

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Amela Hozić Zimmermann

ELEKTROKEMIJSKI SENZOR ZA DETEKCIJU MEKIH ČESTICA

DISERTACIJA

Zagreb, prosinac 2007.

UDK: 544.6

Znanstveno područje: prirodne znanosti

Znanstveno polje: kemija

Znanstvena grana: fizikalna kemija

Institucija: Institut "Ruđer Bošković", Zavod za istraživanje mora i okoliša, Grupa za bioelektrokemiju i oslikavanje površina

Voditelj rada: dr.sc. Vesna Svetličić

Broj stranica: 77

Broj slika: 52

Broj tablica: 2

Broj priloga: -

Broj literaturnih referenci: 114

Datum obrane: 14.12.2007.

Sastav povjerenstva za obranu:

dr.sc. Laszlo Sipos, redovni profesor FKIT-a

dr.sc. Vesna Svetličić, znanstvena savjetnica IRB-a

dr.sc. Stjepan Milardović, docent FKIT-a

Rad je pohranjen u:

knjižnici Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, Marulićev trg 20, Zagreb

Nacionalnoj i sveučilišnoj biblioteci u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb, Zagreb

Biblioteci Sveučilišta u Rijeci, Dolac 1, Rijeka

Biblioteci Sveučilišta u Splitu, Livanjska 5, Split

Biblioteci Sveučilišta u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Tema doktorske disertacije prihvaćena je na *108. redovitoj sjednici* Fakultetskog vijeća Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu održanoj dana *19. lipnja 2006.*

SAŽETAK

U ovom radu opisan je razvoj nove klase senzora za detekciju mekih čestica (npr. liposoma, živih stanica i morskih mikročestica) u vodenom okolišu čija se veličina kreće od 1 – 500 μm . Metoda je jednostavna, pouzdana i selektivno detektira pojedinačne čestice bez obzira na prisutnost krutih čestica.

Svojstva senzora (optimalni i granični uvjeti rada; granica detekcije s obzirom na koncentraciju čestica i medij, te primjenjeni potencijal) ispitani su u suspenziji modelnih čestica jednostaničnih algi *Dunaliella tertiolecta*. Živina elektroda korištena je kao radna elektroda za praćenje pojavnosti signala adhezije u milisekundnom području elektrokemijskom tehnikom kronoamperometrije. Za prihvata, spremanje i analizu velikom broja podataka korišten je analogno-digitalni pretvornik (DAQ card-AI-16-XE-50, National Instruments) i aplikacija razvijena u LabView 6.1 programskom paketu. Apsolutna koncentracija modelnih stanica određena je brojanjem na hemacitometru koristeći svjetlosni mikroskop.

Primjenjivost i univerzalnost senzora ispitana je u odgovarajućim medijima za različite klase čestica:

- u prirodnim uzorcima mora,
- u eksperimentu cvata fitoplanktona na mezo skali,
- u suspenziji liposoma u fiziološkoj otopini
- u suspenzijama krvnih zrnaca u fiziološkoj otopini

Utjecaj adsorpcije otopljene organske tvari na adheziju stanica ispitan je korištenjem dekstran sulfata molekularne mase 500 000 kao modela otopljenog biopolimera. Kompeticija između adsorpcije molekula i adhezije stanica proučavana je analizom učestalosti signala prianjanja.

Ključne riječi: *Dunaliella tertiolecta*, elektrokemijski adhezijski senzor, elektrokemijski adhezijski signali, kronoamperometrija, krvna zrnca, liposomi, morske mikročestice, statička živina kap elektroda

ABSTRACT

The development of a new class of sensor for detection of soft particles (e.g. liposomes, live cells and marine microparticles) in aquatic environments in the size range 1 – 500 μm is the subject of this thesis. The method is simple, reliable and selectively detects individual particles regardless of the presence of solid particles.

Characteristics of the sensor (optimal and critical working conditions; detection limit with regard to the concentration of particles, medium and applied potential) are tested in suspensions of model particles - unicellular marine algae *Dunaliella tertiolecta*. Mercury electrode was used as the working electrode for monitoring the appearance of adhesion signals in millisecond range using electrochemical technique of chronoamperometry. Analog signal data acquisition was performed by DAQ card-AI-16-XE-50 input device and data analyses using the application developed in LabView 6.1 software. Absolute concentration of model particles was determined by counting the cells on the hemacytometer using light microscope.

Application of the sensor was tested in suitable media for different class of particles:

- in natural seawater samples
- in mesocosm bloom experiment
- in liposome suspension (phosphate buffer saline)
- in suspension of red and white blood cells (phosphate buffer saline)

Effect of adsorption of dissolved organic matter on cell adhesion was tested using dextrane sulfate with molecular weight 500 000, as the model for dissolved biopolymers. Competition between molecular adsorption and cell adhesion was studied by analysing the frequency of adhesion signals.

Key words: *Dunaliella tertiolecta*, electrochemical adhesion sensor, electrochemical adhesion signals, chronoamperometry, blood cells, liposomes, marine microparticles, static mercury drop electrode

Disertacija je izrađena u Zavodu za istraživanje mora i okoliša u Zagrebu i Centru za istraživanje mora u Rovinju Instituta "Ruđer Bošković" i u suradnji sa Laboratorijem za tekuće elektrolite i nabijene međupovršine Sveučilišta Pierre i Marie Curie u Parizu.

Zahvaljujem...

.....dr.sc. Vesni Svetličić na predloženoj zanimljivoj temi i nesebičnoj pomoći tijekom izrade ovog rada

.....dr.sc. Veri Žutić na korisnim savjetima i vječnom entuzijazmu

.....dr.sc. Jeanu Chevaletu na suradnji na razvoju senzora i prototipa za *in situ* detekciju mekih čestica u Parizu, Zagrebu i Rovinju

.....kolegama iz Centra za istraživanje mora u Rovinju posebno dr.sc. Dragici Fuks i dr.sc. Tomislavu Radiću na pomoći i diskusijama u toku mezokozmos eksperimenta "Rovinj 2003"

.....posadi istraživačkog broda "Vila Velebita" na nezaboravnim trenucima za vrijeme terenskih izlazaka u okviru projekta Jadran, kao i za poseban izlazak namijenjen testiranju senzora

.....dr.sc. Nadici Ivošević DeNardis na prijateljskoj podršci i izuzetnoj kolegijalnosti tijekom mnogih eksperimentalnih druženja

.....kolegama iz Grupe za bioelektrokemiju i oslikavanje površina na pruženoj podršci tijekom izrade i pisanja ovog rada

.....dr.sc. Ruži Frkanec na pripravi ciljanih suspenzija liposoma

.....dr.sc. Nevenu Žarkoviću i članovima Laboratorija za oksidacijski stres na pripremi i izolaciji uzoraka krvnih zrnaca

Veliko hvala mojim roditeljima i Borisu na neizmjerneoj ljubavi i podršci

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	
2.1 KEMIJSKI SENZOR	2
2.2 TEHNIKE BROJANJA POJEDINAČNIH ČESTICA	2
2.3 ELEKTROKEMIJSKI PRINCIP – ADHEZIJA ČESTICA	4
2.3.1 Živine elektrode	5
2.3.1.1 <i>Kapajuća živina elektroda</i>	5
2.3.1.2 <i>Statička živina elektroda</i>	6
2.3.2 Električni dvosloj	8
2.3.3 Osnove metode	10
2.3.3.1 <i>Elektrokemijsko raspoznavanje organskih čestica na živinoj kap elektrodi</i>	13
2.4 MEKE ČESTICE	15
2.4.1 Samoudruživanje amfifilnih molekula	15
2.4.2 Liposomi	18
2.4.3 Biološke membrane	19
2.4.3.1 <i>Fluidnost membrana</i>	19
2.4.3.2 <i>Membrana crvenog krvnog zrnca</i>	20
2.4.4 Fleksibilne čestice u morima i oceanima	22
2.4.4.1 <i>Organska tvar u moru</i>	22
2.4.4.2 <i>Nežive čestice u morima i oceanima</i>	23
2.4.4.3 <i>Proučavanje neživih čestica u Jadranskom moru</i>	24
3. METODIKA	
3.1 INSTRUMENTI	26
3.2 ĆELIJA I ELEKTRODE	26
3.2.1 Radna elektroda: statička živina elektroda	27
3.2.2 Radna elektroda: kapajuća živina elektroda	27
3.3 KEMIKALIJE	27
3.3.1 Otopine	27
3.3.2 Živa	28
3.4 ISPITIVANE MEKE ČESTICE	28
3.4.1 Kultura stanica morskog fitoplanktona	28
3.4.1.1 <i>Uzgoj stanica <i>Dunaliella tertiolecta</i></i>	29

3.4.1.2	<i>Izolacija stanica</i>	30
3.4.1.3	<i>Određivanje gustoće stanica</i>	31
3.4.2	Liposomi	31
3.4.3	Krvna zrnca	32
3.4.3.1	<i>Izolacija krvnih stanica</i>	32
3.4.3.2	<i>Određivanje gustoće krvnih stanica</i>	32
3.4.4	Morske nežive čestice	33
3.5	POSTUPAK ELEKTROKEMIJSKOG MJERENJA	35
3.5.1	Postupak mjerenja kod eksperimenta određivanja gustoće naboja stanica fitoplanktona	35
3.5.2	Postupak uzorkovanja i elektrokemijskog mjerenja tijekom trajanja mezokozmos eksperimenta "ROVINJ 2003"	36
4. REZULTATI I RASPRAVA		
4.1	PRIMJENA SENZORA ZA DETEKCIJU MEKIH ČESTICA I NJIHOVO BROJANJE	37
4.1.1	Kalibracijski sistem	39
4.1.2	Prihvat i pohrana podataka	43
4.1.3	Testiranje senzora	43
4.1.3.1	<i>Praćenje razvoja čestica tijekom mezokozmos eksperimenta "Rovinj 2003"</i>	43
4.1.3.2	<i>Utjecaj adsorpcije otopljenih organskih molekula na adheziju stanica</i>	48
4.2	RAZVOJ SENZORA ZA <i>IN SITU</i> DETEKCIJU MEKIH ČESTICA U VODENOM OKOLIŠU	51
4.3	PRIMJENA SENZORA ZA KARAKTERIZACIJU ČESTICA	56
4.3.1	Određivanje gustoće naboja stanice fitoplanktona	56
4.3.2	Adhezijski signali liposoma	62
4.3.3	Adhezijski signali krvnih zrnaca	66
4.3.3.1	<i>Adhezijski signali krvnih zrnaca na KŽE</i>	66
4.3.3.2	<i>Adhezijski signali krvnih zrnaca na SŽE</i>	68
5.	ZAKLJUČCI	71
6.	LITERATURA	72
LISTA SIMBOLA I KRATICA		

1. UVOD

Sa problemom detekcije i karakterizacije mekih čestica (npr. organskih mikrokapljica, vezikula, živih stanica) svakodnevno se susrećemo u području ispitivanja i praćenja kvalitete prirodnih voda, tehnoloških procesa u farmakologiji i prehrambenoj industriji, te u biotehnologiji. Uobičajeni princip za brojanje čestica i njihovu raspodjelu po veličini je elektrokemijski princip poznat kao Coulterov princip.

Svrha ovog rada je razvoj nove klase senzora za selektivnu detekciju mekih čestica u vodenom okolišu koji se osniva na otkriću pojedinačnih događaja na živinoj kapajućoj elektrodi.¹ Nađeno je da adhezija pojedinačnih čestica suspendiranih u vodenom mediju rezultira dobro definiranim signalima prijanjanja na krivuljama struja-vrijeme kod konstantnog potencijala. Fluidne organske čestice kao npr. uljne kapljice, organske čestice u moru i jednostanične alge mogu se detektirati i karakterizirati zbog njihove adhezije na međupovršini živina kapajuća elektroda/vodena otopina elektrolita. Učestalost pojavljivanja signala odraz je koncentracije reaktivnih čestica, dok amplituda signala prijanjanja odražava veličinu pojedinačne stanice.

Za razvoj elektrokemijskog brojača čestica koji se osniva na mjerenju adhezijskih signala potrebno je istražiti mogućnost detekcije signala na živinim elektrodama konstantne površine kao povoljnije konstrukcije elektrode od do sada korištene živine kapajuće elektrode.

2. OPĆI DIO

2.1 KEMIJSKI SENZOR

Općenito govoreći, senzor je uređaj koji pretvara fizikalne ili kemijske parametre u električni ili optički signal. Uobičajeni fizikalni parametri koji se prate pomoću senzora su temperatura, tlak, sila, magnetsko polje, i drugi dok je interesantan kemijski parametar najčešće koncentracija kemijskih tvari.²

Prema definiciji koju je preporučila Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (IUPAC), kemijski senzor je mjerna naprava koja kemijsku informaciju, bez obzira da li potječe iz kemijske reakcije ciljnog analita ili fizikalnog svojstva ispitivanog sustava, pretvara u analitički koristan signal.³ Svaki se kemijski senzor sastoji iz *prijemnog (receptorskog)* dijela, odgovornog za, više ili manje, selektivno i osjetljivo prepoznavanje analita, *pretvorničkog* dijela, u kojem se energija oslobođena uslijed interakcije analita i receptora prevodi u oblik pogodan za mjerenje i *elektroničkog* dijela za pojačavanje i rukovanje sa signalom.⁴

S obzirom na receptorski dio senzori se mogu podijeliti na:

- fizikalne (u mjernom analitu ne dolazi do kemijske reakcije)
- kemijske (s mjernim analitom dolazi do kemijske reakcije koja daje analitički signal)
- biokemijske (biokemijska reakcija je izvor analitičkog signala)

S obzirom na mjerni pretvornik kemijski senzori mogu biti:

- optički, koji pokazuju promjenu optičkih svojstava koja su posljedica međudjelovanja analita i receptorskog dijela senzora;
- elektrokemijski, koji pretvaraju utjecaj elektrokemijskog međudjelovanja mjernog analita i elektrode u analitički iskoristiv signal;
- pretvornici mase;
- magnetski;
- temperaturni.

2.2 TEHNIKE BROJANJA POJEDINAČNIH ČESTICA

Uz pomoć slijedećih tehnika moguće je izolirati i mjeriti pojedinačne čestice:

Optička mikroskopija. Mikroskop je osnovni instrument za proučavanje čestica; to je

jedina metoda u kojoj se pojedinačne čestice promatraju direktno. Ako je materijal koji se proučava moguće vizualizirati pomoću optičkog mikroskopa to će uvijek biti prvi izbor, jer je ova tehnika prihvaćena kao referentna. Dokaz dobiven pomoću mikroskopa ima visoki stupanj kredibiliteta. Ovom tehnikom moguće je odrediti veličinu čestice, njezin oblik, kristalnu strukturu, jesu li čestice u primarnom ili agregiranom stanju, i da li se u uzorku nalaze različite tvari. Treba uzeti reprezentativan uzorak što znači da treba paziti što se stavlja pod mikroskop i što se uzima iz dobivene slike, te izbrojati statistički značajan broj čestica.⁵

Uz pomoć optičkog mikroskopa, često je moguće detektirati ali ne i odrediti veličinu čestica ispod $\sim 2 \mu\text{m}$ zbog difrakcije. Kontrast uzorka često ograničava upotrebu optičkog mikroskopa, te se koriste posebne metode za unapređenje kao npr. fazni kontrast, tamno polje i Nomarski interferencija.⁶ Kontrast uzorka za neapsorbirajuće čestice se smanjuje kako se vrijednost refraktivnog indeksa čestice približava onoj medija. Sve vrste optičkih metoda zakazuju za neapsorbirajuće čestice kada su indeksi refrakcije za čestice i medij jednaki.

Elektronska mikroskopija. Prednosti koje imaju metode elektronske mikroskopije (ali i optičke mikroskopije) jesu direktno promatranje uzorka i njegova vizualizacija. Moć razlučivanja koju dostižu elektronski mikroskopi iznosi i do $0,1 \text{ nm}$, što je čak tisuću puta bolje nego kod svjetlosnih mikroskopa. Glavni nedostaci ove metode su efekti visokog vakuma i visoke temperature koji nastaju zbog sruza elektronske zrake sa uzorkom koji zatim neizbježno mijenja svoje stanje bilo flokulacijom ili koalescencijom. Priprema samog uzorka te njegovo oslikavanje su zamorni. Tehnika je zahtjevna u smislu opreme i rada, te izrazito skupa. Stupanj povećanja u elektronskom mikroskopu nije poznat, te je zbog toga uvijek potrebno kalibrirati sa referentnim materijalom. Bez obzira na ove mane, elektronski mikroskop može dati pouzdane informacije o submikronskim česticama.⁵ Dva su osnovna tipa elektronskih mikroskopa: transmisijski elektronski mikroskop (Transmission Electron Microscope, TEM) i pretražni elektronski mikroskop (Scanning Electron Microscope, SEM), a razvijeni su i posebni tipovi SEM-a, tzv. ESEM (Environmental Scanning Electron Microscope) kod kojih uzorak može biti izložen tlaku od čak $6,6 \times 10^3 \text{ Pa}$. Pomoću ESEM-a uzorci se mogu promatrati u njihovom prirodnom stanju te ne moraju biti električki vodljivi i dehidrirani.⁷

Detekcija u fotozoni. Ova tehnika radi na principu mjerenja smanjenja intenziteta svjetlosti koje se javlja kao posljedica prolaska pojedinačne čestice kroz usko područje jednolikog

osvjetljenja u protočnom kanalu senzora. Pad intenziteta svjetlosti proporcionalan je površinskom presjeku čestice. Uobičajeno ime za takve instrumente je fotozonski brojač. Ova tehnika nije ograničena na vodene sisteme; moguće ju je koristiti za nepolarne disperzije i za aerosolove. Ovi instrumenti postaju netočni za čestice promjera manjeg od 1 μm , što će reći blizu valne duljine vidljive svjetlosti, jer tada zbog raspršenja absorpcija svjetla nije jednostavna funkcija površinskog presjeka čestice.

Za detekciju manjih čestica potrebno je koristiti manje volumene, ali tada mogu nastati problemi jer prisutnost većih čestica ometa detekciju. S druge strane, kada se analiziraju veći volumeni gubi se osjetljivost prema malim česticama. Kada su uvjeti detekcije i analize optimalni donja granica detekcije za ovu tehniku iznosi 0,2-0,4 μm , ali u praksi se ta granica kreće oko 1,5 μm . Tipične brzine brojanja čestica iznose blizu 10^4 čestica u sekundi. Komercijalno dostupna oprema ima ugrađene algoritme i mehaničke uređaje za minimizaciju efekata začepjenja senzorske zone.⁵

Detekcija u elektrozonu. Detekcija suspendiranih čestica bazira se na promjeni električnog otpora zbog prolaza pojedinačnih čestica kroz osjetilnu zonu. Svaka čestica koja prođe kroz otvor tj. osjetilnu zonu potiskuje određeni volumen vodljive tekućine, i tako trenutno povećava impedanciju otvora. Uređaj se često naziva Coulterov brojač po braći Coulter koja su razvila uređaj u svrhu određivanja broja krvnih zrnaca i koji je konstruiran na osnovu Coulterovog principa. Nakon što je prihvaćen patent⁸ za Coulterov princip 1953. godine braća su otpočela komercijalnu proizvodnju Coulterovih brojača. Danas postoje i drugi proizvođači sličnih uređaja. Promjena otpora koja nastaje zbog prolaza pojedine čestice kroz osjetilnu zonu proporcionalna je volumenu čestice tako da tehnika daje brojčanu distribuciju volumena. Ovo je vrlo popularna i etablirana tehnika za čestice čiji se raspon veličina kreće od 0.6 μm do 1200 μm .⁵ Raširena je primjena Coulterovog brojača za određivanje broja krvnih zrnaca u medicinskim ispitivanjima.

Gore navedene metode određuju brojnost svih čestica u uzorku ne praveći razliku između krutih i mekih (osim donekle optička mikroskopija), tako da je u nepoznatom uzorku nemoguće selektivno odrediti i karakterizirati meke čestice.

2.3 ELEKTROKEMIJSKI PRINCIP - ADHEZIJA ČESTICA

Potreba za razvojem instrumentacije visoke osjetljivosti i metodologije za selektivnu

detekciju i karakterizaciju mekih čestica u tekućinama u području biologije, biomedicine, prehrambene industrije, zaštite okoliša, ispusta i otpadnih voda očituje se kroz sve veći broj publikacija i patenata koji su posvećeni ovoj temi.

Elektroanalitičke tehnike, naročito amperometrija, pružaju raznolikost važnih i pogodnih alata za analizu između ostalog i otopljene organske tvari. Njihova efikasnost i osjetljivost, jednostavnost uporabe ali i niska cijena čine ih atraktivnijim od većine fizikalnih metoda za koje je potreban visoki stupanj ekspertize.

Adhezija crvenih krvnih zrnaca na krutim elektrodama pokazana je 1975. u radu Gingela et al. na olovnoj elektrodi,⁹ te 20-tak godina kasnije na platinskim mikroelektrodama.^{10,11} Međutim, nije bilo niti pokušaja niti bilo kakvog pokazatelja da se ta interakcija stanica s elektrodom iskoristi za brojanje stanica ili određivanje njihove veličine.

2.3.1 Živine elektrode

Živa ima široku primjenu u elektroanalitičkoj kemiji, bilo kao radna ili referentna elektroda drugog reda. U vrlo širokom temperaturnom području nalazi se u tekućem stanju (-38,9 do 356,9 °C kod standardnog tlaka), tako da se mogu prirediti elektrode različitog oblika, od tankih filmova do visećih, sjedećih, periodički obnovljivih kapi.

Živina elektroda ima atomski glatku, homogenu, kemijski inertnu površinu hidrofobnog karaktera čija se gustoća površinskog naboja i međupovršinska napetost može po volji mijenjati promjenom elektrodnog potencijala.¹²

Otrovnost živinih para zahtijeva i primjerne postupke zaštite pri radu sa živinim elektrodama.

2.3.1.1 Kapajuća živina elektroda

Kapajuća živina elektroda sastoji se od staklene kapilare duljine 5-20 cm, unutrašnjeg promjera od 0,05 do 0,08 mm. Kapilara je povezana fleksibilnom cijevi s rezervoarom za živu. Zbog tlaka živina stupca kroz kapilaru protječe živa. Na otvoru kapilare stvara se kap koja, pošto dostigne određenu veličinu, kapa u elektrolitnu ćeliju. Promjenom visine stupca

žive, odnosno visine rezervoara za živu, mijenja se tlak potiskivanja žive kroz kapilaru, a time i brzina istjecanja žive. Živa, potisnuta tlakom živina stupca, oblikuje na otvoru kapilare kap, praktično pravilnog kuglastog oblika. Kap žive se drži na otvoru kapilare zbog površinske napetosti žive. Kad masa kapi poraste toliko da je napetost površine više ne može zadržati, kap otpada s otvora kapilare. Promjer kapi žive u trenutku otkidanja ovisi o promjeru otvora kapilare i o površinskoj napetosti žive u ispitivanoj elektrolitnoj otopini.

Radna površina živine kapi neprestano se obnavlja. Površina kapi nije stoga onečišćena produktima elektrolize odnosno drugim artefaktima nastalim tijekom rasta kapi. Veličina sukcesivnih kapi, njihova površina i periodično otkidanje obnavljaju se veoma reproducibilno. Padajuća kap žive promiješa otopinu u njezinoj blizini. Tako se nova kap stvara u svježoj otopini u kojoj praktički nema posljedice iscrpljivanja otopine na elektroaktivnoj tvari, a uzrokovane procesom elektrolize na prethodnoj kapi. U homogenom mediju-otopini, svaka elektrodna reakcija koja se dešava na prethodnoj kapi se savršeno točno ponavlja na idućoj. Mjerenja se mogu ponoviti u istoj otopini više puta jer je promjena koncentracije u glavni otopine zbog male radne površine kapajuće živine elektrode praktički zanemariva.¹³

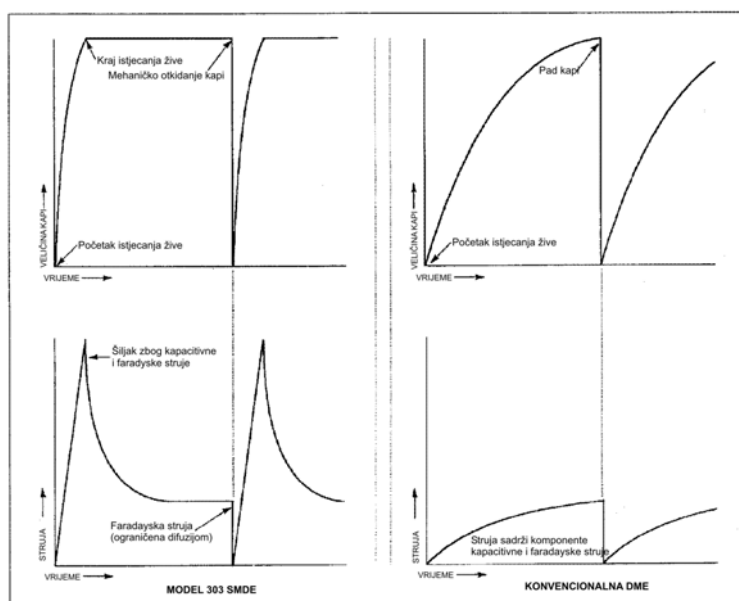
Veoma važna značajka kapajuće živine elektrode proizilazi iz svojstva žive da neke elektrodne reakcije na živi imaju veliki prenapon. Posebnu važnost ima veliki prenapon izlučivanja vodika na živi. U odnosu na krute elektrode, živina elektroda zbog visokog prenapona vodika, može se koristiti u širokom području katodnih potencijala: u kiselim otopinama do potencijala -1 V (prema ZKE), a u neutralnim otopinama do potencijala $-2,6$ V (negativnije od tog potencijala dolazi do raspada vode).¹⁴ Glavni nedostatak žive kao radne elektrode jest relativno nizak potencijal oksidacije žive. Već pri potencijalu od $+0,4$ V u odnosu prema zasićenoj kalomelovoj elektrodi, živa se otapa stvarajući Hg(I)-ione. Rezultirajuća struja oksidacije žive prekriva struju oksidacije elektroaktivne tvari iz otopine i tako onemogućuje primjenu živine elektrode u studiju procesa oksidacije. Stoga se živina elektroda može upotrijebiti samo pri oksidaciji lako oksidirajućih tvari, koje se oksidiraju do potencijala od oko $+0,4$ V prema zasićenoj kalomelovoj elektrodi.¹³

2.3.1.2 Statička živina elektroda

Za pravilnu interpretaciju rezultata mjerenja potrebno je uočiti razlike između kapajuće živine elektrode (KŽE) i statičke živine elektrode (SŽE). Na slici 1 prikazane su

karakteristike rasta kapi i struje u ovisnosti o vremenu za oba tipa elektroda. Grafovi na lijevoj strani odnose se na SŽE, dok su odgovarajući grafovi za konvencionalnu KŽE na desnoj strani. Promotrimo prvo krivulje rasta kapi. Vidljivo je da se kap žive formira brzo sa statičkom živinom elektrodom. Drugim riječima, brzina kojom živa istječe je velika omogućavajući da se kap željene veličine formira u vrlo kratkom vremenu. Kad je dostignuta željena veličina kapi, istjecanje žive prestaje i obujam kapi ostaje stalan sve do njezinog mehaničkog otkidanja. Za usporedbu, kod konvencionalne kapajuće živine elektrode brzina kojom živa istječe je manja ali kontinuirana, i obujam kapi raste tijekom cijelog života kapi. Ovi različiti mehanizmi rasta kapi uzrok su vrlo dubokih razlika u rezultirajućim strujnim odzivima. Promatrajući sliku uočava se da tijekom perioda istjecanja žive kod SŽE struja raste izuzetno brzo. Ta struja se sastoji iz tri komponente:

- Struje nabijanja uzrokovanom brzim rastom kapi;
- Faradejske struje koja nastaje zbog brze ekspanzije kapi u otopinu koja još nije iscrpljena difuzijom;
- Struje nabijanja koja nastaje tijekom perioda istjecanja žive zbog porasta narinutog potencijala, a kada je narinuti potencijal dovoljan da uzrokuje redukciju ili oksidaciju.



Slika 1. Krivulje rasta kapi i struje za SŽE i konvencionalnu KŽE¹⁵

Kako se potencijal mijenja neznatno u odnosu na brzinu rasta kapi, vrijednost zadnje komponente je mala. Kada se zaustavi istjecanje žive veličina kapi prestaje se mijenjati i struja nabijanja uzrokovana rastom kapi staje. Faradejska struja se smanjuje asimptotski približavajući se stanju koje je ograničeno difuzijom. Kao rezultat sveukupna struja se naglo smanjuje približavajući se difuzijskom nivou. Zadnje navedena struja ne sadrži struju

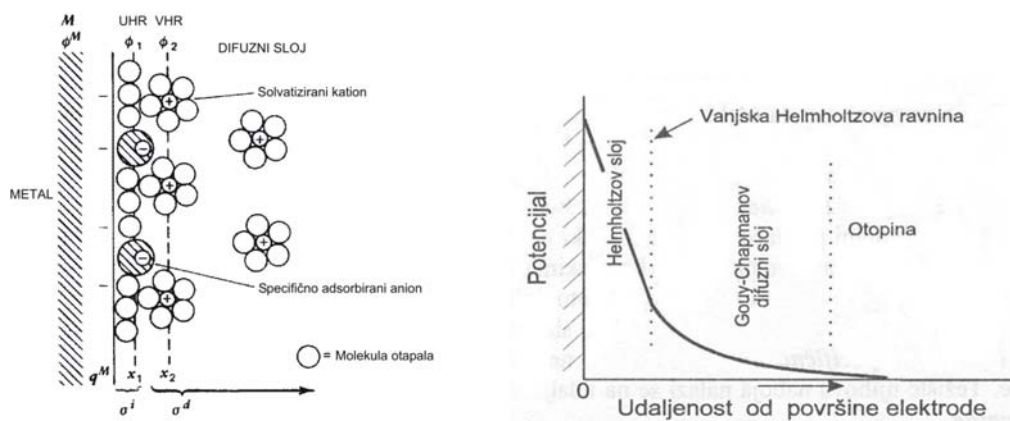
nabijanja uzrokovanu rastom kapi kao što je to slučaj kod kapajuće živine elektrode. Pri konstantnom narinutom potencijalu struja će u cijelosti biti faradejska.

2.3.2 Električni dvosloj

Molekulski sastav otopine u graničnom sloju na dodirnoj površini metal-otopina značajno utječe na elektrodne procese, i to na kinetiku prijelaza nosioca naboja kroz međusloj, ali isto tako i na kemijske reakcije što su vezane s elektrodnom reakcijom.

Na dodirnoj površini metal-otopina postoji električni dvosloj. Njega čini sloj slobodnih (nekompensiranih) nosilaca naboja na površini metala i odgovarajući broj iona suprotnog naboja u otopini uz samu površinu elektrode. Granična površina metal-otopina predstavlja, dakle, električni kondenzator kojem jednu ploču čini površina metala elektrode, a drugu sloj iona u otopini. Kroz međusloj postoji određena razlika potencijala koja ovisi o količini električnih naboja na površini metala elektrode (q^M) i onih u otopini (q^S). Da li je površina metala negativna (višak elektrona) ili pozitivna (manjak elektrona) ovisi o razlici potencijala kroz dvosloj i o sastavu otopine. Međutim, uvijek je naboj na površini elektrode jednak naboju u otopini, $q^M = q^S$. Naboj na površini elektrode često iskazujemo gustoćom naboja, tj. omjerom naboja i radne površine elektrode, $\sigma^M = q^M/A$.

Dok je naboj na površini metala raspodjeljen u vrlo tankom sloju (debljina $< 0,01$ nm), sloj električnog naboja na strani otopine deblji je i složeniji, slika 2.¹³



Slika 2. Molekulska struktura električnog dvosloja na površini elektrode¹⁶ i razdioba razlike potencijala kroz kompaktni i difuzni sloj električnog dvosloja na dodirnoj površini metalna elektroda-otopina.¹³

Sloj najbliži elektrodi, unutarnji sloj, čine molekule otapala, a ponekad i druge specije (ioni ili molekule) za koje se kaže da su specifično adsorbirani. Unutarnji sloj još se naziva i *kompaktni, Helmholtzov, ili Sternov sloj* (UHR). Težište naboja specifično adsorbiranih iona nalazi se na udaljenosti unutarnje Helmholtzove ravnine (x_1). Ukupna gustoća naboja ($\mu\text{C cm}^{-2}$) specifično adsorbiranih iona u unutarnjem sloju je σ^i . Najmanja udaljenost od metalne površine na kojoj se mogu naći solvatizirani ioni je x_2 tj. težište naboja najbližih solvatiziranih iona leži na vanjskoj Helmholtzovoj ravnini (VHR).

Električni naboji na površini elektrode i solvatizirani ioni u otopini privlače se elektrostatskim silama što znači da je njihovo međudjelovanje neovisno o kemijskim svojstvima iona - ovisno je samo o naboju. Ti ioni, u sloju u otopini, nespecifično su adsorbirani. Zbog termičkog gibanja čestica u otopini nespecifično adsorbirani ioni ne čine kompaktni sloj, već su raspodijeljeni u trodimenzionalnom prostoru koji se naziva *difuzni sloj (ili Gouyev sloj)* koji se proteže od vanjske Helmholtzove ravnine u otopinu. Gustoća naboja difuznog sloja iznosi σ^d , tako da ukupnu gustoću viška naboja u dvosloju na strani otopine, σ^S , možemo izraziti sa:

$$\sigma^S = \sigma^i + \sigma^d = -\sigma^M \quad (1)$$

Debljina difuznog dijela dvosloja ovisi o koncentraciji otopine; za koncentracije veće od 10^{-2} M debljina je manja od 30 nm.

Razlika potencijala između površine elektrode i otopine prikazana je na slici 2. Dipolne molekule otapala, npr. vode što se nalaze u međusloju orijentirane su i pridonose razlici potencijala kroz međusloj.

Struktura dvosloja može utjecati na brzinu elektrodne reakcije. Naime, da bi elektroaktivna čestica sudjelovala u elektrodnoj reakciji, mora se približiti elektrodi na udaljenost vanjske Helmholtzove ravnine (ili bliže ako je specifično adsorbirana). Na udaljenosti vanjske Helmholtzove ravnine na elektroaktivne čestice ne djeluje ukupna razlika potencijala elektroda-otopina, nego je ta razlika umanjena za pad potencijala u difuznom dijelu graničnog sloja u otopini.¹⁶ Pad potencijala u difuznom dijelu sloja ovisi o koncentraciji iona u otopini i često se, ali ne uvijek, može zanemariti zbog male vrijednosti i zato malog utjecaja na brzinu elektrodne reakcije.¹³ Za stvaranje električnog dvosloja na površini elektrode potrebna je određena količina naboja. Na površinu metala elektrode taj naboj

moramo dovesti kroz vanjski električni krug ćelije. Isto tako i svaka promjena potencijala elektrode praćena je povećanjem ili smanjenjem koncentracije nosioca naboja na površini elektrode. Dovođenje odnosno odvođenje elektrona potrebnih za stvaranje električnog dvosloja očituje se kao određena jakost struje kroz vanjski krug elektrolitne ćelije.

Promjenom potencijala elektrode mijenja se električni naboj na površini metala i kroz vanjski strujni krug teče električna struja koju iskazujemo relacijom:

$$i = \frac{dq}{dt} \quad (2)$$

gdje je q električni naboj na površini metala, a t vrijeme nabijanja električnog dvosloja.

Tu struju ćelije nazivamo nefaradejskom strujom, odnosno *kapacitetnom strujom* (i_C). Kapacitetna struja ovisi o vremenu nabijanja električnog dvosloja, odnosno o brzini promjene potencijala elektrode i o sastavu otopine.

Kada se na radnoj elektrodi odvija redukcija odnosno oksidacija elektroaktivnih čestica, tada kroz međusloj na površini elektrode prelaze nosioci električnog naboja. Kroz vanjski strujni krug sada teče i struja koja se odnosi na samu elektrodnu reakciju. Tu struju, koja je posljedica redukcije ili oksidacije elektroaktivnih čestica na elektrodi nazivamo *faradejska struja* (i_F). Ukupna struja kroz elektrolitnu ćeliju zbroj je faradejske i kapacitetne struje:¹³

$$i = i_F + i_C \quad (3)$$

2.3.3 Osnove metode

Interakcija uljnih kapljica na međupovršini živa/vodena otopina¹⁷ opisana je ravnotežom kvašenja prema modificiranoj Young-Dupré jednadžbi^{18,19} u kojoj je ukupna Gibbsova energija interakcije:

$$-\Delta G = A(\gamma_{12} - \gamma_{13} - \gamma_{23}) \quad (4)$$

gdje su γ_{12} , γ_{13} i γ_{23} redom površinske napetosti na međupovršinama živa/vodena otopina,

živa/nepolarna organska tekućina i nepolarna organska tekućina/vodena otopina. Izraz u zagradi jednak je koeficijentu širenja:¹⁹

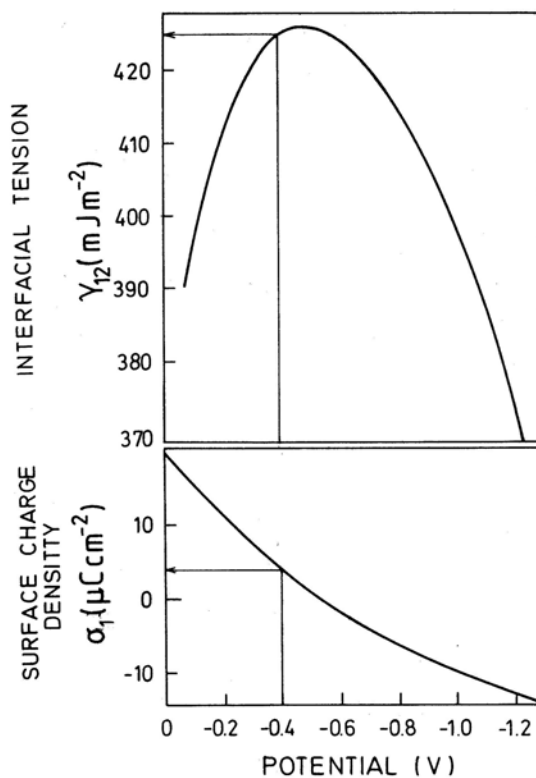
$$S = (\gamma_{12} - \gamma_{13} - \gamma_{23}) \quad (5)$$

Za pozitivne vrijednosti koeficijenta širenja S organska kapljica spontano će se širiti i potiskivati ione i molekule vode sa međupovršine. Za $S < 0$ proces širenja se neće dogoditi spontano.

U elektrolitu 0,1M NaCl (slika 3), površinska napetost može se promijeniti u području od najmanje 100 mJ/m² promjenom potencijala od 0 do -1,8 V prema kalomel elektrodi,²⁰ prema izrazima:

$$\gamma_{12} = \gamma_{12}^0 - \int_0^{E'} \sigma_{Hg} dE' \quad (6)$$

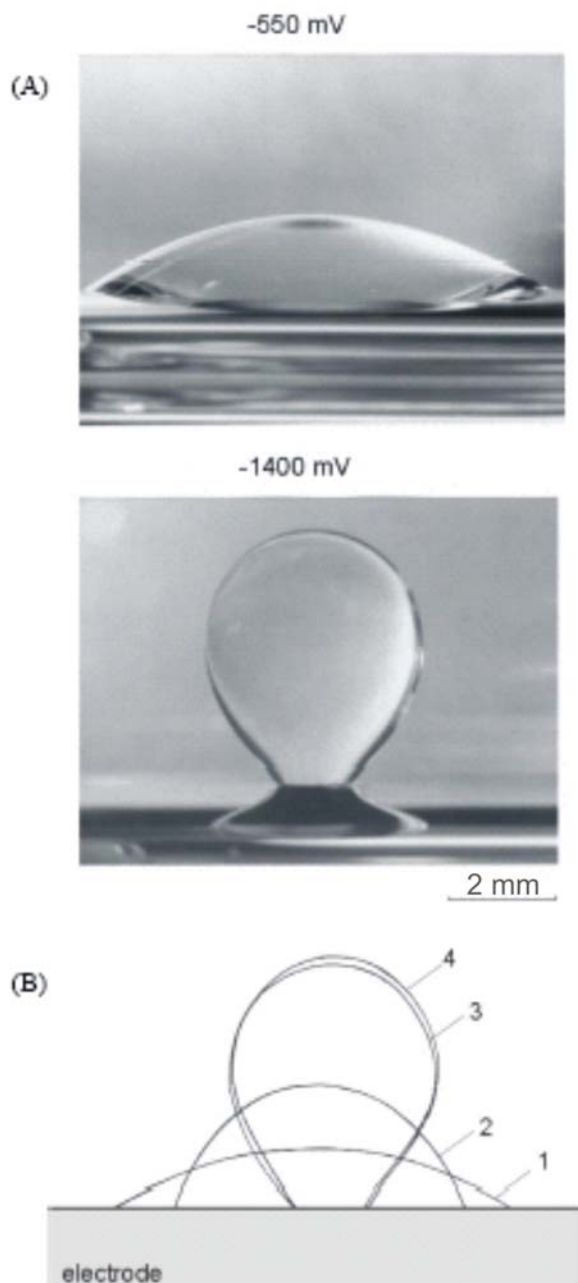
gdje je γ_{12}^0 površinska napetost na potencijalu nultog naboja elektrode (E_{pzc}), a E' jednako je razlici narinutog potencijala i potencijala nultog naboja ($E - E_{pzc}$).



Slika 3. Prikaz površinske napetosti (γ_{12}) i površinskog naboja (σ_1) žive elektrode u vodenoj otopini elektrolita (0,1 M NaCl) u ovisnosti o potencijalu.

Ako γ_{13} ne ovisi o primjenjenom potencijalu onda je koeficijent širenja S , a tako i adhezija kapljica iz disperzije kontroliran samo sa γ_{12} . Ovo je potvrđeno istraživanjem ponašanja kvašenja kapljica ugljikovodika na međupovršini živina elektroda/vodena otopina elektrolita.¹⁷ Vrijednost kritične međupovršinske napetosti eksperimentalno određena iz kritičnih potencijala kvašenja na negativno nabijenoj živinoj kapajućoj elektrodi iznosi 418,2 mJ m⁻² i gotovo je identična predviđanju koje se temelji na Good-Girifalco-Fowkes jednadžbi²¹ za sistem živa/voda/heksadekan (418,26 mJ m⁻²). Ovaj eksperimentalni nalaz nedvosmisleno dokazuje da adhezija i širenje kapljica ugljikovodika na živinoj elektrodi rezultiraju direktnim kontaktom između žive i ugljikovodika, odnosno da se radi o adheziji u pravom fizikalno-kemijskom smislu.

Heksadekan (C₁₆H₃₄) je *n*-alkan koji se na sobnoj temperaturi nalazi u tekućem stanju i za kojeg postoji veliki broj podataka za računanje ravnoteže kvašenja.²¹⁻²³ Utjecaj električnog potencijala na oblik kapljice heksadekana na međupovršini živina "pool" elektroda/vodena otopina elektrolita^{24,25} prikazan je na slici 4. Kapljica heksadekana volumena 70 μm stvara planarnu konveksnu leću pri konstantnom potencijalu od -550 mV (E_{pzc}). Leća mijenja oblik u polusferni sa promjenom potencijala prema negativnijim vrijednostima. Daljnjom promjenom potencijala prema -1400 mV kap mijenja oblik od polusfere prema idealnoj sferi, dok se kontaktna površina smanjuje. Dakle, kapljica ostaje čvrsto pričvršćena na živinu međupovršinu čak i na potencijalima koji su negativniji od kritičnog potencijala kvašenja ($E_c^- = -750$ mV). Slika 4b pokazuje obrise oblika kapljice na različitim konstantnim potencijalima. Na -1450 mV kapljica je još pričvršćena na elektrodu iako sa minimalnom kontaktnom površinom. Tek na potencijalu od -1456 mV kapljica heksadekana se otkida i uzgonom diže prema površini. Opisani specifični oblici reproducibilni su u neovisnim serijama eksperimenata i savršeno ponovljivi sa uzastopnim promjenama potencijala unutar područja prianjanja. Razlika između potencijala otkidanja kapljice i kritičnog potencijala kvašenja iznosi $\Delta E = -700$ mV što odgovara razlici površinske energije od 80 mJ/m². Razlika u površinskoj energiji može se objasniti prisustvom monosloja heksadekana koji se stvara odmah nakon depozicije kapljice na međupovršinu živina elektroda/vodena otopina elektrolita.^{24,26} Svega 0,014% volumena kapljice od 70 μL bilo bi dovoljno za stvaranje monosloja preko cijele međupovršine (pod pretpostavkom da je površina koju zauzima molekula 20 Å²).²⁷

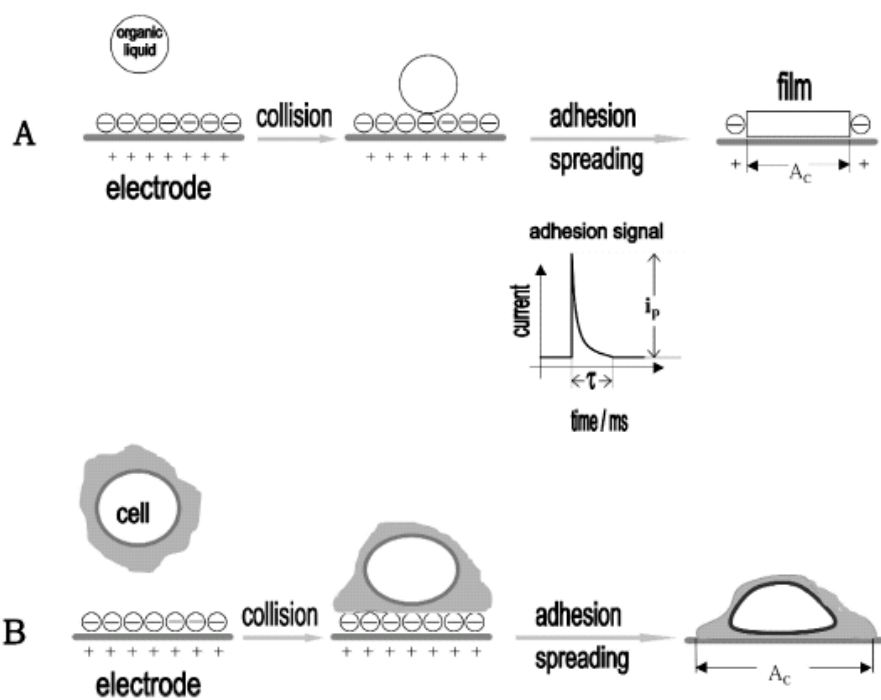


Slika 4. (A) Fotografije kapljice n-heksadekana na međupovršini živa/vodena otopina elektrolita na potencijalima od -550 mV i -1400 mV. (B) Obrisi oblika kapljica na potencijalima: -550 mV (1), -1300 mV (2), -1400 mV (3) and -1450 mV (4). Preuzeto iz poglavlja Ivošević i Žutić, 2002, slika 3, ref. 25.

2.3.1.1 Elektrokemijsko raspoznavanje organskih čestica na živinoj kap elektrodi

Poznato je da organske mikropaljice, vezikule i stanice sa tekućom ili fleksibilnom membranom stvaraju adhezijski kontakt sa površinom pri čemu dolazi do deformacije čestice.^{28,29} Privlačna interakcija između takvih mekih čestica i živine kap elektrode rezultira

u potiskivanju naboja dvosloja u formi adhezijskog signala - shematski prikaz dat je na slici 5.



Slika 5. Shematski prikaz privlačne interakcije sa pozitivno nabijenom živinom elektrodom³⁰ između dispergiranih organskih kapljica (A) i stanica (B) u vodenoj otopini elektrolita. Električni signal javlja se kao posljedica potiskivanja naboja dvosloja sa kontaktne površine A_c . Preuzeto iz rada Svetličić *et al.*, 2000, slika 1, ref. 30.

Potiskivanje naboja uzrokuje tok kompenzacijske struje (eng. displacement current - struja potiskivanja), I_D , koja je direktno povezana sa stvaranjem adhezijskog kontakta koji opet ovisi o veličini čestice i njenoj deformabilnosti:¹

$$I_D = -\frac{dA}{dt} \sigma_E \quad (7)$$

A je kontaktna površina, t je vrijeme i σ_E je gustoća površinskog naboja na međupovršini elektroda/vodena otopina elektrolita. Količina potisnutog naboja, q_D , određuje se iz adhezijskog signala integriranjem struje po vremenu:

$$q_D = \int_{t_1}^{t_1+\tau} i dt \quad (8)$$

Nastala kontaktna međupovršina, A_C , može se precizno odrediti³¹ ako se zna površinski naboj elektrode:

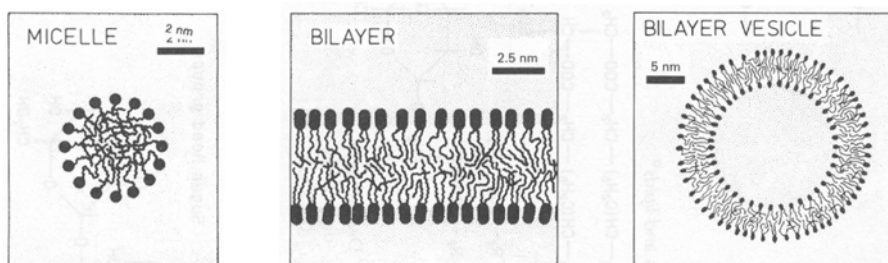
$$A_C = \frac{q_D}{\sigma_E} \quad (9)$$

2.4 MEKE ČESTICE

U ovom radu izraz meke čestice odnosi se na organske mikrokapljice, vezikule i žive stanice sa tekućom ili fleksibilnom vanjskom membranom koja im omogućuje lako uspostavljanje adhezijskog kontakta sa površinom pri čemu dolazi do njihove deformacije.

2.4.1 Samoudruživanje amfifilnih molekula

Amfifilne molekule kao npr. površinski-aktivne tvari, lipidi i neki kopolimeri su molekule koje na jednom kraju imaju hidrofilnu grupu, dok je ostatak molekule hidrofoban - uglavnom se radi o dugom ugljikovodikovom lancu.

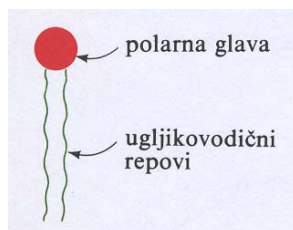


Slika 6. Amfifili kao što su površinski-aktivne tvari i lipidi mogu se u vodenim otopinama udružiti u različite strukture: micle, dvosloj (lamelarna struktura), vezikule. One se pak mogu transformirati iz jedne u drugu promjenom uvjeta u otopini kao što su koncentracija elektrolita ili lipida, pH, ili temperatura.¹⁹

Micle, lamelarne strukture, vezikule i biološke membrane u vodenim otopinama lako nastaju samoudruživanjem određenih amfifilnih molekula (slika 6). Ove strukture i sistemi koje oni stvaraju ponekad se zajednički nazivaju *asocijacijski kolodi* ili *kompleksni fluidi*.

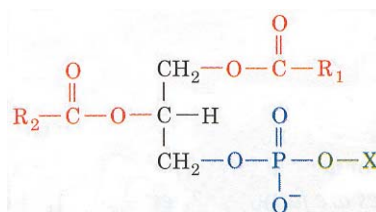
To je zbog toga što sile koje drže amfifilne molekule na okupu u navedenim strukturama potječu od van der Waalsovih, hidrofobnih, vodikovih i elektrostatskih interakcija.¹⁹ Primjer

amfifilnih molekula su lipidi – tvari biološkog porijekla koje su topljive u organskim otapalima kao što su kloroform i metanol ali slabo ili nikako u vodi.³² Lipidi se često prikazuju kao molekule koje se sastoje od hidrofilne (polarne) glave i hidrofobnog (nepolarnog) repa - ugljikovodikovih lanaca (slika 7).

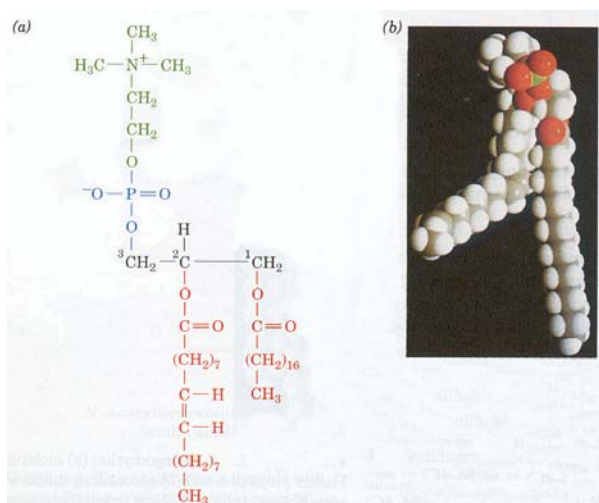


Slika 7. Simbol fosfolipidne molekule.³³

Lipidi su sastavni dio bioloških membrana. Tri su glavne skupine membranskih lipida: fosfolipidi, glikolipidi i kolesterol, a glavnu stukturu komponentu većine membrana čine *fosfolipidi*. Nastaju ili iz glicerola ili iz složenijeg alkohola sfingozina; fosfolipidi nastali iz glicerola zovu se *fosfogliceridi* i sastoje se od glicerolske okosnice, dva lanca masnih kiselina i fosforiliranog alkohola (slika 8 i 9).³³⁻³⁵



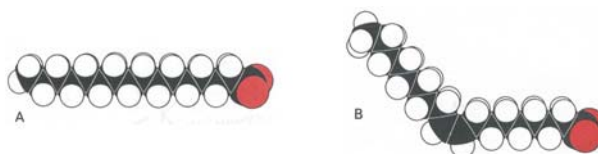
Slika 8. Opća formula fosfoglicerida. R₁ i R₂ označavaju dugolančane ugljikovodične lance masnih kiselina, a X potječe od polarnih alkohola, npr. etanolamina.³²



Slika 9. 1-stearoil-2-oleoil-3-fosfatidilkolin kao primjer fosfoglicerida: (a) molekularna formula u Fischerovoj projekciji i (b) prostorni model bijelo-H, sivo-C, crveno-O, i zeleno-P.³²

Lanci masnih kiselina u fosfolipidima i glikolipidima sadrže obično paran broj ugljikovih atoma, uglavnom između 14 i 24. Najčešće masne kiseline su one sa 16 ili 18 atoma ugljika.

Masne kiseline mogu biti zasićene i nezasićene (slika 10). Duljina i stupanj nezasićenosti lanaca masnih kiselina bitno utječu na fluidnost membrane o čemu će biti riječi nešto kasnije.



Slika 10. Prostorni modeli masnih kiselina: A) palmitinske (C₁₆, zasićena) i B) oleinske (C₁₈, nezasićena). Dvostruka *cis*-veza u oleatu lomi ugljikovodični lanac.³³

Zbog takve građe molekule fosfolipida se u vodenoj otopini spontano udružuju tako da je hidrofilni dio u kontaktu sa vodom, a hidrofobni repovi ugljikovodika izbjegavaju vodu. To se može postići stvaranjem micela u kojima su polarne glave na površini, a repovi ugljikovodika usmjereni prema unutrašnjosti.

Drugi raspored koji zadovoljava i hidrofilne i hidrofobne sklonosti tih membranskih lipida je biomolekulska lamela koja se zove lipidni dvosloj (slika 6). Većina fosfolipida i glikolipida u vodenoj sredini spremnije stvara lipidni dvosloj nego micelu. Ta je činjenica biološki neobično važna. Micela je tvorevina ograničene veličine čiji je promjer najčešće manji od 20 nm. Lipidni dvosloj, nasuprot tome, može biti i makroskopskih razmjera, reda veličine milimetra (10⁶ nm). Zbog lakog stvaranja lipidnog dvosloja fosfolipidi i glikolipidi su ključni sastojci membrana. Osim toga te lamelarne strukture služe kao prepreke prolazu molekula, a ipak su prilično tekuće.³³ Geometrijska svojstva molekule, kao što su volumen i dužina ugljikovodikovog lanca, te optimalna površina polarne glave, određuju u koju strukturu će se molekule udružiti.¹⁹

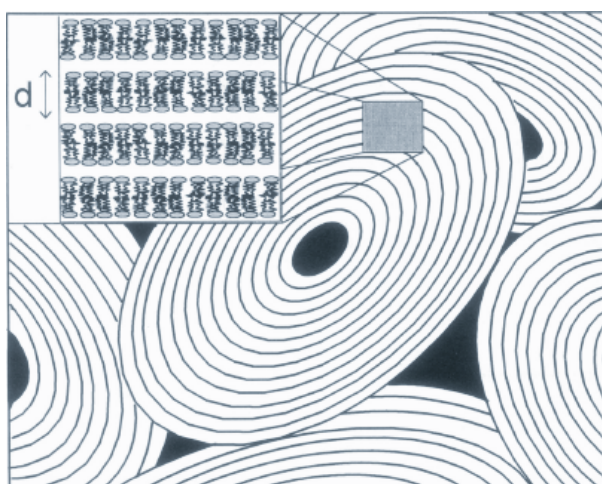
Lipidni dvosloj nastaje procesom samoudruživanja. Glavna pogonska sila za stvaranje lipidnog dvosloja su hidrofobne interakcije. Pri izdvajanju repova membranskih lipida koji se sastoje od lanaca ugljikovodika u nepolarnu unutrašnjost dvosloja oslobađaju se molekule vode. Između repova ugljikovodika u unutrašnjosti dvosloja djeluju privlačne van der Waalove sile koje pomažu gustom pakiranju tih repova. Naposljetku se uspostavljaju i prikladne elektrostatske interakcije i vodikovi mostovi između polarnih glava i molekula

vode, pa vidimo da je lipidni dvosloj stabiliziran nizom sila koje inače sudjeluju u molekulskim interakcijama u biološkim sustavima.³³

2.4.2 Liposomi

Liposomi, ili lipidne vezikule, su sferne strukture u kojima je volumen vodene otopine okružen sa jednim ili više lipidnih dvosloja (slike 6, 11). Liposom potječe od grčke riječi *soma* što znači tijelo – tijelo od lipida.³⁶ Pronalazak liposoma pripisuje se sir Alecu Banghamu početkom 60-tih godina prošlog stoljeća³⁷ od kada započinje njihova široka primjena u biologiji, biokemiji i medicini. Liposomi predstavljaju jednostavan i najčešće korišten modelni sistem bioloških membrana.

Liposomi ne mogu nastati spontano jer takve strukture općenito govoreći nisu termodinamički stabilne; za proizvodnju liposoma potrebna je energija.³⁸ Mogu nastati suspendiranjem prikladnog lipida, poput fosfatidilkolina, u vodenom mediju. Ta se mješavina sonicira, tj. podvrge visokofrekventnim zvučnim valovima (ultrazvuku), čime se dobije disperzija zatvorenih liposoma prilično sličnih veličina. Liposomi se mogu prirediti i brzim miješanjem otopine lipida u etanolu sa vodom. To se postiže ubrizgavanjem otopine lipida u vodu kroz usku iglu. Tako priređeni liposomi gotovo su kuglasti, a promjer im je oko 50 nm. Veći liposomi (promjera veličine oko 1 μm) mogu se prirediti polaganim isparavanjem organskog otapala iz suspenzije fosfolipida u sustavu miješanih otapala.³³



Slika 11. Ilustracija multilamelarnih liposoma³⁹

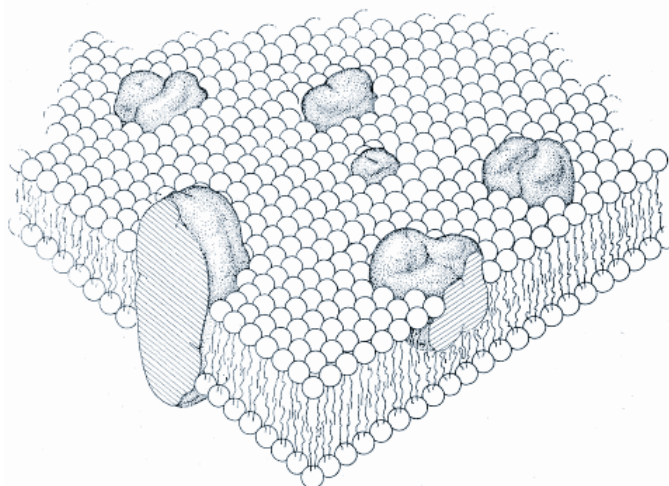
Sa morfološkog stanovišta, liposomi se klasificiraju prema veličini i broju dvosloja od kojih se sastoje. Zadnji parametar se odnosi na lamelarnost. Za liposome koji imaju nekoliko

dvosloja kaže se da su multilamelarni (slika 11). Često se primjenjuju u npr. kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Liposomi sastavljeni od samo jednog dvosloja nazivaju se unilamelarni liposomi i dijele se na: male (10-50 nm), velike (50-1000 nm) i ogromne (>1 μm). Unilamelarni liposomi se često primjenjuju u istraživanjima.

2.4.3 Biološke membrane

Biološke membrane okružuju i odjeljuju stanice - one su međupovršina između stanice i njene okoline. Membrane su smjesa mnogih različitih tipova lipidnih i proteinskih komponenata. Udjeli proteina prema lipidima u membranama značajno se razlikuju ovisno o funkciji membrane, ali se generalno može reći da sastav većine membrana, pa tako i plazma membrana, čini oko 50% lipida i 50% proteine.^{32,35,40} Lipidne membrane nisu krute, već se lipidi i mnogi membranski proteini neprestano latelarno kreću.

Godine 1972. Jonathan Singer i Garth Nicolson predložili su *model fluidnog mozaika* kao opći model organizacije bioloških membrana (slika 12). Taj model je i danas općenito prihvaćen. Bit je njihova modela da su membrane dvodimenzijske otopine usmjerenih globularnih proteina i lipida koje svojom organizacijom stvaraju mozaični uzorak.⁴¹



Slika 12. "Model fluidnog mozaika" sa lipidnim matriksom i slučajno raspoređenim proteinima.⁴¹

2.4.3.1 Fluidnost membrana

Važno svojstvo lipidnog dvosloja i bioloških membrana je njihovo ponašanje kao

dvodimenzijskih fluida u kojima pojedinačne molekule (lipidi i proteini) imaju mogućnost slobodnog rotiranja i gibanja u lateralnom smjeru.³⁵ Fluidnost je njihova važna fiziološka karakteristika jer omogućuje međudjelovanje ugrađenim proteinima.

Hlađenjem ispod karakteristične *temperature prijelaza* lipidni dvosloj prolazi kroz neku vrstu fazne promjene, odnosno prijelaza iz neuređenog u uređeno stanje tijekom kojeg gubi fluidnost. Iznad temperature prijelaza nepolarni repovi masnih kiselina, ali i lipidne molekule u cjelini vrlo su pokretljivi u ravnini dvosloja i nalaze se u relativno neuređenom, tekućem stanju. Ispod temperature prijelaza lipidne molekule stvaraju uređenije, kruto stanje slično gelu. Temperatura prijelaza iz krutog u tekuće stanje za većinu bioloških membrana kreće se u području od 10 do 40 °C.

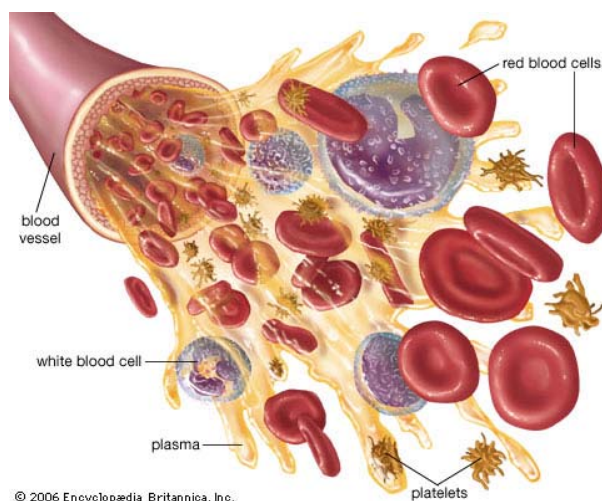
Ključni regulator membranske fluidnosti je i kolesterol, koji samostalno ne tvori dvosloj ali ulazi u sastav svih životinjskih membrana. Kolesterol se ulaže između lanaca masnih kiselina stvarajući na taj način steričku smetnju njihovoj pokretljivosti. On je neka vrsta membranskog plastifikatora. Djeluje dvojako tako da smanjuje fluidnost membrane, ali ujedno i sprečava kristalizaciju lanaca masnih kiselina, tj. ne dopušta fazni prijelaz.

Temperature prijelaza membrana kod sisavaca su znatno ispod temperature tijela zbog čega sve membrane imaju fluidni karakter. Bakterije i hladnokrvne životinje kao što su ribe modificiraju (biosintezom i degradacijom lipida) sastav masnih kiselina svojih membranskih lipida ovisno o temperaturi okoline kako bi membrane ostale fluidne. Tako se npr. pri sniženju temperature sa 42 na 27 °C omjer zasićenih i nezasićenih masnih kiselina u membrani bakterije *E. coli* smanjuje sa 1.6 na 1.0 što omogućuje da membrana i pri nižoj temperaturi ostane tekuća.^{32,33}

2.4.3.2 Membrana crvenog krvnog zrnca

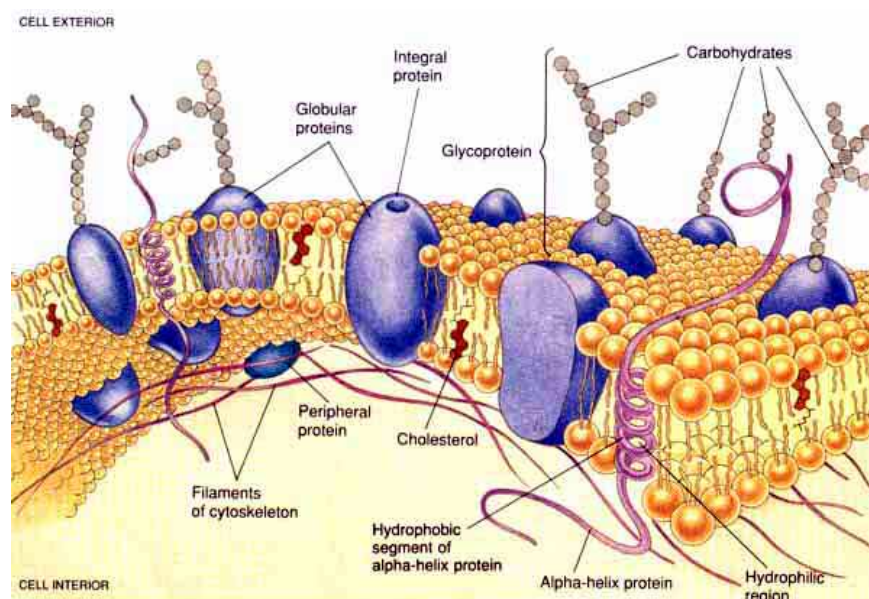
Krv čini suspenzija specijalnih stanica u tekućini - plazmi koja čini 55 % sadržaja krvi. Ostalih 45 % čine stanice i to: crvena krvna zrnca ili eritrociti, bijela krvna zrnca ili leukociti, te trombociti (slika 13).

Crvena krvna zrnca ili eritrociti. Zrela zrnca sisavaca nemaju jezgru i većinom imaju oblik okruglih bikonkavnih diskova čiji promjer iznosi 7,5 – 8 µm, a debljina 1,5 – 1,8 µm. Eritrociti sadrže hemoglobin koji im daje crvenu boju.



Slika 13. Ilustracija sastava krvi.⁴²

Koncentracija eritrocita kod odraslog čovjeka uglavnom iznosi $4,5 - 5 \times 10^{12} \text{ L}^{-1}$. Crveno krvno zrnce ili eritrocit je važan biološki sistem jedinstven po svojoj mogućnosti da obavlja funkciju pod najrazličitijim uvjetima. Njegov životni vijek u ljudskom krvožilnom sustavu je oko 120 dana tijekom kojih ono doživljava brojne deformacije dok prolazi kroz uske kapilare⁴³ zadržavajući pri tom stanični integritet i funkciju.⁴⁴ Odlučujući faktor za oblik i mehanička svojstva crvenih krvnih zrnaca sisavaca je polupravilna, relativno stabilna, isprepletana mreža proteina nazvana membranski skeleton koja oblaže staničnu membranu sa strane koja se nalazi uz citoplazmu (slika 14).⁴⁵



Slika 14. Prikaz stanične membrane eritrocita.⁴⁶

Bijela krvna zrnca ili leukociti. Postoji šest glavnih tipova bijelih krvnih zrnaca među kojima prevladavaju neutrofilni sa oko 50 - 70 % i limfociti sa oko 20 - 40 %. Leukociti su različite veličine; promjer većine kreće se od 7,5 do 12,5 μm (promjer neutrofila 12-15 μm , limfocita 8 – 10 μm). Oblik je skoro okrugao i volumen im je nešto veći od volumena eritrocita. Ukupna koncentracija bijelih krvnih zrnaca u krvi čovjeka je tri reda veličine manja od koncentracije eritrocita i iznosi oko $7 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$.

Trombociti. Promjer trombocita iznosi oko 3 μm i mnogo je manji od promjera crvenih krvnih zrnaca. Normalna koncentracija trombocita kod ljudi kreće se u granicama $1,5 - 4 \times 10^{11} \text{ L}^{-1}$.

2.4.4 Fleksibilne čestice u morima i oceanima

Nedavno proučavanje samoudruživanja kompleksnih mekih tvari ("soft matter") pokazalo je da se stvaranje vezikula i zatvorenih ovojnica događa u mnogim sistemima; nastajanje vezikula zapravo je praoblik samoudruživanja, i obuhvaća daleko više od lipidnih građevnih jedinica.^{47,48} Vezikula potječe od latinske riječi *vesicula* što znači mali mjehur.

2.4.4.1 Organska tvar u moru

Partikularna i otopljena organska tvar određuje se i danas iz praktičnih razloga tradicionalnim postupkom filtriranja kroz filtre veličine pora 0,45-0,70 μm ; tvar koja nakon filtriranja zaostaje na filtru definira se kao partikularna, dok se iz filtrata određuje otopljena organska tvar.⁴⁹ Ovakva podjela, međutim stvara probleme za one koji se bave proučavanjem čestica jer se veliki broj čestica nalazi u "otopljenoj" kategoriji.⁵⁰

Glavna karakteristika uzoraka morske vode je njihova instrinzička nestabilnost zbog kontinuirane agregacije i mikrobne transformacije organske tvari. Zbog toga je neophodno skratiti i pojednostaviti postupke uzorkovanja i obrade što je najviše moguće. Upotrebom tradicionalnih oceanografskih postupaka/procedura važan dio morske partikularne tvari je zbog svoje veličine, sastava ili prozirnosti ostao neprimjećen sve do sredine 80-tih godina prošlog stoljeća, dok je glavni napredak na tom polju nastupio tijekom 90-tih.

Pogled na organsku tvar u morskoj vodi se dramatično mijenja; tradicionalna podjela na

partikularnu i otopljenu organsku tvar zamjenjuje se konceptom kontinuuma organske tvari.⁵¹

2.4.4.2 Nežive čestice u morima i oceanima

Razvoj novih metoda omogućio je detekciju neživih, prvenstveno organskih, fluidnih i fleksibilnih čestica veličine od svega nekoliko nanometara do nekoliko stotina mikrometara čija se koncentracija kreće u granicama $10^4 - 10^{12} \text{ L}^{-1}$.⁵² Mehanizam njihovog nastajanja, njihova stabilnost, a naročito uloga koju igraju u biogeokemijskim ciklusima u oceanima postale su zajednički izazov disciplinama kao što su kemija mora, mikrobiologija i biofizika. Ove nežive čestice prikazane su u Tablici 1. i svrstane su u nekoliko klasa prema mjernim tehnikama pomoću kojih se određuju. Navedene kronološkim redom prema pojavi u literaturi to su: površinski-aktivne čestice⁵³, submikrometarske čestice⁵⁴, mali koloidi⁵⁵, prozirne egzopolimerne čestice (čestice koje se boje sa Alcian plavim)⁵⁶, čestice koje sadrže proteine⁵⁷, gel mikročestice.⁵⁸ Broj neživih čestica u morskoj vodi daleko premašuje broj živih mikroorganizama, algi i bakterija, te virusa. Za sve gore navedene klase čestica tvrdi se da igraju glavnu ulogu u biogeokemijskim procesima u oceanima.

Tablica 1. Glavne klase neživih čestica* u gornjem sloju oceana (eufotička zona), prema Žutić i Svetličić, 2000, Tablica 1, ref. 49.

Type	Size	Location	Detection method	Concentration N/L	Composition	Description
Small colloids [7, 13, 14]	5–200 nm	Santa Monica Basin, North Atlantic, Northwest Pacific	TEM	$10^7 - 10^{12}$ maximum at thermocline	largely organic rounded,	rounded, globular, shape, diffuse
Submicrometer particles [6, 15]	0.38–1 μm	North Pacific off Japan, Northwest Atlantic Schlep	Coulter particle counter	$5 \times 10^{10} - 8 \times 10^{10}$ in top 40 m, $< 10^9$ below 200 m	organic with high water content	highly, flexible, mostly, amorphous
Fluid surface-active aggregates [16–18]	1–100 μm	Mediterranean	adhesion at mercury electrode	$10^5 - 5 \times 10^7$ maximum at halocline	organic, surface-active,	fluid, hydrophobic
Transparent exopolymeric particles (TEP) [8, 19]	3–100 μm	off California coast	microscopy after Alcian blue staining	$3 \times 10^4 - 5 \times 10^6$	polysaccharide matrix with high water content	flexible, deformable, "filmy", gel-like
Protein containing particles (Coomassie stained), CSP [9]	2–500 μm	off California coast	microscopy after Coomassie blue staining	$10^6 - 10^8$	organic proteinaceous	flexible, deformable gelatinous
Giant aggregates (mucilage) [20–22]	> 1 m	North Adriatic, episodic	scuba-diving	0–10 in 100 m ³ above thermocline (~20 m)	Organic (1‰), polysaccharides	Mucus aggregates, gel phase

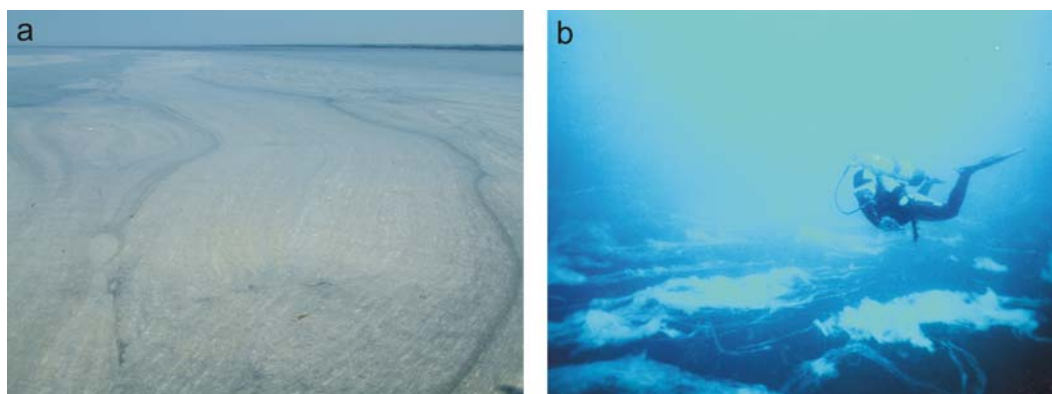
* Defined operationally according to measurement techniques.

2.4.4.3 Proučavanja neživih čestica u Jadranskom moru

Od obilja morskih organskih čestica, tri tipa čestica izučavana su u sjevernom Jadranu: koloidi,⁵⁹ prozirne egzopolimerne čestice,⁶⁰ površinski-aktivne čestice^{61,62} i gel mikročestice.⁶³ Površinski-aktivne čestice uglavnom nastaju samo-organizacijom biopolimera^{48,52} koje luči fitoplankton.⁶⁴

Sustavno praćenje organskih čestica u sjevernom Jadranu počelo je nakon dramatičnog događaja masivne makroagregacije u ljeto 1997. godine koja je imala razoran efekt na turizam i ribarstvo u regiji.⁶⁵

Sjeverni Jadran je plitak bazen (prosječna dubina je 35 m), relativno malog volumena (635 km³) sa površinom od 19000 km².⁶⁶ U pretežno oligotrofnom (siromašnom hranjivim tvarima) Sredozemnom moru utvrđeno je da je zapadni dio Jadrana eutrofna regija⁶⁷ zbog intenzivnog unosa nutrijentima bogatih voda iz brojnih rijeka, ali bez imalo sumnje može se reći da najveći utjecaj ima rijeka Po⁶⁸ zbog čega dolazi do hiperprodukcije fitoplanktona brzinom koja nadilazi mogućnosti "grazinga" herbivora ili razgradnje pomoću bakterija. Kao posljedica toga, velike količine fitoplanktona i ekstracelularnih polimera, uglavnom polisaharida, nakupljaju se u vodenom stupcu, te tijekom toplog dijela godine velika vertikalna stabilnost stratificiranog vodenog stupca može dovesti do akumulacije organskog materijala u gornjem sloju.^{69,70} Određeni meteorološki i hidrografski uvjeti povezani sa intenzivnom primarnom produkcijom pogoduju razvoju "cvjetanja mora", sporadičnog fenomena karakteriziranog masivnim nastankom makroagregata^{65,71,72} (slika 15).



Slika 15. "Cvjetanje mora" u sjevernom Jadranu: (a) površina mora fotografirana 30.6.2004. sa istraživačkog broda "Vila Velebita" (b) u vodenom stupcu.⁵²

Predložen je i biofizički scenarij koji uvodi pojam prekursorskih čestica koje nastaju samo-

organizacijom ekstracelularnih polimera i koje se transformiraju u makrogelove faznom promjenom prvog reda.^{52,73-75}

Značajka fenomena "cvjetanja mora" je brza (1-100 h) pojava ogromnih količina želatinozne organske tvari koje se općenito mogu definirati kao makrogelovi. Iako je do sad predstavljen veliki broj hipoteza o uzroku i mehanizmu njegovog nastanka, mehanizam transformacije otopljenog organskog ugljika u makroagregate još uvijek nije (dovoljno) razjašnjen. Stvaranje ogromnih mukusnih nakupina u kratkom vremenu nije moguće objasniti biološkim procesima. Velika je vjerojatnost da nastanku "cvjetanja mora" prethodi akumulacija organske tvari do neke kritične koncentracije.⁵²

3. METODIKA

3.1 INSTRUMENTI

Elektrokemijska mjerenja napravljena su sa komercijalnim Princeton Applied Research polarografskim analizatorom model 174A.

Kronoamperometrijske krivulje snimane su koristeći LabView sistem od National Instruments-a. Kartica DAQ AI-16-XE-50 omogućila je prihvatanje analognih podataka, a sami podaci analizirani su korištenjem aplikacije koja je razvijena u LabView 6.1 software-u. Iznimka je jedino kod eksperimenta određivanja naboja gustoće stanica u kojem su kronoamperometrijska mjerenja bilježena trajnim pohranjivanjem podataka povezivanjem PC računala s digitalnim osciloskopom s memorijom, Nicolet 3091.

Stanice mikroalgi odvojene su od F2-Si medija u kojem su uzgajane korištenjem centrifuge HiCen 21, Herolab.

Za određivanje gustoće stanica mikroalgi korišten je epifluorescencijski mikroskop Olympus, BX 51 i hemacitometar Fuchs-Rosenthal, Fein-Optik Jena, Germany, dubine jažice 0,2 mm.

3.2 ČELIJA I ELEKTRODE

Troelektrodni sustav sastoji se od:

1. radne elektrode:
 - statičke živine elektrode (SŽE)
 - kapajuće živine elektrode (KŽE)
2. referentne elektrode: Ag/AgCl (0,1 M NaCl)
3. protuelektrode: platinske žice

Elektrokemijska mjerenja napravljena su u standardnoj Methromovoj ćeliji volumena 10 mL (kad je za rad korištena SŽE) ili 50 mL (kad je za rad korištena KŽE).

U svim mjerenjima referentna elektroda Ag/AgCl sadržavala je 0,1 M NaCl, a od mjerne otopine bila je odvojena keramičkom fritom.

3.2.1. Radna elektroda: statička živina elektroda

U radu je korištena statička živina elektroda, model EG&G PARC 303A SMDE. Njene karakteristike su:

- odabrano vrijeme kapanja: 5 s
- površina živine kapi: 1,19 mm²

3.2.2. Radna elektroda: kapajuća živina elektroda

Karakteristike korištene kapajuće živine elektrode su:

- protok žive kroz kapilaru $\dot{m} = 6,1 \text{ mg s}^{-1}$
- vrijeme života kapi $t = 2,08 \text{ s}$
- visina stupca $h = 36 \text{ cm}$
- maksimalna površina kapi $A_{\text{max}} = 4,7 \text{ mm}^2$

3.3 KEMIKALIJE

Tijekom eksperimentalnog rada korištene su slijedeće anorganske i organske kemikalije:

1. Natrijev klorid (NaCl), Kemika *p.a.*
2. Natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO₃), Kemika *p.a.*
3. Kalijev klorid (KCl), Kemika *p.a.*
4. Natrij hidrogenfosfat (Na₂HPO₄), Kemika *p.a.*
5. Kalij hidrogenfosfat (KH₂PO₄), Kemika *p.a.*
6. Dekstran sulfat, $\bar{M} = 500\ 000$, Sigma-Aldrich
7. Živin klorid (HgCl₂), Kemika *p.a.*
8. kemikalije za pripremu F2-Si medija za uzgoj mikroalgi (receptura u 3.4.1.1)

3.3.1. Otopine

U eksperimentalnim mjerenjima korišteni su slijedeći osnovni elektroliti:

- za mjerenje suspenzija stanica algi: 0,1 ili 1 M NaCl kojem je dodano 0,5 mM NaHCO₃ radi postizanja odgovarajućeg pH morske vode (pH = 8,2), te morska voda.
- za mjerenje suspenzija liposoma i krvnih zrnaca: fiziološka otopina sa fosfatnim

puferom - PBS (pH = 7,47)

PBS je izotonična otopina, te se često koristi u biokemiji. Sadrži: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ i 2 mM KH₂PO₄.

NaCl je pročišćavan žarenjem na temperaturi od 450°C u trajanju od 5 sati kako bi se uklonile organske nečistoće. Pripremljena zasićena otopina NaCl dodatno je pročišćena aktivnim ugljenom.

Voda koja se koristila u eksperimentalnom radu dobivena je pročišćavanjem bidestilirane vode kroz sistem Millipore-MilliQ (sadržaj otopljene organske tvari, DOC, nalazi se u granicama 100-200 µg L⁻¹, vodljivost ~ 10 MΩ cm⁻¹).

3.3.2. Živa

Metalna živa koja se koristila u radnim elektrodama čišćena je posebnim postupkom koji obuhvaća uklanjanje metalnih i mehaničkih nečistoća, te dvostupanjsku destilaciju pod sniženim tlakom.

3.4 ISPITIVANE MEKE ČESTICE

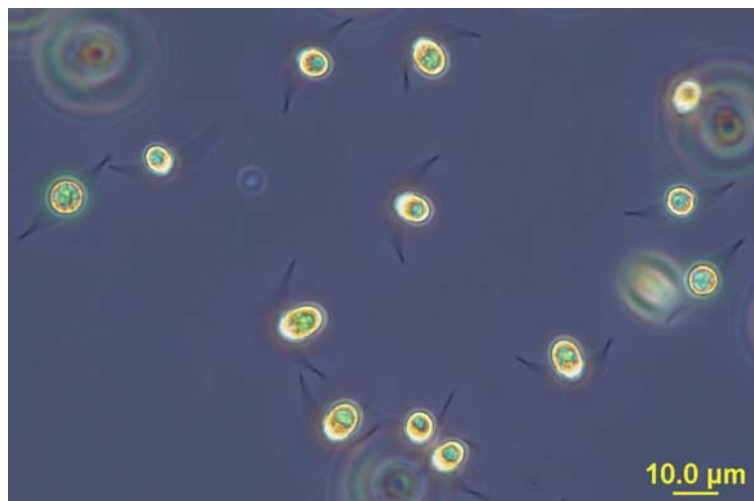
3.4.1 Kultura stanica morskog fitoplanktona

Morska jednostanična alga *Dunaliella tertiolecta* Butcher korištena je kao modelni organizam za pripremu suspenzije čestica s jednolikom raspodjelom veličine.

Dunaliella spp. po taksonomskoj klasifikaciji spada u odjel Chlorophyta (zelene alge), razred Chlorophyceae, red Volvocales, porodicu Chlamydomonaceae, rod *Dunaliella*, vrsta *tertiolecta* Butcher.

Dunaliella tertiolecta ne posjeduje čvrstu staničnu stjenku, već samo fleksibilnu vanjsku membranu. Stanica je elipsoidnog oblika, promjera 6-10 µm, te posjeduje dva biča uz pomoć kojih se kreće.⁷⁶ Na slici 16 prikazana je fotomikrografska snimka stanica snimljena pod povećanjem 400×.

Organizam je kupljen iz zbirke fitoplanktona od Provasoli-Guillard centra (*Provasoli-Guillard Center of Marine Phytoplankton, Bigelow Laboratory for Ocean Sciences, West Boothbay Harbour, Maine, USA*).



Slika 16. Fotomikrografija stanica *Dunaliella tertiolecta* snimljena u faznom kontrastu kod povećanja 400× na epifluorescencijskom mikroskopu Olympus BX51.

3.4.1.1 Uzgoj stanica *Dunaliella tertiolecta*

Za uzgoj stanica korištena je f/2-Si podloga koja je pripremana po Guillard-ovoj recepturi.⁷⁷

f/2-Si podloga

U 950 mL filtriranog mora dodati:

količina	kemikalija	osnovna otopina	molarna koncentracija u mediju
1 mL	NaNO ₃	75 g L ⁻¹ dH ₂ O	8,83 x 10 ⁻⁴ M
1 mL	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5 g L ⁻¹ dH ₂ O	3,63 x 10 ⁻⁵ M
1 mL	f/2 otopina tragova metala	(pogledati recept ispod)	-
0,5 mL	f/2 otopina vitamina	(pogledati recept ispod)	-

Dopuniti volumen do 1L sa filtriranim morem i autoklavirati.

f/2 otopina vitamina

U 950 mL MilliQ vode dodati:

količina	kemikalija	osnovna otopina	molarna koncentracija u mediju
1 mL	Vitamin B ₁₂	1,0 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 x 10 ⁻¹⁰ M
10 mL	Biotin	0,1 g L ⁻¹ dH ₂ O	2 x 10 ⁻⁹ M
200 mg	Thiamine · HCl	-	3 x 10 ⁻⁷ M

Dopuniti volumen do 1 L sa MilliQ vodom. Autoklavirati i čuvati u frižideru na +4 °C.

f/2 otopina tragova metala

U 950 mL MilliQ vode dodati:

količina	kemikalija	osnovna otopina	molarna koncentracija u mediju
3,15 g	FeCl ₃ · 6H ₂ O	-	1 x 10 ⁻⁵ M
4,36 g	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	-	1 x 10 ⁻⁵ M
1 mL	CuSO ₄ · 5H ₂ O	9,8 g L ⁻¹ dH ₂ O	4 x 10 ⁻⁸ M
1 mL	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	6,3 g L ⁻¹ dH ₂ O	3 x 10 ⁻⁸ M
1 mL	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22,0 g L ⁻¹ dH ₂ O	8 x 10 ⁻⁸ M
1 mL	CoCl ₂ · 6H ₂ O	10,0 g L ⁻¹ dH ₂ O	5 x 10 ⁻⁸ M
1 mL	MnCl ₂ · 4H ₂ O	180,0 g L ⁻¹ dH ₂ O	9 x 10 ⁻⁷ M

Dopuniti volumen do 1 L sa MilliQ vodom i autoklavirati.

Osnovne otopine hranjivih soli, tragova metala i vitamina za pripremu podloge čuvane su u hladnjaku na temperaturi od +4°C.

Morska voda potrebna za pripremu medija filtrirana je prije uporabe kroz Millipore filter veličine pora 0,22 µm kako bi se uklonile bakterije i čestice.

Svi alikvoti osnovnih otopina dodavani su u sterilnim uvjetima uz plamenik u već ranije autoklaviranu tikvicu. Nacijepljena kultura stanica *Dunaliella tertiolecta* rasla je na sobnoj temperaturi uz 12:12 h ciklus dan-noć u stacionarnim uvjetima u Erlenmayer tikvicama od 250 mL.

Za održavanje rasta kulture, alikvot od 100 µL kulture u stacionarnoj fazi rasta je otprilike svakih 10 dana dodavan u novih 100 mL f/2-Si medija.

3.4.1.2 Izolacija stanica

Za elektrokemijska mjerenja stanice su nakon 14 dana rasta (stacionarna faza) odjeljene od tekuće podloge blagim centrifugiranjem (1000g, 5 minuta), supernatant je pažljivo uklonjen, a ugušćene stanice isprane sa filtriranom morskom vodom. Ovaj postupak je ponovljen dva puta kako bi se uklonili tragovi medija. Takva osnovna suspenzija, stock otopina, sadrži oko (1-2) × 10¹⁰ stanica L⁻¹.

3.4.1.3 Određivanje gustoće stanica

Stanice *Dunaliella tertiolecta* brojane su u osnovnoj suspenziji i u analiziranoj suspenziji koristeći svjetlosni mikroskop pri povećanju od 200× i hemacitometar dubine jažica 0,2 mm.

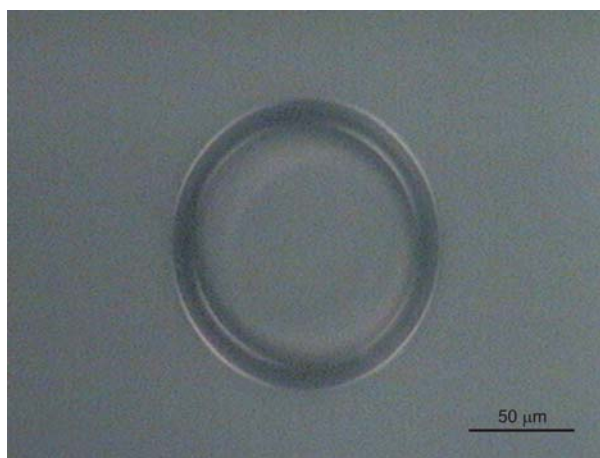
Suspenzije stanica su prethodno fiksirane neutraliziranim 36%-tnim formaldehidom (neutraliziran dodatkom CaCO_3), dodavanjem otopine formaldehida u količini 2% od ukupnog volumena suspenzije.

Za svako mjerenje promatrano je osam polja komorice hemacitometra, odnosno 128 ćelije. Svako polje sastoji se od 16 ćelija. Dimenzija jedne ćelije je $250 \times 250 \times 200 \mu\text{m}$ iz čega proizlazi volumen od $1,25 \times 10^7 \mu\text{m}^3$. Za izračunavanje gustoće stanica određena je srednja vrijednost broja stanica po jednoj ćeliji.

3.4.2 Liposomi

Liposomi su pripremljeni na Imunološkom zavodu u Zagrebu metodom hidratacije tankog filma od fosfatidilkolina, kolesterola i diheksadecilfosfata u molarnom omjeru 7:5:1.⁷⁸ Coulterovim brojačem određena je koncentracija liposoma u osnovnoj suspenziji.

Na slici 17 prikazana je fotomikrografija jednog ogromnog liposoma koji je snimljen kod povećanjem 400× pod polarizacijskim svjetlom.

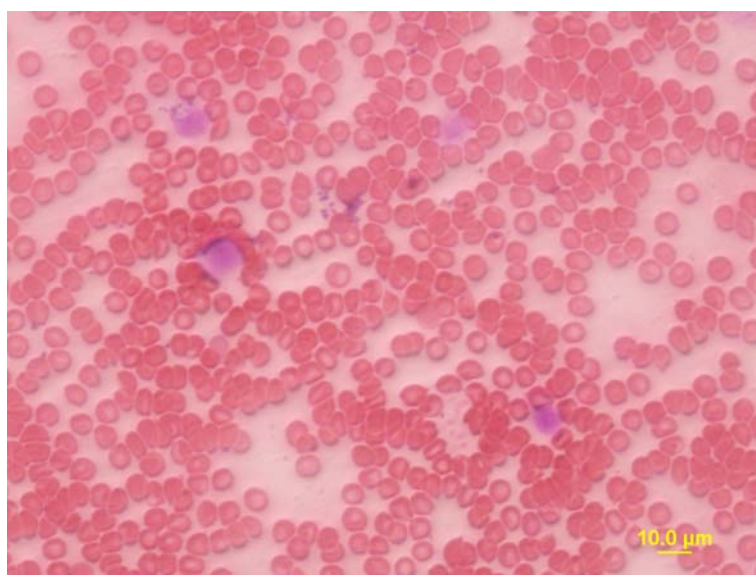


Slika 17. Mikrografija ogromnog liposoma u PBS-u snimljena pod polarizacijskim svjetlom na optičkom mikroskopu.⁷⁹

3.4.3 Krvna zrnca

3.4.3.1 Izolacija krvnih zrnaca

Izolaciju crvenih i bijelih krvnih zrnaca iz krvi miša napravili su kolege iz Laboratorija za oksidacijski stres, Zavoda za molekularnu medicinu Instituta "Ruđer Bošković". Crvena krvna zrnca izolirana su metodom sa fikolom, dok su bijela krvna zrnca dobivena metodom razarača eritrocita. Nakon izolacije stanice su resuspendirane u fiziološkoj otopini sa fosfatnim puferom. Osnovne suspenzije stanica prebrojane su pomoću hemacitometra. Na slici 18 prikazan je razmaz krvi miša nakon bojanja sa Wrightovom bojom – vidljiva je velika gustoća crvenih krvnih zrnaca u odnosu na bijela krvna zrnca (ljubičasto).



Slika 18. Fotomikrografija razmaza obojane mišje krvi snimljena na epifluorescencijskom mikroskopu Olympus BX51.

3.4.3.2 Određivanje gustoće krvnih stanica

Gustoća osnovnih suspenzija stanica u fiziološkoj otopini sa fosfatnim puferom određena je brojanjem na hemacitometru uz pomoć svjetlosnog mikroskopa i one su iznosile:

crvena krvna zrnca: $1,5 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$

bijela krvna zrnca: $3 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$

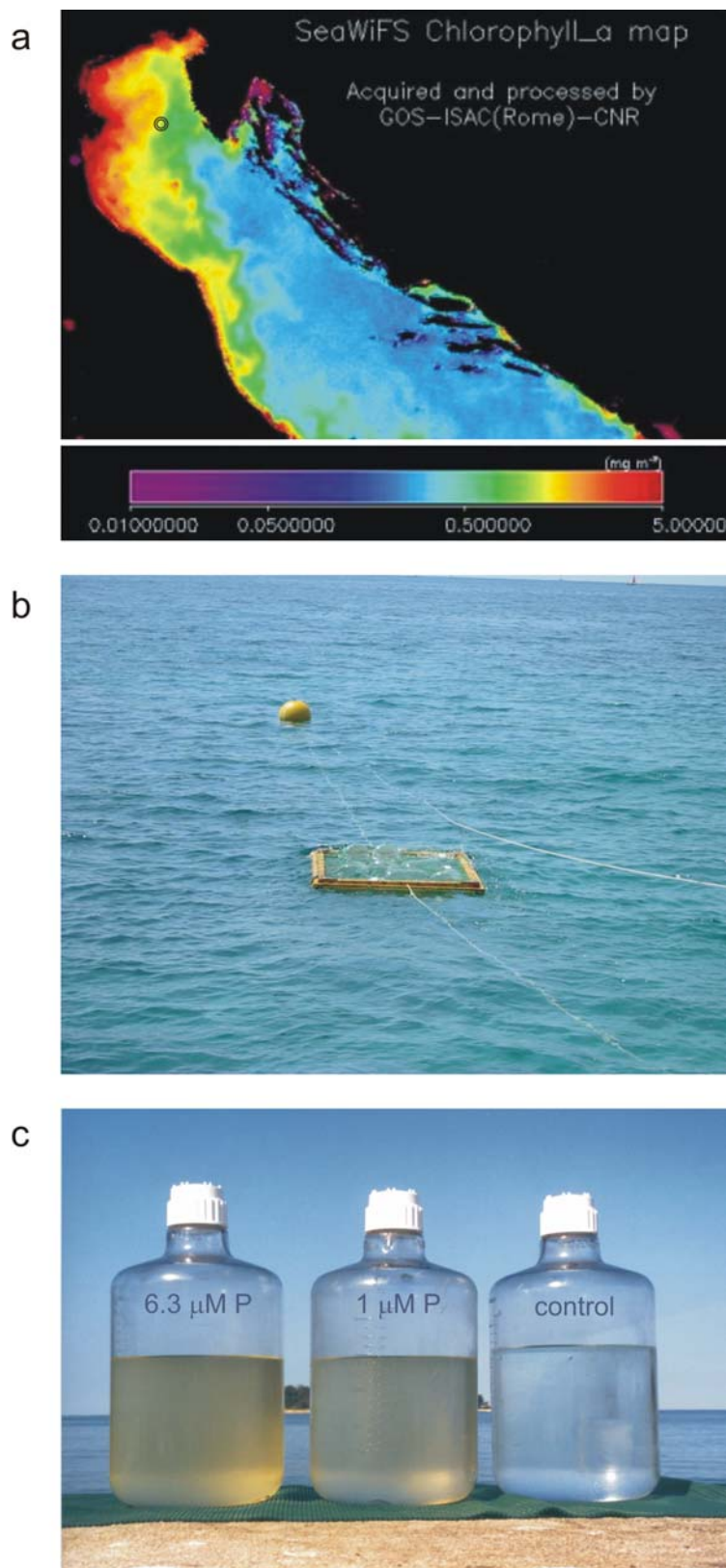
3.4.4 Morske nežive čestice

Pojava i razvoj neživih čestica praćen je u mezokozmos eksperimentu "ROVINJ 2003". Ovdje je opisana postavka i dizajn eksperimenta.

Obogaćenje morske vode nutrijentima bilo je potrebno kako bi se izazvao ubrzani cvat fitoplanktona. Jadransko more uglavnom ima nedostatnu količinu fosfata⁸⁰ što je bila osnova za dizajniranje ovog mezokozmos eksperimenta.

Morska voda korištena u ovom eksperimentu prikupljena je 6.5.2003. na postaji SJ105 (45°02.00'N, 13°09.30'E; 25 Nm od Rovinja) gdje je bila izražena fronta između oligotrofne i više eutrofne vode, što je vidljivo iz vrijednosti klorofila sa satelitske snimke (slika 19a). Za uzorkovanje je korišten Niskinov crpac volumena 30 L. Voda je uzastopce uzorkovana sa 3-4 m dubine i filtrirana kroz mrežicu veličine oka od 250 μm u 8 prozirnih polietilenskih boca (Nalgene) od 20 L. Šest boca sa prirodnim mikrobiološkim sastojcima obogaćivana je sa 100 μM NaNO_3 , 100 μM Na_2SiO_3 i vitaminima (Thiamine-HCl 0,02 mg L⁻¹; B₁₂ i Biotin kao za f/2 medij). U boce 3, 4 i 5 (tri replikata) dodano je po 1 μM NaH_2PO_4 , dok je u druga tri replikata (boce 4, 5, 6) dodano po 6,3 μM NaH_2PO_4 . Boce 1 i 2 korištene su kao kontrolne boce i nisu sadržavale dodatke. U daljnjem tekstu sistem u koji je dodano 1 μM NaH_2PO_4 biti će označen kao "niski P", dok će sistem u koji je dodano 6,3 μM NaH_2PO_4 biti označen kao "visoki P".

Svih 8 boca stavljeno je u za tu priliku specijalno dizajniran drveni okvir sa mrežom (slika 19b) kako bi boce mogle plutati na morskoj površini udaljene nekih 20 m od obale.



Slika 19. (a) Vrijednosti klorofila *a* sa satelitske snimke na dan uzorkovanja 6.5.2003. Oznaka obilježava položaj postaje sa koje je uzorkovana morska voda. (b) Pogled na jednostavnu konstrukciju u kojoj pluta 8 boca od 20 L. (c) Boce uslikane jedanaestog dana eksperimenta (17.5.2003.).

3.5 POSTUPAK ELEKTROKEMIJSKOG MJERENJA

Posebna pažnja posvećena je čistoći vode, ćelije, elektroda i staklenog posuđa. Sistem i posuđe prano je u vrućoj 10% HNO₃.

Kako bi se provjerila čistoća sistema i regularno kapanje živine elektrode, mjerenja su započinjala snimanjem kronoamperometrijskih krivulja redukcije kisika u otopini osnovnog elektrolita (pH = 8,2) kod potencijala -400 mV i -800 mV.

Za pripremu suspenzije mekih čestica željene gustoće u elektrolitu alikvoti osnovne suspenzije dodavani su mikropipetom u odmjerne tikvice od 10 ili 50 mL elektrolita, ovisno o izboru radne elektrode. Suspenzija je blago promućkana, dodana u elektrokemijsku ćeliju nakon čega se odmah pristupilo snimanju kronoamperometrijskih krivulja.

3.5.1 Postupak mjerenja kod eksperimenta određivanja gustoće naboja stanica fitoplanktona

Za mjerenja je korištena standardna elektrokemijska ćelija od 10 mL. Struja nabijanja dvosloja mjerena je nakon pažljive deaeracije u struji dušika iz suspenzije stanica kako bi se uklonili tragovi otopljenog kisika. Tolerancija stanica *Dunaliella tertiolecta* prema anoksičnim uvjetima testirana je snimanjem elektrokemijskih signala prije i poslije deaeracije suspenzije, te nije primjećen nikakav utjecaj. Vodena otopina sadržavala je 0,1 ili 1M NaCl i 5 mM NaHCO₃ kako bi se održao pH na 8,2 (pH morske vode). Mjerenja su provedena pri 25 °C. Statička živina elektroda spojena sa polarografskim analizatorom PAR 174A korištena je za mjerenja I-t krivulja pri konstantnom potencijalu. Proučavani su elektrokemijski odzivi na pozitivnoj i negativnoj strani od točke nultog naboja elektrode u rasponu potencijala od -50 do -1400 mV. Zbog stohastičke prirode procesa u suspenzijama stanica, krivulje struja-vrijeme snimljene su za barem 30 živinih kapi u trajanju od 5 s na svakom potencijalu. Signali su snimljeni i pohranjeni korištenjem digitalnog osciloskopa Nicolet 3091 sa vremenskim rezolucijama od 50-200 μs po točki za snimanje jednog adhezijskog signala i 1-2 ms po točki za snimanje I-t krivulje tijekom cijelog života kapi. Svi potencijali odnose se na Ag/AgCl elektrodu čiji je potencijal 51,4 mV pozitivniji od zasićene kalomel elektrode. Podaci za površinsku gustoću naboja živine elektrode (σ) preuzeti su iz literature. Provjereno je nabijanje dvosloja za KŽE (2s) u čistom elektrolitu i dobiveno je dobro slaganje sa podacima iz literature.

3.5.2 Postupak uzorkovanja i elektrokemijskog mjerenja tijekom trajanja mezokozmos eksperimenta "ROVINJ 2003"

Volumen od 1 L uziman je iz svake boce redovno između 8:15 h i 9 h ujutro i prevožen u laboratorij unutar 20 minuta. Dogovoren je protokol za uzorkovanje kako bi se mogućnost kontaminacije svela na minimum i kako bi se dobila 1 litra reprezentativnog uzorka za mjerenje svih parametara. Eksperiment je trajao od 6. svibnja do 3. lipnja, a elektrokemijska mjerenja su provedena na uzorcima od 6., 8., 10., 11., 12., 13., 14., 15., 16., 18., 20., 21., 27. svibnja i 3. lipnja.

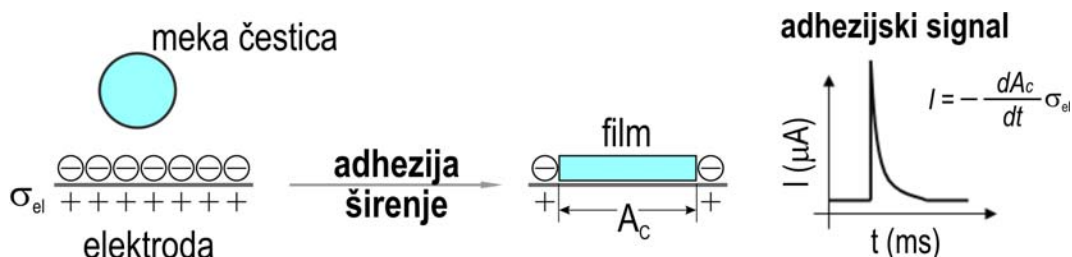
Alikvot od 10 mL uzorka blago je promućkan, a zatim stavljan je u standardnu elektrokemijsku ćeliju nakon čega se odmah pristupilo snimanju kronoamperometrijskih krivulja. Snimanja I-t krivulja pri konstantnom potencijalu od -400 mV provedena su pri 25 °C na statičkoj živinoj elektrodi spojenoj sa polarografskim analizatorom PAR 174A.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 PRIMJENA SENZORA ZA DETEKCIJU MEKIH ČESTICA I NJIHOVO BROJANJE

Meke čestice definirali smo kao organske mikropaljice, vezikule i stanice sa tekućom ili fleksibilnom vanjskom membranom koje pri adhezijskom kontaktu sa površinom pružaju vrlo mali ili nikakav otpor deformaciji. Veličina ovih čestica koje se mogu detektirati na živinnoj elektrodi kreće se u rasponu od 1 do 500 μm .

Metoda se osniva na elektrokemijskoj detekciji mekih čestica u tekućinama korištenjem elektroanalitičke tehnike - kronoamperometrije. U usporedbi sa postojećim elektrokemijskim tehnikama za određivanje broja i veličine čestica u tekućinama ova metoda je bazirana na adheziji čestica nakon sudara/dodira sa elektrodom pri konstantnom potencijalu (slika 20).



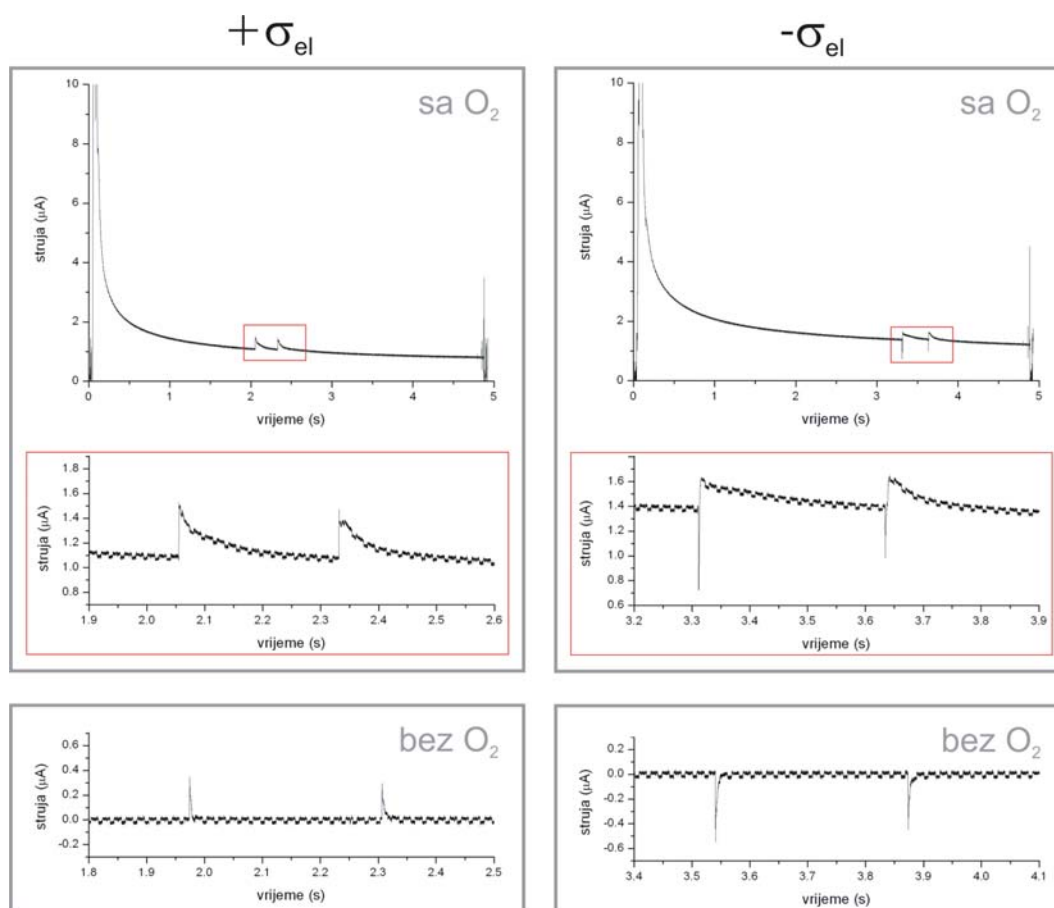
Slika 20. Shematski prikaz interakcije meke čestice sa pozitivno nabijenom živinom elektrodom u vodenoj otopini elektrolita. Adhezijski signal posljedica je potiskivanja naboja dvosloja sa kontaktne površine A_c .

Adhezija sa tekućom elektrodom osnovni je princip elektrokemijskog prepoznavanja pojedinačnih mikročestica. Bazirana na adhezijskom principu detekcija mekih čestica u tekućinama postaje jednostavna i pouzdana. Povrh toga, prisutnost krutih čestica u uzorku ne ometa mjerenje.

Elektrokemijsko oslikavanje pojedinačnih čestica provodi se u sirovim uzorcima ili nakon podešavanja koncentracije. Površina živine kap elektrode je obnovljiva, atomski glatka i električki nabijena u širokom rasponu potencijala. Površinska napetost i površinski naboj na međupovršini živa/otopina elektrolita mogu se kontrolirati vanjskom primjenom potencijala. Glavna prednost živine kap elektrode u analizi čestica je obnovljivost njene površine koja je izotropna s obzirom na fizikalno-kemijska svojstva. Reproducibilnost u stvaranju čiste površine elektrode iskorišteno je za sakupljanje velikog skupa podataka pri istim eksperimentalnim uvjetima. Učestalost kojom se površina živine elektrode obnavlja je

konstantna i iznosi 5s. Živina kap elektroda uranja se u suspenziju čestica i dovodi se prethodno definiran konstantan potencijal pri kojem se javlja jaka privlačna sila između živine površine i čestica.

Pri konstantnom potencijalu, različite klase čestica imaju karakteristične adhezijske signale u obliku strujnih pulseva koji se javljaju kao posljedica njihovog kontakta sa živinom elektrodom. Ispitivane suspenzije čestica tijekom mjerenja nalaze se u elektrokemijskoj ćeliji koja je u kontaktu sa zrakom – što znači da se u ćeliji nalazi otopljeni molekularni kisik koji izaziva reakcije prijenosa naboja na živinoj elektrodi. Upravo je postojanje ovog prirodnog reagensa i njegova reakcija sa elektrodom iskorišteno za pojačanje strujnih pulseva koji predstavljaju adhezijske događaje mekih čestica.



Slika 21. Adhezijski signali na kronoamperometrijskim krivuljama snimljeni u suspenziji stanica *Dunaliella tertiolecta* u uvjetima sa i bez kisika u 0,1M NaCl-u na pozitivno (-400 mV) i negativno (-800 mV) nabijenoj površini statičke živine elektrode. Rezolucija 0,05 μ s/točki.

Sudar meke čestice sa živinom elektrodom evidentira se kao dobro razlučeni strujni impuls milisekundnog trajanja (slika 21) i sastoji se od:

a) toka struje uzrokovane potiskivanjem naboja sa kontaktne međupovršine čestica/živina elektroda

b) dodatne struje redukcije kisika koja se javlja zbog trenutnog povećanja dobave kisika usljed turbulencije na kontaktnoj granici triju faza (otopina/čestica/živina elektroda).

Na slici 21 primjećuje se da je na negativno nabijenoj elektrodi oblik signala promijenjen, jer je smjer struje potiskivanja naboja suprotan struji redukcije kisika.

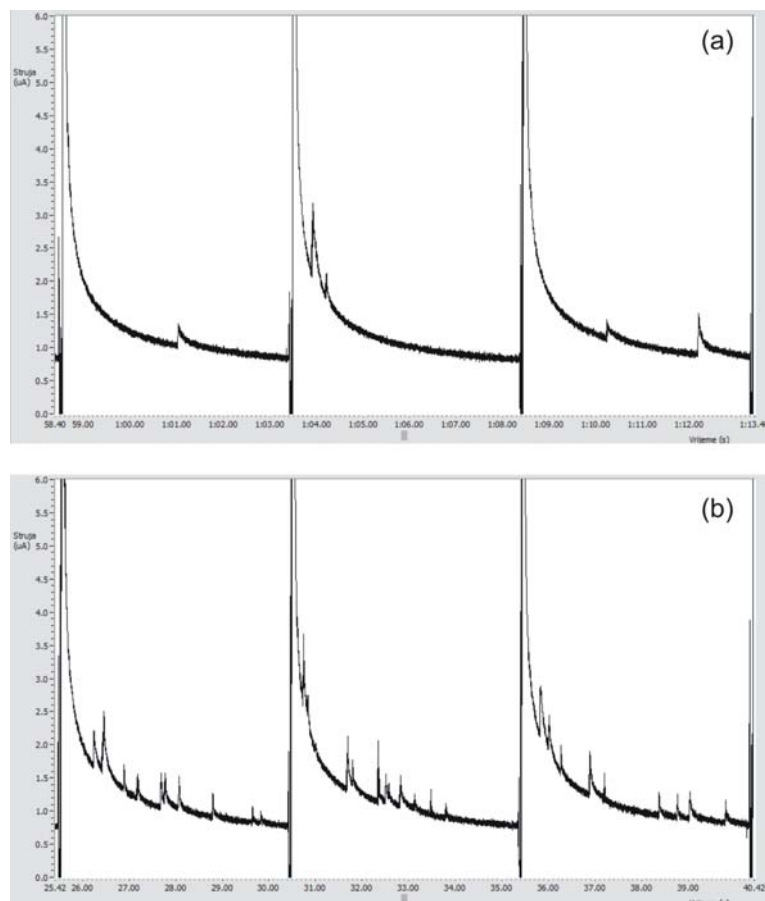
Proces koji uzrokuje tok struje I_D (7) je površinski proces. Dodatna redukcija kisika je reakcija u volumenu izazvana površinskim procesom i traje dok turbulentno strujanje ne oslabi. Struje uzrokovane ovim dvaju procesima su kumulativne. Trajanje pulsa povećava se za red veličine a time i integral struje po vremenu. Ovo pojačanje pomaže pri detekciji i snimanju strujnih pulseva.

4.1.1 Kalibracijski sistem

Kao modelna čestica za izradu kalibracijskih krivulja odabrana je morska jednostanična alga *Dunaliella tertiolecta* Butcher zbog slijedećih svojstava:

- prikladne veličine stanica (6-10 μm)
- deformabilnosti membrane
- stabilnih suspenzija stanica čije su karakteristike vrlo bliske svojstvima monodisperznih sustava
- relativno jednostavnog uzgoja u kulturi i pripremanja suspenzije točno određene koncentracije

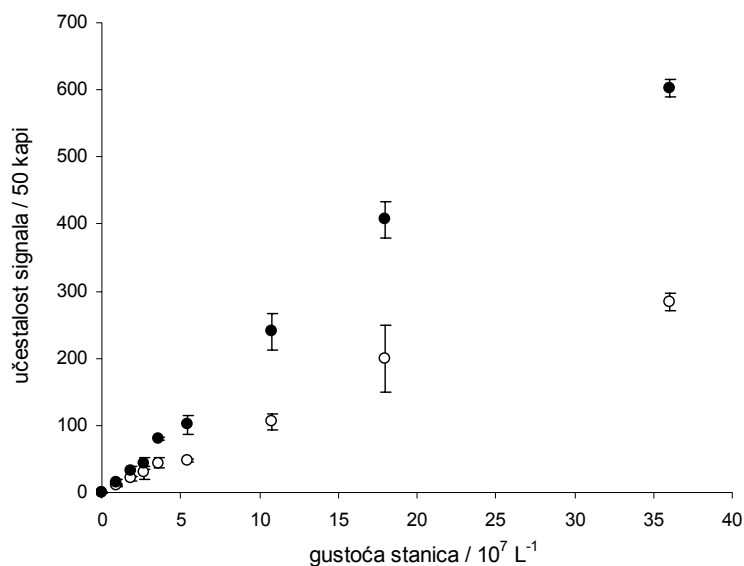
Na slici 22 prikazane su po tri uzastopne kronoamperometrijske krivulje snimljene u suspenzijama stanica različite gustoće: (a) $3,6 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ i (b) $3,6 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ u morskoj vodi kao elektrolitu. Na I-t krivuljama vide se karakteristični adhezijski signali stanica morskog fitoplanktona *Dunaliella tertiolecta*. Primjetno je da se učestalost adhezijskih signala povećava sa porastom koncentracije stanica u suspenziji. Različita učestalost na pojedinačnim kapima živine elektrode upućuje na stohastičku prirodu procesa.



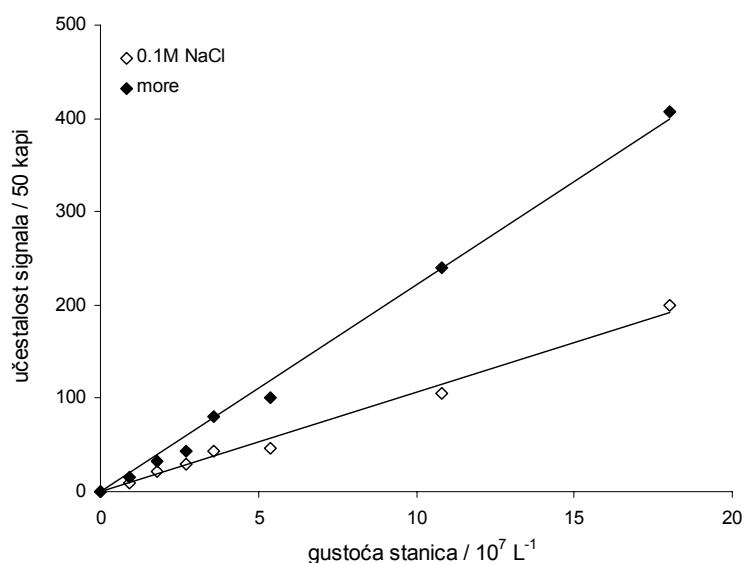
Slika 22. Signali prijanjanja pojedinačnih stanica na I-t krivulji redukcije kisika u morskoj vodi kao elektrolitu. Krivulje su snimljene na statičkoj živinoj elektrodi kod potencijala -400 mV u suspenziji stanica *Dunaliella tert.* gustoće (a) $3,6 \times 10^7$ L $^{-1}$ i (b) $3,6 \times 10^8$ L $^{-1}$. Rezolucija 1 ms/točki.

Ovisnost učestalosti signala prijanjanja na 50 živinih kapi (odnosno tijekom 250 s) o rastućoj gustoći stanica u nizu suspenzija kod pozitivno nabijene površine živine elektrode prikazana je na slici 23. Mjerenja sa adhezijskim senzorom izvedena su pri radnom potencijalu od -400 mV prema Ag/AgCl/0,1M NaCl referentnoj elektrodi u Methromovoj ćeliji od 10 mL pri sobnoj temperaturi. Za pripremu suspenzija određene gustoće stanica korištena su dva elektrolita: 0,1M NaCl uz dodatak 0,5M NaHCO₃ za postizanje pH morske vode (pH=8,2) i morska voda (ionska jakost morske vode iznosi 0,55 mol dm⁻³). Tri serije mjerenja napravljene su za svaku pojedinačnu suspenziju kako bi se mogla odrediti srednja vrijednost i standardna devijacija.

Baždarne krivulje za adhezijski senzor dobivene mjerenjem u dva elektrolita prikazane su na slici 24. Senzor pokazuje dobru linearnost u području gustoće stanica 1×10^7 – $1,8 \times 10^8$ stanica L $^{-1}$.



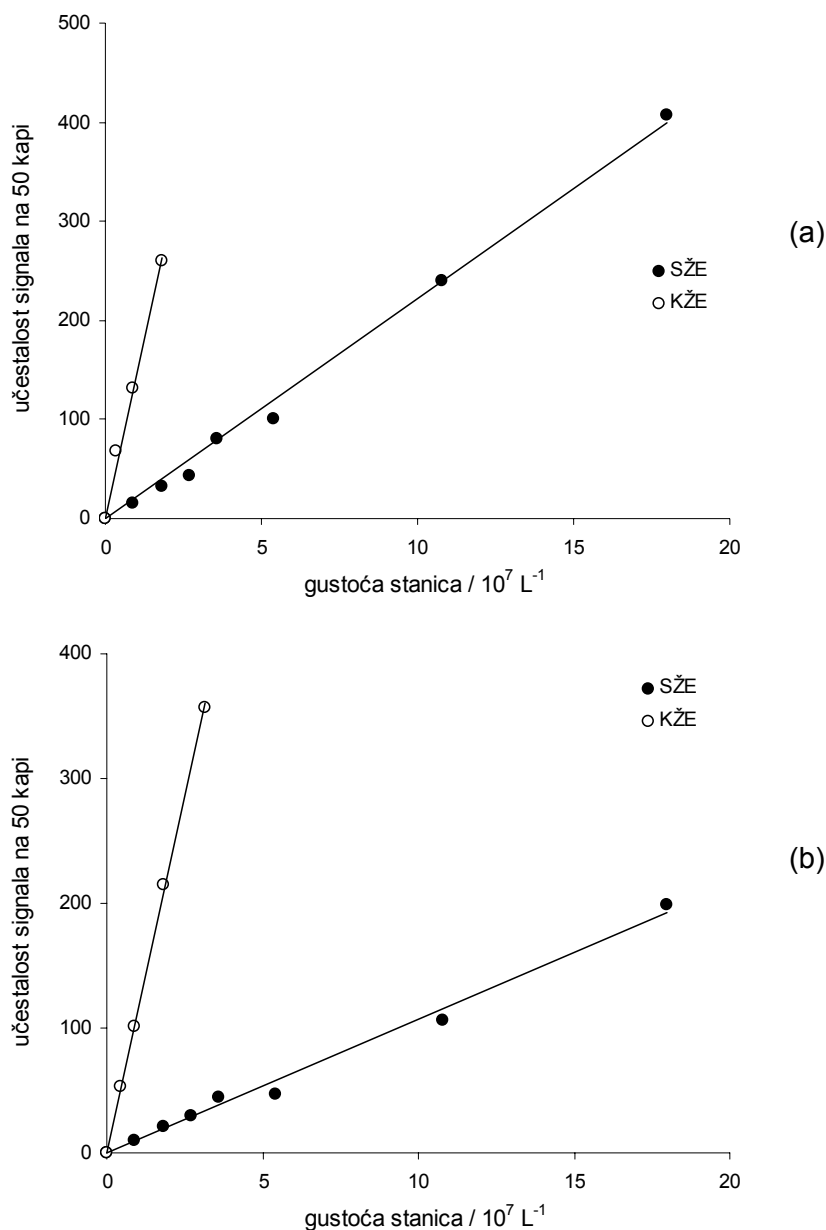
Slika 23. Prikaz ovisnosti učestalosti signala prijanjanja o rastućoj gustoći stanica *Dunaliella tert.* mjerenih u morskoj vodi (●) i 0.1M NaCl (○) na pozitivno nabijenoj živinoj elektrodi.



Slika 24. Prikaz linearnog dijela ovisnosti učestalosti signala prijanjanja o rastućoj gustoći stanica *Dunaliella tertiolecta* mjerenih u morskoj vodi i 0.1M NaCl na potencijalu živine elektrode -400 mV.

Kalibracijski pravci za statičku i kapajuću živinu elektrodu snimljeni su u istim uvjetima kako bi se predočila prednost statičke elektrode pri mjerenju visoke koncentracije čestica u suspenziji. Na slici 25 prikazani su kalibracijski pravci snimljeni u morskoj vodi i 0.1M NaCl na SŽE i KŽE. Uočava se velika razlika u nagibu pravaca za ova dva senzora mekih čestica. KŽE ima veći nagib pravca što je dakako prednost pri mjerenju nižih koncentracija čestica, ali nakon $3 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ učestalost pojavljivanja signala na jednoj živinoj kapi je toliko velika da se adhezijski signali međusobno preklapaju zbog čega ih je nemoguće izbrojati, a

time ni odrediti točnu koncentraciju čestica u uzorku. Ovdje do izražaja dolazi prednost SŽE s kojom je moguće odrediti koncentracije čestica i kada se one kreću i do $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$.



Slika 25. Baždarni pravci snimljeni u (a) morskoj vodi i (b) 0,1M NaCl dvaju živinih senzora za meke čestice: SŽE (●) i KŽE (○).

Veliki nagib kalibracijskog pravca za KŽE u odnosu na SŽE može se objasniti na slijedeći način. Veličina površine živine elektrode vrlo je važna, jer što je ona veća to je i vjerojatnost adhezije stanica na njezinu površinu veća. Površina kapi kapajuće živine elektrode na kraju života kapi iznosi $4,7 \text{ mm}^2$, dok je površina statičke živine kap elektrode konstantna i iznosi $1,19 \text{ mm}^2$. Dalje, kontinuirani rast kapajuće živine elektrode definira njenu dinamičku površinu. Stalno povećanje kapi tijekom njenog života uzrokuje nastajanje gradijenta

površinske napetosti $d\gamma/dE$ (gdje je γ površinska napetost, a E potencijal na međupovršini živanja elektroda/vodena otopina elektrolita) zbog kojeg se javljaju stacionarna i nestacionarna konvektivna strujanja na međupovršini živa/otopina koja se prenose na otopinu u blizini elektrode i uzrokuju dodatno miješanje otopine. Mikroskopske perturbacije na međupovršini pojačavaju se do makroskopskih nestabilnosti – efekt poznat kao Marangonijev efekt.⁸¹⁻⁸³

4.1.2 Prihvat i pohrana podataka

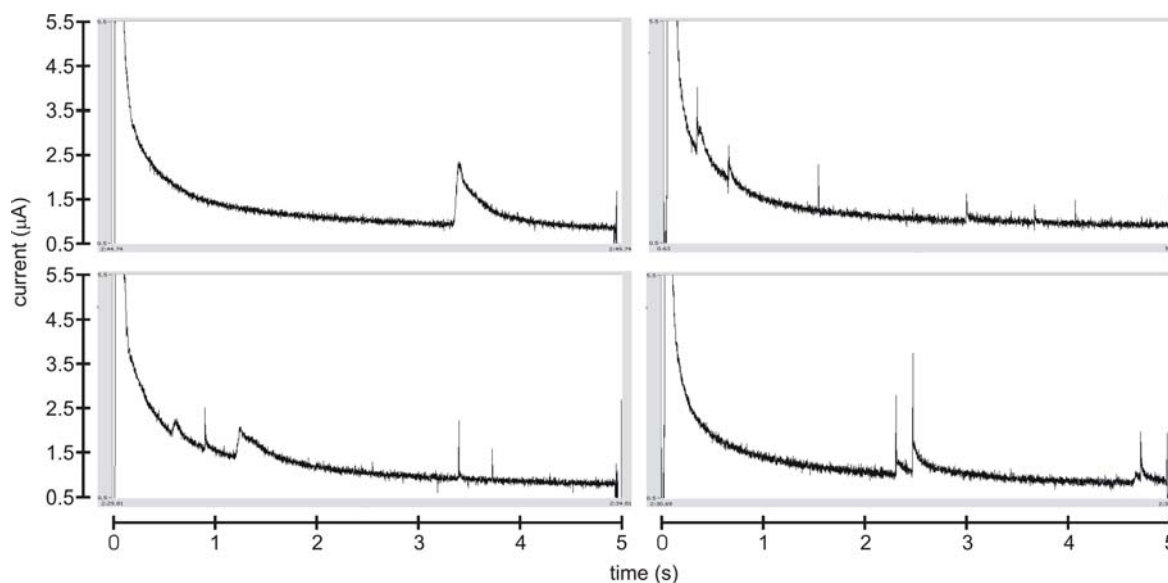
Kronoamperometrijske krivulje snimane su koristeći LabView sistem od National Instruments-a. Ulazni uređaj DAQ kartica AI-16-XE-50 omogućava prihvat analognih podataka, a analiza podataka izvedena je korištenjem aplikacije koja je razvijena u LabView 6.1 software-u.

DAQ kartica AI-16-XE-50 omogućuje snimanje podataka sa velikim razlučivanjem, pa su i rezolucije snimanja podešavane prema zahtjevima samog eksperimenta. Tako su eksperimenti čija je svrha bila izrada kalibracijskih krivulja (ovisnost učestalosti pojavljivanja signala o koncentraciji čestica) sa *Dunaliellom tertiolectom* kao modelnom česticom tekli uz snimanje sa razlučivanjem od 1 ms (1000 točaka po sekundi). Prosječan signal adhezije ovog fitoplanktona na statičkoj živinoj elektrodi u uvjetima kisika može se opisati trajanjem od 100-200 ms i visinom struje 0,5 - 1 μ A, pa je rezolucija od 1 ms po točki dovoljna za detekciju signala na živinoj kapi i očitavanje njihovog broja. S druge strane, u eksperimentima koji su rađeni u dušiciranim uvjetima, tj. bez prisutnosti kisika koji amplificira signal adhezijski signali kraće traju i njihova visina struje je manja, te je za njihovu karakterizaciju potrebno snimanje sa većim rezolucijama: 100 ili 50 μ s po točki.

4.1.3 Testiranje senzora

4.1.3.1 Praćenje razvoja čestica tijekom mezokozmos eksperimenta "Rovinj 2003"

Mezokozmos eksperiment "Rovinj 2003" je bio jedinstvena prilika za vrednovanje odnosa i važnosti mjernih tehnika koje danas postoje za praćenje morskih čestica. Specifičniji cilj je bio usporedba stvaranja čestica u mediju koji je obogaćen niskom odnosno visokom koncentracijom fosfata koristeći elektrokemijski pristup.



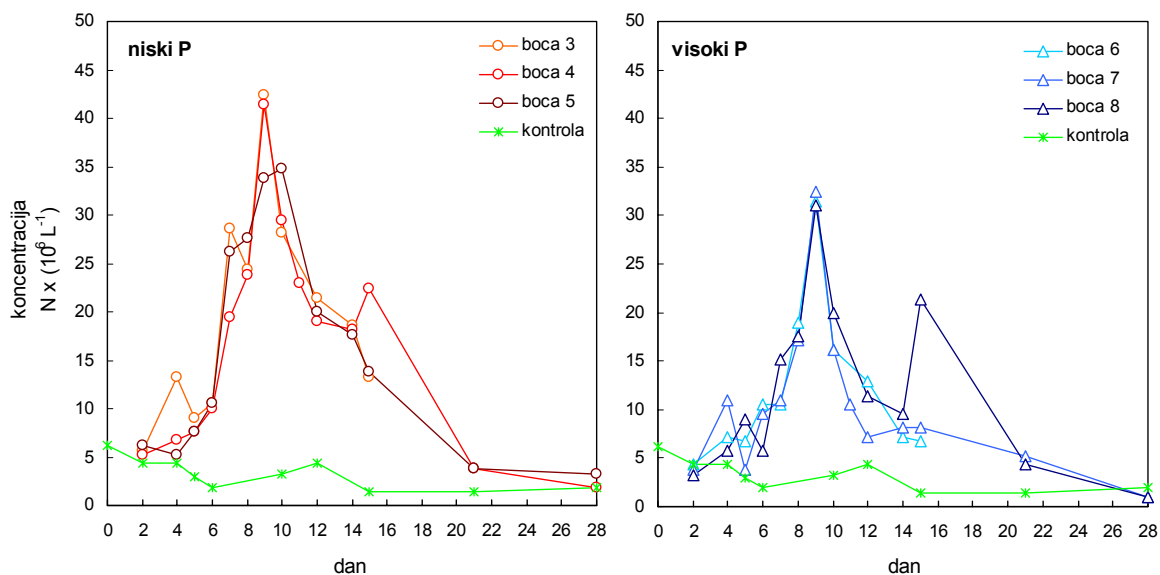
Slika 26. Električni odzivi čestica snimljenih na senzoru – statičkoj živinoj elektrodi. Signali su superponirani na monotono padajuću baznu liniju. Odabrani set krivulja snimljen je u uzorku iz boce 4 devetog dana eksperimenta.

Svi su uzorci analizirani na isti način: statička živina elektroda je jednostavno uranjana u elektrokemijsku ćeliju koja je sadržavala uzorke volumena 10 mL nakon čega je uslijedilo snimanje kronoamperometrijskih krivulja sa signalima prijanjanja.

Rezolucija snimanja iznosila je 1 ms. Na ovaj način moguće je istražiti široki raspon koncentracija čestica ($2 \times 10^6 - 1,3 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$) bez prethodne obrade ili razrijeđenja. Tipični signali snimljeni u boci 4 devetog dana prikazani su na slici 26 kako bi ilustrirali glavne značajke amperometrijskog odziva:

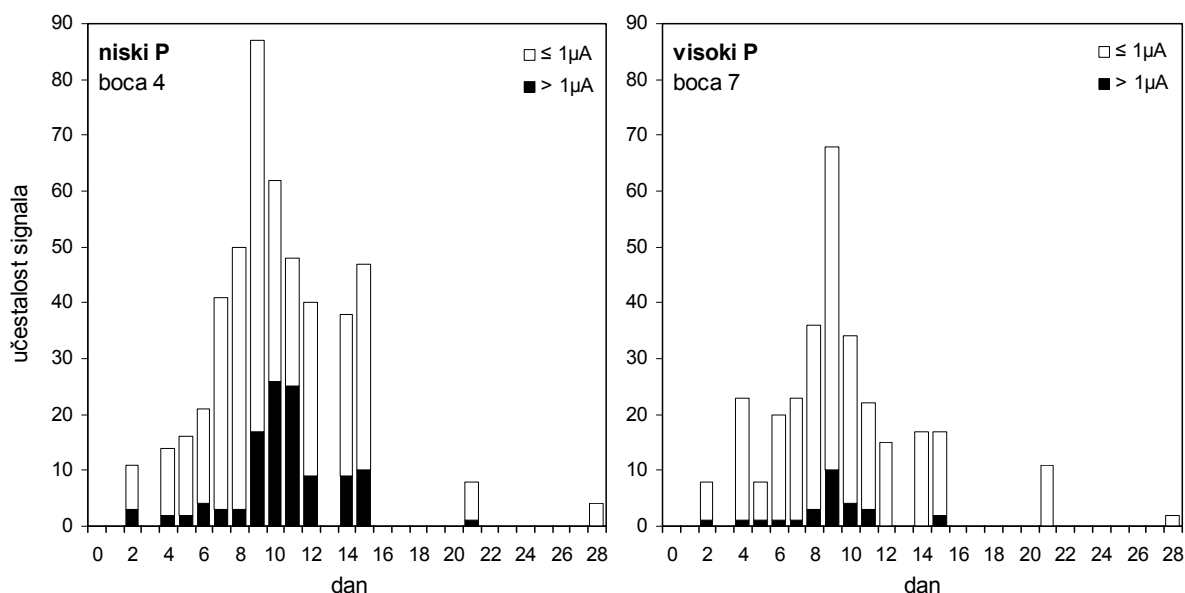
- monotono sniženje bazne linije
- spektar signala – u obliku šiljaka različitih intenziteta (visina struje i trajanje)

Rezultati su prvo analizirani u smislu učestalosti pojavljivanja signala tijekom 50 živinih kapi svake u trajanju od 5 s. Učestalost signala prevedena je u koncentraciju čestica upotrebom kalibracijskog pravca koji je snimljen u morskoj vodi. Koncentracija čestica u bocama sa visokom i niskom koncentracijom fosfata za vrijeme trajanja mezokozmos eksperimenta prikazana je na slici 27. Postignuto je vrlo dobro slaganje između tri replikata. Na grafovima se vidi da je do stvaranja većeg broja čestica došlo u sistemu sa manjom koncentracijom fosfata (boce 3, 4 i 5).



Slika 27. Koncentracija površinski-aktivnih čestica tijekom trajanja eksperimenta u bocama sa niskom i visokom koncentracijom fosfata i u kontrolnoj boci.

Izgleda da zbog neuravnoteženog N/P omjera fitoplankton pojačano luči ekstracelularne polimere koji su neophodni za nastanak ovog fenomena. Dokazi koji proizlaze iz *in situ* i laboratorijskih mjerenja pokazuju da nedostatak fosfata u površinskim vodama u sjevernom Jadranu donekle pridonosi razvoju ovog fenomena.⁸⁴

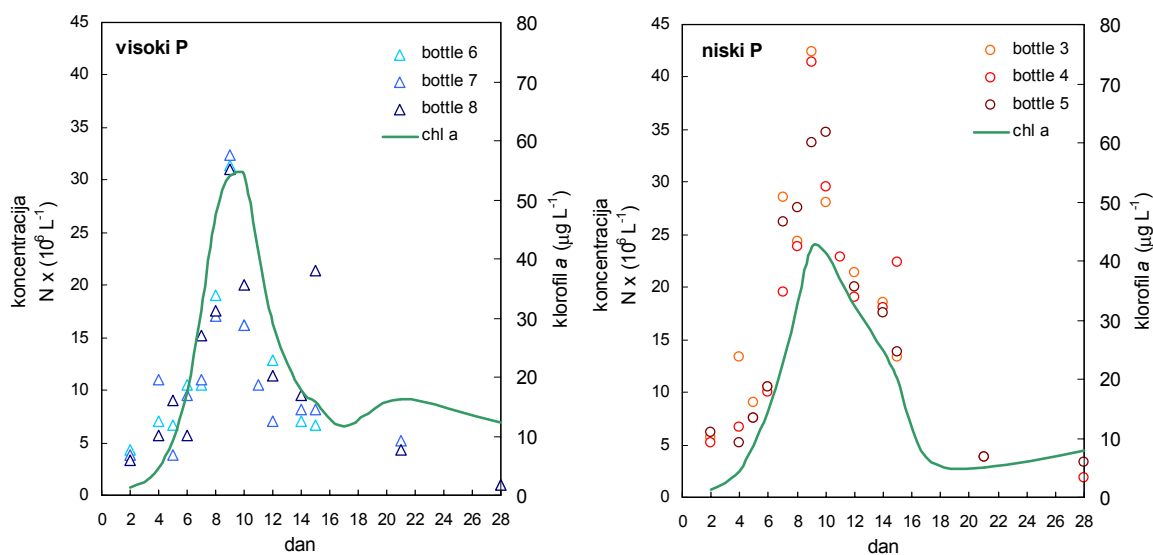


Slika 28. Doprinos dviju kategorija amplituda signala ($\leq 1 \mu\text{A}$ i $> 1 \mu\text{A}$) ukupnom broju signala za vrijeme trajanja eksperimenta snimljenih u bocama 4 (niski P) i 7 (visoki P).

Drugo, električni signali su sortirani u dvije grupe prema visini struje, $\leq 1 \mu\text{A}$ i $> 1 \mu\text{A}$ (slika 28). Signal od $1 \mu\text{A}$ odgovara čestici promjera $10 \mu\text{m}$. Do ovog odnosa se došlo

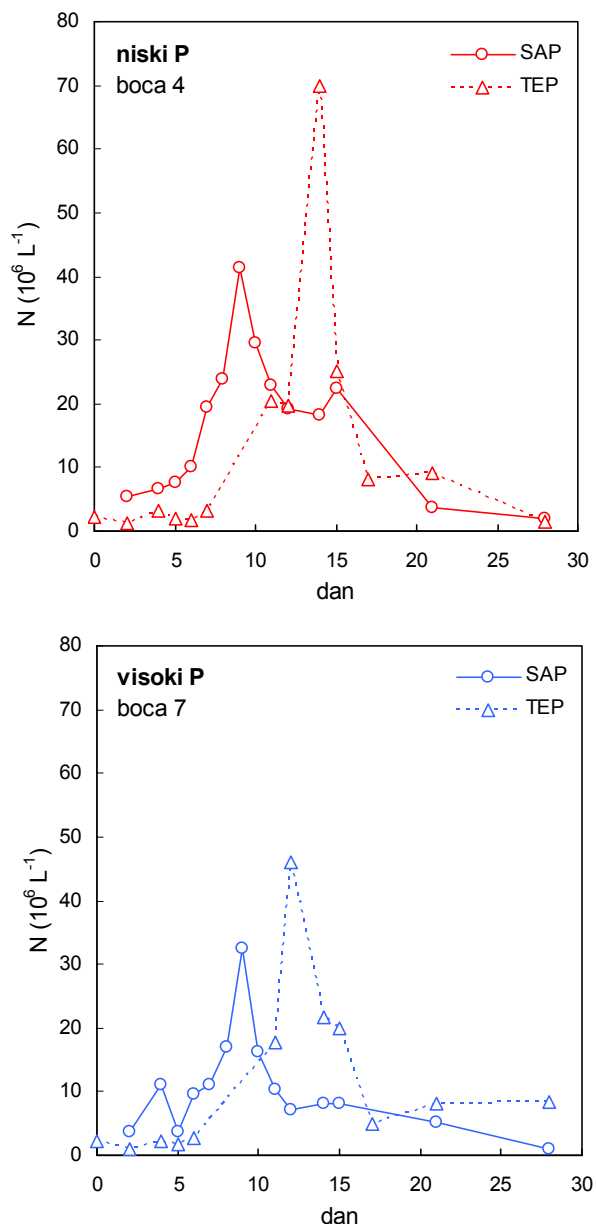
kalibracijom sa signalima stanica *Dunaliella tertiolecta* u stacionarnoj fazi rasta i potvrđeno je mikroskopski. Primjećuje se da se maksimum ukupnog broja signala, i malih i velikih, pojavljuje u isto vrijeme 9. dana. Histogrami na slici 28 pokazuju da su veće čestice ($d > 10 \mu\text{m}$) brojnije u sistemu sa manje fosfata. Distribucija po veličini ne pokazuje agregaciju čestica u vremenu.

Korelacija između fiksiranog organskog ugljika – krivulja klorofila *a* i koncentracije čestica predočena je na istom dijagramu za sisteme sa $1 \mu\text{M PO}_4$ i $6,3 \mu\text{M PO}_4$ (slika 29). Ovo je ujedno najjednostavniji način da se još jednom pokaže kako je koncentracija nastalih čestica veća u sistemu koji sadrži manje fosfata.



Slika 29. Koncentracije površinski-aktivnih čestica u svim bocama uspoređene su sa krivuljom klorofila *a* za oba režima fosfata tijekom trajanja eksperimenta.

Glavni značaj prikazanog odnosa je u tome što pokazuje da nastanak čestica direktno prati tijek krivulje klorofila *a*. To znači da su nastale nežive čestice biološkog porijekla tj. da su nastale kao direktan produkt fitoplanktonskog cvata. Ako se zna da je u oba režima fosfata tijekom ovog eksperimenta dominirala dijatomejska vrsta *Dactyliosolen fragilissimus*,⁸⁵ a poznata je činjenica da dijatomeje luče ekstracelularne polisaharidne tvari,⁸⁶⁻⁸⁹ to je za pretpostaviti da čestice mjerene elektrokemijski imaju polisaharidni matriks. Da je tijekom eksperimenta došlo do razvoja fitoplanktonskog cvata vidljivo je i sa slike 19c koja pokazuje fotografiju triju boca jedanaestog dana eksperimenta. U kontrolnoj boci tijekom trajanja eksperimenta nije došlo do cvata fitoplanktona.



Slika 30. Koncentracije površinski-aktivnih čestica i prozirnih egzopolimernih čestica za vrijeme trajanja eksperimenta u bocama 4 (niski P) i 7 (visoki P).

Dalje su uspoređene vrijednosti koncentracija površinski-aktivnih čestica i prozirnih egzopolimernih čestica (TEP) u bocama 4 i 7 (slika 30). Koncentracije ovih dviju vrste čestica određene su nezavisnim metodama. Vrlo interesantna informacija proizlazi iz vremena stvaranja maksimuma za ove dvije vrste čestica. U boci 4, maksimum TEP-a pojavljuje se pet dana nakon maksimuma površinski-aktivnih čestica, a u boci 7 tri dana kasnije. Maksimalna razlika koncentracije obiju vrsta čestica je 40% što je relativno dobro slaganje kada se uzmu u obzir fenomenološke razlike između dviju mjernih tehnika: adhezije čestica na živinoj površini kao jedne, te filtriranja, bojanja na filter papiru i zatim

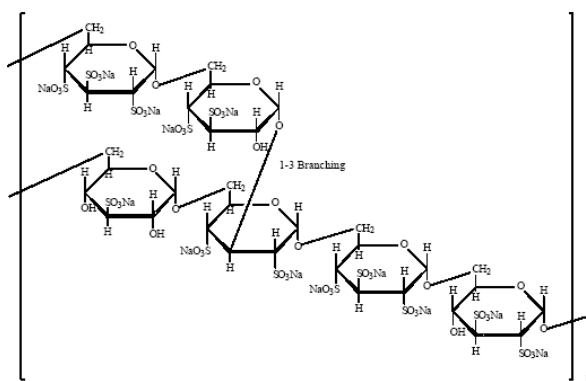
brojanja čestica pod mikroskopom kao druge. Ovaj rezultat upućuje na dvije bitne stvari. Prvo, da je čestice koje se detektiraju elektrokemijski (u obliku polisaharidnih vezikula) moguće obojati sa Alcijan plavom bojom u kasnijoj fazi, nakon 5 ili 3 dana iz čega proizlazi da elektrokemijska tehnika detektira čestice ranije. A drugo, dobro slaganje između ovih dviju vrsta čestica govori u prilog pretpostavci da i čestice mjerene elektrokemijski imaju polisaharidni karakter.

4.1.3.2 Ispitivanje utjecaja adsorpcije otopljenih organskih molekula na adheziju stanica na živinoj statičkoj kap elektrodi

Smjese otopljenih molekula i mikrobnih stanica tipične su za prirodni akvatički okoliš. Kako bi se živina statička elektroda mogla koristiti za ispitivanje prirodnih uzoraka, neophodno je utvrditi kakav je utjecaj adsorpcije otopljenih organskih molekula. Uočeno je da sa porastom koncentracije površinski-aktivnih tvari koje se adsorbiraju na pozitivno nabijenoj živinoj kapajućoj elektrodi učestalost pojavljivanja adhezijskih signala opada.⁹⁰

Kompeticija između adsorpcije organskih molekula i adhezije pojedinačnih mekih čestica ispitana je u suspenziji stanica *Dunaliella tertiolecta* gustoće $7.5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ u 0,1M NaCl-u uz dodatak rastućih koncentracija dekstran sulfata.

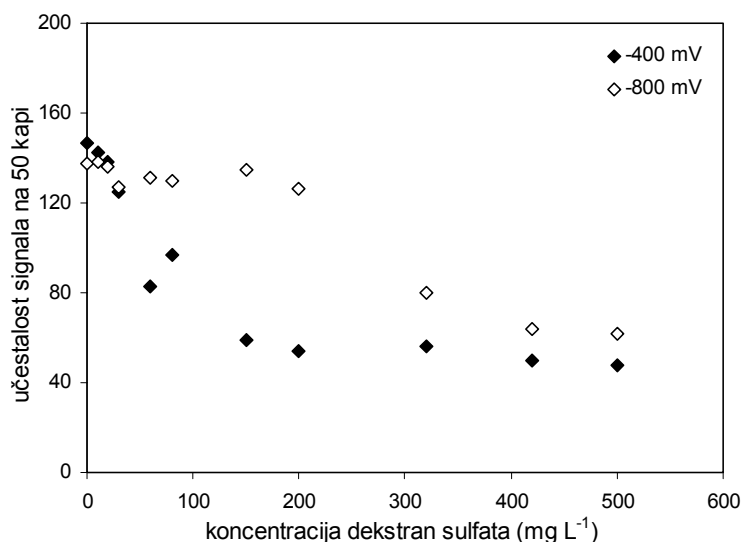
Dekstrani su poznati po svojoj specifičnoj adsorpciji na živinoj elektrodi u širokom području potencijala, kako kod pozitivnih tako i kod negativnih površinskih naboja.^{91,92} Ovi polimeri su sastavljeni od glukoznih jedinica međusobno povezanih sa α -(1-6) vezama i u manjoj mjeri α -(1-3) vezama preko kojih se granaju.



Slika 31. Strukturna formula dekstran sulfata.

Dekstran sulfat, negativno nabijeni biopolimer (slika 31), u ovom radu je upotrijebljen kao model za otopljenu organsku tvar u moru. Sadrži oko 17% sumpora što je približno ekvivalentno 2,3 sulfatne grupe po glukozilnom ostatku. Nalazi se u formi natrijeve soli te je topiv i stabilan u vodi. Molekularna masa ovog sulfoniranog polisaharida je 500 000 i u daljnjem tekstu će biti označen kao D-500*.

Kronoamperometrijske krivulje snimane su na pozitivno i negativno nabijenoj površini živine elektrode i to kod potencijala -400 mV i -800 mV. Učestalost pojavljivanja adhezijskih signala stanica *Dunaliella tertiolecta* na pozitivno nabijenoj živinoj elektrodi maksimalna je na potencijalu -400 mV, dok je na negativno nabijenoj strani elektrode taj maksimum izražen na potencijalu -800 mV⁹³ gdje nema adsorpcije dekstran sulfata.⁹⁴

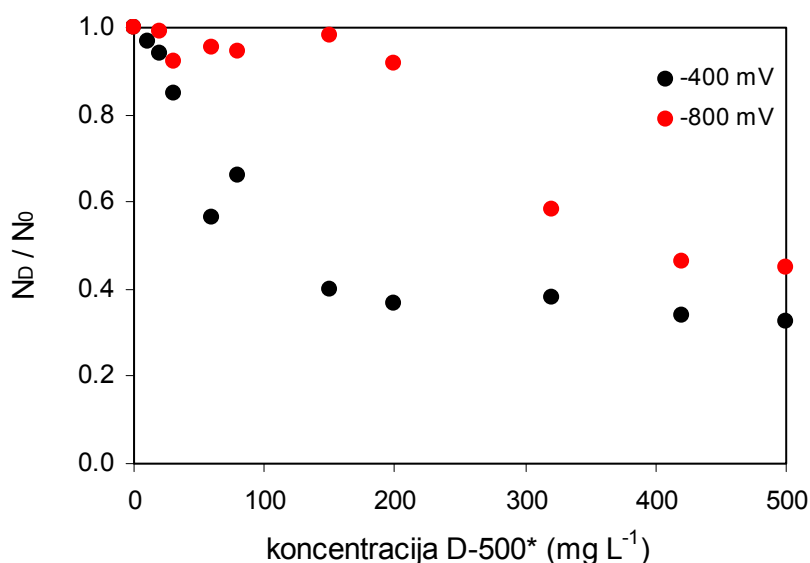


Slika 32. Ovisnost učestalosti pojavljivanja adhezijskih signala stanica *D. tertiolecta* o rastućoj koncentraciji dekstran sulfata u 0,1M NaCl snimljena na potencijalima -400 i -800 mV. Gustoća stanica je $7.5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$.

Na slici 32 učestalost signala na potencijalu -400 mV naglo se smanjuje sa dodatkom koncentracije D-500* do 150 mg L^{-1} , dok na -800 mV učestalost signala u tom području ostaje konstantna. Na -400 mV živina elektroda je pozitivno nabijena, te je adsorpcija negativno nabijenih molekula dekstran sulfata favorizirana – dolazi do blokiranja živine elektrode čime se smanjuje površina slobodnog mjesta za adheziju stanica *D. tertiolecta* i to se na grafu očituje kao kontinuiran pad broja adhezijskih signala. Povećanjem koncentracije biopolimera adsorpcija molekula nadvladava adheziju stanica. S druge strane, na -800 mV gdje je živina elektroda negativno nabijena dekstran sulfat se ne adsorbira što znači da je površina živine elektrode slobodna za nesmetanu adheziju

stanica i to je na početku grafa vidljivo kao konstantna učestalost broja adhezijskih signala bez obzira na povećanje koncentracije dekstran sulfata.

Kako bi se efekt kompeticije ova dva procesa jasnije pokazao, na slici 33 u odnos je stavljena slobodna površina za adheziju stanice prema koncentraciji dekstran sulfata. Slobodna površina za adheziju stanica izražena je kao omjer učestalosti signala N_D/N_0 , gdje je N_D učestalost signala u suspenziji stanica uz dodatak D-500*, a N_0 učestalost signala u suspenziji stanica bez D-500*.



Slika 33. Ovisnost slobodne površine za adheziju stanica o rastućoj koncentraciji dekstran sulfata u 0,1M NaCl-u na SŽE. Gustoća stanica je $7.5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$.

Udio slobodne površine na pozitivno nabijenoj živinoj elektrodi smanjuje se dodatkom dekstran sulfata do 150 mg L^{-1} gdje udio slobodne površine iznosi 40%. Daljnim dodatkom dekstran sulfata, u području $150 - 500 \text{ mg L}^{-1}$, udio slobodne površine za adheziju stanica *Dunaliella tertiolecta* se ne mijenja. Očito je da adsorbirane molekule D-500* na površini elektrode nisu organizirane u kompaktan film, jer stanice morskog fitoplanktona uspijevaju bez obzira na visoku koncentraciju polisaharida u suspenziji doći do čistog dijela površine. Istraživanja provedena sa neutralnim dekstranima različitih molekularnih masa ($M=4000$, 7000 i 500000) i dekstran sulfatom elektrokemijskim metodama supresije polarografskog maksimuma na kapajućoj živinoj elektrodi i fazno osjetljive voltometrije izmjeničnom strujom su pokazala da su u difuzijskim uvjetima u otopini male molekule efikasnije u prekrivanju površine elektrode od voluminoznih molekula velike molekularne mase.^{90,95,96} Postupno smanjenje udjela slobodne površine na negativno nabijenoj živinoj elektrodi (-800 mV) nakon dodatnih 150 mg L^{-1} vjerojatno se dešava zbog steričkih smetnji velikih molekula D-500* u suspenziji.

4.2 RAZVOJ SENZORA ZA *IN SITU* DETEKCIJU MEKIH ČESTICA U VODENOM OKOLIŠU

Glavna karakteristika morskih uzoraka koji sadrže koloidne čestice je njihova intrinzička nestabilnost zbog kontinuirane agregacije i mikrobiološke aktivnosti te je iz tog razloga uzorkovanje i obradu uzorka potrebno što više skratiti i pojednostavniti. Zbog važnosti direktnog mjerenja mekih čestica u njihovom prirodnom okruženju, npr. u morima i oceanima, postoji potreba za izradom uređaja za *in situ* mjerenja. U okviru bilateralne suradnje sa Republikom Francuskom konstruiran je prototip takvog sistema.

Svjesni činjenice da živa spada u grupu zagađivača okoliša ispitivali smo mogućnosti zamjene živine elektrode kao senzora sa krutim elektrodama ili živinim film elektrodama. Ispitivane su stanice *Dunaliella tertiolecta* suspendirane u 0,1M NaCl.

Isprobane su slijedeće krute elektrode:

- interdigitalizirana zlatna elektroda
- staklasta ugljikova elektroda (d = 2 mm)
- grafitna elektroda specijalne izrade: prah staklastog ugljika u poliakrilatnoj smoli. Takva elektroda ima veliku specifičnu površinu jer se sastoji od velikog broja jednoličnih zrnaca ugljika promjera 1 μm .

Nažalost niti jedna elektroda nije dala pozitivan rezultat tj. u širokom rasponu potencijala u kojem su testirane elektrode nije zabilježen niti jedan adhezijski signal.

Dalje su ispitane elektrode prevučene filmom žive. Upotrijebljene su dvije elektrode kao baza (podloga) za film žive:

- grafitna elektroda
- srebrna elektroda – srebrni štapić promjera 2 mm omotan teflonskom cjevčicom

U oba slučaja snimljeni su adhezijski signali, ali je vrlo brzo dolazilo do blokiranja površine elektrode. Regeneracija te površine predstavlja problem jer svaki put zahtijeva vađenje elektrode, čišćenje i nanošenje novog sloja filma žive.

Iz ovih eksperimenata postalo je jasno da je za efikasna i kontinuirana mjerenja neophodno koristiti živinu kap elektrodu. U želji da se utrošak žive smanji na minimum slijedeći logičan korak je bio isprobavanje čišćenja površine živine kap elektrode primjenom pulseva negativnog ili pozitivnog potencijala u odnosu na radni potencijal.

U eksperimentima je kao radna elektroda korištena viseća živina kap elektroda, a primjenjeni radni potencijal u trajanju od 2 do 6 sekundi iznosio je -400mV. Isprobani su slijedeći potencijali "čišćenja":

- 0 mV, -30 mV i -50 mV na pozitivno nabijenoj strani živine elektrode
- -1000 mV, -1100 mV, -1500 mV na negativnoj strani

sa pulsevima različitog trajanja od 1 ms do 6 sekundi koristeći Nanotracer.

Čišćenje na vrlo negativnom potencijalu (-1400 mV) pokazalo se nešto efikasnije od čišćenja na ostalim potencijalima, u smislu da su skokom na -400 mV nakon -1400 mV dobivena 1-2 signala, ali je elektroda unutar par sekundi bila opet blokirana. Mješanje otopine uz pomoć magnetske mješalice ili dotokom zraka nije poboljšalo proces čišćenja.

Ovi eksperimenti su pokazali da je atomski glatka i fluidna površina živine kap elektrode kao i jednostavnost stvaranja uvijek čiste nove površine jednostavnim otkidanjem kapi nezamjenjiva u procesu praćenja adhezijskih signala mekih čestica. Potrebno je bilo osmisliti novu konstrukciju živine kap elektrode unutar samog uređaja za *in situ* mjerenja koja će zadovoljavati i ekološke uvjete mjerenja u moru. Iz tih razloga jasno je da konstrukcija uređaja mora biti takva da se ne dozvoli mogućnost ispuštanja žive u okoliš; drugo, elektroda mora biti takva da se potrošnja žive za određenu seriju mjerenja svede na minimum; i treće, vibracije iz okoline moraju biti pod kontrolom.

Prototip sistema za *in situ* mjerenja sastoji se od senzorskog tijela – živine sesilne elektrode, potenciostata, dva spremnika volumena 20 mL za čistu i otpadnu živu i dvije peristaltičke pumpe za pumpanje uzorka i žive koji su svi zajedno smješteni u odgovarajuće vodonepropusno kućište. Kućište je kabelom povezano sa uređajem za prihvrat i pohranu podataka.

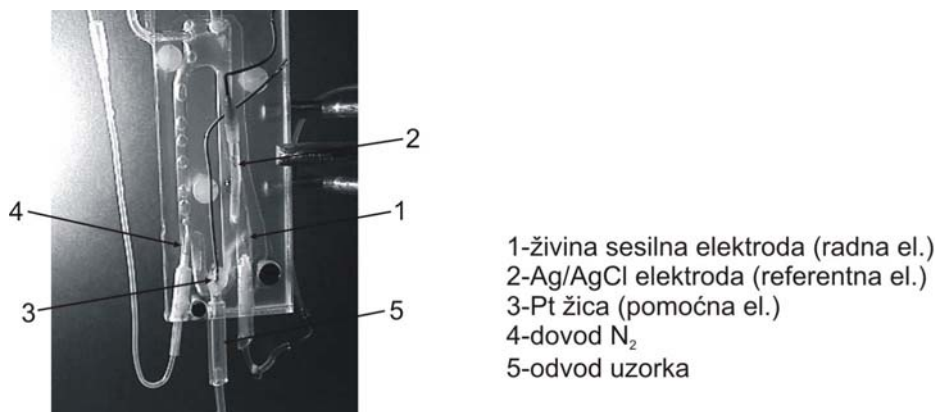


Slika 34. Živina sesilna elektroda.

Sesilna živina kap (slika 34) umjesto viseće nametnula se kao logično rješenje, jer bi i najmanja vibracija u okolini dovela do otkidanja viseće kapi čime bi se onemogućio neometan tijek i praćenje mjerenja. Smanjenje utroška žive tijekom mjerenja postignuto je upotrebom peristaltičke pumpe za dovod žive. Pumpa neprekidno dovodi živu u kapilaru čime se ostvaruje kontinuiran rast živine sesilne kapi, a to znači stvaranje čiste nove površine, ali na prethodno formiranoj kapi.

Na peristaltičkoj pumpi moguće je regulirati brzinu dotoka žive, te tako ostvariti sporiji ili brži rast živine kapi. Sporiji rast znači i duže trajanje života kapi, dok brži rast kraće trajanje (pri maksimalnoj brzini dotoka žive trajanje kapi na -400 mV iznosi 4,90 s) što može koristiti npr. u uvjetima povećane koncentracije organske tvari u moru koja blokira elektrodu. Bitno je naglasiti da se dovod žive jednostavno zaustavlja pritiskom na tipku koja kontrolira rad peristaltičke pumpe.

Slika 35 prikazuje elektrokemijsku ćeliju veličine 10×4 cm koje se sastoji od dvije pločice izrađene od pleksiglasa debljine 0,5 cm u kojima su zrcalno ubrušeni utori koji služe za prolaz uzorka za analizu.

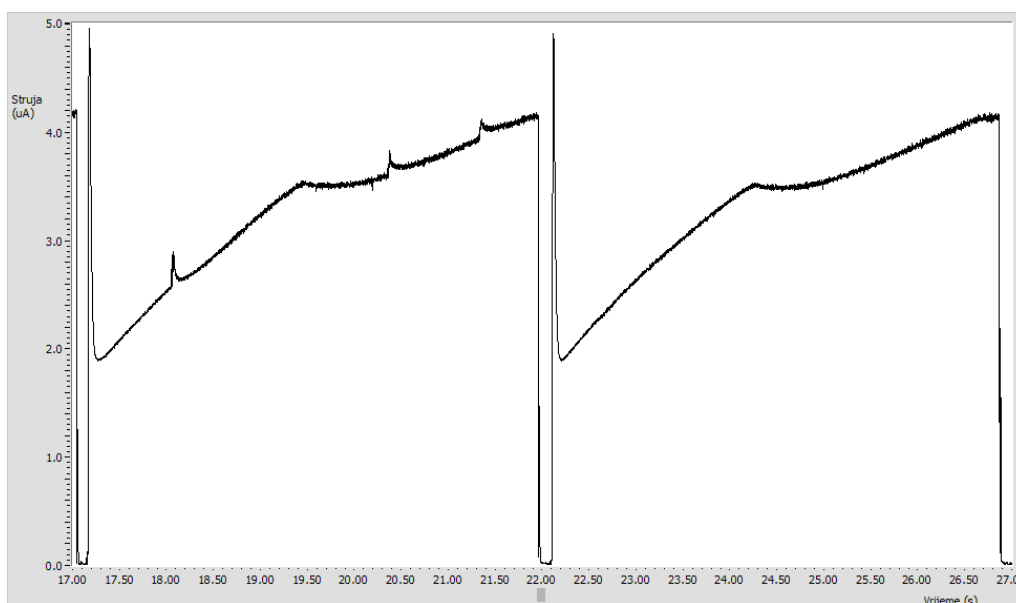


Slika 35. Elektrokemijska ćelija od pleksiglasa sa učvršćenim elektrodama.

Pločice su međusobno spojene teflonskim vijcima. Na tijelu se nalaze otvori u kojima su učvršćene teflonske cjevčice za dovod i odvod uzorka, dovod dušika prema potrebi, te tri elektrode:

1. radna elektroda: živina sesilna elektroda kontinuiranog rasta
2. referenta elektroda: Ag/AgCl/KCl_{zas}
3. protuelektroda: platinska žica

U laboratoriju smo ispitali mogućnost mjerenja adhezijskih odziva na sesilnoj živinoj kap elektrodi. Suspenzija stanica *Dunaliella tertiolecta* gustoće 10^7 L^{-1} u 0,1M NaCl sa dodatkom 0,5 M NaHCO_3 stavljena je u čašu volumena 250 mL, te je u nju uronjena cjevčica za dovod uzorka. Upaljena je pumpa za dovod uzorka i kada je uzorak ispunio elektrokemijsku ćeliju dovod je prekinut kako bi se eliminirale vibracije od prolaza uzorka kroz ispitivanu suspenziju. Zatim je upaljena peristaltička pumpa za dovod žive koja je bila namještena na maksimalni broj okretaja. Potencijal snimanja bio je -400 mV . Slika 36 prikazuje dvije uzastopne kapi; na prvoj su vidljiva tri adhezijska signala stanica superponirana na krivulji osnovnog elektrolita, a na drugoj su signali adhezije izostali, te je tako ponovno pokazana stohastička priroda procesa.

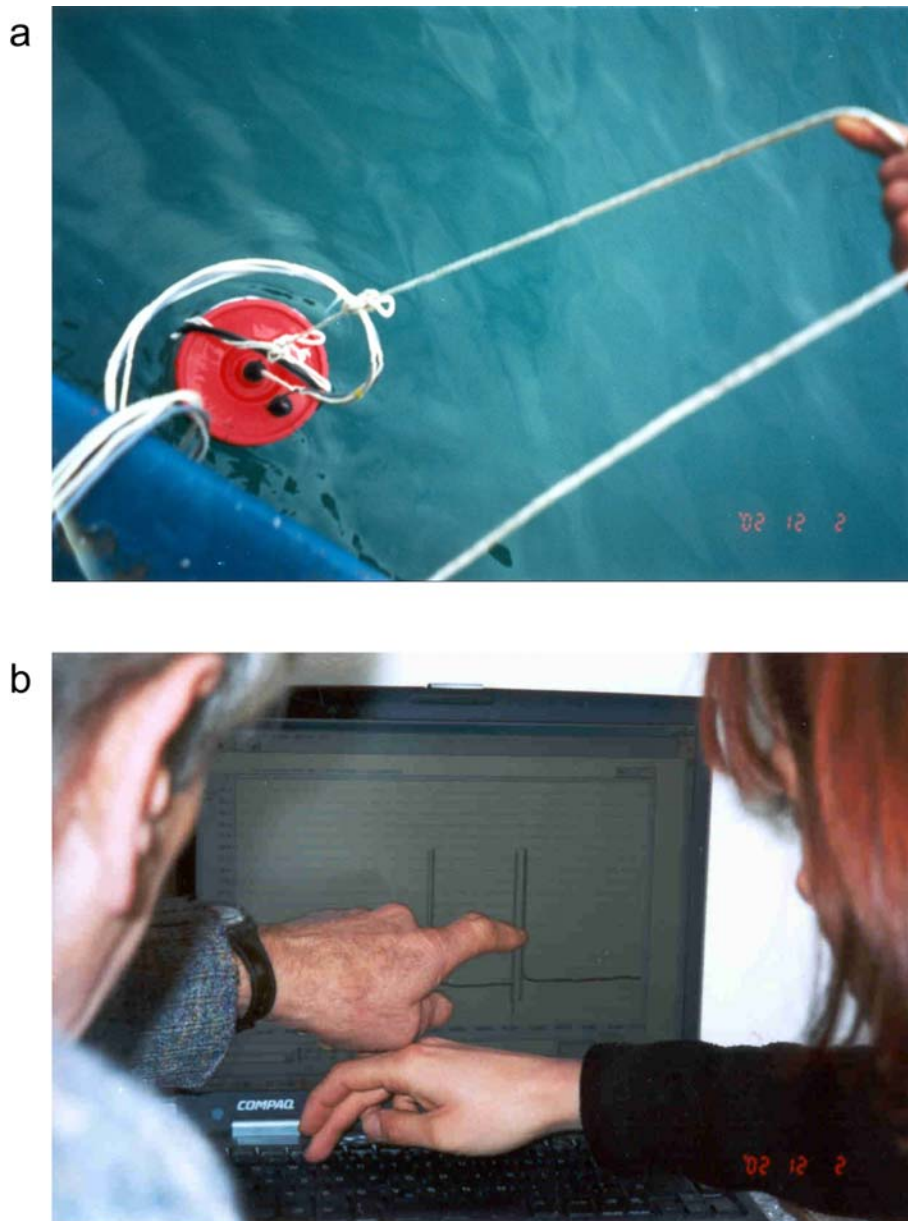


Slika 36. Originalni zapis kronoamperometrijskih krivulja snimljenih u suspenziji stanica *Dunaliella tertiolecta* u 0,1M NaCl na sesilnoj živinoj kap elektrodi. Trajanje života živine kapi na potencijalu -400 mV iznosi 4,9 s.

Dobivene kronoamperometrijske krivulje pokazuju idealnu ponovljivost svake živine kapi. Oblik i trajanje svake I-t krivulje je jednak ($t = 4,9 \text{ s}$). Primjećuje se "grba" koja se pojavljuje oko sredine trajanja života kapi; kako tijekom eksperimenta nije radila peristaltička pumpa za dovod uzorka, ovaj "otisak" je vjerojatno posljedica rada peristaltičke pumpe za dovod žive. Pad struje na nulu u trajanju od 100 ms dešava se nakon spontanog otkidanja svake kapi i prethodi formiranju nove. Nakon otkidanja kapi nivo žive u kapilari se nakratko spusti čime se izazove gubitak kontakta. Adhezijski signali stanica algi imaju očekivan oblik, smjer i visinu struje.

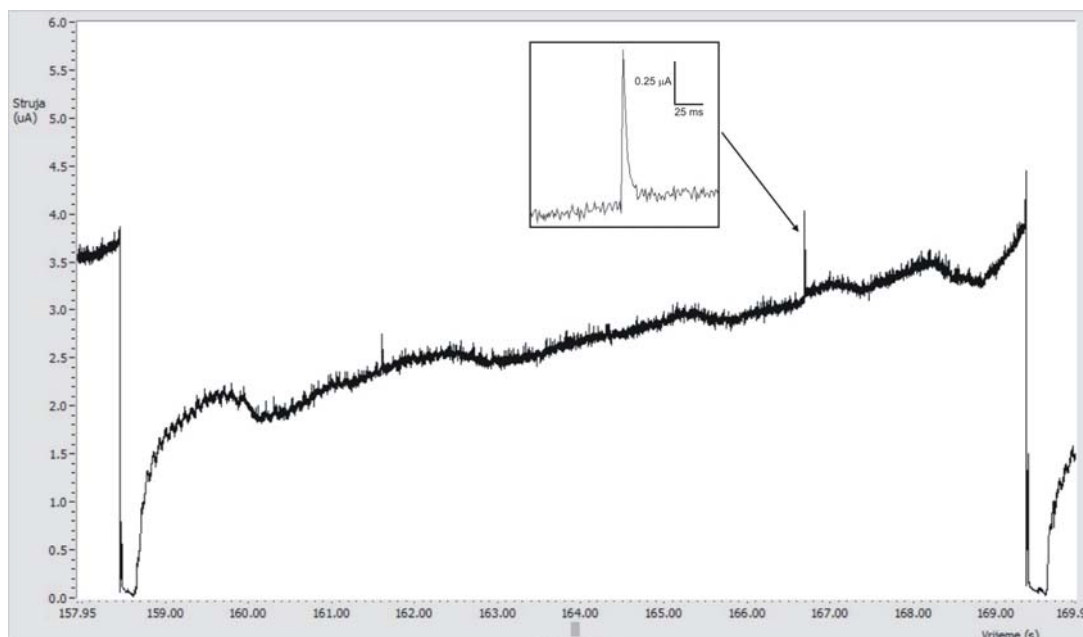
Glavna svrha ovog projekta bila je pokazati da postoji mogućnost za izradu uređaja za *in*

situ mjerenja u akvatičkom okolišu, te je stoga rad ovog prototipa testiran direktnim uranjanjem u more sa palube istraživačkog broda "Vila Velebita" na dubinu 0,5 m (slika 37) u neposrednoj blizini Rovinja.



Slika 37. Testiranje uređaja za *in situ* mjerenje u blizini Rovinja 2.12.2002. godine direktnim uranjanjem u more sa palube istraživačkog broda "Vila Velebita" (a). Prvi strujni odzivi praćeni su sa palube broda (b).

Na slici 38 prikazana je kronoamperometrijska krivulja jedne živine kapi u trajanju od približno 11 sekundi na kojoj je superponiran jedan signal površinski aktivne mikročestice koji su snimljeni tijekom eksperimenta u Rovinju.



Slika 38. Kronoamperometrijska krivulja snimljena na živoj sesilnoj elektrodi na potencijalu od -400 mV. Na krivulji osnovne struje vidljive su nepravilnosti koje su nastale zbog upotrebe peristaltičke pumpe koja pokreće dotok žive u već formiranu kap, ali i zbog vibracija iz okoline.

U daljnjem razvoju uređaja potrebno je prvenstveno ukloniti smetnje iz okoline jer njih nije moguće kontrolirati. To se može postići upotrebom težeg kućišta za instrument kako bi se izbjegla pomicanja uređaja usljed gibanja morske vode. Nažalost, projekt nije dalje financiran te daljnja poboljšanja uređaja za *in situ* mjerenja nisu rađena.

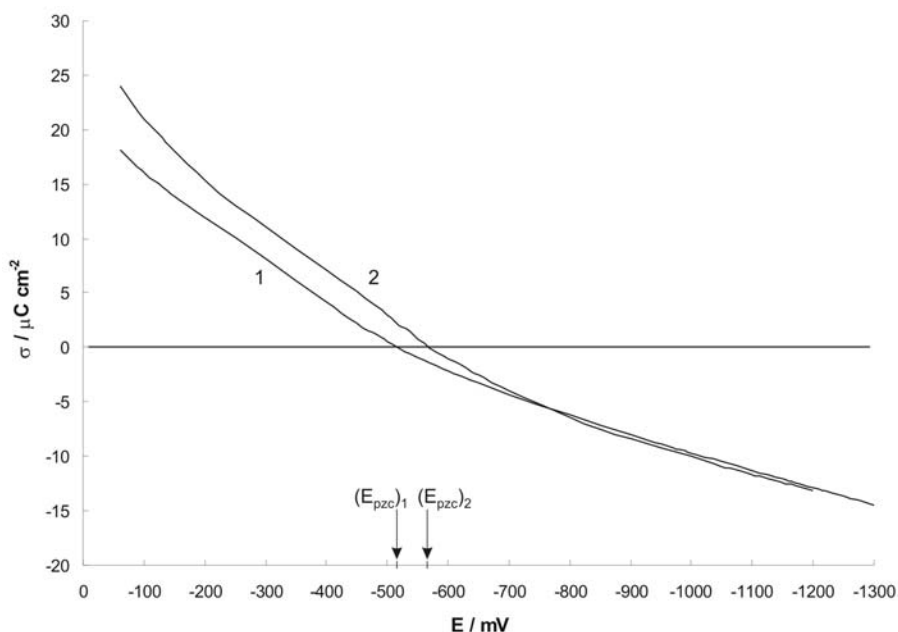
4.3 PRIMJENA SENZORA ZA KARAKTERIZACIJU ČESTICA

4.3.1 Određivanje gustoće naboja stanice fitoplanktona

Statička živina elektroda iskorištena je za mjerenje potiskivanja površinskog naboja živine elektrode koje je uzrokovano adhezijom pojedinačnih deformabilnih čestica i živih stanica.⁹⁷ Pokazano je da se površinski naboj živih stanica koje imaju jako izraženo gibanje može odrediti direktno iz ovisnosti adhezijskih signala o potencijalu oko potencijala nultog naboja živine elektrode za dati elektrolit. Jedini uvjet je točno poznavanje površinskog naboja elektrode oko potencijala nultog naboja. Živina elektroda atomski je glatka podloga čija se površinska svojstva mogu lako podešavati primjenom određenog potencijala. Elektrokemijska tehnika amperometrije nudi alternativni pristup mjerenju elektrostatskih i hidrofobnih međupovršinskih svojstava bioloških čestica u vodenom okolišu za široke raspone koncentracija elektrolitnih otopina.

Jednostanična morska alga *Dunaliella tertiolecta* pogodna je za elektrokemijsku detekciju zbog svoje veličine, membranskih svojstava i eurihaline prirode. Elektronske mikrofografije^{30,98} pokazale su da stanična ovojnica ima strukturu monosloja čija je debljina procijenjena na 90 Å i do sada je analizirana na proteine, lipide i nukleinske kiseline. Pored drugih komponenata koje nose grupe negativnog naboja pronađen je suvišak aminokiselina.⁹⁸ U literaturi ne postoje podaci o gustoći površinskog naboja stanica fitoplanktona iako su njihova međupovršinska svojstva izuzetno važna u fenomenu agregacije u morskom okolišu.⁹⁹

Proučavani su elektrokemijski odzivi na statičkoj živinoj kap elektrodi u suspenziji stanica na pozitivnoj i negativnoj strani od točke nultog naboja elektrode ($E_{pzc} = -518$ mV u 0,1 M NaCl i $E_{pzc} = -568$ mV u 1 M NaCl otopinama) u rasponu potencijala od -50 do -1400 mV. Odgovarajući raspon gustoća naboja kreće se od +18,8 do -16,0 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ za 0,1M NaCl, te od +24,8 do -16,4 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ za 1 M NaCl (slika 39).

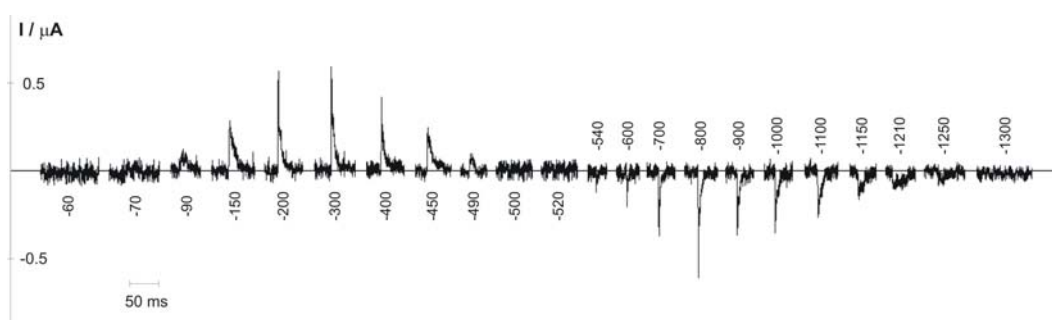


Slika 39. Površinska gustoća naboja živine elektrode kao funkcija primjenjenog potencijala (E vs. Ag/AgCl/0.1M NaCl) u vodenim otopinama 0,1M NaCl (krivulja 1) i 1 M NaCl-u (krivulja 2) pri 25 °C. Graf nacrtan prema podacima iz literature.^{100,101}

Optimalna gustoća stanica za snimanje i analizu pojedinačnih adhezijskih signala uzimajući u obzir učestalost njihovog pojavljivanja za vrijeme trajanja života živine kapi je $2-4 \times 10^7$ stanica L^{-1} , ovisno o rasponu potencijala koji se promatra. Raspon potencijala oko E_{pzc} proučavan je mijenjanjem potencijala za 1 mV ($30 \text{ nC}/\text{cm}^2$). Za svaki potencijal izmjeren je amperometrijski odziv adhezije jedne stanice u realnom vremenu od početnog priranja

do konačnog stupnja širenja stanice na živinoj elektrodi.

Elektrokemijska procedura je prilično jednostavna: snima se struja u vremenskom intervalu pri konstantnom potencijalu. Kako se trajanje električnih signala adhezije stanica bilježi u milisekundnom području, a adhezijski signali su k tome još i slučajni neophodno je bilo snimiti amperometrijske krivulje tijekom 30 života živinih kapi (svaka kap u trajanju od 5 s). Adhezijski signali imaju oblik šiljka i mogu se definirati visinom struje vrha koja se mjeri u stotinama nanoampera, milisekundnim trajanjem signala i potisnutim nabojem u području nanokulona.



Slika 40. Adhezijski signali stanica *D. tertiolecta* snimljeni u cijelom području potencijala pojavljivanja u 0,1 M NaCl. Neposredno prije elektrokemijskog mjerenja iz suspenzija stanica koje su sadržavale 2×10^4 ili 4×10^4 stanica/mL je uklonjen kisik. Brojevi pored signala označavaju potencijale u mV.

Odabir stvarnih adhezijskih signala u cijelom području potencijala pojavljivanja snimljenih u 0,1M NaCl prikazan je na slici 40. Jasno se uočava da signali pokazuju kompleksnu ovisnost o primjenjenom potencijalu. Kako bi se mogla opisati promjena signala unutar širokog raspona potencijala, potrebno je prvo definirati karakteristične potencijale počevši sa rubnim potencijalima pojavljivanja signala na pozitivno nabijenoj elektrodi kao $E_L^+ = -60$ mV, te $E_L^- = -1300$ mV na negativno nabijenoj elektrodi. Na pozitivno nabijenoj elektrodi ukupna struja potiskivanja ima isti smjer kao i struja redukcije, a na negativno nabijenoj elektrodi smjer struje je obrnut i istog je smjera kao struja oksidacije. Nešto prije promjene smjera struje u točki nultog naboja, postoji područje potencijala u kojem se ne pojavljuje struja potiskivanja; adhezijski signali izostaju i $q_D = 0$. Pozitivni kraj ovog područja definiran je kao potencijal kompenzacije gustoće naboja, E_C , pri kojem je gustoća naboja stanice, σ_{cell} , kompenzirana sa gustoćom naboja elektrode, σ_C :

$$-\sigma_C = \sigma_{\text{cell}}$$

(10)

Zbog toga nema toka kompenzacijske struje, $I_D=0$, tj. adhezijski signali se ne pojavljuju, $q_D=0$. Skeniranjem dalje po potencijalima u negativnom smjeru signali izostaju do točke nultog naboja elektrode, E_{pzc} , nakon čega se ponovno pojavljuju, ali suprotnog smjera.

Postoji fundamentalna razlika između postupnog nestajanja signala u blizini rubnih potencijala E_L^+ ili E_L^- i naglog nestanka oštih signala oko točke nultog naboja, E_{pzc} . U području rubnih potencijala gdje je površina elektrode jako nabijena (mala površinska napetost) signali slabe zbog smanjenja jakosti adhezijskih sila između stanice i elektrode. S druge strane, u točki nultog naboja (elektrokapilarni maksimum) adhezijske sile su maksimalno jake, ali nema naboja za potiskivanje sa površine elektrode. U tablici 2 prikazane su vrijednosti za σ gdje je $q_D = 0$, a to su granična područja prianjanja na pozitivno i negativno nabijenoj strani elektrode i oko točke nultog naboja.

Tablica 2. Karakteristični potencijali (E / mV vs. Ag/AgCl) i gustoće površinskih naboja (σ / $\mu\text{C cm}^{-2}$) za živinu elektrodu kada je $q_D=0$.

	granica prianjanja		kompenzacija			granica prianjanja	
	E_L^+	σ_L^+	E_C	σ_C	$E_C - E_{pzc}$	E_L^-	σ_L^-
0,1M NaCl	-60	+18.27	-500	+0.63	+18	-1300	-14.37
1M NaCl	-100	+21.00	-550	+0.75	+18	-1200	-13.15

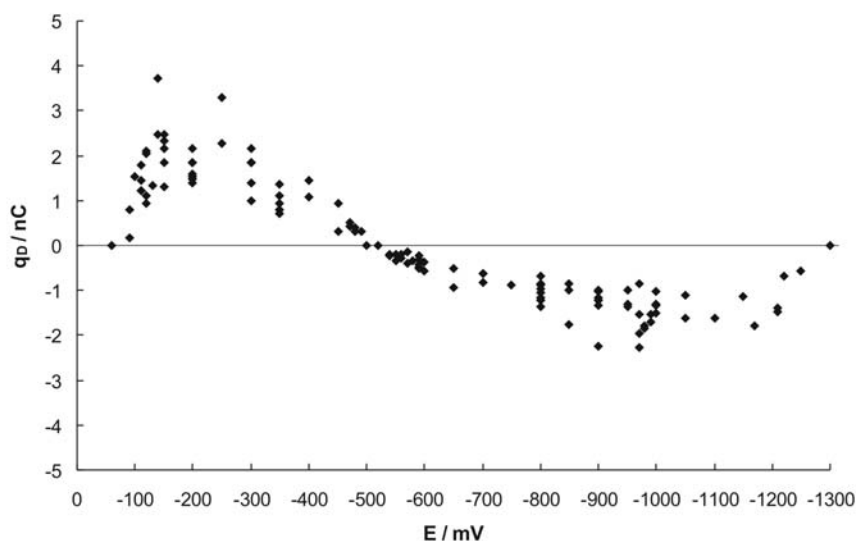
E_L^+ , (E_L^-), rubni potencijal adhezije na pozitivno (negativno) nabijenoj elektrodi

E_C , potencijal kompenzacijskog površinskog naboja elektrode

σ_C , gustoća kompenzacijskog površinskog naboja živine elektrode

σ_L^+ , (σ_L^-), rubna površinska gustoća naboja na pozitivno (negativno) nabijenoj elektrodi

E_{pzc} , potencijal nultog naboja elektrode

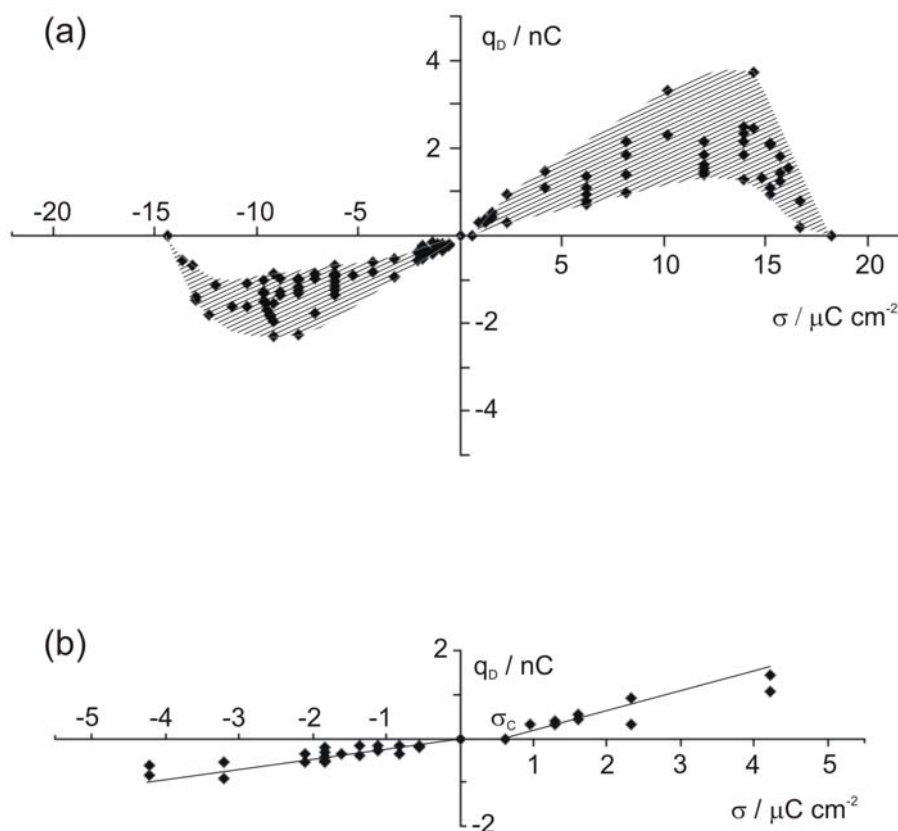


Slika 41. Vrijednosti potisnutog naboja adhezijom pojedinačne stanice, q_D , u 0,1M NaCl kao funkcija

primjenjenog potencijala.

Za svaki snimljeni signal pri konstantnom potencijalu određena je q_D vrijednost grafičkim integriranjem prema jednadžbi (5). Vrijednosti dobivene integriranjem prikazane su kao funkcija potencijala (slika 41). Rasap q_D vrijednosti pri određenom potencijalu može se pripisati distribuciji veličina stanica u kulturi, ali također i varijaciji slobodne površine elektrode koja je dostupna za adheziju i širenje stanice.

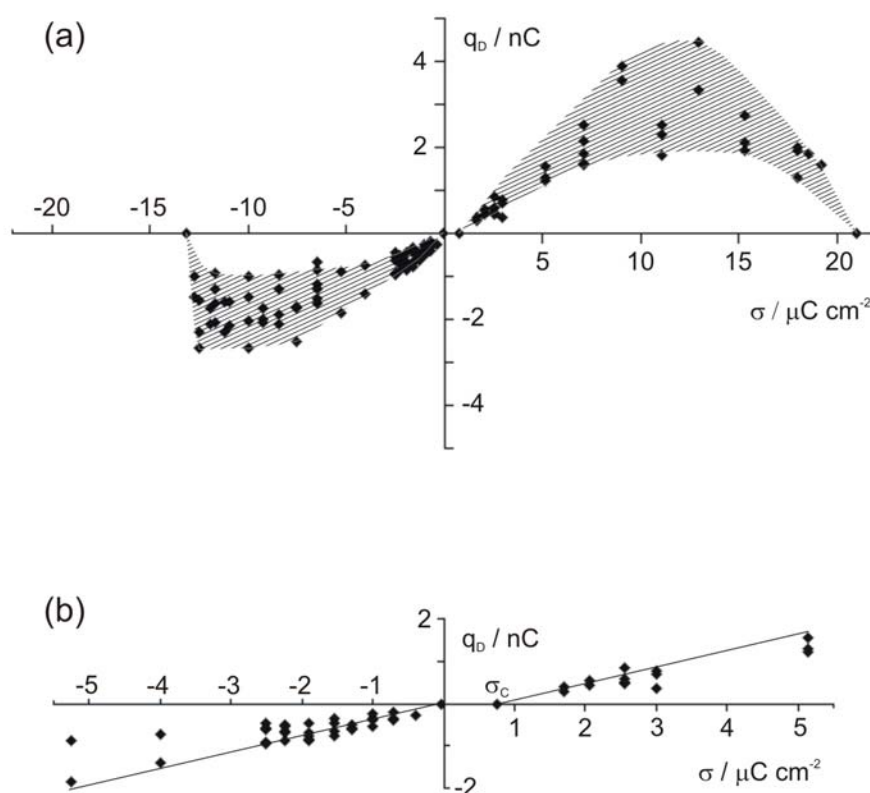
Smisleno je grafički staviti u odnos q_D vrijednosti prema odgovarajućim površinskim gustoćama naboja živine elektrode, σ (slika 42). Područje kompenzacije gustoće naboja živine elektrode (Slika 42ba) ovdje je od primarnog interesa jer omogućuje procjenu površinske gustoće naboja stanice prema (10). U otopini 0,1M NaCl-a kompenzacijski potencijal je 18 mV pozitivniji od E_{pzc} i odgovarajuća površinska gustoća naboja na elektrodi iznosi +0,63, pa je prema tome površinska gustoća naboja stanice *Dunaliella tertiolecta* -0,63 $\mu\text{C cm}^{-2}$. Dobivena vrijednost za površinsku gustoću naboja stanice fitoplanktona istog je reda veličine kao i vrijednosti bazirane na mjerenjima zeta potencijala koje se dobivene za različite tipove stanica, npr. bakterije.¹⁰²⁻¹⁰⁴



Slika 42. (a) Grafički prikaz odnosa eksperimentalno izmjerenih q_D vrijednosti iz slike 39 prema odgovarajućim σ vrijednostima u 0,1M NaCl. Zasjenjena područja ističu rasap izmjerenih q_D vrijednosti. (b) Isto kao (a) sa rastegnutom osi za σ . Pravac je provučen kroz maksimalne vrijednosti

za q_D .

Istraženi su adhezijski signali stanica *D. tertiolecta* suspendiranih i u elektrolitu veće ionske jakosti. E_{pzc} u 1 M otopini NaCl nalazi se 50 mV negativnije nego u 0,1 M NaCl (slika 36). Izmjerene vrijednosti za q_D grafički su prikazane prema odgovarajućim gustoćama površinskog naboja živine elektrode (slika 43). Kompenzacija površinskog naboja elektrode pojavljuje se 18 mV pozitivnije od E_{pzc} kao što je bio slučaj i u 0,1 M NaCl-u. Površinska gustoća naboja stanice σ_{cell} procijenjena iz σ_C u 1 M NaCl-u iznosi $-0,75 \mu\text{C cm}^{-2}$ i dosta je blizu vrijednosti $-0,63 \mu\text{C cm}^{-2}$ koja je dobivena u 0.1M NaCl-u. Usporedne vrijednosti potencijala za slučaj kada je $q_D=0$ u oba elektrolita date su u tablici 2.



Slika 43. (a) Grafički prikaz odnosa eksperimentalno izmjerenih q_D vrijednosti prema odgovarajućim σ vrijednostima u 1M NaCl. Zasjenjena područja ističu rasap izmjerenih q_D vrijednosti. (b) Isto kao (a) sa rastegnutom osi za σ . Pravac je provučen kroz maksimalne vrijednosti za q_D .

Interesantno je razmotriti mogući utjecaj negativne gustoće površinskog naboja stanice na q_D vrijednosti u cijelom području pozitivnih i negativnih površinskih gustoća naboja elektrode. Na slikama (q_D vs. σ) se jasno vidi kako u oba elektrolita stanice *D. tertiolecte* bolje prijanjaju na pozitivno nabijenoj elektrodi. Vrijednosti potisnutog naboja proporcionalno rastu sa σ sve do $\sigma = 10 \mu\text{C cm}^{-2}$. Proporcionalnost q_D sa σ također znači da je kontaktna površina razlivenih stanica, A_C konstantna (6). Daljnjim povećanjem σ preko $15 \mu\text{C cm}^{-2}$ q_D postupno pada sve do potpunog nestanka adhezijskih signala pri $\sigma_L^+ =$

18,27 $\mu\text{C cm}^{-2}$ u 0,1 M NaCl, i 21 $\mu\text{C cm}^{-2}$ u 1 M NaCl. Adhezijski signali na negativno nabijenoj elektrodi nestaju kod $\sigma_L^- = -14,37$ i $-13,15 \mu\text{C cm}^{-2}$ u 0,1 M NaCl, odnosno 1 M NaCl. Slabljenje međudjelovanja između stanica *D. tertiolecta* i nabijene elektrode pri visokim vrijednostima pozitivnih i negativnih gustoća površinskog naboja živine elektrode, kao i nepostojanje bilo kakve interakcije kad σ pređe vrijednosti σ_L , odražava djelovanje istih površinskih sila kao i u slučaju ugljikovodikovih kapljica.^{31,93} U slučaju negativno nabijenih stanica *Dunaliella tertiolecta*, postoji jasan dokaz o dodatnim elektrostatskim interakcijama: privlačenje na pozitivno nabijenoj elektrodi i odbijanje na negativnoj.

Slična ovisnost stanične adhezije o gustoći površinskog naboja elektrode uočena za crvena krvna zrnca je zapanjujuća: Godin i Caprani^{10,11} proučavali su ovisnost "efikasnosti prijanjanja" eritrocita kao funkciju gustoće površinskog naboja Pt-mikroelektrode u području od -15 do $+25 \mu\text{C cm}^{-2}$. Maksimalna efikasnost kontakta između eritrocita i elektrode primjećena je u području gustoće površinskog naboja $0 - 10 \mu\text{C cm}^{-2}$. Povećane gustoće površinskog naboja elektrode ($\sigma > 10 \mu\text{C/cm}^2$) nisu pridonijele poboljšanju kontakta između eritrocita i elektrode, već su naprotiv dovele do postupnog smanjenja efikasnosti prijanjanja.

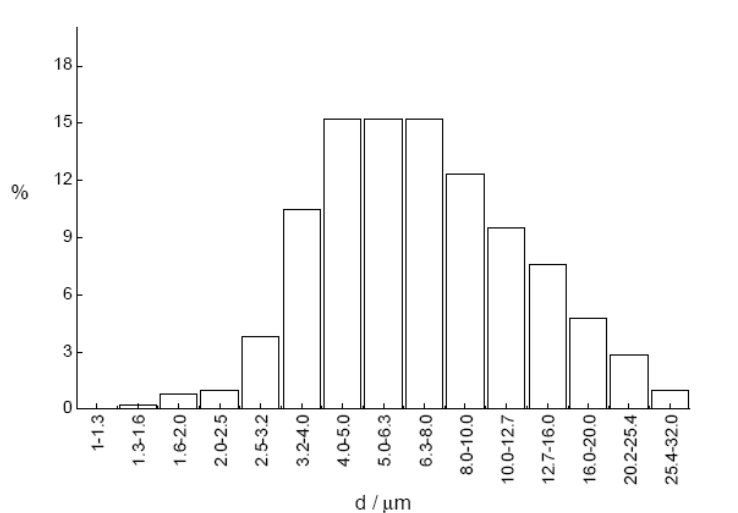
4.3.2 Adhezijski signali liposoma

Začudjujuća sličnost adhezijskih signala *Dunalielle tertiolecte*³¹ sa kapljicama tekućih ugljikovodika ($\text{C}_{12} - \text{C}_{18}$)¹⁰⁵ navodi na pomisao da kolektivna svojstva vanjske stanične ovojnice stanice upravljaju dinamikom adhezije i brzine širenja, dok fluidnost igra glavnu ulogu. Fosfolipidne vezikule, klasični modeli u proučavanju fizikalnih mehanizama stanične adhezije,^{28,29} prikladne su za buduća elektrokemijska istraživanja. Ključna stvar je potenciostatska kontrola adhezijskih sila promjenom površinskog naboja i napetosti na međupovršini elektroda/vodena suspenzija. Promjena elektrodnog potencijala otkriva važne informacije o prirodi adhezijskog procesa.

Do sada su provedena elektrokemijska istraživanja u suspenzijama liposoma na stacionarnoj živinoj elektrodi u deaeriranim otopinama. Karakterizacija monosloja na živinoj elektrodi koji nastaje nakon "adsorpcije i lizije" DOPC (1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilkolin) liposoma¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ u otopini elektrolita provedena je kapacitetnim mjerenjima, kronoamperometrijom i impedancijskom spektroskopijom. Do sada je adhezija pojedinačnih liposoma ispitana na međupovršini živina statička elektroda/vodena otopina elektrolita s namjerom da se odrede kinetički parametri interakcije između elektrode i liposoma,^{109,110} te

pokušajem karakterizacije stabilnosti membrane liposoma u prisutnosti polipeptida koji stvara pore u membrani.^{111,112} Mogućnosti *in situ* amperometrijske karakterizacije suspenzije liposoma uz istovremenu redukciju kisika ispitana je na međupovršini kapajuća živina elektrod/vodena otopina elektrolita.¹¹³

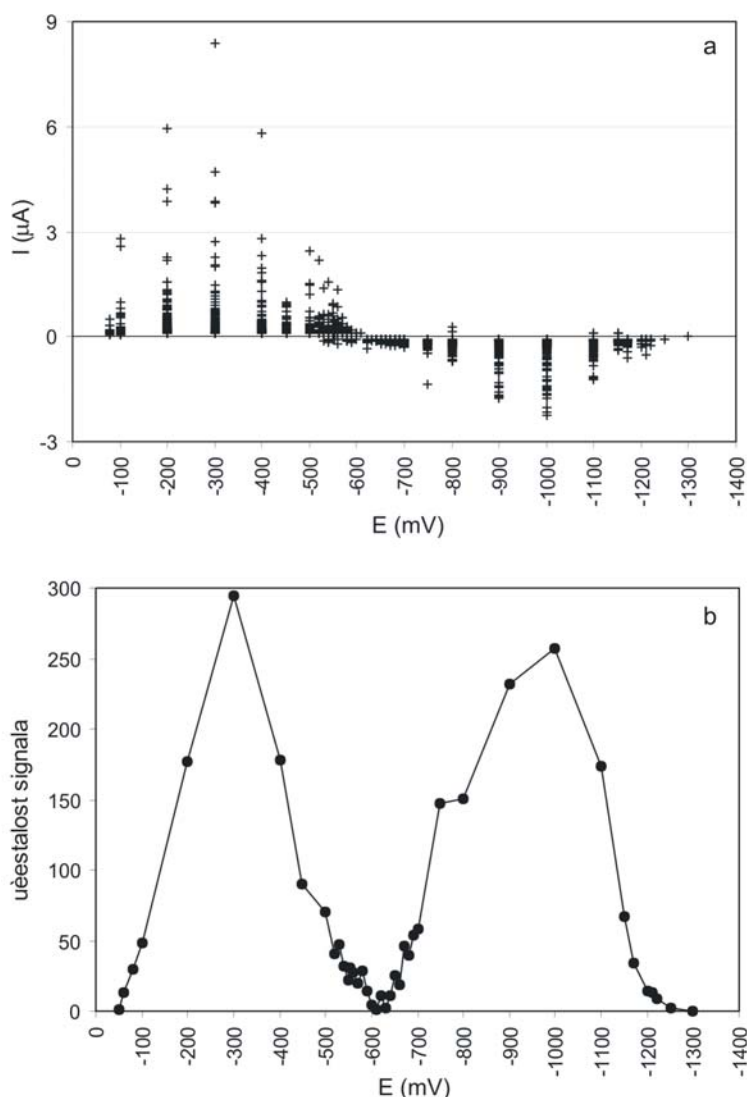
Primjena senzora za karakterizaciju čestica dalje će biti prikazana na primjeru suspenzije liposoma. Multilamelarni liposomi korišteni u ovom eksperimentu pripremljeni su metodom hidratacije tankog filma sastavljenog od fosfatidilkolina, kolesterola i diheksadecil fosfata u molarnom odnosu 7:5:1.⁷⁸ Elektrokemijski eksperiment izveden je u fiziološkoj otopini sa fosfatnim puferom (PBS), pH 7,47, pri 20°C u atmosferi dušika na statičkoj živinoj elektrodi (PAR SMDE 303A) koristeći potencioestat (PAR 174A) povezan sa računalom. Prihvat analognih podataka omogućila je kartica DAQ AI-16-XE-50. Krivulje struja-vrijeme snimane su u suspenziji liposoma gustoće $2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ tijekom 15 života kapi (svake u trajanju od 5 s) za svaki odabrani potencijal sa rezolucijom od 100 μs /točki.



Slika 44. Distribucija po veličini suspenzije liposoma ($5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$) u PBS-u dobivena mjerenjem na Coulterovom brojaču čestica.

Suspenzija liposoma okarakterizirana je Coulterovim brojačem kako bi se odredila njihova koncentracija i distribucija po veličini (slika 44). Polidisperznost suspenzije liposoma vidljiva je ne samo iz rezultata merenja Coulterovim brojačem, već i iz ovisnosti amplitude adhezijskih signala o primjenjenom potencijalu (slika 45a). Na svakom snimljenom potencijalu donja granica raspona amplituda, diktirana visinom šuma, je +0,1 ili -0,1 μA . Visine amplituda signala adhezije kreću se u granicama od +0,1 μA do +8 μA na pozitivnoj, te od -0,1 do -2,5 μA na negativnoj strani elektrode.

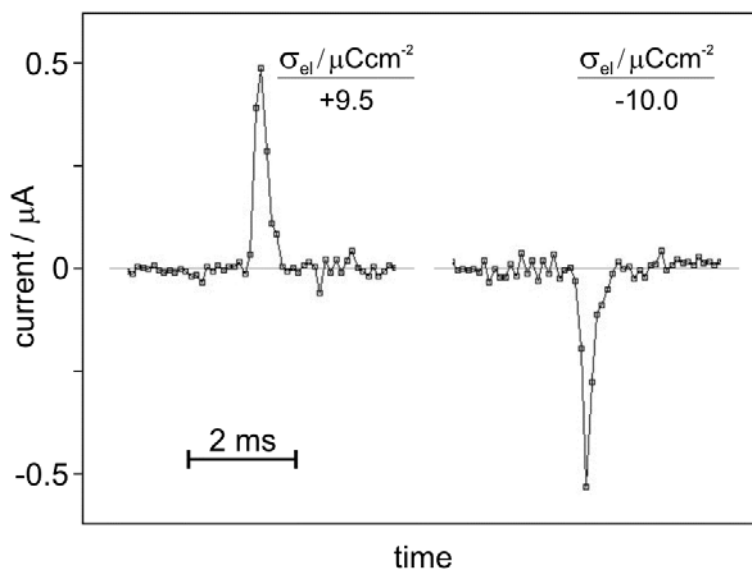
Na svakom potencijalu snimljeni su adhezijski signali na 15 živinih kapi. Ovisnost učestalosti broja signala na 15 kapi SŽE o primjenjenom potencijalu prikazana je na slici 45b. Suspenzija liposoma ispitivana je u širokom rasponu potencijala kako bi se utvrdili rubni potencijali prianjanja na pozitivno i negativno nabijenoj živinoj elektrodi. Prvi signali prianjanja na pozitivno nabijenoj strani živine elektrode zabilježeni su pri potencijalu -60 mV, a na negativnoj strani pri potencijalu od -1300 mV što je zapanjujuća sličnost sa rezultatima dobivenim u suspenziji stanica *Dunaliella tertiolecta* (tablica 2).



Slika 45. Ovisnost (a) amplitude adhezijskih signala i (b) učestalosti adhezijskih signala u suspenziji liposoma gustoće $2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ u dušiciranom PBS-u o primjenjenom potencijalu. Na svakom potencijalu snimljeno je 15 uzastopnih živinih kapi.

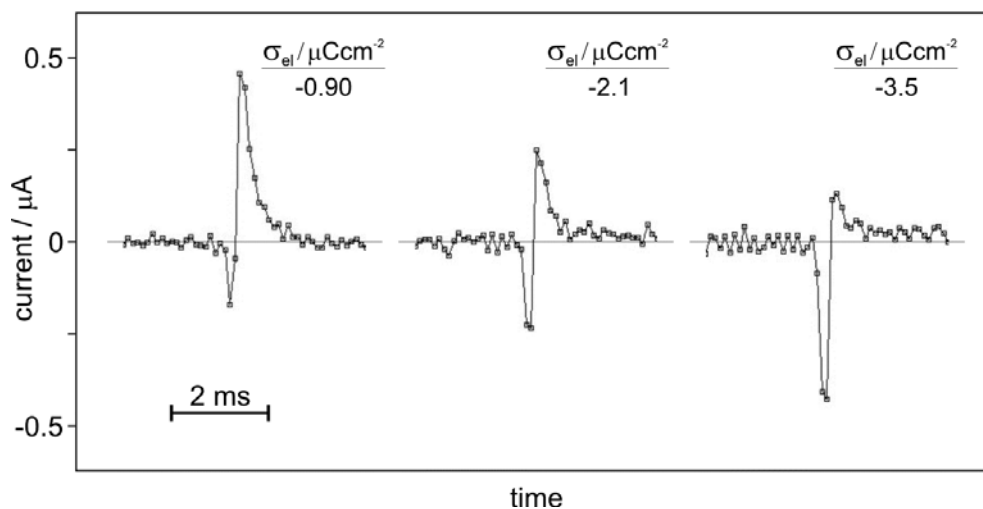
Slika 46 ilustrira oblik adhezijskih signala i smjer toka kompenzacijske struje pri velikim gustoćama naboja živine elektrode (σ_{el}), pozitivne ($\sigma_{el} = +9,5 \mu\text{C cm}^{-2}$) i negativne ($-10,0 \mu\text{C cm}^{-2}$). Na potencijalu $+300$ mV (gustoća površinskog naboja elektrode $+9,5 \mu\text{C cm}^{-2}$) smjer

struje potiskivanja naboja jednak je smjeru redukcije, dok je na negativno nabijenoj elektrodi kod potencijala -1000 mV ($-10,0 \mu\text{C cm}^{-2}$) smjer struje obrnut i istog je smjera kao struja oksidacije. Tok kompenzacijske struje odražava dinamiku stvaranja adhezijskog kontakta sa vrlo nabijenom elektrodom, te širenje do filma konačne površine.



Slika 46. Adhezijski signali pojedinačnih liposoma na statičkoj živinoj kap elektrodi za gustoće površinskog naboja $+9,5 \mu\text{C cm}^{-2}$ i $-10,0 \mu\text{C cm}^{-2}$.¹¹²

Za razliku od adhezijskih signala stanica *Dunaliella tertiolecte* koji potpuno nestaju oko E_{pzc} , u suspenzijama liposoma ne postoji područje potencijala, unutar granica rubnih potencijala prianjanja, gdje nema signala. Suspenzija liposoma detaljnije je ispitana pretragom potencijala oko potencijala nultog naboja, E_{pzc} , gdje su otkriveni karakteristični dvosmjerni adhezijski signali.



Slika 47. Dvosmjerni adhezijski signali u suspenziji liposoma snimljeni na potencijalima negativnijim od E_{pzc} , u području gustoća površinskog naboja elektrode od 0 do $-4 \mu\text{C cm}^{-2}$.¹¹²

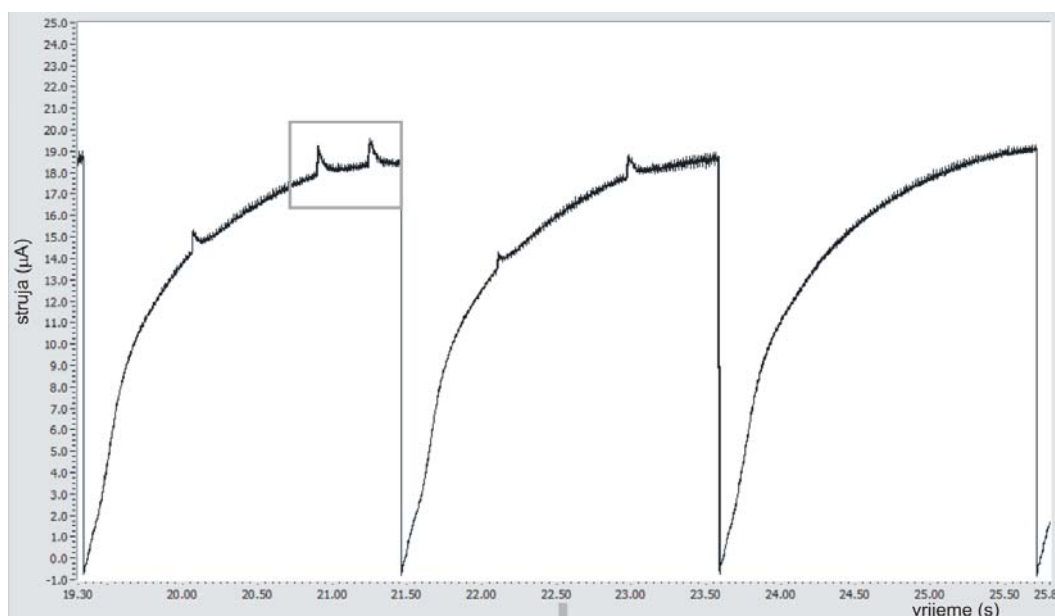
Slika 47 prikazuje takve adhezijske signale koji se pojavljuju u području gustoće površinskog naboja od 0 do $-4 \mu\text{C cm}^{-2}$. Prema našem mišljenju dvosmjerni signali potječu od specifične elektrostatske interakcije pozitivno nabijene kolinske grupe glave liposoma (slika 9) sa živinom elektrodom.

4.3.3 Adhezijski signali krvnih zrnaca

Crvena i bijela krvna zrnca razlikuju se po svom obliku, veličini i mehaničkim svojstvima membrane (deformabilnost)^{43,114} te se očekuje da će se i adhezijski signali ovih dvaju vrsta krvnih zrnaca međusobno razlikovati. Preliminarnim istraživanjima na živinim elektrodama jasno je pokazana razlika adhezijskih signala između crvenih i bijelih krvnih zrnaca.

4.3.3.1 Adhezijski signali krvnih zrnaca na KŽE

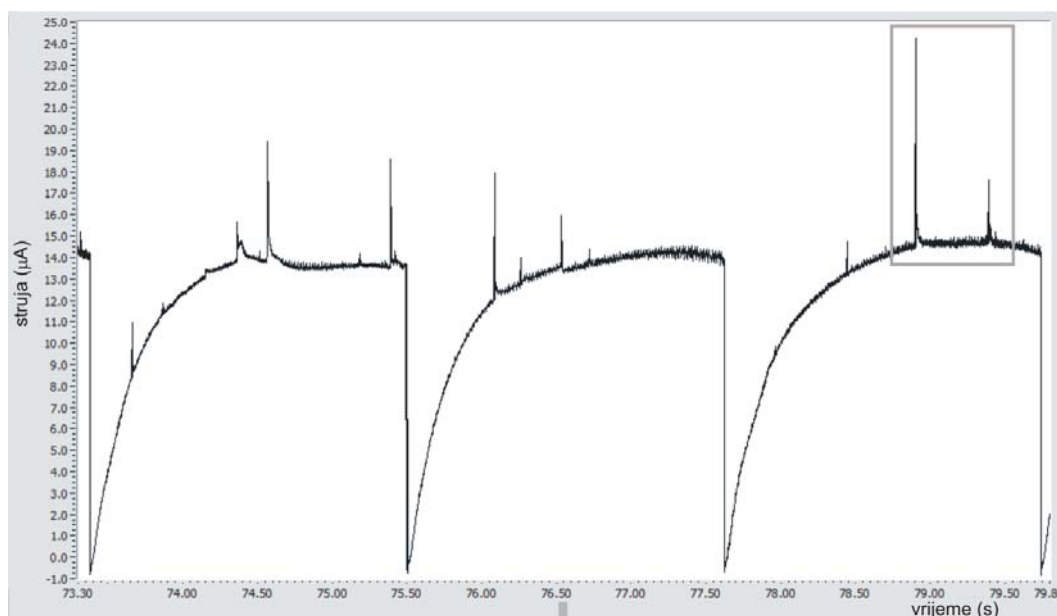
Ovdje su prikazani rezultati istraživanja provedeni sa uzorcima bijelih i crvenih krvnih zrnaca koja su izolirana iz krvi zdravog miša pri čemu je u preliminarnim eksperimentima korištena kapajuća živina elektroda.



Slika 48. Kronoamperometrijske krivulje u realnom vremenu snimljene u suspenziji crvenih krvnih zrnaca u fiziološkoj otopini sa fosfatnim puferom na kapajućoj živinoj elektrodi. Gustoća stanica u mjerenoj suspenziji bila je $7,5 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ (određeno brojanjem na hemacitometru). Uokvireni adhezijski signali eritrocita prikazani su uvećano na slici 50.

Na slici 48 su prikazane tri I-t krivulje na kojima su superponirani adhezijski signali crvenih krvnih zrnaca. Za elektrokemijska mjerenja na kapajućoj živinoj elektrodi pripravljena je suspenzija u kojoj je koncentracija crvenih krvnih zrnaca iznosila $7,5 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$. Oblici adhezijskih signala vrlo su ujednačeni obzirom na amplitudu signala i vrijeme trajanja. Amplituda signala kreće se u granicama $0,8 - 1,6 \mu\text{A}$, a trajanje signala iznosi od 70 do 100 ms.

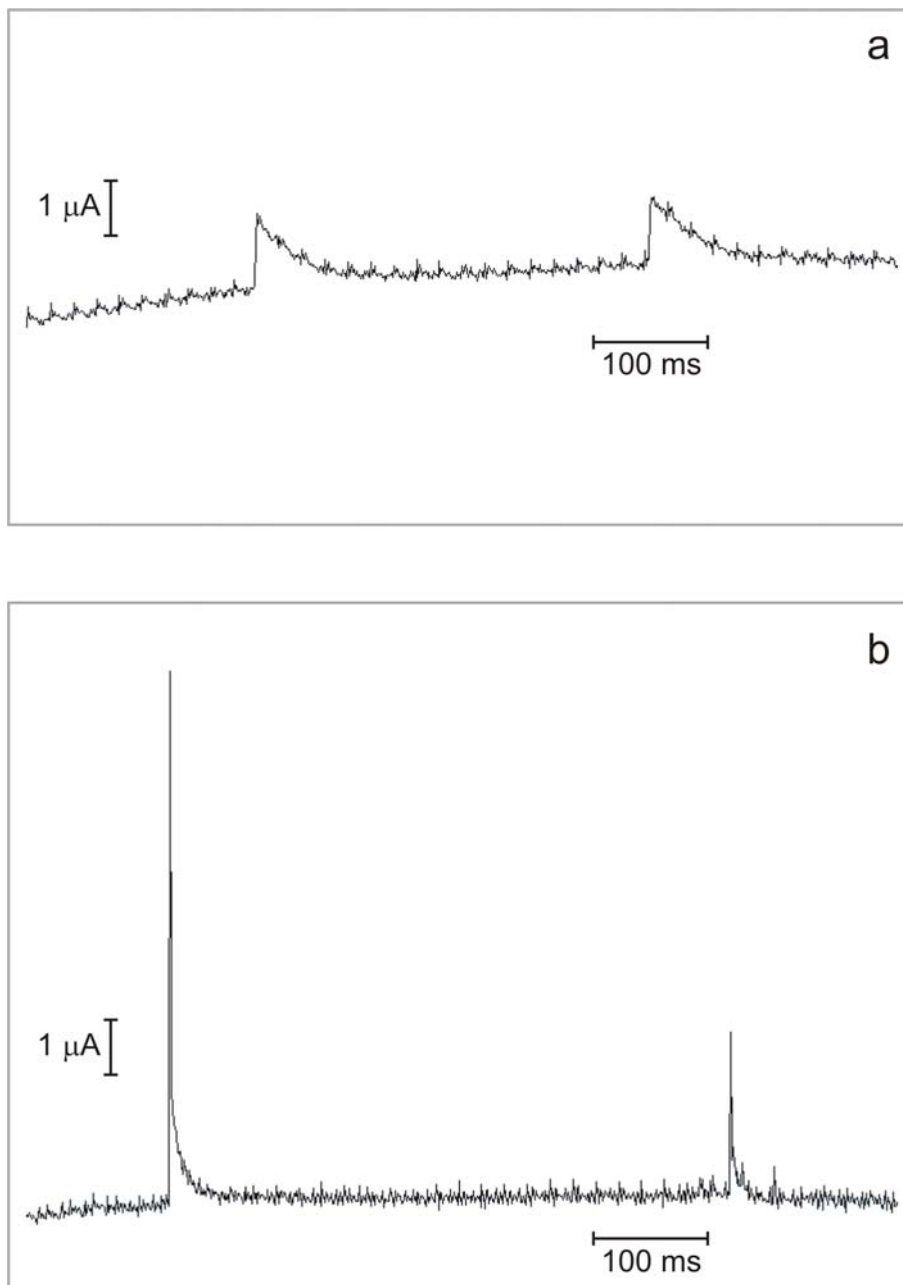
Slika 49 prikazuje tri uzastopne kronoamperometrijske krivulje snimljene na KŽE u suspenziji leukocita čija koncentracija iznosi $7,5 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$. Prvo što upada u oči je neujednačenost adhezijskih signala u smislu visine struje i trajanja pojedinačnog signala. Izmjereni raspon za visinu amplituda iznosi $0,3 \mu\text{A}$ do $10 \mu\text{A}$, a za trajanje signala od 2 ms do 70 ms što je karakteristika polidisperznog sistema (uočeno kod liposoma, slika 45a). U pravilu signali čije su amplitude veće od $5 \mu\text{A}$ imaju trajanje 50 ms i više.



Slika 49. Kronoamperometrijske krivulje u realnom vremenu snimljene u suspenziji bijelih krvnih zrnaca u fiziološkoj otopini sa fosfatnim puferom na kapajućoj živinoj elektrodi. Gustoća stanica u mjerenoj suspenziji iznosila je $7,5 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ (određeno brojanjem na hemacitometru). Adhezijski signali leukocita u crvenom okviru prikazani su uvećano na slici 50.

Usporede li se slike 48 i 49 jasno se vidi da se adhezijski odazivi bijelih krvnih zrnaca značajno razlikuju od adhezijskih signala u suspenzijama crvenih krvnih zrnaca. Adhezijski signali eritrocita ujednačeni su po visini amplitude i trajanju signala što nije slučaj za adhezijske signale leukocita. Na slici 50 prikazani su uvećani adhezijski signali crvenih i bijelih krvnih zrnaca označenih na slikama 48 i 49 kako bi se jasnije uočila ova razlika.

Ovakvo ponašanje što se raspona amplituda struje tiče ne iznenađuje kada se u obzir uzme činjenica da su u ispitivanoj suspenziji bijelih krvnih zrnaca prisutne sve vrste leukocita, a ne diferencirane vrste.



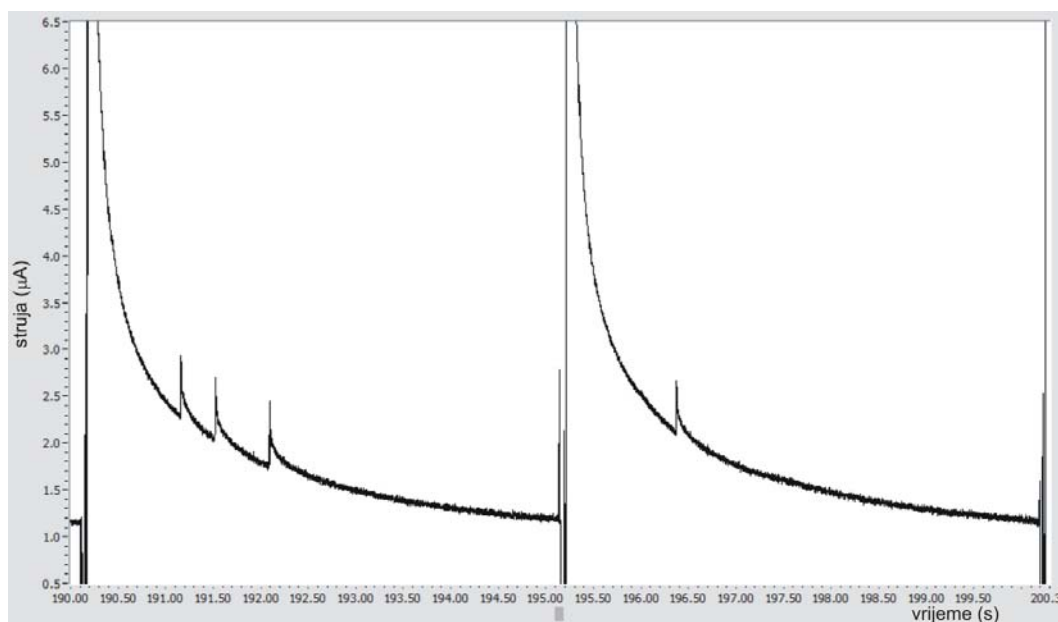
Slika 50. Uvećani prikaz adhezijskih signala: (a) crvenih krvnih zrnaca sa slike 48 i (b) bijelih krvnih zrnaca sa slike 49.

4.3.3.2 Adhezijski signali crvenih krvnih zrnaca na SŽE

Statička živina elektroda testirana je u suspenziji crvenih krvnih zrnaca gustoće $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ u fiziološkoj otopini sa fosfatnim puferom (slika 51). Na kronoamperometrijskim krivuljama

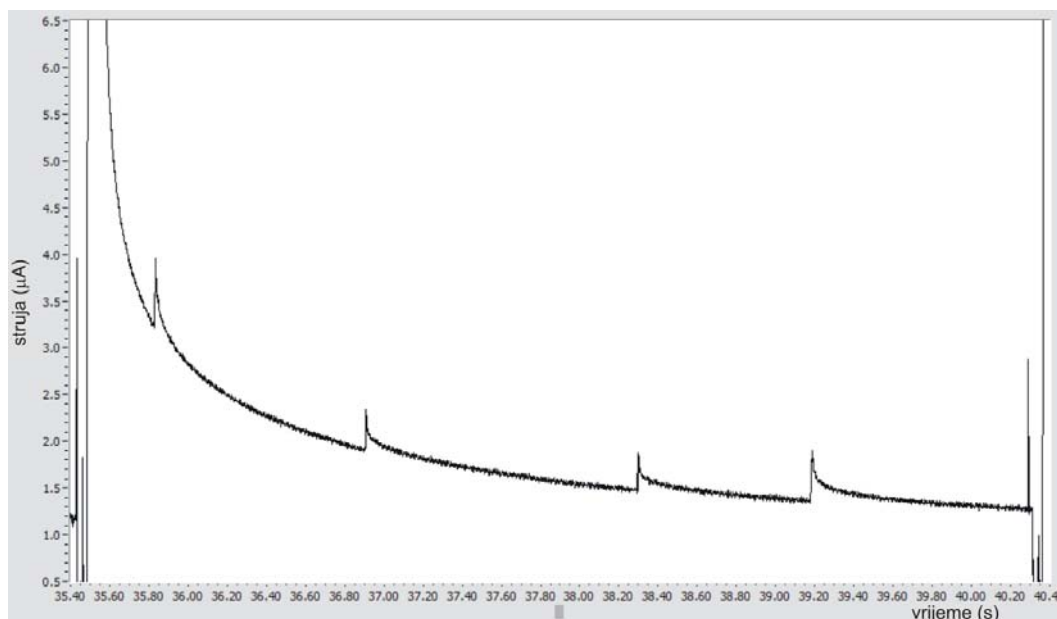
redukcije kisika superponirani su adhezijski signali eritrocita. Signali su vrlo ujednačeni obzirom na visine amplituda i trajanje signala. Raspon amplituda kreće se u granicama 0,4 – 1,0 μA , a trajanje iznosi 200-300 ms.

Interesantno je usporediti adhezijske signale eritrocita zabilježenih na kapajućoj i statičkoj živinoj elektrodi. Veće amplitude i kraća vremena trajanja adhezijskog signala na KŽE rezultat su lokalnih nestabilnosti uzrokovanih dinamikom rasta površine živine elektrode.



Slika 51. Kronoamperometrijske krivulje (originalni zapis) snimljene u suspenziji crvenih krvnih zrnaca u fiziološkoj otopini sa fosfatnim puferom na statičkoj živinoj elektrodi. Gustoća stanica u mjerenoj suspenziji bila je 10^8 L^{-1} .

Na kraju je ispitana mogućnost mjerenja adhezijskih signala krvnih zrnaca direktno u nediferenciranom uzorku krvi miša koji se neposredno prije mjerenja dodaje u fiziološku otopinu sa fosfatnim puferom (slika 52). Dobro izraženi adhezijski signali potječu od pojedinačnih stanica eritrocita, jer je njihova koncentracija za tri reda veličine veća od leukocita.



Slika 52. Kronoamperometrijske krivulje (originalni zapis) snimljene u uzorku krvi miša u fiziološkoj otopini sa fosfatnim puferom na statičkoj živinoj elektrodi. Gustoća stanica u mjerenoj suspenziji bila je 10^9 L^{-1} .

Ova preliminarna istraživanja pokazuju da se adhezijski senzor može primjeniti i u karakterizaciji krvnih zrnaca gdje svaki adhezijski signal karakterizira pojedinačno krvno zrnce uz trajni zapis.

5. ZAKLJUČCI

Provedena sustavna mjerenja nedvojbeno su dokazala primjenjivost živinih elektroda konstantne površine za detekciju i karakterizaciju najrazličitijih klasa mekih čestica veličine 1-500 μm počevši od uljnih kapljica, preko vezikula do živih stanica – bilo da se radi o jednostaničnim algama ili krvnim zrcima.

Što se liposoma i živih stanica tiče, ovaj postupak revolucionaran je u jednostavnosti, pouzdanosti i selektivnosti detekcije pojedinačnih čestica bez prethodne separacije/obrade.

Na osnovu opsežnih ispitivanja primjenom statičke živine elektrode komercijalne izvedbe konstruiran je i ispitan prototip uređaja za *in situ* mjerenje mekih čestica u moru.

Detekcija signala adhezije za ispitane klase mekih čestica upotrebom elektrokemijskog senzora, te optimizacija njegovog rada originalni je doprinos u području temeljnih istraživanja i otvara put za direktnu primjenu.

6. LITERATURA

1. V. Žutić, S. Kovač, J. Tomaić, V. Svetličić: *J. Electroanal. Chem.* **349** (1993) 173-186.
2. C. Nylander: *J. Phys. E: Sci. Instrum.* **18** (1985) 736-750.
3. A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman: *Pure and Appl. Chem.* **63** (1991) 1247-1250.
4. S. Milardović: *Razvoj i primjena novog biosenzora za mjerenje koncentracije glukoze u vodenim otopinama i neposredno u uzorcima krvnog seruma*, Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, 1996.
5. I.D. Morrison, S. Ross: *Colloidal Dispersions - Suspensions, Emulsions, and Foams*, John Wiley and Sons, New York, 2002.
6. S.E. Ruzin: *Plant Microtechnique and Microscopy*, Oxford University Press, New York, Oxford, 1999.
7. J.J. Bozzola, L.D. Russell: *Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists*, Jones and Bartlett Publishers, Boston, 1998.
8. W.H. Coulter, Means for Counting Particles Suspended in a Fluid, US, 1953.
9. D. Gingell, J.A. Fornes: *Biophys. J.* **16** (1976) 1131-1153.
10. C. Godin, A. Caprani: *Eur. Biophys. J.* **25** (1996) 25-30.
11. C. Godin, A. Caprani: *Eur. Biophys. J.* **26** (1997) 175-182.
12. Z. Galus, in P.T. Kissinger, W.R. Heineman (Eds.): *Laboratory techniques in Electroanalytical Chemistry*, Marcel Dekker Inc., New York, 1984.
13. I. Piljac: *Elektroanalitičke metode*, RMC, Zagreb, 1995.
14. J. Heyrovsky, J. Kuta: *Principles of Polarography*, Czechoslovak Academy of Science, Prag, 1965.
15. Manual for SMDE PAR 303A.
16. A.J. Bard, L.R. Faulkner: *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, John Wiley, New York, 1980.
17. N. Ivošević, J. Tomaić, V. Žutić: *Langmuir* **10** (1994) 2415-2418.
18. A.W. Adamson: *Physical Chemistry of Surfaces*, IV izd., Wiley, New York, 1982.
19. J. Israelachvili: *Intermolecular & Surface Forces*, II izd., Academic Press Ltd, London, 1991.
20. J. Lyklema, R. Parsons: *Electrical Properties of Interfaces. Compilation of Data on the Electrical Double Layer on Mercury Electrode*, Office of Standard Reference Data, National Bureau of Standards, Department of Commerce, Washington DC, 1983.
21. F.M. Fowkes: *J. Phys. Chem.* **67** (1963) 2538-2541.
22. F.M. Fowkes: *J. Phys. Chem.* **66** (1962) 382-383.
23. R.W. Pastor: *Science* **262** (1993) 223-226.
24. N. Ivošević, V. Žutić: *Langmuir* **14** (1998) 231-234.

25. N. Ivošević, V. Žutić: Effect of electrical potential on adhesion, spreading and detachment of organic droplets at an aqueous electrolyte/metal interface, in K.L. Mittal (Ed.): *Contact Angle, Wettability and Adhesion*, Brill Academic Publishers Utrecht, 2002, str. 549-561.
26. N. Ivošević: *Kvašenje i širenje organskih kapljica na nabijenoj, vodljivoj međupovršini*, Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, 1997.
27. G. Brezesinski, M. Thoma, B. Struth, H. Möhwald: *J. Phys. Chem.* **100** (1996) 3126-3130.
28. E. Evans: Mechanics of Cell Deformation and Cell-Surface Adhesion, in P. Bongrand (Ed.): *Physical Basis of Cell-Cell Adhesion*, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1988, str. 91-123.
29. U. Seifert: *Adv. Phys.* **46** (1997) 13-137.
30. V. Svetličić, N. Ivošević, S. Kovač, V. Žutić: *Bioelectrochemistry* **53** (2000) 79-86.
31. V. Svetličić, N. Ivošević, S. Kovač, V. Žutić: *Langmuir* **16** (2000) 8217-8220.
32. D. Voet, J.G. Voet: *Biochemistry*, John Wiley and Sons, New York, 1995.
33. L. Stryer: *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 1991.
34. J.G. Smith: *Organic Chemistry*, McGraw-Hill, New York, 2006.
35. G.M. Cooper: *The Cell, A Molecular Approach*, II izd., ASM Press, Sinauer Associates Inc., Washington DC, Sunderland, 2000.
36. M. Antonietti, S. Forster: *Adv. Mater.* **15** (2003) 1323-1333.
37. A.D. Bangham, J.D. Gier, G.D. Greville: *Chem. Phys. Lipids* **1** (1967) 225-246.
38. D.D. Lasić (Ed.), *Liposomes: from physics to applications*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1993.
39. B.W. Koenig, H.H. Strey, K. Gawrisch: *Biophys. J.* **73** (1997) 1954-1966.
40. D. Nath: *Nature* **438** (2005) 577.
41. S.J. Singer, G.I. Nicolson: *Science* **175** (1972) 720-731.
42. "red blood cell: blood." Online Art. Encyclopædia Britannica Online. 3 Oct 2007 <http://www.britannica.com/eb/art-88528>.
43. S. Svetina, D. Kuzman, R.E. Waugh, P. Zihnerl, B. Žekš: *Bioelectrochem.* **62** (2004) 107-113.
44. N. Gov, S.A. Safran: *J. Biol. Phys.* **31** (2005) 453-464.
45. K. Svoboda, C.F. Schmidt, D. Branton, S.M. Block: *Biophys. J.* **63** (1992) 784-793.
46. [Http://Bio.Winona.Edu/Berg/308s01/Lec-Note/Chap7.Htm](http://Bio.Winona.Edu/Berg/308s01/Lec-Note/Chap7.Htm).
47. D.E. Discher, A. Eisenberg: *Science* **297** (2002) 967-973.

48. M. Kerner, H. Hohenberg, S. Ertl, M. Reckermann, A. Spitzzy: *Nature* **422** (2003) 150-154.
49. E.D. Goldberg, M. Baker, D.L. Fox: *J. Mar. Res.* **11** (1952) 197-202.
50. R.S. Wotton: The Classification of Particulate and Dissolved Material, in R.S. Wotton (Ed.): *The Biology of Particles in Aquatic Systems*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1990, str. 2-7.
51. F. Azam: *Science* **280** (1998) 694-697.
52. V. Žutić, V. Svetličić: Interfacial Processes, in P. Wangersky (Ed.): *The Handbook of Environmental Chemistry, Part D, Marine Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 2000, str. 150-165.
53. V. Žutić, T. Pleše, J. Tomaić, T. Legović: *Molecular Crystals Liquid Crystals* **113** (1984) 131-145.
54. I. Koike, S. Hara, K. Terauchi, K. Kogure: *Nature* **345** (1990) 242-244.
55. M.L. Wells, E.D. Goldberg: *Nature* **353** (1991) 342-344.
56. A. Alldredge, U. Passow, B.E. Logan: *Deep-Sea Res. I* **40** (1993) 1131-1140.
57. R.A. Long, F. Azam: *Aquat. Microb. Ecol.* **10** (1996) 213-221.
58. W.-C. Chin, M.V. Orellana, P. Verdugo: *Nature* **391** (1998) 568-572.
59. G.G. Leppard, M.M. West, D.T. Flannigan, J. Carson, J.N.A. Lott: *Can. J. Fish. Sci.* **54** (1997) 2334-2349.
60. S. Schuster, G.J. Herndl: *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **11** (1995) 327-350.
61. J.-C. Marty, V. Žutić, R. Precali, A. Saliot, B. Čosović, N. Smodlaka, G. Cauwet: *Mar. Chem.* **26** (1988) 313-330.
62. R. Kraus: *Primjena suspenzija jednostaničnih algi u elektrokemijskoj analizi morskih čestica*, Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, 2001.
63. V. Svetličić, E. Balnois, V. Žutić, J. Chevalet, A. Hozić Zimmermann, S. Kovač, N. Vdović: *Croatica Chemica Acta* **79** (2006) 107-113.
64. A. Hozić, V. Svetličić: *Periodicum Biologorum* **106** (2004) 75-79.
65. M. Giani, A. Rinaldi, D. Degobbis: *Sci. Total Environ.* **353** (2005) 1-3.
66. D. Degobbis: *Mae Pollut Bull* **20** (1989) 452-457.
67. G. Chiaudani, G.F. Gaggino, R. Marchetti, M. Vighi, Caratteristiche trofiche delle acque costiere adriatiche, Quaderni P.F. Ambiente, promozione Qualita Ambiente AQ/2/14, 1982, p. 132.
68. D. Degobbis, R. Precali, I. Ivančić, N. Smodlaka, D. Fuks, S. Kveder: **13** (2000) 495-533.

69. M. Giani, F. Savelli, V. Berto, B. Zangrando, B. Čosović, V. Vojvodić: **353** (2005) 126-138.
70. S. Fonda-Umani, P.D. Negro, C. Larato, C.D. Vittor, M. Cabrini, M. Celio, C. Falconi, F. Tamberlich, F. Azam: *Aquat. Microb. Ecol.* **46** (2007) 163-175.
71. M. Stachowitsch, N. Fanuko, M. Richter: *P.S.Z.N.I. Mar Ecol* **11** (1990) 327-350.
72. R.A. Vollenweider, A. Rinaldi (Eds.), *Marine Mucilages, with special reference to mucilage events in the northern Adriatic Sea, the Tyrrhenian Sea and the North Sea (special issue)*, 1995.
73. V. Žutić, V. Svetličić, N. Ivošević, A. Hozić, O. Pečar: *Periodicum Biologorum* **106** (2004) 67-74.
74. V. Žutić, V. Svetličić, T. Radić, F. Malfatti, D. Degobbis, F. Azam: *Periodicum Biologorum* **106** (2004) 1-6.
75. V. Svetličić, V. Žutić, A. Hozić Zimmermann: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1048** (2005) 524-527.
76. D. Viličić: *Fitoplankton Jadranskog mora*, Školska knjiga, Zagreb, 2002.
77. R.R.L. Guillard: *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates*, Plenum Press, New York, 1975.
78. J. Tomašić, I. Hršak: *Biochim. Biophys. Acta* **716** (1982) 217-233.
79. N. Ivošević, V. Svetličić, S. Kovač, V. Žutić, R. Frkanec, J. Tomašić, Electrode double layer charge displacement by liposome adhesion, XVI th Conference of the European Colloid and Interface, Pariz, Francuska, 2002.
80. D. Degobbis: *Mar. Chem.* **29** (1990) 235-253.
81. R. Aogaki, K. Kitazawa, K. Fukai, T. Makaibo: *Electrochim. Acta* **23** (1978) 875-880.
82. T.S. Sørensen (Ed.), *Dynamics and Instability of Fluid Interfaces*. Springer-Verlag, Berlin, 1978.
83. J. Reichenbach, H. Linde: *J. Colloid Interface Sci.* **84** (1981) 433-443.
84. N. Smolaka, D. Degobbis, V. Svetličić (Eds.), *Effects of phosphorus on particle dynamics during phytoplankton blooms. Northern Adriatic mesocosm experiment Rovinj 2003.*, Zagreb, 2004.
85. R. Kraus, I. Ivančić, T. Đakovac, N. Smolaka: *Period. Biolog.* **106** (2004) 31-37.
86. N. Staats, B. De Winder, L.J. Stal, L.R. Mur: *Eur. J. Phycol.* **34** (1999) 161-169.
87. J.F.C.D. Brouwer, L.J. Stal: *J. Phycol.* **38** (2002) 464-472.
88. E. Magaletti, R. Urbani, P. Sist, C.R. Ferrari, A.M. Cicero: *Eur. J. Phycol.* **39** (2004) 133-142.
89. R. Urbani, E. Magaletti, P. Sist, A.M. Cicero: *Sci. Total Environ.* **353** (2005) 300-306.

90. S. Kovač, V. Svetličić, V. Žutić: *Colloids and Surfaces A* **149** (1999) 481-489.
91. B. Gašparović: *Karakterizacija otopljene organske tvari u morskoj vodi upotrebom o-nitrofenola kao elektrokemijske probe*, Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, 1995.
92. B. Malfoy, J.A. Reynaud: *Anal. Biochem.* **84** (1988) 1-11.
93. R. Tsekov, S. Kovač, V. Žutić: *Langmuir* **15** (1999) 5649-5653.
94. A. Hozić Zimmermann, V. Svetličić, V. Žutić, Probing polymer adsorption by cell adhesion, 29th International Conference on Solution Chemistry, Portorož, Slovenia, 2005.
95. M. Plavšić, B. Čosović: *Electroanal.* **12** (2000) 895-900.
96. V. Žutić, N. Ivošević, V. Svetličić, R.A. Long, F. Azam: *Aquatic Microbial Ecology* **17** (1999) 231-238.
97. V. Svetličić, A. Hozić: *Electrophoresis* **23** (2002) 2080-2086.
98. A. Chung-Chau Tang Jokela: *Outer Membrane of Dunaliella tertiolecta: Isolation and Properties*, University of California, 1969.
99. A.L. Alldredge, G.A. Jackson (Eds.), *Aggregation in Marine Systems*, 1995.
100. B.E. Conway: *Electrochemical Data*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1952.
101. D.C. Grahame: *Chem. Rev.* **41** (1947) 441-501.
102. D.A. Haydon: *Biochim. Biophys. Acta* **50** (1961) 450-457.
103. A.T. Poortinga, R. Bos, H.J. Busscher: *Colloids Surf. B* **20** (2001) 105-117.
104. W.W. Wilson, M.M. Wade, S.C. Holman, F.R. Champlin: *J. Microbiol. Methods* **43** (2001) 153-164.
105. N. Ivošević, V. Žutić, J. Tomaić: *Langmuir* **15** (1999) 7063-7068.
106. V. Stauffer, R. Stoodley, J.O. Agak, D. Bizzotto: *J. Electroanal. Chem.* **516** (2001) 73-82.
107. D. Bizzotto, Y. Yang, J.L. Shepherd, R. Stoodley, J. Agak, V. Stauffer, M. Lathuillière, A.S. Akhtar, E. Chung: *J. Electroanal. Chem.* **574** (2004) 167-184.
108. J.O. Agak, R. Stoodley, U. Retter, D. Bizzotto: *J. Electroanal. Chem.* **562** (2004) 135-144.
109. D. Hellberg, F. Scholz, F. Schauer, W. Weitschies: *Electrochem. Commun.* **4** (2002) 305-309.
110. D. Hellberg, F. Scholz, F. Schubert, M. Lovrić, D. Omanović, V.A. Hernández, R. Thede: *J. Phys. Chem. B* **109** (2005) 14715-14726.
111. V.A. Hernández, F. Scholz: *Langmuir* **22** (2006) 10723-10731.
112. V. Žutić, V. Svetličić, A. Hozić Zimmermann, N. Ivošević Denardis: *Langmuir* **23** (2007) 8647-8649.

113. N. Ivošević Denardis, V. Žutić, V. Svetličić, R. Frkanec, J. Tomašić: *Electroanalysis* **19** (2007) 2444-2450.
114. R. Pal: *J. Biomech.* **36** (2003) 981-989.

POPIS SIMBOLA I KRATICA

A	kontaktna površina
A_c	konačna kontaktna površina
D-500*	dekstran sulfat $\bar{M} = 500\ 000$
E	elektrodni potencijal
E'	$E - E_{pzc}$
E_c	kritični potencijal kvašenja
E_C	potencijal kompenzacijskog površinskog naboja elektrode
E_L^+	rubni potencijal adhezije na pozitivno nabijenoj elektrodi
E_L^-	rubni potencijal adhezije na negativno nabijenoj elektrodi
E_{pzc}	potencijal nultog naboja elektrode
f/2	medij korišten za uzgoj stanica <i>Dunaliella tertiolecta</i>
I_D	struja uzrokovana potiskivanjem naboja dvosloja, kompenzacijska struja
KŽE	kapajuća živina elektroda
N_D, N_0	učestalost signala u suspenziji stanica uz dodatak odnosno bez dodatka D-500*
PBS	fiziološka otopina sa fosfatnim puferom (eng. Phosphate Buffer Saline)
q_D	potisnuti naboj sa međupovršine živa/vodena otopina elektrolita
S	koeficijent širenja
SAP	površinski-aktivne čestice (eng. Surface Active Particles)
SŽE	statička živina elektroda
t	vrijeme
TEP	prozirne egzopolimerne čestice (eng. Transparent Exopolymeric Particles)
ZKE	zasićena kalomel elektroda
γ	površinska napetost
γ_{12}	površinska napetost na međupovršini živa/vodena otopina
γ_{13}	površinska napetost na međupovršini živa/nepolarna organska tekućina
γ_{23}	površinska napetost na međupovršini nepolarna organska tekućina/vodena otopina
σ_E, σ_{el}	gustoća površinskog naboja na međupovršini elektroda/vodena otopina elektrolita
σ_{cell}	gustoća naboja stanice
σ_C	gustoća kompenzacijskog površinskog naboja živine elektrode
σ_{Hg}	gustoća površinskog naboja na međupovršini živina elektroda/vodena otopina elektrolita
σ_L^+	rubna površinska gustoća naboja na pozitivno nabijenoj elektrodi
σ_L^-	rubna površinska gustoća naboja na negativno nabijenoj elektrodi
τ	vrijeme trajanja adhezijskog signala

ŽIVOTOPIS

Amela Hozić Zimmermann rođena je 26.7.1973. u Banjaluci (BIH) gdje je završila osnovnu školu i Gimnaziju. 1992. godine odmah po završetku Gimnazije, zbog izbijanja rata odlazi u London, Engleska gdje radi kao *au pair* djevojka u obitelji vodeći brigu o dvoje djece. Usavršila je engleski jezik i položila Cambridge ispite: First Certificate i Proficiency in English.

1995. godine dolazi u Hrvatsku, u Zagreb gdje živi sa roditeljima i u razdoblju od 1995. do 2001. studira na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.

Od 2001. godine radi kao znanstvena novakinja na projektima MZOŠ-a "Međupovršinski procesi i eutrofikacija" i "Površinske sile na atomskoj skali u istraživanju mora i nanotehnologiji" na Institutu "Ruđer Bošković" u Zavodu za istraživanje mora i okoliša. Na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije nastavlja školovanje na poslijediplomskom studiju Inženjerska kemija.

Dosad je objavila 3 znanstvena rada u CC časopisima i 3 znanstvena rada u časopisima sa međunarodnom recenzijom. Znanstvena usavršavanja stekla je na studijskom boravku u Parizu 2002. godine na Université Pierre et Marie Curie, Laboratoire d'Electrochimie, CNRS, međunarodnom eksperimentu 2003. u Rovinju "Rovinj 2003 - Northern Adriatic Mesocosm", te 2006. na 9. međunarodnoj ljetnoj školi biofizike. Aktivno je sudjelovala na 9 međunarodnih i domaćih konferencija.