



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Geološki odsjek

Ena Pritišanac

**UTJECAJ ONEČIŠČIVALA NA
FIZIOLOGIJU MORSKE MIKROALGE
*NANNOCHLOROPSIS GADITANA***

DOKTORSKI RAD

Mentori: dr.sc. Maria Blažina

dr.sc. Sunčana Geček

Zagreb, 2025



University of Zagreb

Faculty of Science
Department of Geology

Ena Pritišanac

**EFFECT OF CONTAMINANTS ON THE
PHYSIOLOGY OF MARINE MICROALGA
*NANNOCHLOROPSIS GADITANA***

DOCTORAL THESIS

Mentors: dr.sc. Maria Blažina
dr.sc. Sunčana Geček

Zagreb, 2025

Sveučilište u Zagrebu

Doktorska disertacija

Prirodoslovno-matematički fakultet

Geološki odsjek

Sveučilišni doktorski studij oceanologije

UTJECAJ ONEČIŠĆIVALA NA FIZIOLOGIJU MORSKE MIKROALGE

NANNOCHLOROPSIS GADITANA

ENA PRITIŠANAC

Centar za istraživanje mora, Institut Ruđer Bošković

SAŽETAK

Antropogeni pritisci i sve kompleksniji sastav otpadnih voda negativno utječu na morske organizme. Jedan od predstavnika autotrofnih pikoeukariota, *Nannochloropsis gaditana*, pokazuje metaboličku plastičnost i sposobnost prilagodbe na nepovoljne okolišne uvjete. U ovom istraživanju provedeno je pet eksperimenata te su, uz odabrane visoke koncentracije nutrijenata, nitrata i amonija kao izvora dušika, odabrana onečišćivala poliklorirani bifenil 153 (PCB-153), vodena frakcija sirove nafte (VFN) i metilparaben (MetP). Odabrane su koncentracije onečišćivala koje su zabilježene u literaturi. Detaljno je ispitan učinak odabranih onečišćivala na ključne aspekte fiziologije, metabolizma, staničnog zdravlja i remedijacijskog potencijala morske mikroalge *N. gaditana*. U eksperimentu s PCB-153 je rast i prinos biomase unatoč izlaganju visokim koncentracijama onečišćivala ($3\mu\text{M}$ i $9\mu\text{M}$), što ukazuje na potencijalu prilagodbu vrste na prisutnost onečišćivala. VFN djelovala je kao dodatni izvor nutrijenata, čime je dodatno potaknula rast i akumulaciji biomase. Najviše razine malondialdehida zabilježene su pri izlaganju MetP, dok su u ostalim eksperimentalni uvjetima bile značajno niže. Izrađen je model koji opisuje rast biomase i ostale parametre s obzirom na početne uvjete eksperimenta i koncentracije odabranog onečišćivala. Dobiveni rezultati ukazuju na kompleksne interakcije i promjene u fiziologiji odabrane mikroalge, ali i potencijalne primjene u procesima obrade otpadnih voda. Integracijom biokemijskih analiza s *in silico* modeliranjem postignuto je dublje razumijevanje mehanizama prilagodbe što je omogućilo otvaranje novih smjernica za razvoj učinkovitijih metoda istraživanja u području ekotoksikologije i bioremedijacije.

(141 stranica, 45 slika, 10 tablica, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: *Nannochloropsis gaditana*, onečišćivala, fiziologija, model, toksikologija

Mentori: dr.sc. Maria Blažina, dr.sc. Sunčana Geček

Stručno povjerenstvo za ocjenu rada: prof. dr. sc. Zrinka Ljubešić, dr.sc. Tin Klanjšček,
dr. sc. Maja Fafandžel

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Geology
Doctoral study in Oceanology

Doctoral thesis

EFFECT OF CONTAMINANTS ON THE PHYSIOLOGY OF MARINE MICROALGA
NANNOCHLOROPSIS GADITANA

ENA PRITIŠANAC

Ruđer Bošković Institute, Zagreb

SUMMARY

Anthropogenic pressures and the complex composition of wastewater negatively affect marine organisms. Autotrophic picoeukaryotes, such as *Nannochloropsis gaditana*, exhibit metabolic plasticity and an ability to adapt to unfavourable environmental conditions. In this study, a series of five experiments were conducted, experiments with high nutrient concentrations, nitrate and ammonia as a source of nitrogen, and experiments with selected contaminants: polychlorinated biphenyl 153 (PCB-153), water soluble oil fraction (VFN), and methylparaben (MetP). In the experiment with different concentrations of PCB-153, *N. gaditana* exhibited increased growth and high biomass yield, even at higher concentrations (3 μM and 9 μM), suggesting possible acclimation to PCB-153. VFN acted as an additional nutrient source, promoting the growth of the strain. The highest levels of malondialdehyde were measured in the experiment with different concentrations of MetP, while in other experiments were significantly lower. Growth model was also developed to describe biomass growth and other parameters considering initial experimental conditions and concentrations of the selected contaminant. Results highlight the complex interactions and physiological responses of *N. gaditana* under contaminant exposure and suggest its potential application in wastewater remediation. Integration of biochemical analysis with *in silico* modelling has led to a deeper understanding of adaptation mechanisms, opening new doors for development of more effective research methods in the field of ecotoxicology and bioremediation.

(144 pages, 45 figures, 10 tables, original in Croatian)

Key words: *Nannochloropsis gaditana*, contaminants, physiology, modelling, toxicology

Mentors: dr.sc. Maria Blažina, dr.sc. Sunčana Geček

Reviewers: prof. dr. sc. Zrinka Ljubešić, dr.sc. Tin Klanjšček, dr. sc. Maja Fafandel

ŽIVOTOPIS MENTORA

Dr. sc. Maria Blažina viša je znanstvena suradnica na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, gdje radi od 2001. godine. Doktorirala je 2008. godine iz znanosti o moru na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, gdje je prethodno stekla i magisterij znanosti iz oceanologije 2005. godine. Diplomski studij kemijskog inženjerstva i tehnologije završila je 2000. godine na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Na Institutu Ruđer Bošković zaposlena je od 2001., najprije kao mlađa asistentica, zatim kao asistentica i znanstvena suradnica, a od 2018. godine djeluje kao viša znanstvena suradnica. Tijekom 2014. i 2015. boravila je u Njemačkoj kao dobitnica prestižnog postdokorskog programa u okviru Marie Curie akcije, radeći u području nanobiotehnologije u tvrtki NanotecMARIN GmbH na Sveučilištu Johannes Gutenberg u Mainzu.

Aktivno je uključena u mentoriranje doktorskih studenata i mladih istraživača u okviru razvojno-istraživačkog projekta HAMAG-BICRO i projekta A3PhycoTOX (HrZZ). Također je sudjelovala u praktičnom dijelu diplomskih i doktorskih istraživanja brojnih znanstvenika.

Između 2009. i 2016. predavala je kolegije iz Analitičke kemije, Instrumentalnih metoda analize te Kruženja organske tvari i eutrofikacije na Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli. Trenutno je predavač na doktorskom studiju oceanologije PMF-a (Sveučilište u Zagrebu) na kolegijima Primarna i sekundarna proizvodnja u plitkim morima, te Biomarkerski organski spojevi. Bila je organizatorica više znanstvenih skupova, uključujući završnu radionicu projekta A3PICO3G, otvorenih dana Centra za istraživanje mora, te međunarodnih radionica i ljetne škole posvećene održivoj bioekonomiji i stanju Jadranskog mora u okviru EU-FP7 projekata BlueGenics i CoreShell.

Podpredsjednica je Područnog vijeća Interdisciplinarnih prirodnih znanosti IRB-a, članica je Znanstvenog vijeća dokorskog studija oceanologije (PMF, Sveučilište u Zagrebu) i Znanstvenog vijeća za prirodoznanstvena istraživanja Jadrana pri HAZU, te dugogodišnja članica Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa.

Tijekom karijere sudjelovala je u brojnim nacionalnim i međunarodnim istraživačkim projektima, uključujući projekte praćenja stanja Jadranskog mora, istraživanja sluzavih agregata, eutrofikacije, biotehnoloških primjena morskih mikroorganizama, te potencijala jadranskih algi u proizvodnji biogoriva treće generacije.

Redovito recenzira znanstvene radove za međunarodne časopise poput *Botanica Marina*, *Hydrobiologia*, *Marine Biology Research*, *Food Control* i druge.

Stručno se usavršavala u inozemstvu, uključujući Švicarsku, Švedsku i Sloveniju, gdje je pohađala radionice i treninge iz morske mikrobne ekologije, separacijskih tehnika i poslovnih vještina za istraživače.

Objavila je niz znanstvenih radova, među kojima se ističu oni o adaptivnim svojstvima algi i bakterija, mikrobiološkim zajednicama u oligotrofnim vodama te ulozi dijatomeja u morskim ekološkim pojavama.

Dr. sc. Sunčana Geček diplomirala je primijenjenu matematiku 1996. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, gdje je kasnije stekla i titulu magistra znanosti iz numeričke matematike i računarstva (2002.), te doktorirala prirodne znanosti, smjer oceanologija (2008.). Profesionalni put započela je 1998. godine na Institutu Ruđer Bošković u Zavodu za istraživanje mora i okoliša, gdje je najprije radila kao znanstveni novak, a danas djeluje kao znanstveni suradnik u Laboratoriju za informatiku i modeliranje okoliša. Dodatno je radila kao savjetnik u Institutu za primijenjenu ekologiju Oikon te na gospodarskim projektima u području zaštite okoliša i održivog upravljanja. Stručno se usavršavala u inozemstvu, među ostalim kao gostujući znanstvenik na Sveučilištu u Palermu (Italija), te kroz specijalizirane škole i radionice u Francuskoj, Španjolskoj, Italiji i Turskoj. Njezin znanstveni interes obuhvaća multivarijantnu analizu ekoloških i socio-bihevioralnih podataka, razvoj matematičkih modela bioloških i fizičkih procesa, dinamiku populacija u ekosustavima, adaptaciju akvakulture na klimatske promjene te modeliranje životnog ciklusa organizama prema teoriji dinamičkog energetskog budžeta (DEB). Aktivno je sudjelovala na brojnim domaćim i međunarodnim istraživačkim projektima, uključujući one vezane uz održivo upravljanje prirodnim resursima, procjenu nosivog kapaciteta okoliša, rizike od onečišćenja mora i prilagodbu klimatskim promjenama. Autorica je i koautorica brojnih znanstvenih radova, a njezin rad citiran je u međunarodnoj znanstvenoj zajednici. Na sveučilištima u Zagrebu i Osijeku drži nastavu iz područja obrade podataka, modeliranja u ekologiji i statističkih metoda u zaštiti okoliša. Članica je Međunarodnog društva za ekološko modeliranje i Hrvatskog matematičkog društva. Pored znanstvenog rada, posjeduje bogato iskustvo u programiranju, statističkoj analizi i razvoju modela za potrebe zaštite okoliša, akvakulture i održivog razvoja.

ZAHVALE

Mojim mentoricama, dr.sc. M. Blažina i dr.sc. S. Geček hvala na razgovorima, sugestijama i pomoći prilikom izrade moje doktorske disertacije. Njihova stručnost, strpljenje i podrška bili su neprocjenjivi u svakom koraku ovog zahtjevnog procesa. Zahvalna sam na poticaju, povjerenju i ohrabrenju koje su mi pružale, a što je uvelike pridonijelo oblikovanju mog istraživanja i mom znanstvenom razvoju.

Dr. sc. M. Fafandel, iskreno Vam zahvaljujem. Hvala Vam što ste odvojili svoje dragocjeno vrijeme kako biste mi pružili pomoć i potporu tijekom izrade ove disertacije. Vaša otvorenost, spremnost da me uvijek saslušate i činjenica da su vrata Vašeg ureda uvijek bila otvorena za mene, davali su mi osjećaj sigurnosti i podrške. Posebno zahvaljuem na razmjeni ideja, na Vašem strpljenju i želji da nesebično podijelite svoje znanje te ga prenesete jednom doktorandu, čime ste uvelike obogatili moj znanstveni put.

Veliko hvala ostalim članovima Laboratorija za morsku ekotoksikologiju i bioremedijaciju - hvala na svakom kapućinu, svakom razgovoru i svakoj pomoći koju ste mi nesebično pružili.

Najveća hvala ide mojoj glavnoj posadi.

Hvala mojoj Teri i mome Andrei koji su pružali podršku, slušali i ohrabivali kroz cijeli ovaj proces. Naša druženja obogatila su moj život bez mjere. Bogatija sam jer vas znam i neizmjereno sam zahvalna što me moj posao doveo u Rovinj i što sam vas mogla upoznati. Volim vas.

Hvala mojoj dragoj Ivici, mojoj podršci i stijeni. Najbolja si. Volim te.

Hvala mojim drugim dragima, koji su cijelo ovo vrijeme stajali uz mene i nudili mi šalicu kave, kolač ili pak čašu dobrog vina – Katka, Jure, Goran, Katarina, Shane, Helena, Giordano, Matija i Fabi – Volim vas.

Od cijelog srca (ni to nije dovoljno), hvala mojoj dragoj mami, hvala ti na svakom pozivu, svakoj motivaciji i pomoći kroz ovaj dugotrajan proces. Renči, malo je reći da si najbolja. Volim te.

Mom tati, mom Bokiju, hvala ti što si uvijek bio spreman saslušati me i dati mi savjet. Tijekom mog dugotrajnog obrazovanja imala sam osjećaj da si upravo ti moj najveći navijač. Volim te.

Mojoj sestri, Nini Anđeli, tvoja pomoć i podrška su nemjerljivi. Još uvijek čuvam pismo koje si mi napisala za moj prvi radni dan – kod mene je i znaš što – Uspjela sam, uz tvoju pomoć. Neizmjerljivo te volim.

Hvala teti Sandi, mom Sveniku, Tatjani, Dori, Matei i svim ostalima čija imena su u mom srcu. Volim vas. Svima koji su jedno vrijeme bili na mom putu i više nisu – neizmjerljivo nedostajete i zahvalna sam na vama i vašem guranju – Đurđica, Hrvoje, Ivanka i Davor. Volim vas.

Tebi, mom najdražem. Cijeli život ću zahvaljivati za tebe. Tvoja pomoć i motivacija u ovom cijelom procesu su mi bili najvažniji. Gurao si i pomagao od samog početka, iz naše male spavaće sobice još za vrijeme fakulteta. Bez tebe nikako ne bih uspjela. Slušao si, brisao suze kad ih je bilo, držao me i konstantno pokazivao da si tu. Hvala ti što si imao strpljenja, kad ja nisam imala. Volim te previše.

Mom Eriku, mom Čičiju – ljubavi – hvala ti što si imao strpljenja kada je mama govorila da mora raditi. Znam da ti je bilo teško. Ovo je za tebe. Volim te previše.

Sada je vrijeme za svaku nadoknadu i odmor ...

SADRŽAJ

1. Uvod

1.1. Raznolikost i značaj mikroalgi	1
1.1.1. Opis i glavne karakteristike odabrane vrste <i>N. gaditana</i>	2
1.2. Abiotički čimbenici i odgovor mikroalgi na stresne uvjete	6
1.2.1. Intenzitet svjetlosti	6
1.2.2. Temperatura	7
1.2.3. Dostupnost makronutrijenata	8
1.3. Odabrani anorganski dušikovi spojevi i njihov metabolizam	10
1.3.1. Nitrat (NO_3^-)	10
1.3.2. Amonijev ion (NH_4^+)	11
1.3.3. Asimilacijski putevi unosa anorganskih oblika dušika u morskim mikroalgama	13
1.4. Antropogeni utjecaj na morske ekosustave	15
1.4.1. Neobrađene OV iz petrokemijske industrije i nastanak vodenih frakcija sirove nafte.....	17
1.4.3. Postojane organske onečišćujuće tvari	18
1.4.3. Onečišćivala od rastućeg značaja	20
1.5. Uloga mikroalgi	22
Ciljevi i hipoteze istraživanja	26
2. Materijali i metode	
2.1. Uzgoj mikroalge <i>Nannochloropsis gaditana</i>	27
2.2. Dizajn eksperimenta	29
2.3. Praćenje rasta <i>N. gaditana</i>	31

2.4. Mjerenje biokemijskih parametara

2.4.1. Analiza pigmenata	32
2.4.2. Određivanje proteina	32
2.4.3. Dinamika unosa nutrijenata	33
2.4.4. Gravimetrijsko određivanje ukupnih lipida i izrada profila masnih kiselina....	34
2.4.5. Određivanje količine produkata lipidne peroksidacije	35
2.4.6. Elementarna C:H:N analiza	35
2.5. Procjena toksičnosti	36
2.6. Statistička obrada podataka	37
2.7. Izrada fiziološkog i toksikološkog modela	38

3. Rezultati

3.1. Učinak NO_3^-

3.1. 2. Rast	42
3.1.3. Biokemijski parametri - sastav stanice	43

3.2. Učinak NH_4^+

3.2.1. Rast	51
3.2.2. Biokemijski parametri – sastav stanice	52
3.2.3. Analiza toksičnosti medija	59

3.3. Učinak PCB-153

3.3.1. Rast	60
3.3.2. Sastav stanice - Biokemijski parametri	61
3.3.3. Analiza toksičnosti medija.....	68

3.4. Učinak vodotopive frakcije sirove nafte

3.4.1. Rast	69
-------------------	----

3.4.2. Sastav stanice - Biokemijski parametri	70
3.4.3. Analiza toksičnosti medija.....	77
3.5. Učinak metilparabena	
3.5.1. Rast.....	78
3.5.2.Sastav stanice - Biokemijski parametri	79
3.5.3. Analiza toksičnosti medija	86
3.6. Izrada fiziološkog i toksikološkog modela	
3.6.1. Fiziološki model	87
3.6.2. Toksikološki model	89
4. Rasprava	
4.1. Učinak NO_3^-	92
4.2. Učinak NH_4^+	94
4.3. Učinak PCB-153	96
4.4. Učinak VFN	99
4.5.Učinak MetP	101
4.6. Izrada fiziološkog i toksikološkog modela	104
5. Zaključak	105
6. Literatura	107
7. Dodatak	125

1.UVOD

1.1.Raznolikost i značaj mikroalgi

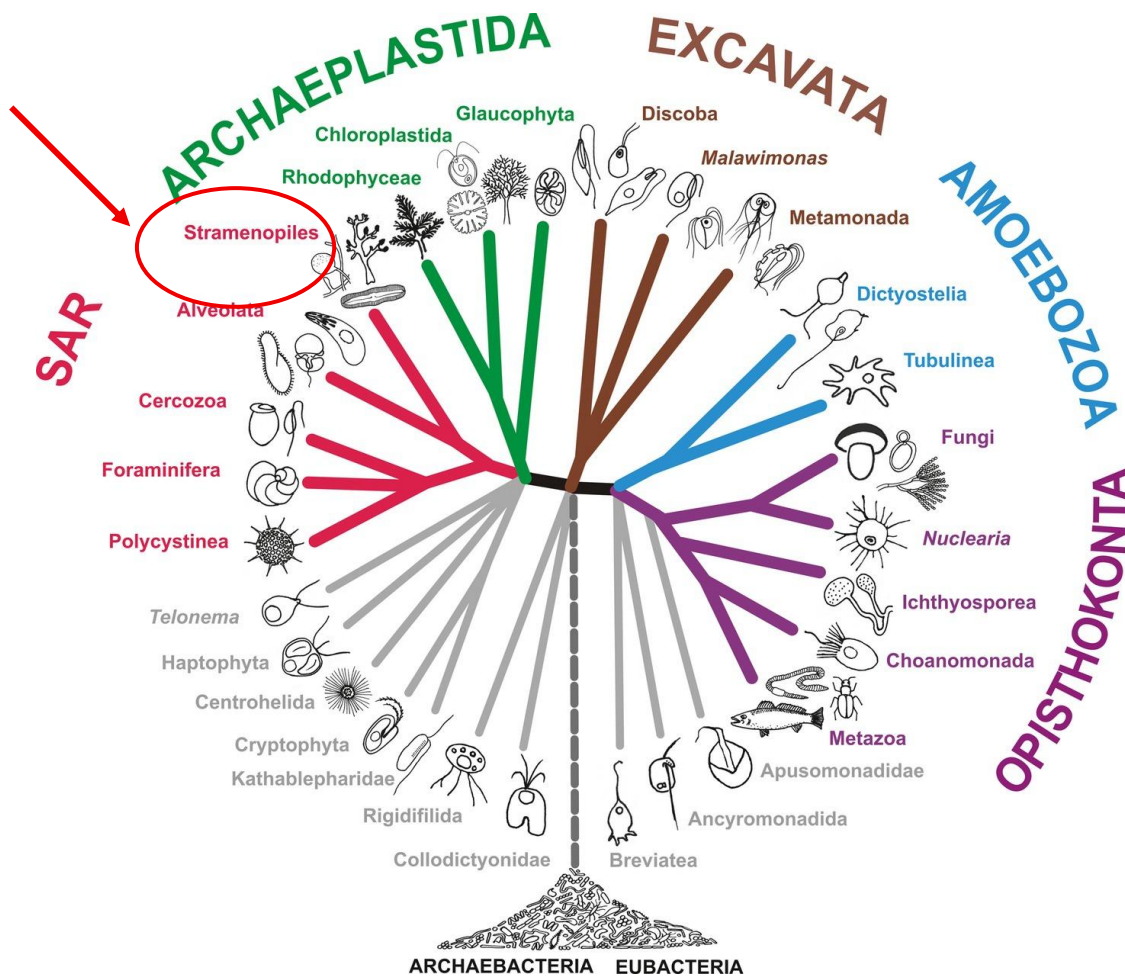
Mikroalge su fotosintetski mikroorganizmi kozmoplitke rasprostranjenosti, a obuhvaćaju i eukariote i prokariote (cijanobakterije) (Calatrava i sur., 2024). Veličine im variraju između 0,2 do 100 μm , a pokazuju izuzetnu biološku raznolikost koja prema procjenama broji više od 200 000 vrsta (Hallmann, 2007; Guiry, 2012). Zbog svog evolucijske raznovrsnosti, mikroalge se odlikuju raznovrsnim biokemijskim sastavom (proteini, ugljikohidrati, lipidi) te metaboličkim mehanizmima koji pokazuju veliku metaboličku fleksibilnost, ključnu za njihovu aklimatizaciju na promjenjive uvjete okoliša, uključujući biotičke i abiotičke stresore (Sharma i Rai, 2011; Borowitzka, 2018).

Kao fotosintetski organizmi, mikroalge mogu rasti autotrofno koristeći sunčevu svjetlost kao izvor energije pri čemu ispuštaju O_2 u atmosferu i ugrađuju CO_2 u biomasu. Mikroalge predstavljaju primarni izvor O_2 te služe kao biološki rezervoar za atmosferski CO_2 i primarni su proizvođači biomase u slatkovodnim i morskim ekosustavima (Ramaraj i sur., 2015). Međutim, mikroalge mogu rasti i fakultativno heterotrofno pri čemu koriste različite izvore organskog ugljika (C) (Perez-Garcia i sur., 2011). Mnoge skupine mikroalgi su miksotrofi, odnosno kombiniraju autotrofne i heterotrofne metaboličke procese (Patel i sur., 2020).

Autotrofni pikoeukarioti (veličina stanica 0.2-3 μm) su ključni dio mikrobnih hranidbenih mreža u morskim ekosustavima. Karakterizira ih jednostavna stanična struktura s velikim omjerom površine u odnosu na volumen tijela, što im omogućava efikasan unos nutrijenata (Mandal i Mallick 2014). Imaju važnu ulogu u biogenom ciklusu elemenata i toku energije u oligotrofnim morima (Wang i sur. 2019) pa tako i u Jadranu (Šolić i sur., 2018). Aktivnost, rast i uspješan razvoj mikroalgi kontrolira niz abiotičkih čimbenika (salinitet, pH, temperatura, svjetlost), čije fluktuacije uzrokuju stresne uvjete, te utječu na kinetiku rasta, aktivnost staničnog metabolizma i biokemijski sastav stanice. Stoga su mikroalge razvile brojne strategije preživljavanja nepovoljnih uvjeta (Borowitzka, 2018).

1.1.1. Opis i glavne karakteristike odabrane vrste *N. gaditana*

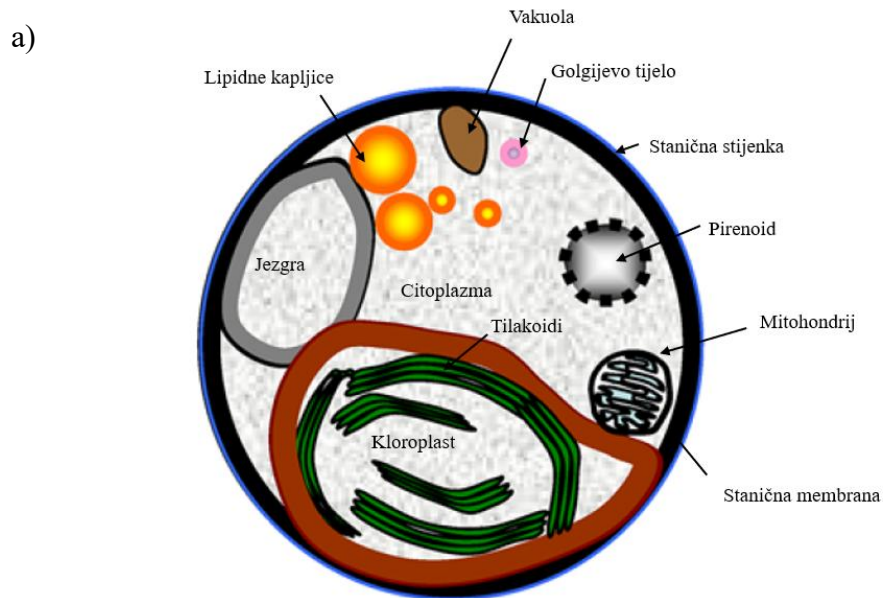
Za razumijevanje filogenetskog položaja *N. gaditana*, važno je poznavati glavne eukariotske supergrupe: SAR (Stramenopiles, Alveolata i Rhizaria), Archeplastida, Excavata, Amoebozoa, Opisthokonta (Slika 1) (Adl i sur., 2012). Odabrana modelna vrsta *N. gaditana* pripada SAR supergrupi, točnije grupi: Stramenopiles. Skupina Stramenopiles obuhvaća više od 100 000 vrsta, od kojih su najpoznatiji članovi dijatomeje, krizofiti i višestanični kelp. Fotosintetski članovi skupine su dominantni eukarioti u većini vodenih okoliša te igraju važnu ulogu u ekosustavu kao primarni proizvođači (Yoon i sur., 2009).



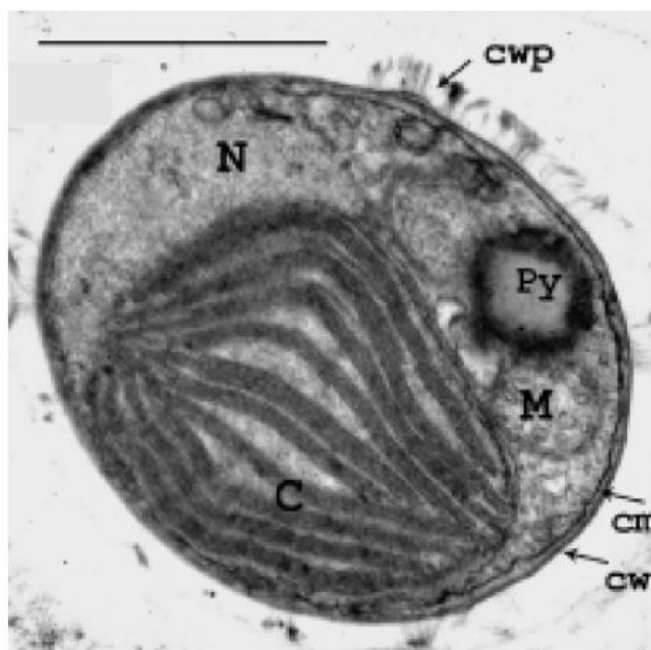
Slika 1. Filogenetsko stablo eukariota. Odabrana mikroalga *N. gaditana* pripada skupini Stramenopiles (Adl i sur., 2012)

Pripada razredu Eustigmatophyceae koji obuhvaća šest poznatih vrsta: *N. gaditana* (Lubián, 1982), *N. granulata* (Karlson i sur., 1996), *N. oceanica* (Suda i sur., 2002), *N. limnetica* (Krienitz i sur., 2000), *N. salina* (Hibberd, 2008) i *N. oculata* (Hibberd, 2008). Nedavne filogenske analize na temelju 18S rDNA otkrile su prisutnost dodatne vrste *N. australis* (Fawley i sur., 2015). Osim toga, provedena je analiza gena za plastidni rbcL što je omogućilo reviziju filogeneze roda *Nannochloropsis*, pri čemu je uveden novi sestrinski rod nazvan *Microchloropsis* te su vrste *N. gaditana* i *N. salina* prebačene u taj rod (Fawley i sur., 2015). Međutim, unatoč tome što su formalno svrstane u navedeni rod, u znanstvenoj literaturi i dalje se često navodi njihova pripadnost rodu *Nannochloropsis*, što će također biti zadržano u okviru ove disertacije radi dosljednosti.

Sve vrste roda *Nannochloropsis*, osim *N. limnetica*, pronađene su u morskom okolišu (Jinkerson i sur., 2013). Morfološki ih karakteriziraju sferične stanice, bez bičeva i s promjerom od 2 do 8 μm što ih svrstava u kategoriju pikoeukariota (veličina stanice do 2 μm) i nanoeukariota (veličina stanice do 8 μm) (Sieburth i sur., 1978; Kandalian i sur., 2013). Kloroplaste im okružuju čak četiri membrane kao rezultat sekundarnog događaja endosimbioze (Janouskovec i sur., 2010). Jedan kloroplast zauzima većinu stanice. Karakterizira ga specifičan sastav pigmenata, klorofil *a* (Chl *a*) i karotenoidi (najzastupljeniji su: violaksantin i β -karoten), dok ostalih pomoćnih pigmenata, klorofila *b* i *c*, nema (Basso i sur., 2014).



b)



Slika 2. *N.gaditana*: a) Shematski prikaz strukture stanice *N. gaditana*; b) Fotografija TEM (transmisijska elektronska mikroskopija) mikroskopom: C=kloroplast, M=mitohondrij, N= jezgra, PY="pirenoid", cm=stanična membrana, cw= stanična stijenska, cwp=izbojci na staničnoj stijenci (Zhang i sur., 2019).

Unatoč jednostavnoj građi, *Nannochloropsis gaditana* ima specifično građenu staničnu stijenku sastavljenu od više slojeva različitog sastava i funkcija (Slika 2). Većinski dio zauzima celulozni unutrašnji sloj koji je obavijen vanjskim hidrofobnim algaenanskim slojem koji je izuzetno otporan na kemijske i mehaničke metode ekstrakcije biomolekula kao što su primjerice pigmenti (Scholz i sur., 2014; Zhang i sur., 2019). Karakteriziraju ju jedinstvena obilježja koja uključuju brz rast u raznovrsnim okolišnim uvjetima i visok sadržaj lipida (Scholz i sur., 2014; Rocha i sur., 2003). *Nannochloropsis gaditana* može se uzgajati u različitim uvjetima, ali i na industrijskoj razini zahvaljujući svom robusnom rastu i stečenoj popularnosti zbog sposobnosti akumulacije visokih količina lipida i višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA) kao što su arahidonska kiselina (AA, 20:4n-6) i eikozapentaenoinska kiselina (EPA, 20:5 n-3), što ih čini poželjnim kandidatima za uzgoj i primjenu u biotehnologiji i akvakulturi (Chini Zittelli i sur., 1999; Tonon i sur., 2002). Zabilježena je čak akumulacija lipida do 69% u odnosu na suhu biomasu (Xiao i sur., 2013), 90% triacilglicerola (TAG) u ukupnim glicerolipidima i 42% EPA u ukupnim masnim kiselinama (Jia i sur., 2015). Lipidi uglavnom uključuju sljedeće glicerolipide: triacilglicerole (TAG), glikolipide monogalaktozildiacilglicerol (MGDG), digalaktozildiacilglicerol (DGDG), fosfolipide: fosfatidilkolin (PC), fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilinozitol (PI) i nefosforni betainlipid diacilglicerol-N,N,N-trimetilhomoserin (DGTS) (Canini i sur., 2024).

De novo sinteza masnih kiselina uglavnom se odvija u kloroplastu, a potom se masne kiseline eksportiraju u endoplazmatski retikulum (ER). S druge strane, glicerolipidi se sastavljaju i u kloroplastu i u ER-u. Kloroplast i ER sadrže aciltransferaze (GPAT, LPAAT), fosfataze (PAP) i sintetaze (CDS, PGPS). Suprotno tome, različiti acil-donori, acil-acil-prijenosni protein u kloroplastu i acil-CoA u ER-u, posreduju korak acilacije. Modifikacija masnih kiselina, poput desaturacije, primarno se odvija u membranama kloroplasta i ER-a, dok elongacija nastaje u kloroplastu i ER-u kroz acil-ACP i acil-CoA, redom. Preoblikovanje lipida putem aciltransferaza i lipaza ključno je za izmjenu masnih kiselina između membranskih lipida i TAG-a (Chapman i Ohlrogge, 2012).

1.2. Abiotički čimbenici i odgovor mikroalgi na stresne uvjete

Aktivnost, rast i uspješan razvoj mikroalgi su kontrolirani setom čimbenika koje nazivamo abiotički i biotički čimbenici. Abiotički čimbenici uključuju: intenzitet svjetlosti, UV zračenje, temperatura, salinitet i dostupnost nutrijenata dok biotički čimbenici uključuju utjecaj drugih organizama na promatrani organizam (pr. stvaranje konzorcija, simbioza, predacija). Fluktuacije abiotičkih čimbenika uzrokuju stresne uvjete te na takav način neki od abiotičkih čimbenika postaju limitirajući faktori. Na mikroalge snažne promjene abiotičkih čimbenika utječu na fotosintezu, produkciju biomase bogatu različitim spojevima te na aktivnost staničnog mehanizma i sukladno s time i na sastav stanice. Upravo zbog toga su mikroalge razvile strategije za preživljavanje nepovoljnih uvjeta nastalih zbog fluktuacija abiotičkih čimbenika (Borowitzka, 2018). Promjene okolišnih uvjeta mogu biti definirane na bazi odgovora stanice zbog nastalog stresnog ili limitirajućeg faktora. Limitirajući faktor određuje brzinu rasta ili biokemijsku reakciju čija će promjena rezultirati promjenom razine rasta ili biokemijske reakcije bez zahtjeva za aklimatizaciju (Hu 2013).

1.2.1. Intenzitet svjetlosti

U morskom ekosustavu, stanice mikroalgi prilagođavaju se ekstremnim fluktuacijama svjetlosti kako bi uspješno provodile fotosintezu i druge metaboličke procese, poput fiksacije dušika i sinteze spojeva bogatih ATP-om (Paerl 2012). Iako svjetlost omogućuje fotosintezu, njen višak može nepovratno oštetiti fotosintetski aparat i uzrokovati smrt stanica (Barber i Anderson, 1992).

Fotoaklimacija je ključan proces prilagodbe mikroalgi na promjene u intenzitetu svjetlosti. To uključuje prilagodbu optičkih svojstava, regulaciju enzima RUBISCO te zaštitu od svjetlosnih oštećenja (Dubinsky i Stambler 2009; Hu 2013). Stanice pri slabom svjetlu povećavaju koncentraciju fotosintetskih pigmenata, poput klorofila i fikobiliproteina, što uzrokuje tamnjenje stanica. Međutim, prekomjerno povećanje pigmentacije može dovesti do "sjenčanja" pigmenata unutar stanice, smanjujući efikasnost apsorpcije svjetlosti (Dubinsky i Stambler 2009).

S druge strane, izloženost pojačanom intenzitetu svjetlosti smanjuje koncentraciju pigmenata dok se povećava proizvodnja fotoprotektivnih karotenoida, poput β -karotena i luteina, koji štite stanice

od oštećenja. Prilagodba na niže intenzitete svjetlosti traje dulje nego prilagodba na više intenzitete (Pal-Nath i sur. 2011; Hu i sur., 2013).

Osim promjena u pigmentaciji, mikroalge koriste strategije poput povećanja veličine svjetlosnih antena ili broja fotosintetskih jedinica kako bi optimizirale apsorpciju svjetlosti. Pri slabom zračenju dolazi do smanjenja transporta elektrona i fiksacije ugljika, dok visoko zračenje može uzrokovati fotoinhibiciju, što dovodi do oštećenja fotosustava II (PSII) (Singh i sur., 2009).

Cijanobakterije i pikoeukarioti razvili su mehanizme regulacije ekscitacije PSII i PSI kako bi uravnotežili energiju i spriječili fotooštećenja. Ovi mehanizmi uključuju rasipanje viška energije putem karotenoidnog proteina (OCP) i proteina povezanih s visokim intenzitetom svjetlosti (HLIP) (Masojídek i sur., 2013).

Svjetlost također utječe na stanični lipidni sastav. Mikroalge poput pripadnika roda *Nannochloropsis* pod jakim osvjetljenjem akumuliraju više lipida i zasićenih masnih kiselina, dok se sadržaj polinezasićenih masnih kiselina (PUFA), poput EPA, smanjuje. Ova promjena povezana je s oštećenjem tilakoidnih membrana u kojima su lokalizirane PUFA, dok niži intenzitet svjetlosti povećava njihov sadržaj, što poboljšava fotosintezu (Canini i sur., 2024).

1.2.2. Temperatura

Uz svjetlost i dostupnost nutrijenata, rast mikroalgi ovisi i o temperaturi. Većina mikroalgi može provoditi fotosintezu i razmnožavanje između 15–30°C, dok je optimalni raspon 20–25°C (Ras i sur. 2013). Ispod optimalne temperature rast se može modelirati pomoću Arrheniusove jednadžbe, pri čemu se brzina rasta udvostručuje za svakih 10°C povećanja do nepovoljne temperature (Ahlgren 1987). Iznad optimalne temperature rast opada zbog toplinskog stresa koji uzrokuje denaturaciju enzima i proteina uključenih u fotosintezu.

Širina temperaturnog raspona između optimalne i letalne temperature varira među vrstama. Mikroalge osjetljive na toplinski stres imaju uski raspon, dok vrste s adaptacijskim strategijama mogu preživjeti širi raspon (Juneja i sur. 2013). Pri temperaturama višim od 40°C, dolazi do inhibicije PSII, disocijacije Mn^{2+} iona i stvaranja kisikovih radikala koji oštećuju membrane i

uzrokuju peroksidaciju masnih kiselina. Neke mikroalge sintetiziraju karotenoide, poput beta-karotena, kako bi spriječile štetne efekte radikala (Nishida i Murata 1996).

Temperatura također utječe na lipidni sastav mikroalgi. Kod *Nannochloropsis oculata* koncentracija lipida bila je najveća na 25°C (Ras i sur. 2013). Povećanje nezasićenih masnih kiselina pri nižim temperaturama povećava fluidnost membrane i štiti fotosintetski aparat od oštećenja (Juneja i sur. 2013).

Na visokim temperaturama, fotosinteza i rast opadaju zbog neuravnoteženosti između potrebe za energijom i dostupnog ATP-a, dok smanjenje veličine stanica može smanjiti metaboličke troškove i povećati unos nutrijenata (Atkinson i sur. 2003). Uz fiziološke, zabilježene su i generacijske prilagodbe mikroalgi, što bi moglo omogućiti uspješan rast unatoč klimatskim promjenama (Ras i sur. 2013).

1.2.3. Dostupnost makronutrijenata

Mikroalge zahtijevaju osnovne makronutrijente - dušik, fosfor i ugljik - za rast, dok nekim morskim vrstama, poput *Halimnobia coffeiformis*, treba i silicij (Markou i sur. 2014). Nedostatak nutrijenata ograničava rast mikroalgi, prema Liebigovom zakonu minimuma. Optimalni omjer C:N:P u okolišu za rast mikroalgi je 106:16:1, poznat kao Redfieldov omjer. Stopa rasta mikroalgi proporcionalna je brzini unosa limitirajućeg nutrijenta u uvjetima optimalne temperature i pH vrijednosti te se opisuje Michaelis-Mentenovom kinetikom. Michaelis-Mentenova kinetika opisana je s tri parametra: brzina maksimalnog unosa (V_{max}), koncentracija substrata (S) i Michaelisova konstanta (K_m) te opisuje nastajanje enzim-substat kompleksa (Collos i Berges, 2003). Limitacija ključnih nutrijenata mijenja metaboličke puteve mikroalgi (Juneja i sur. 2013).

$$v = \frac{v_{max}[S]}{[S] + K_m} \quad (1)$$

Ugljik (C) je ključni makronutrijent za fotosintezu, rast i razmnožavanje mikroalgi. Mikroalge koriste fiksirani ugljik na tri načina: za respiraciju, kao izvor energije i kao materijal za stvaranje novih stanica. Smanjena dostupnost fiksiranog ugljika usporava rast mikroalgi (Juneja i sur., 2013). Mikroalge primarno koriste anorganski ugljik za fotosintezu, u oblicima CO₂, karbonata ili bikarbonata, dok za heterotrofni rast koriste organske izvore poput acetata ili glukoze (Markou

i sur., 2014; Juneja i sur., 2013). Unos ugljika može se odvijati pasivno (difuzija) ili aktivno (transportni mehanizmi). Povećanje atmosferskog CO₂ uzrokuje acidifikaciju oceana, gdje pH opada s prosječnog raspona 7,5–8,4, što rezultira smanjenom dostupnošću minerala poput željeza i amonijaka. Acidifikacija ometa biološke procese poput kalcifikacije, ključnog za proizvodnju zaštitnih skeleta od kalcijevog karbonata (Rajeshwar i sur., 2016).

Dušik (N) je drugi najvažniji makronutrijent nakon ugljika, ključan za izgradnju stanica i makromolekula te rast morskog fitoplanktona. Često je limitirajući element u morskom okolišu te nedostatak dušika ograničava rast i mijenja metaboličke puteve fitoplanktona (Juneja i sur., 2013; Kim i sur., 2016). N je dostupan u anorganskim oblicima (nitrati, nitriti, amonijak) i organskim spojevima (urea, aminokiseline). Njegov unos može biti pasivan (difuzija) ili aktivan (transportni mehanizmi te slijedi Michaelis-Mentenovu kinetiku (Kumar i Bera, 2020; Salbitani i Carfagna, 2021). Kao što je prethodno objašnjeno, navedeni unos i transport nutrijenata, ali i otopljenih plinova i otopljene organske tvari (*engl.* dissolved organic matter, DOM) do i od stanica morskih mikroalgi događa se procesom difuzije ili aktivnim transportom (Salbitani i Carfagna, 2021). Na granici između stanice i okolne morske vode stvara se koncentracijski gradijent plinova, nutrijenata i DOM te u ovom slučaju aktivan unos nutrijenata kroz staničnu membranu održava koncentraciju nutrijenata nižom na površini stanice u odnosu na koncentraciju nutrijenata u okolnoj morskoj vodi (Bergkvist i sur., 2018). Opseg navedene granice može biti 10 do 100 puta veći od stanice morskih mikroalgi te se naziva fikosfera (Seymour i sur., 2017). Fikosfera, mikroskopski prostor oko stanica, omogućuje koncentracijski gradijent nutrijenata poput N, koji mogu dodatno varirati zbog procesa u okolišu, poput ispuštanja amonijaka od strane protista i zooplanktona (Stocker, 2012; Seymour i sur., 2017). Dušik je ključan za sintezu DNA, RNA, aminokiselina i pigmenata (klorofili, fikocijanin). Njegova dostupnost oblikuje zajednice mikroalgi; nitrati potiču rast dijatomeja, dok amonijak pogoduje dinoflagelatima (Markou i sur., 2014). Nedostatak dušika uzrokuje akumulaciju lipida i triglicerida te smanjenje proteina. U uvjetima limitacije dušika, neutralni lipidi (TAG) postaju dominantni, dok polarni lipidi opadaju (Li i sur., 2011; Xiao i sur., 2013). Na primjer, koncentracije TAG u *Nannochloropsis oceanica* mogu porasti do 30% suhe mase, dok se polarni lipidi smanjuju na 1% (Meng i sur., 2017). Fotosinteza se smanjuje pri niskim razinama dušika; klorofil opada, a karotenoidi rastu. Fotosintetski fiksiran dušik se preusmjerava na sintezu ugljikohidrata i lipida (Li i sur., 2011).

Specifične reakcije, poput degradacije fikobilisoma, javljaju se kod cijanobakterija i crvenih algi (Hu, 2013).

Fosfor je ključan makronutrijent za stanične metaboličke procese mikroalgi, sudjelujući u sintezi DNA, RNA, fosfolipida i ATP-a, esencijalnih za rast, razvoj i reprodukciju (Richmond i Hu, 2014; Yaakob i sur., 2021). Iako je fosfor često limitirajući u prirodnim staništima, za razliku od obnovljivih izvora ugljika i dušika, fosfor dolazi iz neobnovljivih fosfatnih stijena, što ga čini dragocjenim resursom. U okolišu i otpadnim vodama fosfor je prisutan kao ortofosfat, polifosfat, pirofosfat, metafosfat i organski oblici. Mikroalge najčešće akumuliraju fosfor kao ortofosfat, no mogu koristiti i druge anorganske i organske oblike (Markou i sur., 2014). Limitacija fosfora dovodi do smanjene sinteze i regeneracije substrata Calvin-Bensonovog ciklusa, akumulacije lipida, smanjenja klorofila *a* (Chl *a*) i proteina te povećanja ugljikohidrata u stanicama. Također, zabilježena je akumulacija astaksantina i usporavanje rasta stanica (Juneja i sur., 2013).

1.3. Odabrani anorganski dušikovi spojevi i njihov metabolizam

U morskom okolišu otopljena su tri glavna anorganska dušikova iona: nitrat (NO_3^-), nitrit (NO_2^-) i amonij ion (NH_4^+). Nitrat je termodinamički dominantan i u njemu je dušik najoksidiraniji, dok je u amonij ionu najreduciraniji te postoji aktivna izmjena između dvaju stanja preko nitrita koji djeluje kao posrednik (Zakem i sur., 2018). Anorganski dušikovi spojevi imaju ulogu u strukturiranju zajednica mikroalgi u različitim vrstama okoliša, pr. uloga nitrata u cvatu dijatomeja i utjecaj amonija na rast dinoflagelata (Collos i Harrison, 2014).

1.3.1. Nitrat (NO_3^-)

Nitrat je jedan od glavnih izvora N za morski fitoplankton te mu koncentracija varira između 50 $\mu\text{mol/L}$ dušika u otvorenom moru do 500 $\mu\text{mol/L}$ dušika u obalnim vodama. Na koncentracijama iznad 1000 $\mu\text{mol/L}$ dušika može biti toksičan (Collos i Berges, 2003). Koncentracije nitrata u površinskim vodama variraju od izrazito niskih (koncentracija gotovo jednaka nuli) u tropskim i subtropskim područjima do nekoliko desetaka $\mu\text{mol/L}$ dušika u umjerenim i polarnim područjima. Povišenje koncentracije nitrata u dubokom moru od sjevernog Atlantika prema Indijskom i Tihom oceanu je rezultat termohalina pokretna traka (*engl.* global conveyor belt) (Voss i sur., 2013). Morske mikroalge konzumiraju nitrat u fotičnoj zoni u svrhu akumulacije biomase te nakon uginuća organizama čestice tonu duž vodenog stupca nakon čega se N remineralizira do amonija,

oksidira do nitrita i kasnije do nitrata (Slika 6). U konačnici, nastali nitrat u duboko morskom području postat će dostupan za asimilaciju u površinskim vodama zbog kretanja vodenih masa, konvekcije i uzdizanja u umjerenim područjima i područjima velike geografske širine (Zhang i sur., 2020). U polarnim i subtropskim područjima gdje ima vrlo malo miješanja, bez uzdizanja vode obogaćene nutrijentima koncentracija nitrata na površini mora izrazito je niska (Sarmiento i Gruber, 2006).

1.3.2. Amonijev ion (NH_4^+)

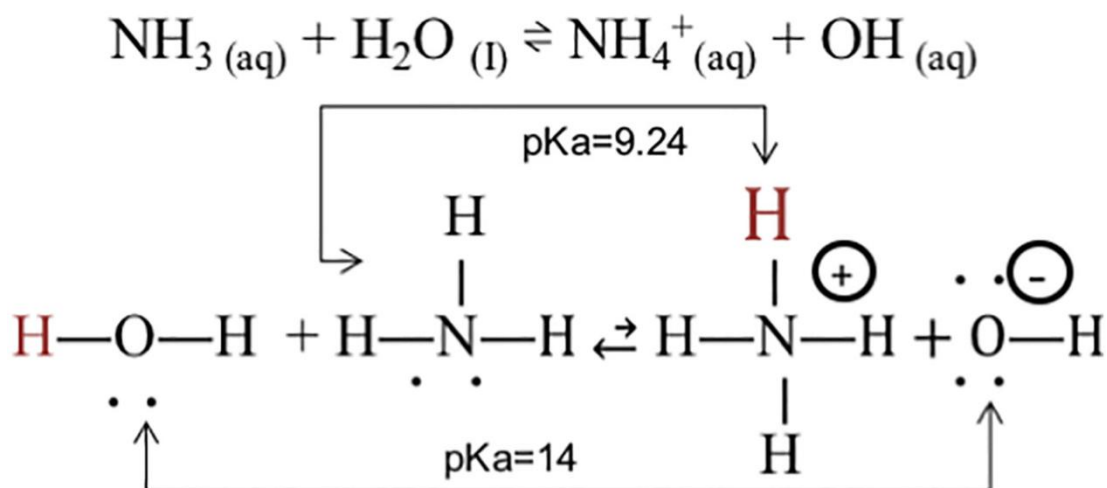
Amonijev ion prisutan je u malim koncentracijama u priobalnom području ($2 \mu\text{mol/L}$ dušika), osim u zagađenim područjima gdje koncentracija dolazi do $600 \mu\text{mol/L}$ dušika. Koncentracija amonija u morima je oko 1000 puta niža od koncentracije nitrata te varira od 0 do nekoliko stotina nM s prosječnim vrijednostima od 300 nM u eufotičnoj i 10 nM u afotičnoj zoni (Gruber, 2008). Unatoč vrlo niskim koncentracijama, amonij ima važnu ulogu u biogeokemijskom kruženju u morima (Sarmineto i sur., 2006). Amonij se može akumulirati u koncentracijama do nekoliko stotina μM u mraku, obalnom okolišu, estuarijima i sedimentu slanih močvara u kojima je manjak svjetlosti i kisika. Međutim, amonij se ne akumulira u suboksičnim zonama oceana što se može objasniti anamoks reakcijom u kojoj je amonij oksidiran nitritom u svrhu produkcije N_2 uz pomoć bakterija *Planctomycetes* (Zhang i sur., 2020):



Amonij je preferirani oblik dušika, u usporedbi s nitratom, zbog svog reduciranog stanja što olakšava proces asimilacije. Također zbog toga što mu je potrebna samo jedna molekula NAD(P)H (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) ili feredoksina i jedna molekula ATP-a za proces asimilacije, dok je nitratu potrebno devet molekula reducensa i jedna molekula ATP-a (Corruzi i Last, 2000). Unutar stanice, amonij nastaje kao produkt procesa fotorespiracije, razgradnje proteina i deaminacije aminokiselina (Collos i Berges, 2003). Veće skupine morskih mikroalgi, kao što su dijatomeje, preferiraju nitrat, dok sitnije frakcije morskih algi kao što su pikoeukarioti i cijanobakterije, preferiraju amonij. Najčešća proučavana interakcija je ona između nitrata i amonija te se mogu identificirati preference i inhibicije. Preference se mogu procijeniti usporedbom vrijednosti brzine maksimalnog unosa ($V_{\max}$) za svaki izvor dušika posebno. S

energetskog stajališta, unos amonija zahtijeva puno manje energije nego unos nitrata što može objasniti pojačani afinitet za unos amonija. Pri jakom svjetlu nitrat može spriječiti fotoinhibitorno oštećenje fotosustava II (PS II) čija je uloga efektivno provođenje procesa fotosinteze. Upravo to je razlog zašto neke vrste morskog fitoplanktona preferiraju nitrat prilikom jačeg osvjetljenja. Inhibicija unosa nitrata amonijem je kompleksan fenomen koji ovisi o vrsti i okolišnim uvjetima. Navedena interakcija varira od neprimjetnog utjecaja do potpune inhibicije unosa nitrata amonijem (Collos i Berges, 2003).

Amonij i amonijak su dva povezana izvora dušika za mikroalge budući da njihova izmjena ovisi o pH, koncentraciji CO₂ ili oboje (Slika 3) (Kumar i Bera, 2020). Stabilnost reakcijske ravnoteže značajno ovisi o pKa (konstanta disocijacije) vrijednosti. Budući da je pKa vode značajno niži 14 niži od pKa amonijaka (9.24), voda može dati proton pri čemu nastaje amonij. Iznad 9.24 pH, reakcija ide u drugu stranu te nastaje amonijak (Kumar i Bera, 2020). Iako je amonij preferirani izvor dušika za mikroalge, toksičan je i može uzrokovati inhibiciju pri visokim koncentracijama i čak staničnu smrt (Tablica 1) (Li i sur., 2019). Amonijak može interferirati sa PSII koji je zaslužan za učinkovito provođenje fotosinteze i uzrokovati povišenje fotosenzibilnosti što vodi do njegovog oštećenja ili odvajanja fotofosforilacije reduciranjem pH gradijenta potrebnog za konverziju ADP u ATP (Markou i sur., 2014).

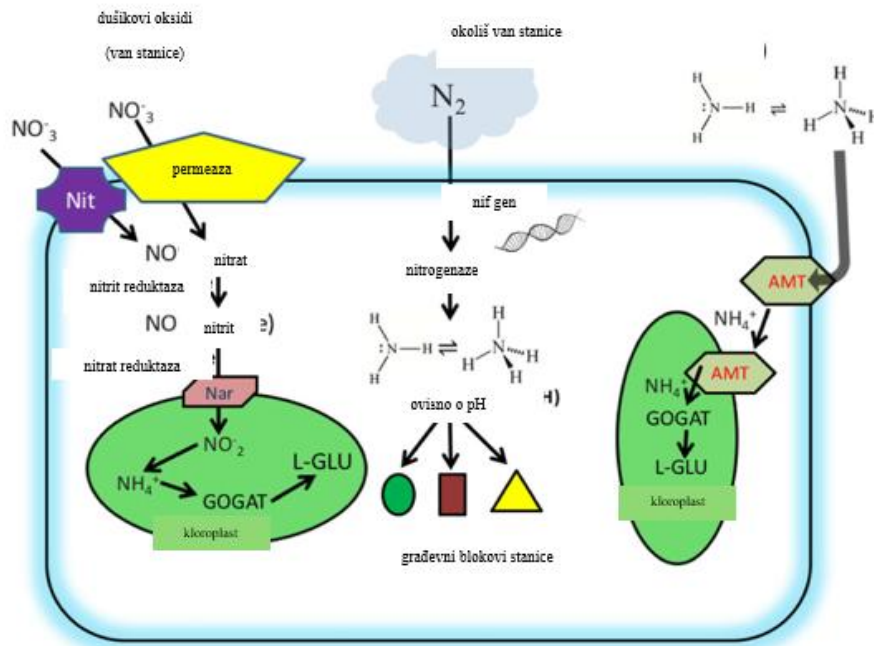


Slika 3. Reakcijska ravnoteža između amonijaka i amonija (Preuzeto iz: Kumar i Bera, 2020)

Ravnotežno stanje između amonija i amonijaka ovisi o pH. Kada je pH viši od 9.25 dominira amonijak (NH_3). Slobodni amonijak ima štetan utjecaj na mikroalge u relativno niskim koncentracijama (2 mM). Ulazi u stanice pasivnim, difuzijskim transportom, te mikroalge imaju vrlo malu kontrolu prilikom promjene intracelularnih koncentracija koje u određenom trenutku mogu postati toksične. Amonijak utječe na fotosintetski sustav, pogotovo na PS II, ali toksičnost amonijevih iona je manja od amonijaka te se zbog toga slobodni amonijak treba smatrati glavnim toksičnim spojem koji utječe na stanice. Međutim, stupanj toksičnosti ovisi o vrsti te je povezan s intracelularnim i ekstracelularnim vrijednostima pH (Marokou i sur. 2014).

1.3.3. Asimilacijski putevi unosa anorganskih oblika dušika u morskim mikroalgama

Asimilacija oksidiranih dušikovih spojeva ovisi o procesima nitrifikacije i denitrifikacije. Proces asimilacije nitrata omogućava redukcija nitrata u nitrit, nakon čega unutar stanice nastaje amonij ili amonijak zbog repetitivne redukcije (Slika 4). Redukcija se odvija pomoću nitrat reduktaze. NADH kao donor elektrona NADH reducira flavin koji transportira elektron na citokrom i tek onda na nitrat reduktazu. Nitrit reduktaza sadrži željezo i reducira nitrit do amonija uz pomoć feredoksina koji djeluje kao elektron donor. Nastali amonijev ion u kombinaciji sa spojevima s ugljikom postaje gradivni element za različite makromolekule koje sadrže dušik (Kumar i Bera, 2020).



Slika 4. Unos i transport anorganskih oblika dušika u stanici fitoplanktona (Preuzeto i prilagođeno iz: Kumar i Bera, 2020)

Amonij je temeljni spoj potreban za izgradnju nukleinskih kiselina, proteina i ostalih organskih molekula. Za morski fitoplankton, unos amonija kao anorganskog oblika dušika je preferiran u odnosu na ostale anorganske spojeve jer zahtijeva puno manje energije (Kumar i Bera, 2020). Morske mikroalge ne asimiliraju ni jedan drugi izvor dušika sve dok se cjelokupni amonij ne iskoristi. Radi što učinkovitije asimilacije, potrebni su transporter koji se nalaze na plazma membrani i membrani kloroplasta (Fernandez i Galvan, 2007). Transporter amonija (AMT) kontrolira kretanje amonija (ili amonijaka) kroz membrane (Slika) (Kumar i Bera, 2020). Amonij se asimilira prvenstveno putem puta glutamin-sintetaza-glutamat-sintaza (GS-GOGAT). Za održavanje tog kompleksnog puta potreban je transfer α -ketoglutarne kiseline za formiranje glutamata (Mifflin i Lea, 1982).

Morske mikroalge akumuliraju intracelularni dušik u obliku nitrata, amonija, aminokiselina, proteina i pigmenata koji mogu biti potpuno ili većinski potrošeni prilikom limitacije dušikom. Stoga, navedeni spojevi djeluju kao dugoročna skladišta dušika. Postoji varijacija u količini uskladištenih različitih dušikovih spojeva u morskim mikroalgama ovisno o dušiku u okolnom mediju (Dortch i sur., 1984). Dušik se može akumulirati u stanicama u nekoliko stupnjeva

asimilacije. Primjerice kod anorganskih spojeva dušika, prvi asimilacijski korak je nitrat s maksimalnim vrijednostima do 30% staničnog dušika što može dovesti do značajnih razlika između koncentracija N izvan i unutar stanice. Za razliku od visokog postotka asimilacije nitrata, kod nitrita je zabilježena vrlo niska razina asimilacije (<1%). Razlog tome vjerovatno leži u tome da nitrit difundira kroz membranu u okolni medij. Opseg akumulacije amonija je sličan kao kod nitrata. Akumulacija dušika unutar stanice vodi do njegovog otpuštanja u okolni medij duž koncentracijskog gradijenta. Od svih oblika dušika, nitrit se najviše otpušta tijekom asimilacije nitrata. Razlog tome je da je nitrit reduktaza limitirajući korak u asimilaciji nitrata. Faktori koji utječu na taj proces uključuju i intenzitet svjetla, temperaturu, stopu rasta, koncentraciju nitrata i nedostatak dušika u stanicama. Nakon što se iscrpi sam nitrat, nitrit se ponovno unosi u stanice. Amonij se izlučuje iz stanice prilikom pojačavanja osvjetljenja (Collos i Berges, 2003).

1.4. Antropogeni utjecaj na morske ekosustave

Zbog sve većih antropogenih pritisaka, sve veće naseljenosti obale, pritisak otpadnih voda (OV) na morske zajednice sve je veći i ima sve značajnije posljedice. Konvencionalne obrade otpadnih voda nisu prilagođene za učinkovito uklanjanje velikog broja postojanih organskih onečišćujućih tvari (*engl.* persistent organic pollutants, POPs), kao i sve češće spominjanih onečišćivala od rastućeg značaja (*engl.* contaminants of emerging concerns, CEC). Neka onečišćivala imaju nizak stupanj razgradnje i lipofilna svojstva te veliku mogućnost bioakumulacije, posebice u obalnim i plitkim morima (Maia i sur., 2023). Sustavno praćenje biološkog učinka zagađivala (MSFD) usredotočeno je na priobalni pojas i eutrofikacijska žarišta. Istraživanja učinaka onečišćivala u Jadranu rađena su na višim heterotrofnim organizmima (Herceg-Romanić 2024 i reference sadržane unutra), međutim rijetka su istraživanja o utjecajima onečišćivala na primarne proizvođače. Literaturnim pregledom utvrđen je manjak istraživanja o utjecaju onečišćivala na fiziologiju fitoplanktona (no vidi: Halm-Lemeille i sur., 2014; Duan i sur., 2016).

Pojačane antropogene aktivnosti kao brza stopa industrijalizacije, pojačani pomorski promet, ispuštanje onečišćivala, izlivanje nafte i neadekvatno obrađene industrijske OV izuzetno štetno utječu na morski ekosustav i pripadajuću biotu (Delrue i sur., 2021; Kuttiyathil i sur., 2020; King i sur., 2014; Schwarzenbach i sur., 2006).

Onečišćenje voda postalo je značajna briga i prioritet za društvo, javne vlasti, a osobito industrijski sektor. Izvori ovog onečišćenja variraju i uključuju rudarske aktivnosti, industrijski otpad, urbane otpadne vode (OV), kanalizaciju, pesticide i kemijska gnojiva, korištenje energije, radioaktivni otpad i urbani razvoj (Madgav i sur., 2020). Postoji mnogo različitih vrsta OV, od kojih svaka ima različiti sastav i karakteristike. Većina OV bogate su C, N, P i S, kao i elementima u tragovima koji djeluju kao nutrijenti. Osim atmosferskog CO₂, mikroalge mogu koristiti različite izvore organskog ugljika, uključujući acetat, laktat, glukozu (Morales-Sánchez i sur., 2017). N je jedan od najčešćih konstituenata OV, obično u obliku organskog (urea, aminokiseline) ili anorganskog N (amonij, nitrit, nitrat). Navedeni spojevi mogu se koristiti kao izvori N za rast mikroalgi, pri čemu je amonij (NH₄^{*}) preferirani oblik N za mnoge mikroalge (Sanz-Luque i sur., 2015). Anorganski spojevi P, kao primjerice hidrogen fosfat (HPO₄²⁻) i dihidrogen fosfat (H₂PO₄²⁻) su preferirani izvor P, iako organske molekule koje sadrže fosfodieterske veze mogu također djelovati kao izvor P.

Aktivnosti u domaćem, poljoprivrednom i industrijskom sektoru generiraju OV koje sadrže štetna onečišćivala koja izlažu ljudsko zdravlje i okoliš rizicima. Budući da se ove OV obično ispuštaju u obalne morske vode, od ključne je važnosti kontinuirano zaštititi izvore vode. Propisi koji reguliraju ispuštanje industrijskih otpadnih voda postaju sve stroži, osobito u razvijenim zemljama, te nalažu da se sve OV trebaju obraditi prije završnog ispusta u okoliš (Johstone i sur., 2003). Europska direktiva o pročišćavanju urbanih otpadnih voda na snazi je već više od 30 godina, a od njezine usvajanja 1991. godine, zabilježen je značajan napredak u kvaliteti europskih vodenih resursa. Države članice Europske unije (EU) uspostavile su sustave za prikupljanje i postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda uz potporu EU financiranja.

OV uglavnom prolaze kroz dva glavna koraka obrade, a to su primarna i sekundarna obrada. Prva se koristi za uklanjanje krupnijih ostataka koji bi mogli biti prisutni; druga se uglavnom sastoji od aeracijskih i taložnih bazena, gdje aktivirani muljevi odgovorni za uklanjanje većine onečišćivala. Ovisno o kvaliteti ispuštanja koja je potrebna i specifičnim propisima koji reguliraju ispuštanje, nakon primarne i sekundarne obrade, OV može proći kroz tercijarnu obradu, poput filtracije, dezinfekcije (upotrebom klora, ultraljubičastog svjetla ili ozona) ili napredne oksidacije kako bi se uklonili preostala onečišćivala i patogeni (Azuma i sur., 2021).

Međutim, i dalje postoje problemi s onečišćivalima koji nisu obuhvaćeni trenutnim propisima. Kako bi se riješio ovaj problem, Komisija je predložila ažuriranje Direktive (Bird, 1992). Unatoč postignutom napretku, tradicionalne metode obrade nisu prikladne za potpuno uklanjanje mnogih onečišćivala. Problem su postojana organska onečišćivala i onečišćivala od rastućeg značaja koja se često nalaze u vodenim tijelima i poznato je da imaju opasne učinke na okoliš, no trenutna zakonodavstva i sustavi obrade nisu uspjeli nositi se s njihovim pravilnim uklanjanjem iz OV (Liberti i sur., 2024). Razvoj dodatnih ili zamjenskih naprednih postupaka obrade, poput bioremedijacije pomoću mikroalgi, mogao bi biti rješenje za daljnje poboljšanje kvalitete vode, čime bi se pomoglo u zaštiti ekosustava i javnog zdravlja (Viancelli i sur., 2020). Osim toga, obrada otpadnih voda jedan je od najvećih potrošača energije u javnom sektoru; stoga je razvoj novih i održivijih tehnika obrade obavezan prema zakonima i međunarodnim konvencijama (Liberti i sur., 2024).

1.4.1. Neobrađene OV iz petrokemijske industrije i nastanak vodenih frakcija sirove nafte

Nafta je jedan od najvažnijih izvora energije, a povećanje globalnih energetskehtjeva dovelo je do intenzivnije eksploatacije i transporta sirove nafte morskim putem, čime morski okoliš postaje podložan izlivanju nafte (Pi i sur., 2015). Sirova nafta je kompleksna mješavina tisuće spojeva kao što su toluen, ksilen, fenol, teški metali i ostali drugi mutageni i onečišćujući spojevi (Schwarzenbach i sur., 2006; Pi i sur., 2015).

Petrokemijska industrija proizvodi značajne količine OV koja sadrži stabilne vodene frakcije sirove nafte (VFN) (Kuttiyathil i sur., 2020). Inače VFN nastaje u OV petrokemijske industrije kao rezultat mehaničkog ili kemijskog emulzifikacijskog procesa, ili spontano prilikom miješanja nafte s vodom. Za razliku od izlivanja nafte na površini, VFN je jako teško ukloniti. Ove frakcije sadrže onečišćujuće spojeve koji su kancerogeni te inhibiraju rast morskih organizama. Također ih se ne može ukloniti prethodno spomenutim metoda obrade OV što rezultira povišenim koncentracijama onečišćivala u obalnim vodama (Goodarzi i Zendehboudi 2019; Kuttiyathil i sur., 2020).

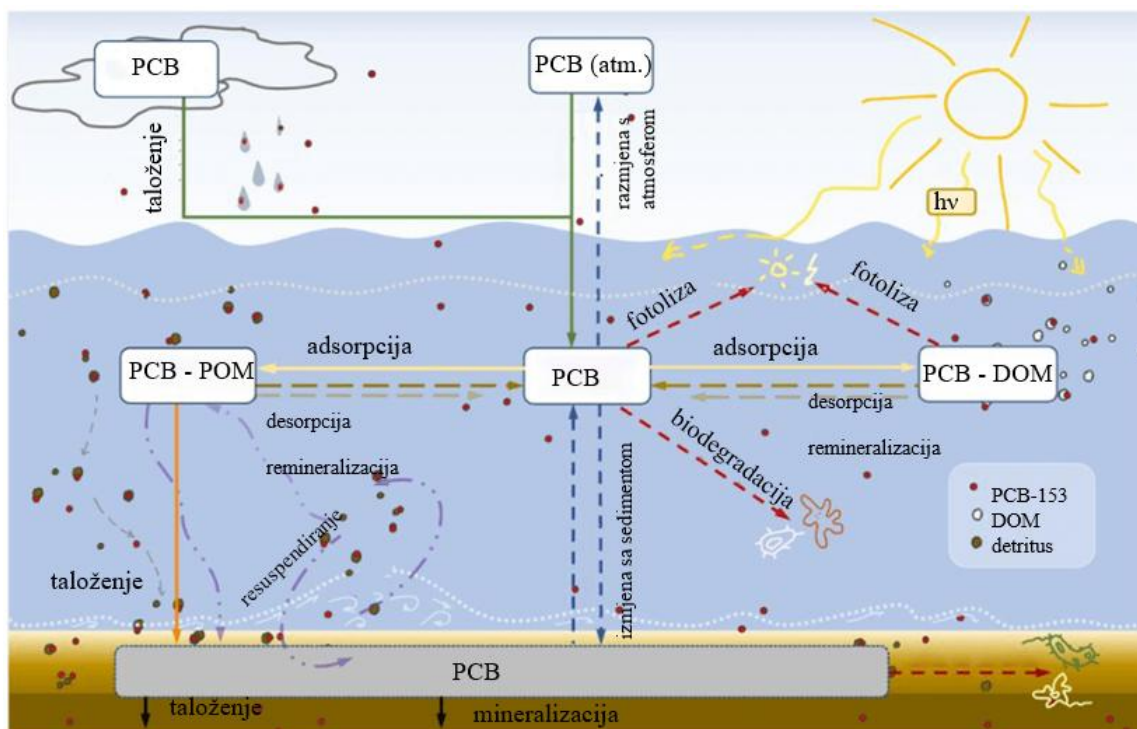
1.4.2. Postojane organske onečišćujuće tvari

Prema MSFD-u, u moru se prate postojane organske onečišćujuće tvari kao što su poliklorirani bifenil (PCB). Proizvodnja PCB-a zabranjena je ranih 1980-ih, međutim oni su još uvijek prisutni u zraku diljem svijeta. Iako nema novih izvora PCB-a u okolišu, prenose se na velike udaljenosti putem atmosferskog transporta i recikliraju se kroz okoliš (izmjenom zraka i vegetacije, mokrom i suhom depozicijom). Podaci o PCB koncentracijama za Jadransko more su oskudni te su razine atmosferskog zagađenja i depozicije slabo poznate (Herceg-Romanić i sur., 2024). Depozicijom u Jadranu najviše dominira PCB 153 (Jakovljević i sur., 2021), koji se i akumulira u bioti (Kljaković-Gašpić i sur., 2015).

Postojane organske onečišćujuće tvari (*engl.* persistent organic pollutants) su organski spojevi koji ostaju prisutni u okolišu tijekom dugog vremenskog razdoblja, imaju sposobnost prijenosa na velike udaljenosti te se bioakumuliraju u ljudskom i životinjskom tkivu (Mikheeva i sur., 2020). Zbog toga imaju značajan utjecaj na ljudsko zdravlje i okoliš, uzrokujući ozbiljne zdravstvene probleme. Postojane organske onečišćujuće tvari obuhvaćaju izuzetno veliki broj spojeva koji se svrstavaju u tri glavne skupine: pesticidi, industrijske kemikalije i nenamjerno nastali/proizvedeni nusprodukti koji se ispuštaju u atmosferu iz procesa izgaranja goriva i termičke obrade otpada (Ministarstvo gospodarstva, RH).

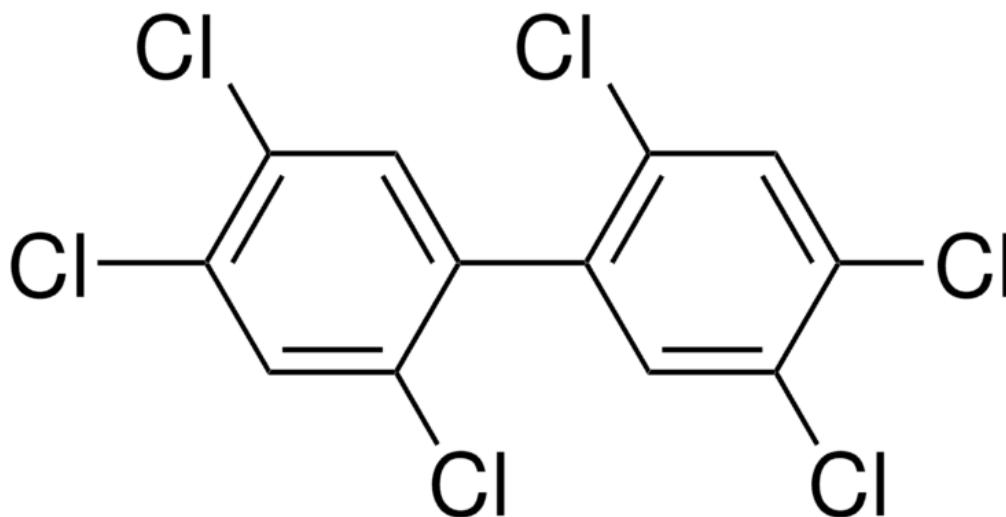
Poliklorirani bifenili (PCB) pripadaju postojećim organskim onečišćujućim tvarima te obuhvaćaju skupinu od 209 organskih spojeva, koji se još nazivaju i kogeneri, komercijano proizvedeni kao smjese s različitim udjelima klora (komercijalno zvan Aroclor, Clophen, Fenclor, Kanechlor i Phenoclor). Karakterizira ih otpornost na razgradnju i rasprostranjenost diljem svijeta unatoč njihovoj globalnoj zabrani proizvodnje u periodu između 1970-1980 (Jones, 2021). Ciklus kruženja PCB-a u okolišu je konstantan i izmjena između sastavnica okoliša (zrak i vodena površina, zrak i tlo, biljke, voda i tlo ili sediment) je izuzetno dinamična interakcija (Slika 5). Također je aktivan i transport putem zračnih masa u plinovitoj ili čestičnoj fazi, pri čemu oni mogu prodirati duboko u tlo, oceane i sedimente, gdje se u konačnici akumuliraju (Herceg Romanić i sur., 2024). U morskom okolišu završavaju putem atmosferske depozicije, rijeka, površinskih voda, sedimenata i OV koje se izravno ispuštaju u more. U moru se veže za čestičnu tvar i akumulira u sedimentu. Na globalnoj razini, mora služe kao finalni recipijent postojanih organskih onečišćivala i posljedično djeluju kao sekundarni izvor onečišćenja zbog dugotrajne razgradnje

PCB-a. Naposljetku ulaze u hranidbeni lanac preko organizama na nižim trofičkim razinama, postupno dospijevajući do predatora (Herceg Romanić i sur., 2024).



Slika 5. Primjer transformacije PCB u okolišu (preuzeto i prilagođeno iz: Mikheeva i sur., 2022). Legenda: POM (*engl.* particulate organic matter, čestična organska tvar); DOM (*engl.* dissolved organic matter, otopljena organska tvar), hv (sunčeva svjetlost)

PCB spojevi dijele se u dvije skupine, indikatorske spojeve i relevantne onečišćujuće spojeve. Indikatorski PCB spojevi koriste se kao pokazatelji ukupnog onečišćenja PCB u okolišu, dok relevantne onečišćujuće spojeve karakterizira veći potencijal za onečišćenje i bioakumulaciju. PCB -153 (2,2',4,4',5,5' heksaklorobifenil) pripada indikatorskoj skupini PCB-a (Herceg-Romanić i sur., 2024) (Slika 6). Karakterizira ga vrlo niska topljivost u vodi i visok afinitet za vezivanje s organskom tvari, visoka sklonost za fotolitičku deklorinaciju i nedostupnost za aerobnu bakterijsku razgradnju zbog njegovih strukturalnih svojstava (Wong i sur., 2006).



Slika 6 . Kemijska struktura PCB-153 (preuzeto:
<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/sial/35602>)

1.4.3. Onečišćivala od rastućeg značaja

Onečišćivala od rastućeg značaja (*engl.* contaminants of emerging concern) širok su pojam koji se koristi za opisivanje spojeva (onečišćivala) koji su postali predmetom znanstvenog interesa zbog njihove važnosti za okoliš. Farré i sur. (2008) definirali su onečišćivala od rastućeg značaja kao spojevi koji nisu prethodno proučavani i stoga nisu ni obuhvaćeni postojećim propisima o kvaliteti vode, te se za njih smatra da predstavljaju potencijalne prijetnje okolišu i zdravlju ljudi (Salthammer, 2020).

Karakterizira ih otpornost na razgradnju, akumulacija u organizmima te čak i otpornost na standardne tehnike obrade OV. Posljednjih godina, prisutnost onečišćivala od rastućeg značaja, kao što su farmaceutici, endokrini disruptori i insekticidi, detektirana je u površinskim vodama, OV i podzemnim vodama diljem svijeta (Arman i sur., 2021). Štetni učinci na organizme i prijenos kroz hranidbene mreže još nisu u potpunosti shvaćeni, što naglašava važnost praćenja (monitoringa), istraživanja i razvoja metoda za njihovo učinkovito uklanjanje (Liberti i sur., 2024). Istraživanja koja se bave razvojem učinkovitih metoda za uklanjanje onečišćivala od rastućeg značaja primjenom različitih tehnika obrade koje uključuju fizikalne, kemijske i biološke pristupe. Inovativne metode, poput upotrebe mikroalgi, također se istražuju. Trenutno europsko zakonodavstvo vezano za onečišćivala od rastućeg značaja primarno se temelji na okviru

regulativa Europske unije (EU) o vodi i kemikalijama (neke od, ali ne sve regulative obuhvaćaju: Water Framework Directive (1997/0067/COD; WFD), Priority Substances Directive (2000/60/EC PSD) i Pharmaceuticals in the Environment (EMEA/CHMP/SWP/447/00) (Wiering i sur.; 2020; Basis, 2010; Council, 2020; Ågerstrand i sur., 2015). Unatoč postojećih smjernica postoje regulativne praznine koje se mogu popuniti praćenjem i procjenom rizika od štetnih utjecaja onečišćivala od rastućeg značaja (Liberti i sur., 2024).

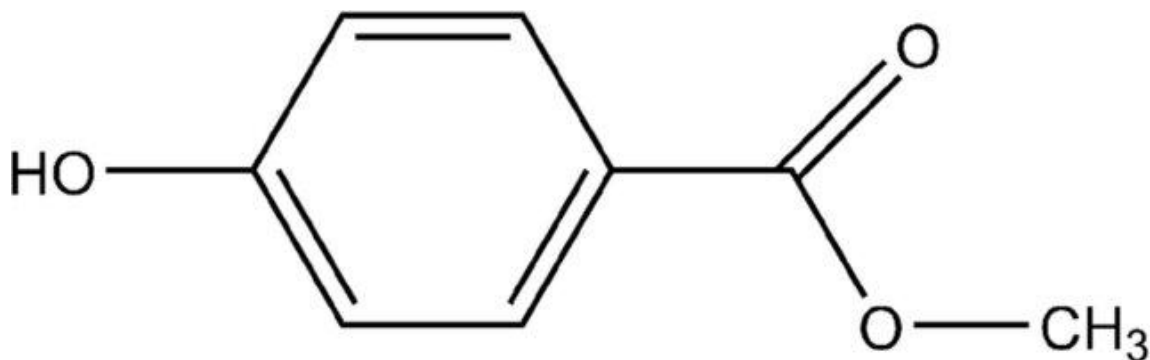
Važna skupina koja pripada onečišćivalima od rastućih značaja su parabeni. Kemijski gledano, parabeni su esteri p-hidroksi benzojeve kiseline koji se koriste u širokom spektru proizvoda, uključujući sredstva za osobnu njegu i prehrambene proizvode, zbog svojih iznimnih svojstava, kao što su širok spektar antimikrobnog djelovanja i sposobnost očuvanja kvalitete proizvoda (Bledzka i sur., 2014; Wei i sur., 2021). Međutim, zbog njihove široke primjene i distribucije parabeni su detektirani u ljudskom tkivu i tjelesnim tekućinama u koncentracijama koje dosežu nekoliko tisuća ng/L i µg/L, kao i u morskoj i slatkovodnoj bioti u razinama od nekoliko tisuća ng/g. Ova akumulacija ukazuje na mogućnost biomagnifikacije unutar hranidbenog lanca (Wei i sur., 2021).

Aktivno djeluju kao kompetitivni antagonisti receptora estrogena koji potencijalno uzrokuju rak dojke (Darbre i Harvey, 2014). Međutim, istovremeno su postali relevantan ekološki problem zbog ekotoksičnosti i zdravstvenih problema koje uzrokuju. Kako bi se ublažio utjecaj parabena na okoliš i zdravlje, uvedene su regulative koje ograničavaju upotrebu parabena i definiraju prihvatljive koncentracije u raznim proizvodima. U Republici Hrvatskoj je dozvoljena upotreba parabena u kozmetičkoj industriji u koncentracijama do 0,4% za jedan ester, odnosno 0,8% za smjesu (EUR-Lex, 2009).

Također, određeni su dozvoljen dnevni unosi metilparabena (MetP) i etilparabena (EtP). Unatoč navedenim mjerama, parabeni se i dalje koriste te su prisutni, u vodenom okolišu, gdje su zabilježene koncentracije u rasponu od ng/L do µg/L (Juliano i Magrini, 2017).

Među parabenima, u vodenim okolišima dominiraju metil paraben i propil paraben. Unatoč napretku u tehnologijama obrade OV, dizajn postojećih postrojenja za obradu nije prilagođen za njihovo uklanjanje, što rezultira otpadom koji sadrži visoke koncentracije onečišćujućih tvari (Vale i sur., 2022). Najčešće korišten paraben je MetP s maksimalnom koncentracijom od 0,0796 mg/L

u zabilježenom u ulaznim tokovima OV (Slika 7). Zbog svoje otpornosti na postupke pročišćavanja, parabene je iznimno teško u potpunosti ukloniti iz obrađenih OV, pa su prisutni i u ispusnim tokovima u koncentracijama od 4µg/L (Bledzka i sur., 2014).



Slika 7. Kemijska struktura metilparabena (preuzeto iz: Nowak i sur., 2020)

1.5. Uloga mikroalgi

Klimatske promjene, održivo korištenje prirodnih resursa i smanjenje onečišćenja okoliša glavni su izazovi današnjice. Predviđa se da će globalna potražnja za vodom u razdoblju između 2000. i 2050. godine porasti za 80% (FAO, 2018). Za smanjenje potrošnje i potražnje vode, jedan logičan pristup, mogao bi biti integracija obrade OV s uzgojem odabranih sojeva mikroalgi (El-Sheekh i sur., 2021). Sustavi pročišćenja OV s upotrebom mikroalgi koriste prirodne mogućnosti dezinfekcije i premašuju konvencionalne metode obrade OV u smanjenju onečišćenja nutrijentima (što dovodi do eutrofikacije i cvjetanja mora). Mikroalge su se pokazale učinkovitim kandidatima za obradu OV onečišćenim raznim onečišćivalima zbog pojačanog antropogenog utjecaja (Kuttyathil i sur., 2020). Proces bioremedijacije upotrebom mikroalgi, nudi alternativu konvencionalnim metodama obrade OV te nedavna istraživanja pokazuju da morske mikroalge zbog svoje visoke stope asimilacije i rasta imaju značajnu sposobnost bioremedijacije (Chen i sur., 2018).

Učinci ugljikovodika, parabena, polikloriranih bifenila iz OV mogu uništiti staničnu strukturu i narušiti integritet membrane mikroalgi, poremetiti rad antioksidacijskog obrambenog sustava te čak i zaustaviti sintezu nukleinskih kiselina i proteina (Jiang i sur., 2010). U sinergiji sa fotokemijski induciranim reakcijama može doći do daljnjih štetnih učinaka na stanično zdravlje i stanični integritet (Fafandel i sur., 2001). Metabolička plastičnost omogućava morskim mikroalgama rezistentnost na stresne uvjete opterećenja hranjivim tvarima, mikrobne invazije kao i štetne učinke prisutnih onečišćivala.

Mikroalge imaju različite metaboličke i aklimatizacijske karakteristike, a njihov potencijal za obradu OV varira među vrstama. Odabir pravih mikroalgi s željenim sposobnostima za remedijaciju ključan je za uklanjanje onečišćivala i mora biti prilagođen odabranoj vrsti OV (Tablica)(Mohsenpour i sur., 2021). Više od 725 vrsta mikroalgi zabilježeno je kao tolerantne na određena onečišćivala. Ekstenzivno su istraživani rodovi: *Chlorella*, *Scenedesmus* i *Spirulina* te rod *Chlorella* čini oko 30% vrsta korištenih u istraživanjima obrade OV (Calatrava i sur., 2024).

Osim uobičajenih anorganskih i organskih spojeva prisutnih u otpadnim vodama, poput teških metala, ksenobiotika, nitrata, fosfata i organskih spojeva ugljika, stanice mikroalgi imaju sposobnost usvajanja i razgradnje otpornijih onečišćivala, poput antibiotika, polikloriranih bifenila (PCB) i ugljikovodika, koji mogu biti vrlo otrovni za ljude (Mondal i sur., 2019). Mikroalge su u mogućnosti ukloniti onečišćujuće tvari zbog njihovog značajnog omjera površine i volumena procesima biotransformacije, bioadsorpcije i bioakumulacije (Fazal i sur., 2018).

Biotransformacija je jedna od najučinkovitijih metoda za uklanjanje onečišćivala. Procesom biotransformacije se složeni spojevi razgrađuju u jednostavnije spojeve koji se mogu koristiti kao izvori ugljika. Biotransformacija obuhvaća niz enzimskih reakcija što rezultira različitim metaboličkim posrednicima ili potpunom mineralizacijom osnovnih molekula u CO₂ i H₂O (Sutherland i Ralph, 2019)

Reakcije biotransformacije podijeljene su u dvije glavne skupine: (I) metaboličku razgradnju gdje onečišćivala djeluju kao donori/akceptor elektrona i izvora ugljika za mikroalge i (ii) ko-metabolizam gdje onečišćivala djeluju i kao elektron donori i kao izvor ugljika (Leng i sur., 2020). Biodegradacija posredovana mikroalgama može se odvijati u izvanstaničnom i/ili unutarstaničnom

okruženju. Enzimi prisutni u mikroalgama ili izlučeni u medij, poput peroksidaza, azo-reduktaza i lakaza, kako navode različiti autori (Sutherland i Ralph, 2019) mogu razgraditi te složene molekule u jednostavnije koje se različitim mehanizmima koriste kao metaboliti.

Tri faze složenih enzimskih reakcija uključene su u biodegradaciju organskih onečišćivala temeljenih na mikroalgama:

Faza I: Enzimi poput citokroma P450 (hidroksilaza, karboksilaza, dekarboksilaza, mono-oksigenaza) povećavaju hidrofilnost zagađivača dodavanjem ili otkrivanjem hidroksilne skupine kroz reakcije oksidacije-redukcije ili hidrolizu (Sutherland i Ralph, 2019).

Faza II: Enzimi poput glutationskih-S-transferaza i glukoziltransferaza olakšavaju konjugaciju glutationa s različitim spojevima koji posjeduju elektrofilne centre kako bi zaštitili stanice od oksidativnog oštećenja (Xiong i sur., 2019).

Faza III: Razni enzimi, uključujući oksidoreduktaze (glutamil-tRNA reduktaza, karboksilaze, mono(di)oksigenaze, lakaze, transferaze, hidrolaze, pirofosfataze i dehidrataze), pretvaraju spojeve u manje štetne ili netoksične intermedijate (Ding i sur., 2017).

Bioadsorpcija omogućava adsorpciju spojeva na membranu stanica mikroalgi (Mustafa i sur., 2021). Za razliku od biotransformacije, bioadsorpcija se provodi i na živim i na mrtvim stanicama (El-Sheek i sur., 2020). Procesi bioadsorpcije uključuju fizičke, kemijske i metabolički neovisne procese koji se provode mehanizmima poput taloženja, izmjene iona i elektrostatičkih interakcija (Chia i sur., 2020). Mikroalge imaju funkcionalne skupine na svojim membranama koje ih čine negativno nabijenima, privlačeći metalne ione, obično otopljene u obliku kationa, elektrostatskim silama. Velika površina sitnih stanica u velikim količinama u vodi doprinosi procesu uklanjanja (Shanab i sur., 2012). Elementi u tragovima, poput mangana, molibdena, kobalta, bakra, željeza i cinka, ključni su za enzimske procese i metabolizam stanica, ali mogu biti toksični u visokim koncentracijama. Suprotno tome, teški metali poput kroma, olova i arsena općenito su toksični za mikroalge (Neff, 2002).

Proces bioakumulacije zahtjeva energiju budući da je riječ o aktivnom metaboličkom procesu pomoću kojeg mikroalge akumuliraju razna onečišćivala (Premaratne i sur., 2021).

Bioakumulacija je nužna za uklanjanje anorganskih i organskih onečišćivala (sulfata, nitrata, fosfata, teških metala i pesticida), a moguće su i promjene u permeabilnosti membrane zbog djelovanja onečišćivala što, može rezultirati pasivnom difuzijom posredovanom depolarizacijom ili hiperpolarizacijom membrane (Tamma i sur., 2018). Iako su procesi bioadsorpcije i bioakumulacije fundamentalno različiti, mehanizmi njihovih reakcija su povezani (Liberti i sur., 2024).

CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Temeljeno na prethodno dobivenim rezultatima, vrsta *Nannochloropsis gaditana* izabrana je kao najperspektivniji kandidat koji će se koristiti kao primarni model organizma za remedijaciju otpadnih voda (OV) i kogeneraciju visokovrijedne biomase. Ciljevi ovog istraživanja obuhvaćaju detaljno ispitivanje učinaka odabranih onečišćivala na ključne aspekte fiziologije, metabolizma i staničnog zdravlja, kao i na remedijacijski potencijal morske mikroalge *Nannochloropsis gaditana*.

Ciljevi ovog istraživanja su:

Odrediti učinak onečišćivala na:

- 1.fiziologiju i metaboličku plastičnost
- 2.stanično zdravlje
- 3.remedijacijski potencijal

mikroalge *N. gaditana* kao predstavnika autotrofnih pikoeukariota koji se učestalo nalaze u priobalnim planktonskim zajednicama plitkih mora.

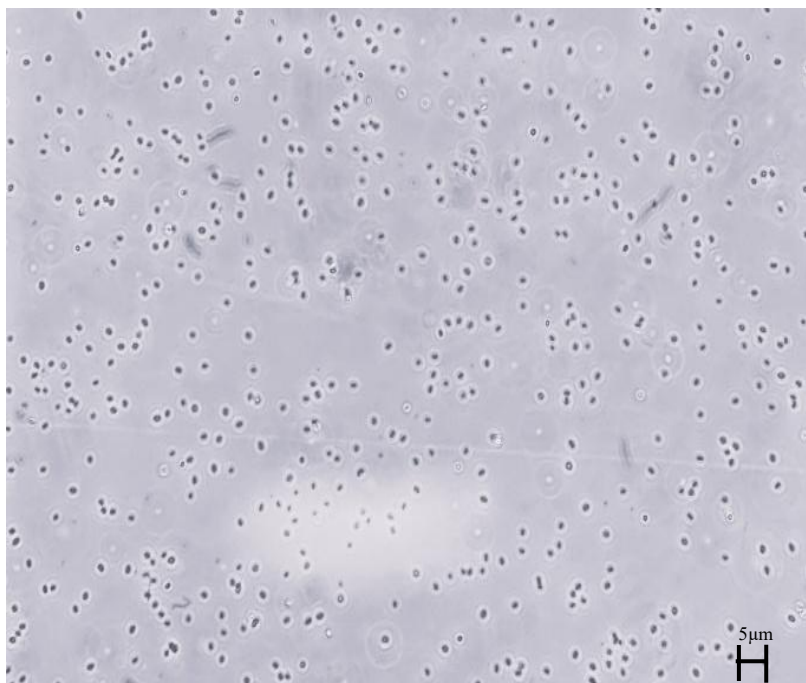
Hipoteze ovog istraživanja su:

- 1.Onečišćivala utječu na kinetiku rasta, metabolizam, fotosintetske pigmente i stanično zdravlje morske mikroalge *N. gaditana*.
- 2.Ekofiziološka plastičnost *N. gaditana* omogućava remedijaciju voda opterećenih onečišćivalima.

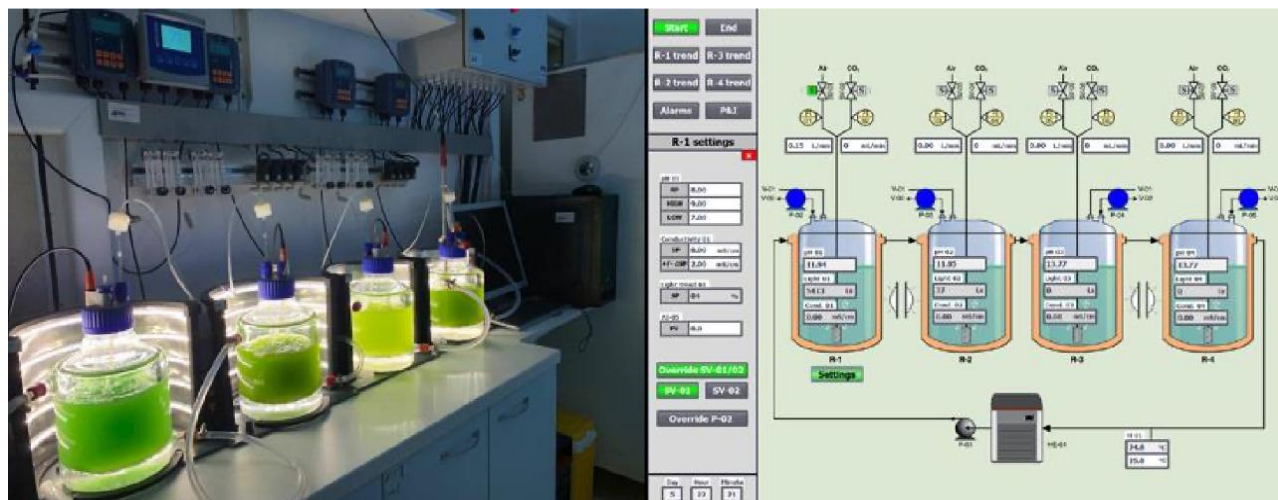
2.MATERIJALI I METODE

2.1.Uzgoj mikroalge *Nannochloropsis gaditana*

Morska mikroalga *Nannochloropsis gaditana* (SAG 2.99) naručena je iz zbirke kultura algi na Gottingen Sveučilištu (SAG) (Slika 8). Inokulum je uzgajan u fotobioreaktoru (PBR) izrađenom od borosilikatnog stakla zapremnine 1 L. Za uzgoj inokuluma postavljeni su sljedeći uvjeti: F/2 medij bez silicija, salinitet 18, 12:12 režim svjetlosti, 130 μmol fotona (m^2s) intenzitet svjetlosti, 26°C i pH 8. Salinitet od 18 PSU postignut je miješanjem odstajale morske vode (OMV) i destilirane vode (u omjeru od: 0,6 L morske vode i 0,4 L destilirane vode). Odstajala morska voda bila je u mraku minimalno dva tjedna i potom filtrirana na 0,2 μm polikarbonatnom filteru (PC) te autoklavirana. Navedeni abiotički čimbenici: intenzitet svjetlosti, ciklus svijetlo: mrak, temperatura i pH (održavan upuhivanjem CO_2) kontrolirani su računalnim sustavom SCADA (*engl.* Supervisory Control And Data Acquisition) (Slika 9). Smjesa zrak : CO_2 (97:3 v/v) upuhivana je u PBR kroz staklenu cjevčicu, čime se ostvaruje ravnomjerno miješanje i sprječava taloženje kulture na dnu reaktora. Fotobioreaktorska postolja okružuju LED plaštevci s toplom bijelom svjetlošću koji osvjetljavaju reaktore. Potrebno je osigurati da sve stanice unutar reaktora budu izložene jednakom intenzitetu svjetlosnog zračenja pri čemu u tome ključnu ulogu ima učinkovito miješanje kultura što omogućava homogenu raspodjelu stanica i u konačnici onemogućava formiranje aglomerata. Salinitet je mjeren svakodnevno pomoću konduktometra (Mettler Toledo), dok je pH vrijednost kontrolirana pH-sondom (Mettler Tledo) povezanom sa SCADA sustavom.



Slika 8. *N. gaditana*, slikano invertnim mikroskopom (Boeco), 1:40 (Fotografirala: E.Pritišanac)



Slika 9. Fotobioreakcijski sustav (lijevo) automatski upravljan pomoću SCADA sustava (desno) postavljenog u Centru za istraživanje mora (snimila: M. Blažina)

2.2. Dizajn eksperimenta

Turbidimetrijski je određena inicijalna koncentracija kulture za provedbu serije eksperimenata te je zatim određena biomasa potrebna za konačnu koncentraciju od 10 mg/L centrifugiranjem (5000 rpm, 10 min, s.t.) izdvojena iz prethodno uzgojenog inokuluma i inokulirana PBR-e. U eksperimentalnom dijelu rada, postavljeni su prethodno opisani uvjeti temperature, pH, nutrijenata i saliniteta. Jačina svjetlosti bila je 130 $\mu\text{mol fotona (m}^2\text{s)}$ jačina svjetlosti, a režim svjetlosti 16:8. Nadalje, proveden je set od pet eksperimenata. Svaki eksperiment imao je referentno stanje, odnosno inokulum koji je rastao u F/2 mediju početnom koncentracijom nitrata (NO_3^-) 0,8 mM/L i omjerom dušika i fosfora 9:1, dok su ostali abiotički čimbenici kontrolirani SCADA programom i izrada morske vode saliniteta 18 opisani u odjeljku gore. U ostale reaktore, u zasebnim eksperimentima, dodani su odabrani spojevi. Odabrane su visoke koncentracije nitrata, amonija te onečišćivala s koncentracijama zabilježenim u obalnoj morskoj vodi i u industrijskim otpadnim vodama (OV) (Tablica 1) (Vale i sur., 2022; Halm-Lemeille i sur., 2014). Odabrana su sljedeća onečišćivala: metilparaben (MetP), 2,2',4,4',5,5'-heksaklorobifenil (PCB 153) i vodotopiva frakcija nafte (VFN). Vrijeme trajanja eksperimenta ovisilo je o vremenu ulaska kulture u stacionarnu fazu.

Tablica 1. Sažeti prikaz eksperimentalnog dizajna.

Eksperiment	PBR			
	PBR1	PBR2	PBR3	PBR4
	NO ₃ ⁻	0,8 mMNO ₃ ⁻	1,6 mMNO ₃ ⁻	2,4 mMNO ₃ ⁻
	NH ₄ ⁺	0,8 mMNO ₃ ⁻	0,8 mM NH ₄ ⁺	1,6 mM NH ₄ ⁺
	PCB-153	0,8 mMNO ₃ ⁻	1 μM PCB-153	3 μM PCB-153
	VFN	0,8 mMNO ₃ ⁻	1% VFN	5% VFN
	MetP	0,8 mMNO ₃ ⁻	MetP1 (3500 ng/L)	MetP2 (500 ng/L)
				MetP3 (10 ng/L)

Eksperiment s različitim koncentracijama nitrata bio je usmjeren na istraživanje rasta kulture u mediju obogaćenom nitratima (NO₃⁻) i izradi osnovnog fiziološkog modela rasta *N. gaditana*. Zbog mogućnosti usporedbe s rezultatima dosadašnjih istraživanja, te rezultata dobivenim s NO₃⁻ kao izvorom dušika (Budiša i sur., 2019; Blažina i sur. 2022), odabrane su sljedeće koncentracije: 0,8 mM NO₃⁻ u kontroli, 1,6mM NO₃⁻ i 2,4 mM NO₃⁻ (Tablica 1).

U eksperimentu s različitim koncentracijama amonija praćen je rast kulture u mediju s različitim koncentracijama amonija (NH₄⁺) kao alternativnim nutrijentom koji je čest u eutrofnim i onečišćenim područjima, odnosno u zonama antropogenog utjecaja. Također, zbog prethodno provedenih istraživanja (Budiša i sur., 2019; Blažina i sur., 2022), odabrane su sljedeće koncentracije NH₄⁺: 0,8 mM NH₄⁺, 1,6 mM NH₄⁺ i 2,4 mM NH₄⁺ (Tablica 1).

PCB-153 odabran je za eksperiment s različitim koncentracijama PCB-a te je pripremljen u otopini dimetil sulfoksida (DMSO), prema metodi opisanoj u literaturi (Okumura i sur., 2001). Odabrane koncentracije PCB-153 bile su: 1 μ M PCB-153, 3 μ M PCB-153 i 9 μ M PCB-153 (Tablica 1).

Za eksperiment s različitim postocima VFN, priprema je provedena na sljedeći način: sirova rafinerijska nafta (INA, Urinj) pomiješana je s morskom i destiliranom vodom. Ekstrakcijski postupak proveden je na rotirajućim valjcima, gdje je ravnomjernim miješanjem kroz 48h postignuta ekstrakcija vodotopivih komponenti iz nafte u vodenu fazu (VFN) između dviju nemješljivih faza (nafta: voda). Vodena faza, koja sadrži ekstrahirane vodotopive komponente sirove nafte, odvojena centrifugiranjem, (10 000g, 10 minuta, postupak ponovljen nekoliko puta). Tako dobivena frakcija korištena je u daljnjim eksperimentima kao smjesa onečišćivala nepoznatog (ali predvidivog) sastava. Pripremljene su različite koncentracije: 1% VFN, 5% VFN, 10% VFN (Tablica 1).

Za eksperiment s metilparabenom, odabrane su sljedeće koncentracije: 3500 ng/L, 500 ng/L i 50 ng/L. Pripremljena je radna otopina u metanolu (MeOH) prema protokolu (Vale i sur., 2022) (Tablica 1).

2.3. Praćenje rasta *N. gaditana*

Svakodnevno je praćen rast kulture spektrofotometrijskim mjerenjem optičke gustoće (OD) u triplikatima ($OD_{\lambda 690nm}$) koristeći SHIMADZU UV-VIS 1800 spektrofotometar. Filtrirani su uzorci kultura na prethodno izvaganom 0.2-0.4 μ m polikarbonatnom filteru (PC) i sušeni u sušioniku na 60°C u trajanju od 2h. Filteri su ponovno izvagani, a biomasa izračunata oduzimanjem mase praznog filtera od mase filtera s uzorkom te dijeljenjem dobivene razlike s volumenom uzorka. Izrađena je kalibracijska krivulja rasta mikroalge *N. gaditana* i dobiveni rezultati izraženi su u mg/mL suhe biomase (dw). Outliers (netipične vrijednosti) izuzete su iz izračunavanje koncentracije modificiranom z-score metodom (Igewicz i Hoaglin, 1993).

2.4. Mjerenje biokemijskih parametara

2.4.1. Analiza pigmenata

Za analizu fotosintetskih pigmenata, uziman je poznati volumen uzoraka (5 mL) nakon čega je uslijedilo centrifugiranje (4500 rpm, 5 min, s.t.) i odbacivanje supernatanta. Dodan je metanol (5mL/uzorak) i uzorci su promiješani na tresilici nakon čega je uslijedila ekstrakcija u mraku u trajanju od minimalno 4h na 4°C. Nakon perioda ekstrakcije, uzorci su ponovno centrifugirani (4500 rpm, 5min, s.t.), a provjerom boje taloga (izbjeljivanje peleta) utvrđen je kraj ekstrakcije (Zavřel i sur., 2015). Spektrofotometrijskim mjerenjem (SHIMADZU UV-VIS 1800) na valnim duljina: 430, 620 i 720 nm omogućeno je kvantitativno određivanje fotosintetskih pigmenata (klorofil a i karotenoidi) pomoću jednadžbi (Ritchie 2006, Welburn 1994):

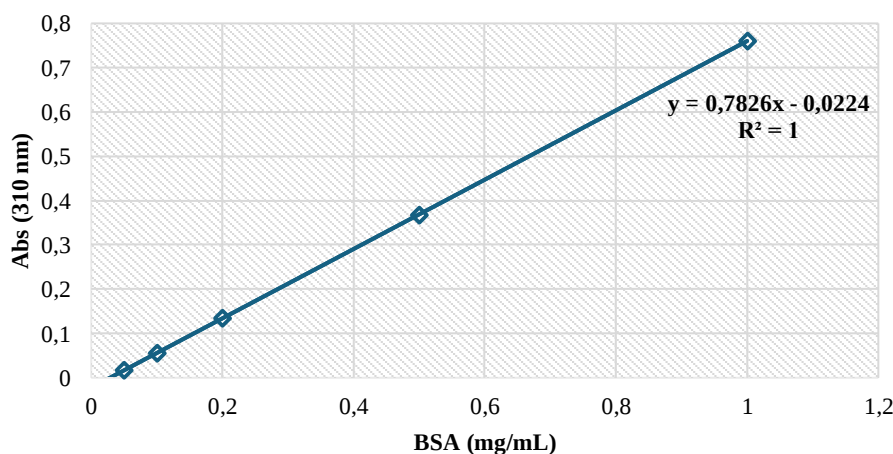
$$Chl\ a \left[\frac{\mu g}{mL} \right] = 12,9447 (A_{665} - A_{720}) \times \frac{V(MetOH)}{V(uzorka)} \quad (3)$$

$$Car \left[\frac{\mu g}{mL} \right] = \frac{(1000(A_{470} - A_{729}) - 2,86 (Chl\ a))}{221} \times \frac{V(MetOH)}{V(uzorka)} \quad (4)$$

2.4.2. Određivanje proteina

Proteini su određeni modificiranom microbiuret metodom (Itzhaki i Gill 1964, Safafar i sur. 2016). Centrifugirani su alikvoti kultura (5-10 mL) na 5000 g u trajanju od 5 minuta na sobnoj temperaturi te je supernatant odbačen. U pelet je dodan 1 mL 0.5 M NaOH i ekstrakcija je provedena u vodenoj kupelji 10 minuta na 80°C. Uzorci su podvrgnuti centrifugiranju te je supernatant prebačen u nove tube. Proces ekstrakcije ponovljen je tri puta i dobiveni ekstrakti pomiješani su zajedno prije spektroskopijskog mjerenja (SHIMADZU UV-VIS 1800). Za određivanje ukupnih proteina u kulturi, 300 µL ekstrakta pomiješano je s 200 µL reagensa (0,21% CuSO₄ x 5 H₂O u 30% NaOH) i 500 µL destilirane vode. Mjerena je na 310 nm te se za kalibracijski standard koristio albumin goveđeg seruma, BSA (*engl.* bovine serum albumin) (Slika 10).

Kalibracijska krivulja BSA



Slika 10. Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih proteina u kulturi

2.4.3. Dinamika unosa nutrijenata

Svakodnevno su se uzorkovali alikvoti (30 mL) za određivanje otopljenih hranjivih tvari: nitrata (NO_3^-), fosfata (PO_4^{3-}) i amonija (NH_4^+). Uzorci su centrifugirani na maksimalnoj brzini u trajanju od 5 minuta te je supernatant filtriran jednom (0,2 μm PC filter). Promjena koncentracije nutrijenata u supernatantu određivala se svakodnevno pomoću fotometra iris-HI801.

Metoda redukcije cinka (*engl.* Zinc reduction method) koristila se za određivanje koncentracija nitrata u uzorcima (10 mL). Mjerenje je provedeno na valnoj duljini od 505 nm s upotrebom reagensa HI782-25 (malonska kiselina, $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_4$). Metoda je prilagođena za morsku vodu i dodatkom reagensa dolazi do crveno-ružičastog obojenja. Upotrebom fotometra određuje se koncentracija nitrata izražena u mg/L NO_3^- .

Koncentracija amonijevih iona u uzorcima (1 mL) mjerena je na valnoj duljini od 430 nm prema prilagođenoj Nessler D1426 metodi iz ASTM priručnika za tehnologiju voda i okoliša (*engl.* Adaptation of the American Society for Testing and Materials Manual of Water and Environmental Technology). Navedena Nesslerova metoda uključuje upotrebu HI93764B-0 reagens tube koja sadrži HI93764-0 Nesslerov reagens (natrijev tetraiodomerkurat i NaOH,). Nakon miješanja reagensa s uzorkom, dolazi do reakcije između amonijevog iona i reagensa što dovodi do žutog

obojenja uzorka. Količina amonija mjerena je kolorimetrijski i intenzitet obojenja određen je pomoću fotometra. Koncentracija je izražena u mg/L (ppm) NH_4^+ .

Mjerenje koncentracije fosfata u uzorku provedeno je prema metodi Aminokiseline (*engl.* Amino acid method) iz priručnika Prilagođavanje standardnih metoda za ispitivanje voda i otpadnih voda (*engl.* Adaptaion of the Standard methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th Edition). Upotrebljeni su reagensi HI93717A (sumporna kiselina, H_2SO_4) i HI93717B (natrijev metabisulfit, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). Dodavanje reagensa u uzorak (10 mL) rezultira plavim obojenjem različitog intenziteta. Intenzitet boje mjeri se fotometrom na valnoj duljini od 525 nm, čime se određuje koncentracija fosfata izražena u mg/L PO_4^{3-} .

2.4.4. Gravimetrijsko određivanje ukupnih lipida i izrada profila masnih kiselina

Za analizu ukupnih lipida i izradu profila masnih kiselina, uzeto je 30 mL uzorka i filtrirano na prethodno žarenim GF/F filterima (Whatman). Filteri su prebačeni u staklene epruvete koje su sadržavale mješavinu diklormetanol/metanola (DCM:MeOH, 2:1, v:v) i prebačeni u ultrazvučnu vodenu kupelj Aquasonic 750D na 32-33°C u trajanju od 10 minuta. Proces ekstrakcije ponovljen je tri puta. Sadržaj lipida određen je gravimetrijskim mjerenjem (Bligh i Dyer, 1959). Ukratko, filteri su nakon ekstrakcije bačeni i ekstrakcijska smjesa DCM: MeOH prebačena je u tikvice uz dodatak 25 mL 8% vodene otopine NaCl. Nakon raslojavanja organske i anorganske faze, nepolarna organska faza (DCM) odvojena je u prethodno izvaganu staklenu epruvetu. Nakon uparivanja uzorka u digestoru, epruveta se ponovno važe i oduzima se vrijednost prazne staklene epruvete da bi se dobio ukupni sadržaj lipida u uzorku.

Nadalje, uzorci su nakon toga saponificirani, metilirani i analizirani prema Miller (1985). Nakon dodavanja 1.2 M NaOH otopljenog u metanolu i vodi, uzorci se smještaju u vodenu kupelj i kuhaju 30 minuta te naposljetku, hlade na sobnu temperaturu. Nastali saponifikat se zakiseljava dodatkom 6M HCl (pH <2) i 12% BF_3 i ponovno smješta u vodenu kupelj u trajanju od 10 minuta. Zadnji korak ekstrakcije uključuje dodatak DCM kako bi se iz vodene faze ekstrahirali metilni esteri masnih kiselina. Potrebno je epruvete čvrsto zatvoriti i mućkati okretanjem u ruci za 180°. Nakon potpunog razdvajanja faza, zakiseljeni vodeni sloj ukloni se kapalicom. Esteri masnih kiselina (FAME) analizirani su plinsko-tekućinskom kromatografijom (GLC) NA 6890 N

Network GC System opremljenim s 5973 Network Mass Selective Detector i kapilarnom kolonom (30 m/0.25 mm/0.25 mm; 5% fenil-metil-siloksan), pri čemu je kao plin-nosioc korišten helij visoke čistoće. Vrijeme zadržavanja, površina vrha (*engl.* peak area) i maseni spektar snimljeni su s ChemStation Software. FAME su identificirane usporedbom vremena zadržavanja sa vremenom zadržavanja standarda: FAME mix C18-20, PUFA1, PUFA3 standardi (Supelco, USA), C4-C24 standard mix i obiteljskim dijagramima FA ekvivalentne duljine lanca (ECL). Primjenjivat će se standardi C18-C20 FAME, PUFA1, PUFA3 (Supelco, SAD), C4-C24 FAME smjesa i različiti pojedinačni čisti standardi (Sigma Aldrich, Njemačka) (Slika 10).

2.4.5. Određivanje količine produkata lipidne peroksidacije

Analiza količine produkata lipidne peroksidacije provedena je pomoću protokola Heath i Packer (1968) s određenim modifikacijama (Kumar i sur., 2013; Pal-Nath i sur., 2017). Svakodnevno je prikupljen određeni volumen uzorka. U početnoj fazi rasta, izdvojeno je 25 mL uzorka dok je u eksponencijalnoj i stacionarnoj fazi rasta izdvojeno 15 mL zbog veće biomase. Uzeti alikvoti kultura su ekvivalentni 2-10 mg suhe biomase. Uzorci su podvrgnuti disrupciji dodatkom 0.5 mL 20% w/v TCA i miješanjem. Uz navedenu disrupciju, dodano je još 0.5 mL 1% 2-tiobarbiturne kiseline pripremljene u 20% TCA nakon čega je slijedilo centrifugiranje na 5000 g u trajanju od 5 minuta. Nastala reakcijska smjesa zagrijavana je u vodenoj kupelji na 95°C (20 minuta) nakon čega je reakcija zaustavljena hlađenjem na ledu (10 minuta). Reakcijska smjesa podvrgnuta je centrifugiranju na 10 000g u trajanju od 10 minuta (4°C). Određivanje TBARS (reaktivne tvari tiobarbiturne kiseline), osobito MDA (malondialdehida), provedeno je mjerenjem absorbance na 532 nm, dok je korekcija ne-specifične adsorpcije izvršena mjerenjem na 600 nm. MDA koncentracija se tada računa pomoću Lambert-Beerovog zakona s koeficijentom $\epsilon^M = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Dobiveni rezultati izraženi su kao $\mu\text{mol MDA g}^{-1} \text{ DW}$.

2.4.6. Elementarna C:H:N analiza

Za određivanje kemijskog sastava biomase, svakodnevno je prikupljano 15-30 mL uzorka (ovisno o gustoći stanica) koji je centrifugiran (4200 rpm, 10 min, s.t.). Supernatant je odbačen, a peleti su isprani deioniziranom vodom radi uklanjanja ostataka soli i ponovno centrifugirani. Peleti su zatim

zamrznuti, liofilizirani (Labconco, ZreeZone 2.5) te je naposljetku korišten „CHH 628 elementarni analizator“ (LECO, USA).

Za određivanje ugljika, vodika i dušika, analizirani uzorak u foliji ili kapsuli spaljuje se u oksidirajućoj atmosferi u vertikalnoj peći. Elementarni ugljik, vodik i dušik prevode se u CO₂, H₂O, N₂ i NO_x. Oslobođeni plinovi vode se preko filtera u balastni cilindar gdje se ta mješavina plinova homogenizira. Za svaki određeni element postoji zasebni detektor. Za ugljik infracrveni detektor (IR), za vodik infracrveni detektor (IR) i za dušik detektor toplinske vodljivosti. Detekcija nastalih plinova odvija se tako da uzorak prolazi kroz uređaj za konstantno doziranje u infracrveni detekcijski (IR) sustav. Sadržaj C i H određuje se na principu neposredne IR apsorpcije gdje se mjeri količina CO₂, odnosno H₂O. Smjesa izgorivih plinova nošena helijem odvodi se u katalitičku peć gdje se NO_x prevodi u NO₂, a zatim se u kolonama punjenim odgovarajućim kemikalijama uklanja CO₂ i vlaga. Mješavina helija i dušika dovodi se u detektor toplinske vodljivosti gdje se mjeri količina N₂.

2.5.Procjena toksičnosti

Procjena toksičnosti organskih ekstrakata izvanstaničnih metabolita proizvedenih tijekom rasta u fotobioreaktorima provedena je metodom Microtox® (EPA, 2014, korišten ISO 11348-3 standard), *in vitro* sustavom testiranja koji koristi bioluminiscentne bakterije *Aliivibrio fischeri* za utvrđivanje toksičnosti medija ili toksičnosti nakon eksperimenta u efluentu nakon mehaničkog uklanjanja biomase. Bakterijska luminescencija će se pratiti kao parametar koji pokazuje inhibiciju koja odražava toksični učinak. Navedeni biološki test proveden je pomoću komercijalno dostupne vrste *A. fischeri* korištene za testiranje u luminometru AZUR 500 prema protokolu prilagođenom za morsku vodu (Bihari i sur., 2007). Ukratko, 30 mL uzoraka centrifugirano je na 5000 rpm u trajanju od 10 min. Supernatanti su ekstrahirani s 5 mL DCM, upareni do suha i otopljeni u 50 µL dimetilsulfoksida (DMSO). Rezultati dobiveni programom MicrotoxOmni izraženi su kao EC₅₀ vrijednosti nakon 15 minuta izlaganja s odgovarajućim intervalima pouzdanosti od 95%.

2.6. Statistička obrada podataka

Dobiveni podaci su statistički obrađeni u programima: MS Excel, Rstudio i PRIMER-e 7. Odabrani su glavni faktori u svakom eksperimentu: faza rasta i koncentracija odabranog spoja. Pratio se pojedinačni utjecaj svakog faktora te njihov međusoban odnos i utjecaj na dobivene rezultate. Faza rasta podijelila se na dijela: lag fazu (početno stanje, obično je trajalo od nultog dana do trećeg dana eksperimenta), eksp fazu (eksponecijalno stanje, uobičajeno je trajalo od trećeg do desetog dana eksperimenta) i stac fazu (stacionarno stanje, uobičajeno je trajalo od desetog dana do kraja eksperimenta) te će se u okviru ove disertacije rezultati tako predstavljati.

nMDS (*engl.* non-metric MultiDimensional Scaling) analiza napravljena je u programu PRIMER-e. nMDS prikaz koristio se za vizualizaciju kompleksnih veza između odabranih biomarkera (chl a, car, MDA i unutarstanični C/N omjer) i odabranih MK: udjeli SAT (*engl.* saturated fatty acids, zasićene masne kiseline), MUFA (*engl.* monounsaturated fatty acids, mononezasićene masne kiseline), PUFA (*engl.* polyunsaturated fatty acids, polinezasićene masne kiseline), UND (*engl.* unsaturation indeks, indeks nezasićenja), DETRIT (bakterijske masne kiseline). Nakon izrađenih nMDS prikaza s navedenim varijablama kao vektorima, u programu PRIMER-e, provedena je SIMPER (*engl.* Similarity percentage analysis) analiza. SIMPER analiza koristila se kako bi se bolje razumjelo koje varijable najviše doprinose razlikama između odabranih grupa, odnosno faza rasta i koncentracija odabranog spoja.

Nadalje, grafički prikazi pojedinih biokemijskih parametara, metoda glavnih sastavnica (*engl.* Principal component analysis, PCA) i MANOVA (*engl.* Multivariate analysis of variance) analiza napravljeni su u programu R studio. PCA analiza je jedna od najjednostavnijih i najpopularnijih metoda multivarijantne statistike koja se primjenjuje za redukciju dimenzionalnosti i interpretaciju podataka, gdje glavne komponente, PC1 i PC2 os, objašnjavaju varijabilnost podataka (Orlić i Marinović, 2012). Za svaki eksperiment posebno, primijenjena je MANOVA analiza, uz izradu odgovarajućeg korelograma, kako bi se utvrdile razlike u skupu zavisnih varijabli: klorofil a (chl a), karotenodi (car), proteini (pro), lipidi (lip), malondialdehid (MDA), unutarstanični ugljik (C) i unutarstanični dušik (N).

2.7. Izrada fiziološkog i toksikološkog modela *N. gaditana*

Izrada modela fokusira se na minimalan skup parametara kojima se opisuje prinos biomase i ostale tražene karakteristike (klorofil a, lipidi, nutrijenti). Koncentracije biomase, lipida i klorofila čine varijable modela čije promjene promatramo s obzirom na početne uvjete eksperimenta. Za potrebe istraživanja korišten je model prilagođen iz Packer i sur. (2011), koji opisuje dinamiku navedenih varijabli u obliku koncentracije radi jednostavnosti modeliranja i interpretacije:

$A(t)$ = koncentracija biomase fitoplanktona bez lipida ($gdw\ m^{-3}$)

$L(t)$ = koncentracija lipida ($gdw\ m^{-3}$)

$H(t)$ = koncentracija klorofila *Chla* s obzirom na biomasu fitoplanktona A ($gChla\ gdw^{-1}$)

$N(t)$ = ekstracelularna koncentracija otopljenog anorganskog dušika ($gN\ m^{-3}$)

Biomasa je podijeljena na dva dijela te je ukupna biomasa formirana kao $A+L$. Model jednadžbama opisuje rast algi, uzimanje i asimilaciju dušika, sintezu klorofila i sintezu lipida:

$$\frac{dA(t)}{dt} = \mu(A, L, H, N)A(t) \quad (5)$$

$$\frac{dL(t)}{dt} = [p(A, L, H, N) - c\mu(A, L, H, N)]A(t) \quad (6)$$

$$\frac{dH(t)}{dt} = c\mu(A, L, H, N)\rho v(A, N) - H(t)\mu \quad (7)$$

$$\frac{dN(t)}{dt} = -v(A, N)A(t) \quad (8)$$

pri čemu je:

$$Q(t) = \frac{A(0)Q_0 + N(0) - N(t)}{A(t)} \quad \text{dinamika unutarnje dušične kvote} \quad (9)$$

$$\mu(A, L, H, N) = \min \left\{ \mu_m \left(1 - \frac{q}{Q(t)}, \frac{p(A, L, H, N)}{c} \right) \right\} \quad \text{brzina rasta stanica} \quad (10)$$

$$p(A, L, H, N) = H(t)p_m(A, L, N) \left(1 - \exp\left(-\frac{a\phi I(A, H)}{p_m(A, L, N)}\right) \right) \quad \text{brzina fotosinteze} \quad (11)$$

$$p_m(A, L, N) = \frac{(AQ)^2(t)p_o}{(AQ)^2(t) + q^2 (A(t) + L(t))^2} \quad \text{maksimalna brzina fotosinteze} \quad (12)$$

$$I(A, H) = \frac{I_0}{aH(t)A(t)z} (1 - \exp(-aH(t)A(t)z)) \quad \text{dostupnost svjetla za fotosintezu} \quad (13)$$

$$v(A, N) = \frac{q_M - Q(t)}{q_M - q} \left(\frac{v_m N(t)}{N(t) + v_h} \right) \quad \text{brzina uzimanja nutrijenata} \quad (14)$$

Parametri modela opisani su u tablici 2.

Tablica 2. Opis parametara modela

Parametar	Opis parametra	Jedinica
I_0	Intenzitet svjetla	mol fotona $\text{m}^{-2}\text{d}^{-1}$
z	put svjetla	M
a	optički aktivna površina klorofila	$\text{m}^2 (\text{g chl})^{-1}$
c	minimalna masa ugljika u biomasi	$\text{gC} (\text{g dw})^{-1}$
q_m	minimalna kvota dušika	$\text{gN} (\text{g dw})^{-1}$
q_M	maksimalna kvota dušika	$\text{gN} (\text{g dw})^{-1}$
V_m	maksimalna brzina uzimanja dušika	$\text{gN} (\text{g dw d})^{-1}$
v_h	polusaturacijska konstanta	gN m^{-3}
ρ	maksimalan omjer klorofila i dušika	$\text{g chl g}^{-1} \text{N}$
μ_m	maksimalna brzina rasta	d^{-1}
p_m	maksimalna brzina fotosinteze	$\text{gC} (\text{g chl d})^{-1}$
Φ	kvantna efikasnost fotosinteze	$\text{mol C mol}^{-1} \text{ fotona}$

Klorofil (H) je odabran kao varijabla jer o koncentraciji klorofila ovisi fotosinteza, ali je koncentracija klorofila a ujedno ovisna i o dostupnom dušiku (relacija 7). Stoga je u modelu sinteza klorofila povezana s uzimanjem i asimilacijom dušika. Količina nastalog klorofila kojeg se može sintetizirati po količini dušika je regulirana omjerom iskoristivosti ugljika obzirom na ukupnu količinu reduciranog ugljika, $c\mu/p$ (Tablica 2). Maksimalni omjer klorofila prema dušiku, ρ , određuje udio uzimanja dušika rezerviranog za sintezu klorofila. Koncentracija klorofila, H , povećava se kako se brzina uzimanja dušika iz okoliša povećava, a smanjuje se kada se stanica podijeli uslijed rasta.

Postoje dva aspekta rasta ukupne biomase koja su uključena u model. Prvi se odnosi na rast biomase (A) koja ne uključuje lipide (relacija 5), dok je drugi sinteza lipida (L) (relacija 6).

Rast biomase je ograničen ili dostupnim nutrijentom ili dostupnim svjetlom (relacija 5 i 10). Kod ograničenja rasta uslijed nedostatka nutrijenta koristi se kvotni model rasta: $\mu_m(I-q/Q)$, gdje je μ_M maksimalna teorijske brzina rasta (d^{-1}), q minimalna kvota fitoplanktona, a Q dušična kvota. Rast fitoplanktona vezan za svjetlo uključen je u model pod pretpostavkom da je udio ugljika u biomasi bez lipida, c , konstantan. Maksimalna brzina rasta obzirom na svjetlo je p/c (d^{-1}), budući da p predstavlja sintezu ugljika.

Dušična kvota (Q) (relacija 9), ključna je za funkcioniranje stanice jer utječe na brzinu rasta i koncentraciju klorofila u stanici. Ujedno i stanje dušične kvote utječe na brzinu uzimanja i asimilacije nutrijenata iz okoliša (relacija 14).

Okolišni uvjeti odnose se na intenzitet temperature i svjetla, salinitet i inicijalne koncentracije otopljenog dušika. Budući da su salinitet, temperatura i svjetlo konstante u svim eksperimentima, sukladno tome njihove promjene nisu uključene u model.

Funkcija pogreške korištena u optimizaciji modela definirana je kao:

$$E_{tot}=5 \times \|err_1\|^2+1 \times \|err_A\|^2+2 \times \|err_2\|^2+1 \times \|err_3\|^2+1 \times \|err_4\|^2$$

Definiranje članova:

err_1 = odstupanje modela od mjerenih vrijednosti koncentracije ukupne biomase u vodi

err_A = odstupanje modela od mjerenih vrijednosti koncentracije lipida u vodi

err_2 = odstupanje modela od mjerenih vrijednosti lipida (po ukupnoj biomasi)

err_3 = odstupanje modela od mjerenih vrijednosti klorofila (po ukupnoj biomasi)

err_4 = odstupanje modela od mjerene koncentracije dušika u vodi

Skaliranje je provedeno dijeljenjem svake varijable s maksimalnom izmjerenom vrijednošću u pojedinom setu podataka. Na taj način varijable u loss-funkciji su dovedene u usporediv raspon vrijednosti. Težinski faktori 5 i 2 naglašavaju važnost ukupne biomase i lipidnog sadržaja u optimizaciji.

Optimizacija je provedena metodom Nelder-Mead (fminsearchbnd) u Matlab-u R2024a uz stiff ODE solver (ode23t) koji je korišten za numeričko rješavanje diferencijalnih jednačbi uz simplex metodu pretraživanja prema Lagarias i sur. (1998).

Početne vrijednosti parametara preuzete su iz literaturnih podataka (Packer i sur., 2012), uz prilagodbu maksimalne brzine rasta (μ_m) na 1,26 (umjesto 3,26) radi bolje usklađenosti s PCB-153 eksperimentom.

Korištene su sljedeće početne vrijednosti:

$a(a)=4.8200$;

$\Phi(\Phi)=9.84 \cdot 10^{-12}$;

$q(q)=0.0278$;

$c(c)=0.610$;

$\rho(\rho)=0.283$;

$v_m(v_m)=0.2$;

$v_h(v_h)=9$;

$\mu_m(\mu_m)=1.26$;

$p_m(p_m)=90.1$;

$q_M(q_M)=q \cdot 3$

Granice parametara u optimizaciji (donja LB (*engl.* lower boundary) i gornja UB (*engl.* upper boundary) postavljene su prema vrijednostima iz literature, uz povećane gornje granice za p_0 za 25% zbog ograničenja PCB modela u postizanju brzine produkcije lipida.

Korištene postavke optimizacijskog algoritma:

$\text{TolX} = 1 \times 10^{-4}$ – tolerancija promjene varijabli

$\text{TolFun} = 1 \times 10^{-4}$ – tolerancija promjene funkcije pogreške

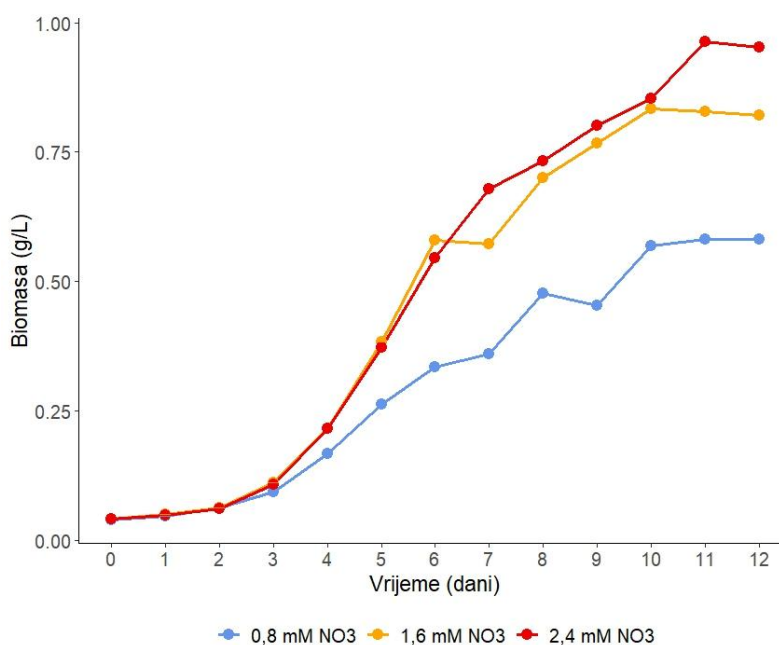
Maksimalan broj iteracija bio je 600.

3. REZULTATI

3.1. Učinak NO_3^-

3.1.1. Rast

Treći dan eksperimenta, unutar cijelog sustava, kultura ulazi u ranu eksponencijalnu fazu rasta (Slika 11). Dinamike rasta prilikom tretiranja višim koncentracijama nitrata, 1,6 mM NO_3^- i 2,4 mM NO_3^- , gotovo se preklapaju između trećeg i šestog dana. Nakon sedmog dana razlike u prinosu biomase postaju izraženije. Eksponencijalna faza rasta trajala je do desetog dana, nakon čega nije zabilježen daljnji prirast biomase, a u nekim je slučajevima zabilježen i blagi pad biomase, osobito pri najvišoj koncentraciji NO_3^- . Najviša koncentracija biomase (1 g/L) ostvarena je u kulturi tretiranom s najvišom koncentracijom nitrata (Slika 11).



Slika 11. Dinamika rasta kulture

S ciljem boljeg uvida u promjene na unutarstaničnoj razini tijekom različitih faza rasta i pod različitim koncentracijama nitrata, analizirani su i biokemijski parametri.

3.1.2. Sastav stanice – biokemijski parametri

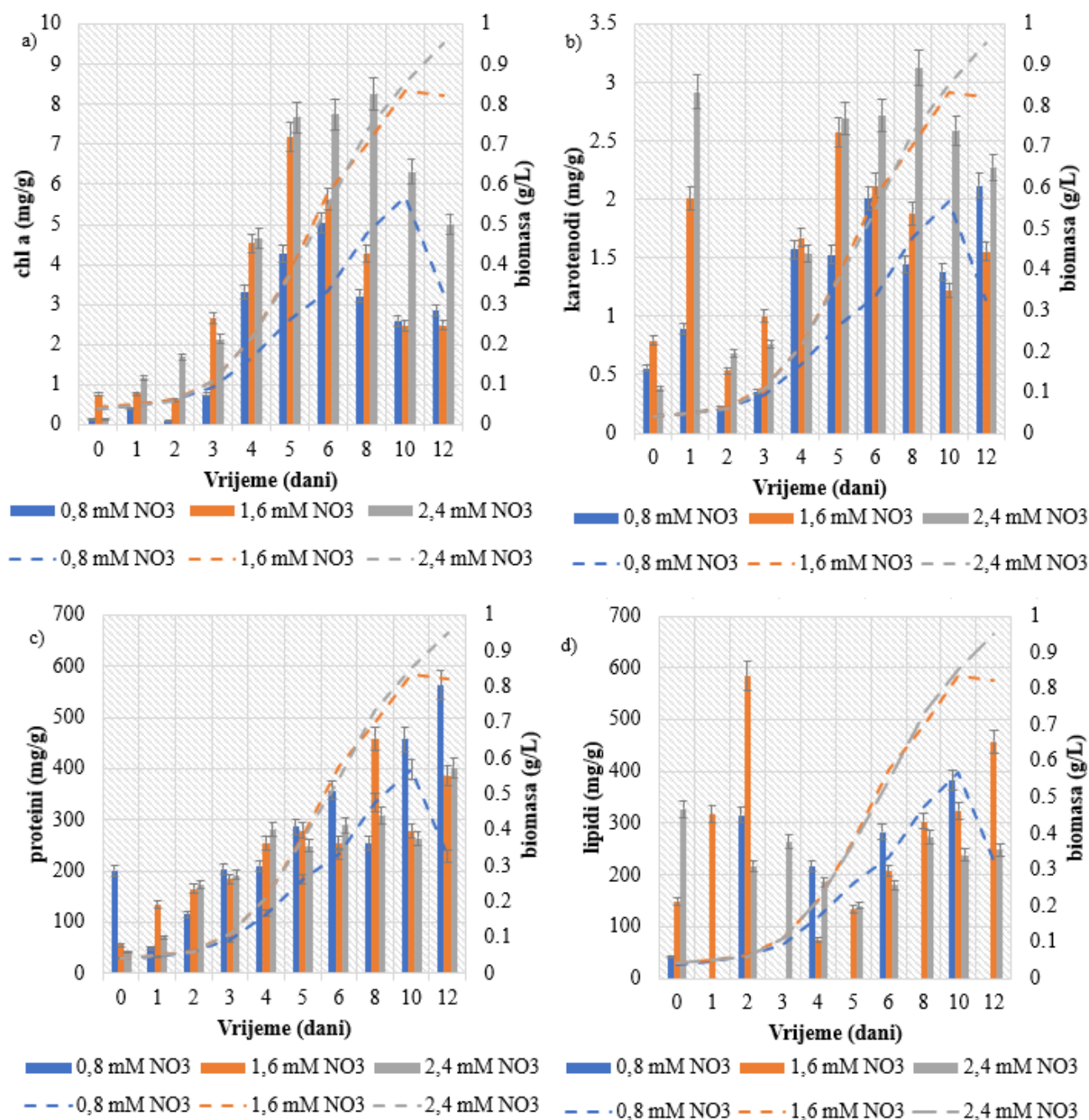
Slika 12 predstavlja prikaze sveukupnih biokemijskih parametara mjerenih u eksperimentu.

U razdoblju eksponencijalne faze rasta, četvrti i peti dan eksperimenta, kod kultura izloženih višim koncentracijama nitrata, utvrđena je minimalna razlika u koncentraciji klorofila a (Slika 12a). Nakon petog dana, dolazi do jasnije razlike u koncentraciji klorofila a te je najviša koncentracija klorofila a (8,26 mg/g) izmjerena osmi dan kod kulture izložene 2,4 mM NO_3^- (Slika 12a). Primijećen je trend rasta koncentracije klorofila a u kulturi izloženoj najvišoj koncentraciji NO_3^- nakon kasne eksponencijalne faze, dok je u kulturama tretiranim s 0,8 mM NO_3^- i 1,6 mM NO_3^- uočen pad koncentracije klorofila a. S druge strane, u kontrolnim uvjetima, najviša koncentracija klorofila a (5,04 mg/g) izmjerena je šesti dan eksperimenta.

Prilikom ulaska kulture u eksponencijalnu fazu rasta, primijećene su minimalne razlike u koncentraciji karotenoida u svim kulturama (1,58 mg/g, 1,67 mg/g i 1,54 mg/g) (Slika 12b). U razdoblju od petog dana do kraja eksperimenta, jasnije su razlike u koncentraciji karotenoida. Koncentracija karotenoida bila je najniža u kontrolnim uvjetima, s najnižom vrijednosti (0,21 mg/g) izmjenom drugi dan i najvišom vrijednosti (2,12 mg/g) izmjenom zadnji dan. Kultura izložena 1,6 mM NO_3^- dosegla je veću koncentraciju karotenoida u odnosu na kontrolne uvjete te je najviša koncentracija (2,58 mg/g) karotenoida izmjerena peti dan u navedenim uvjetima. Prilikom ulaska kulture u stacionarnu fazu rasta, primijećen je pad koncentracije karotenoida u kulturi izloženoj 1,6 mM NO_3^- . S druge strane, u kulturi izloženoj najvišoj koncentraciji nitrata, primijećen je rast u koncentraciji karotenoida i na kraju eksperimenta (Slika 12b). Najviša koncentracija karotenoida (2,72 mg/g) izmjerena je u kulturi s najvišom koncentracijom nitrata.

Prilikom određivanja ukupnih proteina u uzorcima, utvrđen je rastući trend u svim kulturama do petog dana (Slika 12c). Izraženije razlike u koncentraciji proteina između kultura uzgajanih na različitim koncentracijama NO_3^- , primijećene su u prijelazu između eksponencijalne u stacionarnu fazu. U kontrolnim uvjetima koncentracija proteina raste te je deseti dan izmjerena najviša koncentracija proteina (457,2 mg/g). Osmi dan eksperimenta, izmjereno je 459,6 mg/g proteina u kulturi izloženoj 1,6 mM NO_3^- . Kultura je dosegla 401,78 mg/g proteina u najvišoj koncentraciji NO_3^- (Slika 12c).

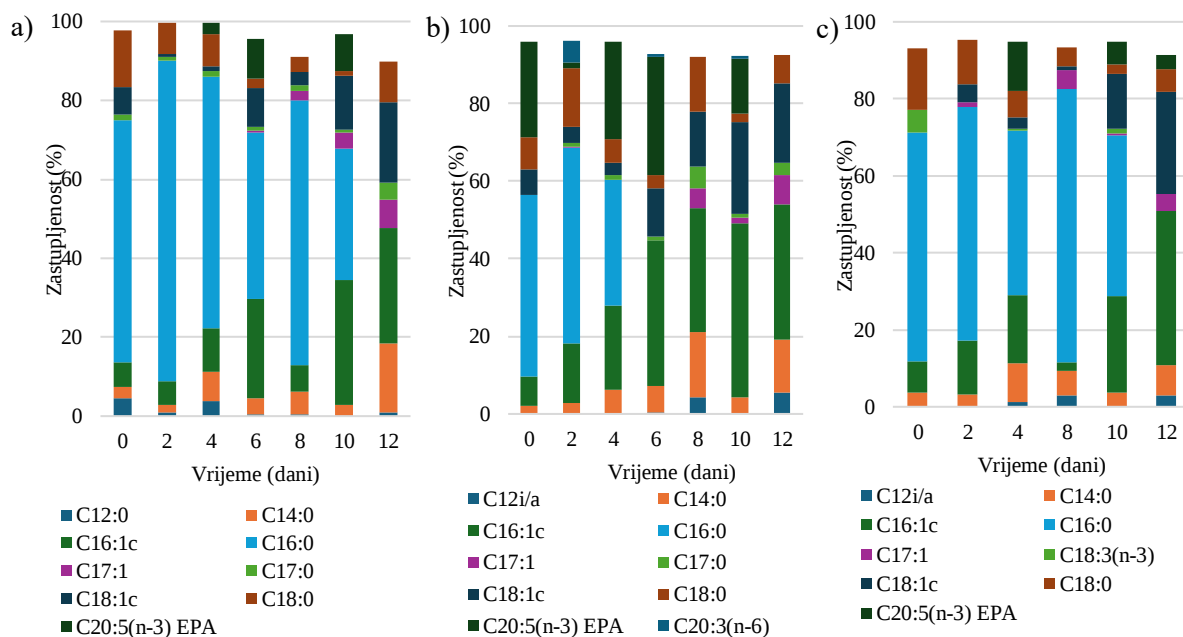
Gravimetrijsko određivanje ukupnih lipida pokazalo je da su najviše koncentracije lipida zabilježene u kulturi tretiranoj s 1,6 mM NO_3^- te je zadnji dan eksperimenta, u stacionarnoj fazi rasta, utvrđeno je 457 mg/g lipida (Slika 12d). U razdoblju eksponencijalne faze rasta, primijećen je manji udio lipida u odnosu na kasnu eksponencijalnu i stacionarnu fazu.



Slika 12. Koncentracije odabranih biokemijskih parametara: a) klorofil a; b) karotenoidi; c) proteini; d) lipidi. Ukupna biomasa za svaki tretman označena je crtkanom linijom

Osim određivanja ukupnih količina lipida, analiziran je i profil masnih kiselina (FAME) s naglaskom na zastupljenost određenih bioindikatorskih masnih kiselina kako bi se detaljnije procijenila kvaliteta lipida, dok je razina oksidativnog stresa procijenjena mjerenjem koncentracije MDA. Za predstavljanje FAME profila, izabrane su MK s najvišom zastupljenošću (veća od 10%).

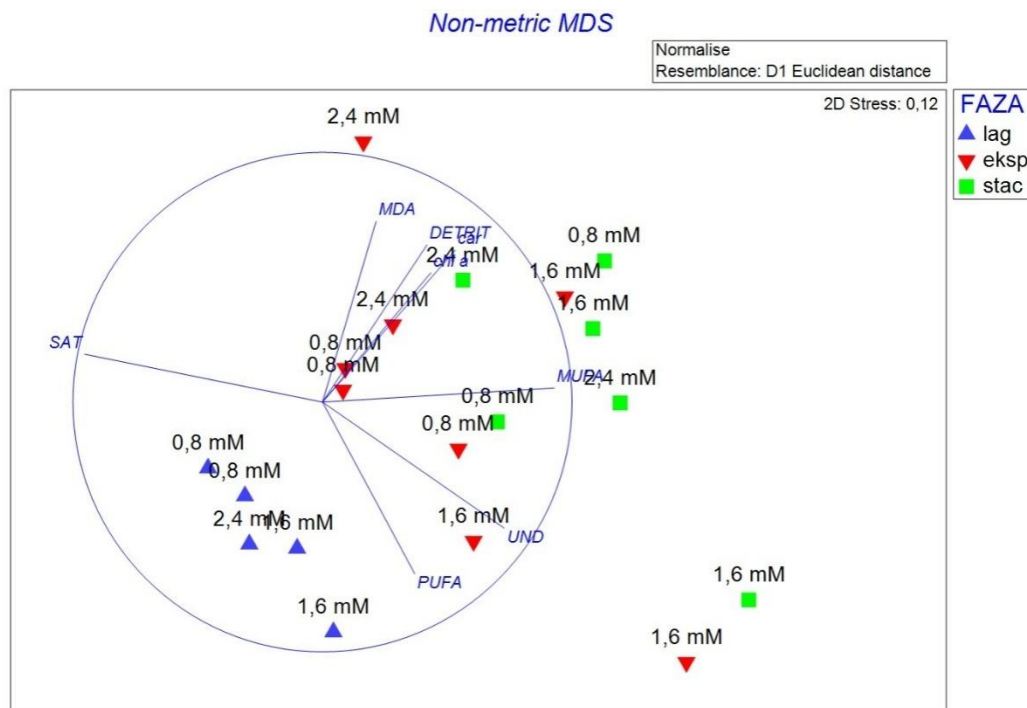
FAME profil pokazao je prevlast zasićene MK, C16:0 (palmitinska kiselina, pripada grupi SAT) u svim testiranim uvjetima u razdoblju između lag i stacionarne faze rasta (Slika 15). Također je prisutna i C16:1c (palmitoleinska kiselina, pripada grupi MUFA) MK u svim testiranim uvjetima s najvišom zastupljenosti u eksponencijalnoj fazi rasta u kulturi tretiranoj s 1,6 mM NO₃⁻ (44,8 %) (Slika 13b) i stacionarnoj fazi rasta kod kulture tretiranoj s 2,4 mM NO₃⁻ (40%) (Slika 13c). Prisutnost MK C18:1c (oleinska kiselina, pripada skupini MUFA) i C18:0 (stearinska kiselina, pripada skupini SAT) primijećena je također u svim testiranim uvjetima sa zastupljenošću od <27%, odnosno <16%. C20:5(n-3) (EPA, eikosapentaenoinska kiselina, pripada skupini PUFA) najzastupljenija je u kulturi tretiranoj s 1,6 mM NO₃⁻.



Slika 13. Promjene u profilu masnih kiselina u kulturi tretiranoj s : a) 0,8 mM NO₃⁻ b) 1,6 mM NO₃⁻ c) 2,4 mM NO₃⁻

Budući da je razina MDA pokazatelj oksidativnog stresa, izmjerene su koncentracije MDA te su se vrijednosti kretale između 0,057-0,240 $\mu\text{mol/g}$ u kontrolnim uvjetima, odnosno između 0,0003-0,14 $\mu\text{mol/g}$ kod kulture izložene koncentracijom od 1,6 mM NO_3^- i 0,025-0,300 $\mu\text{mol/g}$ kod kulture uzgajane na najvećoj koncentraciji nitrata. Najviša koncentracija MDA (0,3 $\mu\text{mol/g}$) izmjerena je četvrti dan u kulturi izloženom najvišom koncentracijom nitrata. Ostale vrijednosti MDA prikazane su u Dodatku.

Za dodatno utvrđivanje odnosa između koncentracija nitrata, MK (u ovom slučaju ukupnih udjela SAT, MUFA, PUFA, UND i DETRIT, izračunatih u FAME profilu) i odabranih biomarkera staničnog stanja (chl a, car i MDA), izrađen je nMDS prikaz (Slika 14). Analiza je temeljena na normaliziranim podacima i D1 Euklidskoj udaljenosti sa stres vrijednosti 0,12 što ukazuje na dobru reprezentaciju podataka u 2D prostoru. Dobiveni nMDS prikaz ukazao je na grupiranje uzoraka iz lag faze između vektora PUFA i SAT, dok su uzorci iz eksp faze grupirani oko vektora MDA, DETRIT i chl a. Uzorci iz stac faze su raspršeni u nMDS prikazu sa slabim grupacijama oko vektora car, MUFA i UND.



Slika 14. nMDS prikaz odnosa između uzoraka u različitim fazama rasta na temelju odabranih biokemijskih varijabli

Kako bi se bolje razumjelo koje točno varijable doprinose razlikama između grupa uzoraka, provedena je SIMPER analiza te su svi rezultati analize prikazani u Dodatku. Temeljeno na rezultatima SIMPER analize koristeći oba faktora posebno, kao glavni čimbenik izabran je faktor koncentracija. SIMPER analiza temeljena na faktoru koncentracija, pokazala je da je 0,8 mM NO₃⁻ (ASD=5,02) umjereno homogena grupa dok su grupe 1,6 mM NO₃⁻ (ASD=8,99) i 2,4 mM NO₃⁻ (ASD=8,29) najmanje homogene s izraženijom varijacijom. Kod grupa 0,8 mM NO₃⁻ i 1,6 mM NO₃⁻ najveće razlike su između vektora PUFA (18%) koje su više kod 1,6 mM NO₃⁻, kao i kod vektora UND (17,21%), SAT (14,27%) i DETRIT (13,84%). Razlici između grupa 0,8 mM NO₃⁻ i 2,4 mM NO₃⁻ doprinijeli su vektori chl a (22,84%) i car (22,22%), dok su vektori MDA (16,36%), UND (14%) i chl a (13,41%) doprinijeli razlici između grupa 1,6 mM NO₃⁻ i 2,4 mM NO₃⁻.

Uz nMDS i SIMPER analizu, za dodatnu potvrdu utjecaja faktora koncentracije i faze rasta, provedena je i statistička analiza pomoću MANOVA i ANOVA testova. MANOVA analiza provedena je s obzirom na početne uvjete eksperimenta, uzimajući u obzir početne koncentracije nitrata i faze rasta mikroalge *N. gaditana* kao glavne i jedine faktore koji su potencijalno utjecali na promatrane zavisne varijable (pigmenti, proteini, lipidi i MDA) (Tablica 3).

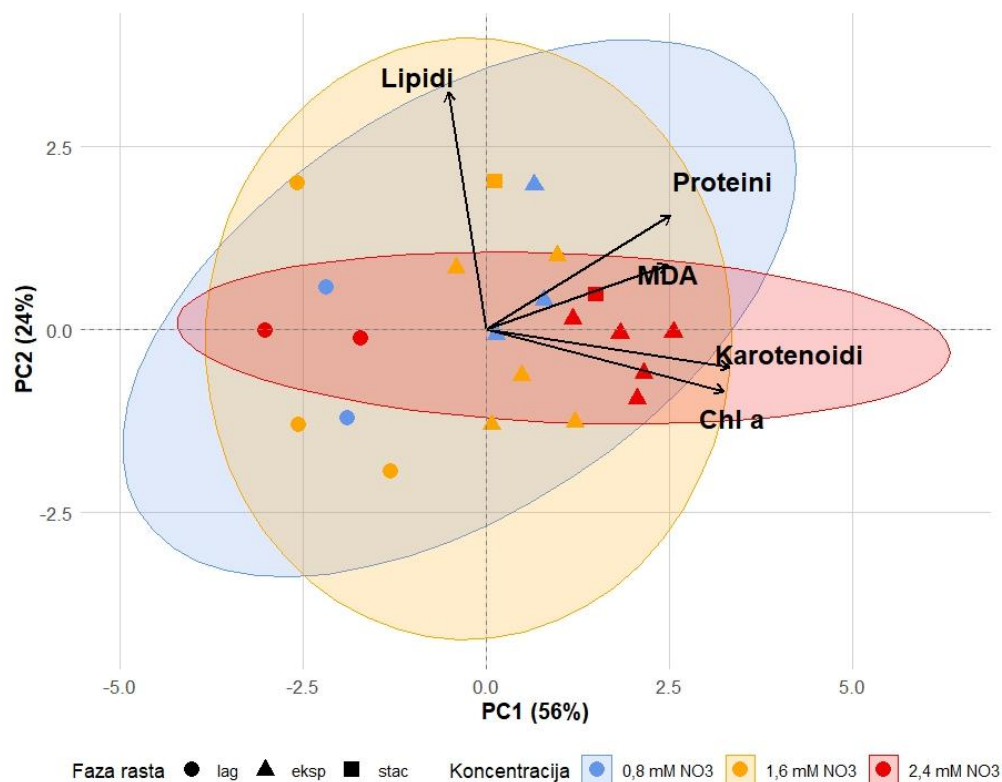
Tablica 3. MANOVA rezultati, u model uključene vrijednosti: klorofil a, karotenoida, proteina, lipida i MDA

	Df	Pillai	Approx F	Num Df	Den Df	Pr(>F)
Koncentracija	2	1,2914	4,0094	10	22	0,00316**
Faza	2	1,4053	5,1982	10	22	0,000618***
Faza:	3	1,0022	1,2040	15	36	0,3128308
Koncentracija						
Residuals	14					
Signif. Codes	0 '***'	0,001 '***'	0,01 '*'	0,05 '.'	0,1 ' '	1

S obzirom na početne uvjete eksperimenta, provedena MANOVA analiza utvrdila je da faza (p=0,00618***) i koncentracija (p= 0,00316**) imaju statistički značajan utjecaj na barem jednu od zavisnih varijabli (Tablica 3). S druge strane, interakcija između faza: koncentracija nije značajna (p=0,3128308).

Kako bi se detaljnije ispitao doprinos pojedinog faktora na svaku varijablu, provedena je dodatna analiza, univarijatna ANOVA da bi se utvrdilo postoji li statistički značajan utjecaj odabranih faktora i njihova međusobna interakcija na promatrane varijable. ANOVA je utvrdila da koncentracija nitrata utječe na biokemijske parametre konzistentno kroz sve faze rasta te da faze rasta utječu konzistentno na sve parametre pri svim koncentracijama, odnosno nema sinergističkog utjecaja što znači da učinak jednog faktora ne ovisi o prisutnosti drugog. Utvrđeno je da nema interakcije između faktora kod varijable proteini. Kod varijable lipidi utvrđena je blaga interakcija između faktora što je prikazano prelamanjem linija u eksponencijalnoj fazi rasta. Jedina značajna interakcija između faktora utvrđena je kod varijable MDA ($p=0,039^*$), pokazujući da koncentracija nitrata različito utječe na promatranu kulturu ovisno o fazi rasta. Interakcija faktora kod fotosintetskih pigmenata bila je minimalna. Detaljniji rezultati ANOVA analize nalaze se u Dodatku.

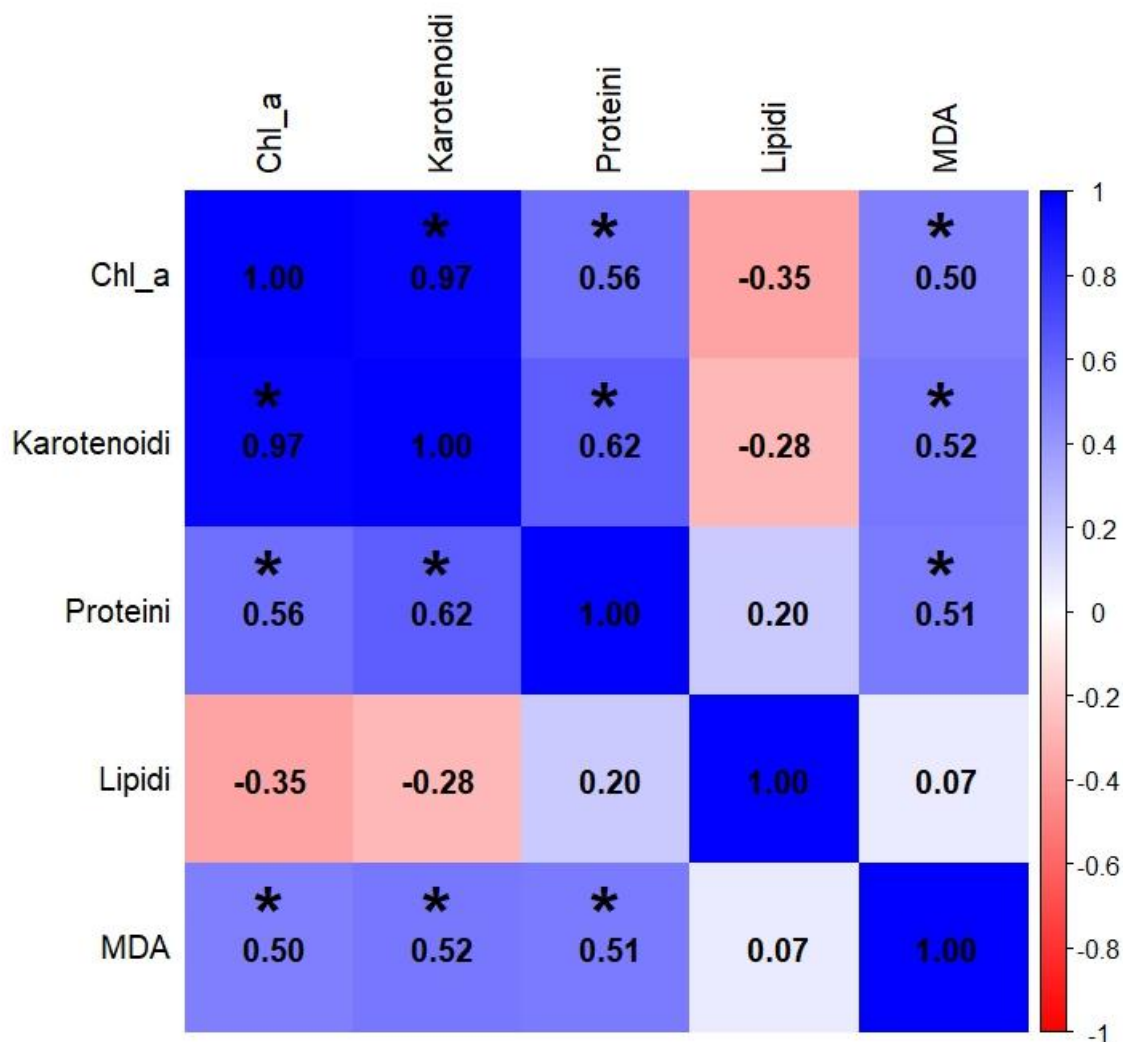
Budući da su potvrđene razlike između promatranih faktora i zavisnih varijabli, izrađena je i PCA analiza koja je uključivala varijable prikazane kao vektore: lipidi, proteini, MDA, karotenoidi i klorofil a (Slika 15).



Slika 15. PCA analiza izrađena prema dva odabrana faktora, fazi rasta i koncentracije

PC1 os objašnjava 56% varijacije u podacima, dok PC2 os objašnjava 24% varijacije u podacima. PCA analiza ukupno objašnjava 80% varijacije u rezultatima što je izvrsna reprezentacija. Elipse predstavljaju koncentraciju nitrata, dok su faze obilježene oblicima. Vektor za varijablu lipidi usmjeren je prema gornjem lijevom dijelu te je ujedno najduži vektor. Proteini su usmjerene prema gornjem desnom dijelu PCA prikaza. MDA, i fotosintetski pigmenti su također usmjereni u desnu stranu prikaza. Elipse su vrlo jasno razdvojene i pokazuju da različite koncentracije nitrata uzrokuju različite metaboličke profile. Vektori fotosintetskih pigmenata su orijentirani u istom smjeru ukazujući na snažnu pozitivnu korelaciju. MDA vektor je kraći što označava manju varijabilnost u podacima. Lipidi imaju najveću varijabilnost te je vektor usmjeren prema niskim koncentracijama nitrata.

Za dodatno potvrđivanje međusobnih odnosa između promatranih varijabli te za potvrdu nalaza provedenih analiza, izrađen je korelogram po Spearmanu s prikazanim korelacijskim odnosima (Slika 16).



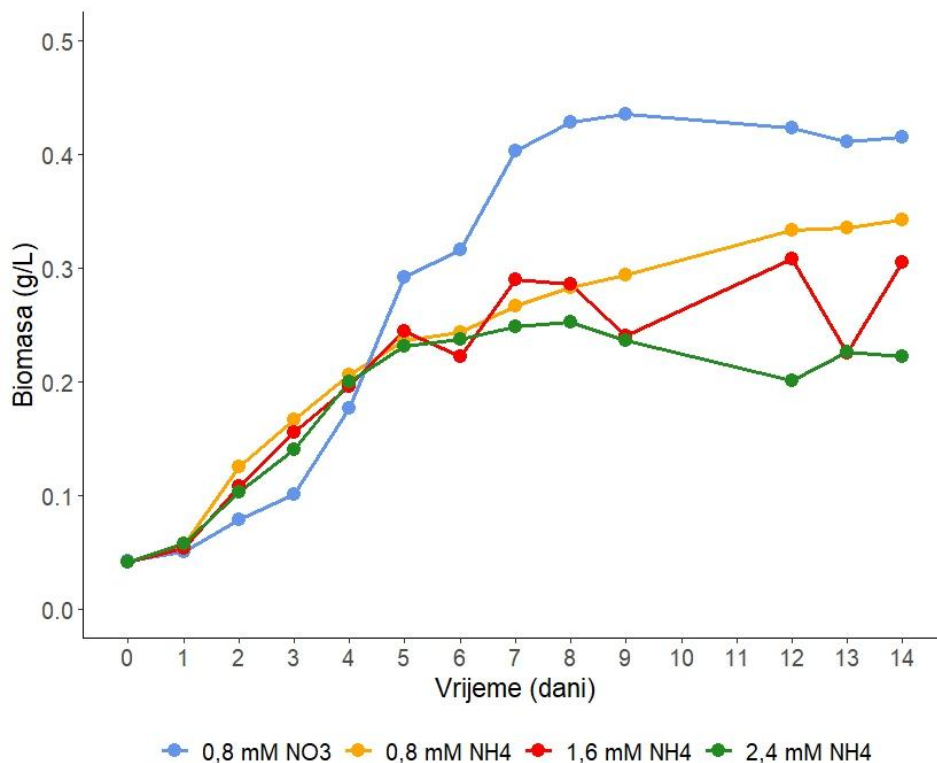
Slika 16. Spearman korelacija promatranih zavisnih varijabla: chl a, karotenoidi, proteini, lipidi i MDA. Simbol * prikazuje statistički značajne korelacije ($p < 0,05$) te su izračunate p vrijednosti prikazane u Dodatku

U korelogramu je najveća pozitivna korelacija utvrđena između fotosintetskih pigmenata ($r=0,97$) (Slika 16). Također su zabilježene umjerene pozitivne korelacije između MDA i klorofila a ($r=0,50$) te karotenoida i proteina ($r=0,62$). S druge strane, lipidi su negativno korelirani s fotosintetskim pigmentima ($r=-0,35$; $r=-0,28$).

3.2. Učinak NH_4^+

3.2.1. Rast

Najveća akumulacija biomase (0,44 g/L) zabilježena je deveti dan u referentnim uvjetima (Slika 17). U početnoj fazi eksperimenta, tijekom ulaska vrste u rano eksponencijalnu fazu, nije bilo značajnih razlika u prinosu biomase *N. gaditana* izložene amonijem. Nakon petog dana eksperimenta, dolazi do razdvajanja u dinamici rasta. Kultura tretirana najnižom koncentracijom amonija ostvarila je ukupnu akumuliranu biomasu od 0,34 g/L. Nasuprot tome, kod kulture izložene najvišom koncentracijom amonija (2,4 mM NH_4^+) zabilježen je pad biomase deveti dan (0,24 g/L), a finalna biomasa na kraju eksperimenta iznosio je 0,22 g/L.



Slika 17. Dinamika rasta kulture

S ciljem boljeg uvida u promjene na unutarstaničnoj razini tijekom različitih faza rasta i pod različitim koncentracijama amonija, analizirani su i biokemijski parametri.

3.2.2. Sastav stanice – biokemijski parametri

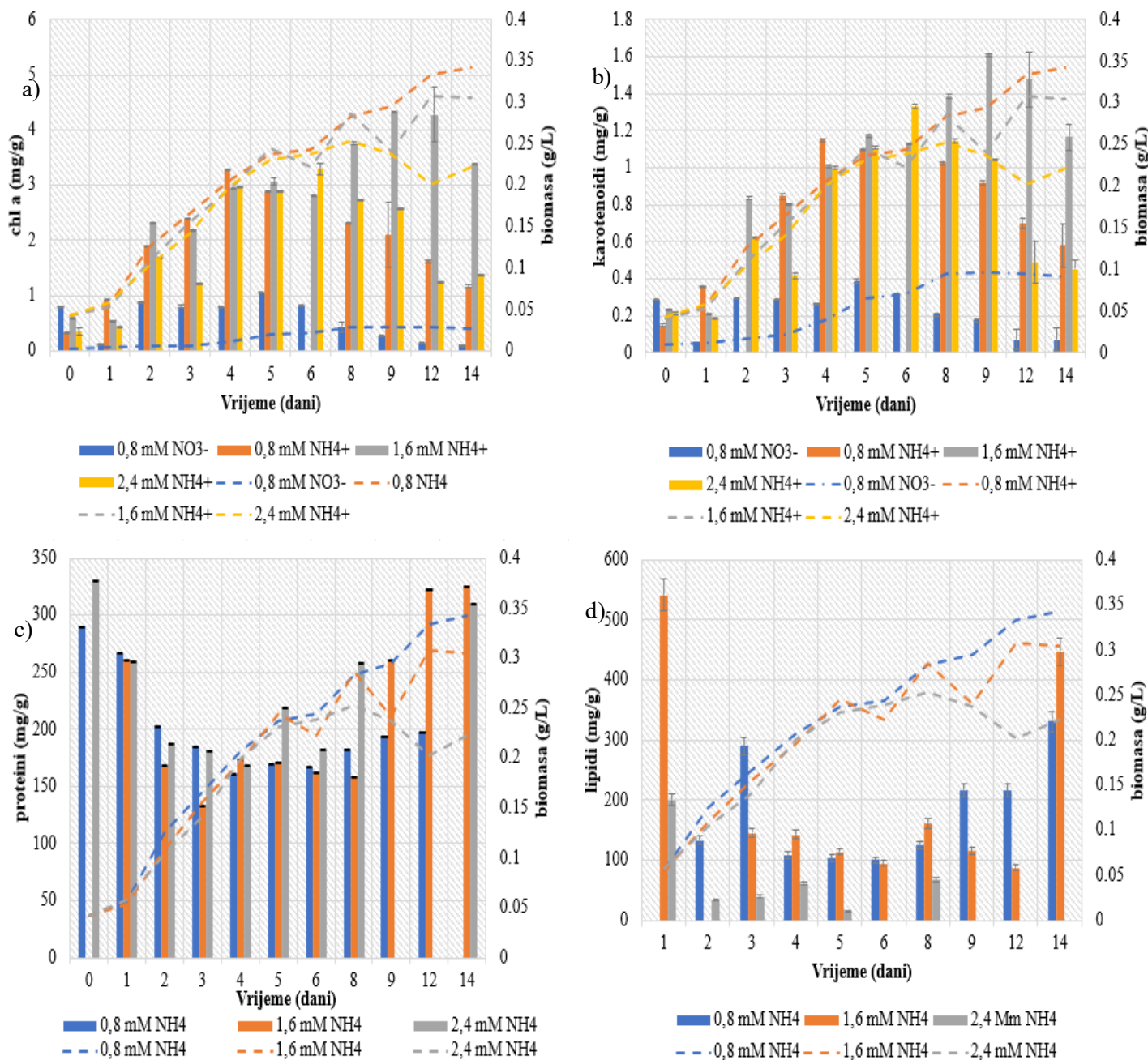
Slika 18 predstavlja prikaze sveukupnih biokemijskih parametara mjerenih u eksperimentu sa prikazanim standardnim devijacijama mjerenja.

U kontrolnim uvjetima, koncentracija klorofila a bila je niža od kultura tretiranih s amonijem. Koncentracije klorofila a i karotenoida prate krivulju rasta, odnosno niže koncentracije su u lag i stacionarnoj fazi rasta s višim koncentracijama u eksponencijalnoj fazi rasta (Slika 18a;b). Iznimka je u koncentraciji klorofila a u kulturi tretiranoj s 1,6 mM NH_4^+ gdje su najviše koncentracije klorofila a izmjerene između osmog i 14. dana eksperimenta (2,3-1,7 mg/g).

Isti trend porasta koncentracije amonija između osmog i 14. dana eksperimenta kod kulture izložene s 1,6 mM NH_4 , uočen je i pri određivanju koncentracije karotenoida. Izmjerene su najviše vrijednosti u rasponu od 1-0,58 mg/g. Uzorci tretirani s 0,8 mM NH_4^+ i 2,4 mM NH_4^+ pokazuju slične vrijednosti u koncentraciji pigmenata.

Tijekom lag i rane eksponencijalne faze, koncentracija proteina bila je slična pri svim koncentracijama amonija, dok u kasnoj eksponencijalnoj fazi i stacionarnoj fazi dolazi do povećanja koncentracije proteina u reaktorima s većom koncentracijom amonija, posebice u kulturi tretiranoj s 1,6 mM NH_4^+ (Slika 18c). U reaktoru s najnižom koncentracijom amonija, utvrđene su slične koncentracije (182,9 – 194,7 mg/g). Na kraju eksperimenta, između devetog i 12. dan eksperimenta, u kulturi tretiranoj s 1,6 mM utvrđen je porast koncentracije proteina (322,9 mg/g). U kasnijim fazama eksperimenta nije došlo do veće promjene te vrijednosti koncentracije proteina. Zabilježeno je 325.8 mg/g i 309 mg/g proteina zadnji dan eksperimenta u kulturam tretiranim s 1,6 mM NH_4^+ i 2,4 mM NH_4^+ .

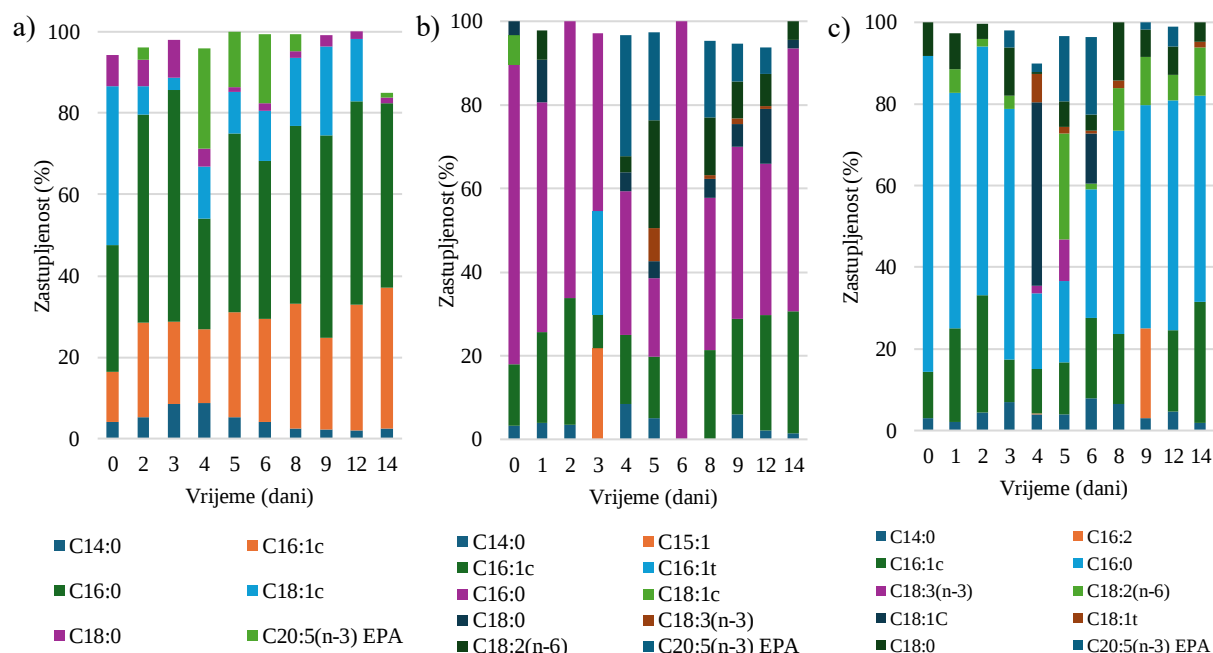
U uzorcima tretiranim s 0,8 mM NH_4^+ , najviša koncentracija lipida izmjerena je treći dan (289,6 mg/g), nakon čega se smanjuje koncentracija i opet raste pri kraju eksperimenta s konačnom koncentracijom od 330,7 mg/g (Slika 18d). Nulti dan eksperimenta, koncentracija lipida bila je najviša u kulturi tretiranoj s 1,6 mM NH_4^+ , no kasnije se vrijednost lipida značajno smanjila te nije prelazila više od 150 mg/g s iznimkom zadnje dana eksperimenta (Slika 18d). Također je nulti dan eksperimenta izmjerena najviša koncentracija lipida (300 mg/g) u uzorcima tretiranim s najvišom koncentracijom amonija.



Slika 18. Koncentracije odabranih biokemijskih parametara: a) klorofil a; b) karotenoidi; c) proteini; d) lipidi. Ukupna biomasa za svaki tretman označena je crtkanom linijom

Osim gravimetrijskog određivanja ukupnih količina lipida, analiziran je i profil masnih kiselina (FAME) s naglaskom na zastupljenost određenih tipova masnih kiselina, kako bi se detaljnije procijenila kvaliteta lipida, dok je razina oksidativnog stresa procijenjena mjerenjem koncentracije MDA. Za predstavljanje FAME profila, izabrane su MK s najvišom zastupljenošću.

Prilikom izrade FAME profila, uočena je najviša zastupljenost C16:0 u svim tretmanima, s prevlašću većom od 20% u svim uzorcima. Uz 16:0 (pripada grupi SAT), primijećena je zastupljenost C16:1 (pripada grupi MUFA) u svim fazama rasta i u svim tretmanima (Slika 19). Međutim, također je primijećena zastupljenost C18:1 u tretmanima s 0,8 i 1,6 mM NH_4^+ . Najviša zastupljenost C18:1c (pripada skupini SAT) utvrđena je nulti dan eksperimenta prilikom tretiranja kulture s 0,8 mM NH_4^+ (39%) i četvrti dan u kulturi tretiranoj s 2,4 mM NH_4^+ (45%). C18:0 (pripada grupi SAT) prisutne su u svim tretmanima, odnosno <10% u kulturi tretiranoj s 0,8 mM NH_4^+ i <15% u kulturama tretiranim s 1,6 i 2,4 mM NH_4^+ .

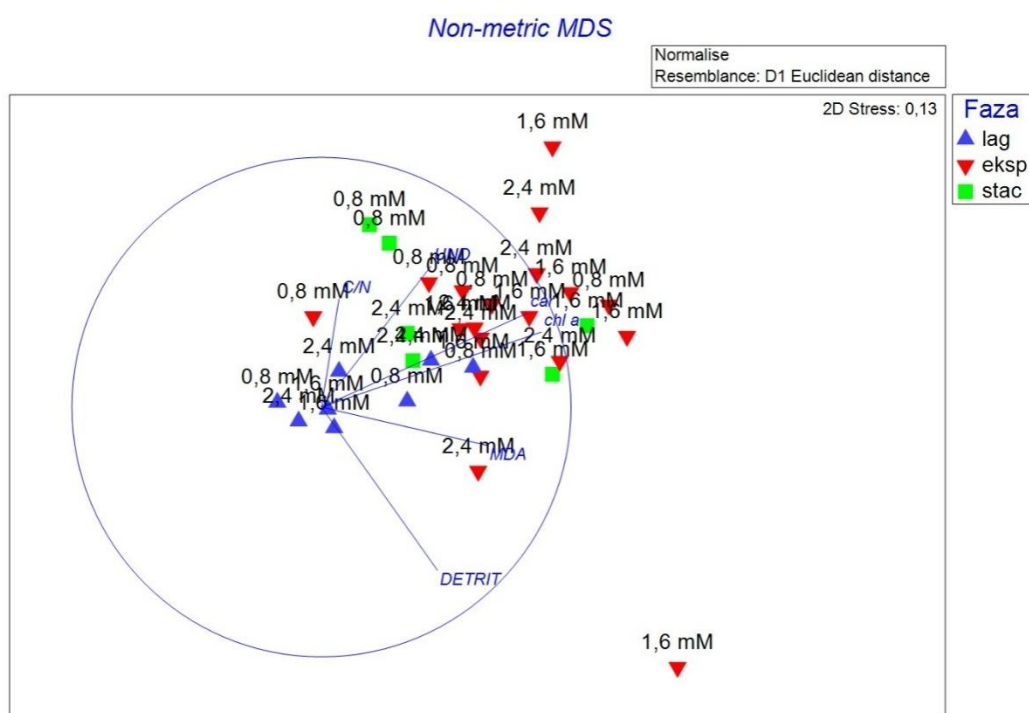


Slika 19 . Promjene u profilu masnih kiselina u kulturi tretiranoj s : a) 0,8 mM NH_4^+ b) 1,6 mM NH_4^+ c) 2,4 mM NH_4^+

U kulturi tretiranoj najnižom koncentracijom amonija, vrijednosti MDA su se kretale između 0,06 $\mu\text{mol/g}$ do 0,54 $\mu\text{mol/g}$. Najviša koncentracija MDA (0,594 $\mu\text{mol/g}$) izmjerena je treći dan

eksperimenta u kulturi tretiranoj najvećom koncentracijom NH_4^+ . Ostale vrijednosti MDA prikazane su u Dodatku.

Kako bi se bolje razumjela povezanost između sastava masnih kiselina (u ovom slučaju UND i DETRIT), odabranih biomarkera staničnog stanja (chl a, car, C/N i MDA) i faza rasta *N. gaditana*, provedena je nMDS analiza (Slika 20). Uzorci iz eksp faze rasta najviše su grupirani oko UND, car i chl a vektora, dok su uzorci iz stacionarne faze također prisutni oko istih vektora, no nalaze se i oko C/N vektora. Oko MDA vektora nalazi se uzorak iz eksp faze tretiran s najvišom koncentracijom amonija.



Slika 20. nMDS prikaz odnosa između uzoraka u različitim fazama rasta na temelju odabranih biokemijskih varijabli

Kako bi se bolje razumjelo koje varijable doprinose razlikama između grupa uzoraka, provedena je SIMPER analiza te su svi rezultati analize prikazani u Dodatku. Kao glavni čimbenik, temeljen na rezultatima SIMPER analize za oba faktora posebno, izabran je faktor „koncentracija“.

Unutargrupna varijabilnost je najveća u grupi 1,6 mM NH_4^+ (ASD=7,91), dok su u grupama 0,8 mM NH_4^+ (ASD=5,02) i 2,4 Mm NH_4^+ (ASD=4,48) najmanje varijabilnosti, odnosno najveća sličnost uzoraka unutar grupe. Međugrupna razlika bila je najveća između grupa 0,8 i 1,6 mM

NH_4^+ (ASD=14,4) s vektorima DETRIT (20,6%) i C/N (20,4%) koji su najviše doprinijeli navedenoj razlici. Najmanja razlika zabilježena je između grupa 0,8 i 2,4 mM NH_4^+ (ASD=9,41) s glavnim doprinosom vektora C/N (30,1%) i MDA (21,6%). Između grupa 1,6 i 2,4 mM također je zabilježena veća razlika (ASD=12,55), pri čemu su vektori DETRIT (22,9%), chl a (18,5%) i car (16,3%) identificirani kao glavni faktori koji su doprinijeli toj razlici.

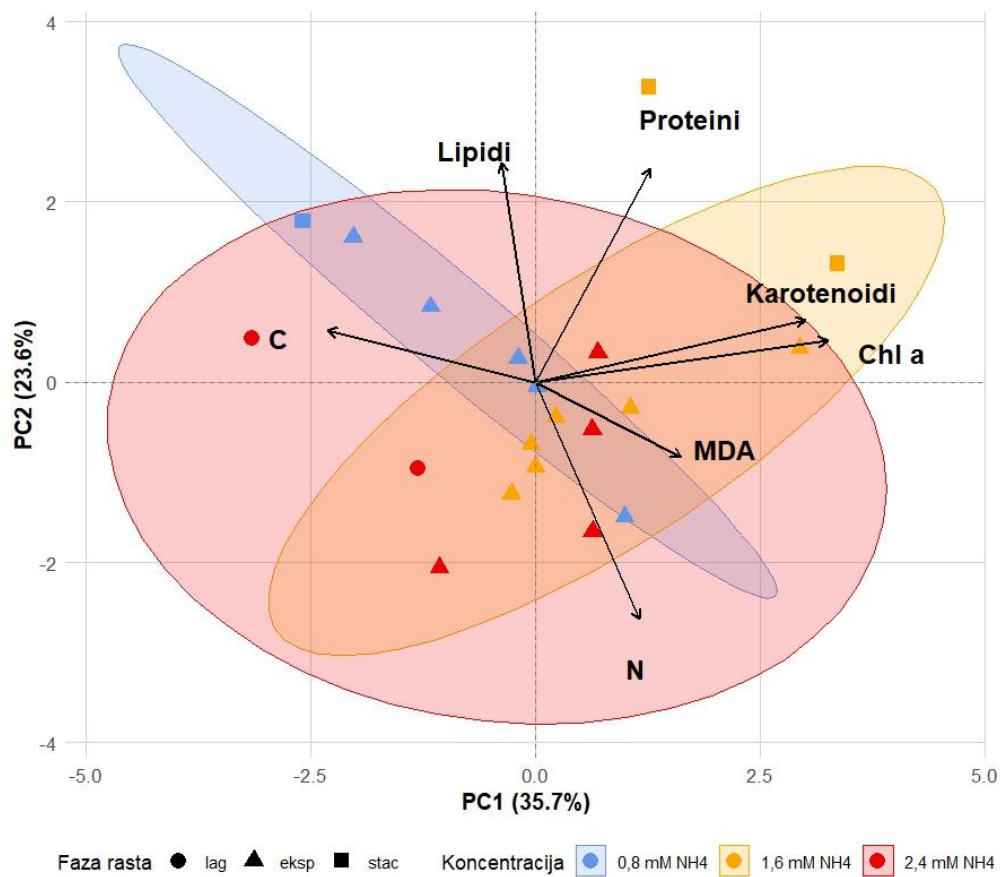
Uz nMDS i SIMPER analizu, za dodatnu potvrdu utjecaja eksperimentalnih faktora i faze rasta, provedena je i statistička analiza pomoću MANOVA i ANOVA testova. MANOVA analiza provedena je s obzirom na početne uvjete eksperimenta, uzimajući u obzir koncentracije amonijaa i faze rasta mikroalge *N. gaditana* kao glavne faktore koji su potencijalno utjecali na promatrane zavisne varijable (pigmenti, proteini, lipidi, MDA, C i N) (Tablica 4).

Tablica 4. MANOVA rezultati, u model uključene vrijednosti: klorofil a, karotenoida, proteina, lipida, MDA, C i N.

	Df	Pillai	Approx F	Num Df	Den Df	Pr(>F)
Koncentracija	2	1.31765	2.4828	14	18	0.03584*
Faza	2	1.36806	2.7834	14	18	0.02165*
Faza:Koncentracija	1	0.60348	1.7394	7	8	0.2272389
Residuals	14					
Signif. codes	0 ‘***’	0.001 ‘**’	0.01 ‘*’	0.05 ‘.’	0.1 ‘ ’	1

MANOVA analiza utvrdila je statistički značajan utjecaj faktora koncentracija ($p=0,03584^*$) i faza ($p=0,02165^*$) na odabrane zavisne varijable. Univarijatna ANOVA provedena je da bi se dodatno utvrdio utjecaj faktora na promatrane zavisne varijable. Na varijable klorofil a i karotenoidi, statistički značajan utjecaj imao je faktor koncentracija ($p=0,008814^{**}$; $p=0,01523^*$). S druge strane, faktor faza imao je statistički značajan utjecaj na varijablu proteini ($p=0,002305^{**}$) i N ($p=0,04060^*$). Interakcija između faktora bila je statistički značajna za varijablu proteini ($p=0,018905^*$). Ostale vrijednosti ANOVA analize nalaze se u Dodatku.

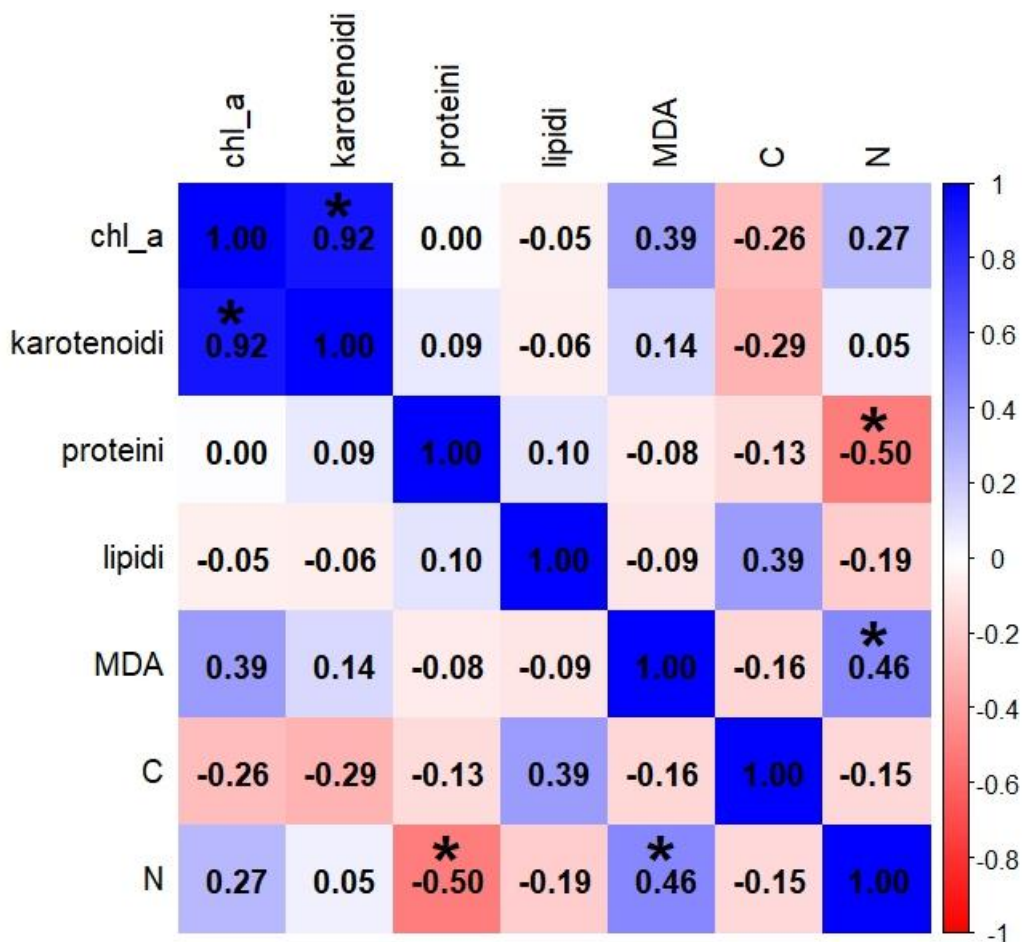
Budući da su potvrđene razlike između promatranih faktora i zavisnih varijabli i prikazani korelacijski odnosi, izrađena je i PCA analiza koja je uključivala varijable prikazane kao vektore: klorofil a, karotenoidi, proteini, lipidi, MDA, C i N (Slika 21).



Slika 21. PCA analiza izrađena prema dva odabrana faktora, fazi rasta i koncentracije

Os PC1 objašnjava 35,7% varijance u podacima, dok os PC2 objašnjava 23,6% varijance u podacima. Vektori za proteine i fotosintetske pigmente usmjereni su prema gornjem desnom dijelu PCA prikaza. Na gornjoj lijevoj strani prikaza nalaze se vektori za C i lipide. U donjem desnom dijelu prikaza nalaze se vektori za MDA i N (Slika 21). Sve koncentracije označene su elipsom, dok su faze rasta označene različitim oblicima. Uzorci s najnižom koncentracijom amonija smješteni su unutar odgovarajuće elipse. Fotosintetski pigmenti imaju vrlo slične smjerove vektora, ukazujući na pozitivnu korelaciju. C i N vektori su odvojeni te je C vektor povezan s uzorcima iz lag faze rasta, dok je N vektor povezan s uzorcima iz ekspanzijske faze. Uzorci iz ekspanzijske i stacionarne faze grupirani su oko vektora za fotosintetske pigmente i proteina.

Za dodatno potvrđivanje međusobnih odnosa između promatranih varijabli te za potvrdu nalaza provedenih analiza, izrađen je korelogram po Spearmanu s prikazanim korelacijskim odnosima (Slika 22).

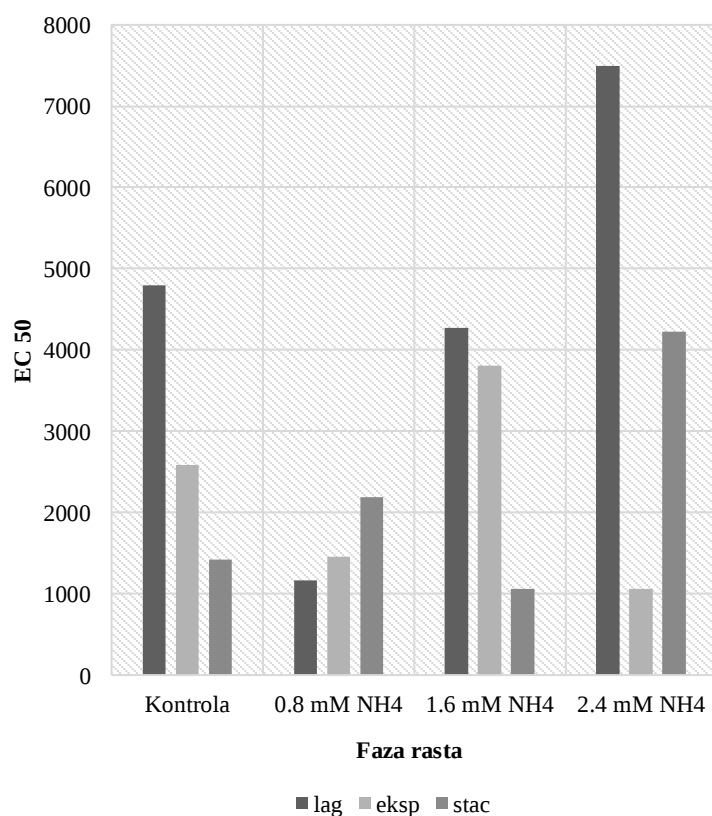


Slika 22. Korelogram promatranih zavisnih varijabla: chl a, karotenoidi, proteini, lipidi, MDA, C i N. Simbol * prikazuje statistički značajne korelacije ($p < 0,05$) te su izračunate p vrijednosti prikazane u Dodatku

Korelogram po Spearmanu pokazao je značajnu korelaciju između pigmenata ($r=0,92$) (Slika 22). Ostale pozitivne korelacije zabilježene između klorofila a i razine MDA ($r=0,39$), MDA i N ($r=0,46$). Negativne korelacije su utvrđene između N i proteina ($r=-0,50$), C i proteina ($r=-0,13$) i između C i fotosintetskih pigmenata ($r=-0,26$; $r=-0,29$).

4.3.2. Analiza toksičnosti medija

Rezultati analize toksičnosti medija pokazali su da je u mediju s 1,6 mM NH_4^+ toksičnost niža u ranijim fazama eksperimenta, no značajno se povećala u stacionarnoj fazi rasta ($\text{EC}_{50}=1055$). U mediju s najvišom koncentracijom amonija toksičnost nije bila prisutna na početku, ali se pojavila već u eksponencijanoj fazi rasta ($\text{EC}_{50}=1057$), dok je u kasnijoj fazi ponovno došlo do smanjenja toksičnosti ($\text{EC}_{50}=4220$) (Slika 23). U kontrolnom mediju (0,8 mM NO_3^-) nije bila zabilježena toksičnost, iako su EC_{50} vrijednosti pokazale pad prema kraju eksperimenta.

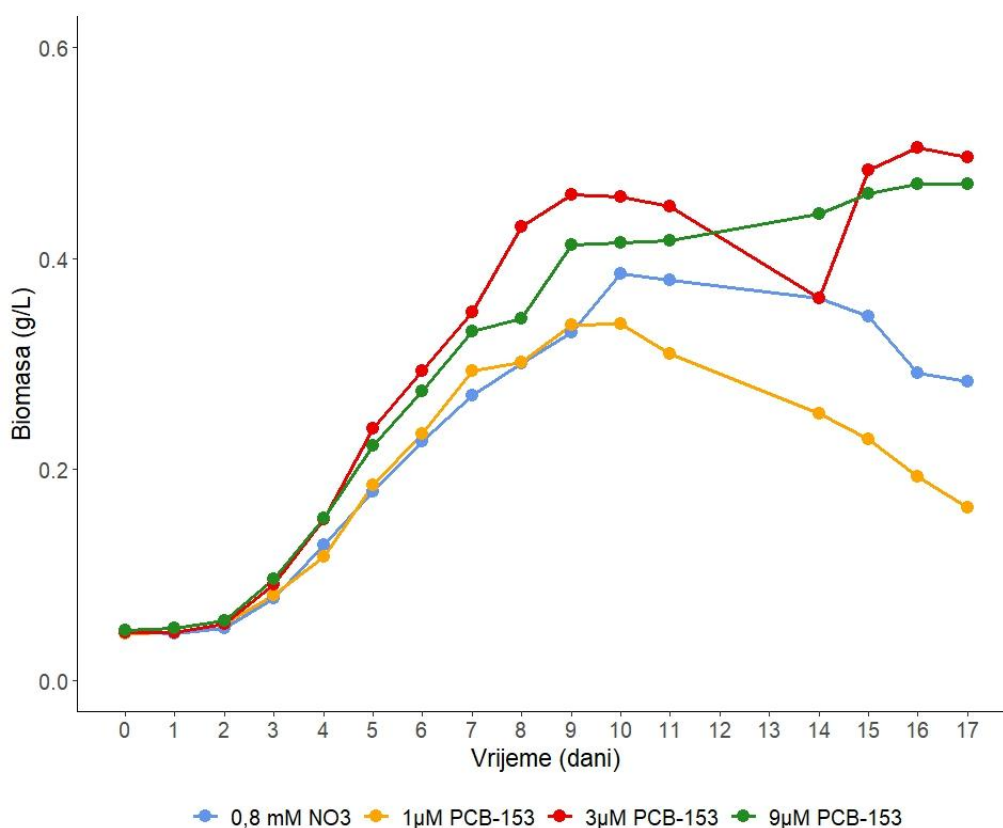


Slika 23. Rezultati analize toksičnosti medija provedene u eksperimentu s različitim koncentracijama amonija

3.4. Učinak PCB-153

3.4.1. Rast

Primijećeno je da sve koncentracije PCB-153 dozvoljavaju rast biomase, pri čemu više koncentracije (3 μ M i 9 μ M) čak pokazuju nešto veći rast u odnosu na kontrolne uvjete (Slika 24). Nakon devetog dana vidljiv je ulazak vrste u stacionarnu fazu, pogotovo u kontrolnim uvjetima s najnižim prinosom biomase (0,28 g/L) izmjerenim zadnji dan eksperimenta. Konačna biomasa izmjerena zadnji dan eksperimenta u *N. gaditana* izložene s PCB-153 iznosila je: 0,16 g/L, 0,50 g/L i 0,47 g/L (Slika 24).



Slika 24. Dinamika rasta kulture

S ciljem boljeg uvida u promjene na unutarstaničnoj razini tijekom različitih faza rasta i pod utjecajem odabranih koncentracija PCB-153 analizirani su i biokemijski parametri.

3.4.2. Sastav stanice - biokemijski parametri

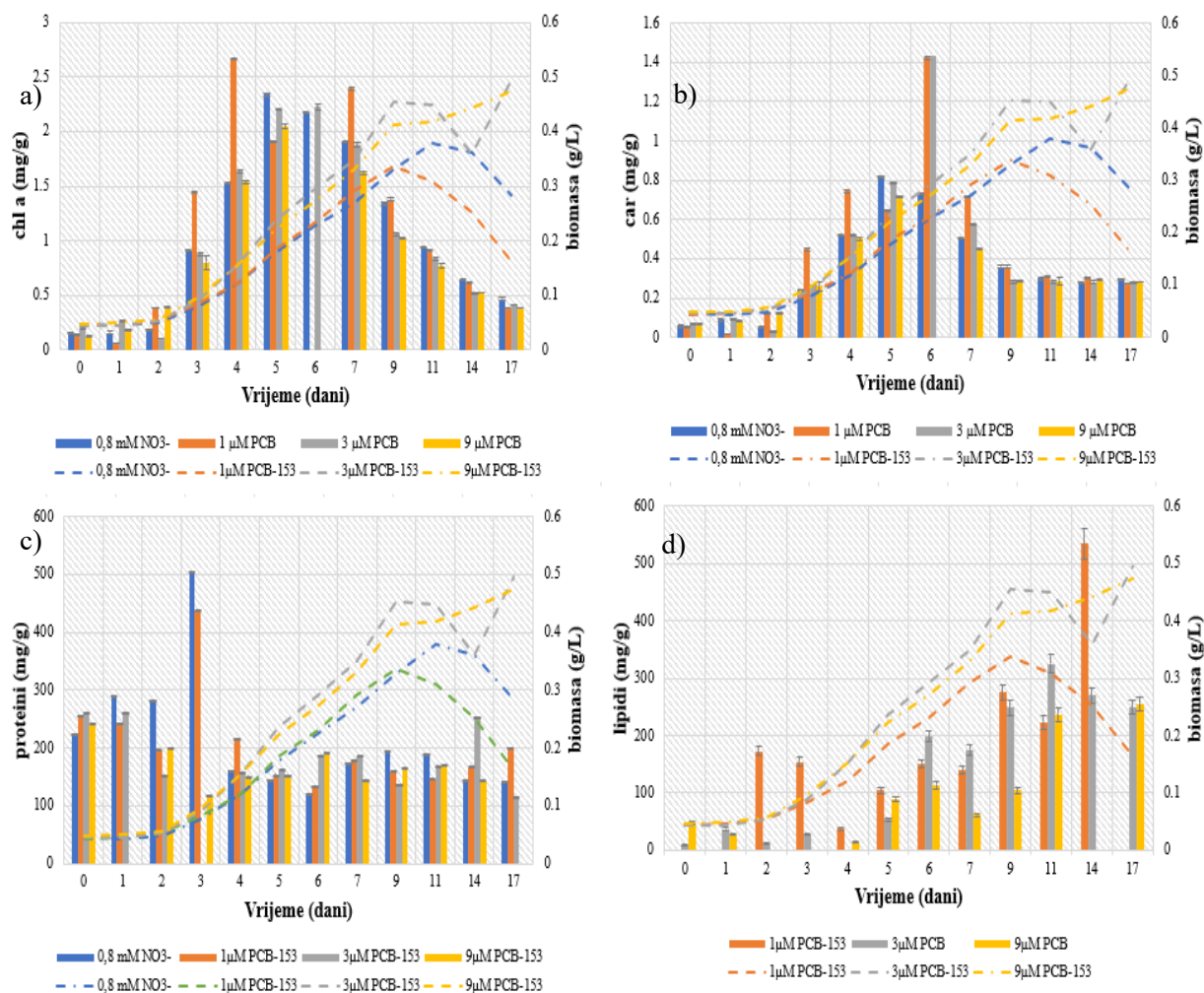
Slika 25 sadrži prikaz izmjerenih biokemijskih parametara tijekom eksperimenta te su prikazane standardne devijacije mjerenja.

Utvrđene su niže koncentracije fotosintetskih pigmenata u odnosu na ostale provedene eksperimente (Slika 25a). Koncentracije klorofila a prate rast kulture, odnosno od devetog dana eksperimenta, kultura prestaje s proizvodnjom klorofila a, pri čemu dolazi do pada u koncentraciji klorofila a. Četvrti i sedmi dan eksperimenta čak je utvrđena viša koncentracija klorofila a u kulturi tretiranoj s 1 μ M PCB-153 (2,67 mg/g i 2,4 mg/g) u odnosu na kontrolne uvjete (1,53 mg/g i 1,91 mg/g).

Isti trend u proizvodnji pigmenta, odnosno smanjenju koncentracije nakon ulaska u stacionarnu fazu, primijećen je i pri određivanju koncentracije karotenoida (Slika 25b). Šesti dan eksperimenta izmjerene su najviše vrijednosti karotenoida u uzorcima tretiranim s 1 μ M PCB-153 (1,42 mg/g) i 3 μ M PCB-153 (1,41 mg/g). Izmjerene koncentracije karotenoida prate prinos biomase.

Koncentracije proteina bile su više u lag fazi u odnosu na eksponencijalnu i stacionarnu fazu rasta, s iznimkom trećeg dana, odnosno ranog ulaska u eksponencijalnu fazu rasta (Slika 25c). Nakon trećeg dana, vrijednosti proteina u svim uvjetima nisu prelazile 200 mg/g u svim tretiranim uzorcima, s iznimkom 14. dana eksperimenta u uzorku tretiranim s 3 μ M PCB-153 (253,6 mg/g).

Gravimetrijskim određivanjem lipida utvrđeno je povišenje u koncentraciji lipida u razdoblju kasne eksponencijalne faze, odnosno od sedmog dana do kraja eksperimenta (Slika 25d). Postupno je primijećen rast u uzorcima tretiranim s 1 μ M PCB-153 i 3 μ M PCB-153, dok su vrijednosti lipida u uzorcima tretiranim s 9 μ M PCB-153 bile niže.

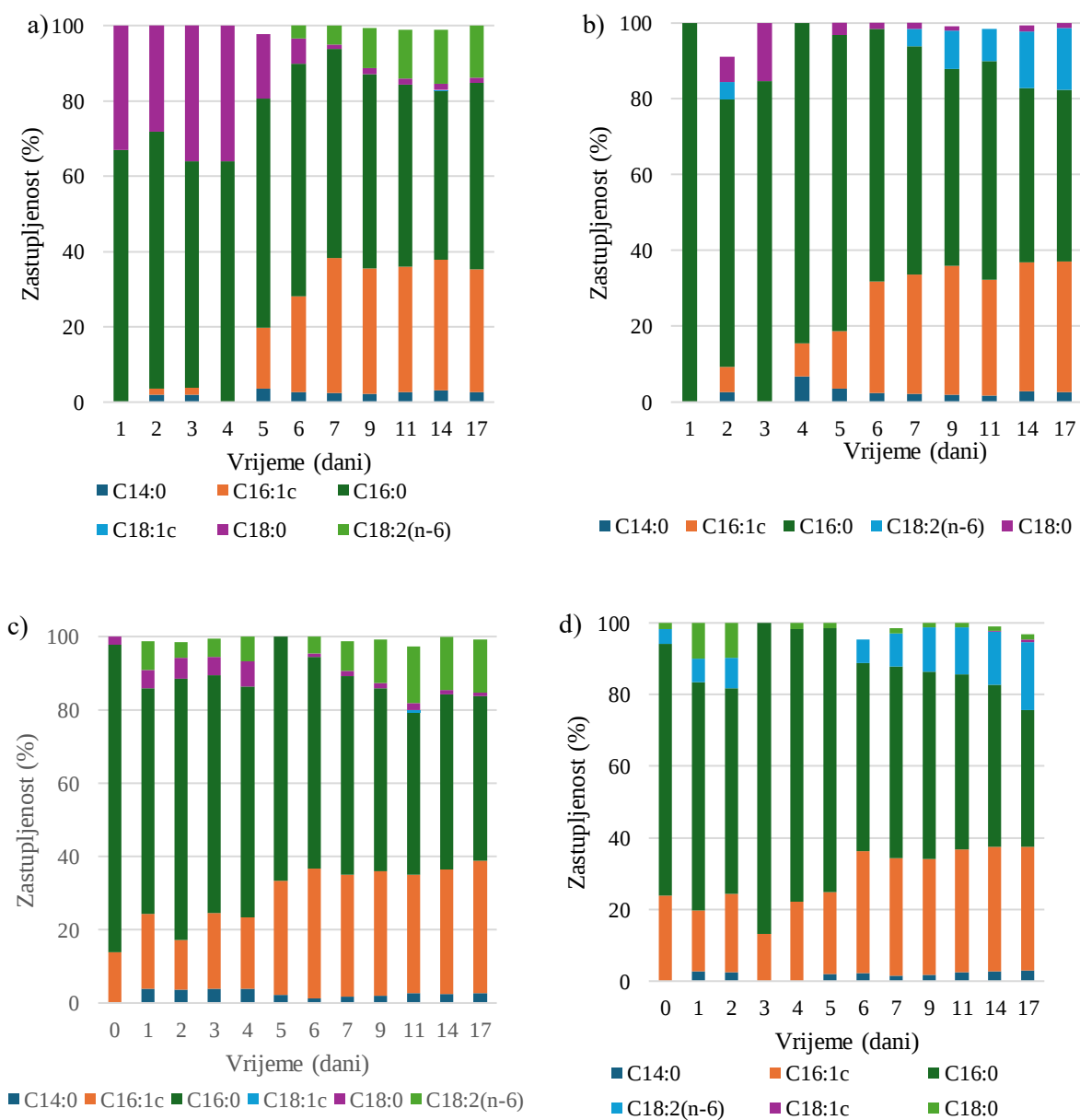


Slika 25. Koncentracije odabranih biokemijskih parametara: a) klorofil a; b) karotenoidi; c) proteini; d) lipidi. Ukupna biomasa za svaki tretman označena je crtkanom linijom

Osim određivanja ukupnih količina lipida, analiziran je FAME profil s naglaskom na kvalitativni sastav masnih kiselina, dok je razina lipidne peroksidacije procijenjena mjerenjem koncentracije MDA. Za predstavljanje FAME profila, izabrane su MK s najvišom zastupljenošću (Slika 26).

U referentnim uvjetima, odnosno kontrolnim uvjetima, u profilu MK dominira C16:0 (pripada skupini SAT). Također je izražena zastupljenost C18:0 (pripada skupini SAT) u lag fazi rasta, odnosno C16:1c (pripada skupini MUFA) u eksponencijalnoj i stacionarnoj fazi (Slika 26a). Udio C16:1 raste s eksponencijalnom fazom, te pred kraj eksponencijalne faze stagnira i zadržava se na konstantnoj vrijednosti. Zastupljenost C16:0 izražena je u svim kulturama tretiranim s PCB-153 kroz sve faze rasta te je također prisutna C18:0. Također, u svim tretmanima zabilježena je

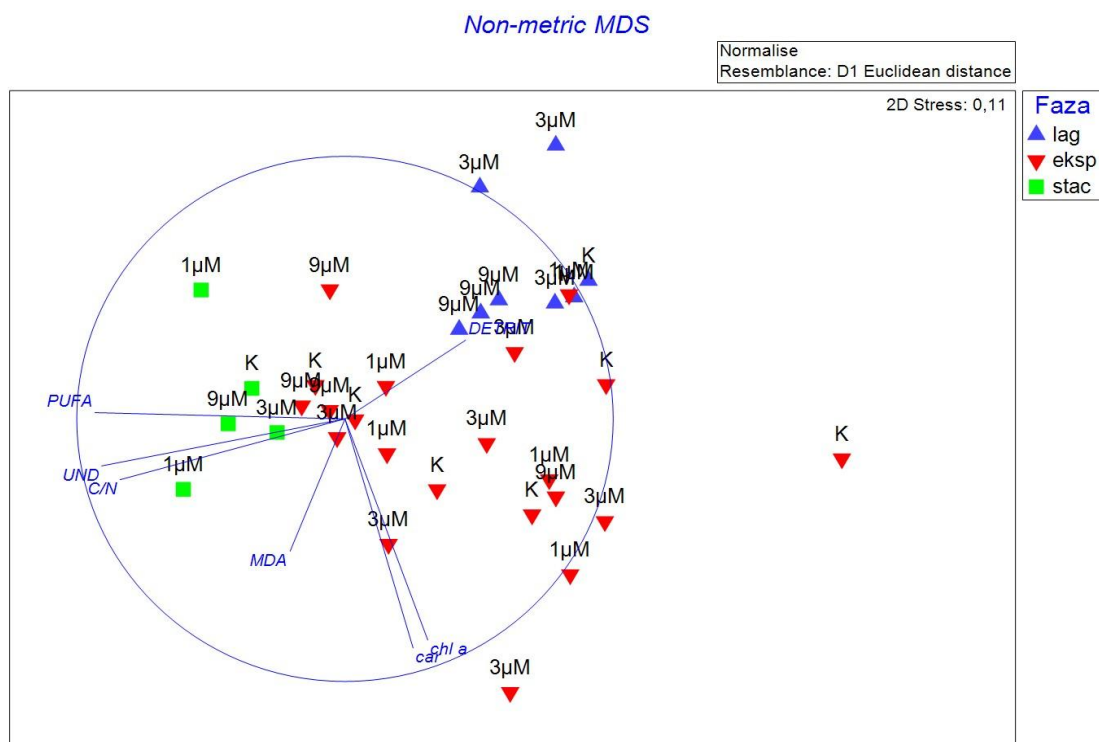
prisutnost C18:2 (n-6) (linolna kiselina, pripada skupini PUFA) u kasnoj ekspanzijskoj fazi i početkom stacionarne faze, pri čemu je njezina koncentracija bila manja od 15%.



Slika 26. Promjene u profilu masnih kiselina u kulturi tretiranoj s : a) 0,8 mM NO₃⁻; b) 1 μM PCB-153; c) 3 μM PCB-153; d) 1 μM PCB-153

Vrijednosti izmjerenih koncentracija MDA, kao pokazatelja oksidativnog stresa, varirale su između 0,12-0,30 $\mu\text{mol/g}$ (kontrolni uvjeti), 0,03-0,39 $\mu\text{mol/g}$ (kultura tretirana s 1 μM PCB-153), 0,08-0,36 $\mu\text{mol/g}$ (kultura tretirana s 3 μM PCB-153) i 0,15-0,26 $\mu\text{mol/g}$ (kultura tretirana s 3 μM PCB-153). Navedene niže vrijednosti izmjerene su u početnim fazama eksperimenta, dok su više vrijednosti izmjerene u kasnoj ekspanzionalnoj, odnosno stacionarnoj fazi rasta. Ostale vrijednosti MDA prikazane su u Tablicu u Dodatku.

Za potvrđivanje odnosa između MK (u ovom slučaju PUFA, UND i DETRIT), odabranih biomarkera staničnog stanja (chl a, car, MDA i C/N), izrađen je nMDS (Slika 27). Dobiveni nMDS prikaz ukazao je na grupiranje uzoraka većinski iz lag faze u blizini DETRIT vektora, dok su uzorci iz stacionarne faze grupirani su s vektorima: PUFA, UND i C/N.



Slika 27. nMDS prikaz odnosa između uzoraka u različitim fazama rasta na temelju odabranih biokemijskih varijabli

Kako bi se utvrdilo koje varijable doprinose razlikama između grupa uzoraka, provedena je SIMPER analiza te su svi rezultati analize prikazani u Dodatku. Kao glavni čimbenik, izabran je faktor faza.

U lag fazi, glavni faktori doprinosa razlici su vektori: DETRIT (63%), zatim PUFA, MDA i UND. U eksp fazi glavni faktori doprinosa razlici su vektori: DETRIT, chl a, PUFA, MDA i UND. U stacionarnoj fazi, glavni faktori doprinosa razlici su vektori: MDA (93%) i visoke vrijednosti PUFA. Glavni faktori doprinosa razlici između lag i eksp faze (ASD= 14,58) su chl a, car, DETRIT i UND (moguća bakterijska prisutnost). Glavni faktori doprinosa razlici između lag i stac faze (ASD=22,79) su C/N omjer PUFA i UND. Glavni faktori doprinosa razlici između eksp i stac faze (ASD=17,31) su C/N omjer, PUFA, UND i MDA te su sve vrijednosti više u stac fazi.

Uz nMDS i SIMPER analizu, za dodatnu potvrdu utjecaja eksperimentalnih faktora i faze rasta, provedena je i statistička analiza pomoću MANOVA i ANOVA testova (Tablica 5). MANOVA analiza provedena je s obzirom na početne uvjete eksperimenta, uzimajući u obzir koncentracije PCB-153 i faze rasta mikroalge *N. gaditana* kao glavne i jedine faktore koji su potencijalno utjecali na promatrane zavisne varijable (pigmenti, proteini, MDA, lipidi, C i N).

Tablica 5. MANOVA rezultati, u model uključene vrijednosti: klorofil a, karotenoida, proteina, lipida, MDA, C i N.

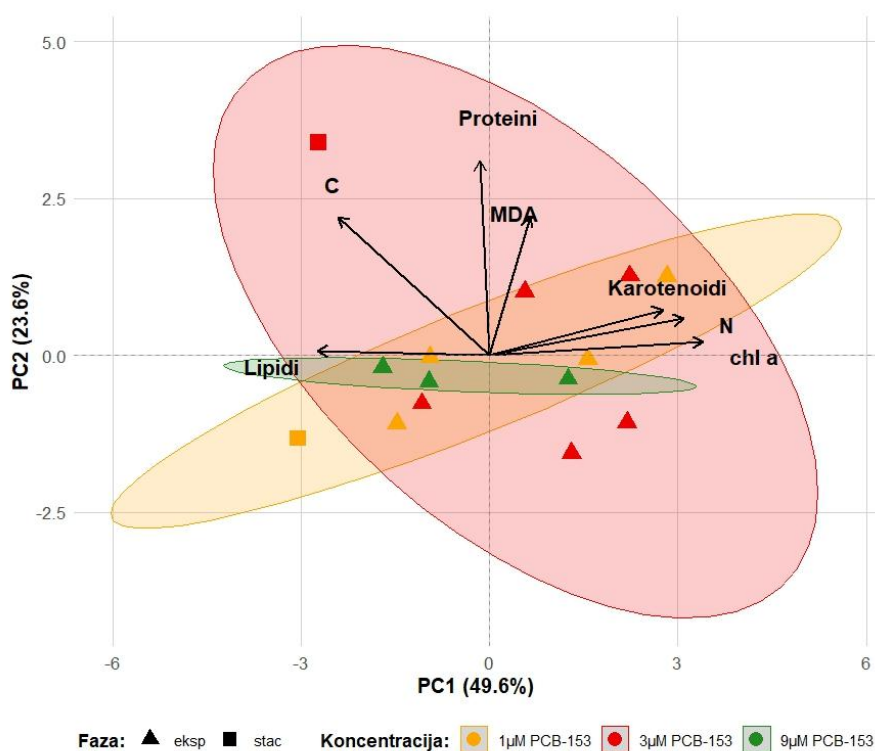
	Df	Pillai	Approx F	Num Df	Den Df	Pr(>F)
Koncentracija	2	1.14327	0.7625	14	8	0.68608
Faza	1	0.88902	3.4331	7	3	0.16937
Koncentracija:Faza	1	0.95176	8.4550	7	3	0.05351 .
Residuals	9					
Signif. codes	0 ‘****’	0.001 ‘***’	0.01 ‘**’	0.05 ‘.’	0.1 ‘ ’	1

MANOVA analiza utvrdila je da ne postoji statistički značajan utjecaj faktora koncentracija ($p=0,68608$) i faza ($p=0,16937$), na promatrane varijable (Tablica 6). Međusobna interakcija odabranih faktora pokazala se potencijalno statistički značajnom ($p=0,053$). Unatoč tome što je MANOVA analiza pokazala nepostojecu statistički značajan utjecaj faktora na varijable, provedena je univarijatna ANOVA. Univarijatna ANOVA pokazala da ne postoji statistički značajan utjecaj faktora Koncentracija na promatrane varijable. Međutim, utvrđen je statistički značajan utjecaj faktora Faza na: klorofil a ($p=0,03779^*$), proteine ($p=0,04295^*$), lipide

($p=0,01091^*$) i C ($p=0,001642^{**}$). Međusobna interakcija bila je statistički značajna na varijable: proteini ($p=0,03920^*$) i C ($p=0,009862^{**}$). Ostale vrijednosti ANOVA nalaze se u Dodatku.

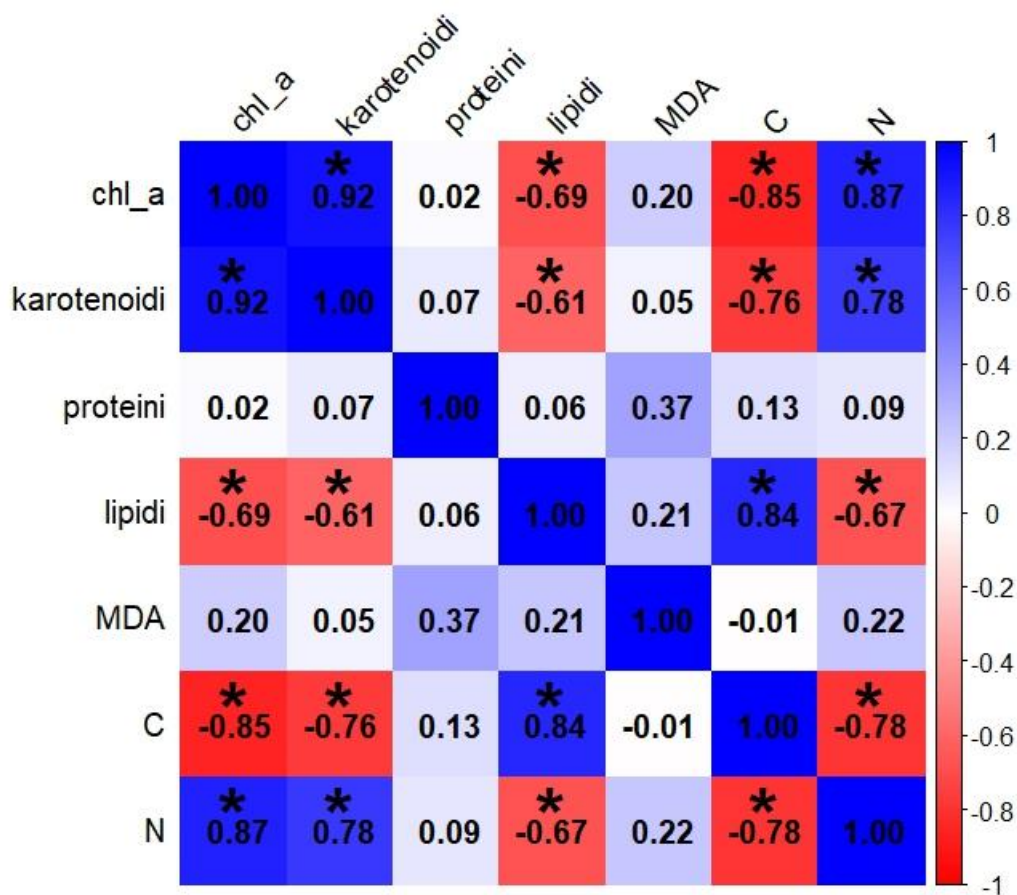
Nakon potvrđenih razlika između promatranih faktora i zavisnih varijabli, provedena je i PCA analiza kako bi se dodatno istražile glavne komponente varijacija između podataka (Slika 28).

PC1 os objašnjava 49,6% varijance, a PC2 os 23,6% varijance u podacima. Vektori za fotosintetske pigmente orijentirani su prema desnoj strani prikaza zajedno s vektorom N (Slika 28). Varijabe proteini i MDA usmjereni su prema sredini gornjeg dijela prikaza, te je vektor proteini puno duži od vektora MDA. Vektor C stoji samostalno na gornjem lijevom dijelu prikaza, a vektor lipidi orijentiran je na sredini prikaza. Na prikazu se nalaze tri elipse koje prikazuju sve tri PCB-153 koncentracije. Uzorci iz svih koncentracija PCB-153 grupirani su oko vektora za pigmente i N na desnoj strani PCA prikaza. Oko vektora lipidi prvenstveno su grupirani uzorci s najvišom koncentracijom PCB-153.



Slika 28. PCA analiza izrađena prema dva odabrana faktora, fazi rasta i koncentracije

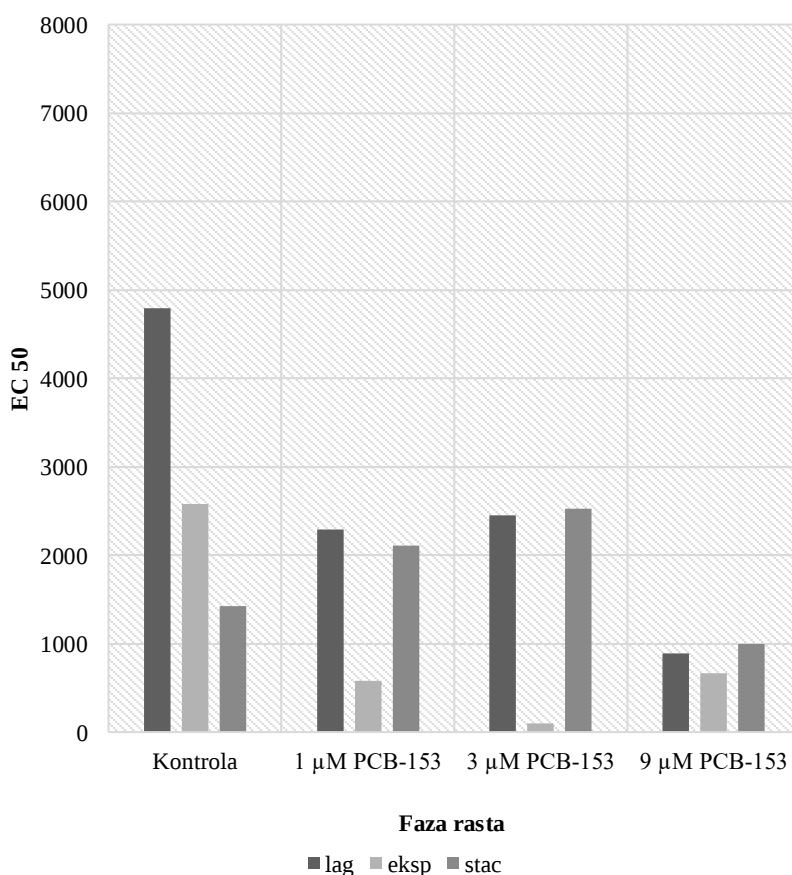
Za dodatno potvrđivanje međusobnih odnosa između promatranih varijabli te za potvrdu nalaza provedenih analiza, izrađen je korelogram po Spearmanu s prikazanim korelacijskim odnosima (Slika 29). Snažna pozitivna korelacije utvrđena je između pigmenata (0,92), pigmenata i N (0,87 i 0,78) te između lipida i C u stanici (0,84). Niže, pozitivne korelacije utvrđene su između klorofila a i MDA (0,26) i između MDA i proteina (0,24). Značajna negativne korelacije izmjerene su između N i C (-0,78), pigmenata i C (-0,85 i -0,76).



Slika 29. Korelogram promatranih zavisnih varijabla: chl a, karotenoidi, proteini, lipidi, MDA, C i N. Simbol * prikazuje statistički značajne korelacije ($p < 0,05$) te su izračunate p vrijednosti prikazane u Dodatku

3.4.2. Analiza toksičnosti medija

Analiza toksičnosti medija pokazala je toksičnost u svim medijima koji su sadržavali PCB-153 (Slika 30). U eksponencijalnoj fazi rasta, u medijima s nižim koncentracijama PCB-153, izmjerene EC_{50} vrijednosti iznosile su: 576 i 102. Ulaskom vrste u stacionarnu fazu, u oba slučaja, EC_{50} su se povisile te su iznosile: 2104 i 2525. U mediju s 3 μ M PCB-153 dolazi do nagle pojave toksičnosti u mediju. S druge strane, u mediju s najvišom koncentracijom PCB-153, izmjerene EC_{50} vrijednosti bile su izuzetno niske kroz cijeli eksperiment, s najnižom vrijednosti izmjerenom u eksponencijalnoj fazi rasta.

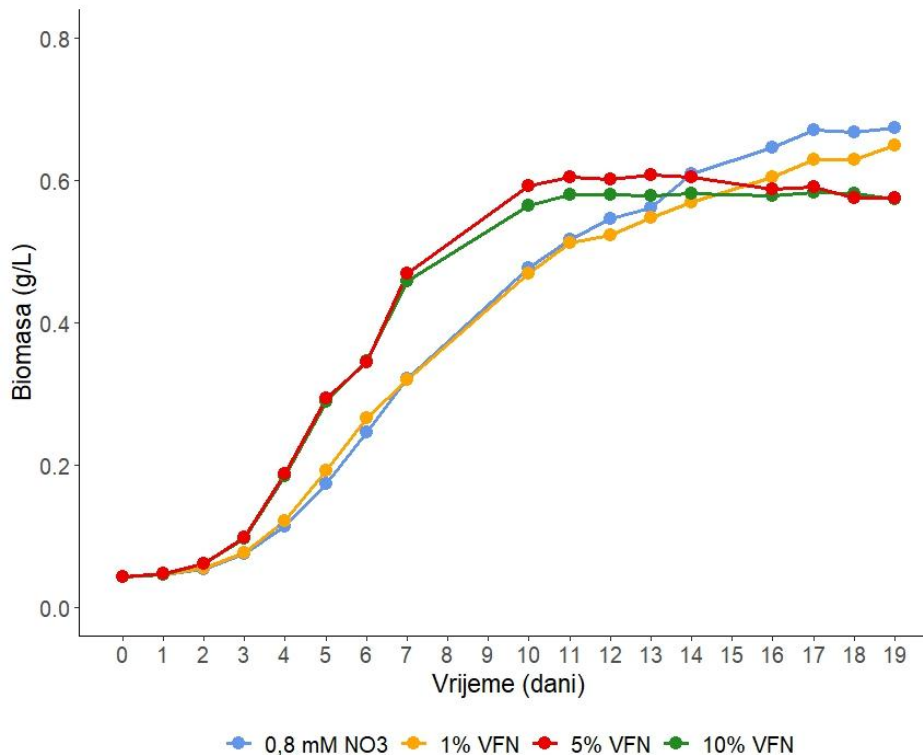


Slika 30. Rezultati analize toksičnosti medija u eksperimentu s različitim koncentracijama PCB-153.

3.5. Učinak vodotopive frakcije sirove nafte

3.5.1. Rast

Iz prirasta vidljivo je da veće koncentracija VFN-a (5% i 10%) pozitivno utječe na dinamiku rasta do ulaska u stacionarnu fazu (od 14. dana nadalje) (Slika 31). Tijekom cijelog eksperimenta, uočava se jasno grupiranje: kontrolni uvjeti i 1% VFN grupiraju se zajedno, dok se tretmani s 5% i 10% VFN izdvajaju po većim prinosima biomase. Najviši prinosi biomase zabilježeni su 12. dan kod tretmana s 10% VFN (0,58 g/L) i 13. dan kod tretmana s 5% VFN (0,607 g/L). U kontrolnim uvjetima, konačni prinos biomase iznosio je 0,67 g/L (Slika 31). Također, tretmani s višim udjelom VFN pokazali su brži početni porast biomase, s izraženijim razlikama već nakon šestog dana.



Slika 31. Dinamika rasta kulture

S ciljem boljeg uvida u promjene na unutarstaničnoj razini tijekom različitih faza rasta i pod različitim koncentracijama VFN, analizirani su i biokemijski parametri.

3.5.2.Sastav stanice - biokemijski parametri

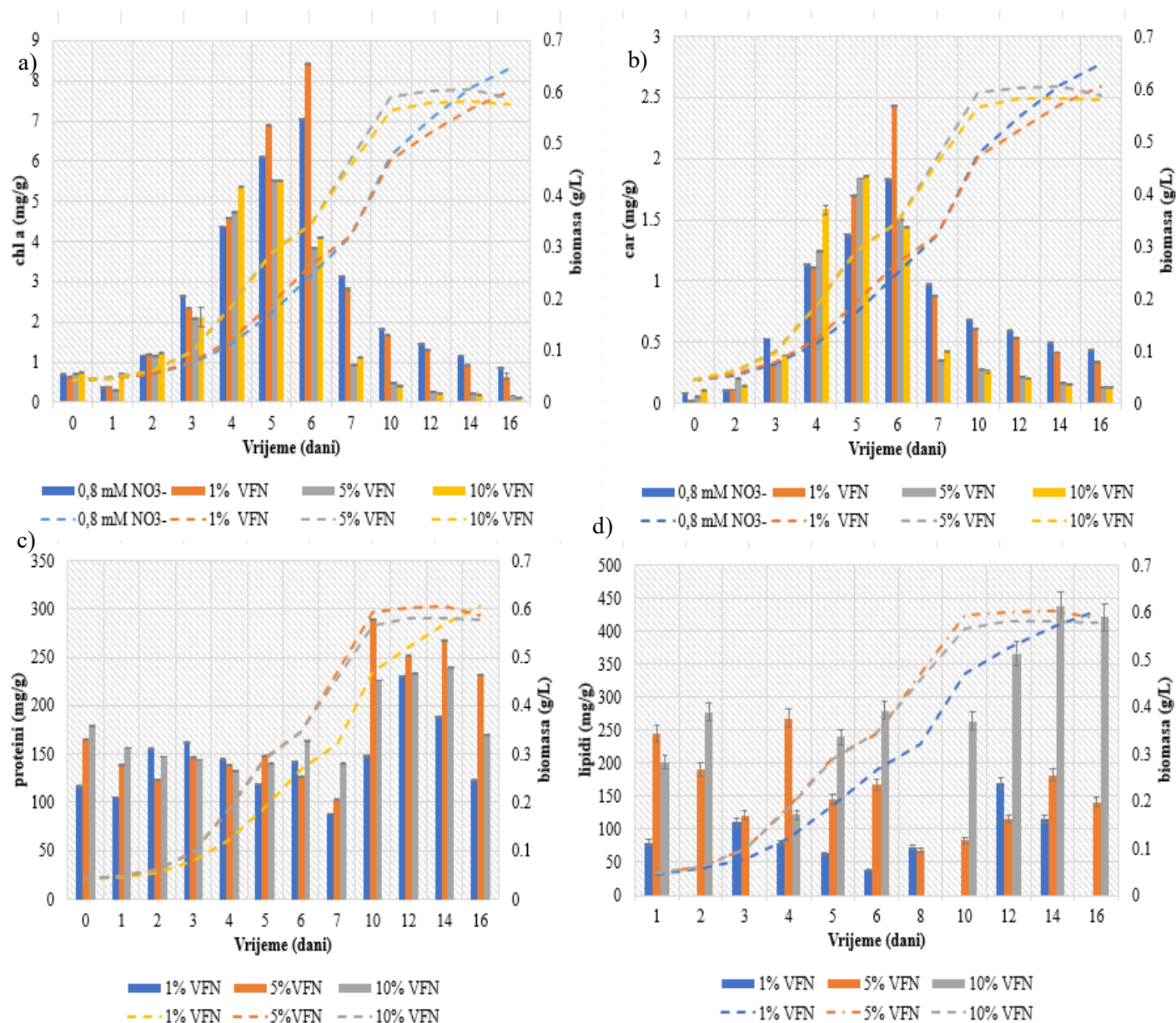
Slika 32 sadrži prikaz izmjerenih biokemijskih parametara tijekom eksperimenta te su prikazane standardne devijacije mjerenja.

Mjerenje pigmenata sugeriraju da VFN služi kao dodatni izvor nutrijenata za kulturu pri čemu dolazi do većih koncentracija klorofila a u odnosu na druge eksperimente. U uzorku tretiranom s 1% VFN, uočeno je povišenje koncentracije klorofila a (8,44 mg/g) izmjereno šesti dan, što je više od koncentracije klorofila a izmjerene u kontrolnim uvjetima (Slika 32a). Četvrtog dana, više koncentracija klorofil a uočene su u tretmanima s 5% (4,77 mg/g) i 10% (5,37 mg/g) VFN u odnosu na kontrolne uvjete i 1% VFN. Sedmog dana zabilježen je nagli pad koncentracije klorofila a u uzorcima s 5% (0,93 mg/g) i 10% VFN (1,11 mg/g), nakon čega vrijednosti nastavljaju opadati (Slika 32a).

Između četvrtog i sedmog dana, koncentracije karotenoida su se povisile u uzorcima tretiranim s 5 i 10% VFN (1,83 mg/g i 1,86 mg/g, vrijednosti izmjerene peti dan eksperimenta) dok su za vrijeme kasne stacionarne faze, koncentracije karotenoida pale ispod 0,15 mg/g u istim uzorcima (Slika 32b). Maksimalna koncentracija karotenoida izmjerena kojem je šesti dan eksperimenta (2,44 mg/g) u uzorku tretiranog s 1% VFN. U uzorcima s višim razinama VFN utvrđeno je manjakoncentracija (kretanje vrijednosti od 0,2 do 0,16 mg/g između 12. i 16. dana) karotenoida što je moguće zbog toksičnog učinka na organizam.

Uzorci tretirani s 5% i 10% VFN imali su značajnije više koncentracije proteina u stacionarnoj fazi (290, odnosno 239 mg/g), dok je u uzorcima tretiranim s 1% VFN najviša koncentracija bila 231.07 mg/g (Slika 32c). U razdoblju od početka do sedmog dana eksperimenta, koncentracije proteina bile su bez većih razlika u svim uvjetima, međutim u periodu između 7-10 dana imamo porast u koncentraciji proteina, što je posebice očito u uzorcima tretiranim s 5% i 10% VFN.

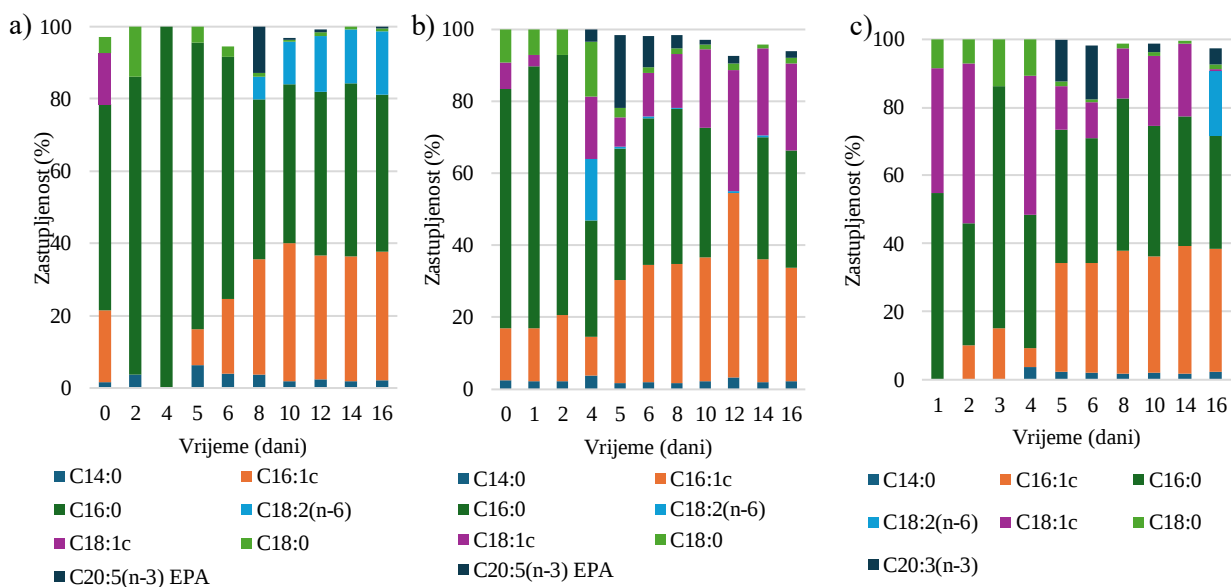
Značajan prinos lipida utvrđen je u kasnoj eksponencijalnoj i ranoj stacionarnoj fazi u uzorcima tretiranim s 5 i 10% VFN (Slika 32d). U razdoblju između 6. i 16. dana, gravimetrijski je određeno najviše lipida u uzorku tretiranom s 10% VFN, s maksimalnom vrijednosti izmjerenom 14.dan (437 mg/g).



Slika 32. Koncentracije odabranih biokemijskih parametara: a) koncentracija klorofila a; b) koncentracija karotenoida; c) koncentracija proteina; d) koncentracija proteina. Ukupna biomasa za svaki tretman označena je crtkanom linijom

Osim određivanja ukupnih količina lipida, analiziran je FAME profil s naglaskom na zastupljenost određenih tipova masnih kiselina, kako bi se detaljnije procijenila kvaliteta lipida, dok je razina oksidativnog stresa procijenjena mjerenjem koncentracije MDA. Za predstavljanje FAME profila, izabrane su MK s najvišom zastupljenošću.

Izrađeni FAME profili pokazali su prevlast C16:0 masnih kiselina. Uz dominantnost C16:0, u svim fazama rasta uočene su i povišene koncentracije mononezasićene C16:1 masne kiseline u uzorcima tretiranim 1%, 5% i 10% VFN (Slika 33). Stabilnost visokog udjela C16:1 kroz sve faze rasta sugerira da prisutnost VFN potiče sintezu masnih kiselina koje imaju važnu ulogu u prilagodbi membrane u uvjetima dodatnog izvora ugljika. Iako nije prikazano na grafovima, zastupljenost EPA primijećena je u kulturama tretiranim s 1% (osmi dan eksperimenta najviša zastupljenost, 12%) i 5% VFN (najviša zastupljenost peti dan, 20%). U kulturi tretiranoj s 10% VFN, EPA vrijednosti bile su <3%.

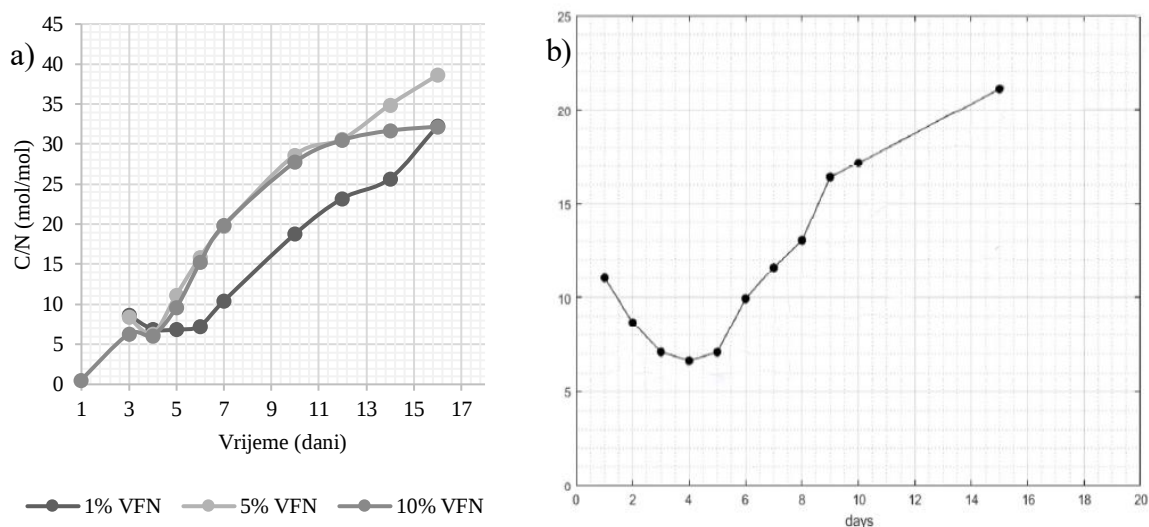


Slika 33. Promjene u profilu masnih kiselina u kulturi tretiranoj s : a) 1% VFN; b) 5% VFN; c) 10% VFN

Vrijednosti MDA, kretale su se od 0,2 do 0,65 $\mu\text{mol/g}$ (1% VFN), 0,05 do 1,5 $\mu\text{mol/g}$ (5% VFN) i 0,039 do 1,17 $\mu\text{mol/g}$ (10% VFN). Ostale vrijednosti MDA prikazane su u Tablici u Dodatku.

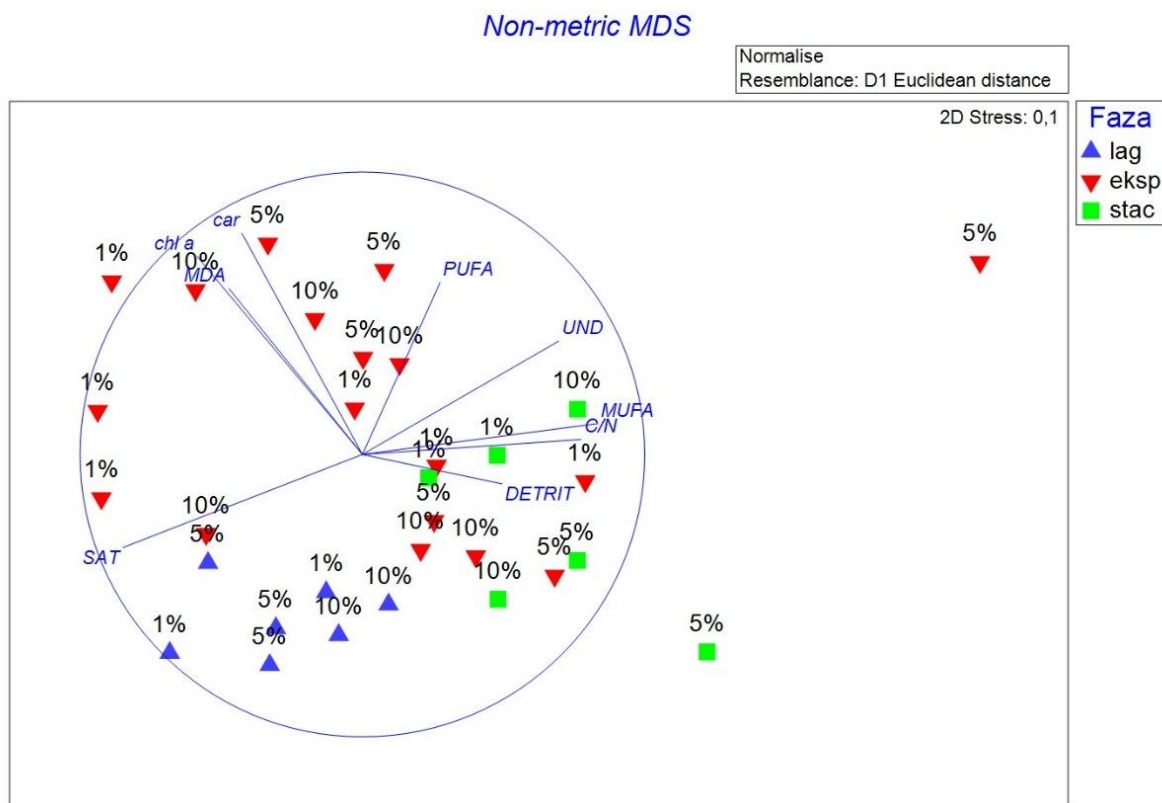
Dinamika unutarstaničnog C/N omjera kod *N. gaditana* tretiranom 1%, 5% i 10% VFN uspoređena je s dinamikom unutarstaničnog C/N omjera kod *N. gaditana* izložene OV iz rafinerije nafte (Pritišanac i sur., 2025). Sastav OV rafinerije nafte nalazi se u Dodatku. U kulturi tretiranoj s 1% VFN, C/N omjer iznosio je 32 mol/mol zadnji dan eksperimenta, dok je u kulturi tretiranoj s 5% VFN omjer C/N bio najveći te je iznosio 38 mol/mol (Slika 34a). Unutarstanični C/N omjer kod *N. gaditana* izložene s OV rafinerije nafte iznosio je 22 mol/mol zadnji dan eksperimenta, no u

razdoblju između drugog do šestog dana (razdoblje rane i eksponencijalne faze) uočen je pad u omjeru koji nakon šestog dana nastavlja rasti (Slika 34b).



Slika 34. Prikaz unutarstaničnog C/N omjera kod: a) *N. gaditana* izložena s 1%, 5% i 10% VFN; b) kod *N. gaditana* izložena s OV rafinerije nafte (prikaz preuzet iz: Pritišanac i sur., 2025)

Za utvrđivanje odnosa između MK (u ovom slučaju PUFA, MUFA, SAT, UND i DETRIT) i odabranih biomarkera staničnog stanja (chl a, car, MDA i C/N), izrađen je nMDS (Slika 35). Analiza je temeljena na normaliziranim podacima i D1 Euklidskoj udaljenosti sa stres vrijednosti 0,1 što ukazuje na dobru reprezentaciju podataka u 2D prostoru. nMDS prikaz pokazuje grupiranje uzoraka iz eksponencijalne faze između vektora: MDA, chl a, car i PUFA, dok su uzorci iz stacionarne faze smješteni između vektora UND, MUFA, C/N i DETRIT. Oko vektora SAT, nalaze se uzorci iz lag i eksponencijalne faze rasta.



Slika 35. nMDS prikaz odnosa između uzoraka u različitim fazama rasta na temelju odabranih biokemijskih varijabli

Kako bi se bolje razumjelo koje varijable doprinose razlikama između grupa uzoraka, provedena je SIMPER analiza te su svi rezultati analize prikazani u Dodatku. Kao glavni čimbenik, temeljen na rezultatima odvojenih SIMPER analiza za oba faktora, izabran je faktor faza.

Lag faza ($ASD=2,45$) je relativno homogena grupa s niskim varijacijama unutar te faze, dok je eksponencijalna grupa najmanje homogena ($ASD=9,08$). Stac faza je umjereno varijabilna ($ASD=4,88$). U lag fazi, glavni faktori doprinosa razlici su SAT (29,9%), MDA (30,3%) i MUFA (36,8%) te obuhvaćaju 96% ukupne varijacije. Glavni faktori doprinosa razlici unutar eksp faze su chl a (12,42%), car (10,97%), SAT (11,53%), MUFA (11,81%), PUFA (10,08%) i DETRIT (9,08%). Vektori DETRIT, PUFA i MUFA bili su glavni faktori doprinosa razlici u stac fazi. Glavni faktori doprinosa razlici između lag i stac faze ($ASD=19,11$) su vektori: C/N (35,69%), DETRIT, PUFA i SAT, dok su glavni faktori doprinosa razlici između grupa lag i eksp ($ASD=19,17$) car (15,13%), MDA (13,28%) i SAT (13,12%). Razlici između grupa eksp i stac ($ASD=19,67$) doprinjeli su vektori DETRIT (15,3%), chl a (13,93%), C/N (12,60%).

Uz nMDS i SIMPER analizu, za dodatnu potvrdu utjecaja eksperimentalnih faktora i faze rasta, provedena je i statistička analiza pomoću MANOVA i ANOVA testova. MANOVA analiza provedena je s obzirom na početne uvjete eksperimenta, uzimajući u obzir koncentracije VFN i faze rasta mikroalge *N. gaditana* kao glavne i jedine faktore koji su potencijalno utjecali na promatrane zavisne varijable (pigmenti, proteini, MDA, lipidi, C i N).

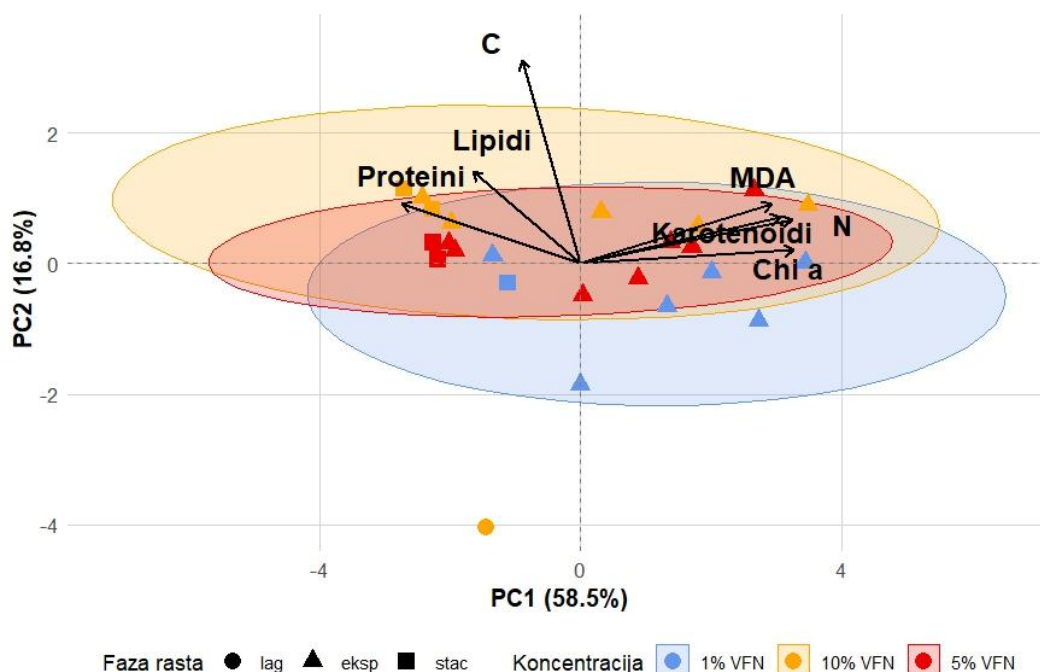
Rezultati provedene MANOVA analize utvrdili su izuzetno statistički značajan utjecaj odabranih faktora (koncentracija, $p=0.002864^{**}$; faza, $p=0.005362^{**}$), no njihova međusobna interakcija nije bila statistički značajna ($p=0.834751$). Ne postoji značajna interakcija između faza i koncentracija, što sugerira da se utjecaji ova dva faktora mogu promatrati neovisno jedan o drugome (Tablica 6).

Tablica 6. MANOVA rezultati, u model uključene vrijednosti: klorofil a, karotenoida, proteina, lipida, MDA, C i N.

	Df	Pillai	Approx F	Num Df	Den Df	Pr(>F)
Koncentracija	2	1.35509	3.6021	14	24	0.002864**
Faza	2	1.31055	3.2586	14	24	0.005362**
Koncentracija:Faza	2	0.52178	0.6051	14	24	0.834751
Residuals	17					
Signif. Codes	0 ‘***’	0.001 ‘**’	0.01 ‘*’	0.05 ‘.’	0.1 ‘ ’	1

Univarijatna ANOVA provedena je da bi se dodatno utvrdio utjecaj faktora na promatrane zavisne varijable. Statistički značajan utjecaj faktora Koncentracija i Faza utvrđen je u zavisnoj varijabli lipidi ($p=3.21e-05^{***}$ i $p=0,03^{*}$) i C ($p=0.003001^{*}$ i $p=6.771e-07^{***}$) varijablama. Rezultati univarijatne ANOVA analize za sve varijable nalaze su u Dodatku.

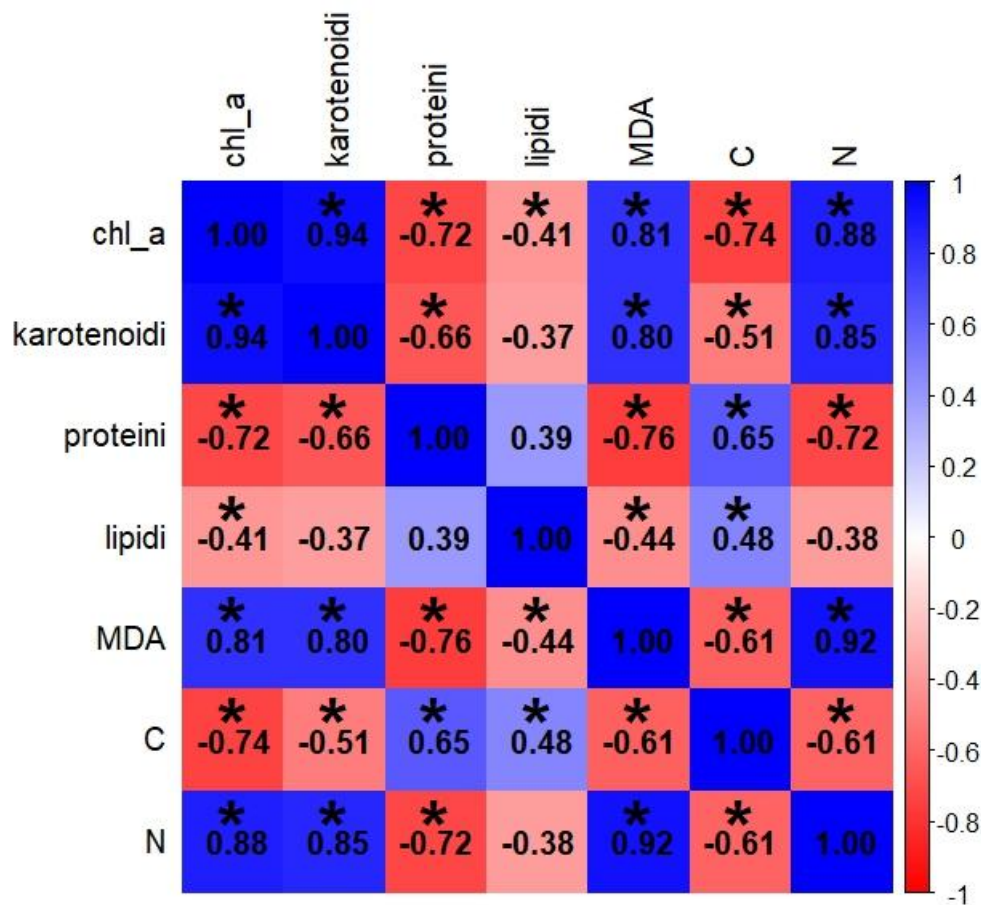
Nakon potvrđenih razlika između promatranih faktora i zavisnih varijabli, provedena je i PCA analiza kako bi se dodatno istražile glavne komponente varijacija između podataka (Slika 36).



Slika 36. PCA analiza izrađena prema dva odabrana faktora, fazi rasta i koncentracije

PC1 os objašnjava 58.5% varijance, a os PC2 objašnjava 16,8% varijance u podacima (Slika 39). PCA prikaz objašnjava ukupno 75,3% varijabilnosti. Koncentracije VFN su označene elipsama, a faze rasta označene su odabranim oblicima. Varijable koje označavaju MDA, fotosintetske pigmente i N usmjerene su prema desnoj strani PCA prikaza. Na lijevoj strani smještene su varijable za C, proteine i lipide. Elipse se postupno preklapaju. Vektor MDA usmjeren je prema višim koncentracijama VFN iz eksponencijalne faze rasta. C ima najduži vektor, što ukazuje na promjene u metabolizmu.

Za dodatno potvrđivanje međusobnih odnosa između promatranih varijabli te za potvrdu nalaza provedenih analiza, izrađen je korelogram po Spearmanu s prikazanim korelacijskim odnosima (Slika 37). Najjače pozitivne korelacije su između MDA i N ($r=0,92$) što sugerira da je oksidativni stres usko povezan s metabolizmom dušika i između fotosintetskih pigmenata ($r=0,94$) što ukazuje na koordiniranu sintezu pigmenata unatoč stresu. Između N i pigmenata je također vrlo jaka pozitivna korelacija ($r=0,85$ i $r=0,88$). Negativne korelacije izražene su između proteina i MDA ($r=-0,76$).



Slika 37. Spearman korelogram promatranih zavisnih varijabla: chl a, karotenoidi, proteini, MDA, lipidi, C i N. Simbol * prikazuje statistički značajne korelacije ($p < 0,05$) te su izračunate p vrijednosti prikazane u Dodatku

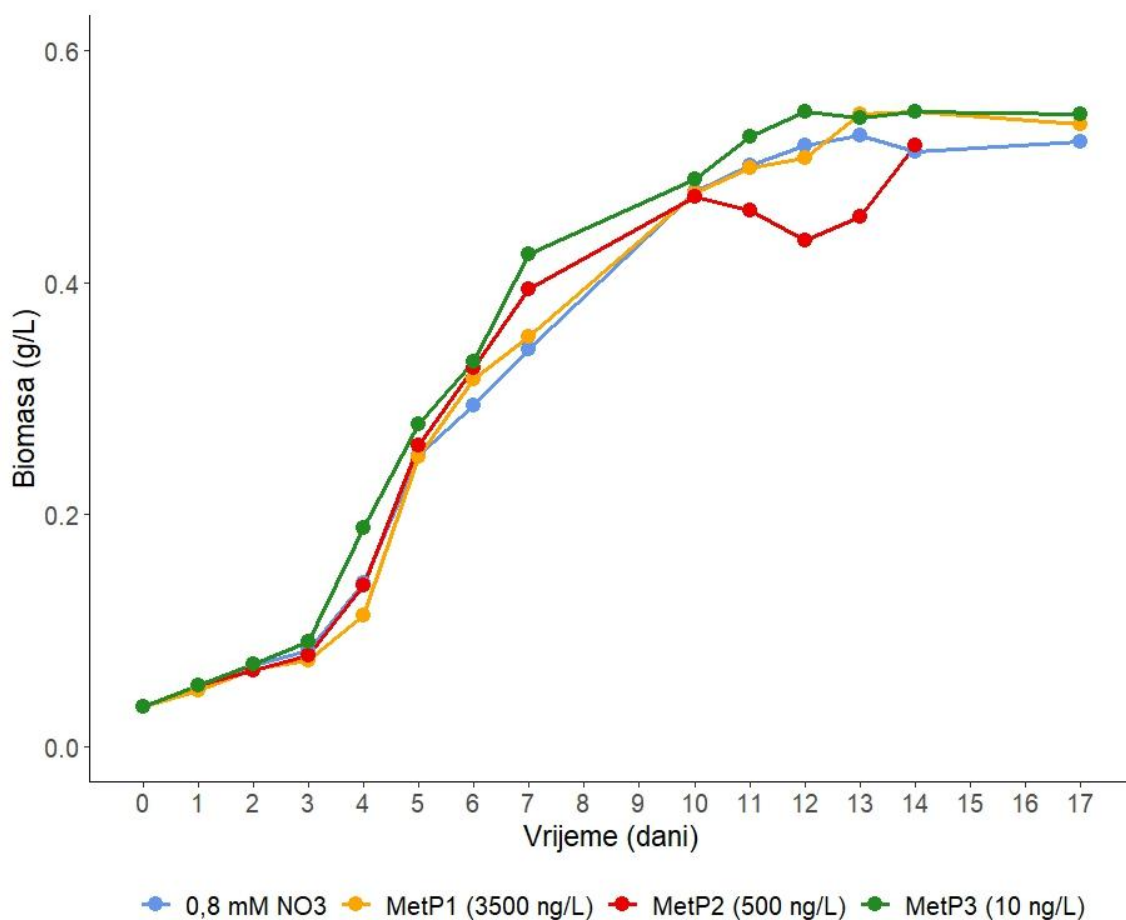
3.5.2. Analiza toksičnosti medija

Analizom toksičnosti medija detektirana je toksičnost, no razina nije dovoljno visoka da bi se smatrala značajnom. Međutim, dobivene vrijednosti EC_{20} pokazale su određeni stupanj inhibicije koji je premali za jasne zaključke o ozbiljnoj toksičnosti.

3.6. Učinak metilparabena

3.6.1. Rast

Učinak metilparabena na dinamiku rasta kulture nije značajan, jer se rast biomase krećekao u kontrolnim uvjetima s minimalnim razlikama (Slika 38). U svim uvjetima, kultura ulazi u eksponencijalnu fazu rasta treći dan eksperimenta. Ulazak u stacionarnu fazu primijećen je 14-ti dan eksperimenta. Rast biomase u kontrolnim uvjetima zadnji dan eksperimenta iznosio je 0,52 g/L (Slika 38). Nisu primijećene značajne razlike u rastu u kulturama tretiranim metilparabenom. Zadnji dan eksperimenta izračunati su sljedeći prinosi: 0,54 g/L, 0,52 g/L i 0,55 g/L (Slika 38).



Slika 38. Dinamika rasta kultura

S ciljem boljeg uvida u promjene na unutarstaničnoj razini tijekom različitih faza rasta i pod utjecajem odabranih koncentracija MetP, analizirani su i biokemijski parametri.

3.6.1. Sastav stanice – biokemijski parametri

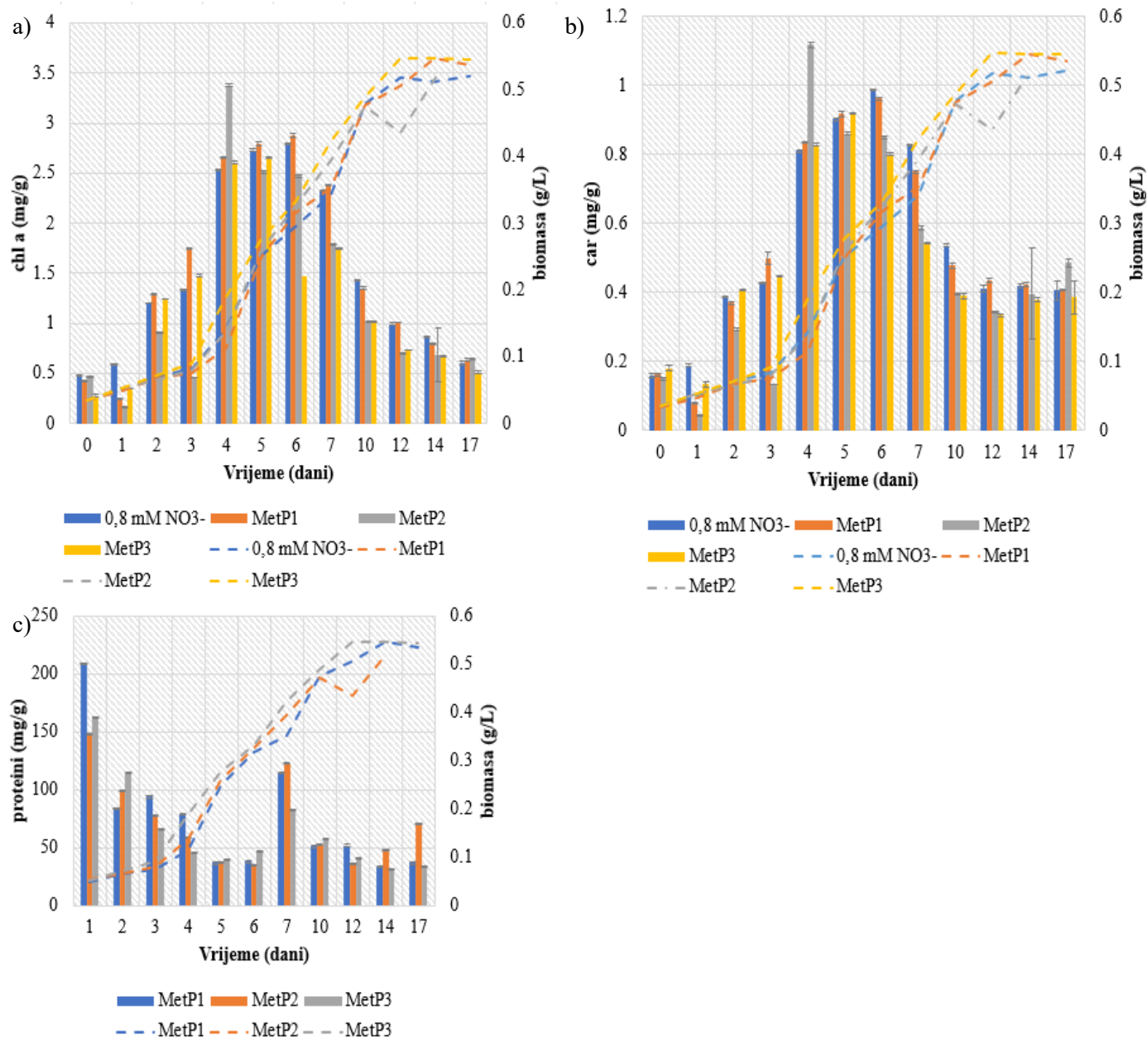
Slika 39 sadrži prikaz izmjerenih biokemijskih parametara tijekom eksperimenta. Prinos biomase prikazan je na sekundarnoj osi isprekidanom linijom radi bolje vizualne usporedbe s ostalim parametrima. Prikazane su standardne devijacije mjerenja.

Koncentracije klorofila a bile su slične u svim eksperimentalnim uvjetima. U razdoblju eksponencijalne faze rasta (od trećeg do desetog dana eksperimenta) koncentracija klorofila a bila je najviša s najvišom vrijednosti (3,38 mg/g) izmjerenom četvrti dan u kulturi tretiranoj 500 ng/L MetP (Slika 39a). Trend rasta i pada u koncentraciji klorofila a prati krivulju prinosa biomase. U kulturama tretiranim MetP, vidljivo je da kulture izložene s MetP3 (3500 ng/L) imaju nižu koncentraciju klorofila a u odnosu na ostale kulture izložene MetP što je posebice izraženo šesti, sedmi, 14-ti i 17-ti dan eksperimenta (Slika 39a).

Koncentracija karotenoida pokazuje sličnu dinamiku kao koncentracija klorofila a (Slika 39b). Četvrti dan eksperimenta, također je u kulturi tretiranoj s 500 ng/L MetP izmjerena najviša koncentracija karotenoida (1,12 mg/g). Krivulja prinosa biomase prati koncentraciju karotenoida te su pri kraju eksperimenta koncentracije karotenoida niže nego u eksponencijalnoj fazi rasta.

Izmjerene koncentracije proteina u kulturama izložene MetP pokazuju drugačiji obrazac od fotosintetskih pigmenata. Najviše koncentracije proteina izmjerene su u početnoj lag fazi eksperimenta, odnosno prvi (209,83 mg/g, 150 mg/g i 163,3 mg/g) i drugi dan (80 mg/g, 100 mg/g i 115,16 mg/g) eksperimenta (Slika 39c). Tijekom eksperimenta, koncentracije proteina bile su niže od izmjerenih koncentracija u lag fazi rasta s iznimkom sedmog dana eksperimenta gdje su izmjerene koncentracije: 115 mg/g, 123,2 mg/g i 83,44 mg/g (Slika 39c).

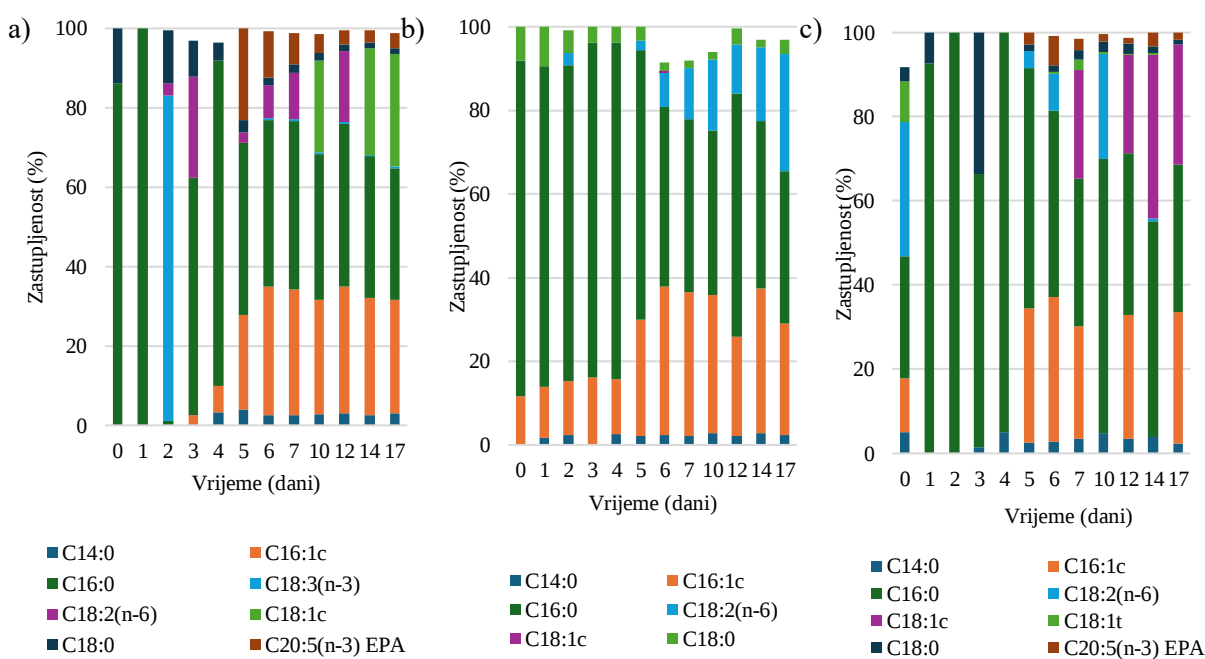
Koncentracija lipida nije prikazana zbog nedostatnog broja pouzdanih rezultata, koji nisu omogućavali vjerodostojnu interpretaciju.



Slika 39. Koncentracije odabranih biokemijskih parametara: a) koncentracija klorofila a; b) koncentracija karotenoida; c) koncentracija proteina. Ukupna biomasa za svaki tretman označena je crtkanom linijom

Osim određivanja ukupnih količina lipida, analiziran je FAME profil s naglaskom na zastupljenost određenih tipova masnih kiselina, kako bi se detaljnije procijenila kvaliteta lipida, dok je razina oksidativnog stresa procijenjena mjerenjem koncentracije MDA. Za predstavljanje FAME profila, izabrane su MK s najvišom zastupljenošću.

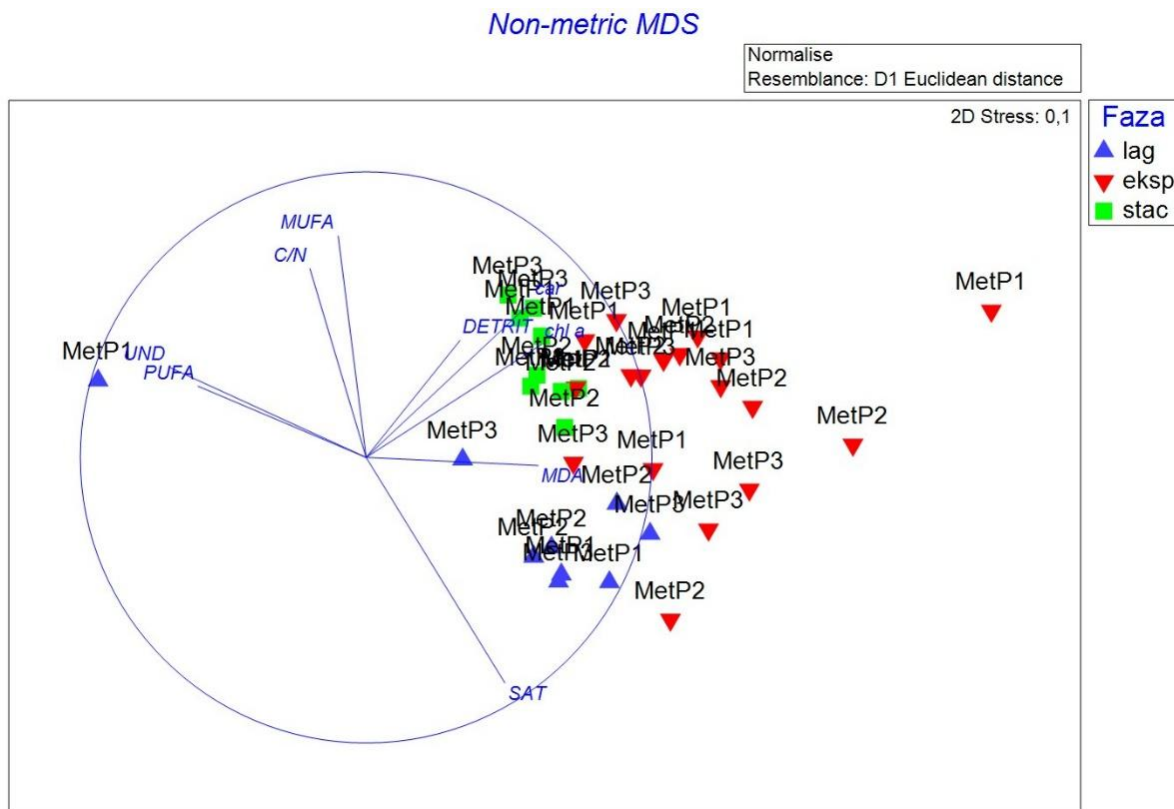
Izrađeni FAME profili pokazali su prevlast C16:0 masnih kiselina (pripada skupini SAT). Uz sveopću prevlast C16:0, izmjeren je visok udio C16:1 (pripada skupini MUFA) u eksponencijalnoj i stacionarnoj fazi u kulturi tretiranoj s 3500 ng/L, u svim fazama rasta u kulturi tretiranoj s 500 ng/L, odnosno u eksponencijalnoj i stacionarnoj fazi u kulturi tretiranoj s 10 ng/L (Slika 40). U kulturi tretiranoj s 3500 ng/L MetP primijećena je visoka zastupljenost C18:3(n-3) (pripada skupini MUFA), koja je iznosila 80%, što je bilo izraženo drugi eksperimenta te je nakon toga zastupljenost iste MK iznosila manje od 5% te zbog toga nije uključena u prikaz. U usporedbi sa svim tretmanima, zastupljenost EPA bila je najviša u tretmanu s najvišom koncentracijom MetP te je iznosila 23% peti dan eksperimenta, dok je u drugim tretmanima zastupljenost EPA bila niža od 10%.



Slike 40. Promjene u profilu masnih kiselina u kulturi tretiranoj: a) MetP1, b) MetP2 i c) MetP3

Izmjerene vrijednosti MDA kretale su se od 0,08 $\mu\text{mol/g}$ do 0,424 $\mu\text{mol/g}$ u kulturi tretiranoj s najvišom koncentracijom MetP. U kulturi tretiranoj s 500 ng/L vrijednosti MDA, kao pokazatelja oksidativnog stresa, kretale su se od 0,034 $\mu\text{mol/g}$ do 0,77 $\mu\text{mol/g}$ što je ujedno i najviša razina MDA izmjerena treći dan eksperimenta. U kulturi tretiranoj s 10 ng/L MetP izmjerene vrijednosti MDA kretale su se od 0,06 $\mu\text{mol/g}$ do 0,59 $\mu\text{mol/g}$. Ostale vrijednosti MDA prikazane su u Tablici u Dodatku.

Za utvrđivanje odnosa između MK (u ovom slučaju SAT, MUFA, PUFA, UND i DETRIT) i odabranih biomarkera staničnog stanja (chl a, car, MDA i C/N), izrađen je nMDS (Slika 41). Analiza je temeljena na normaliziranim podacima i D1 Euklidskoj udaljenosti sa stres vrijednosti 0,10 što ukazuje na dobru reprezentaciju podataka u 2D prostoru. Dobiveni nMDS prikaz ukazao je na grupiranje uzoraka iz lag faze između vektora MDA i SAT, dok su uzorci iz eksp faze između vektora MDA i chl a. Uzorci iz stacionarne faze su smješteni oko vektora chl a, car i DETRIT.



Slika 41. nMDS prikaz odnosa između uzoraka u različitim fazama rasta na temelju odabranih biokemijskih varijabli

Kako bi se bolje razumjelo koje varijable doprinose razlikama između grupa uzoraka, provedena je SIMPER analiza te su svi rezultati analize prikazani u Dodatku. Kao glavni čimbenik, izabran je faktor faza. Najveća varijabilnost unutar grupe utvrđena je u lag fazi (ASD=10,09), dok su uzorci unutar eksp faze umjereno homogeni (ASD=6,76). Stac faza je vrlo homogena (ASD=1,6) s vrlo sličnim uzorcima unutar grupe. Unutar lag faze, razlici najviše doprinosi vektor PUFA (30,69%) i UND (39,59%), a u eksp fazi vektori car (13,62%), chl a (12,34%) i MDA (12,75%) najviše doprinose razlici. Vektori MUFA (33,2%), PUFA (24,95%) i DETRIT (14,3%) najviše doprinose razlici unutar stac faze. Glavni faktori doprinosa razlici između grupa lag i eksp faze (ASD=24,8%) UND (15,3%), car (15,23%), MDA (13,29%) i chl a (13,11%). Između lag i stac grupe (ASD=22,35) vektori C/N (27,47%), MUFA (18,57%) i UND (16,23%) najviše doprinose razlici. C/N (17,54%), chl a (17%) i MDA (14,83%) su glavni doprinositelji razlika između grupa eksp i stac faze.

Uz nMDS i SIMPER analizu, za dodatnu potvrdu utjecaja eksperimentalnih faktora i faze rasta, provedena je i statistička analiza pomoću MANOVA i ANOVA testova. MANOVA analiza provedena je s obzirom na početne uvjete eksperimenta, uzimajući u obzir koncentracije metilparabena i faze rasta mikroalge *N. gaditana* kao glavne i jedine faktore koji su potencijalno utjecali na promatrane zavisne varijable (pigmenti, proteini, MDA, C i N). Varijabla lipidi izuzeta je iz ovih analiza budući da nije bilo dovoljno podataka za vjerodostojnu analizu.

Rezultati MANOVA analize pokazali su da učinak faktora koncentracija ($p=0,120$) kao ni interakcija faktora koncentracija i faza nisu statistički značajni. Međutim, samostalan utjecaj faktora Faza pokazao se statistički značajnim ($p = 1.74e-08^{***}$), što ukazuje na značajan utjecaj ovih Faze na zavisne varijable. Detaljan prikaz rezultata MANOVA analize dostupan je u Dodatku.

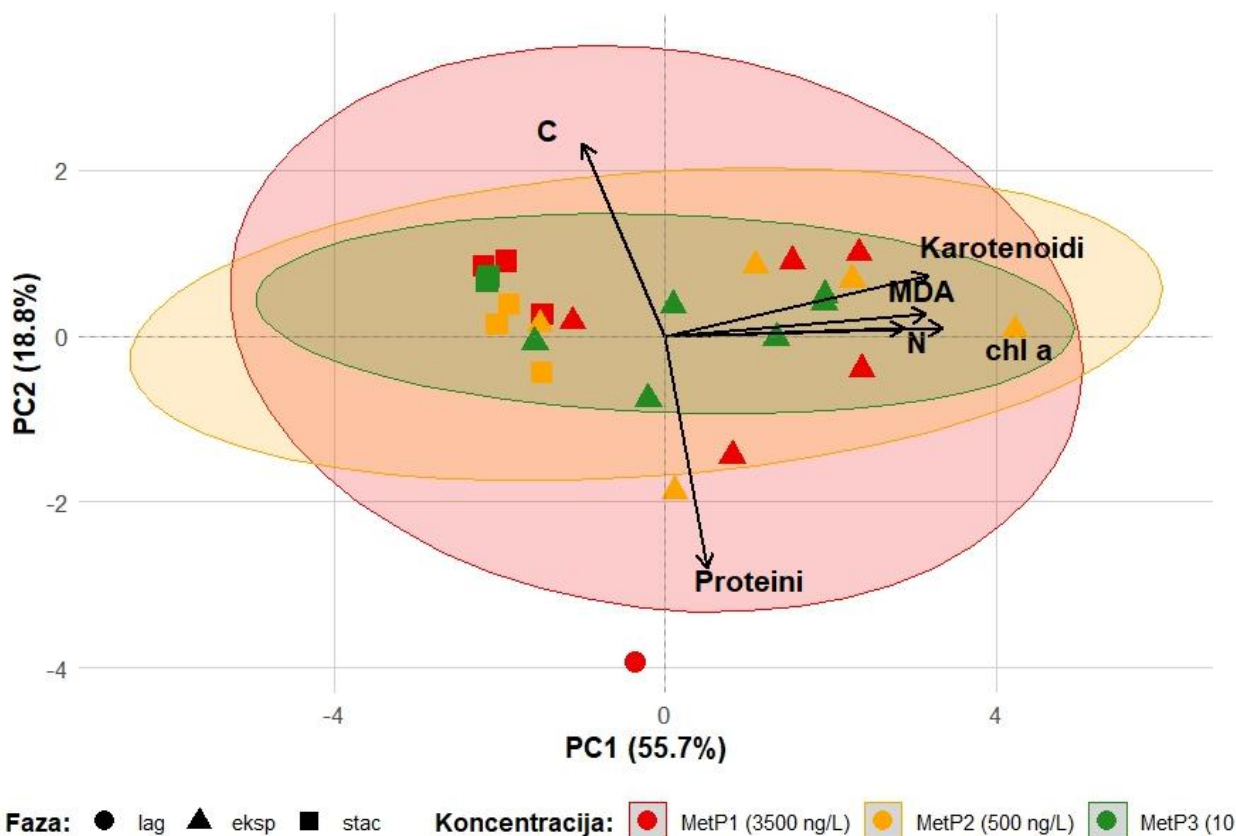
Tablica 7. MANOVA rezultati, u model uključene vrijednosti: klorofil a, karotenoida, proteina, MDA, C i N.

	Df	Pillai	Approx F	Num Df	Den Df	Pr(>F)
Koncentracija	2	0.84376	1.7027	12	28	0.1200
Faza	2	1.69807	13.1226	12	28	1.74e-08***
Koncentracija:Faza	2	0.45243	0.6821	12	28	0.7539
Residuals	18					
Signif. codes	0 ‘****’	0.001 ‘***’	0.01 ‘**’	0.05 ‘.’	0.1 ‘ ’	1

Univarijatna ANOVA provedena je da bi se dodatno utvrdio utjecaj faktora na promatrane zavisne varijable. Statistički značajan utjecaj faktora faza utvrđen je u svim promatranim zavisnim varijablama, osim u proteinima. Rezultati univarijatne ANOVA analize za sve varijable nalaze su u Dodatku.

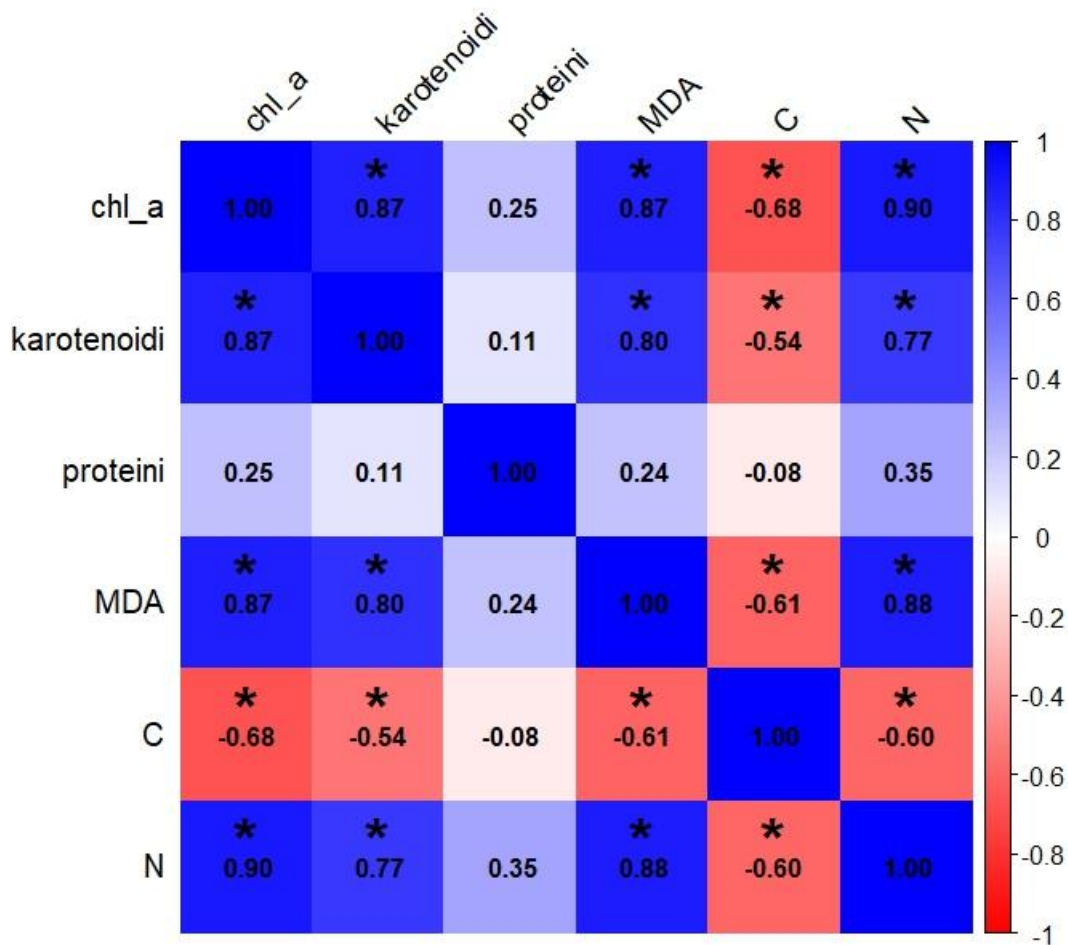
Nakon potvrđenih razlika između promatranih faktora i zavisnih varijabli, provedena je i PCA analiza kako bi se dodatno istražile glavne komponente varijacija između podataka.

PC1 os objašnjava 55,7%, a PC2 os objašnjava 18,8% ukupne varijance u podacima. PCA prikaz ukupno objašnjava 74% varijance u podacima. Na prikazu se nalaze tri elipse te svaka predstavlja pojedinu koncentraciju MetP (Slika 42). Najviša koncentracija ima najveću elipsu koja pokriva većinski dio prikaza, dok su ostale dvije elipse kompaktnije. Vektori za fotosintetske pigmente, MDA i N smješteni su zajedno na desnoj strani prikaza, dok su ostala dva vektora samostalna. Vektor C je na gornjoj lijevoj strani prikaza, a vektor proteini na donjoj desnoj strani prikaza. Uzorci iz eksponencijalne faze rasta odabranih koncentracija MetP nalaze se oko vektora chl a, karotenoida, N i MDA.



Slika 42. PCA analiza izrađena prema dva odabrana faktora, fazi rasta i koncentracije

Za dodatno potvrđivanje međusobnih odnosa između promatranih varijabli te za potvrdu nalaza provedenih analiza, izrađen je korelogram po Spearmanu s prikazanim korelacijskim odnosima (Slika 46). Spearmanov korelogram prikazuje međusobne korelacije između odabranih biokemijskih parametara prilikom tretiranja odabranih koncentracija MetP (Slika 43). Najviša pozitivna korelacija uočena je između klorofila a i dušika ($r=0,90$) što potencijalno ukazuje na moguću povezanost razine pigmenata i dostupnosti dušika. Također je izražena pozitivna korelacija MDA s fotosintetskim pigmentima ($r=0,80$ i $r=0,87$) što može ukazivati na povećanu antioksidativnu aktivnost u uvjetima oksidativnog stresa. Sadržaj ugljika pokazuje negativne korelacije s većinom parametara, posebno s klorofilom a ($r=-0,68$) i MDA ($r=-0,61$). Proteini nisu pokazali značajne korelacije s ostalim parametrima, osim blage pozitivne povezanosti s dušikom ($r=0,35$).



Slika 43. Spearman korelogram promatranih zavisnih varijabla: chl a, karotenoidi, proteini, MDA, C i N. Simbol * prikazuje statistički značajne korelacije ($p < 0,05$) te su izračunate p vrijednosti prikazane u Dodatku

3.6.2. Analiza toksičnosti medija

Analiza toksičnosti medija pokazala se neprikladnom za procjenu toksičnosti u mediju s metilparabenom. Naime, bioluminiscentne bakterije *A. fischeri* mogu svijetliti zbog različitih metaboličkih procesa i raznih produkata metabolizma, koji mogu poticati svijetljenje neovisno o prisutnosti toksičnog učinka. Pri višim koncentracijama metilparabena, uočen je *hormesis* efekt, što upućuje na to da u mediju postoji komponenta koja stimulira bioluminescenciju bakterija, a ne nužno njihovu inhibiciju.

3.6. Izrada fiziološkog i toksikološkog modela *N. gaditana*

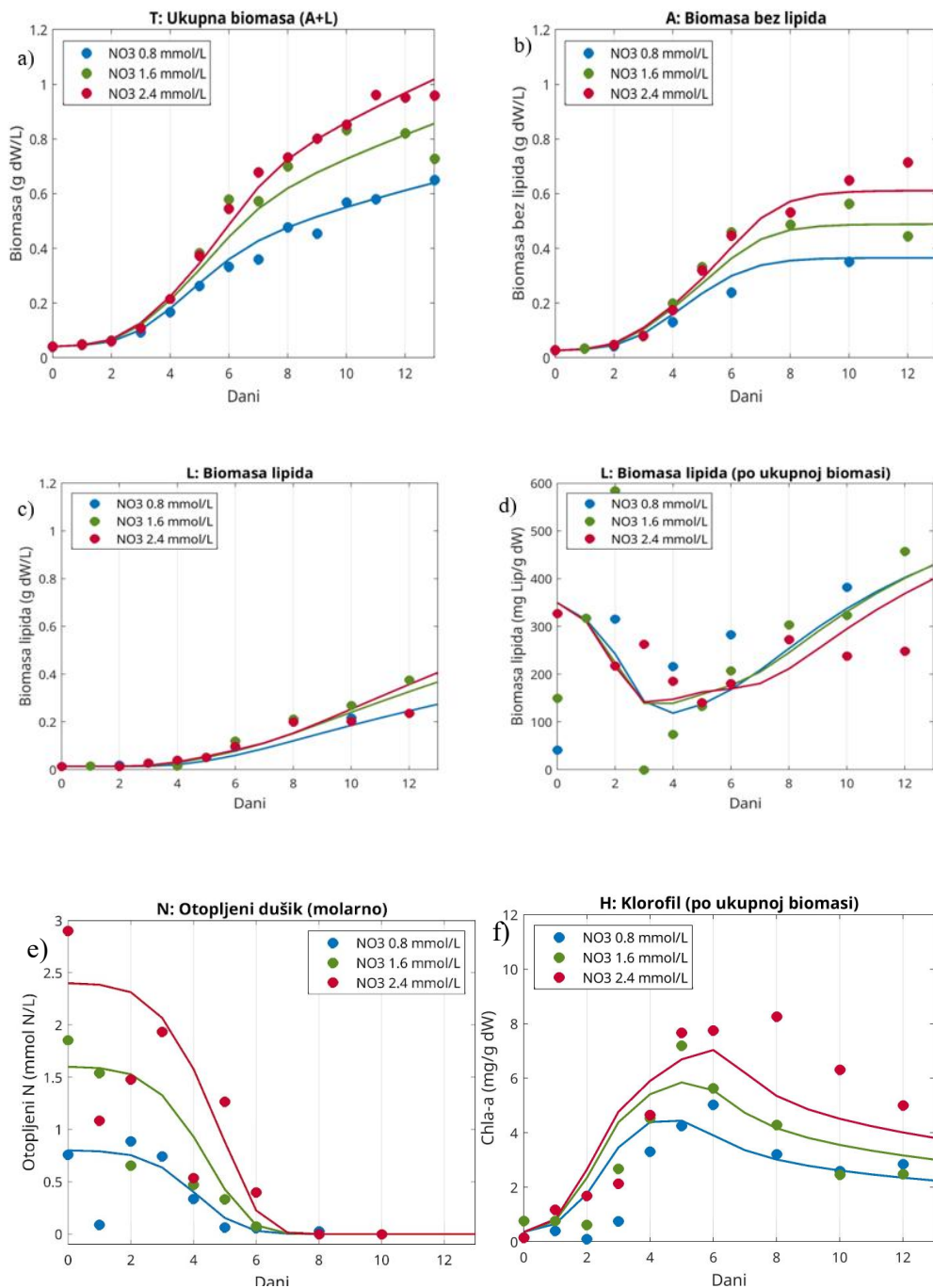
3.6.1. Fiziološki model

Fiziološki model *N. gaditana* razvio se kako bi se kvantitativno opisali i razumjeli procesi koji utječu na rast i metabolizam. Takvi modeli omogućavaju predviđanje dinamike rasta u različitim okolišnim uvjetima, u ovom slučaju dostupnosti nitrata. Fiziološki model izrađen je prema setu podataka dobivenih iz eksperimenta s nitratom i odabranim koncentracijama: 0,8 mM NO₃⁻, 1,6 mM NO₃⁻ i 2,4 mM NO₃⁻ te se model fitirao na ta mjerenja. Parametri dobiveni optimizacijskim postupkom dani su Tablicom 8.

Tablica 8. Dobiveni parametri fiziološkog modela *N. gaditana*

Parametar	
a	31,2126 m ² g ⁻¹ chl
φ	0,6358 mol C mol ⁻¹ fotona
q	0,0911 g N g ⁻¹ dw
c	0,2664 g C g ⁻¹ dw
ρ	0,4026 g chl g ⁻¹ N
v_M	0,0629 g N g ⁻¹ dw d ⁻¹
vh	9,7622 g N m ⁻³
μ_M	2,1376 d ⁻¹
p_θ	180,9880 g C g ⁻¹ chl d ⁻¹
q_M	0,8216 g N g ⁻¹ dw

Kod fiziološkog modela, varijable T i A pokazuju pozitivan odnos s povećanjem koncentracije NO₃⁻ (Slika 44a; b). Rezultati prikazuju da je tretman s 2,4 mmol/L NO₃⁻ imao najviši prinos biomase. Biomasa lipida rasla je u svim tretmanima, dok je količina lipida (po ukupnoj biomasi) bila viša u tretmanima s nižim koncentracijama NO₃⁻ u kasnijim fazama rasta (Slika 44c;d). Otopljeni N i njegova molarna vrijednost pokazali su bržu potrošnju pri nižim početnim koncentracijama nitrata (Slika 44e). Kod varijable H, najviša koncentracija chl a utvrđena je kod najviše koncentracije NO₃⁻, s jasnim padom u koncentraciji nakon kasnije eksponencijalne faze (Slika 44f).



Slika 44. Rezultati simulacije fiziološkog modela *N. gaditana* s tri početne koncentracije nitrata: 0,8 mM; 1,6 mM i 2,4 mM NO_3^- : a) prikaz ukupne biomase; b) prikaz biomase bez lipida; c) prikaz biomase lipida; d) prikaz biomase lipida (po ukupnoj biomasi); e) prikaz otopljenog N (molarno); f) prikaz klorofila a (po ukupnoj biomasi)

3.6.2. Toksikološki model

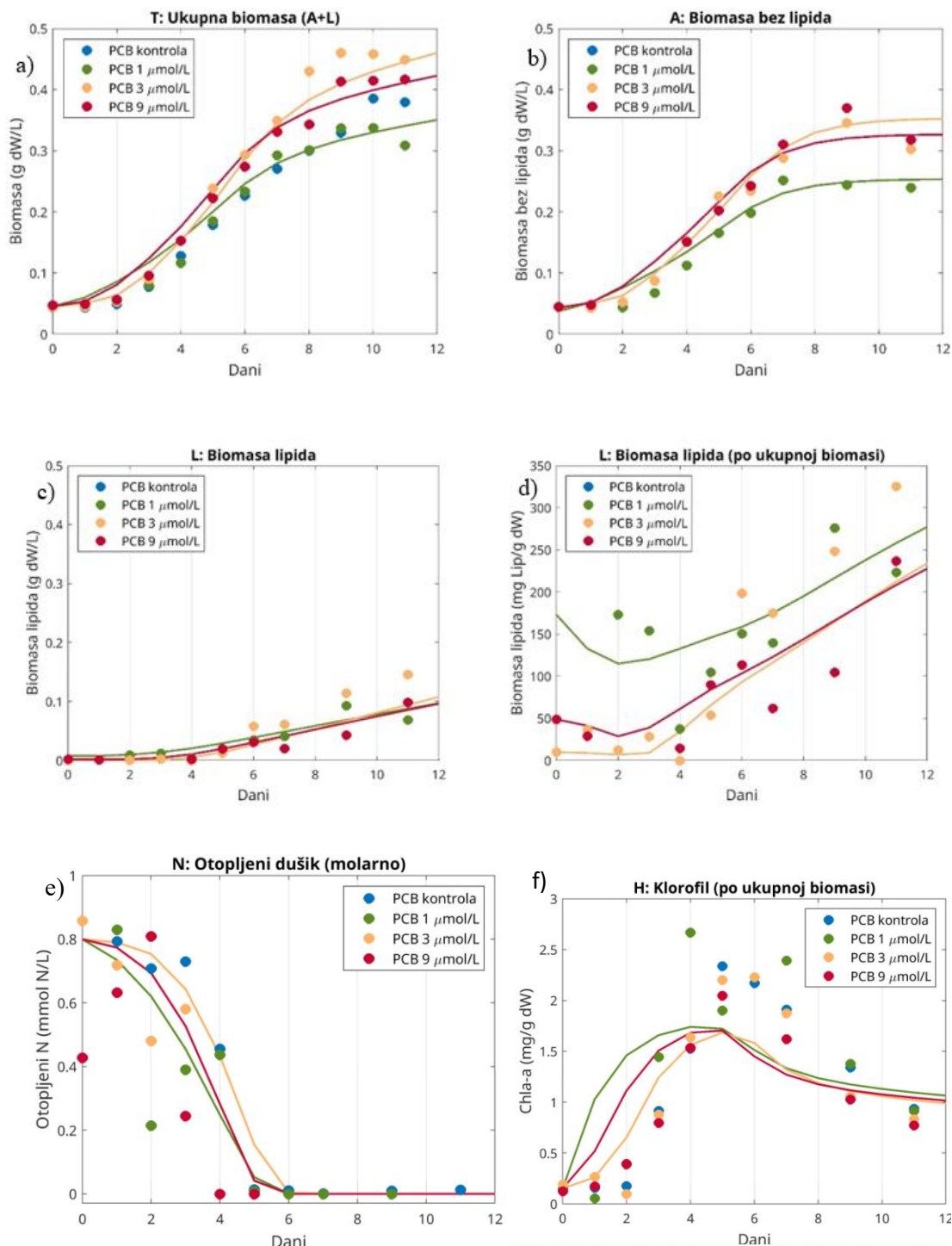
Za izradu toksikološkog modela, odabran je PCB-153 kao reprezentativno onečišćivalo. Pretpostavljeno je da će se toksikološki učinak iskazati ili na a) brzini rasta ili b) na efikasnosti sinteze lipida. Simulacije koje su uzele u obzir različite brzine rasta iskazale su značajno odstupanje varijabli A i H od mjerenih vrijednosti (Tablica 9, Slika 45). Stoga su ovdje prikazini rezultati simulacija koje uzimaju u obzir ovisnost efikasnosti sinteze lipida o razini toksikanta.

U modelu je u drugu jednadžbu za $L(t)$ dodan skalirajući faktor gamma (γ). Za koncentraciju 3 μM PCB-153, postavljeno je $\gamma_2=1,0$, a γ_1 i γ_3 (ostale koncentracije) u optimizacijskoj proceduri estimiralo zajedno s drugim parametrima. Inicijalne vrijednosti parametara su kao na početku tablice. Dodatno, inicijalne vrijednosti za: param_ γ 1=1 i param_ γ 3=1. Donja granica za te parametre je 0, a gornja granica za te parametre je 1. U Tablici 9 predstavljeni su dobiveni parametri toksikološkog modela.

Tablica 9. Dobiveni parametri toksikološkog modela *N. gaditana*

Parametar	
a	27,4234 $\text{m}^2 \text{g}^{-1} \text{chl}$
φ	1,49122 $\text{mol C mol}^{-1} \text{fotona}$
q	0,0746 $\text{g N g}^{-1} \text{dw}$
c	0,1263 $\text{g C g}^{-1} \text{dw}$
ρ	0,1505 $\text{g chl g}^{-1} \text{N}$
v_M	0,0340 $\text{g N g}^{-1} \text{dw d}^{-1}$
vh	1,3831 g N m^{-3}
μ_M	1,6203 d^{-1}
p_θ	154,2327 $\text{g C g}^{-1} \text{chl d}^{-1}$
q_M	0,3362 $\text{g N g}^{-1} \text{dw}$
γ_1 (1 μM PCB-153)	0,9199
γ_3 (9 μM PCB-153)	0,8457

Rezultati toksikološkog modela pokazuju da je varijabla T u tretmanima s PCB koncentracijama od 3 i 9 $\mu\text{mol/L}$ bila viši u odnosu na kontrolne uvjete, osobito u eksponencijalnoj fazi, dok je tretman s 1 $\mu\text{mol/L}$ PCB pokazao nešto niži rast (Slika 45a). Slični trend primijećen je kod varijable A (Slika 45b). Biomasa lipida u apsolutnim vrijednostima pokazuje blagi i konzistentni rast kroz sve tretmane, bez velikih razlika između tretmana (Slika 45c). Biomasa lipida, izražena po ukupnoj biomasi, u kasnijim fazama bila najveća u tretmanu s najnižom koncentracijom PCB-153 (Slika 45d). Koncentracija otopljenog N smanjivala se tijekom rasta u svim tretmanima, uz gotovo potpunu potrošnju do 6. dana, razdoblju ranije eksponencijalne faze (Slika 45 e;f). Klorofil a je bio najviši u ranoj eksponencijalnoj fazi u tretmanu s najnižom koncentracijom PCB-153, no kasnije su se koncentracije ujednačile između tretmana, bez značajne razlike (Slika 45f).



Slika 45. Rezultati simulacije toksikološkog modela *N. gaditana* s koncentracije PCB-153: 1 μM ; 3 μM i 9 μM : a) prikaz ukupne biomase; b) prikaz biomase bez lipida; c) prikaz biomase lipida; d) prikaz biomase lipida (po ukupnoj biomasi); e) prikaz otopljenog N (molarno); g) prikaz klorofila a (po ukupnoj biomasi)

4. RASPRAVA

4.1. Učinak NO_3^-

Porast koncentracije nitrata pozitivno je utjecao na rast i biomasu, što je bilo i očekivano te dosadašnja istraživanja potvrđuju ove spoznaje (Rocha i sur., 2003; Ma i sur., 2018; Budiša i sur., 2019).

Koncentracije pigmenata bile su u porastu kod kulture izložene s najvišom koncentracijom nitrata. Dobiveni rezultati koji ukazuju na veće koncentracije pigmenata u kulturi tretiranoj s 2,4 mM NO_3^- su u skladu s literaturom (Singh i Banerjee 2005), u kojoj se navodi da povećani unos nitrata potiče sintezu pigmenata i rast biomase. Uz visoke koncentracije pigmenata, u kulturi tretiranoj s najvišom koncentracijom nitrata, uočena je i najviša koncentracija MDA. Visoka razina MDA zajedno s visokom koncentracijom pigmenata, upućuje na intenzivniju fotosintetsku aktivnost i produkciju reaktivnih kisikovih specija (ROS). Dobiveni rezultati potvrđuju da, iako visoke koncentracije nitrata imaju pozitivan utjecaj na rast kulture i koncentraciju pigmenata, istovremeno mogu uzrokovati povećani oksidativni stres kojemu *N. gaditana* odgovara pojačanom sintezom karotenoida s fotoprotektivnom ulogom (Ma i sur., 2018).

Promjene u mediju, odnosno promjene u dostupnosti nutrijenata u mediju, u ovom slučaju nitrata, uzrokuje promjene u proizvodnji proteina i lipida (Adams, 2013). Primijećen je rastući trend u ukupnim proteinima te je primijećen porast tijekom eksponencijalne faze rasta, s najvišim vrijednostima izmjerenim pri kraju eksponencijalne faze. Ta pojava najviše je izražena u mediju s najnižom koncentracijom nitrata. U kontrolnim uvjetima u stacionarnoj fazi rasta, zabilježena je visoka razina proteina dok je u kulturama tretiranim s višim koncentracijama nitrata, koncentracija proteina bila niža u stacionarnoj fazi rasta. Unatoč tim saznanjima, sadržaj proteina u tretmanima s nitratima jasno pokazuje statistički značajan utjecaj faktora faze rasta, bez značajne interakcije između odabranih faktora, kako je potvrđeno ANOVA analizom.

S druge strane, akumulacija lipida slijedi drugačiji obrazac. Najviši udio lipida izmjeren je u kulturi tretiranoj s 1,6 mM NO_3^- tijekom stacionarne faze. Akumulacija u kasnijim fazama rasta vjerojatno je rezultat smanjenih metaboličkih aktivnosti i prijelaza na skladištenje energije, što je poznata strategija algi pod stresom ili ograničenjem rasta (Borowitzka, 2018). Statistička analiza pokazala je određenu interakciju između koncentracije nitrata i faze rasta kod varijable lipidi što je dodatno

potvrdilo da je akumulacija lipida osjetljiva na oba faktora. Uslijed limitacije i deplecije N, što dovodi do ulaska u stacionarnu fazu, dolazi do preraspodjele lipida i njihove ugradnje u karotenoide, kako bi se fotosintetski aparat prilagodio. Posljedično raste udio lipida u stanicima.

Promjene u sastavu masnih kiselina potvrđuju fiziološku promjenu stanica. U FAME profilu primijećene su C12i/a MK, odnosno izomerni oblik laurinske kiseline (C12:0) koji ima razgranati lanac, to jest *iso* (metil grana na predzadnjem ugljiku) i *anteiso* (metil grana na trećem ugljiku) razgranati lanac i C17:1 i/a (heptadecenska kiselina). Takav oblik masnih kiselina nalazi se u bakterijskim membranama, što ukazuje na prisutnost bakterija tijekom eksperimenta. Nije poznato da li je riječ o Gram pozitivnim ili Gram negativnim bakterijama, ali bitno je naglasiti da je većina morskih bakterija Gram negativna (Lee i sur., 2024). U FAME profilu, u tretmanu s najvišom koncentracijom nitrata, pronađena je i niska razina polinezasićene masne kiseline, α -linolenske kiseline (ALA), te zbog toga nije prikazana u odjeljku Rezultati. Inače je razina ALA niska u FAME profilu *N. gaditana*, dok je primjerice u vrsti *N. oceanica* potvrđena viša razina ALA (Verspreet i sur., 2021; Paterson i sur., 2023). Od PUFA, u mikroalgi *N. gaditana* prema istraživanjima (Paterson i sur., 2023 i reference sadržane unutra) najviše je zastupljena EPA te je u provedenom eksperimentu njen udio bio najviši u lag fazi kod kulture izložene s 1,6 mM NO_3^- . Uočena je značajna promjena u profilu MK, pri prijelazu iz eksponencijalne u stacionarnu fazu rasta: zastupljenost PUFA opada, dok se istovremeno povećava udio C14:1, C18:1c, osobito u kulturi s najvišom koncentracijom nitrata. Promjene u zasićenosti membrane (SAT) također su bile izražene. Nastale promjene i oscilacije ukazuju na prilagodbe staničnih membrana i metabolizma lipida tijekom prijelaza iz eksponencijalne u stacionarnu fazu rasta. Veći udio C16:0 da je pojačana sinteza TAG čija je sastavna komponenta C16:0 (Ma i sur., 2018; Xiang i sur., 2021).

Koncentracija MDA bila je najviša u kulturi s 2,4 mM NO_3^- četvrtog dana, sugerirajući da visoke koncentracije nitrata mogu uzrokovati stres u ranijim fazama rasta. Iako je riječ o prolaznom porastu, moguće je da blagi oksidativni stres djeluje kao signalni mehanizam za aktivaciju zaštitnih odgovora, uključujući sintezu karotenoida i proteina te nastanak ROS kao produkt intenzivnog metabolizma. Ova pretpostavka pokrijepljena je pozitivnim korelacijama utvrđenim u korelogramu između MDA, klorofila a i proteina što sugerira adaptivnu ulogu oksidativnog stresa (Jena i sur., 2023), dok pojačana proizvodnja karotenoida u uvjetima najviše koncentracije nitrata, potvrđuje aktivaciju antioksidativne obrane, budući da sekundarni metaboliti igraju ključnu ulogu

u neutralizaciji ROS (Ma i sur., 2018). Nadalje, nMDS prikaz također pokazuje grupiranje vektora MDA i car, dodatno potvrđujući prethodnu tvrdnju.

SIMPER analiza je ukazala na varijacije unutar nMDS prikaza, odnosno koje su razlike unutar grupa (0,8 mM NO₃⁻, 1,6 mM NO₃⁻ i 2,4 mM NO₃⁻) i razlike između istih grupa s obzirom na odabrane biokemijske markere. Unutar grupe 0,8 mM NO₃⁻ je najmanje varijacije u podacima i stoga je najstabilnija, a unutar grupe 1,6 mM NO₃⁻ je najviša varijacija u podacima. U grupi s najnižom koncentracijom nitrata, dominiraju pigmenti te je razina oksidativnog stresa niža, što nije slučaj u grupi s najvišom koncentracijom nitrata koju je obilježilo povećanje koncentracije pigmenata i pojačan oksidativni stres što ukazuje na aktivaciju fotosintetskog aparata i obrambenih mehanizama, što je sukladno s prethodnim analizama.

MANOVA i ANOVA analize potvrđuju da su koncentracije nitrata i faze rasta glavni faktori koji utječu na biokemijski sastav, pri čemu nema značajne međusobne interakcije osim u slučaju MDA. Dobiveni rezultati sugeriraju da svaki od faktora djeluje nezavisno na većinu biokemijskih parametara. Rezultati dodatno podupiru zaključak da se biokemijski odgovori mikroalge više mijenjaju s fazom rasta nego s razinom nitrata, iako povećana dostupnost nitrata svakako utječe na intenzitet tih odgovora. U PCA analizi, lipidi su pokazali slabiju povezanost s ostalim biokemijskim parametrima te su odvojen kao vektor što pokazuje da se lipidi akumuliraju pod drugačijim fiziološkim uvjetima i to najčešće u stacionarnoj fazi rasta, kada su metaboličke aktivnosti sporije i aktivnost kulture niža. Smještaj lipida u PCA prikazu ukazuje na njihovu najveću varijabilnost te na usmjerenost metabolizma lipida prema nižim koncentracijama nitrata, što potvrđuje činjenicu da smanjena dostupnost nitrata dovodi do pojačane akumulacije lipida. Isto ponašanje zabilježeno je i u drugim istraživanjima (Budiša i sur., 2019; Devasya i Bassi, 2020) gdje se akumulacija lipida povezuje s nepovoljnim uvjetima ili ograničenjem rasta.

4.2. Učinak NH₄⁺

Rezultati eksperimenta ukazuju na izraženi koncentracijski ovisan učinak amonijevih iona na rast i metabolizam mikroalge *N. gaditana*. Amonij ima primarnu ulogu kao izvor dušika, no pri višim koncentracijama djeluje toksično na stanicu, odnosno smanjuje prinos biomase i uzrokuje promjene u biokemijskim parametrima stanice (Collos i Harrison, 2014; Salbitani i Carfagna, 2021).

U ranijim fazama rasta nisu uočene razlike u rastu između tretmana, što je u skladu s ulaskom mikroalge u eksponencijalnu fazu rasta. Međutim, nakon petog dana eksperimenta, uočene su izražene razlike među tretmanima. Najniže vrijednosti biomase zabilježene su u kulturi tretiranoj s najvišom koncentracijom amonija, dok su najviše ostvarene u kontroli što potvrđuje inhibicijski učinak viška amonija. Smanjenje brzine rasta i početna manja gustoća biomase pri većim početnim koncentracijama amonija može se pripisati pretjeranoj akumulaciji amonija i poremećaju u metabolizmu dušika, kao što je inhibicija enzima uključenih u asimilaciju (npr. GS/GOGAT sustav) (Salbitani i Carfagna, 2021).

Porast udjela pigmenata i proteina, posebice u kulturi tretiranoj s 1,6 mM NH_4^+ , pokazuje aktivaciju obrambenih mehanizama stanice, uključujući antioksidativnu zaštitu i sintezu stresom induciranih proteina. Zabilježen je i porast lipida u kasnim fazama, osobito u tretmanu s 0,8 mM NH_4^+ i 1,6 mM NH_4^+ , što je u skladu s literaturom (Budiša i sur., 2019), gdje je viša koncentracija amonija također dovela do inhibicije rasta i povećanje lipida (do 40%).

Analiza sastava MK otkrila je zastupljenost C16:0, ali i značajne promjene u dinamici U profilu masnih kiselina značajan udio zauzimaju i mononezasićene kiseline, pri čemu dinamika između zasićenih i nezasićenih kiselina odražava metabolički odgovor stanice na okolišne uvjete, odnosno njezino fiziološko stanje te se mijenja s fazom rasta. Saturacija masnih kiselina smanjuje se tijekom intenzivne diobe stanica u eksponencijalnoj fazi, dok s usporavanjem diobe dolazi do povećanja zasićenosti. U stacionarnoj fazi prestaje sinteza membranskih lipida, a većina ugljika preusmjerava se u sintezu triglicerida i pohranu energije (Xiang i sur., 2021).

Porast MDA u svim tretmanima s amonijem ukazuje na pojavu oksidativnog stresa. nMDS analiza ukazuje na grupiranje uzoraka, većinski iz eksponencijalne faze oko chl a i car vektora ukazujući na pojačanu metaboličku aktivnost i pojavu oksidativnog stresa, što je dodatno poduprto grupiranjem najviše koncentracije amonija oko MDA vektora. Uzorci tretirani najmanjom koncentracijom amonija, u eksponencijalnoj fazi rasta, grupirani su oko C/N vektora, pri čemu je zabilježen viši C/N C/N omjer u odnosu na druge tretmane amonijem, što je potvrđeno i u poglavlju Rezultati. Razlog tome je, budući da je niža koncentracija dušika, slabiji unos dušika što dovodi do neravnoteže između unosa N i C. C se i dalje nakuplja (fotosintezom), dok je N niži što rezultira nižim udjelima proteina, što je vidljivo u odjeljku Rezultati, i ostalim spojevima koji sadržavaju dušik kao što su DNA, RNA i enzimi (Sterner i Elser, 2002; Collos i Harrison, 2014).

SIMPER analiza dodatno je potvrdila prethodne tvrdnje ukazujući na značajne razlike između koncentracija koje utječu na fiziološke parametre. Grupa 0,8 mM NH_4^+ ima nizak metabolički intenzitet, više C/N omjere, nisku fotosintetsku aktivnost i stres. S druge strane, grupa 1,6 mM NH_4^+ pokazuje metabolički aktivniju grupu s DETRIT vektorom kao dominantni, ukazujući na bakterijsku aktivnost i prisutnost bakterija u eksperimentu.

Dodatne statističke analize, MANOVA i ANOVA, dodatno potvrđuje utjecaj koncentracije na pigmente, dok faza rasta utječe na koncentraciju proteina i dušika. Značajna interakcija između faktora potvrđena za varijablu proteini naglašava kako se učinak amonija mijenja ovisno o fiziološkom stanju kulture. Spearmanova korelacija dodatno ukazuje na pozitivne veze između pigmenata, MDA i N kao i negativne korelacije između proteina i N te između C i pigmenata.

Nadalje, PCA prikazi ukazuju da su varijable povezane s aktivnim rastom (pigmenti) grupirane zajedno, dok su stresne varijable (MDA, lipidi) bile odvojene. Ovi nalazi ukazuju na promjenu u metaboličkoj aktivnosti u smjeru obrambenih mehanizma i skladištenja lipida pod stresom izazvanim viškom amonija.

U ekotoksikološkom kontekstu, nalazi potvrđuju da amonij djeluje kao stresor čiji se učinak ne mora odmah očitovati toksično već se razvija kroz narušavanje fiziološke ravnoteže stanice. Rezultati analize toksičnosti medija sugeriraju vrijeme oporavka i potencijalan razvoj adaptacijskog odgovora u kulturi tretiranoj s najvišom koncentracijom amonija. Pojava toksičnosti već deveti dan u kulturi tretiranoj s najvišom koncentracijom amonija je vjerojatno zbog energetske potrebe za detoksifikacijskim procesa i smanjene ATP proizvodnje, sukladno s provedenim istraživanjem (Nan i sur., 2024).

4.3. Učinak PCB-153

PCB-153, uz PCB-28, je jedan od najčešće pronađenih PCB spoj u Jadranskom moru (Kljaković-Gašpić i sur., 2015; Jakovljević i sur., 2021). Oba spoja su indikatorske vrste PCB prisutne u morima. Iako imaju različit broj atoma klora (PCB-28 ima tri, dok PCB-153 ima šest), njihove ostale karakteristike su iste, visoka lipofilnost, bioakumulativni potencijal i postojanost u okolišu (Herceg-Romanić i sur., 2024).

U ovom eksperimentu, utvrđeno je da sve ispitane koncentracije PCB-153 omogućuju rast *N. gaditana*, a viši prinosi biomase u uzorcima tretiranim s višim koncentracijama PCB-153 u odnosu na kontrolne uvjete ukazuju na moguću adaptaciju na prisutnost odabranog postojanog organskog onečišćivala. Navedeni su rezultati su suprotni od rezultata dobivenih u istraživanju Halm-Lameille i sur. (2014). Halm-Lameille i sur. (2014) su proveli istraživanje utjecaja PCB-28 i PCB-153 na mikroalgu *Pseudokirchneriella subcapitata*. Rast mikroalgi, u oba slučaja, bio je sličan kao u kontroli pri niskim koncentracijama, dok su koncentracije 2,5 μM , 5 μM , 10 μM i 20 μM u slučaju PCB-153 bile potpuno letalne za promatranu vrstu. Halm-Lameille i sur. (2014) zaključili su da je toksičnost PCB korelirana s niskim logKow vrijednostima. Što je viša vrijednost, toksičnost spoja je manja. PCB-153 ima logKow vrijednost 7.64 što pokazuje da je hidrofoban spoj koji se bioakumulira u organizmima, posebice u lipidima.

Biokemijska analiza pokazala je da povišenje u koncentraciji klorofila a u pojedinim točkama mjerenja u tretmanu s 1 μM PCB-153 u odnosu na kontrolne uvjete što sugerira pozitivnu reakciju na umjereni stres. Karotenoidi su također pokazali porast u koncentraciji u tretmanima s 1 μM PCB-153 i 3 μM PCB-153, posebno šesti dan, u ranoj eksponencijskoj fazi, što dodatno podupire njihovu ulogu u obrambenim mehanizmima protiv oksidativnog stresa. Unatoč tome, izmjerene koncentracije karotenoida su bile niže od uobičajenih, ukazujući na potencijalno loše fiziološko stanje stanice.

Koncentracije proteina pratio je rastući trend u lag fazi i nižih koncentracija u kasnijim fazama rasta u svim tretmanima, s izuzetkom povišenja u tretmanu s 3 μM PCB-153 na kraju eksperimenta što može ukazivati na kasnu aktivaciju specifičnih proteinskih odgovora. Međutim, prilikom određivanja koncentracije lipida zabilježen je obrnuti trend, odnosno postupni porast udjela lipida od sedmog dana eksperimenta nadalje. Najviši udio lipida zabilježen je u uzorku tretiranom s 3 μM PCB-153, što upućuje na potencijal PCB-153 u stimulaciji akumulacije rezervnih tvari, u ovom slučaju lipida.

FAME profil pokazuje smanjenje dominantnosti C16:0 (SAT), s povišenjem C16:1c (MUFA) u kasnijim fazama eksperimenata prilikom izlaganja svim koncentracijama PCB-153. Navedene promjene upućuju na narušen integritet membranskih lipida i adaptivne promjene membrane (Morales i sur., 2021). Porast PUFA (C18:2(n-6), linolna kiselina), izraženo prilikom tretiranja kulture s 3 i 9 μM PCB-153, ukazuje na potencijalni adaptivni odgovor na stresne uvjete. Prilikom

izlaganja *N. gaditana* najvišom koncentracijom PCB-153, uočena je i povećana razina EPA pri kraju eksperimenta, koja nije uključena u prikaz jer je udio bio <50 mg/g. Uloga PUFA, posebice EPA koja je prisutna u FAME profilu *N. gaditana* je održavanje fluidnost membrane, smanjivanje proizvodnje ROS i sukladno s time, snižavanje oksidativnog stresa (Navalho i sur., 2025). Budući da je PCB-153 spoj koji se ugrađuje u membranu (Halm-Lemeille i sur., 2014), moguće da je stanica povećava razinu EPA kako bi stabilizirala membranu. Sukladno tome, primijećene su niže MDA koncentracije u kulturi izloženoj s najvišom koncentracijom PCB-153, dok su više koncentracije MDA primijećene su u tretmanima s 1 μ M PCB-153 i 3 μ M PCB-153, što sugerira na izražen oksidativni stres pri toj koncentraciji. nMDS analiza pokazala je grupiranje uzoraka iz stacionarne faze izložene najvišom koncentracijom PCB-153 oko PUFA vektora.

SIMPER analiza ukazuje na fazno specifične promjene. U eksp fazi pojačana metabolička aktivnost, s porastom koncentracije klorofila a, MDA i PUFA što sugerira pojačan oksidativan stres i adaptaciju stanica na intenzivan rast. U stac fazi glavni doprinositelj bio je vektor MDA što ukazuje na izražen stres, starenje kulture i potencijalno oštećenje membrane. Glavni doprinositelji razlici između lag i eksp faze ukazuju chl a vektor, što ukazuje na pojačanu fotosintetsku aktivnost i aktivaciju fotosintetskog aparata u eksp fazi. Prisutnost vektora DETRIT ukazuje na prisutnost bakterija, što je prikazano nMDS analizom s uzorcima iz lag faze grupirani oko njega. Prelazak iz lag u eksp fazu praćen je porastom rasta i pojačanom metaboličkom aktivnošću, dok je prijelaz iz eksp u stac fazu obilježen naglim povećanjem oksidacijskim oštećenjem i fiziološkim stresom, osobito zbog povećanja PUFA i C/N omjera, što ukazuje na usporavanje metabolizma. U stac fazi dolazi do pada rasta, nakupljanja oksidacijskih produkata i povećanje udjela PUFA.

ANOVA test pokazao je da faza rasta značajno utječe na klorofil a, proteine, lipide i C, dok je interakcija faktora imala značajan utjecaj na proteine i C. Spearmanova korelacija potvrdila je povezanost pigmenata, lipida i N, dok su lipidi i C također bili snažno korelirani. Negativna povezanost između C i N te između pigmenata i C sugerira postojanje kompetitivne dinamike između metabolita u različitim fazama rasta. PCA analiza dodatno potvrđuje odvajanje uzoraka na temelju koncentracije PCB-153 i faze rasta. Kontrolni uzorci su jasno odvojeni od tretiranih, dok su tretmani s PCB-153 pokazali različite obrasce grupiranja ovisno o koncentraciji.

Multivarijante statističke analize pokazale su statistički utjecaj faktora faze rasta na fiziologiju *N. gaditana*. Analiza toksičnosti medija utvrdila je da je toksičnost bila najviša devetog dana na

vrhuncu eksponencijalne faze, što je faza najviše metaboličke aktivnosti. Utvrđena toksičnost medija u odabranim visokim koncentracijama ukazuje na prolaznu akutnu toksičnost pri koncentraciji 3 μ M PCB-153 s djelomičnim oporavkom kulture na kraju, odnosno stalnu toksičnost bez perioda oporavka pri koncentraciji 9 μ M PCB-153.

4.4. Učinak VFN

Rezultati eksperimenta ukazuju na različite fiziološke odgovore *N. gaditana*, ovisno o koncentraciji VFN i fazi rasta.

U ranijim fazama rasta, više koncentracije VFN imaju izražen pozitivan učinak na rast kulture u odnosu na kontrolne uvjete i 1% VFN. Veći prinos biomase i brži početni rast zabilježeni su u tretmanima s višim koncentracijama VFN, što sugerira da je VFN djelovala kao dodatni izvor nutrijenata u ranim fazama rasta. Ovi rezultati u skladu su s literaturom koja ukazuje na potencijal stimulacije mikroalgi niskim do umjerenim koncentracijama organskih spojeva pronađenih u VFN (Koshikawa i sur., 2007; González i sur., 2013). U navedenim istraživanjima primijećeno je da se prisutnost dominantnih vrsta u konzorciju drastično smanjila prilikom izlaganja VFN te da su ostale vrste tolerantne na VFN postale dominantne. Jedna od karakteristika koja je primijećena u promjeni dominantnosti vrsta, poglavito dijatomeja je razlika u veličini stanica. Naime, prethodno dominantne vrste, netolerantne na VFN bile >20 μ m, dok su dijatomeje tolerantne na VFN bile <20 μ m. Utvrđena tolerancija mikroalgi na onečišćenje nastalo zbog formiranja VFN veća je od tolerancija zooplanktona. Veličina *N. gaditana* varira između 2-4 μ m te je to faktor koji bi se potencijalno trebao uzeti u obzir u budućim istraživanjima (Rocha i sur., 2003).

Povišene koncentracije fotosintetskih pigmenata u kulturama tretiranih s VFN primijećene su u ranim fazama rasta, što sugerira fototrofnu aktivnost i mogući inicijalni metabolički poticaj. Međutim, u kasnijim fazama rasta dolazi do naglog pada pigmenta u tretmanima s 5% i 10% VFN, što može ukazivati na nastali stres (Sargian i sur., 2007). Veće koncentracije lipida i proteina u stacionarnoj fazi zabilježene su kod tretmana s 5% i 10% VFN. To sugerira metaboličko preusmjerenje prema sintezi rezervnih proteina i lipida.

C/N analiza pokazala je različite metaboličke odgovore ovisne o koncentraciji onečišćujućih spojeva. Kod kulture izložene OV rafinerije nafte, u početnoj fazi eksperimenta, uočen je pad u

C/N omjeru što ukazuje na stresne uvjete. Kasniji porast u C/N omjeru potencijalno upućuje na djelomičnu prilagodbu stanice na onečišćujuće spojeve prisutne u OV (Pritišanac i sur., 2025). Rezultati analize toksičnosti medija potvrđuju ovu interpretaciju, budući da je utvrđeno smanjenje toksičnosti medija za 50% tijekom eksperimenta vjerojatno zbog biološke razgradnje toksičnih spojeva, njihovog apsorpiranja na staničnu biomasu ili aktivacije detoksikacijskih mehanizama unutar stanica mikroalgi (Fazal i sur., 2018; Pritišanac i sur., 2025). Jedan od razloga, zašto je uopće nastupio akutni stres leži u tome da OV iz rafinerije nafte predstavljaju kompleksnu i heterogenu smjesu koja uključuje merkaptane, sulfate, fenole i ostalo. Iako je, zakonski, navedena OV prošla određeni stupanje obrade, ona je i dalje sadržavala značajnu količinu onečišćujućih spojeva koji utječu na metabolizam (Blažina i sur., 2019). Kao smjesa, VFN je neobrađeni izvor naftnih spojeva, primarno aromatskih ugljikovodika (Pi i sur., 2015; Kuttiyathil i sur., 2020). S druge strane, eksperimentalni rezultati pokazuju da je kultura *Nannochloropsis gaditana* tretirana s 5% VFN imala najizraženiji porast unutarstaničnog C/N omjera u odnosu na 1% i 10% VFN te OV tretman. To sugerira da srednja koncentracija VFN uzrokuje snažniji metabolički pomak, vjerojatno zbog optimalne kombinacije dostupnog ugljika i umjerene toksičnosti, što omogućuje nakupljanje ugljikovih zaliha bez potpune inhibicije metabolizma.

FAME profil pokazao je prevlast zasićenih (C16:0) i mononezasićenih (C16:1) MK kroz sve faze raste s izraženim oscilacijama u tretmanima s 5% i 10% VFN. Prema ranijim istraživanjima (Koshikawa i sur., 2007; González i sur., 2013) izloženost VFN može povećati proizvodnju ROS, što aktivira superoksid dismutazu (SOD) kao zaštitni odgovor stanice. Međutim, visoke razine MDA u tretmanima s 5% i 10% VFN ukazuju na izražen oksidativni stres, što upućuje na to da antioksidativni odgovor možda nije dostatan za neutralizaciju ROS (Wang i Zheng, 2008).

Multivarijatne analize potvrdile su fazno-specifične promjene. SIMPER analiza pokazala je da najvećerazlike između faza uzrokuju MDA, PUFA, SAT, MUFA, chl a i DETRIT što upućuje na oksidacijski stres, lipidnu peroksidaciju i oštećenje stanice, posebno u stacionarnoj fazi.

Rezultati nMDS analize pokazuju jasnu prostornu separaciju uzoraka između različitih faza rasta. Uzorci iz lag faze grupirani su između vektora SAT i MDA, što sugerira nižu metaboličku aktivnost i niski oksidativni stres, ali s prisutnošću zasićenih masnih kiselina, koje su često dominantne u ranijim fazama rasta. Grupiranje uzoraka oko SAT vektora ukazuje na promjene u FAME profilu i na promjene unutar stanice kao što je rigidnija membrana (Morales i sur., 2021).

U eksponencijalnoj fazi, uzorci se grupiraju između vektora MDA i chl a, što upućuje na pojačanu fotosintetsku aktivnost i intenzivniji metabolizam, ali također i na porast oksidativnog stresa, što potvrđuje i povišena razina MDA. Uzorci iz stacionarne faze nalaze se u blizini DETRIT što ukazuje na prisutnost bakterijskih ostataka ili degenerativne promjene u kulturi. SIMPER analiza dodatno pojašnjava ove odnose. Najveća unutarfazna varijabilnost zabilježena je u lag fazi, što sugerira da je u toj fazi velika razlika između pojedinih uzoraka. Stacionarna faza je bila najhomogenija, što je očekivano s obzirom na prestanak aktivnog rasta. Kao glavni doprinositelji unutar faza, identificirani su: PUFA i UND u lag fazi, car, chl a, MDA u eksp fazi te MUFA, PUFA i DETRIT u stac fazi. Prijelazi između faza odražavaju pomak od rasta prema oksidativnom opterećenju i metaboličkoj neravnoteži.

MANOVA i ANOVA potvrdile su statistički značajan utjecaj koncentracije VFN i faze rasta na većinu zavisnih varijabli, ali ne i njihovu interakciju. Prethodno spomenute promjene u koncentraciji proteina, lipida i MDA upućuju na metaboličko preusmjerenje s procesa rasta prema akumulaciji rezervni tvari i zaštitnih molekula što održava metaboličku plastičnost stanica u uvjetima stresa (Huang i sur., 2011; Garr i sur. 2014), što potvrđuje korelacijska analiza. Pozitivne korelacije pigmenata, MDA i dušika ukazuju na metaboličku aktivnost i fotooksidativni stres, dok negativna korelacija između proteina i pigmenata te proteina i MDA, sugerira prebacivanje metaboličkih prioriteta s rasta na sintezu zaštitnih molekula u kasnijim fazama. Korelacija proteina i ukupnog ugljika bila je pozitivna što podupire hipotezu o akumulaciji organskih spojeva u stacionarnoj fazi.

4.5. Učinak MetP

Onečišćivala od rastućeg značaja, kao metilparaben, na molekularnoj razini, mogu prijanjati na negativno nabijenu površinu mikroalge ili vanjski polimerni sloj (oko stanice) kroz elektrostatske interakcije (Sutherland i Ralph, 2019; Viancelli i sur., 2020). Zbog toga, proces bioadsorpcije može predstavljati prvi kontakt između onečišćivala i stanice, koji ne mora nužno biti toksičan već može uzrokovati promjene u stanicite izazvati stresne reakcije (Hussein i sur., 2017). Procesu bioakumulacije i biodegradacije MetP unutar stanice mogu dodatno komplicirati interpretaciju

rezultata jer mogu voditi do stvaranja toksičnih ili netoksičnih metabolita i raspad MetP, ovisno o stanju stanice (Rampel i sur., 2021; Vale i sur., 2022).

U provedenom eksperimentu, utjecaj MetP na rast *N. gaditana* nije bio značajan, što je potvrđeno vrlo sličnim krajnjim vrijednostima biomase u kontrolnim uvjetima i u kulturama tretiranim s MetP. Ipak, biokemijski parametri ukazuju na prisutnost stresnog odgovora.

Utvrđene su promjene u koncentraciji fotosintetskih pigmenata tijekom rasta te je najviša koncentracija zabilježena u tretmanu s 500 ng/L MetP, dok je smanjena razina pigmenata utvrđena u tretmanu s 3500 ng/L. Ovi rezultati potencijalno ukazuju na doziranu fiziološku osjetljivost bez izraženog učinka na rast. Sukladno s radu od Vale i sur (2022), odabrane koncentracije MetP nisu imale drastičan utjecaj u proizvodnji pigmenata u odnosu na kontrolu. Koncentracija proteina bila je najviša u lag fazi rasta, a kasnije značajno niža kroz sve tretmane. Zbog djelovanja visokih koncentracija MetP, moguće je da je nastupilo do oštećenja stanica, odnosno do značajnih promjena u komponentama stanice, pri čemu se mijenja koncentracija proteina i lipida (Hansda i Kumar, 2016).

Sastav masnih kiselina pokazuje promjene, osobito kod tretmana s najvišom koncentracijom MetP gdje su uočene oscilacije u zastupljenosti SAT, MUFA i PUFA što ukazuje na reorganizaciju membranskih lipida, što služi za očuvanje integriteta membrane u obliku pojačanja krutosti membrane i smanjenja fluidnosti (Morales i sur., 2021). U svim tretmanima, zastupljenost SAT bila je najviša. Povišene SAT vrijednosti uočene je u lag i eksponencijalnoj fazi rasta.

Visoke koncentracije MDA mogu dovesti do oštećenja membrane lipida, proteina i DNA što u konačnici vodi do stanične smrti (Patil i Kaliwal, 2019). Valle i sur. (2022) su imali niske vrijednosti ROS te su predložili da je razlog tome: bioakumulacija nije značajna i/ili produkti raspadanja nisu toksični za stanicu. Mikroalge imaju zaštitni mehanizam protiv oštećenja nastalih prilikom prekomjerne proizvodnje reaktivnih kisikovih specija kao što su induciranje ekspresije antioksidativnih enzima i/ili karotenoida (Patil i Kaliwal, 2019). Izmjerene visoke razine MDA, u usporedbi s kontrolnim uvjetima, posljedica su peroksidacije membrane zbog nastalog stresa, što je potvrđeno u nMDS prikazu gdje su uzorci iz lag faze tretirani najvišom koncentracijom MetP grupirali oko MDA vektora.

Statističkom analizom potvrđena je korelacija razine MDA s pigmentima, upućujući na povećanu antioksidativnu aktivnost. nMDS analiza pokazala je grupiranje SAT i MDA posebice u eksponencijalnoj i stacionarnoj fazi rasta što može značiti povezanost između oksidativnog stresa i promjena u lipidnom sastavu.

Statističke analize potvrdile su prevlast u utjecaju faktora faza na biokemijske varijable što upućuje da unutarnja dinamika stanice ima veći utjecaj od samog stresa uzrokovanog izlaganju MetP. PCA analiza i Spearmanova korelacija dodatno potvrđuju vezu između MDA, pigmenata i N, dok je C negativno koreliran s istim varijablama, što ukazuje na energetska preusmjerenje tijekom oksidativnog stresa.

Budući da nema značajnog utjecaja na biomasu, otvara se mogućnost potencijala vrste u bioremedijaciji otpadnih voda opterećenim metilparabenom (Chang i sur., 2023). Rezultati upozoravaju da fiziološki stres ne mora biti vidljiv kroz rast, što implicira da se učinci nižih doza onečišćivala mogu akumulirati u stanici s vremenom. Odabrane koncentracije odgovaraju rasponu onim pronađenim u otpadnim vodama, no potrebno je provesti i istraživanja s višim koncentracijama koja će omogućiti jasnije razumijevanje utjecaja MetP na fiziologiju stanice.

Nadalje, analiza toksičnosti medija nije pouzdana u ovom kontekstu jer se prikazao *hormesis* učinak, odnosno fenomen pri kojem niske koncentracije onečišćivala mogu potaknuti stimulaciju fizioloških procesa. Takav je učinak opažen kod izlaganja alge *Chlorella* sp. fenolu (Gomaa i sur., 2023). Kao alternativni pristup, moguća je primjena testa inhibicije rasta algi (OECD No. 201, 2011)

Detaljne statističke obrade podataka, uključujući SIMPER i MANOVA analizu, pokazale su da je na fiziologiju i stanični odgovor *N. gaditana* najviše utjecala faza rasta, kompletno zanemarujući utjecaj faktora koncentracija ukazujući na to da je utjecaj koncentracije bio gotovo zanemariv. U radu Valle i sur. (2022), korištene su vrlo visoke koncentracije metilparabena (do 100 x više od koncentracija pronađenih u OV), u svrhu razumijevanja negativnog utjecaja metilparabena na fiziologiju mikroalgi i procjenu potencijala korištenja mikroalgi u procesu bioremedijacije OV opterećenih parabenima. Ovim eksperimentom, utvrđeno je da metilparaben, unatoč vrlo niskim korištenim koncentracijama, uzrokuje određene promjene u fiziologiji, posebno u razini MDA koja je najviša u odnosu na ostale provedene eksperimente.

4.6. Izrada fiziološkog i toksikološkog modela

Rezultati fiziološkog modela ukazuju na pozitivan učinak visoke koncentracije nitrata na rast, biomasu i fotosintetsku aktivnost *N. gaditana*. Najviša koncentracija nitrata dovela je do najviših vrijednosti varijable A i T, što je u skladu s literaturom, odnosno da dostatan izvor dušika, u ovom slučaju nitrata, osigurava optimalne uvjete za sintezu proteina, pigmenata i rasta stanice. S druge strane, relativni udio lipida, izražen po ukupnoj biomasi, bio je viši u tretmanima s nižom koncentracijom nitrata, što podupire i Packer i sur. (2011). Brza potrošnja otopljenog N pri nižim početnim koncentracijama, potvrđuje da je riječ o metaboličkom odgovoru na nutritivni stres. Toksikološki model ukazuje na stimulativni učinak PCB-153 na rast *N. gaditna* čak i pri višim koncentracijama.

Primjena modela optimizacije (Lagarias i sur., 1998) u oba izrađenja modela potvrđuje da je Nelder-Mead simplex metoda učinkovita u pronalaženju optimalnih parametara za biološke modele, čak i pri složenim i višedimenzionalnim interakcijama varijabli. U ovom slučaju omogućila je precizno prilagođavanje krivulja za rast, potrošnju N i promjene biokemijskih pokazatelja čim se poboljšala interpretacija rezultata i usporedba između fiziološkog i toksikološkog stanja.

5. ZAKLJUČAK

U provedenim istraživanjima, praćen je opseg fizioloških promjena prilikom izlaganja visokim koncentracijama nutrijenata (NO_3^- i NH_4^+) i odabranim onečišćivalima: PCB-153, VFN i MetP. S ciljem boljeg razumijevanja adaptacijskog odgovora *N. gaditana* na onečišćenje iz antropogenih izvora provedena su ekstenzivna biokemijska i toksikološka istraživanja, u kombinaciji s *in silico* analizama.

Navedenim istraživanjem utvrđene su sljedeće spoznaje:

1. Najveći negativan utjecaj na kinetiku rasta pokazala je izloženost *N. gaditana* amoniju. S porastom koncentracije amonijevih iona vidljiv je brži ulazak u stacionarnu fazu i pad postignute konačne gustoće biomase stanične kulture. Izloženost polikloriranom bifenilu PCB-153 rezultirala je nespecifičnim odgovorom rasta stanica, pokazujući stimulativni efekt u stacionarnoj fazi pri višim koncentracijama onečišćivala PCB-153. Izloženost vodotopivoj frakciji nafte je pokazala stimulativan učinak na kinetiku, dok za izloženost metil-parabenu u rasponu koncentracija od 0.01-3.5 $\mu\text{g/L}$ nije zabilježen ni pozitivan ni negativan učinak na kinetiku i rast *N. gaditana*.
2. Učinak prisutnosti onečišćivala na metabolizam *N. gaditana*, ogleda se u sintezi i odnosu fotosintetskih pigmenata, sintezi proteina i lipida, te dinamici ugradnje ugljika i dušika. Izrazito pozitivan učinak na sintezu pigmenata zabilježen je pri izloženosti *N. gaditana* amoniju, dok u prisutnosti nafte i PCB-153 nema značajnog učinka na koncentraciju pigmenata u stanicama. Izražena akumulacija lipida u stacionarnoj fazi primijećena je pri rastu na najvišoj koncentraciji vodotopive frakcije nafte. Metabolizam proteina dominantno je kontroliran fazom rasta, asimilacijom dušika i dinamikom pigmenata u stanici. Nasuprot tome, vodotopiva frakcija nafte i PCB-153 pokazali su značajan učinak na metabolizam lipida i ugradnju ugljika u stanice.
3. Promjene u strukturi membranskih lipida i oslobađanje peroksidacijskih produkata indikator su stresa u stanicama fitoplanktona, uzrokovanog nepovoljnim okolišnim uvjetima ili izloženosti onečišćivalima. Zdrav rast i sinteza polinezasićenih (PUFA) kiselina C18 i C20 vidljivi su, u većini, u eksponencijalnoj fazi prilikom rasta *N. gaditana* na oba izvora dušika (NO_3 i NH_4). Najveće uočene oscilacije u zastupljenosti PUFA, u stanicama izloženim polikloriranom bifenilu PCB-153 te izostanak sinteze dugolančanih

(C20) PUFA ukazuju na adaptivnu reorganizaciju lipida u staničnoj membrani kao fiziološki odgovor na nepovoljne uvjete okoliša. Međutim, najveća razina oksidativnog stresa prisutna je izlaganjem *N. gaditana* vodotopivoj frakciji nafte i metilparabenu, što je i očekivano s obzirom na veću zastupljenost polinezasićenih masnih kiselina.

4. Rezultati su pokazali veliku ekofiziološku plastičnost pikoeukariotske alge *N. gaditana*, s dobrim adaptacijskim potencijalom prema različitim izvorima dušika, te metil parabenu i komponentama nafte topivim u polarnim uvjetima. Unatoč energetske zahtjevnosti prilagodbi s uočenim odrazom u kinetici rasta i strukturi stanične membrane, najizraženiji učinak remedijacije *N. gaditana* je pokazala u prisutnosti PCB-153, sa (2-5)-erostrukim umanjenoj relativne toksičnosti medija u eksponencijskoj fazi.
5. Ekotoksikološki model izrađen na temelju empirijskih podataka o dinamici rasta i biokemijskim promjenama stanica *N. gaditana* pri izloženosti PCB-153 u rasponu koncentracija 3 – 9 $\mu\text{mol/L}$. Modelom je utvrđeno da u cjelokupnom rasponu koncentracija PCB-153 biomasa lipida pokazuje blagi konzistentni rast, te učinkovito uklanjanje otopljenog dušika. Izloženost PCB-153 nije utjecala na razinu klorofila u stanicama. Iz navedenog proizlazi da *N. gaditana* ima visok potencijal prilagodbe prema izloženosti perzistentnim toksičnim onečišćivačima, kao i obećavajući bioremedijacijski potencijal prema okolišima opterećenim dušikom (NO_3^- i NH_4^+) i polikloriranim bifenilima.

Provedeno istraživanje doprinosi razumijevanju staničnih odgovora *N. gaditana* na stresne okolišne uvjete te potvrđuje važnost ove pikoeukariotske alge kao modelnog organizma u ekotoksikološkim istraživanjima. Integracija biokemijskih analiza i modeliranja pokazala se kao koristan alat koji daje dodanu vrijednost interdisciplinarnim okolišnim istraživanjima nudeći dublji uvid u fiziološki odgovor pikoeukariotskih alga na onečišćivača iz okoliša i predikciju bioremedijacijskog potencijala.

6. LITERATURA

1. Abdel-Razek, M.A.; Abozeid, A.M.; Eltholth, M.M.; Abouelenien, F.A.; El-Midany, S.A.; Moustafa, N.Y.; Mohamed, R.A. Bioremediation of a Pesticide and Selected Heavy Metals in Wastewater from Various Sources Using a Consortium of Microalgae and Cyanobacteria. *Slov. Vet. Res.* 2019, 56, 61–73. <https://doi.org/10.26873/SVR-777-2019>.
2. Adams, C. Studies on nitrogen and silicon deficiency in microalgal lipid production. (Utah State University, 2013).
3. Agerstrand, M.; Berg, C.; Bjorlenius, B.; Breitholtz, M.; Brunstrom, B.; Fick, J.; Gunnarsson, L.; Larsson, D.G.J.; Sumpter, J.P.; Tysklind, M. Improving Environmental Risk Assessment of Human Pharmaceuticals. *Environ. Sci. Technol.* 2015, 49, 5336–5345.
4. Ahlgren, G. Temperature Functions in Biology and Their Application to Algal Growth Constants. *Oikos* 1987, 49, 177–190.
5. Akuwihare, L.; Meador, T. In *Nitrogen in the Marine Environment*, 2nd ed.; Capone, D.G.; Bronk, D.A.; Mulholland, M.R.; Carpenter, E.J., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2008.
6. Alvim, C.B.; Bes-Piá, M.A.; Mendoza-Roca, J.A. Separation and Identification of Microplastics from Primary and Secondary Effluents and Activated Sludge from Wastewater Treatment Plants. *Chem. Eng. J.* 2020, 402, 126293. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126293>.
7. Arman, N.Z.; Salmiati, S.; Aris, A.; Salim, M.R.; Nazifa, T.H.; Muhamad, M.S.; Marpongahtun, M. A Review on Emerging Pollutants in the Water Environment: Existences, Health Effects and Treatment Processes. *Water* 2021, 13, 3258. <https://doi.org/10.3390/w13223258>.
8. Armbrust, E.V. The Life of Diatoms in the World's Oceans. *Nature* 2009, 459, 185–192. <https://doi.org/10.1038/nature08057>.
9. Atkinson, D.; Ciotti, B.J.; Montagnes, D.J.S. Protist Decrease in Size Linearly with Temperature: ca. 2.5% °C⁻¹. *Proc. R. Soc. Lond. B* 2003, 270, 2605–2611. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2538>.
10. Azuma, T.; Hayashi, T. On-Site Chlorination Responsible for Effective Disinfection of Wastewater from Hospital. *Sci. Total Environ.* 2021, 776, 145951. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145951>.

11. Bailey, S.; Grossman, A. Photoprotection in Cyanobacteria: Regulation of Light Harvesting. *Photochem. Photobiol.* 2008, 84, 1410–1420. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00441.x>.
12. Barber, J.; Andersson, B. Too Much of a Good Thing: Light Can Be Bad for Photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 1992, 17, 61–66. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(92\)90503-2](https://doi.org/10.1016/0968-0004(92)90503-2).
13. Basis, L. Procedure File. Reading, UK, 2010, 2160, 8–10.
14. Basso, S.; Simionato, D.; Gerotto, C.; Segalla, A.; Giacometti, G.M.; Morosinotto, T. Characterization of the Photosynthetic Apparatus of the Eustigmatophycean *Nannochloropsis gaditana*: Evidence of Convergent Evolution in the Supramolecular Organization of Photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 2014, 1837, 306–314. <https://doi.org/10.1016/j.bbambio.2014.02.003>.
15. Bergkvist, J.; Klawonn, I.; Whitehouse, M.J.; Lavik, G.; Brüchert, V.; Ploug, H. Turbulence Simultaneously Stimulates Small- and Large-Scale CO₂ Sequestration by Chain-Forming Diatoms in the Sea. *Nat. Commun.* 2018, 9, 3046. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05389-1>.
16. Berman-Frank, I.; Lundgren, P.; Falkowski, P. Nitrogen Fixation and Photosynthetic Oxygen Evolution in Cyanobacteria. *Res. Microbiol.* 2003, 154, 157–164. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00029-9).
17. Bihari, N.; Fafandel, M.; Piškur, V. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Ecotoxicological Characterization of Seawater, Sediment, and Mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Gulf of Rijeka, the Adriatic Sea, Croatia. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2007, 52, 379–387. <https://doi.org/10.1007/s00244-006-0141-6>.
18. Bird, P. The Urban Waste Water Treatment Directive. *Inst. Water Off. J.* 1992, 28, 14–15.
19. Błedzka, D.; Gromadzińska, J.; Wasowicz, W. Parabens—From Environmental Studies to Human Health. *Environ. Int.* 2014, 67, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.02.007>.
20. Blažina, B.; Haberle, I.; Hrustić, E.; Budiša, A.; Petrić, I.; Konjević, L.; Šilović, T.; Djakovac, T.; Geček, S. Growth aspects and biochemical composition of *Synechococcus* sp. MK568070 cultured in oil refinery wastewater. *J. Mar. Sci. Eng.* **2019**, 7, 164.
21. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A Rapid Method for Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959, 37, 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>.

22. Borowitzka, M. The “Stress” Concept in Microalgal Biology – Homeostasis, Acclimation and Adaptation. *J. Appl. Phycol.* 2018, 30, 2815–2825. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1386-1>.
23. Brennan, L.; Owende, P. Biofuels from Microalgae—A Review of Technologies for Production, Processing, and Extractions of Biofuels and Co-Products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2010, 14, 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>.
24. Bristow, L.A.; Mohr, W.; Ahmerkamp, S.; Kuypers, M.M.M. Nutrients That Limit Growth in the Ocean. *Curr. Biol.* 2017, 27, R431–R510. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.03.030>.
25. Bromke, M.A. Amino Acid Biosynthesis Pathways in Diatoms. *Metabolites* 2013, 3, 294–311. <https://doi.org/10.3390/metabo3020294>.
26. Bronk, D.A. Dynamics of DON. In *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*, Hansell, D.A.; Carlson, C.A., Eds.; Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2002; pp. 153–200.
27. Brown, A.K.; Wong, C.S. Distribution and Fate of Pharmaceuticals and Their Metabolite Conjugates in a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Water Res.* 2018, 144, 774–783. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.07.012>.
28. Budiša, A.; Haberle, I.; Konjević, L.; Blažina, M.; Đakovac, T.; Spalj, L. B.; Hrustić, E. Marine microalgae *Microchloropsis gaditana* and *Pseudochloris wilhelmii* cultivated in oil refinery wastewater – a perspective on remediation and biodiesel production. *FEB*, 2019, 28, 7887-7897.
29. Calatrava, V.; Gonzalez Ballester, D.; Dubini, A. Microalgae for Bioremediation: Advances, Challenges, and Public Perception on Genetic Engineering. *BMC Plant Biol.* 2024, 24, 1261. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05061-2>.
30. Canini, D.; Ceschi, E.; Perozeni, F. Toward the Exploitation of Sustainable Green Factory: Biotechnology Use of *Nannochloropsis* spp. *Biology* 2024, 13, 292. <https://doi.org/10.3390/biology13030292>.
31. Catenholz, R.W.; Garcia-Pichel, F. Cyanobacterial Responses to UV Radiation. In *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*; Whitton, B.A., Ed.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2012; pp. 481–499.
32. Chang, X.; He, Y.; Song, L.; Ding, J.; Ren, S.; Lv, M.; Chen, L. Methylparaben toxicity and its removal by microalgae *Chlorella vulgaris* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal*

- of Hazardous Materials, Volume 454, 2023, 131528, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131528>.
33. Chapman, K.D.; Ohlrogge, J.B. Compartmentation of Triacylglycerol Accumulation in Plants. *J. Biol. Chem.* 2012, 287, 2288–2294. <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.295691>.
 34. Chia, W.Y.; Tang, D.Y.Y.; Khoo, K.S.; Lup, A.N.K.; Chew, K.W. Nature's Fight Against Plastic Pollution: Algae for Plastic Biodegradation and Bioplastics Production. *Environ. Sci. Ecotechnol.* 2020, 4, 100065. <https://doi.org/10.1016/j.ese.2020.100065>.
 35. Chini Zittelli, G.; Lavista, F.; Bastianini, A.; Rodolfi, L.; Vincenzini, M.; Tredici, M.R. Production of Eicosapentaenoic Acid by *Nannochloropsis* sp. Cultures in Outdoor Tubular Photobioreactors. *J. Biotechnol.* 1999, 70, 299–312. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00080-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00080-4).
 36. Clarke, K. R. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 18, 117–143 (1993).
 37. Clarke, K. R.; Gorley, R.N. (2015): PRIMER v7 User Manual/Tutorial. PRIMER-E.
 38. Collos, Y.; Berges, J.A. Nitrogen Metabolism in Phytoplankton. In *Encyclopedia of Life Support Systems*; Duarte, C.M., Ed.; EOLSS Publishers, UNESCO, 2003.
 39. Collos, Y.; Harrison, P.J. Acclimation and Toxicity of High Ammonium Concentrations to Unicellular Algae. *Mar. Pollut. Bull.* 2014, 80, 8–23. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.01.006>.
 40. Converti, A.; Casazza, A.A.; Ortiz, E.Y.; Perego, P.; del Borghi, M. Effect of Temperature and Nitrogen Concentration on the Growth and Lipid Content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for Biodiesel Production. *Chem. Eng. Process.* 2009, 48, 1146–1151. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2009.06.005>.
 41. Cornell, S.; Rendell, A.; Jickells, T. Atmospheric Inputs of Dissolved Organic Nitrogen to the Oceans. *Nature* 1995, 376, 243–246. <https://doi.org/10.1038/376243a0>.
 42. Cornet, J.F.; Dussap, C.G. A Simple and Reliable Formula for Assessment of Maximum Volumetric Productivities in Photobioreactor. *Biotechnol. Prog.* 2009, 25, 424–435. <https://doi.org/10.1002/btpr.102>.
 43. Corruzi, G.; Last, R. Amino Acids. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*; Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R., Eds.; American Society of Plant Physiologists: Rockville, MD, USA, 2000; Chapter 8, pp. 358–410.

44. Council of the European Union. Directive 2013/11/EU of the European Parliament and of the Council. Fundam. Texts Eur. Priv. Law 2020, 2013, 1–17. <https://doi.org/10.5040/9781782258674.0013>.
45. Devasya, R.R.P.; Bassi, A.S. Effect of Nitrate Feeding Strategies on Lipid and Biomass Productivities in Fed-Batch Cultures of *Nannochloropsis gaditana*. Biotechnol. Prog. 2021, 37, e3120. <https://doi.org/10.1002/btpr.3120>.
46. Ding, T.; Yang, M.; Zhang, J.; Yang, B.; Lin, K.; Li, J.; Gan, J. Toxicity, Degradation and Metabolic Fate of Ibuprofen on Freshwater Diatom *Navicula* sp. J. Hazard. Mater. 2017, 330, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.02.008>.
47. Dolganyuk, V.; Belova, D.; Babich, O.; Prosekov, A.; Ivanova, S.; Katserov, D.; et al. Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts. Biomolecules 2020, 10, 1153. <https://doi.org/10.3390/biom10081153>.
48. Dortch, Q.; Clayton, J.R.; Thoresen, S.S.; Abmed, S.I. Species Differences in Accumulation of Nitrogen Pools in Phytoplankton. Mar. Biol. 1984, 81, 237–250. <https://doi.org/10.1007/BF00393222>.
49. Dubinsky, Z.; Stambler, N. Photoacclimation Processes in Phytoplankton: Mechanisms, Consequences, and Applications. Aquat. Microb. Ecol. 2009, 56, 163–176. <https://doi.org/10.3354/ame01345>.
50. El-Sheekh, M.; Abdel-Daim, M.M.; Okba, M.; Gharib, S.; Soliman, A.; El-Kassas, H. Green Technology for Bioremediation of the Eutrophication Phenomenon in Aquatic Ecosystems: A Review. Afr. J. Aquat. Sci. 2021, 46, 274–292. <https://doi.org/10.2989/16085914.2021.1890734>.
51. EUR-Lex. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on Cosmetic Products. <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/1223/oj>.
52. FAO. The Future of Food and Agriculture—Alternative Pathways to 2050; FAO: Rome, Italy, 2018; ISBN 9789251301586.
53. Fawley, M.W.; Jameson, I.; Fawley, K.P. The Phylogeny of the Genus *Nannochloropsis* (Monodopsidaceae, Eustigmatophyceae), with Descriptions of *N. australis* sp. nov. and *Microchloropsis* gen. nov. Phycologia 2015, 54, 545–552. <https://doi.org/10.2216/15-43.1>.

54. Fazal, T.; Mushtaq, A.; Rehman, F.; Khan, A.U.; Rashid, N.; Farooq, W.; Rehman, M.S.U.; Xu, J. Bioremediation of Textile Wastewater and Successive Biodiesel Production Using Microalgae. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **201
55. Glibert, P.M.; Harrison, J.; Heil, C.; Seitzinger, S. Escalating Worldwide Use of Urea—A Global Change Contributing to Coastal Eutrophication. *Biogeochemistry* 2006, 77, 441–463. <https://doi.org/10.1007/s10533-005-3070-5>.
56. Gomaa, M.; El-Naeb, E.H.; Hifney, A.F.; Adam, M.S.; Fawzy, M.A. Hormesis Effects of Phenol on Growth and Cellular Metabolites of *Chlorella* sp. Under Different Nutritional Conditions Using Response Surface Methodology. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2023, 30, 56904–56919. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-25678-9>.
57. González, J.; Fernández, E.; Figueiras, F.G.; Varela, M. Subtle Effects of the Water-Soluble Fraction of Oil Spills on Natural Phytoplankton Assemblages Enclosed in Mesocosms. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 2013, 124, 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.12.012>.
58. Gruber, N. Nitrogen in the Marine Environment. In *Nitrogen in the Marine Environment*; Capone, D.G.; Bronk, D.A.; Mullholland, M.R.; Carpenter, E.J., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2008; pp. 1–60.
59. Guiry, M.D. How Many Species of Algae Are There? *J. Phycol.* 2012, 48, 1057–1063. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x>.
60. Guo, L.; Liang, S.; Zhang, Z.; Liu, H.; Wang, S.; Pan, K.; Xu, J.; Ren, X.; Pei, S.; Yang, G. Genome Assembly of *Nannochloropsis oceanica* Provides Evidence of Host Nucleus Overthrow by the Symbiont Nucleus during Speciation. *Commun. Biol.* 2019, 2, 249. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0510-3>.
61. Gutierrez, J.; Kwan, T.A.; Zimmerman, J.B.; Peccia, J. Ammonia Inhibition in Oleaginous Microalgae. *Algal Res.* 2016, 19, 123–127. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.005>.
62. Hallmann, A. Algal Transgenics and Biotechnology. *Transgenic Plant J.* 2007, 1, 81–98.
63. Hansda, A., Kumar, V., 2016. A comparative review towards potential of microbial cells for heavy metal removal with emphasis on biosorption and bioaccumulation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 32 (10), 170. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2117-1>.
64. Heath, R.I.; Packer, L. Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts: I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1968, 125, 189–198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90354-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90354-7).

65. Henze, M.; Comeau, Y. Wastewater Characterization. In *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design*; IWA Publishing: London, UK, 2008; pp. 33–52.
66. Herceg Romanić, S.; Mendaš, G.; Fingler, S.; Drevenkar, V.; Mustać, B.; Jovanović, G. Polychlorinated Biphenyls in Mussels, Small Pelagic Fish, Tuna, Turtles, and Dolphins from the Adriatic: An Overview. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 2024, 75, 15–23. <https://doi.org/10.2478/aiht-2024-75-3642>.
67. Herrero, A.; Flores, E. Genetic Responses to Carbon and Nitrogen Availability in Cyanobacteria. *Environ. Microbiol.* 2019, 21, 1–17. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14439>.
68. Hibberd, D.J. Notes on the Taxonomy and Nomenclature of the Algal Classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 2008, 82, 93–119. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1979.tb02216.x>.
69. Hu, Q. Environmental Effects on Cell Composition. In *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, 2nd ed.; Richmond, A.; Hu, Q., Eds.; Wiley-Blackwell: Oxford, UK, 2013; pp. 114–133.
70. Huang, Y.J.; Jiang, Z.B.; Zeng, J.N.; Chen, Q.Z.; Zhao, Y.; Liao, Y.; Xu, X. The Chronic Effects of Oil Pollution on Marine Phytoplankton in a Subtropical Bay, China. *Environ. Monit. Assess.* 2011, 176, 517–530. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1601-6>.
71. Hure, M.; Mustać, B. Feeding Ecology of *Sardina pilchardus* Considering Co-Occurring Small Pelagic Fish in the Eastern Adriatic Sea. *Mar. Biodivers.* 2020, 50, 40. <https://doi.org/10.1007/s12526-019-01005-3>.
72. Hussein, M.H., Abdullah, A.M., Badr El Din, N.I., Mishaha, E.S.I. Biosorption Potential of the Microchlorophyte *Chlorella vulgaris* for Some Pesticides. *Journal of Fertilizers & Pesticides*, 2017, 08, 1–5. <https://doi.org/10.4172/2471-2728.1000177>
73. Iglewicz, B.; Hoaglin, D.C. *How to Detect and Handle Outliers*; ASQC Quality Press: Milwaukee, WI, USA, 1993; Vol. 16.
74. Itzhaki, R.F.; Gill, D.M. A Microbiuret Method for Estimating Proteins. *Anal. Biochem.* 1964, 9, 401–410. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(64\)90328-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(64)90328-7).
75. Janouskovec, J.; Horák, A.; Oborník, M.; Lukeš, J.; Keeling, P.J. A Common Red Algal Origin of the Apicomplexan, Dinoflagellate, and Heterokont Plastids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 10949–10954. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002720107>.

76. Jena, B.A.; Samal, R.R.; Bhol, N.K.; Duttaroy, A.K. Cellular Red-Ox System in Health and Disease: The Latest Update. *Biomed. Pharmacother.* 2023, 162, 114606. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114606>.
77. Jia, J.; Han, D.; Gerken, H.G.; Li, Y.; Sommerfeld, M.; Hu, Q.; Xu, J. Molecular Mechanisms for Photosynthetic Carbon Partitioning into Storage Neutral Lipids in *Nannochloropsis oceanica* under Nitrogen-Depletion Conditions. *Algal Res.* 2015, 7, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.02.009>.
78. Jinkerson, R.E.; Radakovits, R.; Posewitz, M.C. Genomic Insights from the Oleaginous Model Alga *Nannochloropsis gaditana*. *Bioengineered* 2013, 4, 37–43. <https://doi.org/10.4161/bioe.24187>.
79. Johnstone, D.W.M.; Ilg, S.S.N. Effluent Discharge Standards. In *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2003; Volume 299, pp. 1–20.
80. Jones, K.C. Persistent Organic Pollutants (POPs) and Related Chemicals in the Global Environment: Some Personal Reflections. *Environ. Sci. Technol.* 2021, 55, 9400–9412. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c01745>.
81. Juliano, C.; Magrini, G.A. Cosmetic Ingredients as Emerging Pollutants of Environmental and Health Concern: A Mini-Review. *Cosmetics* 2017, 4, 11. <https://doi.org/10.3390/cosmetics4010011>.
82. Juneja, A.; Ceballos, R.M.; Murthy, G.S. Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. *Energies* 2013, 6, 4607–4638. <https://doi.org/10.3390/en6094607>.
83. Kandilian, R.; Lee, E.; Pilon, L. Radiation and Optical Properties of *Nannochloropsis oculata* Grown under Different Irradiances and Spectra. *Bioresour. Technol.* 2013, 137, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.010>.
84. Karlson, B.; Potter, D.; Kuylensstierna, M.; Andersen, R.A. Ultrastructure, Pigment Composition, and 18S rRNA Gene Sequence for *Nannochloropsis granulata* sp. nov. (Monodopsidaceae, Eustigmatophyceae), a Marine Ultraplankter Isolated from the Skagerrak, Northeast Atlantic Ocean. *Phycologia* 1996, 35, 253–260. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-35-4-253.1>.

85. Kolodny, N.H.; Bauer, D.; Bryce, K.; Klucevsek, K.; Lane, A.; Medeiros, L.; Mercer, W.; Moin, S.; Park, D.; Petersen, J.; Wright, J.; Yuen, C.; Wolfson, A.J.; Allen, M. Effect of Nitrogen Source on Cyanophycin Synthesis in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6308. *J. Bacteriol.* 2006, 188, 934–940. <https://doi.org/10.1128/JB.188.3.934-940.2006>.
86. Koshikawa, H.; Xu, K.Q.; Liu, Z.L.; Kohata, K.; Kawachi, M.; Maki, H.; et al. Effects of the Water-Soluble Fraction of Diesel Oil on Bacterial and Primary Production and the Trophic Transfer to Mesozooplankton through a Microbial Food Web in Yangtze Estuary, China. *Estuar. Coast Shelf Sci.* 2007, 71, 68–80. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2006.08.013>.
87. Krienitz, L.; Hepperle, D.; Stich, H.B.; Weiler, W. *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae), a New Species of Picoplankton from Freshwater. *Phycologia* 2000, 39, 219–227. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-39-3-219.1>.
88. Kumar, A.; Bera, S. Revisiting Nitrogen Utilization in Algae: A Review on the Process of Regulation and Assimilation. *Bioresour. Technol. Rep.* 2020, 12, 100584. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100584>.
89. Kumar, J.; Singh, D.; Tyagi, M.B.; Kumar, A. Cyanobacteria: Applications in Biotechnology. In *Cyanobacteria: From Basic Science to Applications*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 327–346.
90. Kumar, M.; Reddy, C.R.K.; Jha, B. The Ameliorating Effect of Acadian Marine Plant Extract Against Ionic Liquids-Induced Oxidative Stress and DNA Damage in Marine Macroalga *Ulva lactuca*. *J. Appl. Phycol.* 2013, 25, 369–378. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9913-0>.
91. Kumar, R.; Sarmah, A.K.; Padhye, L.P. Fate of Pharmaceuticals and Personal Care Products in a Wastewater Treatment Plant with Parallel Secondary Wastewater Treatment Train. *J. Environ. Manag.* 2019, 233, 649–659. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.01.103>.
92. Lagarias, J.C.; Reeds, J.A.; Wright, M.H.; Wright, P.E. (1998) Convergence properties of the Nelder-Mead simplex method in low dimensions *SIAM Journal on Optimization*, 9 (1), pp. 112-147.
93. Leng, L.; Wei, L.; Xiong, Q.; Xu, S.; Li, W.; Lv, S.; Lu, Q.; Wan, L.; Wen, Z.; Zhou, W. Use of Microalgae-Based Technology for the Removal of Antibiotics from Wastewater: A

94. Li Guo, Sijie Liang, Zhongyi Zhang, Hang Liu, Songwen Wang, Kehou Pan, Jian Xu, Xue Ren, Surui Pei, Guanpin Yang. Genome assembly of *Nannochloropsis oceanica* provides evidence of host nucleus overthrow by the symbiont nucleus during speciation. *Communications Biology*, 2019, 2:249.
95. Li, X., Li, W., Zhai, J., Wei, H., Wang, Q. Effect of ammonium nitrogen on microalgal growth, biochemical composition and photosynthetic performance in mixotrophic cultivation. *Bioresource Technology*, 2019, 273, 368–376.
96. Liang, J., Wen, F., Liu, J. Transcriptomic and lipidomic analysis of an EPA-containing *Nannochloropsis* sp. PJ12 in response to nitrogen deprivation. *Scientific Reports*, 2019, 9, 4540.
97. Liberti, D., Pinheiro, F., Simoes, B., Varela, J., Barreira, L. Beyond Bioremediation: The Untapped Potential of Microalgae in Wastewater Treatment. *Water*, 2024, 16, 2710.
98. Liu, L.K., Becker, D.F., Tanner, J.J. Structure, function, and mechanism of proline utilization A (PutA). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2017, 632, 142–157.
99. Llácer, J.L., Fita, I., Rubio, V. Arginine and nitrogen storage. *Current Opinion in Structural Biology*, 2008, 18, 673–681.
100. Lubián, L.M. *Nannochloropsis gaditana* spec. nov., una nueva Eustigmatophyceae marina. *Lezama*, 1982, 4, 287–293.
101. Ma, N. L.; Aziz, A.; The, K. Y.; Lam, S.S.; Cha, T.S. Metabolites Re-programming and Physiological Changes Induced in *Scenedesmus regularis* under Nitrate Treatment. *Sci. Reports* 2018, 8:9746, doi:10.1038/s41598-018-27894-0.
102. Madhav, S., Ahamad, A., Singh, A.K., Kushawaha, J., Chauhan, J.S., Sharma, S., Singh, P. Water Pollutants: Sources and Impact on the Environment and Human Health. In *Sensors in Water Pollutants Monitoring: Role of Material*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2020; pp. 43–62.
103. Markou, G., Vandamme, D., Muylaert, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research*, 2014, 65, 186–202.
104. Masojídek, J., Torzillo, G., Koblížek, M. Photosynthesis in Microalgae. In *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, 2nd edition; Richmond, A., Hu, Q. (eds.), Blackwell Publishing Ltd, pp. 21–36.

105. Meng, Y., Cao, X., Yao, C., Xue, S., Yang, Q. Identification of the role of polar glycerolipids in lipid metabolism and their acyl attribution for TAG accumulation in *Nannochloropsis oceanica*. *Algal Research*, 2017, 24, 122–129.
106. Miazek, K.; Brozek-Pluska, B. Effect of PHRs and PCPs on Microalgal Growth, Metabolism and Microalgae-based Bioremediation Processes: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 1024. <https://doi.org/10.3390/ijms20102492>.
107. Miller, L. Gas–liquid chromatography of cellular fatty acid as a bacterial identification aid. *HP Gas Chromatography Application Note*, 1985, 228, 37.
108. Mills, L.A., McCormick, A.J., Lea-Smith, D.J. Current knowledge and recent advances in understanding metabolism of the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Bioscience Reports*, 2020, 40, BSR20193325.
109. Mohsenpour, S.F., Hennige, S., Willoughby, N., Adeloye, A., Gutierrez, T. Integrating micro-algae into wastewater treatment: a review. *Science of the Total Environment*, 2021, 752, 142168.
110. Mondal, M., Halder, G., Oinam, G., Indrama, T., Tiwari, O.N. Bioremediation of Organic and Inorganic Pollutants Using Microalgae. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 223–235.
111. Morales-Sánchez, D., Martinez-Rodriguez, O.A., Martinez, A. Heterotrophic cultivation of microalgae: production of metabolites of commercial interest. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2017, 92, 925–936.
112. Mulbry, W., Kondrad, S., Pizarro, C., Kebede-Westhead, E. Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: Algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. *Bioresource Technology*, 2008, 99, 8137–8142.
113. Munoz-Blanco, J., Lain-Guelbenzu, B., Cardenas, J. Characterization of an L-aspartate aminotransferase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiologia Plantarum*, 1998, 74, 433–439.
114. Mustafa, S., Bhatti, H.N., Maqbool, M., Iqbal, M. Microalgae Biosorption, Bioaccumulation and Biodegradation Efficiency for the Remediation of Wastewater and

- Carbon Dioxide Mitigation: Prospects, Challenges and Opportunities. *Journal of Water Process Engineering*, 2021, 41, 102009.
115. Morales, M.; Aflalo, C.; Bernard, O. Microalgal lipids: A review of lipids potential and quantification for 95 phytoplankton species. *Biomass and Bioenergy*, 2021, 150, 106108.
116. Nagata, T., Kirchman, D.L. Release of dissolved organic matter by heterotrophic protozoa: implications for microbial food webs. *Archiv für Hydrobiologie Beihefte Ergebnisse der Limnologie*, 1992, 35, 99–109.
117. Navalho, S.; Barbosa, M. J.; Varela J. *Nannochloropsis* Lipids and Polyunsaturated Fatty Acids: Potential Applications and Strain Improvement. *Mar. Drugs* 2025 Mar 15;23(3):128. doi: 10.3390/md23030128
118. Neff, J.M. Bioaccumulation in Marine Organisms: Effect of Contaminants from Oil Well Produced Water; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2002; ISBN 0080527841.
119. Norton, T.A., Melkonian, M., Andersen, R.A. Algal biodiversity. *Phycologia*, 1996, 35(4), 308–326.
120. Nowak, K.; Jablonska, E.; Radziwon, P.; Ratajczak-Wrona, W. Identification of a novel target for the action of endocrine disrupting chemicals: inhibitory effect of methylparaben on human neutrophil functions. *Environ. Sci. Poll. Res.* 2020, 27:6540-6548.
121. Okumura, Y., Koyama, J., Takaku, H., Satoh, H. Influence of Organic Solvents on the Growth of Marine Microalgae. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2001, 41, 123–128.
122. Oliver, R.L., Hamilton, D.P., Brookes, J.D., Ganf, G.G. Physiology, blooms and prediction of planktonic cyanobacteria. In Whitton, B.A. (Ed.), *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*; Springer-Verlag, Netherlands, 2012, pp. 155–194.
123. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test No. 201: Alga, Growth Inhibition Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. 2011. Available online: <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/1223/oj> (accessed on 7 July 2025).
124. Orlić, M.; Marinović, M. Primjena metode glavnih komponenti u različitim područjima istraživanja. *Društvo i tehnologija*, 2012, 189.

125. Paerl, H.W. Marine Plankton. In Whitton, B.A. (Ed.), *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*; Springer Science+Business Media B.V., 2012, pp. 127–153.
126. Pal-Nath, D., Didi-Cohen, S., Shtaida, N., Nath, P.R., Samani, T., Boussiba, S., Khozin-Goldberg, I. Improved productivity and oxidative stress tolerance under nitrogen starvation is associated with the ablated $\Delta 5$ desaturation in the green microalga *Lobosphaera incisa*. *Algal Research*, 2017, 26, 25–38.
127. Pal-Nath, D., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., Boussiba, S. The effect of light, salinity and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90, 1429–1441.
128. Patel, A.K., Choi, Y.Y., Sim, S.J. Emerging prospects of mixotrophic microalgae: way forward to sustainable bioprocess for environmental remediation and cost-effective biofuels. *Bioresource Technology*, 2020, 300, 122741.
129. Patil, L.; Kaliwal, B.B. *Scenedesmus bajacalifornicus* BBKLP-07, a New Source of Bioactive Compounds with In Vitro Pharmacological Applications. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2019, 42, 979–994. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02099-5>.
130. Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E., Bashan, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research*, 2011, 45, 11–36.
131. Perez-Vicente, R.; Cardenas, J.; Pineda, M. Distinction between hypoxanthine and xanthine transport in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 1991, 95, 126–130.
132. Premaratne, M.; Nishshanka, G.; Liyanaarachchi, V.C.; Nimarshana, P.H.V.; Ariyadasa, T.U. Bioremediation of Textile Dye Wastewater Using Microalgae: Current Trends and Future Perspectives. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2021, 96, 3249–3258.
133. Rahimi, S.; Modin, O.; Mijakovic, I. Technologies for biological removal and recovery of nitrogen from wastewater. *Biotechnol. Adv.* 2020, 43, 107570.
134. Raju, S.; Carbery, M.; Kuttykattil, A.; Senthirajah, K.; Lundmark, A.; Rogers, Z.; Suresh, S.C.B.; Evans, G.; Palanisami, T. Improved Methodology to Determine the Fate and Transport of Microplastics in a Secondary Wastewater Treatment Plant. *Water Res.* 2020, 173, 115549.

135. Ramaraj, R.; Tsai, D.D.W.; Chen, P.H. Biomass of algae growth on natural water medium. *J. Photochem. Photobiol. B* 2015, 142, 124–128.
136. Ras, M.; Steyer, J.P.; Bernard, O. Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2013, 12, 153–164.
137. Rees, T.A.V.; Cresswell, R.C.; Syrett, R.J. Sodium dependent uptake of nitrate and urea by a marine diatom. *Biochim. Biophys. Acta* 1980, 596, 141–144.
138. Rempel, A.; Gutkoski, J.P.; Nazari, M.T.; Biolchi, G.N.; Cavanhi, V.A.F.; Treichel, H.; Colla, L.M. Current Advances in Microalgae-Based Bioremediation and Other Technologies for Emerging Contaminants Treatment. *Sci. Total Environ.* 2021, 772, 144918. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144918>.
139. Ritchie, R.J. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth. Res.* 2006, 89, 27–41.
140. Safaar, H.; Hass, M.Z.; Moller, P.; Holdt, S.L.; Jacobsen, C. High-EPA Biomass from *Nannochloropsis salina* Cultivated in a Flat-Panel Photo-Bioreactor on a Process Water-Enriched Growth Medium. *Mar. Drugs* 2016, 14, 144.
141. Safi, C.; Zebib, B.; Merah, O.; Pontalier, P.Y.; Vaca-Garcia, C. Morphology, Composition, Production, Processing and Applications of *Chlorella vulgaris*: A Review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2014, 35, 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>.
142. Salbitani, G.; Carfagna, S. Ammonium utilization in microalgae: A sustainable method for wastewater treatment. *Sustainability* 2021, 13, 956.
143. Salthammer, T. Emerging Indoor Pollutants. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2020, 224, 113423.
144. Sanz-Luque, E.; Chamizo-Ampudia, A.; Llamas, A.; Galvan, A.; Fernandez, E. Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Front. Plant Sci.* 2015, 6, 899.
145. Sargian, P.; Mas, S.; Pelletier, E. et al., Multiple stressors on an Antarctic microplankton assemblage: water soluble crude oil and enhanced UVBR level at Ushuaia (Argentina), *Polar Biol.* 30 (7) (2007) 829–841.
146. Sarmiento, J.L.; Gruber, N. *Ocean biogeochemical dynamics*; Princeton University Press: Princeton, NJ, USA, 2006.

147. Sarthou, G.; Timmermans, K.R.; Blain, S.; Tréguer, P. Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: a review. *J. Sea Res.* 2004, 53, 25–42.
148. Seitzinger, S.P.; Harrison, J.A.; Dumont, E.; Beusen, A.H.W.; Bouwman, A.F. Sources and delivery of carbon, nitrogen, and phosphorus to the coastal zone: an overview of global nutrient export from watersheds (NEWS) models and their application. *Glob. Biogeochem. Cycles* 2005, 19, 1–11.
149. Shanab, S.; Essa, A.; Shalaby, E. Bioremoval capacity of three heavy metals by some microalgae species (Egyptian isolates). *Plant Signal. Behav.* 2012, 7, 392–399.
150. Sharma, N.K.; Rai, A.K. Biodiversity and biogeography of microalgae: progress and pitfalls. *Environ. Rev.* 2011, 19, 1–15.
151. Shetty, P.; Gitau; Mukami, M.; Maróti, G. Salinity Stress Responses and Adaptation Mechanisms in Eukaryotic Green Microalgae. *Cells* 2019, 8, 1677.
152. Sieburth, J.McN. Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol. Oceanogr.* 1987, 23, 1256–1263.
153. J. Sikkema, J.A.M. Bont, B. Poolman, Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons, *Microbiol. Rev.* 59 (2) (1995) 201–222.
154. Singh, A.K.; Bhattacharyya-Pakrasi, M.; Elvitigala, T.; Ghosh, B.; Aurora, R.; Pakrasi, H.B. A System-Level Analysis of the Effects of Light Quality on the Metabolism of a Cyanobacterium. *Plant Physiol.* 2009, 151, 1596–1608.
155. Singh, S., Kate, B. N. & Banerjee, U. C. Bioactive Compounds from Cyanobacteria and Microalgae: An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology* (2005) **25**, 73–95, <https://doi.org/10.1080/07388550500248498>.
156. Solomon, C.M.; Collier, J.L.; Berg, G.M.; Glibert, P.M. Role of urea in microbial metabolism in aquatic systems: a biochemical and molecular review. *Aquat. Microb. Ecol.* 2010, 59, 67–88.
157. Solovchenko, A.; Verschoor, A.M.; Jablonowski, N.D.; Nedbal, L. Phosphorus from wastewater to crops: An alternative path involving microalgae. *Biotechnol. Adv.* 2016, 34, 550–564.
158. Sterner, R. W., & Elser, J. J. (2002). *Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere*. Princeton University Press.

159. Suda, S.; Atsumi, M.; Miyashita, H. Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. nov. (Eustigmatophyceae). *Phycologia* 2002, 41, 273–279.
160. Sukenik, A.; Carmeli, Y.; Berner, T. Regulation of Fatty Acid Composition by Irradiance Level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *J. Phycol.* 1989, 25, 686–692.
161. Sutherland, D.L.; Ralph, P.J. Microalgal Bioremediation of Emerging Contaminants—Opportunities and Challenges. *Water Res.* 2019, 164, 114921. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.114921>.
162. Sutherland, D.L.; Ralph, P.J. Microalgal bioremediation of emerging contaminants—Opportunities and challenges. *Water Res.* 2019, 164, 114921.
163. Syrett, P.J.; Leftley, J.W. Nitrate and urea assimilation by algae. *Perspect. Exp. Biol.* 2016, 2, 221–234.
164. Šolić, M.; Šantić, D.; Šestanović, S.; Bojanić, N.; Grbec, B.; Jozić, S.; Vrdoljak, A.; Ordulj, M.; Matić, F.; Kušpilić, G.; Ninčević Gladan, Ž. Impact of water column stability dynamics on the succession of plankton food web types in the offshore area of the Adriatic Sea. *J. Sea Res.* 2020, 158, 101860.
165. Tamma, G.; Valenti, G.; Grossini, E.; Donnini, S.; Marino, A.; Marinelli, R.A.; Calamita, G. Aquaporin membrane channels in oxidative stress, cell signaling, and aging: Recent advances and research trends. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2018, 2018, 1501847.
166. Tandeau de Marsac, N.; Houmard, J. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 1993, 104, 119–190.
167. Tonon, T.; Harvey, D.; Larson, T.R.; Graham, I.A. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry* 2002, 61, 15–24.
168. Torres, M.J.; González-Ballester, D.; Gómez-Osuna, A.; Galván, A.; Fernández, E.; Dubini, A. *Chlamydomonas*–*Methylobacterium oryzae* cooperation leads to increased biomass, nitrogen removal and hydrogen production. *Bioresour. Technol.* 2022, 352, 127000.

169. Torzillo, G.; Vonshak, A. Environmental Stress Physiology with Reference to Mass Cultures. In *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, 2nd ed.; Richmond, A., Hu, Q., Eds.; Blackwell Publishing Ltd.: Oxford, UK, 2013; pp. 90–113.
170. Unrein, F.; Gasol, J.M.; Not, F.; Forn, I.; Massana, R. Mixotrophic haptophytes are key bacterial grazers in oligotrophic coastal waters. *ISME J.* 2014, 8, 164–176.
171. Vale, F.; Sousa, C.A.; Sousa, H.; Santos, L.; Simões, M. Impact of parabens on microalgae bioremediation of wastewaters: A mechanistic study. *Chem. Eng. J.* 2022, 442, 136374.
172. VanWagenen, J.; Miller, T.W.; Hobbs, S.; Hook, P.; Crowe, B.; Huesemann, M. Effects of Light and Temperature on Fatty Acid Production in *Nannochloropsis salina*. *Energies* 2012, 5, 731–740.
173. Viancelli, A.; Michelon, W.; Rogovski, P.; Cadamuro, R.D.; de Souza, E.B.; Fongaro, G.; Camargo, A.F.; Stefanski, F.S.; Venturin, B.; Scapini, T.; Bonatto, C.; Preczeski, K.P.; Klanovicz, N.; de Oliveira, D.; Treichel, H. A Review on Alternative Bioprocesses for Removal of Emerging Contaminants. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 2020, 43, 2117–2129. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02410-9>.
174. Voss, M.; Bange, H.W.; Dippner, J.W.; Middelburg, J.J.; Montoya, J.P.; Ward, B. The marine nitrogen cycle: recent discoveries, uncertainties and the potential relevance of climate change. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2013, 368, 20130121.
175. Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), 5944–5972.
176. Paterson, S.; Gómez-Cortés, P.; de la Fuente, M.A.; Hernández-Ledesma, B. Bioactivity and Digestibility of Microalgae *Tetraselmis* sp. and *Nannochloropsis* sp. as Basis of Their Potential as Novel Functional Foods. *Nutrients* **2023**, 15, 477. <https://doi.org/10.3390/nu15020477>.
177. Pritišanac, E.; Fafandel, M.; Haberle, I.; Geček, S.; Markić, M.; Bolf, N.; Vukadin, J.; Crnković, G.; Klanjšček, T.; Žilić, L.; Blažina, M. Comparative study of the microalgae-based wastewater treatment, in an oil refining industry cogeneration concept. *Water*, 2025, 17, 2217. doi: 10.3390/w17152217.

178. Verspreet, J.; Soetemans, L.; Gargan, C.; Hayes, M.; Bastiaens, L. Nutritional Profiling and Preliminary Bioactivity Screening of Five Micro-Algae Strains Cultivated in Northwest Europe. *Foods* **2021**, *10*, 1516. <https://doi.org/10.3390/foods10071516>.
179. Xiang, Q.; Wei, X.; Yang, Z.; Xie, T.; Zhang, Y.; Li, D.; Pan, X.; Liu, X.; Zhang, X.; Yao, C. Acclimation to a broad range of nitrate strength on a euryhaline marine microalga *Tetraselmis subcordiformis* for photosynthetic nitrate removal and high-quality biomass production. *Sci. Total. Environ.* **2021**, *781*, 146687.
180. Wang, L.; Zheng, B. Toxic effects of fluoranthene and copper on marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *J. Environ. Sci.* **20** (11) (2008) 1363–1372. Wang, C.; Sun, Y.; Ruan, H.; Yang, J. Toxic effects of 2,4,4'-trichlorobiphenyl (PCB-28) on growth, photosynthesis characteristics and antioxidant defense system of *Lemna minor* L. *PPB* **2021**, 166.
181. Wang, Y.; Ho, S.H.; Cheng, C.L.; Guo, W.Q.; Nagarajan, D.; Ren, N.Q.; et al. Perspectives on the feasibility of using microalgae for industrial wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* **2016**, *222*, 485–497.
182. Wei, F.; Mortimer, M.; Cheng, H.; Sang, N.; Guo, L.H. Parabens as Chemicals of Emerging Concern in the Environment and Humans: A Review. *Sci. Total Environ.* **2021**, *778*, 146150. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146150>.

7. DODATAK

1.MDA koncentracije u svim eksperimentima.

Vrijeme (dani)	0,8 mM NO_3^-	1,6 mM NO_3^-	2,4 mM NO_3^-
0	0.057533	0.000258	0.024715
1	0.070426	0.003871	0.120362
2	0.150871	0.010065	
3	0.198778	0.017032	0.018967
4	0.199905	0.07329	0.292416
5	0.142359	0.052645	0.203117
6	0.096545	0.066323	0.188118
8	0.157721	0.103656	0.189022
10	0.190613	0.139785	0.228878
12	0.23838	0.132903	0.159513

Vrijeme (dani)	0,8 mM NH_4^+	1,6 mM NH_4^+	2,4 mM NH_4^+
0	0.061649185	0.135930743	0.106385033
1	0.153554176	0.172729129	0.132891653
2	0.316393051	0.376826664	0.289129765
3	0.361614691	0.33252894	0.594481021
4	0.540887139	0.346684618	0.516221952
5	0.286296513	0.172902486	0.25658774
6	0.199190893	0.175367526	0.216606138
8	0.31189024	0.321188494	0.21234831
9	0.201197503	0.458858275	0.257856052
12	0.237519826	0.394098253	0.320103312
14	0.234698578	0.497539127	0.288093121

	0,8 mM NO ₃ ⁻	1µM PCB- 153	3µM PCB- 153	9µM PCB- 153
0	0.129572	0.1518393	0.190311647	0.157103712
1		0.213228895	0.08023711	0.214279018
2	0.330267		0.138988088	0.206087323
3			0.158122806	
4	0.18155	0.24125225	0.187661423	
5	0.111891	0.281125127	0.082895012	0.206183034
6	0.270317	0.161163724	0.313020075	0.153816396
7			0.355121134	
8	0.202176			
9		0.289810828	0.273687297	0.226213971
10	0.182293			
11	0.199516	0.162261778		0.228025418
14		0.037390457	0.284084652	0.258997133
17		0.390792087		

	1% VFN	5% VFN	10% VFN
0	0.242085	0.179837897	0.241566699
1	0.428568	0.054301135	0.038371868
2	0.276234	0.77696053	0.24293747
3	0.417824	0.767611109	0.77939528
4	0.645249	1.150761857	1.173562218
5	0.590937	0.500430799	0.54977452
6	0.574427	0.753235088	0.338277799
7	0.55449	0.525554714	0.256406328
10	0.242109	0.279446924	0.265103406
12	0.291295	0.279954665	0.227481255
14	0.298834	0.282404749	0.200077231
16	0.185773	0.158227893	0.166300478

	MetP1 (3500 ng/L)	MetP2 (500 ng/L)	MetP3 (10 ng/L)
0	0.082504241	0.034350697	0.069814555
1	0.363405915	0.063029482	0.063698461
2	0.231689657	0.252764244	0.313291521
3	0.278607521	0.772952584	0.591148297
4	0.396794578	0.768025153	0.39837263
5	0.424852114	0.666115482	0.509658478
6	0.360978588	0.414978169	0.330446058
7	0.34344392	0.362624116	0.34834876
10	0.241099654	0.240067442	0.228876901
12	0.237859842	0.244505028	0.18924157
14	0.184840755	0.167744165	0.165233149
17	0.156921973	0.234065267	0.217342836

2. Rezultati univarijatne ANOVA analize:

Eksperiment s učincima NO₃⁻

chl_a :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	30.251	15.125	7.4266	0.006332 **
Faza	2	80.553	40.276	19.7757	8.346e-05 ***
Koncentracija:Faza	3	5.719	1.906	0.9361	0.449347
Residuals	14	28.513	2.037		

karotenoidi :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	2.4867	1.2433	6.0566	0.01273 *
Faza	2	9.1932	4.5966	22.3911	4.347e-05 ***
Koncentracija:Faza	3	0.6723	0.2241	1.0916	0.38505
Residuals	14	2.8740	0.2053		

proteini :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	647	324	0.0513	0.9501418
Faza	2	174464	87232	13.8405	0.0004823 ***
Koncentracija:Faza	3	1011	337	0.0535	0.9830319
Residuals	14	88237	6303		

lipidi:

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	1278	638.9	0.0303	0.9702
Faza	2	29514	14756.8	0.7006	0.5129
Koncentracija:Faza	3	50557	16852.2	0.8001	0.5142
Residuals	14	294867	21062.0		

MDA :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	0.042625	0.0213124	12.6985	0.0007156 ***
Faza	2	0.058330	0.0291650	17.3773	0.0001610 ***
Koncentracija:Faza	3	0.018431	0.0061436	3.6605	0.0388743 *
Residuals	14	0.023497	0.0016783		

Eksperiment s učincima NH₄⁺**chl_a :**

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	6.7630	3.3815	6.7608	0.008814 **
Faza	2	2.5978	1.2989	2.5969	0.109840
Koncentracija:Faza	1	1.4040	1.4040	2.8070	0.116033
Residuals	14	7.0023	0.5002		

karotenoidi :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	0.77924	0.38962	5.7267	0.01523 *
Faza	2	0.35209	0.17604	2.5875	0.11060
Koncentracija:Faza	1	0.10741	0.10741	1.5788	0.22950
Residuals	14	0.95250	0.06804		

proteini :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	4143.1	2071.6	1.6402	0.229099
Faza	2	24418.7	12209.3	9.6670	0.002305 **
Koncentracija:Faza	1	8891.9	8891.9	7.0403	0.018905 *
Residuals	14	17681.9	1263.0		

lipidi :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	42024	21012.2	2.6770	0.1036
Faza	2	32829	16414.7	2.0913	0.1604
Koncentracija:Faza	1	4491	4491.2	0.5722	0.4619
Residuals	14	109886	7849.0		

MDA :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	0.000710	0.000355	0.0200	0.9803
Faza	2	0.052461	0.026231	1.4753	0.2622
Koncentracija:Faza	1	0.032795	0.032795	1.8444	0.1959
Residuals	14	0.248925	0.017780		

C :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	3.7552e-05	1.8776e-05	2.9945	0.08267 .
Faza	2	5.7510e-06	2.8756e-06	0.4586	0.64133
Koncentracija:Faza	1	1.7002e-05	1.7002e-05	2.7116	0.12188
Residuals	14	8.7783e-05	6.2702e-06		

N :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
--	----	--------	---------	---------	--------

Koncentracija	2	8.0928e-06	4.0464e-06	3.6012	0.05473	.
Faza	2	9.1314e-06	4.5657e-06	4.0634	0.04060	*
Koncentracija:Faza	1	2.3740e-07	2.3740e-07	0.2113	0.65283	
Residuals	14	1.5731e-05	1.1236e-06			

Eksperiment s učincima PCB -153

chl_a :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	0.1846	0.09230	0.2349	0.79535
Faza	1	2.3260	2.32601	5.9197	0.03779 *
Koncentracija:Faza	1	0.0139	0.01389	0.0354	0.85501
Residuals	9	3.5363	0.39293		

karotenoidi :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	0.12503	0.062515	0.5486	0.5959
Faza	1	0.17353	0.173532	1.5227	0.2485
Koncentracija:Faza	1	0.02144	0.021442	0.1881	0.6747
Residuals	9	1.02568	0.113964		

proteini :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	728.9	364.5	0.6563	0.54190
Faza	1	3079.7	3079.7	5.5462	0.04295 *
Koncentracija:Faza	1	3227.0	3227.0	5.8116	0.03920 *
Residuals	9	4997.5	555.3		

lipidi :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	22236	11118	1.0886	0.37723
Faza	1	104275	104275	10.2097	0.01091 *
Koncentracija:Faza	1	23523	23523	2.3031	0.16343
Residuals	9	91920	10213		

MDA :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	0.006182	0.0030912	0.4833	0.6319
Faza	1	0.010395	0.0103955	1.6252	0.2343
Koncentracija:Faza	1	0.025069	0.0250692	3.9192	0.0791 .
Residuals	9	0.057569	0.0063966		

C :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	0.00001155	0.00000578	0.1183	0.889752
Faza	1	0.00095904	0.00095904	19.6453	0.001642 **
Koncentracija:Faza	1	0.00051835	0.00051835	10.6180	0.009862 **
Residuals	9	0.00043936	0.00004882		

N :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
--	----	--------	---------	---------	--------

Koncentracija	2	3.0310e-06	1.5153e-06	0.3903	0.6877
Faza	1	7.7190e-06	7.7185e-06	1.9883	0.1921
Koncentracija:Faza	1	8.2900e-07	8.2910e-07	0.2136	0.6549
Residuals	9	3.4937e-05	3.8819e-06		

Eksperiment s učincima VFN

chl_a :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	16.978	8.4891	1.5410	0.24264
Faza	2	33.357	16.6785	3.0275	0.07504 .
Koncentracija:Faza	2	0.698	0.3491	0.0634	0.93882
Residuals	17	93.652	5.5090		

karotenoidi :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	0.6775	0.33875	0.6923	0.51401
Faza	2	2.9161	1.45804	2.9795	0.07775 .
Koncentracija:Faza	2	0.0493	0.02466	0.0504	0.95099
Residuals	17	8.3189	0.48935		

proteini :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	5462	2730.8	0.8771	0.4340
Faza	2	10438	5219.2	1.6764	0.2165
Koncentracija:Faza	2	2179	1089.7	0.3500	0.7096
Residuals	17	52926	3113.3		

lipidi :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	164404	82202	20.2118	3.21e-05 ***
Faza	2	33979	16989	4.1773	0.03344 *
Koncentracija:Faza	2	20272	10136	2.4923	0.11241
Residuals	17	69139	4067		

MDA :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	0.10288	0.051441	0.6822	0.51880
Faza	2	0.53522	0.267608	3.5492	0.05151 .
Koncentracija:Faza	2	0.01679	0.008395	0.1113	0.89528
Residuals	17	1.28181	0.075401		

C :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	0.00023290	0.00011645	4.3401	0.03001 *
Faza	2	0.00196992	0.00098496	36.7092	6.771e-07 ***
Koncentracija:Faza	2	0.00001551	0.00000776	0.2891	0.75256
Residuals	17	0.00045614	0.00002683		

N :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	4.0040e-06	2.0018e-06	0.7367	0.49335

Faza	2	1.9609e-05	9.8047e-06	3.6084	0.04941 *
Koncentracija:Faza	2	4.7000e-08	2.3600e-08	0.0087	0.99137
Residuals	17	4.6192e-05	2.7172e-06		

Eksperiment s učincima MetP

chl_a :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	0.2390	0.1195	0.3079	0.7388135
Faza	2	11.7749	5.8875	15.1670	0.0001378 ***
Koncentracija:Faza	2	0.1250	0.0625	0.1610	0.8524713
Residuals	18	6.9871	0.3882		

karotenoidi :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	0.00805	0.00403	0.1015	0.904000
Faza	2	0.66090	0.33045	8.3299	0.002748 **
Koncentracija:Faza	2	0.00844	0.00422	0.1063	0.899703
Residuals	18	0.71407	0.03967		

proteini :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	296.4	148.21	0.2288	0.7978
Faza	2	2526.9	1263.44	1.9501	0.1712
Koncentracija:Faza	2	241.0	120.50	0.1860	0.8318
Residuals	18	11661.6	647.87		

MDA :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	0.044191	0.022095	1.3000	0.296929
Faza	2	0.246894	0.123447	7.2630	0.004868 **
Koncentracija:Faza	2	0.012397	0.006199	0.3647	0.699423
Residuals	18	0.305941	0.016997		

C :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	0.00002949	0.00001475	1.6128	0.2268
Faza	2	0.00159078	0.00079539	86.9942	5.597e-10 ***
Koncentracija:Faza	2	0.00000278	0.00000139	0.1518	0.8603
Residuals	18	0.00016457	0.00000914		

N :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Koncentracija	2	2.9890e-06	1.4945e-06	0.2861	0.75456
Faza	2	4.4579e-05	2.2290e-05	4.2666	0.03043 *
Koncentracija:Faza	2	1.7850e-06	8.9250e-07	0.1708	0.84431
Residuals	18	9.4035e-05	5.2242e-06		

Tablica 10. Sastav netretirane OV rafinerije nafte (Preuzeto iz: Pritišanac i sur., 2025)

Parametar	Mjerna jedinica	Raspon koncentracija
pH		7,84-10,62
Ugljikovodici	mg/L	5,4-152
Mineralno ulje	mg/L	3,3-81,3
Kemijska potrošnja kisika (KPK)	mg/L O ₂	1-658
NH ₄ ⁺	mg/L	0,5-124
NO ₃ ⁻	mg/L	15-61
PO ₄ ³⁻	mg/L	0-1
S ²⁻	mg/L	0-122
Merkaptani	mg/kg	0-64

Rezultati SIMPER ANALIZE

Eksperiment s nitratom

SIMPER

Similarity Percentages - species contributions

One-Way Analysis

Data worksheet

Name: Data25

Data type: Environmental

Sample selection: All

Variable selection: All

Parameters

Resemblance: D1 Euclidean distance

Cut off for low contributions: 70,00%

Factor Groups

Sample	KONC
0,8 mM NO3	0,8 mM
0,8 mM NO3	0,8 mM
0,8 mM NO3	0,8 mM
0,8 mM NO3	0,8 mM
0,8 mM NO3	0,8 mM
0,8 mM NO3	0,8 mM
0,8 mM NO3	0,8 mM
1,6 mM NO3	1,6 mM
1,6 mM NO3	1,6 mM
1,6 mM NO3	1,6 mM
1,6 mM NO3	1,6 mM
1,6 mM NO3	1,6 mM

1,6 mM NO3 1,6 mM
 1,6 mM NO3 1,6 mM
 2,4 mM NO3 2,4 mM
 2,4 mM NO3 2,4 mM
 2,4 mM NO3 2,4 mM
 2,4 mM NO3 2,4 mM
 2,4 mM NO3 2,4 mM

Group 0,8 mM

Average squared distance = 5,02

Species	Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
UND	-0,407	0,0376	0,59	0,75	0,75
PUFA	-0,526	0,267	0,54	5,32	6,07
MDA	0,292	0,586	0,54	11,67	17,74
chl a	-0,357	0,598	0,54	11,91	29,65
MUFA	-0,283	0,814	0,58	16,22	45,87
car	-0,253	0,82	0,55	16,34	62,21
SAT	0,439	0,852	0,60	16,97	79,18

Group 1,6 mM

Average squared distance = 8,99

Species	Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
MDA	-0,703	0,461	0,57	5,13	5,13
car	-0,164	0,548	0,56	6,09	11,22
chl a	-0,138	0,699	0,57	7,78	19,00
SAT	-0,579	0,773	0,56	8,59	27,59
MUFA	0,386	0,987	0,59	10,97	38,56
PUFA	0,684	1,64	0,59	18,27	56,83
DETRIT	0,0763	1,7	0,55	18,88	75,71

Group 2,4 mM

Average squared distance = 8,29

Species	Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
UND	-0,278	0,136	0,51	1,64	1,64
PUFA	-0,221	0,272	0,54	3,27	4,91
DETRIT	-0,104	0,362	0,58	4,36	9,27
SAT	0,196	1,09	0,56	13,13	22,40
MUFA	-0,145	1,37	0,55	16,53	38,94
MDA	0,575	1,5	0,54	18,12	57,06
chl a	0,693	1,7	0,53	20,48	77,54

Groups 0,8 mM & 1,6 mM

Average squared distance = 17,04

Variable	Group 0,8 mM Av.Value	Group 1,6 mM Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
PUFA	-0,526	0,684	3,1	0,93	18,20	18,20
UND	-0,407	0,606	2,93	0,62	17,21	35,41
SAT	0,439	-0,579	2,43	0,88	14,27	49,67
DETRIT	-0,00229	0,0763	2,36	0,75	13,84	63,51
MUFA	-0,283	0,386	1,99	0,90	11,69	75,19

Groups 0,8 mM & 2,4 mM

Average squared distance = 13,02

Variable	Group 0,8 mM Av.Value	Group 2,4 mM Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
----------	--------------------------	--------------------------	------------	------------	----------	-------

chl a	-0,357	0,693	2,97	0,93	22,84	22,84
car	-0,253	0,584	2,89	0,87	22,22	45,06
MUFA	-0,283	-0,145	1,81	0,78	13,94	59,00
MDA	0,292	0,575	1,78	0,83	13,71	72,70

Groups 1,6 mM & 2,4 mM

Average squared distance = 19,74

variable	Group 1,6 mM Av.Value	Group 2,4 mM Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
MDA	-0,703	0,575	3,23	0,97	16,36	16,36
UND	0,606	-0,278	2,76	0,61	14,00	30,36
chl a	-0,138	0,693	2,65	0,92	13,41	43,77
car	-0,164	0,584	2,52	0,94	12,76	56,53
PUFA	0,684	-0,221	2,44	0,91	12,38	68,92
MUFA	0,386	-0,145	2,22	0,93	11,27	80,18

Eksperiment s amonijem

SIMPER

Similarity Percentages - species contributions

One-Way Analysis

0. Data worksheet

1. Name: Data31
2. Data type: Environmental
3. Sample selection: All
4. Variable selection: All
- 5.

6. Parameters

7. Resemblance: D1 Euclidean distance
8. Cut off for low contributions: 70,00%
- 9.

10. Factor Groups

11. Sample Konc
12. 0,8 mM NH4 0,8 mM
13. 0,8 mM NH4 0,8 mM
14. 0,8 mM NH4 0,8 mM
15. 0,8 mM NH4 0,8 mM
16. 0,8 mM NH4 0,8 mM
17. 0,8 mM NH4 0,8 mM
18. 0,8 mM NH4 0,8 mM
19. 0,8 mM NH4 0,8 mM
20. 0,8 mM NH4 0,8 mM
21. 0,8 mM NH4 0,8 mM
22. 1,6 mM NH4 1,6 mM
23. 1,6 mM NH4 1,6 mM
24. 1,6 mM NH4 1,6 mM
25. 1,6 mM NH4 1,6 mM
26. 1,6 mM NH4 1,6 mM
27. 1,6 mM NH4 1,6 mM

28. 1,6 mM NH4 1,6 mM
 29. 1,6 mM NH4 1,6 mM
 30. 1,6 mM NH4 1,6 mM
 31. 1,6 mM NH4 1,6 mM
 32. 1,6 mM NH4 1,6 mM
 33. 2,4 mM NH4 2,4 mM
 34. 2,4 mM NH4 2,4 mM
 35. 2,4 mM NH4 2,4 mM
 36. 2,4 mM NH4 2,4 mM
 37. 2,4 mM NH4 2,4 mM
 38. 2,4 mM NH4 2,4 mM
 39. 2,4 mM NH4 2,4 mM
 40. 2,4 mM NH4 2,4 mM
 41. 2,4 mM NH4 2,4 mM
 42. 2,4 mM NH4 2,4 mM
 43. 2,4 mM NH4 2,4 mM

44.

45. *Group 0,8 mM*

46. Average squared distance = 5,02

47.

48. Species	Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
49. DETRIT	-0,249	0,0381	0,45	0,76	0,76
50. UND	-0,0383	0,448	0,47	8,92	9,68
51. chl a	-0,302	0,789	0,52	15,72	25,41
52. MDA	-0,126	0,934	0,45	18,62	44,03
53. car	-0,334	0,987	0,56	19,67	63,70
54. C/N	0,631	1,82	0,51	36,30	100,00

55.

56. *Group 1,6 mM*

57. Average squared distance = 7,91

58.

59. Species	Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
60. C/N	-0,332	0,406	0,45	5,13	5,13
61. MDA	0,125	0,934	0,55	11,82	16,95
62. car	0,457	1,03	0,50	13,01	29,96
63. chl a	0,501	1,17	0,50	14,86	44,82
64. UND	0,103	1,6	0,41	20,27	65,08
65. DETRIT	0,403	2,76	0,32	34,92	100,00

66.

67. *Group 2,4 mM*

68. Average squared distance = 4,48

69.

70. Species	Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
71. DETRIT	-0,177	0,0308	0,57	0,69	0,69
72. C/N	-0,242	0,471	0,44	10,52	11,21
73. chl a	-0,227	0,791	0,56	17,66	28,87
74. car	-0,153	0,817	0,57	18,25	47,12
75. UND	-0,0684	1,08	0,42	24,04	71,16

76.

77. *Groups 0,8 mM & 1,6 mM*

78. Average squared distance = 14,41

79.

80. Variable	Group 0,8 mM Av.Value	Group 1,6 mM Av.Value	Av.Sq.Dist
81. DETRIT	-0,249	0,403	2,97
82. 0,33	20,60	20,60	
83. C/N	0,631	-0,332	2,94
84. 0,77	20,37	40,98	
84. car	-0,334	0,457	2,45
84. 0,81	16,99	57,97	

85.	chl a	-0,302	0,501	2,42
	0,82	16,82	74,78	
86.				
87.	<i>Groups 0,8 mM & 2,4 mM</i>			
88.	Average squared distance = 9,41			
89.				
90.		Group 0,8 mM	Group 2,4 mM	
91.	Variable	Av.Value	Av.Value	Av.Sq.Dist
	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%	
92.	C/N	0,631	-0,242	2,83
	0,77	30,09	30,09	
93.	MDA	-0,126	-0,0108	2,03
	0,67	21,56	51,65	
94.	car	-0,334	-0,153	1,66
	0,83	17,69	69,33	
95.	chl a	-0,302	-0,227	1,43
	0,82	15,25	84,58	
96.				
97.	<i>Groups 1,6 mM & 2,4 mM</i>			
98.	Average squared distance = 12,55			
99.				
100.		Group 1,6 mM	Group 2,4 mM	
101.	Variable	Av.Value	Av.Value	Av.Sq.Dist
	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%	
102.	DETRIT	0,403	-0,177	2,87
	0,33	22,89	22,89	
103.	UND	0,103	-0,0684	2,46
	0,58	19,63	42,53	
104.	chl a	0,501	-0,227	2,32
	0,87	18,46	60,99	
105.	car	0,457	-0,153	2,05
	0,89	16,33	77,32	
106.				

SIMPER

Similarity Percentages - species contributions

One-Way Analysis

Data worksheet

Name: PCB-NORM

Data type: Environmental

Sample selection: All

Variable selection: All

Parameters

Resemblance: D1 Euclidean distance

Cut off for low contributions: 70,00%

Factor Groups

Sample Faza

K lag

1µM lag

3µM lag

3µM lag

3µM lag
 9µM lag
 9µM lag
 9µM lag
 K eksp
 K eksp
 K eksp
 K eksp
 K eksp
 K eksp
 1µM eksp
 1µM eksp
 1µM eksp
 1µM eksp
 1µM eksp
 3µM eksp
 3µM eksp
 3µM eksp
 3µM eksp
 3µM eksp
 3µM eksp
 3µM eksp
 9µM eksp
 9µM eksp
 9µM eksp
 9µM eksp
 K stac
 1µM stac
 1µM stac
 3µM stac
 9µM stac

Group lag

Average squared distance = 2,72

Species	Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
C/N	-0,983	0	SD=0!	0,00	0,00
car	-0,925	0,00838	0,49	0,31	0,31
chl a	-1,04	0,0144	0,46	0,53	0,84
UND	-0,851	0,229	0,57	8,43	9,26
MDA	-0,537	0,37	0,53	13,58	22,84
PUFA	-0,529	0,386	0,58	14,16	37,00
DETRIT	0,342	1,71	0,49	63,00	100,00

Group eksp

Average squared distance = 5,91

Species	Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
C/N	-0,0288	0,525	0,51	8,87	8,87
UND	-0,0105	0,781	0,54	13,21	22,08
MDA	0,129	0,824	0,50	13,94	36,02
PUFA	-0,148	0,84	0,56	14,21	50,23
chl a	0,521	0,853	0,50	14,42	64,65
DETRIT	-0,0604	0,976	0,24	16,51	81,15

Group stac

Average squared distance = 2,88

Species	Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
car	-0,239	0,00214	0,59	0,07	0,07
DETRIT	-0,294	0,00711	0,62	0,25	0,32
PUFA	1,47	0,0147	0,59	0,51	0,83
UND	1,41	0,0218	0,53	0,75	1,58

chl a	-0,529	0,0427	0,55	1,48	3,07
C/N	1,69	0,106	0,57	3,66	6,73
MDA	0,32	2,69	0,54	93,27	100,00

Groups lag & eksp

Average squared distance = 14,58

Variable	Group lag Av.Value	Group eksp Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
chl a	-1,04	0,521	3,25	1,18	22,26	22,26
car	-0,925	0,409	2,85	0,67	19,53	41,79
DETRIT	0,342	-0,0604	2,59	0,54	17,78	59,57
UND	-0,851	-0,0105	1,65	0,87	11,33	70,89

Groups lag & stac

Average squared distance = 22,79

Variable	Group lag Av.Value	Group stac Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
C/N	-0,983	1,69	7,25	4,69	31,80	31,80
UND	-0,851	1,41	5,31	2,43	23,32	55,11
PUFA	-0,529	1,47	4,33	1,80	18,99	74,10

Groups eksp & stac

Average squared distance = 17,13

Variable	Group eksp Av.Value	Group stac Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
C/N	-0,0288	1,69	3,55	1,44	20,73	20,73
PUFA	-0,148	1,47	3,42	1,17	19,94	40,67
MDA	0,129	0,32	2,97	0,83	17,36	58,03
UND	-0,0105	1,41	2,77	1,07	16,16	74,19

Eksperiment s VFN

SIMPER

Similarity Percentages - species contributions

One-Way Analysis

Data worksheet

Name: Data13

Data type: Environmental

Sample selection: All

Variable selection: All

Parameters

Resemblance: D1 Euclidean distance

Cut off for low contributions: 70,00%

Factor Groups

Sample	Faza
1% VFN	lag
1% VFN	lag
5% VFN	lag

5% VFN lag
 5% VFN lag
 10% VFN lag
 10% VFN lag
 1% VFN eksp
 1% VFN eksp
 1% VFN eksp
 1% VFN eksp
 1% VFN eksp
 1% VFN eksp
 5% VFN eksp
 5% VFN eksp
 5% VFN eksp
 5% VFN eksp
 5% VFN eksp
 5% VFN eksp
 10% VFN eksp
 10% VFN eksp
 10% VFN eksp
 10% VFN eksp
 10% VFN eksp
 10% VFN eksp
 1% VFN stac
 1% VFN stac
 5% VFN stac
 5% VFN stac
 10% VFN stac
 10% VFN stac

Group lag

Average squared distance = 2,45

Species	Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
DETRIT	-0,56	0	SD=0!	0,00	0,00
C/N	-1,2	0,000296	0,40	0,01	0,01
car	-0,853	0,0128	0,55	0,52	0,53
UND	-0,401	0,0164	0,48	0,67	1,20
PUFA	-0,812	0,0175	0,40	0,72	1,92
chl a	-0,588	0,0226	0,57	0,92	2,84
SAT	0,833	0,735	0,52	29,99	32,83
MDA	-0,544	0,744	0,44	30,36	63,19
MUFA	-0,587	0,902	0,51	36,81	100,00

Group eksp

Average squared distance = 9,08

Species	Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
C/N	-0,000828	0,453	0,52	4,99	4,99
DETRIT	0,0699	0,822	0,37	9,05	14,04
PUFA	0,161	0,915	0,54	10,08	24,12
MDA	0,444	0,988	0,45	10,88	35,00
car	0,544	0,996	0,52	10,97	45,97
SAT	-0,115	1,05	0,44	11,53	57,50
MUFA	0,0598	1,07	0,44	11,81	69,31
chl a	0,493	1,13	0,51	12,42	81,74

Group stac

Average squared distance = 4,88

Species	Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
UND	-0,025	0,0205	0,54	0,42	0,42
chl a	-0,795	0,0206	0,54	0,42	0,84

car	-0,636	0,0318	0,57	0,65	1,49
MDA	-0,696	0,0445	0,59	0,91	2,41
SAT	-0,628	0,0676	0,56	1,39	3,79
C/N	1,4	0,115	0,51	2,36	6,15
MUFA	0,506	0,469	0,63	9,62	15,77
PUFA	0,465	1,59	0,58	32,67	48,44
DETRIT	0,444	2,51	0,47	51,56	100,00

Groups lag & eksp

Average squared distance = 19,17

variable	Group lag Av.Value	Group eksp Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
car	-0,853	0,544	2,9	0,91	15,13	15,13
MDA	-0,544	0,444	2,55	0,72	13,28	28,41
SAT	0,833	-0,115	2,52	0,84	13,12	41,54
chl a	-0,588	0,493	2,25	0,78	11,75	53,29
MUFA	-0,587	0,0598	2,2	0,72	11,50	64,79
UND	-0,401	0,164	1,9	0,26	9,91	74,69

Groups lag & stac

Average squared distance = 19,11

Variable	Group lag Av.Value	Group stac Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
C/N	-1,2	1,4	6,82	4,24	35,69	35,69
DETRIT	-0,56	0,444	3,1	0,50	16,24	51,93
PUFA	-0,812	0,465	2,97	0,86	15,56	67,48
SAT	0,833	-0,628	2,82	1,16	14,77	82,25

Groups eksp & stac

Average squared distance = 19,67

Variable	Group eksp Av.Value	Group stac Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
DETRIT	0,0699	0,444	3,01	0,58	15,30	15,30
chl a	0,493	-0,795	2,74	0,84	13,93	29,24
C/N	-0,000828	1,4	2,48	1,31	12,60	41,84
car	0,544	-0,636	2,36	0,84	11,99	53,83
PUFA	0,161	0,465	2,28	0,86	11,61	65,44
MDA	0,444	-0,696	2,27	0,68	11,53	76,97

Eksperiment s metilparabenom

SIMPER

Similarity Percentages - species contributions

One-Way Analysis

Data worksheet

Name: Data23

Data type: Environmental

Sample selection: All

Variable selection: All

Parameters

Resemblance: D1 Euclidean distance

Cut off for low contributions: 70,00%

Factor Groups

Sample	Faza
MetP1 (3500 ng/L)	lag
MetP1 (3500 ng/L)	lag
MetP1 (3500 ng/L)	lag
MetP2 (500 ng/L)	lag
MetP2 (500 ng/L)	lag
MetP2 (500 ng/L)	lag
MetP3 (10 ng/L)	lag
MetP3 (10 ng/L)	lag
MetP3 (10 ng/L)	lag
MetP1 (3500 ng/L)	eksp
MetP1 (3500 ng/L)	eksp
MetP1 (3500 ng/L)	eksp
MetP1 (3500 ng/L)	eksp
MetP1 (3500 ng/L)	eksp
MetP1 (3500 ng/L)	eksp
MetP2 (500 ng/L)	eksp
MetP2 (500 ng/L)	eksp
MetP2 (500 ng/L)	eksp
MetP2 (500 ng/L)	eksp
MetP2 (500 ng/L)	eksp
MetP2 (500 ng/L)	eksp
MetP3 (10 ng/L)	eksp
MetP3 (10 ng/L)	eksp
MetP3 (10 ng/L)	eksp
MetP3 (10 ng/L)	eksp
MetP3 (10 ng/L)	eksp
MetP1 (3500 ng/L)	stac
MetP1 (3500 ng/L)	stac
MetP1 (3500 ng/L)	stac
MetP2 (500 ng/L)	stac
MetP2 (500 ng/L)	stac
MetP2 (500 ng/L)	stac
MetP3 (10 ng/L)	stac
MetP3 (10 ng/L)	stac
MetP3 (10 ng/L)	stac

Group lag

Average squared distance = 10,09

Species	Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
C/N	-1,07	0	SD=0!	0,00	0,00
MUFA	-0,926	0,191	0,53	1,90	1,90
car	-0,998	0,195	0,54	1,93	3,83
chl a	-0,783	0,22	0,54	2,18	6,01
DETRIT	-0,226	0,27	0,46	2,68	8,68
MDA	-0,767	0,474	0,57	4,70	13,38
SAT	0,658	1,65	0,47	16,33	29,72
PUFA	0,117	3,1	0,41	30,69	60,41
UND	0,236	4	0,36	39,59	100,00

Group eksp

Average squared distance = 6,76

Species	Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
UND	-0,128	0,116	0,55	1,72	1,72

C/N	-0,151	0,339	0,51	5,02	6,74
PUFA	-0,0238	0,402	0,57	5,95	12,69
SAT	0,0224	0,729	0,53	10,78	23,47
MUFA	-0,0107	0,79	0,51	11,68	35,15
chl a	0,723	0,834	0,47	12,34	47,50
MDA	0,669	0,862	0,47	12,75	60,25
car	0,655	0,921	0,46	13,62	73,87

Group stac

Average squared distance = 1,60

Species	Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
chl a	-0,663	0,0215	0,44	1,34	1,34
car	-0,312	0,0266	0,50	1,66	3,00
UND	0,0186	0,0323	0,52	2,02	5,02
MDA	-0,571	0,0348	0,58	2,17	7,20
SAT	-0,703	0,133	0,48	8,29	15,48
C/N	1,37	0,192	0,51	11,99	27,47
DETRIT	-0,0868	0,23	0,46	14,38	41,85
PUFA	-0,0694	0,4	0,53	24,95	66,80
MUFA	0,947	0,532	0,59	33,20	100,00

Groups lag & eksp

Average squared distance = 24,80

Variable	Group lag Av.Value	Group eksp Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
UND	0,236	-0,128	3,79	0,38	15,30	15,30
car	-0,998	0,655	3,78	1,20	15,23	30,52
MDA	-0,767	0,669	3,3	0,82	13,29	43,82
chl a	-0,783	0,723	3,25	1,14	13,11	56,92
PUFA	0,117	-0,0238	3,15	0,51	12,72	69,64
SAT	0,658	0,0224	2,56	1,07	10,31	79,95

Groups lag & stac

Average squared distance = 22,35

Variable	Group lag Av.Value	Group stac Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
C/N	-1,07	1,37	6,14	2,93	27,47	27,47
MUFA	-0,926	0,947	4,15	1,37	18,57	46,04
UND	0,236	0,0186	3,63	0,39	16,23	62,28
SAT	0,658	-0,703	3,44	1,69	15,38	77,65

Groups eksp & stac

Average squared distance = 16,05

Variable	Group eksp Av.Value	Group stac Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
C/N	-0,151	1,37	2,82	1,33	17,54	17,54
chl a	0,723	-0,663	2,73	1,19	17,00	34,54
MDA	0,669	-0,571	2,38	0,76	14,83	49,37
MUFA	-0,0107	0,947	2,14	0,83	13,31	62,68
DETRIT	0,156	-0,0868	1,93	0,29	12,04	74,71