(12), 2493.

Lindberg, M., Biverståhl, H., Gräslund, A., i Mäler, L. (2003). Structure and positioning comparison of two variants of penetratin in two different membrane mimicking systems by NMR. *European Journal of Biochemistry*, 270(14), 3055-3063.

Liu, J., i Hu, Q. (2013). *Chlorella*: industrial production of cell mass and chemicals. *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*, 329-338.

Liu, J., Tan, K., He, L., Qiu, Y., Tan, W., Guo, Y., Wang, Z., i Sun, W. (2018). Effect of limitation of iron and manganese on microalgae growth in fresh water. *Microbiology*, 164(12), 1514-1521.

Lombardi, A. T., i Vieira, A. A. H. (2000). Copper complexation by *Cyanophyta* and *Chlorophyta* exudates. *Phycologia*, 39, 118-125.

Lombardi, A.T., Vieira, A. A. H., i Sartori, L. A. (2002). Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kirchneriella aperta* (*Chlorococcales*). *Journal of Phycology*, 38, 332-337.

Luckey, T. D. (1982). Physiological benefits from low levels of ionizing radiation. *Health Physics*, 43(6), 771-789.

Lupi, F. M., Fernandes, H. M. L., i Sá-Correia, I. (1998). Increase of copper toxicity to growth of *Chlorella vulgaris* with increase of light intensity. *Microbial ecology*, 35(2), 193-198.

Luxton, T. P., Miller, B. W., i Scheckel, K. G. (2013). Zinc speciation studies in soil, sediment and environmental samples. *Speciation studies in soil, sediment and environmental samples*, 433-477.

Lv, J., Feng, J., Liu, Q., i Xie, S. (2017). Microalgal cultivation in secondary effluent: recent developments and future work. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 79.

Macfie, S. M., i Welbourn, P. M. (2000). The cell wall as a barrier to uptake of metal ions in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (*Chlorophyceae*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39(4), 413-419.

Macklis, R. M., i Beresfold, B. (1991). Radiation hormesis. *Journal of Nuclear Medicine*, 32, 350-359.

Madison, A. S., Tebo, B. M., Mucci, A., Sundby, B., i Luther, G. W. (2013). Abundant porewater Mn(III) is a major component of the sedimentary redox system. *Science*, 341(6148), 875-878.

Mallick, N., i Mohn, F. H. (2000). Reactive oxygen species: response of algal cells. *Journal of Plant Physiology*, 157(2), 183-193.

Mangi, J. I., i Schumacher, G. J. (1979). Physiological Significance of Copper-slime Interactions in *Mesotaenium* (*Zygnematales; Chlorophyta*). *American Midland Naturalist*, 134-139.

Mansilla-Rivera, I., i Nriagu, J. O. (1999). Copper chemistry in freshwater ecosystems: An overview. *Journal of Great Lakes Research*, 25(4), 599-610.

Marschner, P. (2012). *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. Boston, MA: Academic Press.

Martinez, F., Ascaso, C., i Orus, M. I. (1991). Morphometric and stereologic analysis of *Chlorella vulgaris* under heterotrophic growth conditions. *Annals of botany*, 67(3), 239-245.

Matamoros, M. A., i Becana, M. (2021). Molecular responses of legumes to abiotic stress: post-translational modifications of proteins and redox signaling. *Journal of Experimental Botany*, 72(16), 5876-5892.

McCall, K. A., i Fierke, C. A. (2000). Colorimetric and fluorimetric assays to quantitate micromolar concentrations of transition metals. *Analytical biochemistry*, 284(2), 307-315.

McDermott, G. P., Francis, P. S., Holt, K. J., Scott, K. L., Martin, S. D., Stupka, N., Brenett, N. W., i Conlan, X. A. (2011). Determination of intracellular glutathione and glutathione disulfide using high performance liquid chromatography with acidic potassium permanganate chemiluminescence detection. *Analyst*, 136(12), 2578-2585.

McKnight, D. M., i Morel, F. M. M. (1979). Release of weak and strong copper-complexing agents by algae. *Limnology and Oceanography*, 24, 823-837.

McGraw, V. E., Brown, A. R., Boothman, C., Goodacre, R., Morris, K., Sigee, D., Anderson, L., i Lloyd, J. R. (2018). A novel adaptation mechanism underpinning algal colonization of a nuclear fuel storage pond. *mBio*, 9(3), e02395-17.

Mehta, S. K., i Gaur, J. P. (2005). Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. *Critical reviews in biotechnology*, 25(3), 113-152.

Meister, A., i Anderson, M. E. (1983). Glutathione. Annual review of biochemistry, 52(1), 711-760.

Melegari, S. P., Perreault, F., Costa, R. H. R., Popovic, R., i Matias, W. G. (2013). Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Aquatic Toxicology, 142, 431-440.

Mendoza-Cózatl, D., Loza-Tavera, H., Hernández-Navarro, A., Moreno-Sánchez, R. (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Reviews, 29, 653-671.

Menon, K. R., Balan, R., i Suraishkumar, G. K. (2013). Stress induced lipid production in *Chlorella vulgaris*: relationship with specific intracellular reactive species levels. Biotechnology and bioengineering, 110(6), 1627-1636.

Mikes, J., Siglova, M., Cejkova, A., Masak, J., i Jirku, V. (2005). The influence of heavy metals on the production of extracellular polymer substances in the processes of heavy metal ions elimination. Water science and technology, 52(10-11), 151-156.

Moenne, A., González, A., i Sáez, C. A. (2016). Mechanisms of metal tolerance in marine macroalgae, with emphasis on copper tolerance in *Chlorophyta* and *Rhodophyta*. Aquatic Toxicology, 176, 30-37.

Monostori, P., Wittmann, G., Karg, E., i Túri, S. (2009). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: an in-depth review. Journal of Chromatography B, 877(28), 3331-3346.

More, T. G., Rajput, R. A., i Bandela, N. N. (2003). Impact of Heavy metals on DNA Contents in the whole body of fresh water Bivalve, *Lamellidens marginalis*. Pollution Research, 22(4), 605-611.

Morelli, E., i Scarano, G. (2004) Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*. Plant Science, 167, 289-296.

Morina, A., Morina, F., Djikanović, V., Spasić, S., Krpo-Ćetković, J., i Lenhardt, M. (2016). Seasonal variation in element concentrations in surface sediments of three rivers with different pollution input in Serbia. Journal of Soils and Sediments, 16, 255-265.

Muik, B., Lendl, B., Molina-Diaz, A., Valcarcel, M., i Ayora-Cañada, M. J. (2007). Two-dimensional correlation spectroscopy and multivariate curve resolution for the study of lipid oxidation in edible oils monitored by FTIR and FT-Raman spectroscopy. Analitica Chimica Acta, 593, 54-67.

Muley, A. B., Ladole, M. R., Suprasanna, P., i Dalvi, S. G. (2019). Intensification in biological properties of chitosan after γ -irradiation. International journal of biological macromolecules, 131, 435-444.

Müller, W. E., Wang, S., Wiens, M., Neufurth, M., Ackermann, M., Relkovic, D., Kokkinopoulou, M., Feng, Q., Schröder, H. C., i Wang, X. (2017). Uptake of polyphosphate microparticles in vitro (SaOS-2 and HUVEC cells) followed by an increase of the intracellular ATP pool size. *PLoS One*, 12(12), e0188977.

Nakajima, A., Horikoshi, T., i Sakaguchi, T. (1979). Uptake of manganese ion by *Chlorella regularis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 43(7), 1461-1466.

Naveed, S., Li, C., Lu, X., Chen, S., Yin, B., Zhang, C., i Ge, Y. (2019). Microalgal extracellular polymeric substances and their interactions with metal(loid)s: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 49, 1769-1802.

Nemcova, Y. V. O. N. N. E., i Kalina, T. (2000). Cell wall development, microfibril and pyrenoid structure in type strains of *Chlorella vulgaris*, *C. kessleri*, *C. sorokiniana* compared with *C. luteoviridis* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*). (With 14 figures in the text). *Archiv fur Hydrobiologie-Supplementband Only*, 136, 95-106.

Ni, H., Yu, H. N., Liu, P., i Xu, G. D. (2007). Response of photosynthetic characteristics to Mn nutrition in soybean seedling. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 13, 1135-1142.

Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Applied microbiology and biotechnology*, 51(6), 730-750.

Nikčević, M., i Anđelić, T. (2011). Radioaktivnost i jonizujuća zračenja detekcija, dozimetrija i zaštita od jonizujućih zračenja. *Podgorica*, 12-13.

Noctor, G., i Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49(1), 249-279.

Nordberg, G. F., Fowler, B. A., i Nordberg, M. (2014). *Handbook on the Toxicology of Metals*. Academic Press, New York.

Nuccetelli, C., Rusconi, R., i Forte, M. (2012). Radioactivity in drinking water: regulations, monitoring results and radiation protection issues. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*, 48, 362-373.

Nussey, G., Van Vuren, J. D., i Du Preez, H. H. (1995). Effect of copper on the haematology and osmoregulation of the *Mozambique tilapia*, *Oreochromis mossambicus* (*Cichlidae*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 111(3), 369-380.

Nyholm, N., i Källqvist, T. (1989). Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 8(8), 689-703.

O'Connell, D. W., Birkinshaw, C., i O'Dwyer, T. F. (2008). Heavy metal adsorbents prepared from the modification of cellulose: A review. *Bioresource technology*, 99(15), 6709-6724.

Oh-hama, T., Siebelt, F., Furihata, K., Seto, H., Miyachi, S., i Ohmori, M. (1986). ³¹P-NMR studies on inorganic polyphosphates in microalgae. *Journal of Phycology*, 22, 485-490.

Ooi, L. L. (2010). *Principles of X-ray Crystallography*. Oxford University Press.

Ortega, R., Carmona, A., Llorens, I., i Solari, P. L. (2012). X-ray absorption spectroscopy of biological samples. A tutorial. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27(12), 2054-2065.

Osman, Z., i Arof, A. K. (2003). FTIR studies of chitosan acetate based polymer electrolytes. *Electrochimica Acta*, 48, 993-999.

Ota, S., Yoshihara, M., Yamazaki, T., Takeshita, T., Hirata, A., Konomi, M., Oshima, K., Hattori, M., Bišová, K., Zachleder, V., i Kawano, S. (2016). Deciphering the relationship among phosphate dynamics, electron-dense body and lipid accumulation in the green alga *Parachlorella kessleri*. *Scientific Reports*, 6, 25731.

Pacelli, C., Selbmann, L., Zucconi, L., Raguse, M., Moeller, R., Shuryak, I., i Onofri, S. (2017). Survival, DNA integrity, and ultrastructural damage in Antarctic cryptoendolithic eukaryotic microorganisms exposed to ionizing radiation. *Astrobiology*, 17(2), 126-135.

Pawlikowska-Pawłęga, B., Dziubińska, H., Król, E., Trębacz, K., Jarosz-Wilkolazka, A., Paduch, R., Gawron, A., i Gruszecki, W. I. (2014). Characteristics of quercetin interactions with liposomal and vacuolar membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1838, 254-265.

Pawlikowska-Pawlega, B., Misiak, L. E., Zarzyka, B., Paduch, R., Gawron, A., i Gruszecki, W. I. (2013). FTIR, ¹H NMR and EPR spectroscopy studies on the interaction of flavone apigenin with dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828, 518-527.

Pawlik-Skowrońska, B. (2001). Phytochelatin production in freshwater algae *Stigeoclonium* in response to heavy metals contained in mining water; effects of some environmental factors. *Aquatic Toxicology*, 52(3-4), 241-249.

Pawlik-Skowrońska, B., Pirszel, J., i Brown, M. T. (2007). Concentrations of phytochelatins and glutathione found in natural assemblages of seaweeds depend on species and metal concentrations of the habitat. *Aquatic toxicology*, 83(3), 190-199.

Peisach, J., i Blumberg, W. E. (1974). Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins. *Archives of biochemistry and biophysics*, 165(2), 691-708.

Perales-Vela, H. V., Peña-Castro, J. M., i Cañizares-Villanueva, R. O. (2006). Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*, 64, 1-10.

Pérez-Rama, M., Alonso, J. A., López, C. H., i Vaamonde, E. T. (2002). Cadmium removal by living cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Bioresource Technology*, 84(3), 265-270.

Peters, A., Lofts, S., Merrington, G., Brown, B., Stubblefield, W., i Harlow, K. (2011). Development of biotic ligand models for chronic manganese toxicity to fish, invertebrates, and algae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(11), 2407-2415.

Petin, V. G., Morozov, I. I., Kabakova, N. M., i Gorshkova, T. A. (2003). Some effects of radiation hormesis for bacterial and yeast cells. *Radiatsionnaia biologii, radioecologiya*, 43(2), 176-178.

Petrovič, A., i Simonič, M. (2016). Removal of heavy metal ions from drinking water by alginate-immobilised *Chlorella sorokiniana*. *International journal of environmental science and technology*, 13(7), 1761-1780.

Pikula, K. S., Zakharenko, A. M., Aruoja, V., Golokhvast, K. S., i Tsatsakis, A. M. (2019). Oxidative stress and its biomarkers in microalgal ecotoxicology. *Current Opinion in Toxicology*, 13, 8-15.

Pinto, E., Sigaud-kutner, T. C., Leitao, M. A., Okamoto, O. K., Morse, D., i Colepicolo, P. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae¹. *Journal of phycology*, 39(6), 1008-1018.

Pittman, J. K. (2005). Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. *New Phytologist*, 167(3), 733-742.

Radway, J. C., Wilde, E. W., Whitaker, M. J., i Weissman, J. C. (2001). Screening of algal strains for metal removal capabilities. *Journal of Applied Phycology*, 13(5), 451-455.

Rahman, I., Kode, A., i Biswas, S. K. (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature protocols*, 1(6), 3159-3165.

Rahman, S. M., Kippler, M., Tofail, F., Bölte, S., Derakhshani Hamadani, J., i Vahter, M. (2017). Manganese in drinking water and cognitive abilities and behavior at 10 years of age: a prospective cohort study. *Environmental health perspectives*, 125(5), 057003.

Rai, L. C., i Gaur, J. P. (2012). *Algal adaptation to environmental stresses: physiological, biochemical and molecular mechanisms*. Springer Science and Business Media.

Rajpoot, R., Srivastava, R. K., Rani, A., Pandey, P., Dubey, R. S. (2021). Manganese-induced oxidative stress, ultrastructural changes, and proteomics studies in rice plants. *Protoplasma*, 258(2), 319-335.

Rao, A. R., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T. R., i Ravishankar, G. A. (2007). Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource technology*, 98(3), 560-564.

Rashidi, B., i Trindade, L. M. (2018). Detailed biochemical and morphologic characteristics of the green microalga *Neochloris oleoabundans* cell wall. *Algal research*, 35, 152-159.

Ravel, B., i Newville, M. (2005). ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *Journal of Synchrotron Radiation*, 12, 537-541.

Rea, G., Esposito, D., Damasso, M., Serafini, A., Margonelli, A., Faraloni, C., Torzillo, G., Zanini, A., Bertalan, I., Johanningmeier, U., i Giardi, M. T. (2008). Ionizing radiation impacts photochemical quantum yield and oxygen evolution activity of Photosystem II in photosynthetic microorganisms. *International Journal of Radiation Biology*, 84, 867-877.

Ren, H. Y., Liu, B. F., Kong, F., Zhao, L., Xie, G. J., i Ren, N. Q. (2014). Enhanced lipid accumulation of green microalga *Scenedesmus* sp. by metal ions and EDTA addition. *Bioresource technology*, 169, 763-767.

Ren, H. Y., Liu, B. F., Kong, F., Zhao, L., Xie, G. J., i Ren, N. Q. (2014). Enhanced lipid accumulation of green microalga *Scenedesmus* sp. by metal ions and EDTA addition. *Bioresource Technology*, 169, 763-767.

Reynolds, C. S. (2007). Variability in the provision and function of mucilage in phytoplankton: facultative responses to the environment. *Hydrobiologia*, 578(1), 37-45.

Rijstenbil, J. W., Haritonidis, S., Malea, P., Seferlis, M., i Wijnholds, J. A. (1998). Thiol pools and glutathione redox ratios as possible indicators of copper toxicity in the green macroalgae *Enteromorpha* spp. from the Scheldt Estuary (SW Netherlands, Belgium) and Thermaikos Gulf (Greece, N Aegean Sea). *Hydrobiologia*, 385(1), 171-181.

Riley, P. A. (1994). Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *International journal of radiation biology*, 65(1), 27-33.

Rivasseau, C., Farhi, E., Compagnon, E., de Gouvion Saint Cyr, D., van Lis, R., Falconet, D., Kuntz, M., Atteia, A., i Couté, A. (2016). *Coccomyxa actinabiotis* sp. nov. (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*), a new green microalga living in the spent fuel cooling pool of a nuclear reactor. *The Journal of Phycology*, 52, 689-703.

Rivett, A. J., i Levine, R. L. (1990). Metal-catalyzed oxidation of *Escherichia coli* glutamine synthetase: Correlation of structural and functional changes. *Arch Biochem Biophys*, 278, 26-34.

Rodrigues, M. A., i Bon, E. P. D. S. (2011). Evaluation of *Chlorella* (*Chlorophyta*) as source of fermentable sugars via cell wall enzymatic hydrolysis. *Enzyme research*.

Rodriguez-Garcia, I., i Guil-Guerrero, J. L. (2008). Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food chemistry*, 108(3), 1023-1026.

Rosko, J. J, i Rachlin, J. W. (1975). The Effect of Copper, Zinc, Cobalt and Manganese on the Growth of the Marine Diatom *Nitzschia closterium*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 102(3), 100-106.

Rouhier, N., Lemaire, S. D., i Jacquot, J. P. (2008). The role of glutathione in photosynthetic orgasms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 143-166.

Rousch, J. M., i Sommerfeld, M. R. (1999). Effect of manganese and nickel on growth of selected algae in pH buffered medium. *Water Research*, 33(10), 2448-2454.

Roussel, H., Ten-Hage, L., Joachim, S., Le Cohu, R., Gauthier, L., i Bonzom, J. M. (2007). A long-term copper exposure on freshwater ecosystem using lotic mesocosms: primary producer community responses. *Aquatic Toxicology*, 81, 168-182.

Rugnini, L., Costa, G., Congestri, R., i Bruno, L. (2017). Testing of two different strains of green microalgae for Cu and Ni removal from aqueous media. *Science of the Total Environment*, 601, 959-967.

Russell, B. L. (1995). Determination of factors limiting enzymatic hydrolysis of the *Chlorella sorokiniana* cell wall.

Rzyski, P., Klimaszyk, P., Marszelewski, W., Borowiak, D., Mleczek, M., Nowiński, K., Pius, B., Niedzielski, P., i Poniedziałek, B. (2017). The chemistry and toxicity of discharge waters from copper mine tailing impoundment in the valley of the Apuseni Mountains in Romania. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(26), 21445-21458.

Sabatini, S. E., Juárez, Á. B., Eppis, M. R., Bianchi, L., Luquet, C. M., i de Molina, M. D. C. R. (2009). Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(4), 1200-1206.

Santier, S., Gilet, R., i Malaise, E. P. (1985). Induced radiation resistance during low-dose-rate γ irradiation in plateau-phase *Chlorella* cells. *Radiation research*, 104(2), 224-233.

Sanz-Luque, E., Bhaya, D., i Grossman, A. R. (2020). Polyphosphate: A multifunctional metabolite in cyanobacteria and algae. *Frontiers in Plant Science*, 11, 938.

Savage, D. B., Watson, L., Carr, K., Adams, C., Brage, S., Chatterjee, K. K., Hodson, L., Boesch, C., Kemp, G. J., i Sleigh, A. (2019). Accumulation of saturated intramyocellular lipid is associated with insulin resistance. *Journal of Lipid Research*, 60(7), 1323-1332.

Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38, 995-1014.

Schafer, F. Q. i Buettner G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 30, 1190-1212.

Schenck, R. C., Tessier, A., i Campbell, P. G. C. (1988). The effect of pH on iron and manganese uptake by a green alga. *Limnology and oceanography*, 33(4), 538-550.

Schmollinger, S., Chen, S., Strenkert, D., Hui, C., Ralle, M., i Merchant, S. S. (2021). Single-cell visualization and quantification of trace metals in *Chlamydomonas* lysosome-related organelles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(16):e2026811118.

Serra, A., Guasch, H., Admiraal, W., Van der Geest, H. G., i Van Beusekom, S. A. (2010). Influence of phosphorus on copper sensitivity of fluvial periphyton: the role of chemical, physiological and community-related factors. *Ecotoxicology*, 19, 770-780.

Sethi, A. (2006). X-Rays: Interaction with Matter. *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*.

Shen, L., Li, Z., Wang, J., Liu, A., Li, Z., Yu, R., Wu, X., Liu, Y., Li, J., i Zeng, W. (2018). Characterization of extracellular polysaccharide/protein contents during the adsorption of Cd(II) by *Synechocystis* sp. PCC6803. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(21), 20713-20722.

Sheng, G. P., Xu, J., Li, W. H., i Yu, H. Q. (2013). Quantification of the interactions between Ca²⁺, Hg²⁺ and extracellular polymeric substances (EPS) of sludge. *Chemosphere*, 93(7), 1436-1441.

Shivaji, S., i Dronamaraju S. V. L. (2019). *Scenedesmus rotundus* isolated from the petroleum effluent employs alternate mechanisms of tolerance to elevated levels of Cadmium and Zinc. *Scientific Reports*, 9(1), 8485.

Shoemaker, G. L., Anderson, J. B., i Kostiner, E. (1977). Copper (II) phosphate. *Acta Cryst.* 33, 2969-2972.

Sianoudis, J., Küsel, A. C., Mayer, A., Grimme, L. H., i Leibfritz, D. (1986). Distribution of polyphosphates in cell-compartments of *Chlorella fusca* as measured by ³¹P-NMR-spectroscopy. *Arch. Microbiol.* 144, 48-54.

Sigel, A., Sigel, H., (2000). *Metal Ions in Biological Systems: Manganese and its Role in Biological Processes*. Marcel Dekker, New York.

Simonović, J., Stevanic, J., Djikanović, D., Salmén, L., i Radotić, K. (2011). Anisotropy of cell wall polymers in branches of hardwood and softwood: a polarized FTIR study. *Cellulose*, 18(6), 1433-1440.

Smith, B. C. (2015). More Theory and Practice: The Thorny Problem of Mixtures and More on Straight Chain Alkanes. *Spectroscopy*, 30(7), 26-31.

Smith, B. C. (2016). The Infrared Spectroscopy of Alkene. *Spectroscopy*, 31(11), 28-34.

Smith, C. L., Steeke, J. E., Stauber, J. L. i Jolley, D. F. (2014). Copper-induced changes in intracellular thiols in two marine diatoms: *Phaeodactylum tricorutum* and *Ceratoneis closterium*. *Aquatic Toxicology*, 156, 211-220.

Sokołowska, M., i Bal, W. (2005). Cu(II) complexation by “non-coordinating” N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES buffer). *Journal of inorganic biochemistry*, 99(8), 1653-1660.

Spasojević, I. (2011). Free radicals and antioxidants at a glance using EPR spectroscopy. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 48(3), 114-142.

Spasojević, I., Mojović, M., Blagojević, D., Spasić, S. D., Jones, D. R., Nikolić-Kokić, A., i Spasić, M. B. (2009). Relevance of the capacity of phosphorylated fructose to scavenge the hydroxyl radical. *Carbohydrate research*, 344(1), 80-84.

Spasojević, I., Mojović, M., Blagojević, D., Spasić, S. D., Jones, D. R., Nikolić-Kokić, A., i Spasić, M. B. (2009). Relevance of the capacity of phosphorylated fructose to scavenge the hydroxyl radical. *Carbohydrate research*, 344(1), 80-84.

Stadtman, E. R. (1990). Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biology and Medicine*, 9, 315-325.

Stauber, J. L. i Florence, T. M. (1986). Reversibility of copper-thiol binding in *Nitzschia closterium* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Aquatic Toxicology*, 8, 223-229.

Steele, D. J., Franklin, D. J., i Underwood, G. J. (2014). Protection of cells from salinity stress by extracellular polymeric substances in diatom biofilms. *Biofouling*, 30(8), 987-998.

Stern, B. R. (2010). Essentiality and toxicity in copper health risk assessment: overview, update and regulatory considerations. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 73(2-3), 114-127.

Sule, K., Umbsaar, J., i Prenner, E. J. (2020). Mechanisms of Co, Ni, and Mn toxicity: From exposure and homeostasis to their interactions with and impact on lipids and biomembranes. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1862(8), 183250.

Sunda, W. G., i Huntsman, S. A. (1998). Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: phytoplankton as model systems. *Science of the Total Environment*, 219(2-3), 165-181.

Sutak, R., Botebol, H., Blaiseau, P. L., Léger, T., Bouget, F. Y., Camadro, J. M., Lesuisse, E. (2012). A comparative study of iron uptake mechanisms in marine microalgae: iron binding at the cell surface is a critical step. *Plant Physiology*, 160(4), 2271-84.

Suwalsky, M., Villena, F., Sotomayor, C. P. (2010). Mn²⁺ exerts stronger structural effects than the Mn-citrate complex on the human erythrocyte membrane and molecular models. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104(1), 55-61.

Takeda, H. (1991). Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of *Chlorella* (*Chlorophyceae*) 1. *Journal of Phycology*, 27(2), 224-232.

Thomas, C., Mackey, M. M., Diaz, A. A., i Cox, D. P. (2009). Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation. *Redox Report*, 14(3), 102-108.

Tien, C. J (2002). Biosorption of metal ions by freshwater algae with different surface characteristics. *Process Biochemistry*, 38, 605-613.

Tien, C., Sigee, D. C., i White, K. N. (2005). Copper adsorption kinetics of cultured algal cells and freshwater phytoplankton with emphasis on cell surface characteristics. *Journal of Applied Phycology*, 17, 379-389.

Tsednee, M., Castruita, M., Salomé, P. A., Sharma, A., Lewis, B. E., Schmollinger, S. R., Strenkert, D., Holbrook, K., Otegui, M. S., Khatua, K., Das, S., Datta, A., Chen, S., Ramon, C., Ralle, M., Weber, P. K., Stemmler, T. L., Pett-Ridge, J., Hoffman, B. M., i Merchant, S. S. (2019). Manganese co-localizes with calcium and phosphorus in *Chlamydomonas* acidocalcisomes and is mobilized in manganese-deficient conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 294(46), 17626-17641.

Tüzün, I., Bayramoğlu, G., Yalçın, E., Başaran, G., Celik, G., i Arıca, M. Y. (2005). Equilibrium and kinetic studies on biosorption of Hg (II), Cd (II) and Pb (II) ions onto microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Environmental Management*, 77(2), 85-92.

UNSCEAR, (2008). Sources and Effects of Ionizing Radiation. Report to the General Assembly, with Scientific Annex.

UNSCEAR, (2011). Sources and Effects of Ionizing Radiation. United Nations, New York.

Ushizaka, S., Sugie, K., Yamada, M., Kasahara, M., i Kuma, K. (2008). Significance of Mn and Fe for growth of coastal marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Fisheries science*, 74(5), 1137-1145.

Vaiserman, A., Cuttler, J. M., i Socol, Y. (2021). Low-dose ionizing radiation as a hormetin: experimental observations and therapeutic perspective for age-related disorders. *Biogerontology*, 1-20.

Valko, M. M. H. C. M., Morris, H., i Cronin, M. T. D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry*, 12(10), 1161-1208.

Van den Berg, C. M. G., Wong, P. T. S., i Chau, Y. K. (1979). Measurement of complexing materials excreted from algae and their ability to ameliorate copper toxicity. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 36, 901-905.

Vanhoudt, N., Vandenhove, H., Leys, N., Janssen, P. (2018). Potential of higher plants, algae, and cyanobacteria for remediation of radioactively contaminated waters. *Chemosphere*, 207, 239-254.

Venkatesan, S., Pugazhendy, K., Sangeetha, D., Vasantharaja, C., Prabakaran, S., i Meenambal, M. (2012). Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic analysis of *Spirulina*. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives*, 3(4), 969-972.

Verbruggen, N., Hermans, C., i Schat, H. (2019). Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3), 364-372.

Verma, S. K., Singh, R. K., i Singh, S. P. (1993). Copper toxicity and phosphate utilization in the cyanobacterium *Nostoc calcicola*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 50, 192-198.

Vicente-Martorell, J. J., Galindo-Riaño, M. D., García-Vargas, M., i Granada-Castro, M. D. (2009). Bioavailability of heavy metals monitoring water, sediments and fish species from a polluted estuary. *Journal of Hazardous Materials*, 162(2), 823- 836.

Vinyard, D. J., Badshah, S. L., Riggio, M. R., Kaur, D., Fanguy, A. R., i Gunner, M. R. (2019). Photosystem II oxygen-evolving complex photoassembly displays an inverse H/D solvent isotope effect under chloride-limiting conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(38),18917-18922.

Volland, S., Andosch, A., Milla, M., Stöger, B., Lütz, C., i Lütz-Meindl, U. (2011). Intracellular metal compartmentalization in the green algal model system *Micrasterias denticulata* (*Streptophyta*) measured by transmission electron microscopy-coupled electron energy loss spectroscopy. *Journal of Phycology*, 47(3), 565-579.

Volland, S., Lütz, C., Michalke, B., i Lütz-Meindl, U. (2012). U. Intracellular chromium localization and cell physiological response in the unicellular alga *Micrasterias*. *Aquatic Toxicology*, 109,59-69.

Walsh, M. J., Goodnow, S. D., Vezeau, G. E., Richter, L. V., i Ahner, B. A. (2015). Cysteine enhances bioavailability of copper to marine phytoplankton. *Environmental Science and Technology*, 49, 12145-12152.

Wang, W. X., i Fisher, N. S. (1999). Delineating metal accumulation pathways for marine invertebrates. *Science of the Total Environment*, 237/238, 459-472.

Wasikiewicz, J. M., Yoshii, F., Nagasawa, N., Wach, R. A., i Mitomo, H. (2005). Degradation of chitosan and sodium alginate by gamma radiation, sonochemical and ultraviolet methods. *Radiation Physics and Chemistry*, 73(5), 287-295.

Watanabe, K., Imase, M., Sasaki, K., Ohmura, N., Saiki, H., i Tanaka, H. (2006). Composition of the sheath produced by the green alga *Chlorella sorokiniana*. *Letters in Applied Microbiology*, 42, 538-543.

Wehrheim, B., Wettern, M., (1994). Biosorption of cadmium, copper and lead by isolated mother cell walls and whole cells of *Chlorella fusca*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 8 (4), 227-232.

Wei, D., Li, M., Wang, X., Han, F., Li, L., Guo, J., Ai, L., Fang, L., Liu, L., Du, B., i Wei, Q. (2016). Extracellular polymeric substances for Zn(II) binding during its sorption process onto aerobic granular sludge. *Journal of Hazardous Materials*, 301(15), 407-415.

Wei, L., Li, Y., Noguera, D. R., Zhao, N., Song, Y., Ding, J., Zhao, Q., i Cui, F. (2017). Adsorption of Cu²⁺ and Zn²⁺ by extracellular polymeric substances (EPS) in different sludges: Effect of EPS fractional polarity on binding mechanism. *Journal of Hazardous Materials*, 321, 473-483.

Weiner, L. (2012). Quantitative Determination of Thiol Status of Proteins and Cells by Nitroxyl Biradical. RS-SR. In Nitroxides-Theory, Experiment and Applications, IntechOpen, 369-384.

Wiercigroch, E., Szafraniec, E., Czamara, K., Pacia, M.Z., Majzner, K., Kochan, K., Kaczor, A., Baranska, M., i Malek, K. (2017). Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 5, 185, 317-335.

Wilde, E. W., i Benemann, J. R. (1993). Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. *Biotechnology Advances*, 11, 781-812.

Wilde, K. L., Stauber, J. L., Markich, S. J., Franklin, N. M., i Brown, P. L. (2006). The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51, 174-185.

Wu, H., Wang, S., Gao, L., Zhang, L., Yuan, Z., Fan, T., Wei, K., i Huang, L. (2018). Nutrient-derived environmental impacts in Chinese agriculture during 1978–2015. *Journal of environmental management*, 217, 762-774.

Wu, S. P., Dai, X. Z., Kan, J. R., Shilong, F. D., i Zhu, M. Y. (2017). Fabrication of carboxymethyl chitosan–hemicellulose resin for adsorptive removal of heavy metals from wastewater. *Chinese Chemical Letters*, 28(3), 625-632.

Xiao, R., i Zheng, Y. (2016). Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1225-1244.

Xu, H., Cai, H., Yu, G., i Jiang, H. (2013). Insights into extracellular polymeric substances of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* using fractionation procedure and parallel factor analysis. *Water Research*, 47(6), 2005-2014.

Yamada, T., i Sakaguchi, K. (1982). Comparative studies on *Chlorella* cell walls: induction of protoplast formation. *Archives of Microbiology*, 132, 10-13.

Yan, H., Wang, X. J., Lin, Y. X., i Wen, G. (2001) Toxic effects of Cu, Zn and Mn on the inhibition of *Chlorella pyrenoidosa*'s growth. *Environmental Science*, 22, 23-26.

Yan, P., Xia, J. S., Chen, Y. P., Liu, Z. P., Guo, J. S., Shen, Y., Zhang, C-C., i Wang, J. (2017). Thermodynamics of binding interactions between extracellular polymeric substances and heavy metals by isothermal titration microcalorimetry. *Bioresource technology*, 232, 354-363.

Yang, J., Cao, J., Xing, G., i Yuan, H. (2015). Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341. *Bioresource Technology*, 175, 537-544.

Yang, Y., Campbell, C. D., Clark, L., Cameron, C. M., i Paterson, E. (2006). Microbial indicators of heavy metal contamination in urban and rural soils. *Chemosphere*, 63(11), 1942-1952.

Yap, B. H. J., Crawford, S. A., Dagastine, R. R., Scales, P. J., i Martin, G. J. O. (2016). Nitrogen deprivation of microalgae: effect on cell size, cell wall thickness, cell strength, and resistance to mechanical disruption. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43, 1671-1680.

Yruela, I. (2005). Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 145-156.

Yuan, Q., Li, H., Wei, Z., Lv, K., Gao, C., Liu, Y., i Zhao, L. (2020). Isolation, structures and biological activities of polysaccharides from *Chlorella*: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*.

Zaffagnini, M., Bedhomme, M., Groni, H., Marchand, C. H., Puppo, C., Gontero, B., Cassier-Chauvat, C., Decottignies, P., i Lemaire, S. D. (2012). Glutathionylation in the photosynthetic model organism *Chlamydomonas reinhardtii*: a proteomic survey. *Molecular and Cellular Proteomics*, 11(2), M111-014142.

Zarić, S. D. (2008). Hemija prelaznih metala. Hemijski fakultet, Beogradski univerzitet.

Zegota, H. (2002). Some quantitative aspects of hydroxyl radical induced reactions in γ -irradiated aqueous solutions of pectins. *Food hydrocolloids*, 16(4), 353-361.

Zhan, Y., Marchand, C. H., Maes, A., Mauries, A., Sun, Y., Dhaliwal, J. S., Uniacke, J., Arragain, S., Jiang, H., Gold, N. D., Martin, V. J. J., Lemaire, S. D., i Zerges, W. (2018). Pyrenoid functions revealed by proteomics in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS One*, 13(2), e0185039.

Zhang, J., Zhou, F., Liu, Y., Huang, F., i Zhang, C. (2020). Effect of extracellular polymeric substances on arsenic accumulation in *Chlorella pyrenoidosa*. *Science of the Total Environment*, 704, 135368.

Zhang, W., Tan, N. G. J., Fu, B., i Li, S. F. Y. (2015). Metallomics and NMR-based metabolomics of *Chlorella* sp. reveal the synergistic role of copper and cadmium in multi-metal toxicity and oxidative stress. *Metallomics*, 7, 426-438.

Zhang, Y., Cao, Z., Cao, Y., i Sun, C. (2013). FTIR studies of xanthate adsorption on chalcopyrite, pentlandite and pyrite surfaces. *Journal of Molecular Structure*, 1048, 434-440.

Zhou, Y., Xia, S., Zhang, J., Nguyen, B. T., i Zhang, Z. (2017). Insight into the influences of pH value on Pb(II) removal by the biopolymer extracted from activated sludge. *Chemical Engineering Journal*, 308, 1098-1104.

Zuppini, A., Andreoli, C., i Baldan, B. (2007). Heat Stress: an Inducer of Programmed Cell Death in *Chlorella saccharophila*. *Plant and Cell Physiology*, 48 (7), 1000-1009.

7. BIOGRAFIJA AUTORA

Snežana Vojvodić je rođena 17. oktobra 1990. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu, kao i XII beogradsku gimnaziju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija i fiziologija završila je 2017. godine, a Master studije na istom fakultetu, studijski program Biologija, smer Biofizika, završila je 2018. godine sa prosečnom ocenom 9,83. Master rad „Optimizacija metode za izolaciju genomske DNK iz mikroalge *Chlamydomonas reinhardtii*“ odbranila u junu 2018. godine sa ocenom 10. Doktorske studije upisala je 2018. na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program doktor hemije.

Na Institutu za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu, Snežana Vojvodić usavršava se od 2018. godine, a od 01.03.2019. do 29.08.2019. godine bila je i stipendista međunarodnog projekta iz programa NATO Nauka za mir i bezbednost (*NATO Science for Peace and Security*), pod nazivom „*Radiation Hormesis for Higher Microalgae Biofuels Yield*“ (broj projekta G5320). U okviru rada na NATO projektu usavršavala se na Bejlor Univerzitetu, Vako, Teksas, SAD tokom oktobra 2019. godine. Tamo se u Centru za mikroskopiju, pod mentorstvom dr Bernta Zekmana (*Bernd Zechmann*), direktora Centra obučavala za rad na transmisionom i skenirajućem elektronskom mikroskopu kao i konfokalnom mikroskopu. Od 2020. godine zaposlena je kao istraživač-pripravnik na Odseku za nauku o živim sistemima Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu, a od 2021. godine kao istraživač saradnik.

Do sada ima objavljena tri naučna rada u međunarodnim časopisima, od kojih je jedan i u vrhunskom međunarodnom časopisu (kategorija M21) i dva rada u istaknutim međunarodnim časopisima (kategorije M22).

8. IZJAVA O AUTORSTVU

Ime i prezime autora: Snežana D. Vojvodić

Broj indeksa: DH03/2018.

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

„Ispitivanje interakcije jona Cu(II) i Mn(II) sa strukturnim jedinicama polimera ćelijskog zida i mukusa jednoćelijske alge *Chlorella sorokiniana* izložene abiotičkom stresu“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini i u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu,

Potpis autora

9. IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTOSKOG RADA

Ime i prezime autora: Snežana D. Vojvodić
Broj indeksa: DH03/2018.
Studijski program: Doktor hemijskih nauka

Naslov rada: „Ispitivanje interakcije jona Cu(II) i Mn(II) sa strukturnim jedinicama polimera ćelijskog zida i mukusa jednoćelijske alge *Chlorella sorokiniana* izložene abiotičkom stresu“.

Mentori: dr Marina Stanić, viši naučni saradnik i dr Dalibor Stanković, docent

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjenja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu,

Potpis autora

10. IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom: „Ispitivanje interakcije jona Cu(II) i Mn(II) sa strukturnim jedinicama polimera ćelijskog zida i mukusa jednoćelijske alge *Chlorella sorokiniana* izložene abiotičkom stresu“, koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje. Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence

Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo - nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo - bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

U Beogradu,

Potpis autora

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. **Autorstvo - nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. **Autorstvo - nekomercijalno - bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. **Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. **Autorstvo - bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. **Autorstvo - deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.