Utjecaj selena na sadrţaj glutationa i antioksidacijsku aktivnost u stanicama alge Monoraphidium cf. contortum

Sabo, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:170025

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

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

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Diplomski sveučilišni studij Biologija i kemija, smjer: nastavnički

Nikolina Sabo

Utjecaj selena na sadržaj glutationa i antioksidacijsku aktivnost u stanicama alge *Monoraphidium* cf. *contortum*

Diplomski rad

Osijek, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Diplomski rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij Biologija i kemija; smjer: nastavnički

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Utjecaj selena na sadržaj glutationa i antioksidacijsku aktivnost u stanicama alge *Monoraphidium* cf. *contortum*

Nikolina Sabo

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

Kratki sažetak diplomskog rada: Selen (Se) je element u tragovima koji se u prirodi pojavljuje u brojnim organskim i anorganskim oblicima. Dosadašnja istraživanja pokazala su dvojak učinak Se na živi svijet – djeluje kao esencijalan mikronutrijent, ali i kao toksični element, u ovisnosti o koncentraciji, kemijskom obliku te drugim parametrima okoliša. Potencijalna toksičnost leži u sposobnosti bioakumulacije od strane primarnih producenata, posebice mikroalga, koje osiguravaju transport Se duž hranidbenih lanaca u vodenim ekosustavima. U kontekstu navedenog, cilj istraživanja bio je utvrditi učinak različitih koncentracija selenita (5, 25, 50 i 100 mg/L) na rast kulture jednostanične zelene alge *Monoraphidium* cf. *contortum*, aktivnost antioksidacijskog enzima glutation S-trasferaze (GST), sadržaj ukupnih topljivih fenola i ukupnog glutationa (tGSH) te ukupan sadržaj reaktivnih kisikovih tvari (ROS) tijekom različitih vremenskih perioda izlaganja (24, 48 i 72 sata). Tretmani većim koncentracijama Se rezultirali su inhibicijom rasta alga i pojačanim stvaranjem ROS-a u stanicama. Također, selenit je uzrokovao povećanje ukupne koncentracije topljivih fenola, smanjenje koncentracije tGSH te povećanje aktivnosti GST-a. Tretman najnižom koncentracijom selenita imao je pozitivan učinak na rast alga i smanjenje sadržaja ukupnog ROS-a u stanicama. Učinak Se na antioksidacijski odgovor ovisio je o primijenjenoj koncentraciji i vremenu izlaganja selenitu.

Broj stranica: 54
Broj slika: 10
Broj tablica: 1
Broj literaturnih navoda: 118
Broj priloga: 2
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: selenit, oksidacijski stres, antioksidacijski odgovor, glutation, zelene mikroalge

Datum obrane: 6. ožujka 2019.

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. dr. sc. Rosemary Vuković, doc., predsjednik povjerenstva
2. dr. sc. Dubravka Špoljarić Maronić, doc., komentor i član
3. dr.sc. Tanja Žuna Pfeiffer, doc., član
4. dr.sc. Zorana Katanić, doc., zamjena člana

Rad je pohranjen: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

BASIC DOCUMENTATION CARD **Master Thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Biology
Graduate university study programme in Biology and Chemistry Education

Scientific area: Natural science
Scientific Field: Biology

The effect of selenium on glutathione content and antioxidant activity in *Monoraphidium* cf. *contortum*

Nikolina Sabo

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

Short abstract: Selenium (Se) is a trace element that appears in nature in many organic and inorganic forms. Previous investigations showed a dual impact of Se on the living world - it acts as an essential micronutrient, but also as a toxicant, depending on its concentration, chemical form and other environmental parameters. Potential toxicity lies in the ability of its bioaccumulation by primary producers, particularly microalgae, which provide its transport along the food chains in aquatic ecosystems. In the context of the above, the study aimed to determine the effect of different selenite concentrations (5, 25, 50 and 100 mg/L) on the growth of unicellular green alga *Monoraphidium* cf. *contortum*, the activity of antioxidant enzyme glutathione S-transferase (GST), the content of total soluble phenols and total glutathione (tGSH) and the total content of reactive oxygen species (ROS) during different periods of treatment (24, 48 and 72 hours). The results showed the inhibiting effect of higher Se concentrations on algal growth and enhanced ROS generation in cells. Also, selenite treatment induced an increase in the content of total soluble phenols, a decrease in the content of tGSH and increased GST activity. Treatment with the lowest concentration of selenite had a positive effect on algal growth and reduced the total content of ROS in cells. The effect of Se on the antioxidative response in algal cells depended on the applied concentration and time of exposure to selenite.

Number of pages: 54
Number of figures: 10
Number of tables: 1
Number of references: 118
Original in: Croatian

Key words: selenite, oxidative stress, antioxidative response, glutathione, green microalgae

Date of thesis defense: 6th March 2019

Reviewers:
1. Rosemary Vuković, Assistant Professor, PhD, president
2. Dubravka Špoljarić Maronić, Assistant Professor, PhD, co-supervisor and member
3. Tanja Žuna Pfeiffer, Assistant Professor, PhD, member
4. Zorana Katanić, Assistant Professor, PhD, substitute reviewer

Thesis deposited: on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

U prvom redu, zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Ivni Štolfi Čamagajevac na ukazanom povjerenju, prenesenom znanju i poticanju tijekom studiranja i pri izradi ovog diplomskog rada. Isto tako, zahvaljujem komentorici doc. dr. sc. Dubravki Špoljarić Maronić na motivaciji, svakoj pruženoj pomoći i dostupnosti pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada. Objema sam iskreno zahvalna na stručnom vodstvu i vremenu koje su mi posvetile.

Zahvala i doc. dr. sc. Rosemary Vuković na korisnim savjetima, idejama i pomoći pri eksperimentalnom dijelu rada.

Hvala i doc. dr. sc. Mirni Velki na ustupljenoj opremi i pomoći.

Zahvaljujem se i kolegama i prijateljima koji su na bilo koji način olakšali izradu ovog rada i obilježili moje vrijeme studiranja. Osobito hvala Katarini za svaku pomoć i prijateljstvo od prvih studentskih dana.

Posebno hvala Josipu, koji je uvijek bio uz mene, motivirao me i pružao podršku i ljubav.

Najveća zahvala pripada mojoj obitelj, roditeljima i sestri Tihani, za sva odricanja, savjete, razumijevanje i bezuvjetnu pomoć tijekom studiranja.

1. UVOD 1

1.1 Kemijski oblici selena u prirodi i bioraspoloživost 1

1.2 Biokemijska uloga i fiziološki učinak selena 4

1.2.1 Biomarkeri oksidacijskog stresa i antioksidacijskog odgovora 7

1.2.1.1 Reaktivne kisikove tvari 7

1.2.1.2 Glutation 7

1.2.1.3 Glutation S- transferaza (EC 2.5.1.18.) 8

1.2.1.4 Fenolni spojevi 8

1.2.2 Učinak selena na antioksidacijski sustav 9

1.3 Cilj istraživanja 10

2. MATERIJALI I METODE 11

2.1 Opis eksperimenta 11

2.1.1 Uzgoj kultura alge *Monoraphidium* cf. *contortum* 11

2.1.2 Tretman kultura natrijevim selenitom ($Na_2SeO_3 \times 5H_2O$) 13

2.2 Metode rada 14

2.2.1 Praćenje prirasta kulture 14

2.2.2 Određivanje koncentracije ukupnih topljivih fenola 14

2.2.3 Određivanje koncentracije ukupnog glutationa 15

2.2.4 Priprema enzimskog ekstrakta i određivanje aktivnosti glutation S-transferaze. 16

2.2.5 Određivanje sadržaja reaktivnih kisikovih spojeva 17

2.3 Statistička obrada rezultata 18

3. REZULTATI 19

3.1 Utjecaj selenita na prirast kulture *Monoraphidium* cf. *contortum* 19

3.2 Utjecaj selenita na koncentraciju ukupnih topljivih fenola u stanicama kulture *Monoraphidium* cf. *contortum* 20

3.3 Utjecaj selenita na sadržaj ukupnog glutationa u stanicama kulture *Monoraphidium* cf. *contortum* 22

3.4 Utjecaj selenita na aktivnost glutation S-transferaze u stanicama kulture *Monoraphidium* cf. *contortum*..... 23

3.5 Utjecaj selenita na sadržaj reaktivnih kisikovih tvari u stanicama kulture *Monoraphidium* cf. *contortum*..... 24

4. RASPRAVA..... 26

5. ZAKLJUČCI..... 30

6. LITERATURA..... 31

7. PRILOZI..... 43

7.1 Prilog 1. Priprema BBM medija..... 43

7.2 Prilog 2. Metodički dio..... 44

1. UVOD

1.1 Kemijski oblici selena u prirodi i bioraspoloživost

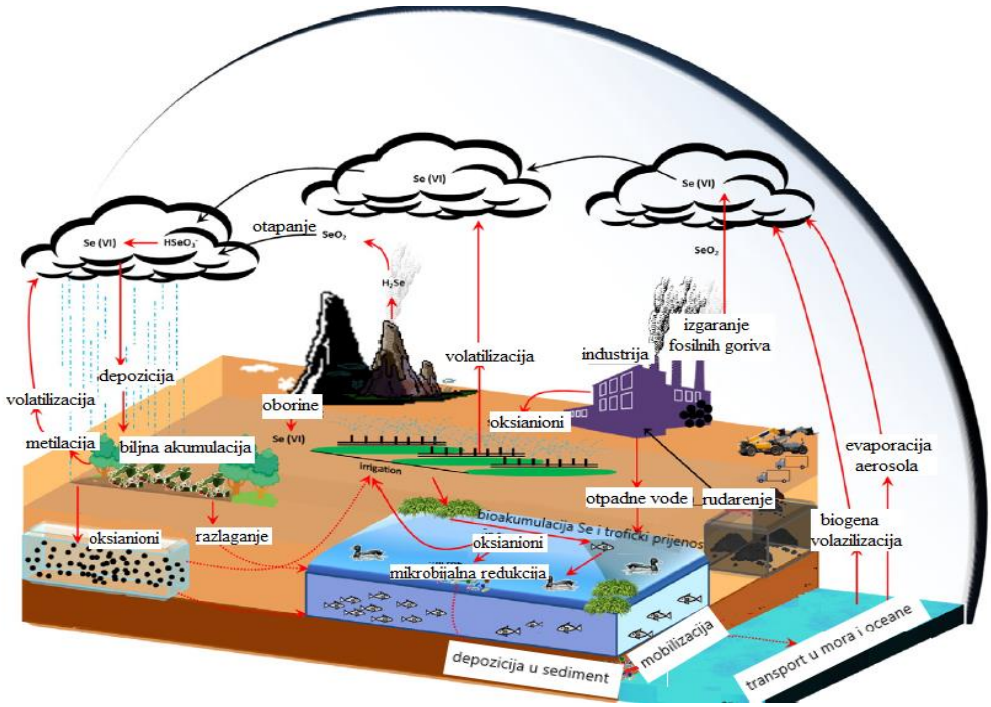
Selen (Se) je kemijski element koji se u prirodi pojavljuje u tragovima, ali u brojnim organskim i anorganskim oblicima. Metaloid je te pripada skupini halkogenih elemenata (VIA) periodnog sustava što određuje njegova kemijska i fizikalna svojstva između svojstava metala i nemetala. Se je po svojim kemijskim svojstvima sličan sumporu (S), koji, iako je nemetal, pripada istoj skupini, što objašnjava analogiju u reaktivnosti s drugim elementima i spojevima (Pilon-Smits i Quinn, 2010; Fordyce, 2005). U biologiji i geologiji česti su primjeri interakcije Se i S te zamjene jednog elementa drugim u stvaranju spojeva. Važnost Se očituje se u održavanju normalnog fiziološkog stanja gotovo svih živućih organizama, što znači da ga autotrofni organizmi moraju apsorbirati iz tla, vode ili zraka, dok ga heterotrofi preuzimaju sekundarno putem lanca ishrane. Esencijalan je za brojne organizme, uključujući sisavce, mnoge bakterije i određene vrste zelenih alga, jer sudjeluje u brojnim biološki važnim procesima (Araie i Shiraiwa, 2009; Fu i sur., 2002; Stadtman 1996, 1990). Međutim, zastupljen u prekomjernim koncentracijama može djelovati izrazito toksično (Gojković, 2015; Vítová i sur., 2015; Pilon-Smits i Quinn, 2010; Umysová, 2009; Morlon i sur., 2005; Parkman i Hultberg, 2002). Potencijalna toksičnost leži u sposobnosti bioakumulacije primarnih producenata i prijenosa prema višim trofičkim nivoima putem složene hranidbene mreže (Presser i Luoma, 2010; Hamilton, 2004; Stewart i sur., 2004). Granicu između nedostatka i toksičnosti, tj. optimalni raspon koncentracija unutar kojih je unos Se poželjan, teško je općenito izreći za pojedine skupine organizama, s obzirom na to da se razlike uočavaju na razini vrste (Hamilton 2002).

Kao rezultat kemijske specifičnosti, Se je široko zastupljen na Zemlji, uključujući stijene, tlo, vodu, zrak te biljna i životinjska tkiva (Beatty i Russo, 2014; Fordyce, 2005). Anorganski Se najvećim je dijelom dostupan u obliku oksianiona topljivih u vodi – selenata (SeO_4^{2-}) i selenita (SeO_3^{2-}) (Tan i sur., 2016; McNeal i Balistrieri, 1989). U laboratorijskim istraživanjima utjecaja Se na različite pokazatelje u biljnim organizmima uglavnom se koriste selenati i seleniti, koje biljke u različitoj mjeri mogu učinkovito apsorbirati i tako povećavati njegovu bioraspoloživost u prirodi. Organizmima je rijetko dostupan Se u elementarnom obliku jer je netopljiv, iako može biti prisutan u obliku koloidnih nakupina (Riedel i Sanders, 1996). U prisutnosti reducensa prima elektrone, pri čemu se stvara selenidni anion (Se^{2-} ili HSe^-). Selenidi su, također, zbog netopljivosti

organizmima biološki neraspoloživi. Uzrok velikoj raznolikosti spojeva Se u prirodi je nekoliko oksidacijskih stanja u kojima se može nalaziti: selenid (-II), elementarni Se (0), selenit (+II) i selenat (+VI), a svako rezultira različitim ponašanjem u kemijskim reakcijama. Organski oblici Se nastaju kao rezultat sorpcije biogenih spojeva i metilacije (Nagpal, 2000). Važni organski oblici su selenoaminokiseline – selenometionin (SeMet) i selenocistein (SeCys). Tijekom sinteze proteina zamjenjuju uobičajene aminokiseline koje sadrže S i inkorporiraju se u proteine (Milanović i sur., 2015; Pilon-Smits i Quinn, 2010). Poveznica između anorganskog i organskog Se je u živim organizmima, primarno fotoautotrofima. Se se ispire iz stijena, sedimenata i tala u vode, gdje je dostupan biljnim organizmima. U biljke se najčešće unosi anorganski selenat, koji se reducira i ugrađuje u organske komponente i dalje prenosi kroz hranidbeni lanac te naposljetku razgrađuje i izlučuje iz organizma, čime se upotpunjuje biogeokemijski ciklus Se (Tan i sur., 2016; Terry i sur., 2010) (Slika 1). Podaci o kemijskim svojstvima anorganskog Se i metaboličkim transformacijama u organske oblike ključni su parametri u procjeni bioraspoloživosti.

Izvori Se mogu biti primarni (erupcije vulkana i metalni sulfidi) i sekundarni (biološki izvori) te antropogeni (izgaranje fosilnih goriva, proizvodni procesi, rudarstvo i sl.) (Fordyce, 2005; Nagpal, 2000; Adriano, 2001; Presser, 1994). U stijenama ili tlima Se se često može pronaći u kombinaciji sa S u sulfidnim mineralima (Tokunaga i sur., 1996; Neal, 1995; Fleming, 1980). U Zemljinoj kori pojavljuje se u rasponu koncentracija od 0,05 do 0,5 mg/kg (Tan i sur., 2016). Posebno su izražene razlike u koncentracijama Se u tlu. Prema Martensu i sur. (2003), koncentracija Se u tlima prirodno se kreće u rasponu od 0,05 do 0,09 mg/kg, dok Fordyce (2005) govori o prosječnoj koncentraciji od 0,4 mg/kg. Na globalnoj razini postoji široki raspon koncentracija Se, od tala siromašnih Se sve do iznimno bogatih, selenifernih tala (1200 mg/kg) (Fairweather-Tait i sur., 2010; Fordyce, 2005). Ipak, područja s izraženom deficijencijom Se raširenija su u odnosu na područja s optimalnom ili prekomjernom koncentracijom. Iz tog razloga, antropogeno obogaćivanje površina Se u agrikulturalne svrhe često je u procesima biofortifikacije (Germ i Stibilj, 2007). U vodenim sustavima koncentracije Se općenito su niske u odnosu na tlo, pri čemu se u nezagađenim sustavima, kako izvještava Gojković (2015), radi o vrijednostima između 0,01 i 0,2 μg/L (ekvivalentno 0,13-0,25 nM), dok Jacobs (1989) govori o prosječnoj vrijednosti od 1 μg/L. Sadržaj Se otopljenog u vodi u nekim područjima povećava se efluksom nusprodukata industrijskih procesa direktno u okolne vode,

odvodnjom s poljoprivrednih površina obogaćenih Se te kroz prirodni biogeokemijski ciklus, kemijskim i biološkim transformacijama posredstvom mikroalgalnih zajednica (Gojković i sur., 2015, Fordyce, 2005; Morlon i sur., 2005a). U takvim kontaminiranim područjima koncentracija Se može varirati od 1 do 10 μg/L (ekvivalentno 7-10 nM) (Simmons i Emery, 2010). Saiki i sur. (1993) izmjerili su koncentracije Se u riječnoj vodi, sedimentu, detritusu i različitim organizmima te ustanovili da su koncentracije generalno povišene uslijed odvodnje s poljoprivrednih površina kao i da se stupanj bioakumulacije povećava kroz hranidbeni lanac. U zrak Se dospijeva zahvaljujući metaboličkoj sposobnosti pojedinih biljnih vrsta i mikrobijalnom aktivnošću, koji se oslobađaju viška Se volatilizacijom plinovitih organskih oblika – dimetil selenida (DMSe, $(CH3)_2Se$), dimetil diselenida (DMDSe, $(CH3)_2Se_2$) i dimetil selenona (DMS, $(CH3)_2SeO_2$) (Terry i sur., 2000; Hartikainen, 2005; Mayland, 1994; Zhang, 1993) (Slika 1). U atmosferi je prisutan u vidu metilnih derivata (Web 1). Selenovodik (H_2Se) je toksični plin nastao u vulkanima, koji u prisutnosti vode lako oksidira u elementarni Se (McNeal i Balistrieri, 1989). Najčešći oblik Se u zraku, osobito danas, je selenov dioksid (SeO_2), otrovan plin koji se ne pojavljuje prirodno u okolišu, ali je produkt sagorijevanja fosilnih goriva. Selenokomponente u zraku općenito se vrlo brzo razlažu na vodu i elementarni Se, koji nije toksičan s obzirom na netopljivost u vodi.



Slika 1. Shematski prikaz biogeokemijskog ciklusa Se (preuzeto i prilagođeno prema Tan i sur., 2016).

1.2 Biokemijska uloga i fiziološki učinak selena

Složenu ulogu i utjecaj Se u živim organizmima najbolje opisuje paradoksalna izjava preuzeta iz rada Lenza i Lensa (2009), koja opisuje Se kao „esencijalni toksin". Naime, učinak Se na živi svijet je dvojak: djeluje kao esencijalan mikronutrijent, ali i kao toksični element, u ovisnosti o koncentraciji, kemijskom obliku, mehanizmima apsorpcije, vremenu izloženosti, vrsti organizma i detoksikacijskim mehanizmima (Zheng i sur., 2017; Gojković, 2015; Thiry i sur., 2012; Umysová i sur., 2009; Wheeler i sur., 1982). Vrlo je važno proučavati i razumjeti dvovrsnu ulogu Se, jer kao nutrijent ima antioksidacijski potencijal, odnosno važnu ulogu u suzbijanju oštećenja stanica uzrokovanih slobodnim radikalima, dok u prekomjernim koncentracijama, djelujući kao toksin, stimulira stvaranje istih, tj. ponaša se kao prooksidans, što za posljedicu ima pojavu oksidacijskog stresa. Esencijalnost Se dokazana je u biljnim stanicama nižeg razvojnog stupnja, dok se kod viših biljaka i kvasaca ta osobina ne uočava, iako postoje indikacije za brojne pozitivne učinke (Zheng i sur., 2017; Pilon-Smits i Quinn 2010).

Oksidacijski stres predstavlja stanje organizma u kojem je ravnoteža oksidacijsko-redukcijskih procesa u stanicama narušena, odnosno pomaknuta je prema oksidaciji, pri čemu dolazi do prekomjerne oksidacije molekula u metaboličkim procesima i stvaranja slobodnih radikala kisika, koji ne mogu biti uklonjeni postojećim homeostatskim mehanizmima. Ovi endogeni spojevi odgovorni za pomak redoks ravnoteže u organizmima zajednički se nazivaju reaktivne kisikove tvari (engl. *Reactive Oxygene Species*, ROS), a uglavnom uključuju superoksidni radikal ($O^{2\bullet-}$), hidroksilni radikal ($OH^{\bullet}$), metilni radikal ($CH_3^{\bullet}$) i slobodne radikale koji su produkti lipidne peroksidacije ($LOO^{\bullet}$, $ROO^{\bullet}$) te neradikalne molekule kao što su vodikov peroksid (H_2O_2) i singlentni kisik ($^1O_2$) (Feng i sur., 2013). Formiranje ROS-a neizbježno je u oksidirajućoj atmosferi provođenjem aerobnog metabolizma i zahtjeva postojanje antioksidacijskih enzima i neenzimskih antioksidansa, spojeva koji će prevenirati nastanak oksidacijskog stresa direktno ili indirektno putem enzimske katalize. Reagirajući s membranskim lipidima, nukleinskim kiselinama, proteinima i enzimima, ROS uzrokuju oštećenja stanica, tkiva i organizama te brojne bolesti (Zheng i sur., 2017). Kao odgovor na stres javlja se pojačana sinteza antioksidacijskih enzima i neenzimskih antioksidansa (Feng i sur., 2013; Roat-Malone, 2002). Neenzimski antioksidacijski sustav čine antioksidansi male molekularne mase, primjerice glutation (GSH), askorbinska kiselina, tokoferoli, flavoni, antocijanini, karotenoidi i sl., a enzimski antioksidacijski sustav antioksidacijski enzimi, poput

superoksid-dismutaze (SOD), katalaze (CAT), askorbat-peroksidaze (APX), glutation-peroksidaze (GSH-Px) gvajakol-peroksidaze (GPOD), glutation-reduktaze (GR) i druge nespecifične peroksidaze (POD) (Asada, 2006; Cao i sur., 2004; Meharg i Hartley-Whitaker, 2002; Hartikainen i sur., 2000; Lu, 1999; Thompson i sur., 1987). Navedeni enzimi mogu se pojavljivati u različitim izoenzimskim oblicima i biti aktivni u različitim dijelovima stanice, a njihova ekspresija okolišno regulirana, čime se sprječava prekomjerno generiranje ROS-a u stanicama.

Fiziološki učinak Se na organizam očituje se kroz funkcije proteina, konkretno selenoproteina, organskih oblika Se, koji nastaju zamjenom S sa Se u aminokiselinama Met i Cys (Brigelius-Flohe i Flohe, 2016). Integrirane modificirane aminokiseline – SeCys i SeMet – posjeduju selenolnu funkcijsku skupinu (–SeH), čine funkcionalni dio polipeptida, odnosno nalaze se u aktivnom mjestu proteina i odgovorne su za fiziološki odgovor (Pilon-Smits i Quinn, 2010; Flohe, 2009; Fordyce, 2005). Aminokiselina SeCys kovalentno se veže u primarnu strukturu proteina, a kodirana je stop kodonom UGA odgovarajuće mRNA (Araie i Shiraiwa, 2016; Vítová i sur., 2015). Sinteza SeMet i SeCys odvija se na specijaliziranim Se-tRNA, koje određuju njihovu ugradnju u rastući polipeptidni lanac. Se u sastavu SeCys je oko sto puta jači nukleofil u odnosu na S iz Cys, što značajno utječe na biokemijska svojstva (Araie i Shiraiwa, 2009). Selenoproteini su, u odnosu na enzime bez Se, jači antioksidansi, posebnim mehanizmima uklanjaju ROS iz stanica, a imaju ulogu i u imunološkom odgovoru (Pilon-Smits i Quinn, 2010). Do pojave toksičnosti dolazi kada zamjena S sa Se u proteinima dovede do pogrešnog slaganja i metaboličke disfunkcije proteina (Terry i sur., 2000). Klasični predstavnici selenoproteina su neki od navedenih antioksidacijskih enzima, a zbog prirode SeCys svrstavaju se u skupinu oksidoreduktaza, s obzirom na to da im je za aktivnost potreban snažan nukleofil (Brigelius-Flohe i Flohe, 2016; Stadtman, 1996). Preko 40 porodica selenoenzima identificirano je u velikom broju raznolikih organizama, a većina je karakteristična za animalne stanice (Araie i Shiraiwa, 2016; Vítová i sur., 2015). Važnu ulogu u kontroli toksičnosti Se imaju tioredoksin-reduktaze (TR), ključni enzimi u metabolizmu Se, te homolozi GPx-a, prvih enzima za koje je dokazano da u svom sastavu ima ugrađen SeCys (Vítová i sur., 2015). Selenoproteini su pronađeni i u algama te detaljno proučavani. U zelenoj mikroalgi *Chlamydomonas reinhardtii*, set selenoproteina nalikuje onom u organizmima sisavaca, a od ukupno 10 selenoproteina 5 je aktivnih izoenzima GPx sa SeCys u reakcijskom središtu (Araie i Shiraiwa, 2016). Analizama genoma alga roda

Chlamydomonas otkriveno je da ukupno sadrži 12 selenoproteina, predstavnika 10 porodica, koji su ključni u održavanju vijabilnosti stanica (Grossman i sur., 2007; Lobanov i sur., 2007; Novoselov i sur., 2002). Biomasa klorokokalne alge *Scenedesmus quadricauda* sadrži visok udio organski vezanog Se, što je pridonijelo proučavanju odnosa prisutnih anorganskih oblika i aktivnosti TR-a (Vítová i sur., 2011). Selenoproteini su primjenom bioinformatičkog pristupa identificirani i u drugim vrstama mikroalga – *Ostreococcus tauri* i *O. lucimarinus* (Prasinophyceae), *Emiliania huxleyi* (Haptophyta) te dijateomeji *Thalassiosira pseudonana* (Lobanov i sur., 2009; Araie i sur., 2008; Lobanov i sur., 2007; Obata i Shiraiwa, 2005). Općenito, postoji velika varijabilnost u zastupljenosti selenoproteina u eukariotima: dok u višim biljkama i gljivama nisu identificirani, u stanicama alga i riba moguće je identificirati 30 ili više različitih selenoenzima u proteomu (Vítová i sur., 2015).

Istraživanja o učinku Se su toliko intenzivna upravo zbog načina na koji utječe na vodene i kopnene organizme, od alga do sisavaca, uključujući i ljude. Učinak Se najbolje se može istražiti proučavanjem fizioloških, biokemijskih i molekularnih parametara na nižim organizmima. Idealan model za ovakvu vrstu istraživanja u vodenim ekološkim sustavima su glavni primarni producenti – alge. Jednostanične alge su mikroskopskih veličina, stoga ih je lako uzgajati za potrebe velikih istraživanja, a pogodne su kao modelni organizmi zbog kratkog životnog vijeka, velike osjetljivost na promjene u okolišu te čine osnovnu kariku u hranidbenima lancima vodenih ekoloških sustava. Većina istraživanja provedena je na vrstama zelenih mikroalga: *Chlamydomonas reinhardtii, Scenedesmus quadricauda, Dunaliella salina, Chlorella* sp. te na makroalgi *Ulva* sp. (Zhong i sur., 2017; Vriens i sur., 2016; Gojković 2015; Sun i sur., 2014; Schiavon i sur., 2012; Vítová i sur., 2011; Fournier i sur., 2010; Umysová i sur., 2009; Geoffroy i sur., 2007; Reunova i sur., 2007; Morlon i sur., 2006; Morlon i sur. 2005a, b). Zbog mogućnosti transformacije anorganskog Se u organske oblike i sekvestracije unutar stanica postale su ciljni organizmi u istraživanjima. Učinak Se na jednostaničnu zelenu mikroalgu *Monoraphidium contortum* do danas je nedovoljno istražen. Ova je vrsta kozmopolitska i tijekom cijele godine nalazi se u fitoplanktonu slatkovodnih sustava. Može se pronaći u nutrijentima osiromašenim tlima te umjereno do jako onečišćenim vodama (John i sur., 2011). Bogen i sur. (2013) identificirali su vrstu *M. contortum* kao obećavajuću sirovinu u proizvodnji biogoriva zbog visoke produktivnosti biomase tijekom faze eksponencijalnog rasta, kao i odgovarajućeg

sadržaj lipida. Stoga, poznavanje optimalne koncentracije Se potrebne za rast ove alge moglo bi pronaći svoj značaj i u proizvodnji biogoriva.

1.2.1 Biomarkeri oksidacijskog stresa i antioksidacijskog odgovora

Mjerljive i/ili uočljive promjene u biološkom ili biokemijskom odgovoru, u rasponu od molekularne do fiziološke razine, uključujući promjene u ponašanju, koje ukazuju na izloženost okolišnom stresoru ili toksični učinak stresora i ekološki su relevantne nazivamo biomarkerima. Učinkovit su dijagnostički alat u prirodnim sustavima, a općenito se klasificiraju u tri kategorije: biomarkeri izloženosti, učinka i osjetljivosti (Cossu-Leguille i Vasseur, 2013). Budući da mnogi enzimi i neenzimski antioksidansi sudjeluju u uklanjanju suviška ROS-a, mjerenjem njihove aktivnosti ili ukupnog sadržaja moguće je procijeniti oksidacijski status organizma.

1.2.1.1 Reaktivne kisikove tvari

ROS su kemijski vrlo reaktivne i agresivne tvari koje nestabilnost uzrokovanu nesparenim elektronom nastoje neutralizirati reakcijom s elektronima najbliže molekule (Machu i sur., 2018). Kisik, koji se normalno oslobađa iz mitohondrija u procesu oksidativne fosforilacije, zbog velikog elektronskog afiniteta uobičajen je krajnji akceptor elektrona. U normalnim uvjetima u stanici koncentracija ROS-a kontrolira se aktivnošću složenog antioksidacijskog sustava, koji minimizira oksidativna oštećenja biološki važnih makromolekula. Pojačan intenzitet aerobnog metabolizma vodi k oksidacijsko-redukcijskim poremećajima i može rezultirati djelomičnom redukcijom kisika, što uzrokuje stvaranje prekomjernih koncentracija ROS-a (Feng i sur., 2013). U tom pogledu, ROS mogu imati ulogu signalnih molekula, jer nakupljanjem u stanicama djeluju kao okidač za pojačanu sintezu i aktivaciju antioksidacijskog sustava (Sun i sur., 2014). Ukupna koncentracija ROS-a odraz je oksidacijskog statusa organizma te ujedno i važan biomarker u istraživanjima.

1.2.1.2 Glutation

Tiolni tripeptid glutation (GSH, γ-glutamil-cisteinil-glicin) jedan je od najpoznatijih i najvažnijih neenzimskih antioksidansa, a ujedno i biomarker izloženosti toksinima (Cossu-Leguille i Vasseur, 2013). Ističe se kao važna signalna komponenta, reducens i kelator teških metala (engl. *heavy metals*, HM) u reakcijama detoksikacije (Jozefczak i sur., 2012). GSH je zbog stabilnosti i jake nukleofilnosti centralnog Cys izvrstan reducens,

što omogućuje sudjelovanje u redoks procesima u stanicama. Među brojnim važnim ulogama GSH središnja je ona u metabolizmu Se i redukciji ROS-a. Anorganski oblici Se reagiraju s tiolima, kakav je GSH i stvaraju se selenotrisulfidi. U suvišku Se oni dalje reagiraju s drugim tiolima i oksidiraju ih, što rezultira stvaranjem ROS-a (Mézes i Balogh, 2009). Postoji poveznica između GSH i enzima uključenih u metabolizam Se. Kada biljna stanica akumulira selenit, u reakciji s GSH formiraju se različiti metaboliti: GSH-selenit, selenodiglutation (GS-Se-SG), selenol (GS-SeH) i konačno GS-konjugirani selenid (GS-Se-) (Janz i sur. 2010; Terry i sur., 2000). Potvrđeno je i da GSH može direktno reagirati sa Se kako bi se formirali SeCys i SeMet (Terry i sur., 2000). Dakle, sadržaj ukupnog GSH (tGSH, GSSG/GSH) daje specifične informacije o oksidativnom statusu organizma.

1.2.1.3 Glutation S- transferaza (EC 2.5.1.18.)

Glutation S-transferaze (GST) pripadaju velikoj porodici detoksikacijskih izoenzima koji kataliziraju konjugaciju elektrofilnih i hidrofobnih ksenobiotika s tripeptidom GSH (Kumar i Trivedi, 2018; Dixon i sur., 2010). Pronađeni su u svim tipovima organizama, uključujući biljke, životinje i bakterije. Novije studije istražuju molekularne i biokemijske karakteristike algalnih GST (Herve i sur., 2010). Enzimi GST izravno su uključeni u obranu organizama od kontaminanata, a njihova se aktivnost često koristi kao biomarker izloženosti u studijama utjecaja na okoliš, budući da je inducirana organskim ksenobioticima (Beatty i Russo, 2014). Enzimski i neenzimski antioksidacijski sustavi nespecifični su biomarkeri izloženosti jer mogu biti povezani s raznim brojem okolišnih zagađivača. Brojne studije na biljkama otkrile su mehanizam kojim GST katalizira konjugaciju širokog spektra elektrofilnih ksenobiotika egzogenog i endogenog porijekla (lipidnih peroksida, metilglioksala i raznih herbicida) s GSH (Kumar i Trivedi 2018). Stoga, dostupnost GSH parametar je koji ograničava aktivnost GST-a.

1.2.1.4 Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su najznačajniji i najrašireniji sekundarni biljni metaboliti. Pripadaju skupini biološki aktivnih komponenti fotosintetskih organizama i smatraju se najvažnijim prirodnim antioksidansima (Machu i sur., 2015; Onofrejova i sur., 2010). Imaju aromatsku strukturu s jednom ili više hidroksilnih skupina. Klasifikacija fenola je složena, a najznačajnije skupine su fenolne kiseline, flavonoidi, izoflavonoidi i fenolni polimeri (Machu i sur., 2015). Karakteristični su za biljne organizme i dobro su istraženi, a primarna uloga u biljkama je zaštita od UV zračenja i patogena. Vrlo je ograničena

količina informacija vezana uz sadržaj i vrstu fenolnih spojeva u mikroalgama, kao i poveznica između sadržaja fenola i antioksidacijskog kapaciteta (Li i sur., 2007). Do sada pronađeni fenolni spojevi u algama uključuju florotanine, katehine, flavonole i flavonol glikozide iz smeđih i crvenih alga, čija je pretpostavljena uloga inhibicija lipidne peroksidacije (LPO) (Machu i sur., 2015; Frova, 2006). Ustanovljeno je da mikroalge proizvode različite antioksidacijske spojeve, uključujući karotenoide, polinezasićene masne kiseline i polisaharide te nije razjašnjeno koja skupina spojeva ima najizraženiju ulogu u njihovom antioksidacijskom odgovoru.

1.2.2 Učinak selena na antioksidacijski sustav

Dosadašnja istraživanja pokazala su otpornost određenih vrsta alga na povišene koncentracije Se u vodi te na njihovu važnu ulogu u brzoj transformaciji i prijenosu Se kroz akvatičke hranidbene mreže (Janz i sur., 2010). Općenito, u odnosu na druge trofičke razine, alge mogu koncentrirati Se u najvećoj mjeri. Ipak, recentna istraživanja slatkovodnih vrsta alga pokazuju da tretmani prekomjernim koncentracijama Se uzrokuju pojačanu akumulaciju ROS-a u stanicama, što dokazuje kako alge generalno nisu otporne na visoke koncentracije Se te da postoji varijabilnost u toleranciji (Feng i sur., 2013). Prag kronične toksičnosti za izloženost zelenih alga natrijevom selenitu duže od 4 dana varira između 522 i 70,000 µg/L (US EPA (2004)). Određeni broj studija sugerira da je selenit toksičniji od selenata, zbog brže metaboličke transformacije u selenoaminokiseline, odnosno zamjene S u proteinima, dok druge ističu veću toksičnost selenata uslijed jače inhibicije stope rasta (Terry i sur., 2000). U mikroalgama toksičnost se najviše očituje u opadanju stope eksponencijalnog rasta i gustoće populacije te inhibiciji fotosinteze i stanične diobe (Umysová i sur., 2009; Geoffroy i sur., 2007; Morlon i sur., 2005b, Bennett, 1988). Nadalje, toksičnost Se ovisi i o kapacitetu sinteze neproteinskih aminokiselina i njihovom volatilizilizacijom u obliku DMSe (Mézes i Balogh, 2009). Glavni mehanizam detoksikacije, kako sugeriraju studije na višim biljkama, je redukcija unutarstaničnih koncentracija SeCys i SeMet te sinteza manje toksičnih oblika, poput selenometil-selenocisteina (SeMetSeCys) i selenocistationina (Terry i sur., 2000). K tome, dolazi do inhibicije aktivnosti antioksidacijskih enzima, primjerice APX, POD i CAT, pri predugom izlagaju prekomjernim koncentracijama Se, što ukazuje na akumulaciju ROS-a (Feng i Wei, 2012; Vitova i sur., 2011; Janz i sur., 2010; Umysová i sur., 2009). Suprotno tome, aktivnost GST-a inducira se u uvjetima pojačanog oksidacijskog stresa (Hossain i sur., 2010). GST pojačava aktivnost prilikom izloženosti HM i herbicidima (Dixon i sur., 2010).

Pokazalo se da tretman kadmijem uzrokuje povećanu aktivnost GST-a u listovima zlatnog graha (*Vigna radiata*) (Hossain i sur., 2010). Daljnje studije provode se u smjeru istraživanja formacija Se-HM kompleksa i učinka na enzime poput GST-a, zamjena S sa Se u Fe-S klasterima te odnosima Se, S, Fe i LPO (Feng i sur., 2013). Koncentracije Se koje premašuju fiziološki optimum rezultiraju i pojačanom sintezom neenzimskih antioksidansa, u prvom redu spojeva S povezanih s tolerancijom stresa, kao što su GSH i fitokelatini (Simmons i Emery, 2010). Potreba za pojačanom sintezom GSH javlja se kao odgovor na uključenost u metaboličke transformacije Se i reakcijske mehanizme enzima GPx i GST u svom reduciranom obliku te GR u oksidiranom (Schiavon i sur., 2012). Istraživanja na višim biljkama brojnija su u odnosu na alge.

1.3 Cilj istraživanja

Dosadašnja istraživanja ukazala su na blagi stimulacijski učinak primjene nižih koncentracija selenita na rast alga, a smanjenje broja stanica i snažnu aktivaciju antioksidacijskog sustava prilikom primjene viših koncentracija, kao i na veliku varijabilnost među vrstama s obzirom na tendenciju akumulacije Se iz okoliša.

U kontekstu navedenog i uslijed nedovoljne istraženosti učinka selenita na antioksidacijsku aktivnost u stanicama kulture jednostanične zelene alge *Monoraphidium* cf. *contortum*, cilj istraživanja bio je odrediti učinak različitih koncentracija selenita na rast kulture, aktivnost antioksidacijskog enzima GST, sadržaj ukupnih topljivih fenola, tGSH i ukupan sadržaj ROS-a, a sve u svrhu boljeg razumijevanja prilagodbe alga i strategije održivosti u uvjetima stresa uzrokovanog povećanim koncentracijama Se u vodenim ekosustavima.

2. MATERIJALI I METODE

2.1 Opis eksperimenta

2.1.1 Uzgoj kultura alge *Monoraphidium* cf. *contortum*

Modelni organizam korišten u ovom istraživanju je jednostanična zelena slatkovodna alga *Monoraphidium* cf. *contortum* (Slika 3). Kultura alge kupljena je iz zbirke kultura autotrofnih organizama laboratorija Botaničkog instituta Češke akademije znanosti u Třeboňu, a kultivirana u Laboratoriju za ekologiju alga, Zavoda za ekologiju voda Odjela za biologiju u Osijeku. Vrsta *Monoraphidium contortum* (Thuret) Komárková-Legnerová po sistematici svrstava se u odjeljak Chlorophyta, razred Chlorophyceae te pripada porodici Selenastraceae (Web 3). Rod *Monoraphidium*, koji broji 30 taksonomski prihvaćenih vrsta, odlikuju uske i izdužene stanice vretenastog oblika, često blago uvijene s ušiljenim krajevima (Web 5). Iako oblik stanice može varirati od ravnog do spiralno uvijenog (do 1,5 spiralna navoja), što ovisi o ekološkim uvjetima staništa, općenito je okarakteriziran kao sigmoidalni do polumjesečasti koji se blago sužava prema ušiljenim krajevima, dok se veličina stanice kreće od 2-182 x 1-8 μm (Web 4). Stanice imaju jednu jezgru, glatke stanične stijenke, kloroplasti su najčešće pojedinačni, parijetalni, a pirenoid obično nije prisutan. Razmnožavanje je nespolno, autosporama, čiji se broj kreće od 2, 4 ili 8 do 16 po sporangiju. Vrsta *M. contortum* smatra se kozmopolitskom i zastupljena je u planktonu tijekom cijele godine, a može se također razviti i u nutrijentima osiromašenim tlima te umjereno do jako onečišćenim vodama. Prirodno se pojavljuje u slatkovodnim ekosustavima na brojnim staništima – primarno u ribnjacima, barama i jezerima (John i sur., 2011).



Slika 2. Morfologija stanica vrste *Monoraphidium contortum* (Web 2).

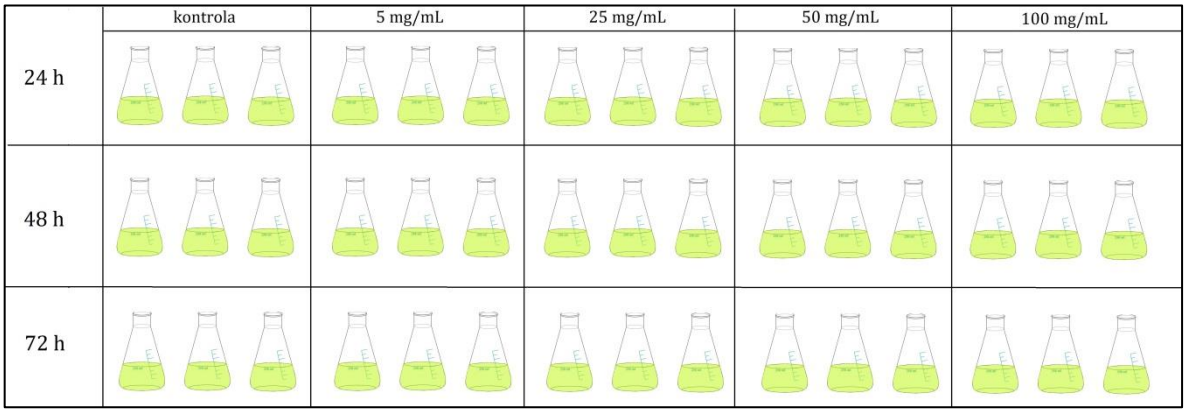
Kulture su uzgajane u tekućem hranjivom mediju (BBM, Bischoff i Bold, 1963; pH=6,6). Za pripremu medija priređeno je 14 stock otopina hranjivih soli, koje su u odmjernim tikvicama od 1000 mL miješane u odgovarajućim volumenima s destiliranom vodom (Prilog 1.). Pripremljeni BBM steriliziran je u staklenim bocama (Schott Duran) u autoklavu, 15 min pri 121°C i tlaku od 1 bar. Presađivanje kulture odvijalo se u laminaru u sterilnim i kontroliranim uvjetima. Samom postupku prethodila je sterilizacija potrebnog pribora i podloge UV svjetlošću tijekom 30 minuta. Kulture su presađivane u sterilne Erlenmeyerove tikvice volumena 250 mL u 100 mL BBM-a. Kako bi se osigurao dovoljan broj stanica za presađivanje tijekom cjelokupnog trajanja eksperimenta, kulture su u kontinuitetu presađivane na tjednoj bazi (Slika 3A). Nakon presađivanja, tikvice su premještene u uzgojnu komoru i ondje uzgajane pri fotoperiodu od 16 sati svijetla i 8 sati tame i temperaturi od 25±2°C te se vodilo računa o razmještanju tikvica unutar komore kako bi se izjednačili uvjeti uzgoja (Slika 3B).



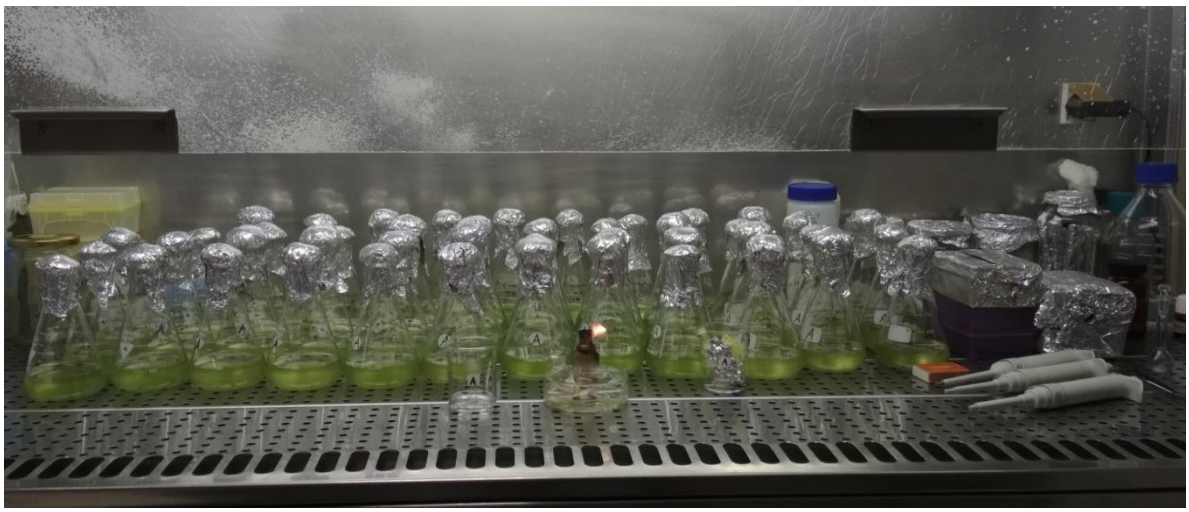
Slika 3. (A) Kontinuirano nasađivanje kulture *Monoraphidium* cf. *contortum* u tekućem hranjivom mediju za potrebe eksprimenta; (B) Rast kultura u uzgojnoj komori (fotografije: Nikolina Sabo).

2.1.2 Tretman kultura natrijevim selenitom ($Na_2SeO_3 \times 5H_2O$)

Za tretman kultura korištena je svježe pripremljena otopina natrijevog selenita ($Na_2SeO_3 \times 5H_2O$, 99% Sigma-Aldrich) u BBM-u. Kulture su tretirane s četiri različite koncentracije selenita (5, 25, 50 i 100 mg/L) u tri replike (Slika 4). Tretman se provodio u laminaru pri sterilnim uvjetima tijekom eksponencijalne faze rasta alga (Slika 5). Kontrolne kulture nisu bile podvrgnute tretmanu selenitom i uzgajane su u jednakim uvjetima. Uzorci stanica alga za potrebe istraživanja uvijek su uzimani 24, 48 i 72 sata nakon tretmana. Također, tijekom eksperimenta kulture u tikvicama razmještane su unutar uzgojne komore i ručno miješane u svrhu smanjenja potencijalnih varijacija i značajnih odstupanja u rezultatima istraživanja.



Slika 4. Shematski prikaz tretmana kulture *Monoraphidium* cf. *contortum* različitim koncentracijama selenita (5, 25, 50 i 100 mg/L).



Slika 5. Tretman kulture *Monoraphidium* cf. *contortum* provodio se pri sterilnim uvjetima u laminaru (fotografija: Nikolina Sabo).

2.2 Metode rada

U istraživanju su tijekom analize određeni navedeni parametri:

- prirast kultura *Monoraphidium* cf. *contortum*
- koncentracija ukupnih topljivih fenola,
- koncentracija ukupnog glutationa (tGSH)
- aktivnost enzima GST,
- sadržaj ROS.

2.2.1 Praćenje prirasta kulture

Prirast kultura *Monoraphidium* cf. *contortum* praćen je brojanjem stanica u Bürker-Türkovoj komorici nakon čega je izračunat ukupni broj stanica u 1 mL za svaki pojedini uzorak. Uzorci stanica za brojanje prikupljeni su 24, 48 i 72 h nakon tretmana i fiksirani u 4%-tnoj otopini formaldehida. U komoricu je dodano po 15 µL svakog uzorka, a brojnost stanica određivala se prebrojavanjem pomoću invertnog mikroskopa (Axiovert 25, Carl Zeiss, Inc., Njemačka). Ukupan broj stanica u 1 mL izračunat je pomoću formule $\bar{x} = \frac{x}{64}$ te je izražen kao srednja vrijednost triplikata.

2.2.2 Određivanje koncentracije ukupnih topljivih fenola

Ukupni topljivi fenoli određeni su metodom po Folinu i Ciocalteau-u (1927). Metoda je spektrofotometrijska i temelji se na oksidaciji fenolnih grupa dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa pri čemu nastaje obojeni produkt. Nereducirani Folin-Ciocalteau reagens žute je boje, dok reducirani ima stabilnu plavu boju. Apsorbancija, odnosno intenzitet obojenja, se mjeri pri 765 nm u odnosu na slijepu probu. Nasađene kulture su nakon 24, 48 i 72 h tretmana centrifugirane 20 min na 6000 okr/min. Nakon odvajanja supernatanta, talog (stanice alga) je ispran od medija u 100 mM kalij-fosfatnom puferu (pH=7,0), prebačen u epruvete volumena 1,5 mL i centrifugiran 20 min na 6500 okr/min. Uslijedila je ekstrakcija dobivenog taloga u 1 mL 70%-tnog etanola, a potom i soniciranje (sonikator Vibra-Cell, Sonics and Materials Inc., SAD) dobivenog ekstrakta (amplituda 40%), u pet intervala od 10 s u ledenoj kupelji (smjesa vode i usitnjenog leda). Svi sonicirani uzorci pohranjeni su na -20ºC te na dan mjerenja centrifugirani na 21000*g* (15 min, 4˚C), a dobiveni supernatanti iskorišteni su za spektrofotometrijsko mjerenje.

Za izradu baždarnog dijagrama kao standardne krivulje pripremljene su otopine galne kiseline (GA) različitih koncentracija razrjeđenjem iz stock otopine koncentracije 5 mg/L. U epruvete volumena 1,5 mL pipetirano je po 100 µL svake koncentracije standarda, dodano 700 µL destilirane vode, 50 µL Folin-Ciocalteau reagensa te je smjesa dobro vorteksirana. Nakon 5 min dodano je 150 µL zasićene otopine Na_2CO_3, nakon čega je reakcijska smjesa ponovno vorteksirana i inkubirana 60 min na 37°C. Nakon inkubacije mjerena je apsorbancija pri 765 nm te je izražen baždarni dijagram koji prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji GA.

Prije određivanja ukupnih topljivih fenola dobiveni supernatanti zagrijavani su u vodenoj kupelji 30 min pri 80°C. U označene epruvete volumena 1,5 mL pipetirano je po 100 µL svakog pojedinog uzorka i dodano 100 µL destilirane vode i 50 µL Folin-Ciocalteau reagensa. U vorteksiranu reakcijsku smjesu, nakon 5 min je dodano 150 µL zasićene otopine Na_2CO_3 te je nakon ponovnog vorteksiranja smjesa inkubirana 60 min pri 37°C. Nakon inkubacije, reakcijska smjesa je centrifugirana 10 min pri 21000g. Apsorbancija je izmjerena na 765 nm korištenjem Lambda 2 (Perkin-Elmer, SAD) spektrofotometra.

2.2.3 Određivanje koncentracije ukupnog glutationa

Koncentracija tGSH (GSH + GSSG) određena je spektrofotometrijski metodom prema Akerboomu i Siesu (1981). Metoda se temelji na kinetičkoj analizi odnosno mjerenju brzine kontinuirane redukcije 5,5`-ditiobis(2-nitrobenzojeva kiselina) (DTNB) katalitičkim količinama GSH, pri čemu nastaje žuto obojeni produkt 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (TNB) i GSSG. Porast apsorbancije mjeri se na 412 nm, a uzrokovan je nastankom TNB-a. Nastali GSSG reciklira se u enzimskoj reakciji kataliziranoj glutation-reduktazom (GR) uz NADPH kao donora elektrona (jednadžbe (1) i (2)):

$$2\ \mathrm{GSH} + \mathrm{DTNB} \rightarrow \mathrm{GSSG} + 2\ \mathrm{TNB} \quad (1)$$

$$\mathrm{GSSG} + \mathrm{NADPH} + \mathrm{H^+} \xrightarrow{glutation\ reduktaza} \mathrm{NADP^+} + 2\ \mathrm{GSH} \quad (2)$$

Kulture su 24, 48 i 72 h nakon tretmana centrifugirane 20 min na 6000 okr/min. Talozi su od medija isprani s u 100 mM kalij-fosfatnom puferu (pH=7.0) i centrifugirani 20 min na 6500 okr/min. Talog je ekstrahiran u 200 µL 5%-te otopine 5-sulfosalicilne kiseline, koja denaturira proteine i ekstrahira GSH. Uslijedilo je soniciranje dobivenog

ekstrakta (amplituda 40%), u pet intervala od 10 s u ledenoj kupelji. Sonicirani ekstrakt centrifugiran je 15 min na 21000*g*, a dobiveni supernatanti prebačeni su u epruvete volumena 1,5 mL i svježi korišteni za mjerenje.

Reakcijski koktel potreban za mjerenje koncentracije tGSH sastojao se od reakcijskog pufera (8 mL 100 mM kalij-fosfatnog pufera + 1 mM EDTA, pH 7.0), 228 µL otopine GR (6 U/mL) i 228 µL otopine DTNB (1.5 mg/mL), a komponente su dobro promiješane. Mjerenju količine GSH u ekstraktima prethodila je izrada standardne krivulje, serijskim razrjeđivanjem 50 µM otopine GSH (pripremljene serijom razrjeđenja alikvota 10 mM stock otopine glutationa) s 5% otopinom SSA. U UV kivete dodano je po 750 µL reakcijskog koktela i 50 µL pripremljenog uzorka te je sadržaj kivete ekvilibriran na 25°C 5 min kako bi se otopina stabilizirala. Konačno, dodano je 250 µL otopine NADPH koncentracije 0.16 mg/mL, sadržaj kivete 3 puta je promiješan inverznim okretanjem kivete i smješten u spektrofotometar. Kinetika reakcije praćena je porastom apsorbancije uslijed nastalog TNB-a, svakih 15 s tijekom 3 min na valnoj duljini 412 nm. Koncentracija ukupnog glutationa izražena je kao nmol GSH po mililitru kulture (nmol GSH/mL).

2.2.4 Priprema enzimskog ekstrakta i određivanje aktivnosti glutation S-transferaze

Kulture su 24, 48 i 72 h nakon tretmana centrifugirane 20 min na 6000 okr/min. Nakon uklanjanja supernatanta, stanice su od medija isprane u 100 mM kalij-fosfatnom puferu (pH=7.0) centrifugiranjem na 6500 okr/min. Sonicirane su (sonikator Vibra-Cell, Sonics and Materials Inc., SAD) u 1 mL kalij-fosfatnog pufera (100 mM, pH=7.0) te su ekstrakti centrifugirani 20 min na 21000*g*. Supernatanti su odvojeni i čuvani na -80˚C do spektrofotometrijskog određivanja aktivnosti enzima GST.

Aktivnost GST-a određena je spektrofotometrijski u enzimskim ekstraktima praćenjem nastajanja produkta reakcije konjugacije pri 340 nm (Simons i Van der Jagt, 1977; Habig i sur., 1974). Metoda se temelji na reakciji reduciranog GSH s 1-klor-2,4-dinitrobenzenom (CDNB) pri čemu nastaje konjugat glutation-2,4-dinitrobenzen (G – SDNB) uz izdvajanje klorovodične kiseline (HCl). Princip reakcije prikazan je jednadžbom (3):

$$\mathrm{G-SH + CDNB} \xrightarrow{glutation\ S-transferaza} \mathrm{G-SDNB\ konjugat + HCl} \qquad (3)$$

U UV-kivete pipetirana je reakcijska smjesa koja se sastojala od reakcijskog pufera (1350 µL 100 mM kalij-fosfatnog pufera + 1 mM EDTA, pH=6.5), u koji je dodano 50 µL otopine reduciranog glutationa (75 mM) i 50 µL 30 mM otopine CDNB. Smjesu je bilo potrebno ekvilibrirati na 25°C kako bi se valna duljina stabilizirala. Enzimska reakcija započela je dodavanjem 50 µL enzimskog ekstrakta te je spektrofotometrom praćen porast apsorbancije (svakih 30 s tijekom 5 min pri valnoj duljini od 340 nm), do kojeg dolazi uslijed stvaranja G–SDNB konjugata.

2.2.5 Određivanje sadržaja reaktivnih kisikovih spojeva

Uzorci za analizu ukupnog sadržaja ROS-a uzeti su 24, 48 i 72 h nakon tretmana selenitom. Produkcija ROS-a kvantificirana je pomoću nefluorescentne organske boje (probe) 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetata (DCFH-DA, Fluka), iz koje nizom reakcija nastaje fluorescentni spoj, čiji je intenzitet fluorescencije moguće detektirati spektrofotometrom. DCFH-DA difundira u stanice, gdje se aktivnošću esteraza deacetilira do 2',7'-diklorodihidrofluoresceina (DCFH). U stanicama se događa oksidacija nefluorescentnog DCFH djelovanjem ROS-a (najvećim dijelom H_2O_2), pri čemu nastaje fluorescentni 2',7'-diklorofluorescein (DCF), koji se nakuplja unutar stanica. Fluorescencija DCF-a se može izmjeriti spektrofotometrijski, što predstavlja način kvantifikacije ROS-a (Poljak-Blazi i sur, 2011).

Nakon tretmana (24, 48 i 72 h), iz svake je tikvice uzeto po 700 µL kulture, centrifugirano 2 min na 6000 okr/min te je talog ispran u 100 mM kalij-fosfatnom puferu (pH=7.0) ponovnim centrifugiranjem. Stanice su inkubirane 60 min sa 100 µM otopinom DCFH-DA u puferu na 25°C u mraku. Slijepe probe su napravljene paralelno za svaki uzorak na isti način, ali su inkubirane samo u puferu. Nakon inkubacije, stanice su centrifugirane, supernatant je uklonjen te je u svaku mikroepruvetu dodano po 700 µL pufera. Po 200 µL svakog uzorka je u triplikatu naneseno na bijelu mikrotitarsku pločicu s 96 bunarića (Nunc, Danska) te je intenzitet fluorescencije mjeren na čitaču mikrotitarskih pločica (Tecan Spark, Švicarska) s ekscitacijom na 500 nm i emisijom na 529 nm. Pozadinska fluorescencija algalnih stanica određena je iz suspenzije stanica u puferu bez dodatka DCFH-DA. Konačne vrijednosti fluorescencije DCF korigirane su prema vrijednostima pozadinske fluorescencije.

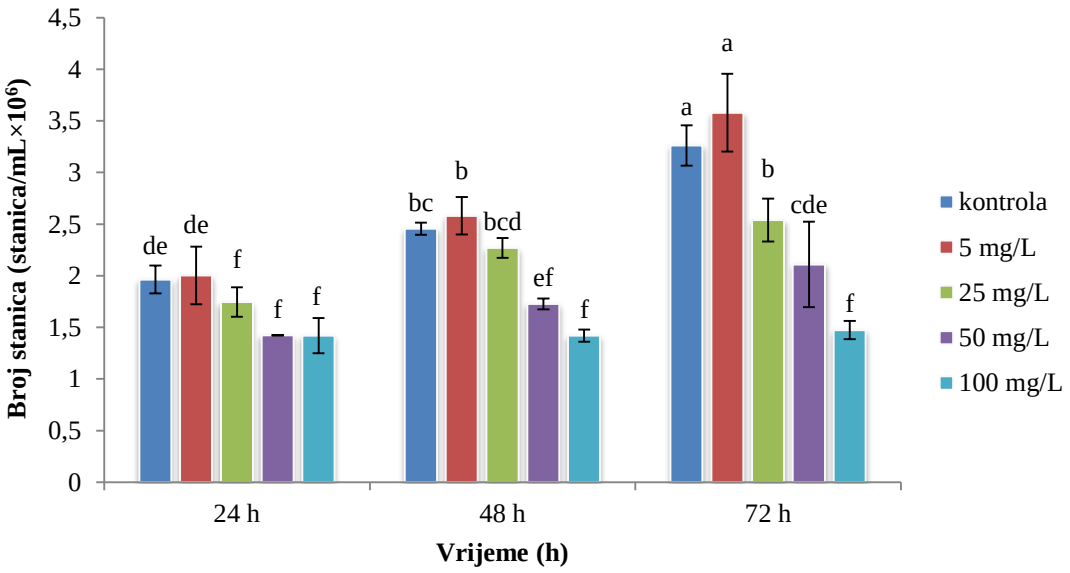
2.3 Statistička obrada rezultata

Istraživanje utjecaja različitih koncentracija selenita na *M.* cf. *contortum* provedeno je u tri ponavljanja. Dobiveni podaci obrađeni su u statističkom programu Statistica 13.3 (TIBCO Inc., SAD). Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (SD). Normalnost distribucije testirana je Shapiro-Wilksovim testom, a homogenost varijanci Levene testom. S obzirom na normalnu distribuciju i homogenost varijanci korištena je jednofaktorska analiza varijance (engl. *One-way ANOVA*), kako bi se utvrdilo postojanje razlika između tretmana različitim koncentracijama selenita. Nakon što je utvrđeno postojanje razlika, proveden je LSD post hoc test kako bi se odredilo između kojih skupina postoji razlika. Svi testovi provedeni su na razini značajnosti od 5% ($p < 0,05$).

3. REZULTATI

3.1 Utjecaj selenita na prirast kulture *Monoraphidium* cf. *contortum*

Tretman kultura *M.* cf. *contortum* različitim koncentracijama selenita u trajanju od 3 dana rezultirao je statistički značajnim promjenama u brojnosti stanica u ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji i vremenu izloženosti (Slika 6). Nakon tretmana selenitom u trajanju od 24 h došlo je do statistički značajnog smanjenja broja stanica u odnosu na kontrolne kulture (1,96 × 10^6 stanica/mL) primjenom selenita u koncentracijama 25 mg/L (1,74) te 50 i 100 mg/L s ujednačenim brojem stanica (1, 42 × 10^6 stanica/mL). Suprotno navedenom inhibicijskom učinku, najmanja primijenjena koncentracija (5 mg/L) pokazala je blagi stimulativni učinak na stopu rasta kulture u odnosu na kontrolne skupine, no nije bio statistički značajan (2 × 10^6 stanica/mL).



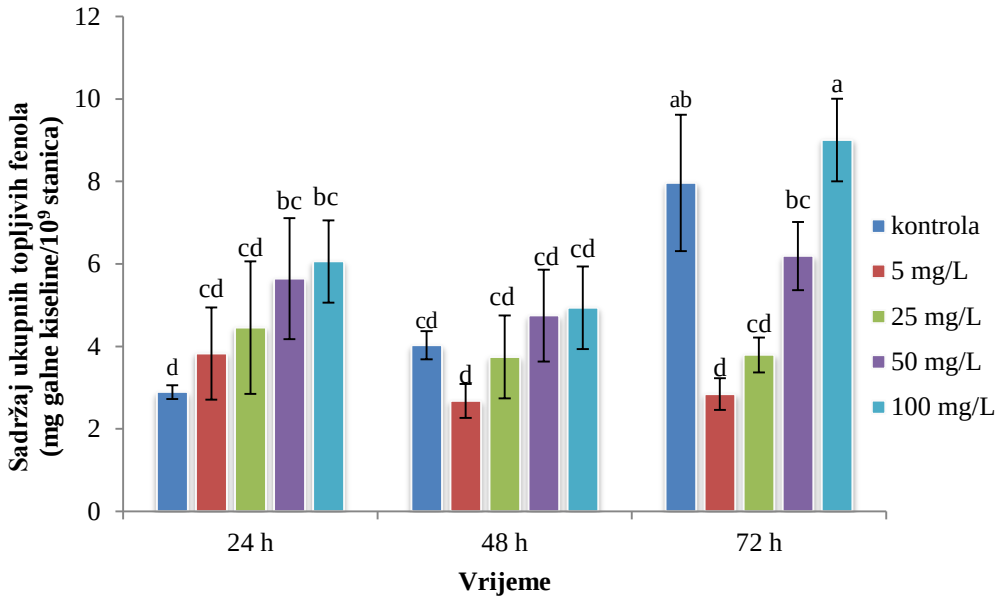
Slika 6. Prirast kultura *M.* cf. *contortum* 24, 48 i 72 h nakon tretmana različitim koncentracijama selenita (5, 25, 50 i 100 mg/L). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti triplikata ± SD. Statistički značajne razlike između prosječnih vrijednosti pojedinih skupina označene su različitim slovima ($p < 0.05$).

Sličan trend rasta nastavio se do kraja eksperimenta. Nakon 48 sati izloženosti selenitu ponovno je uočen blagi stimulativni učinak primjenom koncentracije 5 mg/L (2,58 × 10^6 stanica/mL) u odnosu na kontrolne kulture (2,45× 10^6/mL), dok su se stanice kultura tretiranih s 25 mg/L oporavile od početnog stresa uočenog nakon 24 h. Statistički

značajnom inhibicijom ($p<0,05$ u usporedbi s kontrolnim skupinama) rezultirale su primjene dviju viših koncentracija selenita (50 i 100 mg/L). Prirast kulture kao posljedica tretmana selenitom koncentracije 5 mg/L utvrđen je i nakon 72 h, a sve ostale primijenjene koncentracije (25, 50 i 100 mg/L) rezultirale su statistički značajnom inhibicijom rasta. Sveobuhvatno, najveći stimulativni učinak na rast uočen je primjenom 5 mg/L selenita nakon 48 h, dok su tretmani najvišom koncentracijom selenita (100 mg/L) tijekom 24, 48 i 72 h pokazali najjači inhibitorni učinak i ujednačene vrijednosti broja stanica ($1,42 \times 10^6$; $1,419 \times 10^6$; $1,47 \times 10^6$ stanica/mL).

3.2 Utjecaj selenita na koncentraciju ukupnih topljivih fenola u stanicama kulture *Monoraphidium* cf. *contortum*

Rezultati istraživanja ukazuju na promjenu sadržaja ukupnih topljivih fenola u ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji selenita i vremenu izloženosti. Na temelju smanjenja koncentracija ukupnih fenola u stanicama alga tijekom sva 3 dana uočava se rani odgovor fenolnih spojeva na oksidacijski stres uzrokovan povišenim koncentracijama selenita. Nakon 24 h sveukupno je uočen porast u sadržaju fenola kod svih tretmana u odnosu na kontrolne (2,89 mg GA/10^9 stanica), sa statistički značajnom razlikom pri koncentracijama 50 mg/L (5,64 mg GA/10^9 stanica) i 100 mg/L (6,05 mg GA/10^9 stanica), gdje se sadržaj fenola povećao za 1,95 odnosno 2 puta (Slika 7).

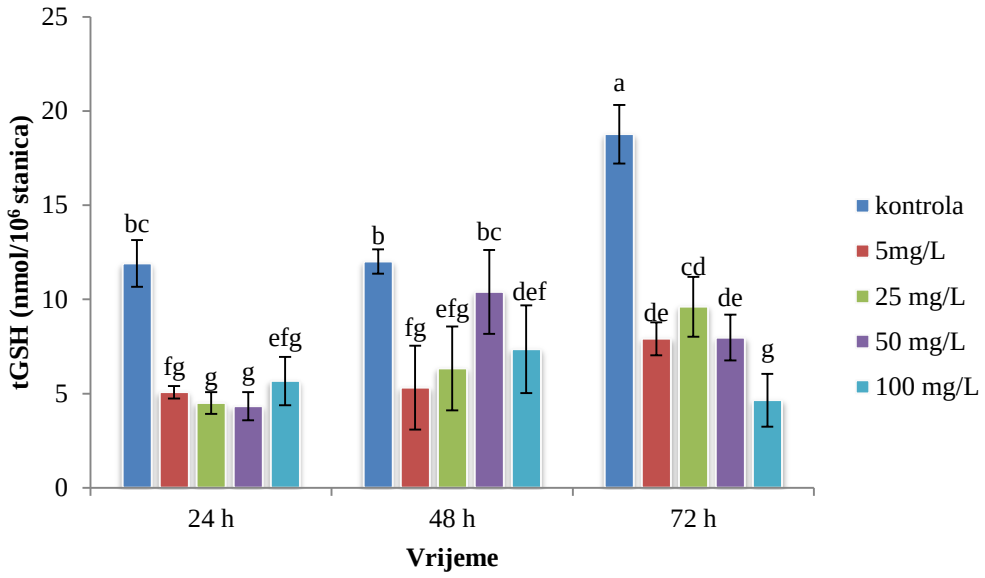


Slika 7. Sadržaj ukupnih topljivih fenola u kulturama *M.* cf. *contortum* 24, 48 i 72 h nakon tretmana različitim koncentracijama selenita (5, 25, 50 i 100 mg/L). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti triplikata ± SD. Statistički značajne razlike između prosječnih vrijednosti pojedinih skupina označene su različitim slovima ($p < 0.05$).

Nakon tretmana selenitom u trajanju od 48 sati nije uočena statistički značajna razlika u sadržaju fenola u odnosu na kontrolne kulture, a vrijednosti su bile manje u odnosu na prvih 24 h. Sadržaj fenola u kontrolnim kulturama blago se povećao nakon 48 h, a statistički značajan porast uočen je posljednjeg dana tretmana (72 h) i iznosio je 7,96 mg GA/10^9 stanica. Nakon 72 h, primjena koncentracija 5, 25 i 50 mg/L selenita uzrokovala je statistički značajno smanjenje sadržaja fenola u stanicama i vrijednosti su redom iznosile 2,84 mg GA/10^9 stanica, 3,79 mg GA/10^9 stanica i 6,19 mg GA/10^9 stanica. Najviša primijenjena koncentracija (100 mg/L) rezultirala je blagim porastom sadržaja fenola u odnosu na kontrolu, s izmjerenom koncentracijom 9 mg GA/10^9 stanica.

3.3 Utjecaj selenita na sadržaj ukupnog glutationa u stanicama kulture *Monoraphidium* cf. *contortum*

Rezultati istraživanja ukazuju na uključenost GSH u antioksidacijski odgovor alge *M.* cf. *contortum* nakon tretmana selenitom. Sadržaj tGSH u tretiranim stanicama značajno se razlikovao u odnosu na kontrole i rastao je tijekom sva 3 dana provođenja eksperimenta, sukladno primijenjenim koncentracijama (Slika 8). Nakon 24 h došlo je do statistički značajnog smanjenja koncentracije tGSH kod svih tretiranih kultura u odnosu na kontrolu (11,9 nmol/10^6 stanica) s najnižom izmjerenom vrijednosti 4,3 nmol/10^6 stanica pri tretmanu s 50 mg/L selenita.



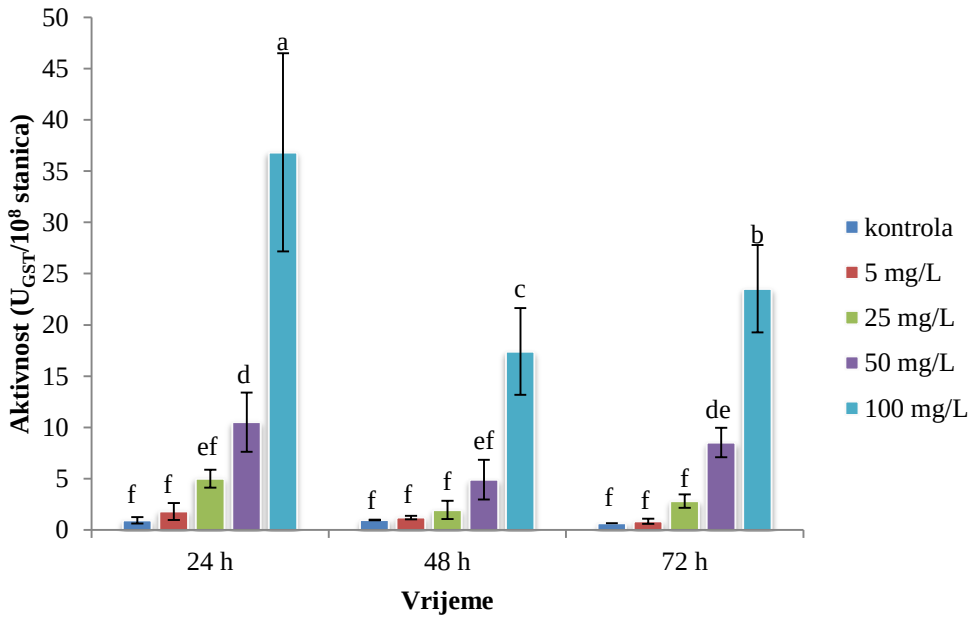
Slika 8. Koncentracija ukupnog glutationa (tGSH) u kulturama *M.* cf. *contortum* 24, 48 i 72 h nakon tretmana različitim koncentracijama selenita (5, 25, 50 i 100 mg/L). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti triplikata ± SD. Statistički značajne razlike između prosječnih vrijednosti pojedinih skupina označene su različitim slovima ($p < 0.05$).

Sadržaj tGSH u tretiranim kulturama nakon 48 h blago je porastao u odnosu na 24 h, a najviša izmjerena vrijednost tijekom cijelog eksperimenta određena je pri koncentraciji 50 mg/L selenita i iznosila je 10,39 nmol/10^6 stanica te se nije statistički razlikovala u odnosu na kontrolne kulture (12,0 nmol/10^6 stanica). Vrijednosti izmjerene u kulturama tretiranim ostalim koncentracijama (5, 25 i 100 mg/L) selenita statistički su se značajno smanjile u odnosu na kontrolu, a vrijednosti su iznosile redom 5,3 nmol/10^6 stanica, 6,3 nmol/10^6 stanica i 7,3 nmol/10^6 stanica. Nakon 72 h, u kontrolnim kulturama došlo je do

statistički značajnog porasta sadržaja tGSH u odnosu na prethodna 2 vremenska perioda. Do porasta u sadržaju tGSH u odnosu na prethodne vremenske periode došlo je i u tretiranim kulturama. Statistički značajan pad sadržaja tGSH u odnosu na kontrolu (18,7 nmol/10^6 stanica) dogodio se u svim tretiranim kulturama, s izraženom minimalnom vrijednošću u tretmanu s koncentracijom 100 mg/L selenita.

3.4 Utjecaj selenita na aktivnost glutation S-transferaze u stanicama kulture *Monoraphidium* cf. *contortum*

Rezultati istraživanja ukazuju na to da je aktivnost GST-a značajno uvjetovana primijenjenim koncentracijama selenita i periodom inkubacije, pri čemu su najviše vrijednosti izmjerene prilikom najkraćeg izlaganja najvišim koncentracijama selenita (Slika 9). Nakon 24 h tretmana selenitom, do statistički značajnog povećanja aktivnosti GST-a u odnosu na kontrolne skupine (0,946 $U_{GST}/10^8$ stanica) došlo je primjenom koncentracija 50 mg/L (10,52 $U_{GST}/10^8$ stanica) i 100 mg/L (36,8 $U_{GST}/10^8$ stanica).



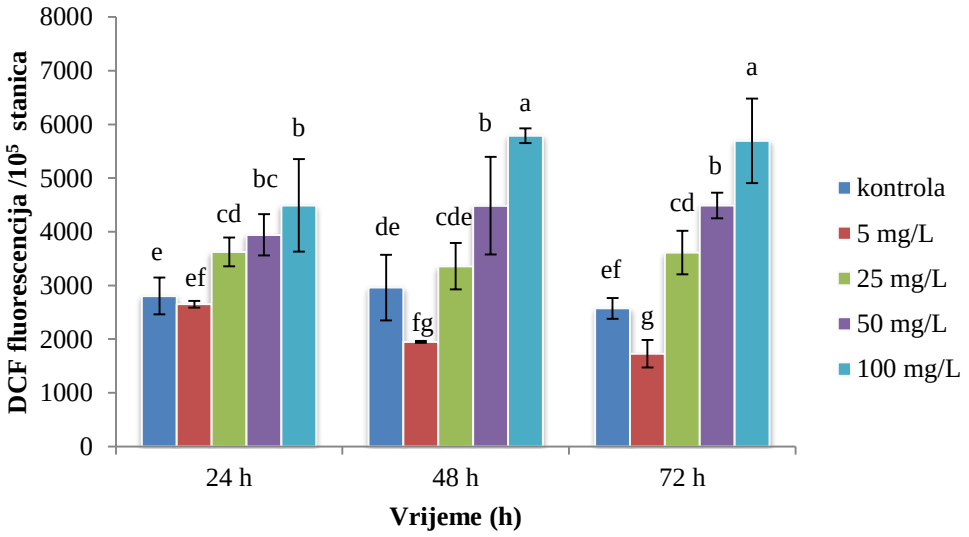
Slika 9. Aktivnost GST u kulturama *M.* cf. *contortum* 24, 48 i 72 h nakon tretmana različitim koncentracijama selenita (5, 25, 50 i 100 mg/L). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti triplikata ± SD. Statistički značajne razlike između prosječnih vrijednosti pojedinih skupina označene su različitim slovima ($p < 0.05$).

Nakon 48 h tretmana aktivnost GST-a statistički se značajno razlikovala u odnosu na kontrolu (0,97 $U_{GST}/10^8$ stanica) samo u slučaju primjene najviše koncentracije selenita (100 mg/L) s izmjerenom vrijednošću od 17,4 $U_{GST}/10^8$ stanica, što je ujedno i najniža

izmjerena vrijednost pri navedenoj koncentraciji tijekom sva 3 vremenska perioda. Statistički se značajno razlikovala i u odnosu na sve ostale tretirane skupine tog dana (redom: 1,2 $U_{GST}/10^8$ stanica,1, 95 $U_{GST}/10^8$ stanica i 4,9 $U_{GST}/10^8$ stanica). Nakon 72 h ponovno je došlo do značajnog porasta aktivnosti primjenom dviju viših koncentracija – 50 mg/L (8, 5 $U_{GST}/10^8$ stanica) i 100 mg/L (23,5 $U_{GST}/10^8$ stanica). Rezultati ukazuju na ranu aktivaciju ovog antioksidacijskog enzima, s obzirom na to da je najviša aktivnost zabilježena nakon 24 h primjenom najviše koncentracije selenita.

3.5 Utjecaj selenita na sadržaj reaktivnih kisikovih tvari u stanicama kulture *Monoraphidium* cf. *contortum*

Tretman selenitom značajno je utjecao na ukupan sadržaj ROS-a u stanicama alga. Rezultati mjerenja pokazuju da je selenit pri koncentraciji od 5 mg/L rezultirao postupnim smanjenjem sadržaja ROS-a tijekom eksperimenta u odnosu na kontrolne skupine, sa statistički značajnom razlikom nakon 48 h (1948,15/10^5 stanica) te 72 h (1728,9/10^5 stanica) (Slika 10). Sadržaj ROS-a u kontrolnim skupinama bile su ujednačene tijekom eksperimenta.



Slika 10. Ukupan sadržaj ROS-a u kulturama *M.* cf. *contortum* 24, 48 i 72 h nakon tretmana različitim koncentracijama selenita (5, 25, 50 i 100 mg/L). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti triplikata ± SD. Statistički značajne razlike između prosječnih vrijednosti pojedinih skupina označene su različitim slovima ($p < 0.05$).

Kulture u kojima je uočen statistički značajan porast sadržaja ROS-a su one tretirane s 25, 50 i 100 mg/L selenita već nakon 24 h. Primjena koncentracija 25 i 50 mg/L tijekom sva tri vremenska perioda dovela je do statistički značajne generacije ROS-a u stanicama alga ($p < 0.05$ u odnosu na kontrolne skupine), a izmjerene vrijednosti bile su bliske tijekom sva tri dana, s nešto slabije izraženim učinkom koncentracije 25 mg/L nakon 48 h te 50 mg/L nakon 24 h. Najviše sadržaja ROS-a pojavile su se kao posljedica tretmana koncentracijom 100 mg/L tijekom 24, 48 i 72 h, s najizraženijim učinkom nakon 48 h ($5788,18/10^5$ stanica).

4. RASPRAVA

Dosadašnja istraživanja pokazala su dvojak učinak Se na organizme: pri nižim koncentracijama ponaša se kao antioksidans, a pri povišenim kao prooksidans. Razlike u toleranciji na Se kod različitih biljnih vrsta očituju se promjenama u stopi rasta, gustoći populacije i aktivnosti antioksidacijskih enzima prilikom izloženosti različitim oblicima Se u različitim vremenskim periodima (Umysová i sur., 2009; Geoffroy i sur., 2007; Morlon i sur., 2005b). Selen je potreban algama kao mikronutrijent, za sintezu proteina i lipida kako bi se pospješila stanična dioba (Sun i sur., 2014). Iz tog razloga određene vrste alga kao odgovor na optimalni raspon koncentracija Se povećavaju stopu rasta, dok se toksični učinak Se očituje smanjenjem broja stanica i gustoće populacije koje je proporcionalno koncentraciji Se u mediju (Gojković i sur., 2015; Geoffroy i sur., 2007; Vitova i sur. 2011). Rezultati ovog istraživanja pokazali su dvojak učinak selenita na rast kultura *M.* cf. *contortum* (Slika 6). Povećanje broja stanica uočeno je nakon tretmana s 5 mg/L selenita nakon sva tri dana eksperimenta, iako nije bilo statistički značajno. Blagi stimulacijski učinak na rast može se interpretirati primjenom koncentracije koja je blizu optimalnoj vrijednosti za ovu vrstu. Više koncentracije Se (25, 50 i 100 mg/L), sukladno očekivanjima, dovele su do značajnog smanjenja biomase u odnosu na kontrolne kulture. Slično istraživanje proveli su Abdel-Hamida i Skulberga (1995) te su utvrdili da je do inhibicije rasta kultura *M.* cf. *contortum* došlo i pri najnižim i najvišim primijenjenim koncentracijama, uz nedosljedna odstupanja u biomasi. Rast je bio značajno inhibiran pri 0,01 mg/L selenita, ali je stimuliran primjenom koncentracije 0,1 mg/L, te ponovno inhibiran s 0,32 mg/L. Rezultati našeg istraživanja pokazali su veću toleranciju u rasponu navedenih koncentracija selenita. Navedeni autori istražili su i učinak selenita na prirast kultura *M. convolotum* i *M. griffithii*. Rast *M. convolotum* bio je blago stimuliran primjenom 0,032 mg/L selenita, dok su sve ostale primijenjene koncentracije (0,0032 – 320 mg/L) pokazale inhibitorni učinak Kulture *M. griffithii* odgovorile su stimulacijom rasta nakon tretmana u rasponu koncentracija od 0,0032 do 1 mg/L te inhibicijom kod svih ostalih koncentracija selenita (0,32 – 320 mg/L). Primjeri istraživanja na drugim vrstama su brojniji. U istraživanju Wheelera i sur. (1982) tretman selenitom sveukupno nije pokazao niti stimulativan niti inhibitorni učinak na rast šest vrsta jednostaničnih morskih alga, sve do predtretmana sulfatom, kada je opažena stimulacija rasta. Navedeno sugerira da je kod istraživanih vrsta djelovanje selenita uvjetovano prisutnošću sulfatnih aniona. Slične rezultate utvrđene u istraživanjima provedenim na *C. reinhardtii* predstavili su

Morlon i sur. (2005a, b) te Fournier i sur. (2010). Inhibicija rasta bila je u pozitivnoj korelaciji s količinom akumuliranog Se, a sulfati su interferirali s apsorpcijom selenita i selenata tako da je s povećanjem koncentracije sulfata u mediju došlo do jače inhibicije unosa oba oksianiona Se. Isto tako, kod vrste *Scenedesmus quadricauda* nedostatak S rezultirao je povećanom toksičnošću selenita i selenata (Umysová i sur., 2009). Ovisnost stope rasta o primijenjenoj koncentraciji selenita i apsorpcije selenita o sadržaju sulfita u mediju potvrdili su Li i sur. (2003) te zabilježili stimulativni učinak selenita (0,5–40 mg/L) na rast cijanobakterije *Spirulina platensis* i toksičnost pri koncentracijama višim od 500 mg/L. Zhong i sur. (2014) ustanovili su da koncentracije selenita niže od 750 mg/L potiču rast makroalge *U.* te također uzrokuju povećanje aktivnost antioksidacijskih enzima, dok koncentracije više od 750 mg/L pokazuju toksičan učinak. Isto tako, Sun i sur. (2014) su kod tretmana nižim koncentracijama selenita (25–75 mg/L) tijekom šest dana utvrdili statistički značajan prirast kulture *C. vulgaris*, dok su više koncentracije značajno smanjile prirast. Ujedno su ustanovili da je prirast kulture bio ovisan o koncentraciji ukupnog akumuliranog Se u biomasi. Zhong i sur. (2017) također su uočili pozitivan učinak nižih koncentracija selenita (≤40 mg/L) na rast kulture *C. pyrenoidosa.* Stimulativni učinak optimalnih koncentracija Se na stopu rasta kulture *M.* cf. *contortum* mogao bi imati potencijal u proizvodnji biogoriva, budući da raspon odgovarajućih koncentracija selenita vrlo brzo može rezultirati povećanjem gustoće populacije (Bogen i sur., 2013).

Ukupni sadržaj ROS-a u stanicama značajan je pokazatelj oksidacijskog stresa. U našem istraživanju fluorimetrijskom je analizom utvrđeno da je tretman kultura *M.* cf. *contortum* selenitom uzrokovao statistički značajno povećanje ukupnog sadržaja ROS-a u stanicama uslijed tretmana koncentracijama 25, 50 i 100 mg/L te da je povećanje oksidacijskog stresa uzrokovano nakupljanjem ROS-a u pozitivnoj korelaciji s povećanjem primijenjenih koncentracija i dužim vremenom izlaganja selenitu (Slika 10). Suprotno navedenom, tretman najnižom primijenjenom koncentracijom (5 mg/L) pokazao je antioksidacijski učinak u stanicama kulture smanjujući sadržaj ROS-a, s najizraženijim učinkom nakon 72 h. Dosadašnja istraživanja pokazala su da tretman Se može značajno utjecati na sadržaj ROS-a u stanicama pri čemu učinak ovisi o koncentraciji Se, vremenu izloženosti i samoj biljnoj vrsti. Visoke koncentracije Se iz okoliša uzrokovale su uslijed indukcije ROS-a pojavu oksidacijskog stresa u stanicama *S. quadricauda* (Vitova i sur. 2011), *U. fasciata* (Zhong i sur. 2014) i *C. vulgaris* (Sun i sur. 2014). Dodatak Se kulturama *C. vulgaris* u rasponu koncentracija 25–75 mg/L reducirao je akumulaciju ROS-

a nakon 4. dana tretmana selenitom sa statistički značajnom razlikom pri 75 mg/L, dok su koncentracije ≥100 mg/L dovele do značajne akumulacije ROS-a i inhibicije rasta (Sun i sur. 2014). S druge strane, Zhong i sur. (2014) ustanovili su da je u kulturama *C. vulgaris* tretiranim s 250, 500 i 750 mg/L selenita došlo do smanjenja sadržaja ROS-a u odnosu na kontrole dok je kod koncentracija viših od 750 mg/L došlo do povećanja sadržaja ROS-a. U sljedećem primjeru tretman kulture *C. pyrenoidosa* selenitom u koncentracijama ≤40 mg/L utjecao je na smanjenje sadržaja ROS-a, a izloženost višim koncentracijama (60 i 80 mg/L) dovela do suprotnog efekta (Zhong i Cheng, 2017).

Povećanje učinkovitosti antioksidacijskog sustava ukazuje na sposobnost prilagodbe organizama na stres, dok je smanjenje znak oštećenja stanica i pojave toksičnosti. Istraživanja pokazuju da tretman Se može povećati sadržaj neenzimskih antioksidansa kao što su fenolni spojevi i oksidirani glutation (GSSG) u stanicama alga (Schiavon i sur., 2016; Malagoli i sur., 2015, Schiavon i sur., 2012). Rezultati ovog istraživanja ukazuju na trend povećanja sadržaja fenola pri najvišim koncentracijama selenita (Slika 7) pri čemu je statistički značajno povećanje u sadržaju fenola uočeno samo nakon 24 h pri tretmanu koncentracijama 50 i 100 mg/L. Učinak selenita na sadržaj fenola u mikroalgama do sada nije istražen. Međutim, prema istraživanju Schiavon i sur. (2010) učinak selenata na makroalgu *Ulva* sp. očituje se povećanjem koncentracije fenola u stanicama, uz aktivaciju drugih antioksidansa. Ukupni sadržaj fenola povećao se za 3,5 puta čak i pri najnižoj primijenjenoj koncentraciji (2,5 μM). S obzirom na to da kod navedene vrste nije došlo do morfoloških ni ultrastrukturnih promjena uslijed tretmana selenatom, dobiveni rezultati ukazuju na važnu ulogu fenola u neutralizaciji mogućih posljedica oksidacijskog stresa. Inače, fenolni spojevi imaju nekoliko važnih zaštitnih uloga u biljnim stanicama, a jedna od njih je mogućnost direktnog keliranja metala, što u konačnici može dovesti do smanjenog stvaranja ROS-a (Schiavon i sur., 2012; Mazid i sur., 2011; Michalak, 2006). Također, značajno povećanje sadržaja fenola uslijed tretmana povećanim koncentracijama Se može biti rezultat utjecaja Se na metabolizam dušika, tj. na sintezu aminokiselina metionina, fenilalanina, tirozina i triptofana koje su prekursori za sintezu sekundarnih biljnih metabolita – glukozinolata i fenola (Malagoli i sur., 2015).

Analizom koncentracije tGSH u našem istraživanju ustanovljeno je da je pri svim primijenjenim koncentracijama tijekom svih vremenskih perioda došlo do statistički značajnog smanjenja koncentracije tGSH u odnosu na kontrolne kulture, s najnižim sadržajem izmjerenim nakon 72 h tretmana primjenom najviše koncentracije selenita (Slika

8). Schiavon i sur. (2016) u svom su istraživanju kod vrste *U. australis* uočili da selenit inducira povećanje koncentracije sadržaja GSSG i objasnili to njegovim direktnim vezanjem na tiolne (–SH) skupine GSH. Također, izloženost alga sve većim koncentracijama selenita rezultirala je izraženim povećanjem sadržaja tGSH. Takeda i sur. (1997, 1992) su kod vrste *C. reinhardtii* utvrdili značajan porast sadržaja tGSH u kulturama tretiranim selenitom. Koncentracija tGSH u stanicama nakon 5 dana tretmana iznosila je 1 mM, odnosno bila je 2,6 puta veća u odnosu na kontrolne kulture, a reducirani oblik činio je >90% tGSH. Veći broj istraživanja učinka Se na povećanje sadržaja tGSH proveden je na stanicama viših biljaka (Hasanuzzaman i sur., 2011; Mroczek-Zdyrska i Wójcik, 2011). Feng i sur. (2013) toksičnost Se u biljnim stanicama objašnjavaju neravnotežom u koncentracijama reduciranih spojeva nužnih za njegovu asimilaciju: GSH, tiola, feredoksina i NADPH. Selenit reagira s endogenim GSH u stanicama ili ekstracelularno uzrokuje toksičnost stvaranjem superoksida i Se^0 preko stvaranja selenopersulfida koji u reakciji s drugim tiolima stvaraju ROS (Janz i sur. 2010; Mézes i Balogh 2009). S druge strane, organski diselenidi prelaze u selenole u prisustvu tiola što također rezultira stvaranjem ROS-a. Također, može doći do stvaranja metil-selenida (Mézes i Balogh 2009) što za posljedicu ima oksidaciju GSH i inhibiciju antioksidacijskih tiolnih proteina (Beatty i Russo 2014; Mézes i Balogh 2009).

GST je enzim s ključnom ulogom u katalizi konjugacije okolišnih zagađivača s GSH (Kumar i Trivedi, 2018). Na taj način GST, uz ostale antioksidacijske enzime (primjerice SOD, GR i GPx), osigurava postojanost uspješnog sustava obrane od štetnog djelovanja ROS-a. Dixon i sur. (2010) u svojim su istraživanjima uočili da se aktivnost GST-a pojačava prilikom izloženosti biljnih stanica HM i herbicidima. Rezultati našeg istraživanja idu u prilog navedenom jer pokazuju snažno povećanje aktivnosti GST-a pod utjecajem selenita pri koncentraciji 100 mg/L (Slika 9). Statistički značajan, no višestruko manji, porast aktivnosti uočen je i u kulturama tretiranim selenitom koncentracije 50 mg/L. Promjena aktivnosti GST-a u algama pod utjecajem Se do sada nije istražena, stoga ovo istraživanje daje novi uvid u moguću uključenost GST-a u antioksidacijski odgovor.

U svrhu detaljnijeg utvrđivanja oksidacijskog statusa *M.* cf. *contortum* i uključenosti metabolizma GSH u odgovor na stres, trebalo bi ispitati promjene u omjeru GSH/GSSG te aktivnosti ostalih enzima koji su uključeni u njegov metabolizam.

5. ZAKLJUČCI

- Tretmani kultura povišenim koncentracijama selenita (25, 50 i 100 mg/L) rezultirali su smanjenjem prirasta kultura, dok je najmanja primijenjena koncentracija (5 mg/L) bila u rasponu optimalnih vrijednosti i pokazala blagi stimulacijski učinak na prirast kultura.

- Tretman višim koncentracijama selenita uzrokovao je značajan porast sadržaja ukupnog ROS-a u stanicama, dok je najniža primijenjena koncentracija (5 mg/L) pokazala blagi antioksidacijski učinak na kulture.

- Rani porast sadržaja ukupnih topljivih fenola u stanicama kulture kao odgovor na tretman prekomjernim koncentracijama ukazuje na sudjelovanje ovih sekundarnih metabolita u ublažavanju toksičnih učinaka selenita.

- Koncentracija tGSH značajno se smanjila pod utjecajem selenita pri svim primijenjenim koncentracijama, što je mogući pokazatelj uključenosti GSH u antioksidacijski odgovor. Ovakav rezultat može se objasniti pojačanom potrebom za GSH zbog moguće uključenosti u neenzimsku redukciju selenita i druge transformacije u metabolizmu Se te aktivnost antioksidacijskih enzima.

- Značajno povećanje aktivnosti GST-a nakon primjene najviših koncentracija selenita ukazuje na važnu ulogu ovog enzima u antioksidacijskom odgovoru alge *M.* cf. *contortum* na tretman toksičnim koncentracijama selenita.

- Ovim je istraživanjem dokazan dvojni učinak Se na oksidacijski status i antioksidacijski odgovor alge *Monoraphidium* cf. *contortum* koji ovisi o primijenjenoj koncentraciji i vremenu izlaganja selenitu. Tretman najnižom koncentracijom selenita imao je pozitivan učinak na rast alga i smanjenje sadržaja ukupnog ROS-a u stanicama, dok su više koncentracije selenita inducirale antioksidacijski odgovor u kojem važnu ulogu ima enzim GST.

6. LITERATURA

Abdel-Hamid, M. I., Skulberg, O. M. (1995) Effect of selenium on the growth of some selected green and blue-green algae. Lakes and Reservoirs: Research and Management 1(3): 205–211.

Adriano, D.C. 2001. Trace elements in the terrestrial environment: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. 2nd ed. New York, NY (US): Springer-Verlag Inc. str. 871.

Akerboom, T. P. M., Sies, H. (1981) Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. Detoxication and Drug Metabolism: Conjugation and Related Systems. Methods in Enzymology 77: 373–382.

Araie, H., Suzuki, I., Shiraiwa, Y. (2008) Identification and characterization of a selenoprotein, thioredoxin reductase, in a unicellular marine haptophyte alga, *Emiliania huxleyi*. Journal of Biological Chemistry 283:35329–35336.

Araie, H., Shiraiwa, Y. (2009) Selenium Utilization Strategy by Microalgae. Molecules 14: 4880-4891.

Araie, H., Shiraiwa, Y. (2016) Selenium in Algae. U: M. Borowitzka i sur. (ur.). The Physiology of Microalgae, Developments in Applied Phycology 6. Springer, Switzerland

Asada, K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplastsand their functions. Plant Physiology 141 (2): 391–396.

Beatty, J.M., Russo, G.A. (2014) Ambient water quality guidelines for Selenium Technical Report Update.

Bennett, W. N. (1988) Assessment of selenium toxicity in algae using turbidostat culture. Water Research 22(7): 939–942.

Bogen, C., Klassen, V., Wichmann, J., Russa, M. L., Doebbe, A., Grundmann, M., Mussgnug, J. H. (2013) Identification of *Monoraphidium contortum* as a promising species for liquid biofuel production. Bioresource Technology 133: 622–626.,

Brigelius-Flohé, R., Flohé, L. (2016) Selenium and Redox Signaling, Archives of Biochemistry and Biophysics, doi: 10.1016/j.abb.2016.08.003.

Cao, X.D., Ma, L.Q., Tu, C. (2004) Antioxidative responses to arsenic in the arsenic hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). Environmental Pollution 128 (3): 317–325.

Chapman, P. M., Adams, W. J., Brooks, M. L., Delos, C. G., Luoma, S. N., Maher, W. A., Ohlendorf, H. M., Presser, T. S., Shaw, D. P. (ur.) Ecological Assessment of Selenium in the Aquatic Environment. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola, Florida, str. 70.

Dixon, D.P., Skipsey, M., Edwards, R. (2010) Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. Phytochemistry 71: 338–350.

Fairweather-Tait, S.J., Collings, R., Hurst, R. (2010) Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. American Journal of Clinical Nutrition 91: 1484-1491.

Fang W., Nath, K. A., Mackey, M. F., Noelle, R. J., Mueller, D. L., Behrens, T. W. (1997) CD40 inhibits B cell apoptosis by upregulating bcl-xL expression and blocking oxidant accumulation. American Journal of Physiology 272: C950-C956.

Feng R., Wei C., Tu S. (2013) The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. Environmental and Experimental Botany 87: 58-68.

Cossu-Leguille, C., Vasseur, P. (2013) Aquatic biomarkers. U: Férard, J.-F., Blaise, C. (ur.) Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology. Springer, Dordrecht, str. 49-54.

Finley, J. W., Sigrid-Keck, A., Robbins, R. J., Hintze, K. J. (2005) Selenium Enrichment of Broccoli: Interactions between Selenium and Secondary Plant Compounds. The Journal of Nutrition 135(5): 1236–1238.

Fleming, G. A. (1980) Essential Micronutrients II: Iodine and Selenium. U: Davis, B.E. (ur.) Applied Soil Trace Elements. John Wiley and Sons, New York. str.199-234.

Flohé, L. (2009). The labour pains of biochemical selenology: The history of selenoprotein biosynthesis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1790(11): 1389–1403.

Folin, O., Ciocalteu, V. (1927) On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. Journal of Biological Chemistry 73: 627–650.

Fordyce, F.M. (2005) Selenium deficiency and toxicity in the environment. U: Selinus, O., Alloway, B. J. (ur.) Essentials of Medical Geology: impacts of the natural environment on public health. Elsevier Academic Press, Amsterdam, str. 373-416.

Fournier, E., Adam-Guillermin, C., Potin-Gautier, M., Pannier, F. (2010) Selenate bioaccumulation and toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*: Influence of ambient sulphate ion concentration. Aquatic Toxicology 97(1): 51–57.

Frova, C. (2006). Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. Biomolecular Engineering 23(4): 149–169.

Fu, L.H., Wang, X.F., Eyal Y., She, Y.M., Donald, L.J., Standing, K.G., Ben-Hayyim, G. (2002) A selenoprotein in the plant kingdom: Mass spectrometry confirms that an opal codon (UGA) encodes selenocysteine in *Chlamydomonas reinhardtii* glutathione peroxidase. Journal of Biolical Chemistry 277: 25983–25991.

Germ M., Stibilj V. (2007) Selenium and plants. Acta Agriculturae Slovenica 89: 65-71.

Geoffroy, L., Gilbin, R., Simon, O., Floriani, M., Adam, C., Pradines, C., Cournac, L., Garnier-Laplace, J. (2007) Effect of selenate on growth and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. Aquatic Toxicology 83:149–158.

Gojković, Ž., Garbayo, I., Gómez Ariza, J.L., Márová, I., Vílchez, C. (2015) Selenium bioaccumulation and toxicity in cultures of green microalgae. Algal Research 7: 106-116.

Grossman, A.R., Croft, M., Gladyshev, V.N., Merchant, S.S., Posewitz, M.C., Prochnik, S., Spalding, M.H. (2007) Novel metabolism in *Chlamydomonas* through the lens of genomics. Current Opinion in Plant Biology 10:190–198.

Habig W. H., Pabst M. J. and Jakoby W. B. (1974) Glutathione S-transferase: first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of Biological Chemistry 249: 7130-7139.

Hamilton, S. J. (2002). Rationale for a tissue-based selenium criterion for aquatic life. Aquatic Toxicology 57(1-2): 85–100.

Hamilton, S. J. (2004) Review of selenium toxicity in the aquatic food chain Science of the Total Environment 326: 1–31.

Hartikainen, H., Xue, T.L., Piironen, V. (2000) Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. Plant and Soil 225 (1-2): 193-200.

Hartikainen, H. (2005) Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 18(4): 309–318.

Hasanuzzaman, M,, Fujita, M. (2011) Selenium Pretreatment Upregulates the Antioxidant Defense and Methylglyoxal Detoxification System and Confers Enhanced Tolerance to Drought Stress in Rapeseed Seedlings. Biological Trace Element Research 143: 1758–1776.

Herve, C., De Franco, P.O., Groisillier, A., Tonon, T., Boyen, C. (2008) New members of the glutathione transferase family discovered in red and brown algae. Biochemical Journal, Portland Press 412 (3) str. 535-544.

Jacobs, L.W. (ur.) (1989) Selenium in Agriculture and the Environment. Soil Science Society of America Special Publication 23. SSSA, Madison, Wisconsin.

Jakubowski, W. (2000) 2,7-dichlorofluorescin oxidation and reactive oxygen species: What does it measure? Cell biology international 24(10): 757–760.

Janz, D.M., DeForest, D.K., Brooks, M.L., Chapman, P.M., Gilron, G., Hoff, D., Hopkins, W.A., McIntyre, D.O., Mebane, C.A., Palace, V.P., Skorupa, J.P., Wayland, M. (2010) Selenium toxicity to aquatic organisms. U: Chapman, P. M., Adams, W. J., Brooks, M. L., Delos, C. G., Luoma, S. N., Maher, W. A., Ohlendorf, H. M., Presser, T. S., Shaw, D. P. (ur.) Ecological Assessment of Selenium in the Aquatic Environment. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola, Florida, str. 139 – 230.

John, D., Brooks, A.J., Whitton, B. (2011) The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae.

Jozefczak, M., Remans, T., Vangronsveld, J., Cuypers, A. (2012) Glutathione Is a Key Player in Metal-Induced Oxidative Stress Defenses. International Journal of Molecular Sciences 13: 3145-3175.

Kumar, S., Trivedi, P. K. (2018) Glutathione S-Transferases: Role in Combating Abiotic Stresses Including Arsenic Detoxification in Plants. Frontiers in Plant Science, 9.

Lenz, M., Lens, P. N. L. (2009) The essential toxin: The changing perception of selenium in environmental sciences. Science of The Total Environment 407(12): 3620–3633.

Li, Z.Y., Guo, S.Y., Li, L. (2003). Bioeffects of selenite on the growth of *Spirulina platensis* and its biotransformation. Bioresource Technology 89(2): 171–176.

Li, H., Cheng, K., Wong, C., Fan, K., Chen, F., Jiang, Y. (2007) Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. Food Chemistry 102(3): 771–776.

Lobanov, A.V., Fomenko, D.E., Zhang, Y., Sengupta, A., Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N. (2007) Evolutionary dynamics of eukaryotic selenoproteomes: large selenoproteomes may associate with aquatic life and small with terrestrial life. Genome Biol 8:198.

Lobanov, A.V., Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N. (2009) Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes. Biochimica et Biophysica Acta 1790:1424–1428.

Lu, S.C. (1999) Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. The FASEB Journal 13 (10): 1169–1183.

Machu, L., Misurcova, L., Vavra Ambrozova, J., Orsavova, J., Mlcek, J., Sochor, J., Jurikova, T. (2015) Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Algal Food Products. Molecules, 20(1): 1118–1133.

Maher, W., Roach, A., Doblin, M., Fan, T., Foster, S., Garrett, R., Möller, G., Oram, L., Wallschläger, D. (2010) Environmental sources, speciation, and partitioning of selenium. U: Adams, W.J., M.L. Brooks, C.G. Delos, S.N. Luoma, W.A. Maher, H.M. Ohlendorf, T.S. Presser and D.P. Shaw (ur.). Proceedings from the SETAC workshop on ecological assessment of selenium in the aquatic environment.

February 2009, Pensacola. Boca Raton FL (US): SETAC in collaboration with CRC Press. str. 47-91.

Malagoli, M., Schiavon, M., dall' Acqua, S., Pilon-Smits, E. A. H. (2015). Effects of selenium biofortification on crop nutritional quality. Frontiers in Plant Science, 6.

Mane, P.C., Kadam, D.D., Chaudhari, R.D. (2013) Biochemical responses of some freshwater algal species to selenium: a laboratory study. Central European Journal of Experimental Biology 2:27–33.

Martens, D.A. (2003) Selenium. U: B.A. Stewart, T.A. Howel (Eds.), Encyclopedia of Water Sciences, Marcel Dekker, New York, str. 840–842.

Mayland, H. F. (1994) Selenium in plant and animal nutrition. U: Frankenberger, W.T., Benson, S. (ur.) Selenium in the Environment. Marcel-Dekker, New York. str. 29-47.

Mazid, M., Khan, T., A., Mohammad, F. (2011) Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. Biology and Medicine, 3: 232-249.

McNeal, J.M., Balistrieri, L.S. (1989) Goechemistry and occurrenece of selenium: An overview. U: Jacobs, L.W. (ur.). Selenium in agriculture and the environment. Madison, WI (US): Soil Science Society of America (SSSA) Special Publication No 23. str. 1-13.

Meharg, A.A., Hartley-Whitaker, J. (2002) Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. New Phytologist 154 (1): 29–43.

Mézes, M., Balogh, K. (2009) Prooxidant mechanisms of selenium toxicity - A review. Acta Biologica Szegediensis 53.

Michalak, A. (2006) Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. Polish Journal of Environmental Studies 15: 523-530.

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

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

Morlon, H., Fortin, C., Adam, C., Garnier-Laplace, J. (2005b) Cellular quotas and induced toxicity of selenite in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Radioprotection 40: 101–106.

Morlon, H., Fortin, C., Adam, C., Garnier-Laplace, J. (2006) Selenite transport and its inhibition in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Environmental Toxicology and Chemistry. 25(5): 1408–1417.

Mroczek-Zdyrska, M., Wójcik, M. (2011) The influence of selenium on root growth and oxidative stress induced by lead in *Vicia faba* L. minor plants. Biological Trace Element Research 147: 320-328.

Nagpal, N. K. (2000) Proposed water quality guidelines for selenium to protect aquatic life. Proceedings of the 24th Annual British Columbia Mine Reclamation Symposium in Williams Lake, BC. The Technical and Research Committee on Reclamation.

Neal, R.H. (1995) Selenium. U: Alloway, B. J. (ur.) Heavy Metals in Soils. Blackie Academic and Professional, London. str. 260-283.

Novoselov, S.V., Rao, M., Onoshko, N.V., Zhi, H., Kryukov, G.V., Xiang, Y., Weeks, D.P., Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N. (2002) Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system Chlamydomonas reinhardtii. The EMBO Journal 21: 3681–3693.

Obata, T., Shiraiwa, Y. (2005) A novel eukaryotic selenoprotein in the haptophyte alga *Emilliana huxleyi* . Journal of Biological Chemistry 280:18462–18468.

Onofrejová, L., Vašíčková, J., Klejdus, B., Stratil, P., Mišurcová, L., Kráčmar, S., Vacek, J. (2010) Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 51(2): 464–470.

Parkman, H., Hultberg, H. (2002) Occurrence and effects of selenium in the environment - a literature review.

Pelah, D., Cohen, E. (2005) Cellular response of *Chlorella zofingiensis* to exogenous selenium. Plant Growth Regulation 45:225–232.

Pilon-Smits EAH, Quinn CF. (2010) Selenium metabolism in plants. Cell Biology of Metals and Nutrients 17: 225-241.

Poljak-Blazi, M., Jaganjac, M., Sabol, I., Mihaljevic, B., Matovina, M., Grce, M. (2011) Effect of ferric ions on reactive oxygen species formation, cervical cancer cell lines growth and E6/E7 oncogene expression. Toxicology in Vitro 25(1): 160–166.

Presser, T.S., Luoma, S.N. (2010) A methodology for ecosystem-scale modeling of selenium. Integrated Environmental Assessment and Management 6(4):685-710.

Presser, T. S. (1994) Geologic origin and pathways of selenium from the California Coast Ranges to the west-central San Joaquin Valley. U: Frankenberger, W.T., Benson, S. (ur.) Selenium in the environment. New York, NY (US): Marcel Dekker Inc. str. 139-156.

Reunova, Y.A., Aizdaicher, N.A., Khristoforova, N.K., Reunov, A.A. (2007) Effects of selenium on growth and ultrastructure of the marine unicellular alga *Dunaliella salina* (Chlorophyta). Russian Journal of Marine Biology 33: 125–132.

Riedel, G.F., Sanders, J.G. (1996) The influence of pH and media compositions on the uptake of inorganic selenium by *Chlamydomonas reinhardtii*. Environmental Toxicology and Chemistry 15(9):1577-1583.

Ríos, J. J., Blasco, B., Cervilla, L. M., Rosales, M. A., Sanchez-Rodriguez, E., Romero, L., Ruiz, J. M. (2008a) Production and detoxification of H_2O_2 in lettuce plants exposed to selenium. Annals of Applied Biology, 154(1): 107–116.

Ríos J. J., Rosales M. A., Blasco B., Cervilla L. M., Romero L., Ruiz J. M. (2008b) Biofortification of Se and induction of the antioxidant capacity in lettuce plants. Scientia Horticulturae, 116: 248–255.

Roat-Malone, R. M. (2002) Bioinorganic chemistry: a short course. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Robbins, R. J., Keck, A.-S., Banuelos, G., Finley, J. W. (2005) Cultivation conditions and selenium fertilization alter the phenolic profile, glucosinolate, and sulforaphane content of broccoli. Journal of Medical Food 8: 204–214.

Schiavon, M., Moro, I., Pilon-Smits, E. A. H., Matozzo, V., Malagoli, M., Dalla Vecchia, F. (2012). Accumulation of selenium in *Ulva* sp. and effects on morphology, ultrastructure and antioxidant enzymes and metabolites. Aquatic Toxicology, 122-123, 222–231.

Schiavon, M., Dall'acqua, S., Mietto, A., Pilon-Smits, E. A., Sambo, P., Masi, A. (2013) Selenium fertilization alters the chemical composition and antioxidant constituents of tomato (*Solanum lycopersicon* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 61: 10542–10554.

Schiavon, M., Pilon-Smits, E. A. H., Citta, A., Folda, A., Rigobello, M. P., Dalla Vecchia, F. (2016) Comparative effects of selenate and selenite on selenium accumulation, morphophysiology, and glutathione synthesis in *Ulva australis*. Environmental Science and Pollution Research 23(15): 15023–15032.

Schiavon, M., Pilon-Smits, E. A. H. (2016) The fascinating facets of plant selenium accumulation - biochemistry, physiology, evolution and ecology. New Phytologist, 213(4): 1582–1596.

Simmons, D. B. D., Emery, R. J. N. (2010) Phytochelatin induction by selenate in *Chlorella vulgaris*, and regulation of effect by sulfate levels. Environmental Toxicology and Chemistry 30(2): 469–476.

Stadtman, T. C. (1990) Selenium Biochemistry. Annual Review of Biochemistry 59(1): 111–127.

Stadtman, T. C. (1996). Selenocysteine. Annual Review of Biochemistry 65(1): 83–100.

Staicu, L. C., van Hullebusch, E. D., Oturan, M. A., Ackerson, C. J., Lens, P. N. L. (2015) Removal of colloidal biogenic selenium from wastewater. Chemosphere 125: 130–138.

Stewart, A.R., Luoma, S.N., Schletkat, C.E., Doblin, M.A., Hieb, K.A. (2004) Food web pathway determines how selenium affects aquatic ecosystems: a San Francisco Bay case study. Environmental Science and Technology 38:4519-4526.

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

Takeda, T., Shigeoka, S., Hirayama, O., Mitsunaga, T. (1992) The Presence of Enzymes Related to Glutathione Metabolism and Oxygen Metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 56(10): 1662–1663.

Takeda, T., Ishikawa, T. and Shigeoka, S. (1997) Metabolism of hydrogen peroxide by the scavenging system in Chlamydomonas reinhardtii. Physiologia Plantarum 99: 49-55.

Tan, L. C., Nancharaiah, Y. V., van Hullebusch, E. D., Lens, P. N. L. (2016) Selenium: environmental significance, pollution, and biological treatment technologies. Biotechnology Advances 34(5): 886–907.

Thompson, J.E., Legge, R.L., Barber, R.F. (1987) The role of free radicals in senescence and wounding. New Phytologist 105 (3): 317–344.

Terry, N., Zayed, A.M., de Souza, M.P., Tarun, A.S. (2000) Selenium in higher plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 51:401–32.

Tokunaga, T., Pickering, I., Brown, G. (1996) Selenium transformations in ponded sediments. Soil Science Society of America Journal 60: 781-790.

Umysová, D., Vítová, M., Doušková, I., Bišová, K., Hlavová, M., Žížková, M., Machát, J., Doucha, J., Zachleder, V. (2009) Bioaccumulation and toxicity of selenium compounds in the green alga *Scenedesmus quadriacauda*. BMC Plant Biology 9: 58-74.

[USEPA] United States Environmental Protection Agency. (2004) Draft aquatic life water quality criteria for selenium - 2004. EPA-822-D-04-001, November 2004. Washington DC (US): U.S. Environmental Protection Agency, Office of Science and Technology. str. 90. Online pristup:

http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/upload/2008_10_27_criteria_seleniums _maintext.pdf

Vítová, M., Bišová, K., Hlavová, M., Zachleder, V., Rucki, M., Čížková, M. (2011) Glutathione peroxidase activity in the selenium-treated alga Scenedesmus quadricauda. Aquatic Toxicology 102(1-2): 87–94.

Vítová, M., Bišová, K., Doucha, J., Zachleder, V. (2015) Beneficial or Toxic Effects of Selenium on Green Algae and Their Application as Nutrient Supplements or Bio-remediators, U: Prokop, A. Bajpai, R. K., Zappi, M. E. (ur.) Algal Biorefineries, Springer, Switzerland, 315 – 335.

Vriens, B., Behra, R., Voegelin, A., Zupanic, A., Winkel, L. H. E. (2016) Selenium Uptake and Methylation by the Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Environmental Science & Technology 50(2): 711–720.

Wheeler, A. E., Zingaro, R. A., Irgolic, K., Bottino, N. R. (1982) The effect of selenate, selenite, and sulfate on the growth of six unicellular marine algae. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 57(2-3): 181–194.

Xu, J., Yang, F., Chen, L., Hu, Y., Hu, Q. (2003) Effect of Selenium on Increasing the Antioxidant Activity of Tea Leaves Harvested during the Early Spring Tea Producing Season. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51(4): 1081–1084.

Zhang, L. (1993) Synthesis of Dimethyl Selenone and Studies on the Biomethylation Intermediates of Selenium Reduction and Methylation. Diplomski rad. The Faculty of the Department of Chemistry, Sam Houston State University.

Zhang, X. (2013) Aqueous speciation of selenium during its uptake by green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. Doktorski rad. Waterloo, Ontario, Canada.

Zheng Y., Li, Z., Tao, M., Li, J., Hu, Z. (2017) Effects of selenite on green microalga *Haematococcus pluvialis*: Bioaccumulation of selenium and enhancement of astaxanthin production. Aquatic Toxicology 183:21–27.

Zhong, Y., Chen, T., Zheng, W., Yang, Y. (2014) Selenium enhances antioxidant activity and photosynthesis in *Ulva fasciata*. Journal of Applied Phycology 27(1): 555–562.

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

Zhou, C., Huang, J.-C., Liu, F., He, S., Zhou, W. (2018) Removal of selenium containing algae by the bivalve *Sinanodonta woodiana* and the potential risk to human health. Environmental Pollution 242: 73–81.

WEB IZVORI

Web 1. https://www.lenntech.com/periodic/elements/se.htm (12.12.2018)

Web 2. http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Chlorophyta/Monoraphidium/contortum/contortum_6.jpg (6.12.2018)

Web 3. http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=27719 (5.12.2018)

Web 4. http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=43438 (5.12.2018)

Web 5. http://www.algaebase.org/browse/taxonomy/?id=6953 (5.12.2018)

7. PRILOZI

7.1 Prilog 1. Priprema BBM medija

	Stock-otopina (g/100 mL dH_2O)	Količina potrebna za 1 L BBM-a
1. $NaNO_3$	2,5 g	10 mL
2. $CaCl_2$	0,33 g	10 mL
3. $MgSO_4$ x 7 H_2O	0,75 g	10 mL
4. K_2HPO_4	0,75 g	10 mL
5. KH_2PO_4	1,75 g	10 mL
6. NaCl	0,25g	10 mL
7. Na_2EDTA **KOH**	5 g 3,1 g	1 mL
8. $FeSO_4$ x 7 H_2O **H_2SO_4 (96%)**	0,498 g 0,1 mL	1 mL
9. H_3BO_3	1,142 g	1 mL
10. $ZnSO_4$ x 7 H_2O	0,882 g	1 mL
11. $MnCl_2$ x 4 H_2O	0,144 g	1 mL
12. Na_2MoO_4 x 2 H_2O	0,278 g	1 mL
13. $CuSO_4$ x 5 H_2O	0,157 g	1 mL
14. $CoCl_2$ x 6 H_2O	0,0404 g	1 mL

7.2 Prilog 2. Metodički dio

PLAN NASTAVNOG SATA

Škola	**Razred**
	2. razred gimnazije
Nastavna tema	**Nastavna jedinica**
AUTOTROFNI PROTOKTISTI – ALGE	Odjeljak: Zelene alge (Chlorophyta)
Temeljni koncepti	**Ključni pojmovi**
1. Makrokoncept: Organiziranost živog svijeta Koncept 1: Srodnosti i raznolikosti Koncept 2: Raznolikost protista/protoktista **2. Makrokoncept:Razmnožavanje i razvoj organizama** Koncept 1: Životni ciklusi Koncept 2: Životni ciklusi organizama	klorofil a i b, ksantofil, mikroalge, makroalge, jednostaničnost, višestaničnost, kolonijalni oblici, korjenčić, stabalce, listić, stigma, konjugacija, sporofit, gametofit, izmjena generacije

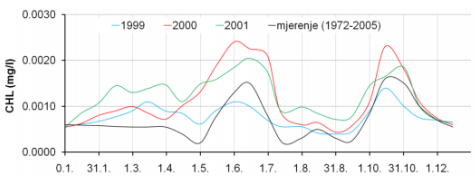
Cilj nastavnog sata

Upoznati se s osnovnim obilježjima građe i razmnožavanja jednostaničnih i višestaničnih zelenih alga te razumjeti njihov značaj kao dodatka prehrani i izvora u proizvodnji biogoriva.

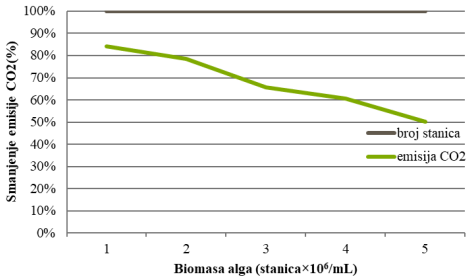
Ishodi učenja

1. Analizirati osnovne značajke građe jednostaničnih, kolonijalnih i višestaničnih oblika zelenih alga na tipičnim predstavnicima
2. Procijeniti značenje zelenih alga za čovjeka i biosferu
3. Povezati načine razmnožavanja s biološkom raznolikošću zelenih alga

Br.	**Razrada ishoda nastavne jedinice**	**Zadatak/ primjer ključnih pitanja za provjeru ostvarenosti ishoda**	**KR**	**PU**
1.	1.1. Opisati osnovna obilježja i sistematiku odjeljka Chlorophyta uz navođenje poznatih predstavnika	• Navedi osnovna obilježnja odjeljka zelenih alga (Chlorophyta). (R1) • Kako se prema građi dijele zelene alge? (R1) • Navedi po jednu vrstu koja je predstavnik jednostaničnih, kolonijalnih i višestaničnih oblika zelenih alga. (R1) • Na što se odnose pojmovi mikro- i makroalge? (R1) • Opiši moguća staništa zelenih alga (R1) • Navedi jednu vrstu karakterističnu za Jadran. (R1) • Koja je karakteristika građe jadranskog klobučića? (R1) • Opiši građu spirogire. (R1) • Navedi dijelove tijela (talusa) mnogostaničnih alga. (R1) • Koje pigmente sadrže zelene alge i koja je njihova uloga? (R1) • Koja je uloga celuloze u stanicama alga? (R1) • Navedi rezervnu tvar u stanicama zelenih alga. (R1)	R1 R2	

<table>
<tr><td></td><td>1.2. Na temelju analize građe tipičnih predstavnika zelenih alga uvidjeti raznolikost u morfologiji</td><td>• Ukaži na razliku u građi kolonijalnih i višestaničnih zelenih alga. (R2)
• Opiši građu kolonijalnih oblika zelenih alga na najrazvijenijem primjeru. (R2)
• Što je cenobij? (R1)
• Objasni značaj kolonijalnih oblika alga u evolucijskom smislu. (R2)
• Pokušaj objasniti raznolikost građe zelenih alga s evolucijskog aspekta. (R2)
• Navedi mnogostanične oblike zelenih alga koje poznaješ i opiši njihov izgled. (R1)
• Koja obilježja povezuju alge s kopnenim biljkama? (R2)
• Što je očna pjega i čemu služi? Navedi vrstu zelene alge u kojoj se može identificirati. (R1)
• Kojeg protoktista već poznaješ, koji ima očnu pjegu i stezljivi mjehurić kao klamidomonas? (R1)
• Što je karakteristično za vrstu Haematococcus pluvialis? Kako ju najlakše možeš prepoznati? (R1)</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td rowspan="3">2.</td><td>2.1. Prepoznati alge kao najvažnije primarne producente i osnovne karike hranidbenih lanaca</td><td rowspan="3">• Što alge proizvode u procesu fotosinteze? (R1)
• Objasni važnost zelenih alga u vodenim ekološkim sustavima. (R2)
• Utječe li primarna produkcija alga izravno na čovjeka? Objasni. (R2)
• Objasni izravnu i posrednu korist zelenih alga za čovjeka. (R2)
• Na što se odnosi pojam cvjetanje voda? (R1)
• Objasni posljedice cvjetanja voda za ekološke sustave. (R2)
• Istraži više o algi kaulerpa i objasni zašto je nazivaju „algom ubojicom“. (R2)
• Razmisli i odgovori koji je razlog cvjetanja mora u priobalnom području. (R2)
• Gospodarski i poljoprivredno najrazvijeniji dio Italije je njen sjever, kroz koji protječe najveća talijanska rijeka, rijeka Po.
a. Pomoću zemljopisne karte objasni moguću povezanost talijanske poljoprivrede i rijeke Po s cvjetanjem mora u hrvatskom dijelu sjevernog Jadrana.
b. Na temelju grafičkog prikaza ovisnosti koncentracije klorofila o mjesecima u periodu od 1999. do 2001. godine izdvoji mjesece s najvećom i najmanjom zastupljenošću fitoplanktonskih vrsta i usporedi naveden. Na osnovu čega to zaključuješ?
c. U kojem mjesecu svake godine se bilježi najveća biomasa fitoplanktona? Objasni. (R3)


Vremenske serije modelskih koncentracija klorofila-a u površinskom sloju mora sa mjesečno osrednjenim vrijednostima za 1999., 2000. i 2001. godinu na poziciji mjerne postaje S2.</td><td rowspan="3">R1
R2
R3</td><td rowspan="3"></td></tr>
<tr><td>2.2.Ukazati na uzrok i posljedice masovnog razmnožavanja alga u ekološkim sustavima (cvjetanje voda)</td></tr>
<tr><td>2.3. Definirati zelene alge kao bioindikatore, izvore u dobivanju energije i biogoriva te dodatak prehrani</td></tr>
</table>

		• Na temelju predstavljenog grafa argumentiraj ulogu bioreaktora sa zelenim algama u reguliranju koncentracije stakleničkih plinova. (R3)  • Procijeni kako bi zagađenje selenom (kemijskim elementom koji pri povišenim koncentracijama djeluje kao toksin) utjecalo na populaciju alga i održivost nekog vodenog ekološkog sustava (primjerice, jezera). (R3) • Objasni na koji se način uspostavljaju i održavaju bioreaktori sa zelenim algama te koja je njihova uloga. (R2) • Zašto se za morsku salatu govori da je bioindikator organskog onečišćenja? Istraži koje su još vrste takvi bioindikatori. (R2) • Izradi plakat na temu „*Alge u tanjuru*“ u web alatu Piktochart i prezentiraj ga ostatku razreda. (R2) • Što misliš, zašto se za alge govori da su hrana budućnosti i vrijedi li to generalno za ovu skupinu organizama? (R2)		
3.	3.1. Interpretirati značaj razmnožavanja zelenih alga na više načina uz navođenje konkretnih primjena 3.2. Objasniti osnovno načelo izomorfne izmjene generacija	• Navedi moguće načine razmnožavanja zelenih alga uz navođenje konkretnog predstavnika. (R1) • Neke vrste alga mogu se razmnožavati na više od jednog načina. Procijeni značaj ove osobine. (R2) • Objasni što se u životnom ciklusu prilikom izmjene generacija razvija iz gamete, a što iz zoospore. (R1) • Analiziraj razmnožavanje zelenih alga kod najjednostavnijih i najsloženijih oblika. (R2) • Objasni značenje pojmova sporofit i gametofit. (R2) • Napiši kratki esej pomoću pojmova: haploidna faza, diploidna faza, sporofit, gametofit, izmjena generacija. (R2) • Opiši izomorfnu izmjenu generacije vrste *Ulva rigida*. (R2) • Koji je najprimitivniji način razmnožavanja zelenih alga i za koju je vrstu karakterističan? (R1) • Kako se mijenja dominacija sporofita i gametofita od alga prema kopnenim biljkama? (R2)	R1 R2	
Kognitivna razina (KR): **I. reprodukcija, II. konceptualno razumijevanje i primjena znanja, III. rješavanje problema** Procjena uspješnosti učenja (PU): **– odgovara manje od 5 učenika, +/- odgovara otprilike polovina učenika, + odgovara većina učenika**				

Tijek nastavnog sata							
Tip sata	sat obrade	**Trajanje**	90 min (blok sat)				
STRUKTURNI ELEMENT NASTAVNOG SATA	**DOMINANTNA AKTIVNOST**	**BR. ISHODA**	**KORISTITI U IZVEDBI**	**METODA**	**SOCIOLOŠKI OBLIK RADA**	**TRAJANJE (min)**	
Uvodni dio	N → animirati učenike za aktivno sudjelovanje na satu i pridobiti njihovu pažnju postavljanjem motivacijskih pitanja praćenih ilustracijama i fotografijama iz pripremljene PowerPoint prezentacije; primjerice: - pitati učenike jesu li nekada na vlažnoj kori drveća, vlažnim zidovima ili krovovima vidjeli zelene prevlake (prikazati fotografije na ppt – otkriti da je riječ o kišnoj algi koja pripada skupini zelenih alga), upitati poznaju li još neke vrste zelenih alga te znaju li po čemu su dobile naziv; - prikazati ilustraciju lanca ishrane vodenog ekološkog sustava i potaknuti na razmišljanje o važnosti alga u ekološkim sustavima (osnovna karika hranidbenih lanaca, glavni primarni producenti, proizvode kisik i hranu) - prikazati fotografiju bioreaktora sa zelenim algama i upitati ih znaju li o čemu je riječ te koji bi bio razlog uspostave takvih sustava; ako im odgovor nije poznat, dati im priliku da odgovore tijekom sata; Usmjeriti učenike na praćenje i izradu plana učeničkog zapisa tijekom sata. U → aktivno se uključuju u uvodni razgovor, odgovaraju na pitanja, iznose svoja predznanja i prijašnja iskustva vezana uz temu	1. 2.1 2.3	PP P	R I	F, I	10	
	N → najava obrade alga odjeljka Chlorophyta (zelene alge) – napisati naslov na ploču U → učenici zapisuju naslov u svoje bilježnice						
Središnji dio	N → zadati učenicima da opišu izgled alga koje su naveli na početku sata, navesti ih da razmisle o njihovim dimenzijama te zaključe o velikoj morfološkoj raznolikosti; projicirati pripremljen ppt – prikazati fotografije različitih vrsta te pokazati herbarij morskih alga kao dokaz biološke raznolikosti – identificirati odjeljak Chlorophyta kao najbrojniji među algama; uvesti pojmove mikro- i makroalge; zadati da objasne raznolikost građe zelenih alga s evolucijskog aspekta. U → rješavaju predstavljene zadatke, naglašavaju poznate činjenice, opisuju izgled njima poznatih vrsta te na temelju ppt-a i ostalih; uočavaju sličnost složeno građenih alga s kopnenim biljkama te pokušavaju objasniti uočeno s evolucijskog stajališta.	1.1 1.3 1.2	PP PM	D R I	F, I	25	
	N → naglasiti da se zelene alge smatraju precima kopnenih biljaka te pitati učenike za koja obilježja smatraju da povezuju alge s kopnenim biljkama (klorofil a i b, škrob kao pričuvna tvar, celuloza u staničnoj stijenci, izmjena spolne i nespolne generacije – gametofita i sporofita, uz redukciju gametofita).; prema građi podijeliti zelene alge na jednostanične, kolonijalne i višestanične oblike; objasniti dijelove talusa mnogostaničnih alga na primjeru kaulerpe U → surađuju u obradi gradiva, zapisuju u svoje bilježnice karakteristične pigmente zelenih alga; definiraju postojanje škroba kao pričuvne tvari te celuloze u staničnoj stijenci; zapisuju građu talusa mnogostaničnih alga i prapoznaju dijelove na jednom primjeru iz herbarija alga	1.1 1.3 1.2	PP PM P	D R I	F, I		
	N → napraviti pregled osnovnih značajki građe jednostaničnih, kolonijalnih i višestaničnih oblika zelenih alga na tipičnim predstavnicima (klamidomonas, hematokokus, volvoks, jadranski klobučić, spirogira, kaulerpa, morska salata, paroženja); postaviti učenicima pitanja: *Opiši moguća staništa zelenih alga; Navedi jednu vrstu karakterističnu za Jadran.; Objasni značaj kolonijalnih algalnih oblika u evolucijskom smislu.* U → zapisuju poznate predstavnike jednostaničnih (*Chlamydomonas, Haematococcus, Acetabularia*), kolonijalnih (*Volvox*) i višestaničnih	1.2 1.3	PP P	D R I	F, I		

	zelenih alga (*Spirogyra*, *Caulerpa*, *Ulva*, *Chara*) i najvažnija karakteristična obilježja pojedine vrste; ukazuju na razliku u građi kolonijalnih i višestaničnih oblika; ponavljaju ulogu očne pjege i prisjećaju se kod kojeg protoktista su ranije spomenuli očnu pjegu i stezljivi mjehurić					
	N → navesti načine razmnožavanja zelenih alga (vegetativno – uzdužnom diobom i fragmentacijom; nespolno – različitim tipovima spora; spolno – konjugacija, gametama različitih oblika) i navesti konkretne primjere; objasniti načelo izmjene generacija na primjenu izomorfne izmjene generacija morske salate. U → dopunjuju plan učeničkog zapisa, prate primjere načina razmnožavanja u udžbeniku	3.1 3.2	PP UDŽ P	R I	F, I	
	N → učenicima zadati da na temelju uvodnog razgovora procijene značenje zelenih alga za čovjeka i biosferu – da prepoznaju alge kao najvažnije primarne producente i osnovne karike hranidbenih lanaca koje direktno i indirektno utječu na cijelu biosferu; nadograditi početnu priču o bioreaktorima sa zelenim algama kao alternativnom izvoru izvore u dobivanju energije i biogoriva; opisati učenicima posljedice masovnog razmnožavanja alga u ekološkim sustavima i pojavu pod nazivom *cvjetanje voda*; navesti zelene alge kao bioindikatore onečišćenja mora (morska salata) te dodatak prehrani zbog visokog postotka lipida i proteina U → iznose svoje ideje na temelju dosadašnjih iskustva i saznanja; promišljaju o upotrebi alga za proizvodnju biogoriva i prednost u odnosu na korištenje fosilnih goriva	2.1 2.2 2.3	PP UDŽ	R I	F I	
	N → najaviti učenicima praktični rad – mikroskopiranje zelenih alga; podijeliti učenike u grupe s obzirom na broj mikroskopa; zadati učenicima da izrade vlastiti nativni (mokri) preparat zelenih alga i u vidnom polju pomoću ključa za determinaciju pronađu i odrede minimalno 3 predstavnika zelenih alga (na razini roda ili vrste) i uoče njihovu građu, odnosno izvornu stvarnost povežu s naučenom teorijom; uputiti učenike da opaze koje dijelove zelenih alga mogu vidjeti i prepoznati pomoću svjetlosnog mikroskopa U → kroz grupnu podjelu rada izvršavaju zadani zadatak; prilikom svake determinacije potrebno je pozvati nastavnika na provjeru	1.-3.	RL PM M	PR R	F G	25
	N → podijeliti učenicima radne listiće (Prilog 3) u svrhu provjere ostvarenosti ishoda U → individualno rješavaju radne listiće		RL	T	I	15
Završni dio	N → napraviti sintezu sata provjerom rješenja radnih listića; odgovoriti na eventualna pitanja i nejasnoće U → prezentiraju rješenja radnih listića – nadopunjuju se u svojih odgovorima i jedni druge ispravljaju, postavljaju pitanja ukoliko im je nešto nejasno N → Zadati učenicima da do idućeg sata u prethodno formiranim grupama naprave kratak poster obradom sljedećih tema: •*Istražite više o algi kaulerpa i objasni zašto je nazivaju „algom ubojicom".* •*Argumentirajte ulogu bioreaktora sa zelenim algama u reguliranju koncentracije stakleničkih plinova.* •*Procijenite kako bi zagađenje nekog velikog jezera (primjerice teškim metalima) utjecalo na populaciju alga i održivost ekološkog sustava.* • *Alge – hrana budućnosti.* Postere trebaju izraditi u web alatu Piktochart i prezentirati ih ostatku razreda.	1.-4.	RL	R	F I	15

Nositelji aktivnosti: **N – nastavnik, U - učenici (dodati i mijenjati uloge ukoliko je potrebno uz svaku aktivnost)**
Koristiti u izvedbi: **RL – radni listić za učenike, UDŽ – udžbenik, RB – radna bilježnica, P – ploča, PM – prirodni materijal, E – pokus/eksperiment, MD – model, AP – aplikacija, PP – projekcija prezentacije, V – video zapis, A – animacija, I – igra, IU – igranje uloga, RS – računalna simulacija, M – mikroskop, L – lupa, F – fleks kamera, T – tablet, MO – mobitel, OP – organizator pažnje, AL - anketni listić TM - tekstualni materijali (dodati prema potrebi)**
Metode: **PR – praktični radovi, D – demonstracija, C – crtanje, I – usmeno izlaganje, R – razgovor, T – rad na tekstu i pisanje**
Oblici rada: **I – individualno, P – rad u paru, G – grupni rad, F – frontalno**

Materijalna priprema

Računalo, LCD projektor, udžbenik, radna bilježnica, herbarij morskih alga, mikroskop, materijal i pribor za izradu preparata, protokol za mikroskopiranje, ploča, kreda.

Plan učeničkog zapisa

Odjeljak: Zelene alge (Chlorophyta)

- najbrojnija skupina alga, velika biološka raznolikost
- pigmenti: ***klorofil a i b, ksantofil***
- ***talus = listić + stabalce + korjenčić***

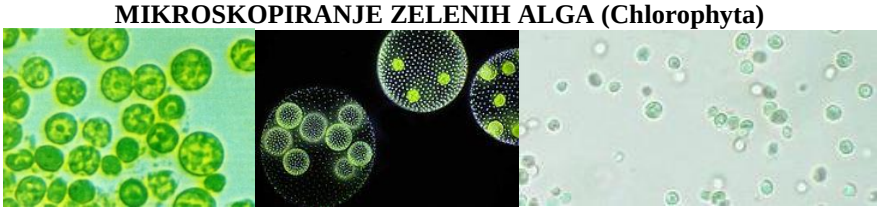
Jednostanične zelene alge	*Višestanične zelene alge*
pojedinačne: - **klamidomonas** – očna pjega (stigma), dva jednako dugačka biča - **jadranski klobučić** – cenocita; vapnenac - **hematokokus** – crveni pigment ***kolonijalne***: - **volvoks** – kolonija bičastih stanica s podjelom rada	- **spirogira** – dugački spiralni kloroplasti - **morska salata** – **bioindikator** onečišćenog mora - **kaulerpa** – najveći jednostanični organizam; **invazivna vrsta –** brzo se širi, otporna - **paružina** – najbolje diferenciran talus

- ***razmnožavanje*:** uzdužna dioba; konjugacija; izmjena generacija

Prilozi

Prilog 1. Radni listić za grupni rad – mikroskopiranje

MIKROSKOPIRANJE ZELENIH ALGA (Chlorophyta)



Cilj: pripremiti i mikroskopirati preparat zelenih alga iz barske vode ili akvarija

Informacije o uzorku:
Uzorci alga dobivaju se procjeđivanjem vode kroz fitoplanktonsku mrežicu. Na bočici za pohranu uzorka uvijek se nalazi naljepnica s pripadajućim informacijama o uzorku (datum, lokalitet, količina profiltrirane vode i vrsta uzorka). Na svoj radni listić zapišite informacije s naljepnice dobivenog uzorka.

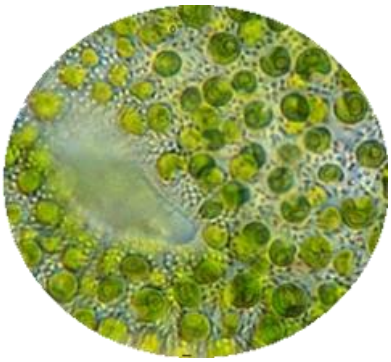
Uputa za izvođenje zadatka*:*
Napravite nativni (mokri) preparat i promatrajte alge pod mikroskopom. Služeći se ključem za determinaciju ***odredite 3 – 5 različitih vrsta/rodova*** *zelenih alga. Nakon svake determinacije (prije pronalaska nove vrste) pozovite nastavnika da provjeri vaš rad.*

Potreban materijal i pribor:
bočica s uzorkom, mikroskop, zaštitne rukavice, predmetnica, pokrovnica, kapaljka, iglica

Postupak:
Uzorak uzmite kapaljkom s dna bočice, pri čemu pazite da ne dođe do jakog mućkanja. Nekoliko kapi uzorka (2-3) stavite na predmetnicu i pažljivo prekrijte pokrovnicom da ne zaostane mjehurić zraka. Vaš preparat promatrajte mikroskopom i odredite vrste (ili barem rodove) zelenih alga.

Determinirane vrste/rodovi zelenih alga:
1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Prilog 2. **KLJUČ ZA DETERMINACIJU – Chlorophyta**



***Chlamydomonas* sp.**
Jednostanična alga, ovalnog do okruglog oblika, s tankom i čvrstom staničnom stijenkom. Na prednjem kraju nalazi se ispupčenje iz kojeg izlaze dva biča duža od same stanice. Kloroplast je velik i peharast, u njegovom prednjem dijelu nalazi se mala okrugla stigma, a u zadnjem škrobna zrnca. Razmnožavaju se uzdužnom diobom i izogamijom. Stanište su stajaćice i tekućice.



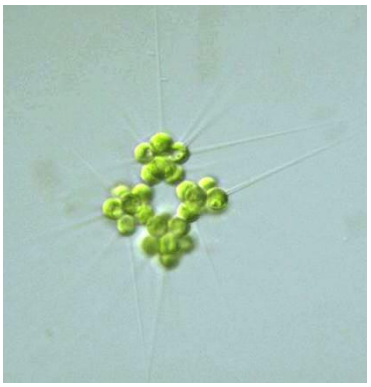
***Micractinium pusillum* FRES.**
Stanice okruglaste, promjera 3 – 7 µm. Po 4 (8) stanica spojeno u vijenac s otvorom u sredini. Svaka stanica im 2-3 bodljice duge do 60 µm. Nespolno se razmnožava autosporama, spolno oogamijom. Česta u stajaćicama.



***Chlorella kessleri* FOTT et NOVAK**
Jednostanična alga, stanice okrugle promjera 5 – 10 µm, obavijene glatkom staničnim stijenkom. Imaju veliki peharasti kloroplast. Brzo se razmnožava nepokretnim autosporama, što je čini pogodnom za uzgoj. Česta je u slatkim vodama, vlažnim zemljištima, kori drveća, u sastavu lišajeva te u simbiozi. Zbog velikog sastava proteina, vitamina i minerala masnovno se uzgaja u bazenima i koristi u pripravcima kao dodatak prehrani.



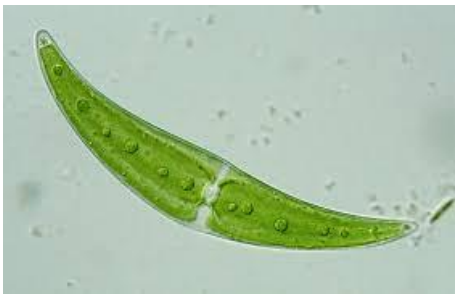
***Eudorina elegans* EHRENB**
Cenobij ovalnog ili okruglog oblika promjera 60-200 µm. Građen od 32 okrugle ili ovalne stanice s dva biča, poredane u 5 do 8 slojeva, obavijene omotačem kroz koji prolaze unutrašnjost ispunjena sluzavom masom. Razmnožavanje uzdužnom diobom i spolno oogamijom. Dio planktona stajaćica i tekućica.



***Micrasterias rotata* (GREV.) RALFS**
Stanice krupne i ovalne, plosnate s mnogo pora u staničnoj stijenci. Dimenzija 200-366 x 165x300 µm. Dubokom brazdom podijeljene na dvije simetrične polovine, a svaka je urezima podijeljena na simetrične režnjeve. Krajevi bočnih renjeva podijeljeni urezom na dva dijela. Srednji režanj dulji od bočnih. U slabo produktivnim vodama.

***Mougeotia* sp. AG**
Nitast talus, stanice cilindrične uske i duge. U sredini stanice nalaze se pokreljivi kloroplasti, u ovisnosti o intenzitetu svjetlosti. Razmnožavanje vegetativno dijelovima talusa i spolno konjugacijom. Stanovnici stajaćica.

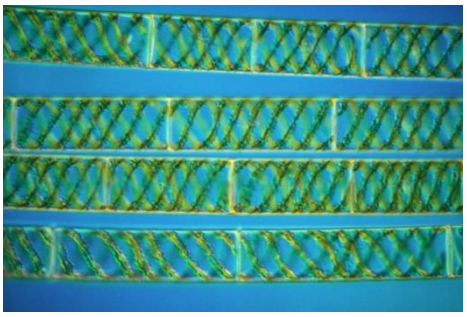




***Closterium moniliferum* (BORY) EHRENB.**
Stanice vretenaste i srpasto savijene, dimenzija 170-450 x 28-70 µm. S unutrašnje strane luka blago konveksne te se sužavaju prema zaobljenim vrhovima. Stanična stijenka glatka i sadrži pore za izlučivanje sluzi za pokretanje. U oba dijela po jedan kloroplast s 10 uzdužnih traka. U središnjem dijelu je jezgra. Stanište – rijeke, ribnjaci i jezera

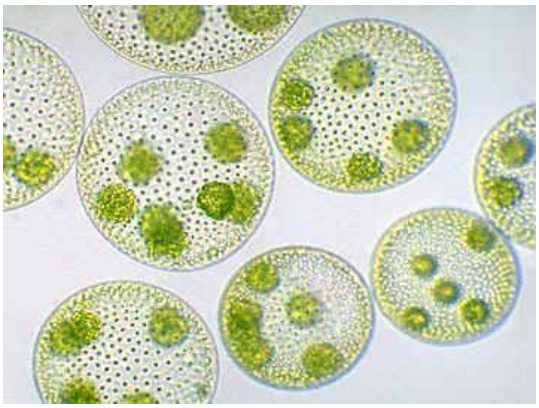
***Cosmarium reuniforme* ARCH.**
Stanice elipsoidne, dimenzija 46-57 x 44-54 µm. Podijeljene dubokom uskom brazdom na dvije simetrične polovice, u sredini sužene. U svakoj polovici po jedan kloroplast. Nastanjuje močvare i jezera.

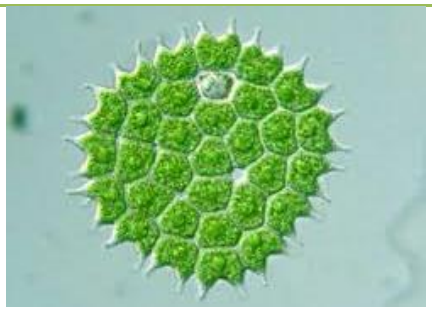




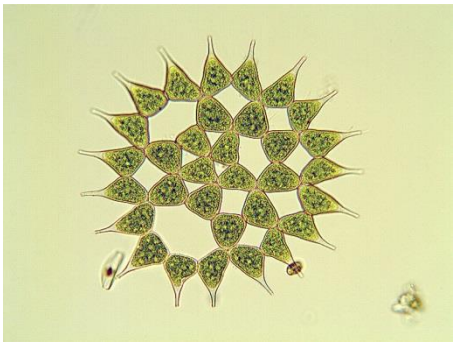
***Spirogyra* sp. LINK**
Nitast talus od cilindričnih stanica. Stanice duge koliko su i široke ili su dvostruko duže nego šire. Imaju spiralno uvijeni kloroplast. Velika jezgra nalazi se u sredini stanice. Razmnožavanje vegetativno dijelovima talusa, spolno konjugacijom. Stanište su ribnjaci, stajaćice i sporotekuće vode. Često se masovno razvija i stvara nakupine koje prekrivaju dno ili isplivaju na površinu (žabokrečina).

***Volvox globator* (L.) EHRENB.**
Cenobij okrugao ili ovalan, velik, promjera do 800 µm. Građen od 1500 do 20 000 okruglih stanica obavijenih sluzavim omotačem. Stanice su rapoređene u jednom sloju na kolonije i međusobno komuniciraju plazmodezmijama. Centralni dio ispunjava sluz. U kolonijama se razlikuju vegetativne stanice od stanica za razmnožavanje. Stanice u funkciji nespolnog razmnožavanja nalaze se u stražnjem dijelu kolnije između vegetativnih stanica. Njihovom diobom nastaju nove kolonije. Spolno se razmnožava oogamijom. Plankton stajaćih i tekućih voda, ponekad masovno u ribnjacima („vodni cvijet“).

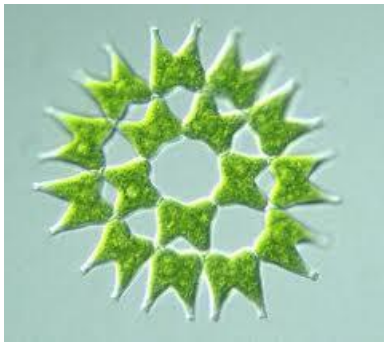




***Pediastrum boryanum* (TURP.) MENEGH**
Pločasti neperforirani cenobij s 8-64 stanice koje su međusobno povezane i obično kružno raspoređene oko središnje stanice. Krajnje stanice imaju dva vrha. Nespolno se razmnožavaju zoosporama, a spolno izogametama. Javljaju se u planktonu slatkih voda i kao epifiti



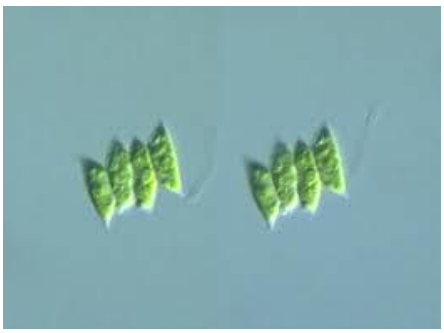
***Pediastrum simplex* MEYEN**
Pločasti perforirani cenobij s 4-32 stanice međusobno povezane i kružno raspoređene oko središnje stanice. Krajnje stanice imaju jedan izduženi vrh. Nespolno se razmnožavaju zoosporama, a spolno izogametama. Javljaju se u planktonu slatkih voda i kao epifiti.



***Pediastrum duplex* MEYEN**
Pločasti perforirani cenobij s 4-64 stanice međusobno povezane, obično i kružno raspoređene oko središnje stanice. Krajnje stanice imaju dva izdužena vrha. Nespolno se razmnožavaju zoosporama, a spolno izogametama. Javljaju se u planktonu slatkih voda i kao epifiti.

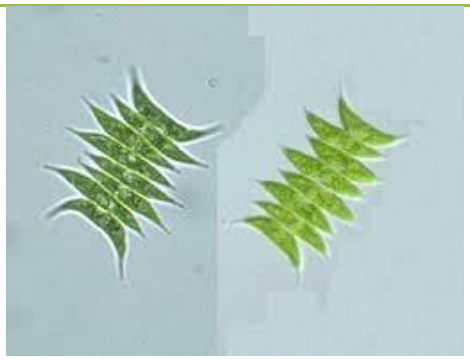


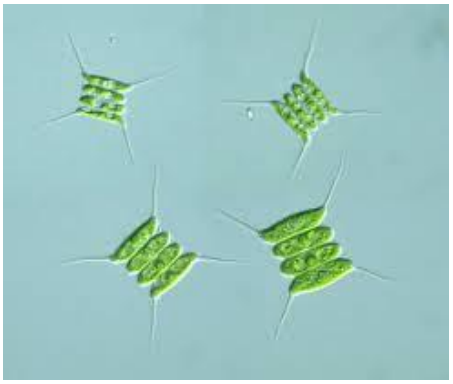
***Pediastrum tetras* (EHRENB.) RALFS**
Pločasti perforirani cenobij s 4-16 stanica koje su međusobno povezane, obično i kružno raspoređene oko središnje stanice. Stanice višekutne s dubokim prorezom. Nespolno se razmnožavaju zoosporama, a spolno izogametama. Javljaju se u planktonu slatkih voda i kao epifiti.



***Scenedesmus acutus* MEYEN**
Cenobij s alternirajućim stanicama, rijetko linearan, sastavljen od 2-4-8 stanica. Stanice su vretenaste, na krajevima cenobija blago polumjesečasti savinute i imaju sužene tupe vrhove. Čine plankton i perifiton visokoproduktinih voda.

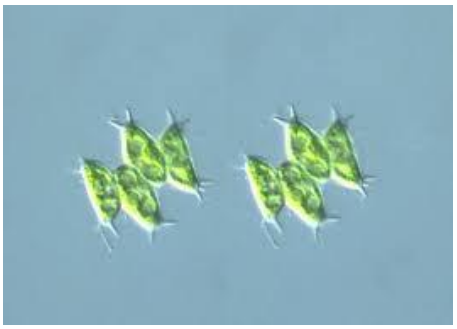
***Scenedesmus acuminatus* (LAGERH.) CHOD**.
Cenobij linearan s alternirajućim stanicama, sastavljen od 4 do 8 stanica. Stanice su usko vretenaste i imaju izdužene krajeve. Krajnje stanice cenobija polumjesečasto savinute. U planktonu visokoproduktivnih voda.

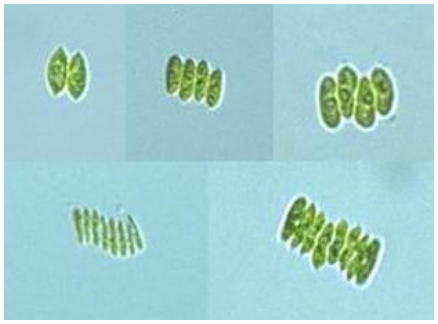




***Scenedesmus quadricauda* (TURP.) BREB.**
Cenobij jednoredan, sastavljen od 2 do 8 ovalnih stanica. Stanice imaju zaobljene vrhove i glatku staničnu stijenku. Samo krajnje stanice cenobija imaju na oba vrha po jednu bodlju. Vrsta je česta u visokoproduktivnim vodama.

***Scenedesmus denticulatus* LAGERH.**
Cenobij građen od 4 alternirajuće ovalne stanice koje na vrhovima imaju kratke bodljice poput zubića. Krajnje stanice imaju bodljice na oba vrha,a unutrašnje samo na jednom vrhu. Vrsta je česta u visokoproduktivnim vodama.





***Scenedesmus ecornis* (RALFS) CHOD.**
Cenobij jednoredan, linearan, sastavljen od 2 do 32 ovalne stanice zaobljenih vrhova i glatke stanične stijenke. Nalaze se u litoralu visokoproduktivnih voda.

Prilog 3. Pitanja za provjeru ostvarenosti ishoda

1. Koje pigmente sadrže zelene alge i koja je njihova uloga?
2. Navedi po jednu vrstu koja je predstavnik jednostaničnih, kolonijalnih i višestaničnih oblika zelenih alga.
3. Opiši građu kolonijalnih oblika zelenih alga na najrazvijenijem primjeru.
4. Navedi moguće načine razmnožavanja zelenih alga: _____ .
5. Napiši kratki esej pomoću pojmova: haploidna faza, diploidna faza, sporofit, gametofit, izmjena generacija.
6. Prouči i dopuni ilustraciju koja prikazuje izmjenu generacija morske salate. Uz brojeve na slici označene zelenom bojom pridruži nazive staničnih dioba (mejoza ili mitoza), a uz brojeve na slici označene crnom bojom pridružite odgovarajući broj kromosoma (n ili 2n).

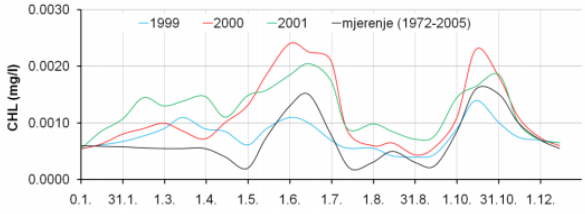


7. Na što se odnosi pojam *cvjetanje voda?*
8. Zašto se za morsku salatu govori da je bioindikator organskog onečišćenja? Istraži koje su još vrste alga takvi bioindikatori.
9. Napiši kratak opis ilustracije.



ZADATAK ZA DOMAĆU ZADAĆU

Gospodarski i poljoprivredno najrazvijeniji dio Italije je njen sjever, kroz koji protječe najveća talijanska rijeka, rijeka Po. a) Pomoću zemljopisne karte objasni moguću povezanost talijanske poljoprivrede i rijeke Po s cvjetanjem mora u hrvatskom dijelu sjevernog Jadrana. b) Na temelju grafičkog prikaza ovisnosti koncentracije klorofila o mjesecima u periodu od 1999. do 2001. godine izdvoji mjesece s najvećom i najmanjom zastupljenošću fitoplanktonskih vrsta i usporedi naveden. Na osnovu čega to zaključuješ? c) U kojem mjesecu svake godine se bilježi najveća biomasa fitoplanktona? Objasni.



Vremenske serije modelskih koncentracija klorofila-a u površinskom sloju mora sa mjesečno osrednjenim vrijednostima za 1999., 2000. i 2001. godinu na poziciji mjerne postaje S2.

Literatura

- Bogut, I., Futivić, I., Špoljarević, M., Bakarić, A. 2014. *Biologija 2, udžbenik iz biologije za drugi razred gimnazije,* Zagreb: ALFA.
- bilješke s kolegija *Alge, gljive i lišajevi*
- http://www.bioteka.hr/modules/okolis/article.php?storyid=24
- http://www.bioteka.hr/modules/zivisvijet/index.php/zivi-svijet.%C4%8Clanci.56/Zanimljiv-svijet-morskih-algi.html
- https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/5e7d944d-1bcf-4564-8ac8-1b0c0c6e1f32/biologija-2/m03/j01/index.html
- https://mikrosvijet.wordpress.com/2013/03/24/alga-spirogyra/
- https://www.ck12.org/biology/algae-classification/lesson/Classification-of-Plant-like-Protists-Advanced-BIO-ADV/
- Ilustracije https://www.istockphoto.com/illustrations/microalgae?sort=mostpopular&mediatype=illustration&phrase=microalgae