

UNIVERZITET U BEOGRADU
MULTIDISCIPLINARNE DOKTORSKE STUDIJE

Ivanka Lj. Rodić

**ADAPTIVNI ODGOVOR GLJIVE
PHYCOMYCES BLAKESLEEANUS NA
OKSIDATIVNI STRES INDUKOVAN
SELENITOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2026

UNIVERSITY OF BELGRADE
MULTIDISCIPLINARY DOCTORAL STUDIES

Ivanka Lj. Rodić

**ADAPTIVE RESPONSE OF THE FUNGUS
PHYCOMYCES BLAKESLEEANUS TO
SELENITE-INDUCED OXIDATIVE STRESS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

Mentori:

Prof. dr Tijana Cvetić-Antić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Milan Žižić, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za multidisciplinarna istraživanja, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Članovi komisije:

Prof. dr Miroslav Živić, vanredni profesor, Katedra za opštu fiziologiju i biofiziku, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Marina Stanić, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za multidisciplinarna istraživanja, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Aleksandar Krmpot, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za fiziku, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Datum odbrane _____

Zahvalnica

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je izveden na Institutu za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu, na Odseku za nauku o živim sistemima, kao i na Institutu za Botaniku i Botaničkoj bašti „Jevremovac“ na Katedri za fiziologiju i molekularnu biologiju biljaka pri Biološkom fakultetu u Beogradu.

*Želim da izrazim najdublju zahvalnost svojim mentorima, **dr Tijani Cvetić Antić** i **dr Milanu Žižiću**, čije je vođstvo, stručnost i strpljenje bilo neprocenjivo tokom izvođenja eksperimenata, praktičnog uobličavanja rezultata, do samog pisanja teze. Hvala na savetima i smernicama koji su oblikovali ne samo ovaj rad, već i moj rast kao istraživača.*

*Veliku zahvalnost dugujem i profesoru **dr Miroslavu Živiću**, **dr Marini Stanić** i **dr Aleksandru Krmpotu**, koji su kao članovi Komisije za ocenu ovog doktorskog rada uputili preko potrebne kritike i sugestije, kao i pomoć i podršku u obradi podataka prikazanih u radu.*

*Posebnu zahvalnost dugujem svojoj **porodici** bez čije beskrajne podrške, kako emotivne tako i materijalne, danas ne bih bila ovde. Hvala **tata**, **Keko** i **Makice**!*

Adaptivni odgovor gljive *Phycomyces blakesleeanus* na oksidativni stres indukovan selenitom

Sažetak

Selen je halkogeni nemetal koji se u prirodi nalazi u više oksidacionih stanja i oblika. Elementarni selen je nerastvorljiv i slabo toksičan, dok su selen-oksianjoni, naročito selenit i selenat, visoko rastvorljivi, pokretljivi i toksični. Njihova toksičnost proizlazi iz sposobnosti selena da nespecifično zamenjuje sumpor u biomolekulama, vezujući se za sulfhidrilne grupe što remeti ključne biohemijske procese. Zbog toga su biogeohemijski putevi koji vode ka redukciji selenita u netoksični Se^0 od posebnog ekološkog i biohemijskog značaja.

Gljive čine raznoliku i brojnu grupu organizama, ali je sposobnost redukcije selenita i sinteze SeNP potvrđena kod malog broja vrsta. Razumevanje mehanizama biotransformacije selena od suštinskog je značaja za kontrolu njegove bioraspodivnosti i toksičnosti u prirodnim i biotehnološkim sistemima.

U ovoj disertaciji, kao model organizam izabrana je filamentozna gljiva *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff, koja efikasno vrši biotransformaciju selenita kroz kombinaciju biološke redukcije, volatilizacije i biosinteze nanočestica selena, pri čemu se značajan deo selena gubi u obliku isparljivih derivata, dok se ostatak usvaja u micelijum ili ostaje u medijumu. Selenit koncentracije 100 μM indukuje aktivaciju antioksidativnih enzima, naročito GPx, GST, GR i CAT, u različitim fazama izlaganja, što sugerise adaptaciju metaboličkih procesa na stres. PCA analiza pokazuje da su razvojne promene glavni izvor varijabilnosti, dok selenit specifično modulira aktivnosti antioksidativnih enzima i sistema glutationa. Biotransformacija selenita u miceliji *P. blakesleeanus* rezultira formiranjem višestrukih alotropskih oblika selena, uključujući SeNP prosečnog prečnika 57 nm, što znatno povećava njihov bioaktivni potencijal. Ramanova spektroskopija, SEM-EDS i XFM analize otkrivaju strukturnu raznolikost i lokalizaciju selena, dok XANES spektri ukazuju na redukciju selenita.

Ova multidisciplinarna analiza potvrđuje sposobnost gljive da transformiše selenit u stabilne SeNP kroz kompleksne biohemijske puteve, uz formiranje prelaznih struktura i specijacija koje zavise od mikrokruženja i oksidacionog stanja.

Ključne reči: *Phycomyces blakesleeanus*, selenit, oksidativni stres, biogene nanočestice selena, biotransformacija selena, enzimi oksidativnog stresa

Naučna oblast: Biološke nauke

Uža naučna oblast: Biofizika

Adaptive response of the fungus *Phycomyces blakesleeanus* to selenite-induced oxidative stress

Abstract

Selenium is a chalcogenous nonmetal found in nature in several oxidation states and forms. Elemental selenium is insoluble and slightly toxic, while selenium oxyanions, especially selenite and selenate, are highly soluble, mobile and toxic. Their toxicity arises from the ability of selenium to non-specifically replace sulfur in biomolecules, binding to sulfhydryl groups, which disrupts key biochemical processes. Therefore, the biogeochemical pathways that lead to the reduction of selenite into non-toxic Se^0 are of particular ecological and biochemical importance.

Fungi are a diverse and numerous group of organisms, but the ability to reduce selenite and synthesize SeNP has been confirmed in a small number of species. Understanding the mechanisms of selenium biotransformation is essential to control its bioavailability and toxicity in natural and biotechnological systems.

In this dissertation, the filamentous fungus *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff was chosen as a model organism, which efficiently biotransforms selenite through a combination of biological reduction, volatilization and biosynthesis of selenium nanoparticles, whereby a significant part of selenium is lost in the form of volatile derivatives, while the rest is absorbed into the mycelium or remains in the medium. Selenite at a concentration of 100 μM induces the activation of antioxidant enzymes, especially GPx, GST, GR and CAT, in different stages of exposure, which suggests the adaptation of metabolic processes to stress. PCA analysis shows that developmental changes are the main source of variability, while selenite specifically modulates the activities of antioxidant enzymes and the glutathione system. The biotransformation of selenite in the mycelia of *P. blakesleeanus* results in the formation of multiple allotropic forms of selenium, including SeNPs with an average diameter of 57 nm, which greatly increases their bioactive potential. Raman spectroscopy, SEM-EDS and XFM analyzes reveal the structural diversity and localization of selenium, while XANES spectra indicate selenite reduction.

This multidisciplinary analysis confirms the ability of the fungus to transform selenite into stable SeNPs through complex biochemical pathways, with the formation of transition structures and speciations that depend on the microenvironment and oxidation state.

Keywords: *Phycomyces blakesleeanus*, selenite, oxidative stress, biogenic selenium nanoparticles, selenium biotransformation, oxidative stress enzymes

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Biophysic

Lista skraćenica

- CAT** (*engl.* catalase) – katalaza
- D-EAA** (*engl.* D-Erythroascorbic Acid) - D-eritroaskorbat
- D-EAAG** (*engl.* D-Erythroascorbate monoglucoside) – D-eritroaskorbat monoglukoamid
- DLS** (*engl.* Dynamic Light Scattering) – dinamička spektroskopija rasejanja svetlosti/
metoda direktnog raspršivanja svetlosti
- DMDS_e** (*engl.* dimethyl diselenide) – dimetil diselenid (CH₃SeSeCH₃)
- DMSe** (*engl.* dimethyl selenide) – dimetil selenid (CH₃SeCH₃)
- DTNB** (*engl.* 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)) – 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoična
kiselina)/Elmanov reagens
- EDS** (*engl.* Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy) – energetski disperzivna
spektroskopija X-zračenja
- GPx** (*engl.* glutathione peroxidase) – glutation peroksidaza
- GR** (*engl.* glutathione reductase) – glutation reduktaza
- GSH** (*engl.* reduced glutathione) – redukovani glutation
- GSSG** (*engl.* oxidized glutathione) – oksidovani glutation
- GST** (*engl.* glutathione S-transferase) – glutation S-transferaza
- ICP-OES** (*engl.* Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy) –
indukovano spregnuta plazma sa optičkom emisionom spektroskopijom
- K-Pi pufer** – kalijum fosfatni pufer
- NADPH** (*engl.* nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) – nikotinamid adenin
dinukleotid fosfat
- Na-Pi pufer** – natrijum fosfatni pufer
- PCA** (*engl.* Principal Component Analysis) – Analiza glavnih komponenti
- POD** (*engl.* peroxidase) – peroksidaza
- ROS** (*engl.* Reactive Oxygen Species) – reaktivne vrste kiseonika
- SeCys** (*engl.* selenocysteine) – selenocistein
- SEM** (*engl.* Scanning Electron Microscopy) – skenirajuća elektronska mikroskopija
- SeMet** (*engl.* selenomethionine) – selenometionin
- SeNP** (*engl.* Selenium Nanoparticles) – nanočestice selena
- SOD** (*engl.* superoxide dismutase) – superoksid dismutaza
- UV VIS spektroskopija** (*engl.* Ultraviolet Visible Spectroscopy) – ultravioletna vidljiva
spektroskopija
- XANES** (*engl.* X-ray Absorption Near Edge Spectroscopy) – rendgenska apsorpciona
spektroskopija bazirana na sinhrotronskim izvorima zraka
- XRF** (*engl.* X-ray Fluorescence) – niskofrekventna rendgenska fluorescentna mikroskopija
bazirana na sinhrotronskim izvorima zraka

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1 Selen	1
1.2 Biogeochemijski ciklus i značaj selena	1
1.3 Fizičko-hemijske osobine i oblici selena	3
1.4 Bioaktivna jedinjenja selena	5
1.5 Neorganski oblici selena i njihov uticaj na žive sisteme.....	8
1.6 Biosinteza SeNP.....	9
1.7 <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	11
1.8 Stres i indukcija stanja stresa.....	13
1.9 Efekti i uloga ROS u ćelijama.....	17
1.10 Antioksidativni metabolizam gljiva.....	18
1.11 Sistem glutaciona.....	23
2. Cilj istraživanja	30
3. Materijal i metode	32
3.1. Eksperimentalni objekat.....	32
3.1.1. Uzgoj <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	32
3.1.1.1 Uzgoj micelije gljive radi proizvodnje spora.....	32
3.1.1.2. Uzgoj micelije.....	33
3.1.1.3 Natrijum selenit/selenat.....	34
3.1.1.4 Merenje biomase.....	34
3.1.1.5 Određivanje uticaja dužine tretmana selenitom na rast micelija.....	34
3.2 Biohemijska ispitivanja.....	35
3.2.1 Određivanje sadržaja proteina.....	36
3.2.2 Određivanje aktivnosti CAT.....	36
3.2.3 Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti SOD.....	38
3.2.4 Određivanje aktivnosti POD.....	38
3.2.5 Određivanje aktivnosti GPx.....	39
3.2.6 Određivanje aktivnosti GR.....	39
3.2.7 Određivanje aktivnosti GST.....	40
3.2.8 Određivanje sadržaja ukupnog i oksidovanog glutaciona.....	40
3.3 Priprema micelije za skenirajuću elektronsku mikroskopiju sa energetski disperzionom spektroskopijom X-zračenja (<i>engl.</i> Scanning Electron Microscopy - Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy - SEM-EDS).....	41
3.3.1 Metoda direktnog raspršivanja svetlosti.....	43
3.3.2 Apsorpciona rendgenska spektroskopija sinhrotronskog izvora zračenja (<i>engl.</i> X-ray Absorption Near Edge Spectroscopy - XANES) i Ramanska spektroskopija - utvrđivanje oksidacionih stanja i karakterizacija kristalnog uređenja SeNP	44

3.3.3 Rendgenska fluorescentna mikroskopija niskih energija bazirana na sinhrotronskim izvorima zraka (<i>soft XRF</i>).....	47
3.3.4 Indukovano spregnuta plazma sa optičkom emisionom spektrometrijom (ICP-OES)	49
3.4. Statistička analiza rezultata.....	51
3.5. Reagensi.....	51
4. Rezultati.....	52
4.1 Kriva rasta <i>P. blakesleeanus</i>	52
4.2 Uticaj selenita na rast micelijuma <i>P. blakesleeanus</i>	53
4.3 Sadržaj proteina.....	54
4.4 Aktivnost CAT.....	55
4.5 Aktivnost SOD.....	56
4.6 Aktivnost POD.....	57
4.7 Aktivnost GPx.....	57
4.8 Aktivnost GR.....	58
4.9 Aktivnost GST	59
4.10 Sadržaj ukupnog (GSSG+GSH) i oksidovanog glutationa (GSSG).....	60
4.11 SeNP.....	64
4.12 ICP analiza.....	77
4.13 PCA analiza.....	79
5. Diskusija.....	81
5.1 Toksičnost selenita.....	81
5.2 Sadržaj proteina.....	83
5.3 Biohemijski parametri.....	83
5.4 Usvajanje i biotransformacija selena.....	91
6. Zaključak	101
7. Literatura.....	103

1. UVOD

Gljive su široko rasprostranjene u nadzemnim i podzemnim staništima, a njihova sposobnost prilagođavanja ekstremnim uslovima životne sredine i razvoju različitih metaboličkih i morfoloških strategija rasta čini ih važnim u biogeochemijskim ciklusima elemenata i očuvanju strukture tla (Gadd, 2007). Zahvaljujući filamentoznoj prirodi i sintezi egzopolimera, gljive doprinose stabilnosti zemljišta, razgradnji organske materije i mobilizaciji hranljivih i toksičnih elemenata. One pokazuju visoku toleranciju prema metalima i metaloidima, pri čemu kontaminacija sredine često dovodi do dominacije gljiva u mikrobiološkim zajednicama (Gadd, 2007; Rosenfeld et al., 2017). Pored uloge u bioremedijaciji, pojedine vrste gljiva ostvaruju mutualističke odnose sa biljkama (mikorize), dok neke vrste imaju značaj u ishrani i tradicionalnoj medicini (Gadd, 2007).

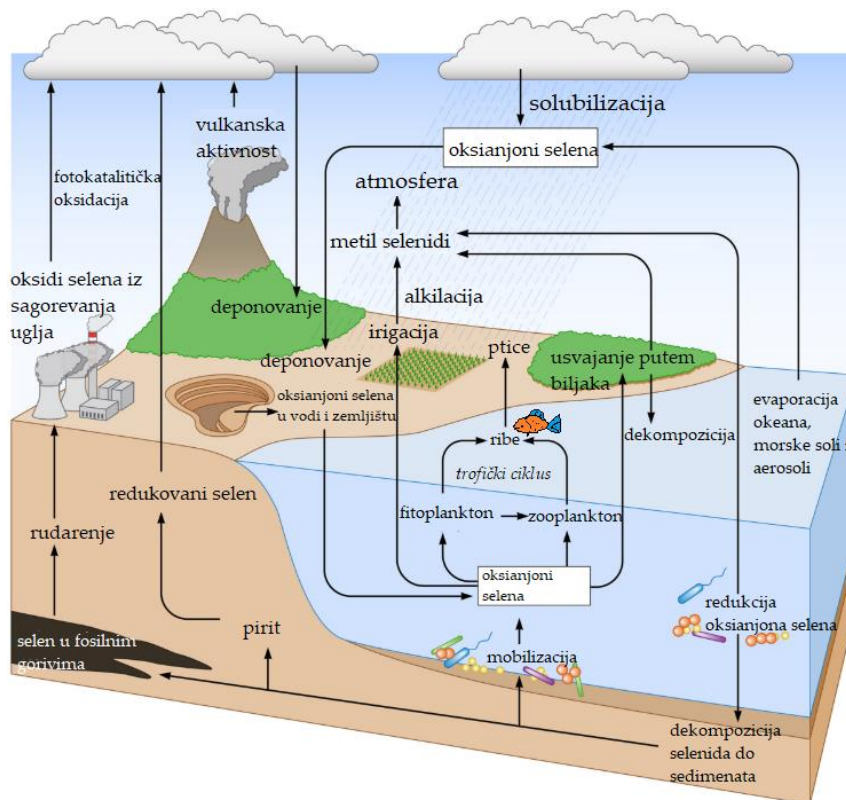
1.1 Selen

Selen je esencijalan element za mnoge organizme, od bakterija do sisara, gde učestvuje u funkcionisanju najmanje 25 selenoproteina i enzima, sa ulogama u reproduktivnom, endokrinom, kardiovaskularnom i nervnom sistemu, antioksidativnoj zaštiti, imunom odgovoru, sintezi DNK i kontroli rasta ćelija (Bébién et al., 2002; Z. Y. Li et al., 2003; L. C. Tan et al., 2016; Wadhvani et al., 2016; Adebayo et al., 2020; Vetchinkina et al., 2013; Kimura et al., 2014; Nancharaiah & Lens, 2015; El-Deeb et al., 2018). Status selena značajno utiče na imunološku funkciju i razvoj različitih patoloških stanja (Avery & Hoffmann, 2018; Bianchi et al., 2017). Iako se ne smatra esencijalnim za više biljke i gljive (Herrero & Wellinger, 2015), selen je neophodan za rast brojnih mikroorganizama, uključujući bakterije, arhee i mikroalge (Z. Y. Li et al., 2003; Araie et al., 2011; Husen & Siddiqi, 2014; Adebayo et al., 2020; Y. Tan et al., 2016; L. C. Tan et al., 2016; Butler et al., 2012; Kondaparthi et al., 2019; Oremland et al., 2004; Kimura et al., 2014). Neki eukarioti, poput *Saccharomyces cerevisiae*, izgubili su sposobnost sinteze selenoproteina, ali zadržavaju mogućnost korišćenja selenovih jedinjenja (McDermott et al., 2010). U većim koncentracijama, selen može generisati reaktivne vrste kiseonika (*engl.* Reactive Oxygen Species - ROS) i izazvati oksidativni stres (Kondaparthi et al., 2019).

1.2 Biogeochemijski ciklus i značaj selena

Biogeochemijski ciklus selena (Slika 1) obuhvata dinamičnu razmenu između oksidativnih i reduktivnih sredina, posredovanu mikroorganizmima koji vrše oksidaciju i redukciju, pri čemu nastaju različiti oblici kao što su elementarni selen (Se^0), nanočestice selena (*engl.* Selenium Nanoparticles – SeNP), selenidi i jedinjenja organoselena

(Oremland et al., 2004; Nancharaiah & Lens, 2015). U prirodi se Se^0 retko nalazi, dok se selen najčešće javlja kao selenid u sulfidnim mineralima poput piritu, halkopiritu i sfaleritu. Zbog različitih oksidacionih stanja, specijacija selena zavisi od redoks uslova sredine, što direktno utiče na njegovu rastvorljivost i biološku raspoloživost (Yee et al., 2007; Nancharaiah & Lens, 2015).



Slika 1: Globalni ciklus kruženja selena u prirodi. Najveći rezervoar selena na Zemlji su sulfidne rude, pirit i uglj sa visokim sadržajem sumpora. Geološki i antropogeni izvori oslobađaju selen u obliku SeO_4^{2-} u životnu sredinu. Usvajanje selena se vrši u obliku selenata ili selenita od strane mikroorganizama i biljaka u osnovi lanca ishrane, a zatim i od strane životinja. Selen se asimilira u organoselenide (tj. selenoproteine) kod živih organizama. Dekompozicijom organskih materija se selen oslobađa nazad u životnu sredinu. Procesu kao što su iskopavanje ruda, sagorevanje fosilnih goriva, poljoprivredna proizvodnja i vulkanske erupcije oslobađaju selen u atmosferu, zemljište i vodu u rastvorljivim oblicima (SeO_4^{2-} i SeO_3^{2-}). Mikroorganizmi igraju ključnu ulogu u kruženju jedinjenja selena u prirodi (modifikovano iz Nancharaiah & Lens, 2015).

Selen ulazi u ekosistem iz stena, sedimenta, zemljišta i vode i prenosi se kroz lanac ishrane (L. C. Tan et al., 2016; Nancharaiah & Lens, 2015). Fotosintetički organizmi ga transformišu u organske selenoforme, a heterotrofni organizmi efikasnije preuzimaju organske nego neorganske oblike (Burau, 1985). U prirodi je njegova raspodela neravnomerna (Hariharan & Dharmaraj, 2020), sa prosečnim sadržajem u tlu od

0,4 mg kg⁻¹ (Burau, 1985), dok u tropskim zemljištima može dostići 4,5 mg kg⁻¹ (Adebayo et al., 2020). Ekstremne koncentracije, do 1200 mg kg⁻¹, zabeležene su u određenim područjima SAD, Kanade, Kine i Rusije (L. C. Tan et al., 2016). U vodi, prosečan nivo selena iznosi 0,1 – 0,2 µg L⁻¹, dok u slanim jezerima može dostići čak 2000 µg L⁻¹ (Nancharaiah & Lens, 2015). Svetska zdravstvena organizacija (*engl.* World Health Organisation - WHO) preporučuje maksimalnu koncentraciju od 10 µg L⁻¹ u vodi za piće (Burau, 1985; Adebayo et al., 2020).

Specijacija selena u zemljištu zavisi od pH i redoks potencijala: selenat je dominantan u alkalnim uslovima, dok selenit prevladava u kiselim sredinama i lako se adsorbuje na mineralne površine (L. C. Tan et al., 2016; Adebayo et al., 2020). Organski oblici uglavnom potiču od biljnog materijala, dok mikrobiološka aktivnost, pH i redoks uslovi dodatno utiču na bioraspodivnost (Adebayo et al., 2020; Hariharan & Dharmaraj, 2020). Emisije selena u atmosferu rezultat su vulkanskih aktivnosti, volatilizacije iz biljaka i mikroorganizama, ali i antropogenih izvora — oko 40% ukupne emisije potiče od ljudskih aktivnosti poput rudarstva, sagorevanja fosilnih goriva i poljoprivrede (Avenidaño et al., 2016; L. C. Tan et al., 2016). Industrijske otpadne vode često sadrže toksične oblike selena koji, naročito u prisustvu fenolnih zagađivača, mogu izazvati masovna trovanja vodenih i kopnenih organizama (Chakraborty et al., 2019; Yee et al., 2007). Selen se akumulira u lancu ishrane, pa kontaminacija može uticati na čitave ekosisteme, uključujući i čoveka (L. C. Tan et al., 2016).

Razumevanje hemijskog ponašanja i specijacije selena, kao i njegove interakcije sa mikroorganizmima, postaje sve značajnije u kontekstu ekoloških izazova i održivog upravljanja resursima (Y. Wang et al., 2013). U anaerobnim uslovima dominira redukcija selenita i selenata do Se⁰, dok se pri još nižem redoks potencijalu može formirati selenid, koji se veže za metale i organske molekule (Nancharaiah & Lens, 2015). S obzirom na toksičnost nekih oblika selena i njegovu mobilnost, uloga gljiva u njegovoj transformaciji predstavlja značajan potencijal za unapređenje metoda zaštite životne sredine (Gadd, 2007).

1.3 Fizičko-hemijske osobine i oblici selena

Selen (Se), halkogeni metaloid iz Grupe 16 Periodnog sistema (VI A), identifikovan je 1817. godine od strane švedskog hemičara Berzelijusa (Jöns Jacob Berzelius), a naziv je dobio po boginji Meseca, Seleni, u kontrastu sa "zemaljskim" teluriumom (Nancharaiah & Lens, 2015; L. C. Tan et al., 2016; Hariharan & Dharmaraj, 2020; El-Deeb et al., 2018; Perrone et al., 2015; Herrero & Wellinger, 2015; Werkneh et al., 2017). Stabilan je na sobnoj temperaturi i ne oksiduje lako (Adebayo et al., 2020).

U prirodi se javlja u obliku pet stabilnih izotopa (⁷⁴Se, ⁷⁶Se, ⁷⁷Se, ⁷⁸Se i ⁸⁰Se), dok izotop ⁷⁹Se (produkt fisije ²³⁵U) i 24 radioaktivna izotopa imaju značaj u oblasti

nuklearnog otpada i radiofarmacije (Perrone et al., 2015; L. C. Tan et al., 2016). Prirodni izotop ^{82}Se ima poluživot od oko 1020 godina. Stabilni izotopi koriste se i za ispitivanje nutritivne uloge selena (Perrone et al., 2015).

Selen postoji u više alotropskih (strukturnih) formi. Trigonalni, sivi selen ($t\text{-Se}$) se sastoji od helikalnih lanaca atoma selena i ujedno je termodinamički najstabilniji. Monoklični, kristalni oblici ($\alpha\text{-Se}$, $\beta\text{-Se}$ i $\gamma\text{-Se}$) tamno crvene boje se sastoje od Se_8 prstenova, a amorfni, crni staklasti selen ($g\text{-Se}$) karakterišu neuređena struktura helikalnih lanaca i jedinstvene fotokonduktorske osobine (Marple et al., 2017; Perrone et al., 2015; L. C. Tan et al., 2016; Adebayo et al., 2020). Različiti oblici selena mogu biti identifikovani Ramanovom spektroskopijom (Carini et al., 1980; Marple et al., 2017). Na temperaturama od 110 – 180 °C crveni selen prelazi u sivi, a na 220 °C u crni staklasti, amorfni oblik (Kessi et al., 1999; Hariharan & Dharmaraj, 2020).

Tabela 1: Atomska i fizička svojstva selena (Perrone et al., 2015).

Atomski broj	34
Atomska težina	78,996 Da
Elektronska konfiguracija	$3d^{10} 4s^2 4p^4$
Atomski radijus	103 pm
Kovalentni radijus	116 pm
van der Waals-ov radijus	190 pm
Oksidaciona stanja	-2, 0, +4, +6
MeM energija veze	44 kcal/mol
MeH energija veze	67 kcal/mol
Potencijal jonizacije	1. 941,0 kJ/mol 2. 2045,0 kJ/mol 3. 2973,7 kJ/mol
Afinitet prema elektronu	- 4,21 eV
Elektronegativnost (Paulingova skala)	2.55
Tačka topljenja	221°C (494 K)
Tačka ključanja	685°C (958 K)

Prema hemijskim karakteristikama, selen je analog sumporu i arsenu, što mu omogućava ugradnju u selenoaminokiseline i slične biomolekule (Oremland et al., 2004; Nancharaiyah & Lens, 2015). Posедуje halkofilna i siderofilna svojstva, vezuje se za metale (Cu, Fe, Ag, Ni, Pb), halogene elemente (Cl, F, Br) i kiseonik (L. C. Tan et al., 2016; El-Deeb et al., 2018; Hariharan & Dharmaraj, 2020). Identifikovane su Se-metal veze u format dehidrogenazama bakterija *Escherichia coli* i *Desulfovibrio gigas*, uključujući Se-Ni ligacije u hidrogenazama (Jacob et al., 2003).

Od selenovih oksida poznati su SeO_2 i SeO_3 ; sagorevanjem selena nastaje SeO_2 , koji u vodi formira selensku kiselinu (H_2SeO_3), potentan oksidans za većinu metala osim platine, paladijuma i zlata (Adebayo et al., 2020).

1.4 Bioaktivna jedinjenja selena

Selen se u živim organizmima javlja pretežno u organskom obliku, kao sastavni deo selenoaminokiselina u selenoproteinima, dok se neorganski oblici (selenat i selenit) apsorbuju iz zemljišta, ulaze u biljne sisteme i dalje prelaze u lanac ishrane (Hariharan & Dharmaraj, 2020). Kod biljaka, selen prati put asimilacije sumpora, a u organizmu se redukuje do selenida, koji sa serinom formira selenocistein (*engl.* selenocysteine – SeCys) (Řezanka & Sigler, 2008). Takođe je neophodan za sintezu selenometionina (*engl.* selenomethionine – SeMet), iz kojeg nastaju volatilni derivati kao što su dimetil selenidi (*engl.* dimethyl selenide – DMSe) i dimetil diselenidi (*engl.* dimethyl diselenide – DMDSe) (Awadallah, 2013; Rosenfeld et al., 2017). Isparljive, metilovane oblike selena proizvode različiti mikroorganizmi, gljive i nematode (Rosenfeld et al., 2017).

Ključna biološka uloga selena ogleda se u formiranju aminokiseline SeCys, koja se ugrađuje u selenoproteine putem specifičnog mehanizma koji redefiniše genetski kod: UGA kodon, inače stop-signal, kodira SeCys u prisustvu SECIS sekvence insercije selenocisteina (Hatfield & Gladyshev, 2002; Perrone et al., 2015; Avery & Hoffmann, 2018).

Organska jedinjenja selena često su analozi sumporovih jedinjenja, a enzimi koji asimiluju sumpor pokazali su sličan afinitet i za selenoforme. Specifični enzimi, poput selenat-reduktaze kod *Thauera selenatis* i SeCys-metiltransferaze kod *Astragalus bisuleatus*, imaju viši afinitet za SeCys i značajni su za biljke-akumulatore selena (Řezanka & Sigler, 2008).

Selenoproteini su identifikovani kod brojnih eukariota, bakterija i arhea — kod čoveka ih ima 25 (Lenart et al., 2013). Iako se dugo smatralo da gljive ne sintetišu SeCys, novija istraživanja potvrđuju njegovu prisutnost kod devet vrsta filuma Chytridiomycota, Zoopagomycota i Mucoromycota (Mariotti, 2019).

Među najbolje proučenim enzimskim selenoproteinima je glutathion peroksidaza (*engl.* glutathione peroxidase – GPx), antioksidativni enzim prisutan u mitohondrijama i citosolu, koji transformiše H_2O_2 i lipidne perokside u vodu i odgovarajuće alkohole (Perrone et al., 2015; Ighodaro & Akinloye, 2018; Hariharan & Dharmaraj, 2020). Kod kvasca su identifikovane dve GPx izoforme, dok je kod filamentoznih gljiva opisana samo jedna. GPx kod *Schizosaccharomyces pombe* nije selenoenzim, za razliku od GPx kod *S. cerevisiae*, *Hansenula mrakii* i *Candida boidinii*, gde je GPx vezana za mitohondrijalnu i peroksizomalnu membranu (Inoue et al., 1995; Pócsi et al., 2004).

Drugi selenoenzimi uključuju TrxR, jodotironin dejodinaze, metionin-R-sulfoksid reduktazu B1 i selenofosfat sintazu II (Avery & Hoffmann, 2018; Perrone et al., 2015). Kod ljudi su opisani i neenzimski selenoproteini P, S, N, W, K, H, R i M (Hariharan & Dharmaraj, 2020). Filamentozna gljiva *Phycomyces blakesleanus* sintetizira i izlučuje selenobiotin – selenoanalog biotina koji se ponaša kao faktor rasta za određene mikroorganizme i funkcionalno se ugrađuje u karboksilaze (Lindblow-Kull et al., 1980).

Neke biljke iz roda *Astragalus* mogu akumulirati selen i do 1000 puta više nego neakumulatori. Biljke najčešće akumuliraju selen u formi selenita (krastavac, brokoli), SeMet (pšenica) ili Se-metilselenometionin (luk). Gljive selen akumuliraju pretežno kao SeMet. Kod 83 analizirane vrste gljiva, sadržaj selena kretao se od 0,01 do 20 ppm, a najviši nivoi su utvrđeni kod *Agaricus bisporus*, *Boletus edulis* i *Boletus macrolepiota*. Selenom obogaćen kvasac se komercijalno koristi kao jedan od najbogatijih izvora organskog selena (Řezanka & Sigler, 2008).

Tabela 2: Distribucija nekih jedinjenja selena kod gljiva i drugih organizama (modifikovano iz Řezanka & Sigler, 2008).

Jedinjenje	Vrsta
Selenocistationin	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Astragalus pectinatus</i> <i>Astragalus praleongus</i> <i>Brassica oleracea capitata</i> <i>Lecythis ollaria</i> <i>Morinda reticulata</i> <i>Neptunia amplexicaulis</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Stanleya pinnata</i>
Se-metilselenocistein (metilselenocistein)	<i>Allium cepa</i> <i>Allium sativum</i> <i>Allium tricoccum</i> <i>Astragalus bisulcatus</i> <i>Astragalus crotalariae</i> <i>A. praleongus</i> <i>B. oleracea capitata</i> <i>Melilotus indicus</i> <i>Dunaliella primolecta</i> <i>Oonopsis condensata</i>

	<i>Phaseolus lunatus</i> <i>B. oleracea botrytis</i>
γ -glutamyl-Se-metilselenocistein	
	<i>A. cepa</i> <i>A. sativum</i> <i>A. terreus</i> <i>A. bisulcatus</i> <i>P. chrysogenum</i> <i>P. lunatus</i>
SeMet	
	<i>A. tricoccum</i> <i>A. fumigatus</i> <i>A. terreus</i> <i>Brassica juncea</i> <i>B. oleracea capitata</i> <i>M. indicus</i>
Se-metilselenocistein Se-oksidi	
	<i>B. oleracea capitata</i>
selenobiotin	
	<i>P. blakesleeanus</i>
SeCys	
	<i>Fusarium sp.</i> <i>Vigna radiata</i>
dimetil selenid	
	<i>Penicillium sp.</i>
γ -glutamilselenocistationin	
	<i>A. pectinatus</i>
γ -glutamilselenometionin	
	<i>A. sativum</i>
Se-adenozilselenohomocistein	
	<i>S. cerevisiae</i>
selenocisteinska kiselina	
	<i>D. primolecta</i> <i>Fusarium sp.</i>
Se-metilselenometionin	
	<i>A. fumigatus</i> <i>D. primolecta</i>
selenolantionin	
	<i>S. cerevisiae</i>

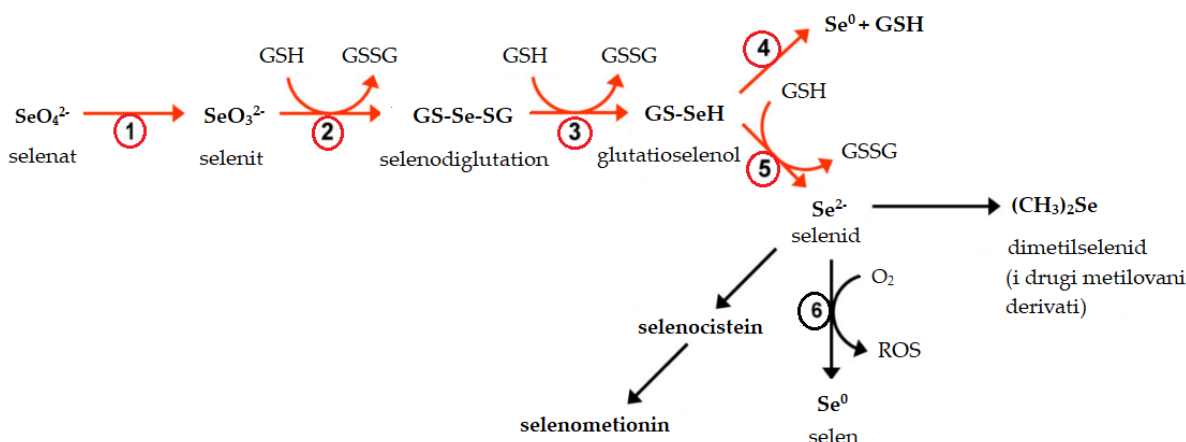
4-selenouridin	<i>E. coli</i>
3-butenil izoselenocijanat	<i>S. pinnata</i>
selenosinigrini	<i>Armoracia lapathifolia</i> <i>S. pinnata</i>
selenošćeri	<i>Astragalus racemosus</i>

1.5 Neorganski oblici selena i njihov uticaj na žive sisteme

Neorganski selen u prirodi postoji u više oksidacionih stanja (-2, 0, +4, +6) (Oremland et al., 2004; Wadhvani et al., 2016; El-Deeb et al., 2018; Herrero & Wellinger, 2015; Avendaño et al., 2016; Butler et al., 2012; Adebayo et al., 2020; L. C. Tan et al., 2016; Rosenfeld et al., 2017). Najčešće se javlja u površinskim i podzemnim vodama, močvarama i sedimentima kao selenat (SeO_4^{2-}), selenit (SeO_3^{2-}), selenid (Se^{2-}) i nerastvorni elementarni selen (Se^0) (Butler et al., 2012; L. C. Tan et al., 2016; Husen & Siddiqi, 2014; Vogel et al., 2017). Elementarni selen se javlja kao koloidna čestica ili talog i termodinamički je stabilan u redukujućim sredinama (Rosenfeld et al., 2017), biološki inertan i netoksičan u malim količinama (Avendaño et al., 2016; Y. Wang et al., 2013). Nekada se smatrao biološki nedostupnim (Vetchinkina et al., 2013), a njegova funkcija u biološkim sistemima u tom obliku i dalje ostaje slabo poznata (Shilo et al., 2005).

Oksianjoni selenata i selenita prisutni su u aerobnim i oksidujućim uslovima i ispoljavaju visoku rastvorljivost i bioraspoloživost, što ih čini najtoksičnijim formama (Dwivedi et al., 2013; Avendaño et al., 2016; Y. Wang et al., 2013). Selenit pri ulasku u ćeliju izaziva formiranje ROS koje mogu dovesti do oksidativnog stresa (McDermott et al., 2010; Bébien et al., 2002). Zbog hemopreventivnih i antikancerogenih svojstava, natrijum selenit se koristi kao suplement u terapiji kancera (Avendaño et al., 2016; Hariharan & Dharmaraj, 2020).

Selenat se u prirodi ponaša slično kao sulfat, dok se selenit uglavnom javlja u kiselim oksidujućim uslovima i predstavlja dominantan mobilni oblik selena (L. C. Tan et al., 2016). Mikroorganizmi redukuju ove oblike u elementarni selen ili isparljivi R_2Se , u čemu učestvuje redukovani glutation (*engl.* reduced glutathione – GSH), a nastaju oksidovani glutation (*engl.* oxidized glutathione – GSSG) i ROS (Slika 2; Bébien et al., 2002; L. C. Tan et al., 2016). Selenidi su stabilni u jakim redukcionim uslovima (L. C. Tan et al., 2016) i učestvuju u biosintezi SeCys i SeMet kod organizama sa aktivnim transulfuracionim putem (Herrero & Wellinger, 2015).



Slika 2: Metabolička redukcija neorganskih oblika selena i njihova konverzija u organske oblike. Reakcije redukcije su označene crvenim strelicama. Strelica 1 odgovara reakcijama koje uključuju ATP sulfurilazu i druge enzime koji učestvuju u početnim koracima puta asimilacije sulfata. Strelice 2, 3, 4 i 5 odgovaraju neenzimskim reakcijama koje rezultiraju neto konverzijom redukovano glutationa (GSH) u oksidovani glutation (GSSG). Reakcija 6 je takođe neenzimska i rezultira indukcijom sinteze različitih reaktivnih vrsta kiseonika (modifikovano iz Herrero & Wellinger, 2015).

Razumevanje karakteristika različitih valentnih stanja i mehanizama toksičnosti selena, posebno kao selenita, ključno je za njegovu potencijalnu primenu u medicini i ekotoksikologiji. Niska toksičnost selenata u poređenju sa selenitima može biti posledica ograničene apsorpcije i manje efikasne redukcije u reaktivne oblike (Bébien et al., 2002; L. C. Tan et al., 2016).

Geomikologija ispituje ulogu gljiva u geohemijskim transformacijama, uključujući razgradnju materijala, biorazgradnju, kruženje elemenata i interakcije gljiva sa metalima (Gadd, 2007). Gljive, kao efikasni kolonizatori ekstremnih staništa, mogu transformisati i imobilisati selen kroz biosorpciju, biomineralizaciju i redukciju. Njihova aktivnost može uticati na distribuciju i oblik selena u tlu, što ih čini važnim akterima u bioremedijaciji kontaminiranih staništa (Rosenfeld et al., 2017).

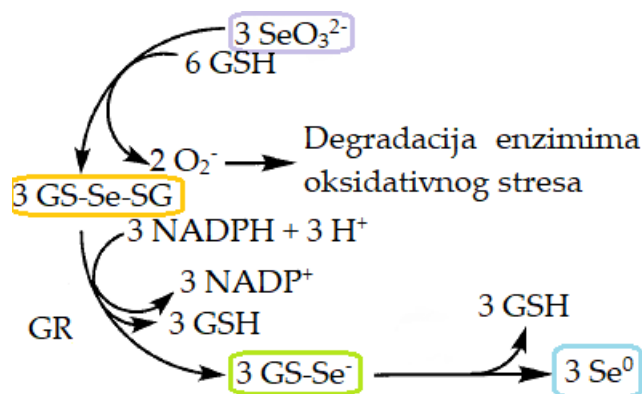
1.6 Biosinteza SeNP

SeNP predstavljaju jedinstveni oblik selena čija sinteza se može izvršiti biogenim putem, redukcijom selenata/selenita u prisustvu različitih mikroorganizama, gljiva, biljaka i bakterijskih proteina ili enzimskih ekstrakata (Prasad & Swamy, 2013; Husen & Siddiqi, 2014; El-Deeb et al., 2018). Mnogi mikroorganizmi imaju sposobnost konverzije jedinjenja selena različitim mehanizmima, kao što su redukcija, metilacija i oksidacija.

Mikrobiološka konverzija selenita u elementarni selen predstavlja vid detoksifikacije pod aerobnim ili anaerobnim uslovima rasta (Y. Wang et al., 2018).

SeNP se mogu formirati u rasponu prečnika od 50-500 nm. Veličina SeNP je važan faktor koji određuje njihovu potencijalnu biohemijsku aktivnost, i zavisi od vrste mikroorganizma, uslova redukcije i vremena proizvodnje (Avendaño et al., 2016; Oremland et al., 2004; Jain et al., 2014). Veličina čestica proizvedenih mikrobiološkom respiracijom se povećava s vremenom (Nancharaiah & Lens, 2015). Prema definiciji, samo čestice dimenzija 1-100 nm je ispravno nazvati nanočesticama, iako se u literaturi često i veće čestice označavaju ovim terminom (Wadhvani et al., 2016). Zahvaljujući malim dimenzijama i velikom odnosu površine prema zapremini, SeNP ispoljavaju specifična fizička, hemijska i biološka svojstva što ih čini pogodnim za primenu u poljoprivredi, elektronici i medicini (El-Deeb et al., 2018; Husain et al., 2025). Čestice veličine 5–200 nm mogu direktno ukloniti slobodne radikale *in vitro*. Čestice prečnika manjeg od 100 nm pokazuju veći stepen interakcije sa biološkim sistemima nego čestice većih dimenzija (Avendaño et al., 2016). Različite vrste mikroorganizama proizvode SeNP različite strukture i optičkih svojstava, što se ne može replicirati upotrebom konvencionalne hemijske sinteze (Oremland et al., 2004; Butler et al., 2012). Pretpostavlja se da je ova varijabilnost uzrokovana raznovrsnošću enzimskih reakcija tokom procesa mikrobiološke redukcije (Oremland et al., 2004), što može objasniti različite veličine nanočestica kod gljiva (Rosenfeld et al., 2017).

Smatra se da mikrobiološka redukcija oksianjona selena uključuje dva koraka: redukciju selenata do selenita, a zatim redukciju selenita do elementarnog selena, što podrazumeva dejstvo enzima nitrit, odnosno nitrat reduktaza (Nancharaiah & Lens, 2015; Dwivedi et al., 2013; Avendaño et al., 2016). Drugi mehanizam redukcije podrazumeva dejstvo specifičnih enzima, selenat/selenit reduktaza. Neki mikroorganizmi redukuju selenite, ali ne i selenate. Odsustvo specifične selenat reduktaze se može pretpostaviti kod strogih aerobnih mikroorganizama, koji kao krajnji akceptor elektrona prilikom respiracije koriste kiseonik. Sposobnost redukcije selenata stoga je povezana uglavnom sa anaerobnim mikroorganizmima, međutim više vrsta gljiva, uglavnom Askomikota, se pokazalo sposobnim za aerobnu redukciju selenata i selenita (Avendaño et al., 2016). Biološka redukcija selenita se može izvršiti i putem sistema glutationa, gde GSH ima ulogu donora elektrona (Slika 3).



Slika 3: Biološka redukcija selenita. Selenit anjon (ljubičasto) neenzimski reaguje sa redukovanim glutationom (GSH) pri čemu se dobijaju selenodiglutation (narandžasto), oksidovani glutation (GSSG) i superoksid anjon. Glutation reduktaza (GR) redukuje selenodiglutation u selenopersulfid (zeleno) koji se, kao nestabilan produkt, transformiše u elementarni selen (plavo). GSSG se pomoću GR konvertuje u GSH (modifikovano iz Kessi & Hanselmann, 2004).

1.7 *Phycomyces blakesleeanus*

P. blakesleeanus je saprotrofna striktno aerobna filamentozna gljiva prisutna u vlažnim sredinama širom sveta. Prvi put je okarakterisana u Švedskoj 1817. godine kao zelena alga i nazvana *Ulva nitens*, zbog čega je 1823. uvedeno ime roda *Phycomyces* ("gljiva algi"). Godine 1925. je na osnovu oskudnih dokaza originalna vrsta *Phycomyces nitens* podeljena na dve, a najzastupljenijim laboratorijskim sojevima je dato ime *P. blakesleeanus* (Cerdá-Olmedo, 2001). Gljiva *P. blakesleeanus* taksonomski pripada redu Mucorales klase Mucoromycetes, podfilumu Mucoromycotina i filumu Mucoromycota (Chaudhary et al., 2013). Ova gljiva se odlikuje brzim rastom i visokom proizvodnjom biomase pod povoljnim uslovima (Žižić et al., 2022), te je često prisutna u zemljištu, organskim ostacima i vazduhu zbog sposobnosti brze kolonizacije i sporulacije na različitim zemljišnim supstratima bogatim jednostavnim ugljenim hidratima (O'Donnell et al., 2001). Ipak, najranije evolutivne grane u kraljevstvu gljiva dobile su relativno malo pažnje naučnika, uprkos potencijalnoj mogućnosti razumevanja evolucije gljiva kroz njihovo ispitivanje (Chaudhary et al., 2013). Genetička ispitivanja potvrđuju razlikovanje i prepoznavanje porodice Phycomycetaceae zasebno od Mucoraceae i drugih porodica reda Mucorales. Kao pripadnik klase Mucoromycetes, rod *Phycomyces* je genetički relativno toliko udaljen od Ascomycetes, biljaka i životinja koliko su ove grupe međusobno udaljene jedna od druge (Cerdá-Olmedo, 2001).

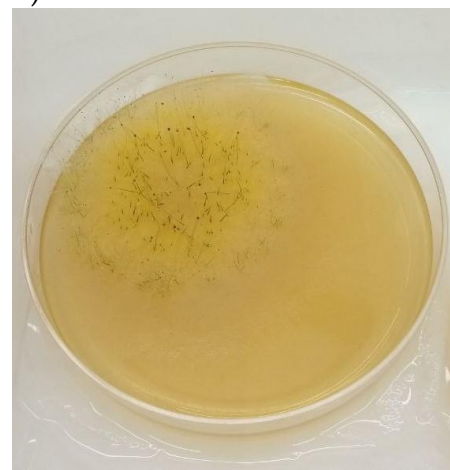
Kao model organizam, *P. blakesleeanus* se koristi u genetičkim i molekularno-biološkim istraživanjima zbog jednostavnog životnog ciklusa, veličine vegetativnih

plodonosnih tela (sporangiofora), makrofora i lakog uzgoja i čuvanja u laboratorijskim uslovima (Cerdá-Olmedo, 2001; Idnurm et al., 2006).

a)



b)



Slika 4: a) *P. blakesleeanus* fotografisan u prirodnom okruženju (preuzeto sa <https://www.inaturalist.org/observations/10028162>). b) *P. blakesleeanus* u uslovima laboratorijskog uzgoja, starosti dva dana.

Vegetativne spore *P. blakesleeanus* su pojedinačne, elipsoidne, nepokretne, višejedarne i obložene debelim ćelijskim zidom. Osušene spore se mogu čuvati u epruvertama u frižideru najmanje 4 godine, dok se spore suspendovane u vodi mogu čuvati više od godinu dana, a liofilizovane spore ostaju vijabilne i preko 20 godina. Čak se i sporulisane kulture na agaroznoj podlozi mogu čuvati nekoliko godina u frižideru ili zamrzivaču. U minimalnom medijumu samo 1,5-3,6% spora klija i stoga je neophodna njihova aktivacija. Metoda koja se najčešće koristi u tu svrhu je toplotni šok (48-53°C tokom nekoliko minuta) što izaziva klijanje ~ 95% spora. Micelijum *P. blakesleeanus* se uzgaja u tečnom medijumu ili na čvrstijoj podlozi. Nakon klijanja, hife brzo rastu i granaju se. Micelijum raste radijalno od mesta klijanja spore, a rast se odvija isključivo na vrhovima hifa, koje se granaju bez formiranja poprečnih zidova ili anastomoze. Svetlost ne utiče direktno na rast micelijuma, već stimuliše sintezu karotenoida i razvoj sporangiofora nakon 2-3 dana (Bergman et al., 1969).

Sporangiofore predstavljaju jednostavne igličaste strukture koje mogu dostići visinu od 15-20 cm (obično oko 10 cm zbog mehaničkih ograničenja) i prečnika oko 100 µm, sa centralnom vakuolom koja se proteže celom dužinom. Brzina rasta sporangiofora povećava se eksponencijalno pri temperaturama od 7°C do 25°C, dok iznad 27°C brzina rasta naglo opada. Stopa rasta takođe direktno proporcionalno zavisi od vlažnosti (Bergman et al., 1969). Svaka sporangiofora nosi po jednu sporangiju koja sadrži spore za rasejavanje (Idnurm et al., 2006). Kod *P. blakesleeanus* se spore oslobađaju rupturom

spoljašnjeg zida sporangijuma pri kontaktu sa čvrstom površinom ili sa vodom. Raspuknute sporangije su veoma lepljive, te se putem vetra, kiše, insekata ili životinja mogu rasejati na velike udaljenosti (Bergman et al., 1969).

Različiti sojevi ili linije *P. blakesleeanus* se klasifikuju kao (+) ili (-) na osnovu njihove sposobnosti da interaguju pri formiranju zigospora, proizvoda seksualne fuzije. Ova podela, koja ne implicira rodne karakteristike, ukazuje da oba pola jednako doprinosu izogamičnom reproduktivnom procesu. Pri kontaktu hifa suprotnog poladolazi do hemijskih i morfoloških promena koje rezultiraju formiranjem zigofora. Zigofore suprotnog pola nakon kontakta formiraju prsten čija je svaka polovina sastavljena od distalnog regiona jedne zigofore, progametangijuma. Poprečni zid unutar svakog progametangijuma odvaja ćeliju, gametangijum, od ostatka micelijuma. Zid između dve gametangije nestaje i formira se jedna ćelija, zigot, čiji su citoplazma i mnogobrojna jedra izvedeni iz dve micelije. Zigot sazreva u zigosporu, nabubri i oformi debeo spoljašnji zid. Susedni delovi zigofora sa obe strane zigospore, supenzori, proizvode fine dvokrake bodlje ili trnove raspoređene svuda oko zigospore. Zigospora ostaje u stanju mirovanja najmanje 3 meseca, a često i duže. Germosporangijumi nose spore, slične onima u aseksualnom ciklusu, osim što kod njih dolazi do genetičke rekombinacije (Bergman et al., 1969).

P. blakesleeanus je poznat po izraženom fototropizmu, odgovoru sporangiofora na svetlosni stimulans (Chaudhary et al., 2013). Rast sporangiofora pokazuje pozitivan fototropizam prema talasnim dužinama bliske UV i plave svetlosti (vidljiva svetlost), a negativan prema dalekim UV talasnim dužinama (kraće talasne dužine visoke energije). Ovo svojstvo je opširno proučavano i pruža važan uvid u molekularne mehanizme percepcije svetlosti i transdukcije signala u eukariotskim ćelijama. Osim na svetlost, gljiva reaguje i na hemijski nadražaj, dodir, gravitaciju, pa čak i na objekte u neposrednoj blizini, što utiče na pravac i brzinu rasta sporangiofora (Idnurm et al., 2006).

1.8 Stres i indukcija stanja stresa

Stres je nespecifičan odgovor organizma na bilo koji uslov sredine, dok je stresor agens koji proizvodi stres u bilo kom trenutku (Selye, 1976). Stresor se karakteriše nepredvidivošću i nemogućnošću kontrolisanja od strane organizma. Fiziološke karakteristike stresa podrazumevaju smanjenje ili odsustvo očekivane reakcije organizma (Koolhaas et al., 2011). Ćelijski odgovor na stres je zasnovan na makromolekularnom oštećenju koji stres izaziva, ne na samoj vrsti stresa (Emri et al., 2015).

Koncept oksidativnog stresa se definiše kao neravnoteža između oksidanata i antioksidanata u korist oksidanata, što dovodi do stanja koje remeti redoks signalizaciju i kontrolu (Jones, 2006; Sies, 2020). Prema ovoj definiciji, oksidativni stres odražava

poremećaje specifične za pojedinačni organ ili metabolički put, a ne opštu neravnotežu organizma (Jones, 2006). Koncept ravnoteže oksidanata i antioksidanata implicira da promena balansa može biti izazvana sa obe strane ovog sistema. Manje promene u ovom odnosu vode ka homeostatskim adaptacijama na nove uslove sredine, dok vrlo nagle i velike promene izazivaju ćelijska oštećenja i smrt (Burton & Jauniaux, 2011).

Formiranje aerobne atmosfere i nastanak 2-oksoaldehida tokom glikolize predstavljali su ključne hemijske izazove u evoluciji života. Porast koncentracije kiseonika usled fotosintetske aktivnosti doveo je do dve velike oksigenacione epizode (pre ~2,5–2,2 i 0,8–0,5 milijardi godina), koje su dramatično promenile hemijske i fizičke osobine okeana i atmosfere i dovele do pojave ROS, što je zahtevalo razvoj efikasnih sistema odbrane od oksidativnih oštećenja kod aerobnih organizama (Deponte, 2013).

ROS učestvuju u redoks reakcijama, pri čemu oksidacija označava dobijanje atoma kiseonika ili gubitak atoma vodonika/elektrona, dok redukcija podrazumeva gubitak atoma kiseonika ili dobijanje atoma vodonika/elektrona. ROS (Tabela 3) se mogu podeliti na vrste slobodnih radikala, koje obuhvataju molekule sa nesparenim elektronom (kao što je superoksid), i neradikalske vrste, koje predstavljaju molekuli bez nesparenih elektrona ali visoke reaktivnosti (npr. peroksid) (Krumova & Cosa, 2016; Jakubczyk et al., 2020). Svi kiseonični radikali su reaktivne kiseonične vrste, ali nisu sve reaktivne kiseonične vrste ujedno i kiseonični radikali (Sies et al. 2017).

Tabela 3: Reaktivne vrste slobodnih radikala i neradikala koje su važne za biološke sisteme (modifikovano iz Sies et al., 2017).

Slobodni radikali	Neradikali
<i>Reaktivne vrste kiseonika</i>	
superoksid radikal ($\bullet\text{O}_2^-$)	vodonik peroksid (H_2O_2)
hidroksil radikal ($\bullet\text{OH}$)	organski hidroperoksidi (ROOH)
peroksil radikal ($\bullet\text{ROO}$)	singlet molekularni kiseonik ($^1\text{O}_2$)
alkoksil radikal ($\bullet\text{RO}$)	pobuđena karbonilna jedinjenja (RCO)
	ozon (O_3)
<i>Reaktivne vrste hlora i broma</i>	
atomski hlor ($\bullet\text{Cl}$)	hipohlorit (OCl^-)
atomski brom ($\bullet\text{Br}$)	hloramini (RNHCl)
	hipobromit (OBr^-)
<i>Reaktivne vrste azota</i>	
azot oksid/azot monoksid ($\bullet\text{NO}$)	nitrit (NO_2^-)
azot dioksid ($\bullet\text{NO}_2$)	nitroksil anjon (NO^-)
	peroksinitrit (ONOO^-)
	peroksinitrat (O_2NOO^-)
	nitrozoperoksikarbonat (ONOOCO_2^-)

<i>Reaktivne vrste sumpora</i>	
tiil radikali (\bullet RS)	tioli (RSH), tiolati (RS^-) disulfidi (RSSR) sulfenati (RSO^-), sulfinati (RSO_2^-), sulfonati (RSO_3^-) vodonik sulfid (H_2S) polisulfidi ($H_2S_x, x \geq 2$)
<i>Reaktivne karbonilne vrste</i>	
	acetaldehid akrolein metilglioksal 4-hidroksi-nonenal pobuđeni triplet karbonili
<i>Reaktivne vrste selena</i>	
	seleniti selenati selenocistein (SeCys) selenometionin (SeMet)

Slobodni radikali se mogu generisati iz više elemenata, ali u biološkim sistemima su najvažniji oni koji sadrže kiseonik ili azot (Burton & Jauniaux, 2011). Kiseonik je podložan stvaranju slobodnih radikala zbog toga što u spoljašnjoj ljusci ima dva nesparena elektrona u odvojenim elektronskim orbitalama (Ighodaro & Akinloye, 2018). Druge biološki važne reaktivne vrste su vrste hlora i broma (Sies et al., 2017). Slobodni radikali su izuzetno nestabilni, npr. životni vek $\bullet O_2^-$ i $\bullet OH$ je 10^{-6} , odnosno 10^{-9} sekundi (Belozerskaya & Gessler, 2006).

Gljive su u prirodnim uslovima konstantno izložene raznim spoljašnjim faktorima - izgladnjivanju, nepovoljnim svetlosnim i temperaturnim uslovima, jonizujućem zračenju, promenama u sastavu atmosfere i osmotskom pritisku medijuma, kao i mehaničkim oštećenjima gljive - što može izazvati oksidativni stres u ćelijama (Belozerskaya & Gessler, 2006).

Toplotni šok povećava učestalost mutacija, DNK rekombinacija i oštećenja mitohondrijske DNK i membrane, što se pripisuje povećanoj unutrašnjoj oksidaciji izazvanoj pojačanom respiracijom (Pócsi et al., 2004). Suša izaziva oksidativni stres povećavajući generisanje ROS na ćelijskom nivou (Csiszár et al., 2007). Tolerancija lišajeva na sušu, toplotu i hladnoću rezultat je kombinacije zaštitnih i reparacionih mehanizama, pri čemu su formiranje GSSG tokom isušivanja i njegova redukcija nakon hidratacije, kao i uloga GSH i GSH-zavisnih enzima, ključni za antioksidativnu odbranu kod mahovina, morskih algi i biljaka (Pócsi et al., 2004). Svetlost može delovati kao jak

stresor na neke gljive, na primer ćelije *Neurospora crassa* sadrže molekule (flavini, pterini, porfirini) čija stimulacija svetlom dovodi do generisanja ROS (Belozerskaya & Gessler, 2006). Povećanje gustine ćelija u kulturi može izazvati metabolički stres usled brzog iscrpljivanja hranljivih materija, što dodatno povećava oksidativni stres (Pócsi et al., 2004). Kod bakterija je pokazano da su enzimi katalaze (*engl.* catalase – CAT) i superoksid dismutaze (*engl.* superoxide dismutase – SOD) regulisani gustinom ćelija (Crockford et al., 1995; Wood & Sørensen, 2001), a slični efekti se mogu predvideti u kulturama gljiva (Pócsi et al., 2004). Kod *S. cerevisiae* nedostatak azota dovodi do razgradnje oko 90% ćelijskog GSH kako bi se obezbedile aminokiseline (L-Glu, L-Cys, Gly) za sintezu drugih organskih molekula. Suprotno tome, kod filamentozne gljive *P. chrysogenum* nedostatak ugljenika povećava *de novo* sintezu i unutrašnji nivo GSH, dok se smanjuju specifične aktivnosti glutation reduktaze (*engl.* glutathione reductase – GR) i GPx, posebno u stacionarnoj fazi kultura bez ugljenika (Pócsi et al., 2004).

Prisustvo teških metala usled industrijskih aktivnosti predstavlja pretnju populacijama gljiva, uključujući kvasce i bazidiomicete koje formiraju ektomikorize. Metalni joni generišu ROS direktno (putem redoks-aktivnih metala kao što su Cu, Fe, Cr, V) ili indirektno (zamenom redoks-aktivnih metala na veznim mestima, npr. Cd, Hg, Ni, Pb), što rezultira oksidacijom lipida, proteina i DNK i smanjenjem stope rasta. Enzimi metabolizma glutationa (GR, GPx, glutation S-transferaza (*engl.* glutathione S-transferase – GST)) pomažu u odbrani od stresa indukovano metalima kod gljiva poput *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Aspergillus nidulans* i *Paxillus involutus* (Pócsi et al., 2004). Preopterećenje gvožđem dodatno stimuliše formiranje ROS, što dovodi do oštećenja intra- i ekstracelularnih komponenti (Awadallah, 2013).

Visoke doze selena deluju kao pro-oksidanti, generišući ROS, a takođe mogu biti toksične zbog kompeticije sa sumporom u aminokiselinama, što rezultira neodgovarajućom konformacijom proteina i stvaranjem nefunkcionalnih proteina i enzima (J. Wang et al., 2016; Adebayo et al., 2020). Studije pokazuju da selenit izaziva jednolančane prekide DNK, generisanje ROS, fosforilaciju serina i ćelijsku apoptozu u ćelijskoj liniji kancera prostate (G. X. Li et al., 2007). Granica između esencijalne (< 40 mg/dan) i toksične (> 400 mg/dan) doze selena je uska, pa čak i mala promena nivoa može dovesti do oštećenja kod živih organizama i ekološke štete (Gharieb & Gadd, 2004; El-Deeb et al., 2018; Nancharaiah & Lens, 2015; L. C. Tan et al., 2016; Vogel et al., 2017; Adebayo et al., 2020).

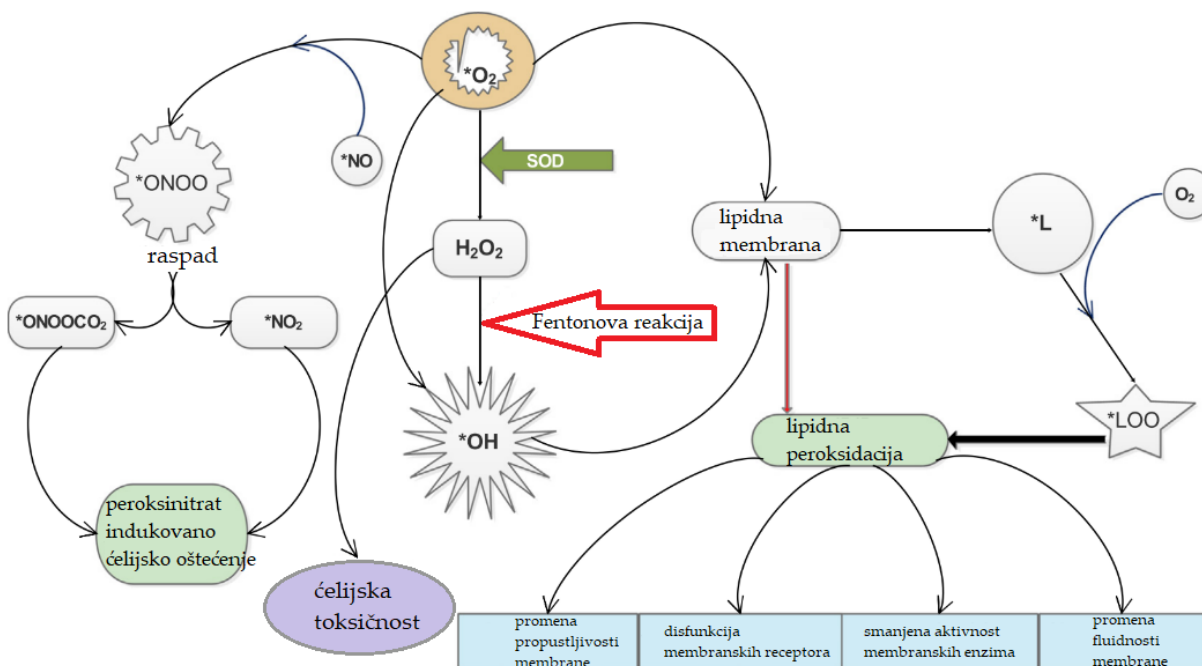
Svi aerobni organizmi, pa i gljive, su kontinuirano izloženi ROS jer koriste molekularni kiseonik kao krajnji akceptor elektrona u procesu disanja odnosno oksidacije hranljivih materija radi dobijanja energije (Angelova et al., 2005; Zhao et al., 2015). Preci savremenih organizama razvili su mehanizme za održavanje redukujuće sredine ćelija, prevenciju generisanja ROS, njihovu detoksifikaciju ili popravku oštećenja izazvanih ROS, što je neophodno u oksidujućim uslovima (Deponte, 2013).

Respiratorni lanac mitohondrija je osnovni izvor ROS u ćelijama aerobnih organizama gde se nepotpunom redukcijom kiseonika generišu ROS, poput superoksid anjon radikala, vodonik peroksida i hidrosil radikala (Belozerskaya & Gessler, 2006; Q. Li et al., 2008; Ighodaro & Akinloye, 2018; Angelova et al., 2005; Zhao et al., 2015). Prenos elektrona kroz respiratorni lanac nije potpuno efikasan pa dolazi do „curenja“ elektrona, naročito iz proteinskih kompleksa I i III unutrašnje membrane mitohondrija, što usled kontakta sa molekularnim kiseonikom rezultira formiranjem $\cdot\text{O}_2^-$. U normalnim uslovima, redukcijom kiseonika nastaje voda ali se oko 2% kiseonika na ovaj način transformiše u $\cdot\text{O}_2^-$. Zbog svog naelektrisanja, $\cdot\text{O}_2^-$ ne prolazi kroz membrane i ostaje unutar mitohondrijskog matriksa gde ulazi u lančane reakcije generisanja drugih ROS (Burton & Jauniaux, 2011). Slično tome, $\cdot\text{O}_2^-$ se može generisati „curenjem“ elektrona sa kraćeg elektron transportnog lanca unutar endoplazmatskog retikuluma (ER). Formiranje disulfidnih veza tokom procesa uspostavljanja konformacije proteina je oksidujući proces prilikom koga se generiše $\cdot\text{O}_2^-$ unutar ER. Ovako generisani $\cdot\text{O}_2^-$ čini oko 25% ćelijskog $\cdot\text{O}_2^-$, međutim taj procenat može biti i veći u uslovima ER stresa (Burton & Jauniaux, 2011). Još jedan način proizvodnje $\cdot\text{O}_2^-$ u ćelijama je aktivnost NADPH oksidaze (*engl.* NADPH oxidase – NOX) (Jomova et al., 2024; Tudzynski et al., 2012). NOX je membranski enzim eukariota koji generiše $\cdot\text{O}_2^-$ redukcijom kiseonika (Mattila et al., 2022). Ima važnu ulogu u neutralizaciji patogena kroz „oksidativni prasak“ (*engl.* oxidative burst) koji podrazumeva generisanje velike količine ROS (Scott & Eaton, 2008). Fagociti, a posebno neutrofili, indukuju produkciju ROS kroz aktivnost NOX prilikom uništavanja patogena (Ighodaro & Akinloye, 2018). Aktivnost ksantin oksidaze (*engl.* xanthine oxidase – XO) je takođe izvor ROS kod gljiva jer formira peroksid kao nusproizvod, što doprinosi ukupnoj proizvodnji ROS (Mattila et al., 2022).

1.9 Efekti i uloga ROS u ćelijama

Jedna od uobičajenih posledica izloženosti stresnim uslovima je povećana proizvodnja ROS (De Castro et al., 2013). U normalnim uslovima rasta, akumulacija ROS je niska i ne uzrokuje značajna oštećenja, osim u zrelih kulturama gde se ROS postepeno akumuliraju. Međutim, stresni uslovi poput promena u okruženju, UV zračenja ili nedostatka hranljivih materija znatno povećavaju akumulaciju ROS, što rezultira peroksidacijom lipidnih membrana, oksidacijom proteina, inaktivacijom enzima, poremećajem ćelijske homeostaze i oštećenjem DNK/RNK – procesima koji dovode do starenja, apoptoze ili ćelijske smrti (Belozerskaya & Gessler, 2006; Hayes & McLellan, 1999; Angelova et al., 2005; Zhao et al., 2015; Pócsi et al., 2004; H. Shao et al., 2019). Peroksidacija membranskih lipida menja propustljivost membrana, funkcionalnost receptora i aktivnost membranskih enzima, te smanjuje fluidnost membrana (Ighodaro

& Akinloye, 2018). Takođe, kiseonični radikali mogu inicirati formiranje drugih vrsta ROS koji mogu imati još razornije efekte (Ighodaro & Akinloye, 2018).



Slika 5: Šematski prikaz uloge superoksida u produkciji drugih reaktivnih vrsta. $*O_2$ – superoksid anjon radikal, $*NO$ – azot oksid radikal, $*NO_2$ – azot dioksid radikal, $*ONOOCO_2$ – nitrozoperoksikarbonat, $*ONOO$ – peroksinitrat, $*OH$ – hidroksi radikal, $*L$ – lipidni radikal, $*LOO$ – lipid peroksi radikal (modifikovano iz Ighodaro & Akinloye, 2018).

Visoke koncentracije ROS mogu da pokrenu genetički programiranu ćelijsku smrt (apoptozu) (Hernández et al., 2017), a iako se starenje kod gljiva često povezuje sa unutrašnjom akumulacijom ROS, nije sasvim jasno da li su oni sami uzrok starenja ili posledica oksidativnih oštećenja (Pócsi et al., 2004).

Dugo se smatralo da su ROS isključivo štetni nusprodukti aerobnog metabolizma (A. Ren et al., 2017), ali sada je poznato da, uz tiil radikale, disulfide i sulfenske kiseline, ROS imaju i vitalne funkcije u ćeliji. Oni utiču na posttranslacione modifikacije proteina, metabolizam, fiziološke funkcije, te regulišu rast i razvoj (De Castro et al., 2013; Ighodaro & Akinloye, 2018). ROS igraju ulogu u odbrani od patogena, biosintezi sekundarnih metabolita i suštinski su učesnici u međućelijskoj i unutrašnjoj signalizaciji, modulirajući aktivnost transkripcionih faktora (Belozerskaya & Gessler, 2006).

Postoji niz proteina i enzima koji detektuju i/ili generišu ROS, uključujući mijeloperoksidaze koje proizvode HOCl i NOX enzime, koji generišu superoksid ($*O_2$). Tiil radikali iz cisteina, sulfenskih kiselina i disulfida su značajni signalni međuproizvodi (Deponte, 2013). Kod gljiva, postoje tri podfamilije NOX enzima – NoxA, NoxB i NoxC.

NoxA i NoxB, rasprostranjeni među gljivama, imaju evolutivno zajedničko poreklo i predačku funkciju, dok je uloga NoxC manje poznata. Funkcionalna analiza kod *A. nidulans*, *Podospora anserina* i *N. crassa* pokazuje da je NoxA ključan za seksualnu diferencijaciju – mutanti bez NoxA nemaju sposobnost generisanja ROS i nisu sposobni za sazrevanje, što se kod divljeg tipa dešava nakon oksidativnog praska (Scott & Eaton, 2008). Takođe, NoxB je važan za germinaciju askospora, a oba enzima su neophodna za formiranje plodonosnih tela kod *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* i *Claviceps purpurea*. Kod fitopatogenih gljiva, NOX enzimi su ključni za virulenciju, tako što ROS vrše ulogu signalnih molekula koji iniciraju formiranje infektivnih struktura ili pospešuju brzu kolonizaciju domaćinskih tkiva (Tudzynski et al., 2012; Scott & Eaton, 2008). Povećanje ROS pre naredne faze diferencijacije zabeleženo je i kod *Sclerotium rolfsii* i *Flammulina velutipes* (Belozerskaya & Gessler, 2006). Takođe, superoksidni anjon i vodonik peroksid funkcionišu kao mitogeni, povećavajući brzinu DNK replikacije i ćeljske proliferacije, i stoga su ROS neophodni za diferencijaciju kod gljiva (Ighodaro & Akinloye, 2018).

Kod *A. nidulans* i *P. anserina*, ROS regulišu razvoj ćelija, dok kod fitopatogena poput *Magnaporthe oryzae* narušena ravnoteža ROS smanjuje virulenciju. Povećani nivo ROS je u pozitivnoj korelaciji sa nivoom aflatoksina kod *A. parasiticus* i *A. flavus*. Kod *Ganoderma lucidum*, povišeni intraćeljski ROS poboljšavaju biosintezu ganoderinske kiseline (GA), a dodatak H₂O₂ značajno povećava akumulaciju GA (A. Ren et al., 2017). Kod ispitivanih filamentoznih gljiva – uključujući *Mucor racemosus*, *Humicola lutea*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Cladosporium elatum*, *P. chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. claviforme*, *P. roquefortii*, *Aspergillus niger*, *A. argilaceum* i *A. oryzae* – frakcija cijanid rezistentne (*engl.* cyanide-resistance respiration – CNRR) u ukupnoj respiraciji značajno raste tokom izlaganja ROS (Angelova et al., 2005).

Biljke takođe koriste ROS kao sekundarne glasnike u signalnim kaskadama, gde proizvodnja i uklanjanje ovih molekula utiču na razvoj, odbranu i regulaciju oksidativne signalizacije putem antioksidanata niske molekulske mase, kao što su askorbat i glutathion (Hernández et al., 2017).

1.10 Antioksidativni metabolizam gljiva

Da bi se zaštitili od oksidativnih oštećenja i održali ćeljsku redoks ravnotežu, aerobni organizmi razvili su kompleksne enzimatске i neenzimatске antioksidativne sisteme (Hayes & McLellan, 1999; Angelova et al., 2005; Zhao et al., 2015; Deng et al., 2016). Ovi sistemi umanjuju štetne efekte ROS koji mogu poremetiti ćeljsku homeostazu i oštetiti ćeljske komponente. Studije pokazuju da visoke koncentracije oksidanata inhibiraju proizvodnju biomase i konidija, dok transkriptomske analize otkrivaju regulisanu ekspresiju redoks gena poput CAT, GPx i SOD (H. Shao et al., 2019).

Gljive su razvile sofisticirane mehanizme za registrovanje spoljašnjih uslova, signalizaciju i prilagođavanje na stresore iz životne sredine, što im omogućava zauzimanje raznovrsnih ekoloških niša. Zaštita od kombinovanog dejstva stresora kod gljiva oslanja se delimično na gene za odgovor na stres koji nastaje pod uticajem spoljašnje sredine (*engl.* Environment Stress Response – ESR), identifikovane kod *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Candida albicans* i *C. glabrata*. Broj i regulacija ESR gena variraju u zavisnosti od intenziteta stresora i brzine rasta, a njihov metod identifikacije još nije standardizovan (Emri et al., 2015).

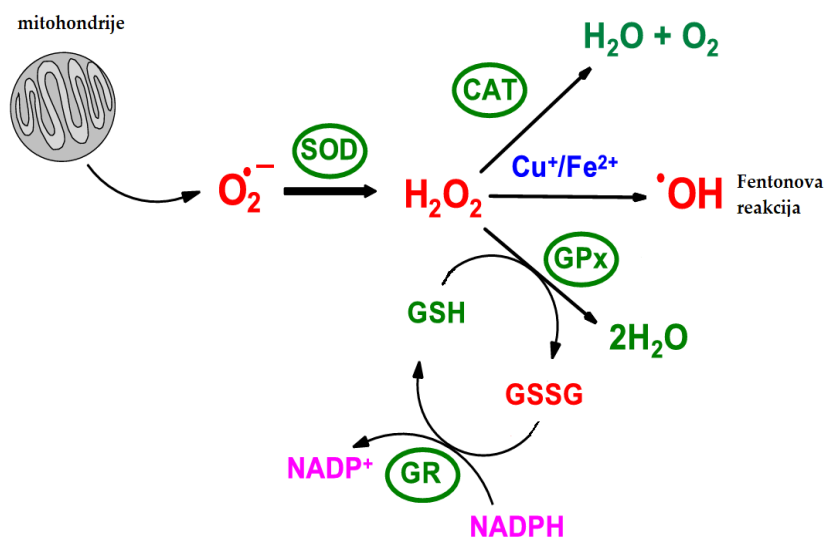
Eukariotske ćelije poseduju metaboličke sisteme za neutralizaciju ROS - koristeći ih kao supstrat u reakcijama koje dovode do proizvodnje vode, kiseonika ili za prenos elektrona na NADP (Pócsi et al., 2004). Ključnu ulogu u ovom procesu imaju antioksidativni enzimi, kao što su CAT, SOD, GPx i GR, koji katalitički uklanjaju toksične metabolite kiseonika. Njihova efikasnost zavisi od međusobne koordinacije i interakcija sa drugim molekulima (Awadallah, 2013; Deng et al., 2016).

Molekuli koji čine mehanizam zaštite od oksidativnih oštećenja u živim sistemima deluju na različitim nivoima prema čemu se mogu kategorisati kao antioksidanti prve, druge, treće i četvrte linije odbrane. Sistemi antioksidanata koji deluju na suzbijanju ili sprečavanju sinteze slobodnih radikala ili reaktivnih vrsta u ćelijama nazivaju se prvom linijom zaštite od oksidativnih oštećenja (Ighodaro & Akinloye, 2018). Različiti antioksidativni enzimi transformišu reaktivne kiseonične vrste u manje štetna jedinjenja (Hayes & McLellan, 1999). Oni vrlo brzo neutralizuju bilo koji molekul s potencijalom da se razvije u slobodni radikal ili bilo koje slobodne radikale sa sposobnošću indukcije proizvodnje drugih radikala. Tri ključna enzima čine prvu liniju zaštite od oksidativnih oštećenja, a to su SOD, CAT i GPx (Slika 6). Ovi enzimi katalizuju dismutaciju superoksid anjon radikala i razlažu nastali vodonik peroksid i hidroperokside u bezopasne ili manje štetne molekule (H_2O_2 /alkohole i O_2). Superoksid dismutaza katalitički transformiše toksični superoksid anjon radikal kiseonika u relativno manje štetan vodonik peroksid i molekularni kiseonik. Akumulacija H_2O_2 je toksična za telesna tkiva ili ćelije. Takođe, u prisustvu Fe^{2+} , se prevodi u štetan hidroksilni radikal Fentonovom reakcijom. Da bi se sprečio ovaj fenomen, enzim CAT, koje ima u izobilju u peroksisomima, razlaže H_2O_2 na vodu i molekularni kiseonik (Deng et al., 2016; Ighodaro & Akinloye, 2018). Međutim, CAT se ne nalazi u mitohondrijama, pa se redukcija H_2O_2 do vode i lipidnih peroksida u odgovarajuće alkohole vrši pomoću GPx. Uloga i efikasnost odbrambenih antioksidanata prve linije stoga je važna i neophodna u celokupnoj odbrambenoj strategiji antioksidanata, posebno u odnosu na superoksid anjon radikal (Ighodaro & Akinloye, 2018). Aktivnosti enzima prve linije zaštite od oksidativnih oštećenja igraju fundamentalnu ulogu u odbrambenim mehanizmima bioloških sistema (Hayes & McLellan, 1999; Ighodaro & Akinloye, 2018).

Pošto su određeni hemijski intermedijeri nastali nakon interakcije ROS sa makromolekulima visoko reaktivni, postoji jednaka potreba za detoksifikacijom ovih sekundarnih oksidacionih proizvoda dejstvom preventivnih antioksidanasa. Bez odgovarajuće detoksifikacije takvih proizvoda, dolazi do inicijacije lančane reakcije koja rezultira razgradnjom ćelijskih komponenti i smrću ćelije. Drugu liniju zaštite od oksidativnih oštećenja obezbeđuju enzimi poput GST, aldo-keto reduktaze i aldehid dehidrogenaze (Niki, 1993; Hayes & McLellan, 1999). U ovu grupu se mogu ubrojati i neenzimski antioksidansi koji neutralizuju slobodne radikale predajom elektrona i pritom postajući reaktivna vrsta, ali sa manje štetnim potencijalom. Tu spadaju askorbinska kiselina, GSH, alfa tokoferol (vitamin E), vitamin C, tioli i ubikvinol (Niki, 1993; Ighodaro & Akinloye, 2018).

Kategorija antioksidanasa treće linije zaštite od oksidativnih oštećenja dolazi do izražaja tek nakon što su ROS dovele do oštećenja makromolekula. Oni su *de novo* sintetisani enzimi koji vrše reparaciju oštećenja na biomolekulima, rekonstruišu oštećenu ćelijsku membranu, prepoznaju, razgrađuju i uklanjaju oksidovane ili oštećene proteine, DNK i lipide. Primeri uključuju enzimske sisteme za reparaciju DNK (polimeraze, glikozilaze i nukleaze) i proteolitičke enzime (proteinaze, proteaze i peptidaze) (Niki, 1993; Ighodaro & Akinloye, 2018).

Delovanje antioksidanasa četvrte linije odbrane od oksidativnih oštećenja može se nazvati adaptacijom, gde ROS signalizuje formiranje (SOD, CAT) i transport odgovarajućeg antioksidanta do ciljanog mesta (Niki, 1993).



Slika 6: Usklađeno dejstvo antioksidativnih enzima superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GPx). SOD transformiše superoksid anjon radikal u vodonik peroksid. Fiziološki nivo vodonik peroksida održava se pod dejstvom CAT. U patološkim uslovima, redoks aktivni metali (Cu, Fe) mogu katalizovati formiranje hidroksil

radikala razgradnjom vodonik peroksida u Fentonovoj reakciji. GPx prevodi vodonik peroksid u molekule vode koristeći redukovani glutation (GSH) kao supstrat, koji se transformiše u svoj oksidovani oblik, glutation disulfid (GSSG). GSSG se vraća u svoj redukovani oblik, GSH, koristeći enzim glutation reduktazu (GR). Reakcija GR značajno doprinosi ćelijskom održavanju GSH, koji je važan za redoks odbranu (modifikovano iz Jomova et al., 2024).

Odgovor na oksidativni stres najopsežnije je proučavan kod prokariota i kvasaca (Angelova et al., 2005), kao i kod filamentoznih gljiva poput *A. niger* (Q. Li et al., 2008), *N. crassa* (Gyöngyösi & Káldi, 2014) i *P. blakesleeanus* (De Castro et al., 2013). Osim enzimatskih antioksidanasa, gljive poseduju neenzimske antioksidanse – glutation, askorbat, fenole, karotenoide i melanine – pri čemu su karotenoidi efikasni u neutralizaciji singlet kiseonika (De Castro et al., 2013). Neke vrste (npr. *Blakeslea trispora*, *Phaffia rhodozyma*, *N. crassa*) povećavaju sintezu karotenoida u odsustvu Cu/Zn-SOD, što dodatno naglašava njihovu značajnu ulogu (Gessler et al., 2007). Trehaloza, zajedno sa glikogenom, predstavlja još jedan mehanizam zaštite, naročito kod kvasaca, dok *P. blakesleeanus* akumulira antioksidante poput galne kiseline i β -karotena (Baroja-Mazo et al., 2005). Pod stresom nedostatka glukoze ili u prisustvu acetata, *P. blakesleeanus* mobilise rezerve trehaloze i glikogena, a specifičan sistem transporta acetata i indukcija NAD⁺-izocitrat dehidrogenaze omogućavaju njegov ulazak u ciklus trikarboksilnih kiselina (engl. Tricarboxylic Acid Cycle – TCA ciklus) kako bi se obezbedila proizvodnja energije u suboptimalnim uslovima (Rua et al., 2014).

P. blakesleeanus sintetiše D-eritroaskorbat (engl. D-Erythroascorbic Acid - D-EAA) i D-eritroaskorbat monoglukoamid (engl. D-Erythroascorbate monoglucoside – D-EAAG) čija je uloga u zaštiti ćelijskog GSH i β -karotena utvrđena pri tretmanu H₂O₂ (De Castro et al., 2013). D-EAA je analog L-askorbata (vitamin C) kome je sličan strukturno i fizikohemijski, međutim gljive u prirodnim uslovima sintetišu D-EAA, dok sinteza L-askorbata nije potvrđena (Y. Y. Shao et al., 1993). Sinteza D-EAA je potvrđena kod nekih Askomikota (*N. crassa*, *S. cerevisiae*, *Lipomyces starkeyi*, *Candida* sp. i *S. sclerotiorum*), dok je kod Bazidiomikota prisutan i 6-deoksiaskorbat. *P. blakesleeanus* akumulira D-EAA i D-EAAG i takođe vrši ekskreciju D-EAA u medijum, najviše pri prelasku u stacionarnu fazu rasta, i tada koncentracija D-EAA u medijumu postaje znatno viša nego unutarćelijska koncentracija (oko 6 puta). Ovo naglašava izuzetan potencijal *P. blakesleeanus* u biosintezi D-EAA i njegovih derivata. U poređenju sa *S. cerevisiae* ili *S. sclerotiorum*, *P. blakesleeanus* sintetiše daleko veću količinu D-EAA (85 μ g/g suve mase gljive), što može značiti da verovatno preuzima veći deo uloge askorbata (Baroja-Mazo et al., 2005). *P. blakesleeanus* u prisustvu glukoze sintetiše analoge L-askorbata, D-EAA i njegov glukozid, iz prekursora kao što su L-galaktoza i L-galaktono-1,4-lakton, L-gulono-1,4-lakton, 6-deoksiaskorbat i L-fukoza (Baroja-Mazo et al., 2005; Gutierrez-Larrainzar et al., 2010). Suplementacija medijuma D-arabinozom dovodi isključivo do sinteze D-EAA i akumulacije njegovih glikozida. Put sinteze L-askorbata iz ovih supstrata verovatno

koristi mehanizme biosinteze D-EAA, što bi ukazalo na široku specifičnost enzima kao što su D-arabinoza dehidrogenaza i D-arabinono-1,4-lakton oksidaza (Baroja-Mazo et al., 2005). β -karoten, galna kiselina, D-EAA i D-EAAG su metaboliti važni u borbi protiv oksidativnih oštećenja prilikom gladovanja ili korišćenja alternativnih izvora ugljenika (Rua et al., 2014).

Tokom eksponencijalne faze rasta, uz dovoljno glukoze, gljiva primarno viši akumulaciju D-EAA. Ovu fazu karakteriše visoka metabolička aktivnost što posledično vodi ka produkciji ROS. D-EAA se brzo proizvodi i neutrališe ROS. Metabolizam *P. blakesleeanus* se menja prelaskom u sledeću fazu rasta, što je okarakterisano promenama u produkciji antioksidanasa. Gljiva počinje akumulaciju β -karotena (neutrališe singlet kiseonik), galne kiseline (značajna tokom relokacije metaboličkih resursa ćelije) i D-EAAG (glikozilovani derivat D-EAA koji je stabilniji i stoga može biti aktivan tokom dužeg vremenskog perioda stresa). Bioakumulacija različitih antioksidanasa tokom različitih faza rasta je strateška adaptacija *P. blakesleeanus*. Dinamička i brza neutralizacija ROS koju omogućuje D-EAA tokom eksponencijalne faze menja se stabilnijim i dužeživećim molekulima u stacionarnoj fazi kada produženo stanje stresa menja redoks balans ćelije (Rua et al., 2014).

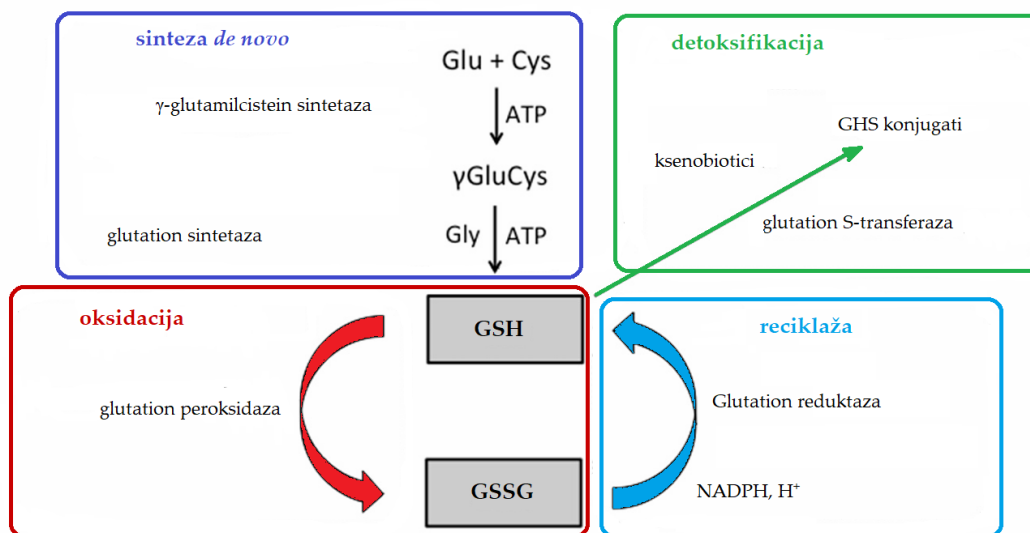
P. blakesleeanus u stacionarnoj fazi dostiže svoj najviši antioksidativni kapacitet. Kratkotrajno izlaganje peroksidu tokom eksponencijalne faze stimuliše visoku aktivnost CAT, koja se smanjuje nakon dugog izlaganja, dok se u stacionarnoj fazi ne detektuje, što može označiti metaboličku promenu u sistemu odbrane. Nasuprot tome, aktivnost SOD ostaje stabilna tokom eksponencijalne faze, ali u stacionarnoj fazi se povećava do 40 puta, najverovatnije usled akumulacije ROS. Enzimi sistema glutationa su takođe modulirani peroksidom kod *P. blakesleeanus*: tokom eksponencijalne faze održavaju se visoki nivoi GSH, GPx i odnos GSH:GSSG, dok produženi stres dovodi do smanjenja količine GSH, što ukazuje na preopterećenje sistema, što vodi smanjenju redukcije GSSG u GSH. Ovakva enzimatska aktivnost omogućava brzu detoksifikaciju i kontinuiran rast, ali u stacionarnoj fazi ćelije pokazuju znake oksidativnog oštećenja, što se može zaključiti iz povećane karbonilacije proteina u ćelijama gljive. Iako se gubi aktivnost CAT, povećana aktivnost SOD u stacionarnoj fazi, kao i značajna akumulacija neenzimskih antioksidanata, čine robustan i dugotrajan sistem zaštite od oksidativnog oštećenja (De Castro et al., 2013).

1.11 Sistem glutationa

Tiolne grupe (-SH), prvenstveno iz cisteinskih ostataka, predstavljaju senzore oksidativnog stresa jer direktno reaguju sa $\cdot\text{O}_2^-$ i H_2O_2 , čime učestvuju u regulaciji transkripcije i signalnim mehanizmima odgovora na stres. Održavanje nivoa tiola je usko povezano sa održanjem redoks ravnoteže u ćeliji (Belozerskaya & Gessler, 2006; Aaseth

et al., 2016). GSH je tripeptid sa centralno zaštićenim molekulom cisteina, a zahvaljujući svojoj tiolnoj grupi deluje kao nukleofil u detoksifikaciji ROS i elektrofilnih molekula. U procesu oksidacije, GSH se transformiše u GSSG, koji se dejstvom GR regeneriše nazad u GSH, čime se formira redoks pufer visokog kapaciteta unutar ćelije (Pócsi et al., 2004; Awadallah, 2013; Sato et al., 2009; Deponte, 2013; Hernández et al., 2017). Enzimi zavisni od GSH omogućavaju eliminaciju peroksida i redukciju disulfidnih veza, dok GSH kao univerzalni redoks agens doprinosi širokom spektru biosintetičkih, signalnih i procesa detoksifikacije (Deponte, 2013).

Sinteza GSH *de novo* (Slika 7) se vrši u dve ATP-zavisne faze. U prvoj reakciji se pod uticajem GSH1 sintetiše dipeptid γ -L-glutamil-L-cistein iz glutaminske kiseline i cisteina, koji zatim GSH2 prevodi u γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicin, odnosno glutation, pri čemu je gama-glutamilcistein sintetaza (*engl.* gamma-glutamylcysteine synthetase – γ GCS) enzim koji ograničava brzinu ove reakcije. GSH inhibira GSH1 povratnom spregom, dok ekspresiju γ GCS dodatno regulišu transkripcioni faktori (npr. Met4p kod *S. cerevisiae*) i dostupnost azota i ugljenika (Hayes & McLellan, 1999; Pócsi et al., 2004; Aaseth et al., 2016; Bakti et al., 2017; Wangsanut & Pongpom, 2022).



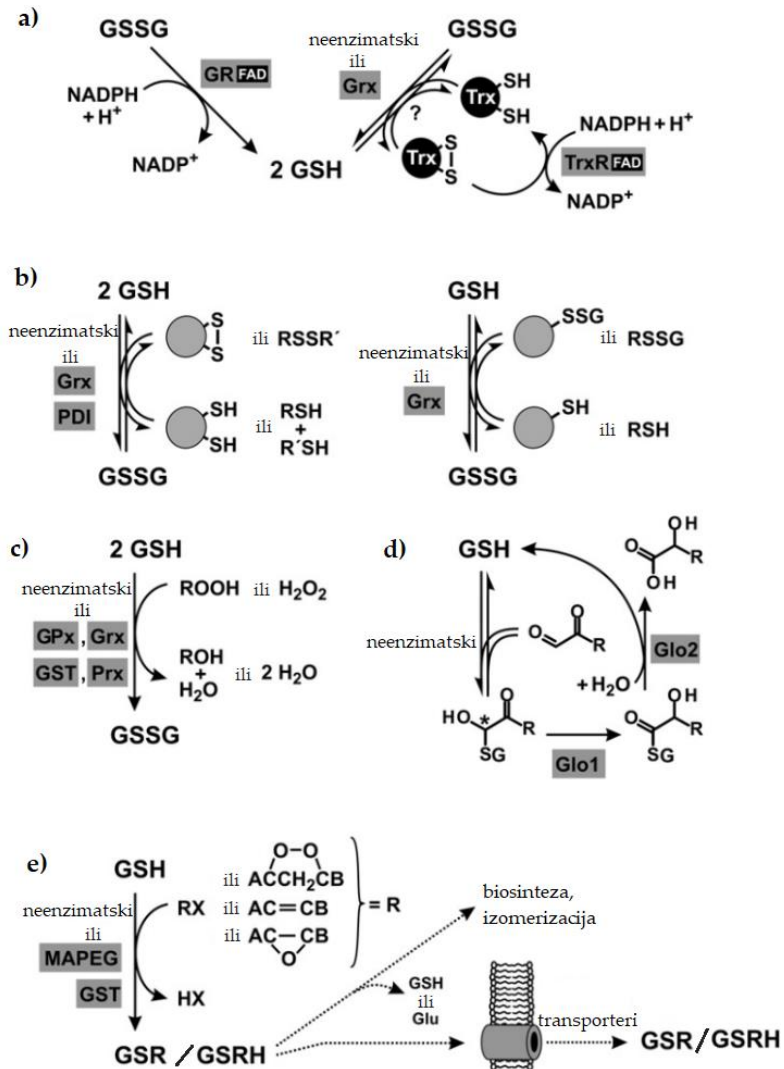
Slika 7: Put glutationa kod *S. cerevisiae*. Sinteza glutationa je proces u dva koraka koji katalizuju enzim γ -glutamilcistein sintetaza (GSH1) i glutation sintetaza (GSH2) u citoplazmi.

GSH igra ključnu ulogu u zaštiti makromolekula od oksidanata. Redukovani oblik (GSH) direktno uklanja različite oksidante i ksenobiotike preko delovanja glutation peroksidaze (GPx) i glutation S-transferaze (GST) i postaje oksidovan (GSSG). Regeneracija oksidovanog GSSG u redukovani GSH je katalizovana glutation reduktazom (GR) uz potrošnju nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) (modifikovano iz Wangsanut & Pongpom, 2022).

Sistem tioredoksin/tioredoksin reduktaza (*engl.* thioredoxin/thioredoxin reductase – Trx/TrxR) funkcioniše paralelno sa sistemom glutationa, koristeći nikotinamid adenin

dinukleotid fosfat (*engl.* nicotinamide adenine dinucleotide phosphate – NADPH) preko TrxR za obnavljanje oksidovanih proteinskih disulfida. Oba sistema deluju na održavanju ćelijske redoks homeostaze i obnavljanju oksidovanih biomolekula, a njihova sinhronizacija obezbeđuje adaptivnu fleksibilnost u stresnim uslovima (Deponte, 2013; Hayes & McLellan, 1999; Sato et al., 2009).

Kod mutanta *S. cerevisiae*, nedostatak GSH izaziva produženu lag fazu, usporen rast i povećanu osetljivost na metale, okso-aldehide i ROS. Iako Trx delimično nadoknađuje njegovu funkciju, istovremeni gubitak oba sistema je letalan. Iako Trx mogu obezbediti redukcionu ekvivalente za ćelije koje ne proizvode GSH, nije poznato da li se proizvode u višku u mutantnim ćelijama radi kompenzacije nedostatka GSH. Čak i pod uslovima bez stresa, GSH je neophodan za očuvanje ćelijske arhitekture, integriteta membrana i procesa diferencijacije kod gljiva (Pócsi et al., 2004).



Slika 8: Pregled i aktuelni modeli metabolizma glutationa. **a)** NADPH zavisna regeneracija GSH pomoću GR i/ili od tioredoksin para, Trx/TrxR. Direktna reakcija GSSG (glutation disulfid) sa Trx *in vitro* je vrlo spora pa bi redukcija zavisna od Trx *in vivo* mogla biti indirektna. **b)** Redukcija ili oksidacija intra- ili intermolekularnih disulfida ili tiola sa 2 GSH/GSSG (levo). Deglutationilacija/glutationilacija tiola pomoću GSH/GSSG (desno). Reakcije se mogu odvijati neenzimski ili enzimski uz pomoć glutaredoksina (Grx), protein disulfid izomeraza (PDI) i GST. **c)** GSH-zavisno uklanjanje H₂O₂ i drugih hidroperoksida katalizovano je raznim enzimima, kao što su glutation peroksidaza (GPx), peroksiredoksini (Prx), GST i nekoliko Grx-izoforni. **d)** GSH zavisnu konverziju 2-oksoaldehida (2-OA) u 2-hidroksikarboksilnu kiselinu katalizuju izomeraza glioksalaza 1 (Glo1) i tioesteraza glioksalaza 2 (Glo2). **e)** Raznoliki elektrofilni su modifikovani pomoću GSH uz pomoć GST i membranskih proteina sa divergentnom funkcijom u metabolizmu eikosanoida i glutationa (*engl.* Membrane-Associated Proteins with divergent functions in Eicosanoid and Glutathione metabolism – MAPEG). Dobijeni proizvodi se ili

uklanjaju iz ćelije ili su prekursori drugih metabolita. Glu – ostatak glutaminske kiseline (modifikovano iz Deponte, 2013).

Većina ćelijskog glutaciona (85–90%) lokalizovana je u citoplazmi, gde se i sintetiše (Bachhawat et al., 2013; Awadallah, 2013). Međutim, GSH je funkcionalno prisutan i u jedru, mitohondrijama, endoplazmatskom retikulumu, peroksizomima i vakuolama. Izlučuje se i u vanćelijski prostor, a ćelije ga mogu ponovo internalizovati u zavisnosti od svog redoks statusa (Bachhawat et al., 2013). U citosolu dominira redukovani oblik GSH, dok je GSSG prisutan u znatno manjim količinama. Ukupna koncentracija glutaciona ključna je za održavanje ćelijske redoks homeostaze, a odnos GSH:GSSG predstavlja njen pokazatelj, tako što snižen odnos ukazuje na oksidativni stres (Jacob et al., 2003; Pócsi et al., 2004; Sato et al., 2011; Awadallah, 2013). Kod svežih konidija *N. crassa* ovaj odnos dostiže 150:1, dok se sa starenjem smanjuje. U aktivno rastućim micelijumima, odnos iznosi 3–10:1, pri čemu su promene uglavnom rezultat fluktuacija nivoa GSSG (Fahey et al., 1975).

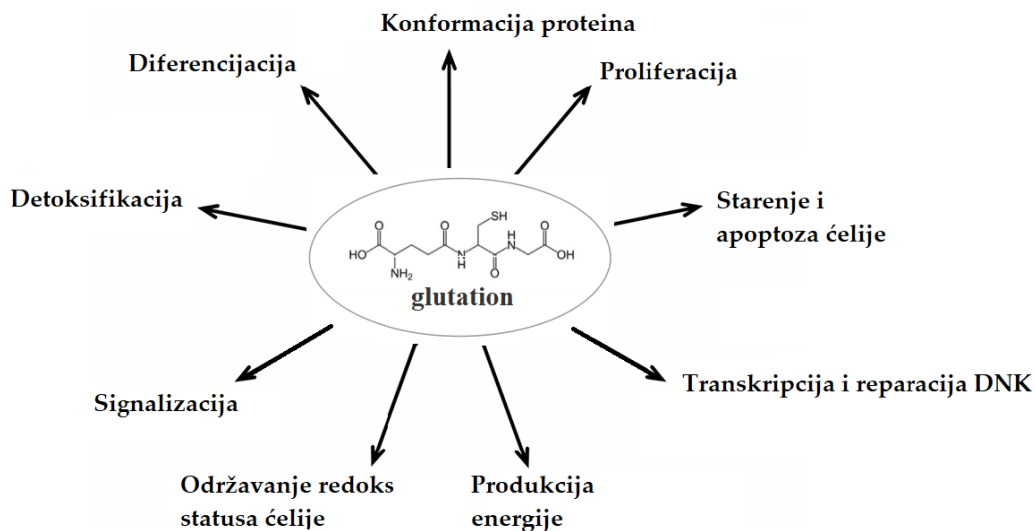
Kod većine eukariota GSH je najzastupljeniji tiol male molekulske mase, dok je kod prokariota prisutan prvenstveno kod aerobnih, gram-negativnih bakterija. Kod anaerobnih, gram-pozitivnih vrsta često su prisutni alternativni tioli poput koenzima M i γ -L-glutamil-L-cisteina (GGC) (Pócsi et al., 2004). Ova raznolikost sugerise da su tiolni sistemi univerzalan element redoks regulacije. Tioli su evoluirali kao adaptivni molekuli zbog svojih hemijskih karakteristika, većeg nukleofilnog potencijala i niže pK_a vrednosti u odnosu na alkohole, što ih čini pogodnijim za interakciju sa elektrofilima. Slično, SeCys pokazuje još izraženiju reaktivnost i učestvuje u redoks reakcijama sa većom efikasnošću, čineći selenoproteine ključnim regulatorima u brojnim biološkim procesima (Deponte, 2013). Geni uključeni u biosintezu i redoks regulaciju GSH visoko su konzervirani kod različitih vrsta gljiva (Pócsi et al., 2004). Međutim, GSH nije jedini cisteinski tiol koji koriste organizmi. Alternativni oblici uključuju γ -glutamil-cistein (halofilne arhee), tripanotion (kinetoplastidni paraziti), glutationilspermidin (*E. coli*), mikotiol (aktinobakterije, uključujući *Micobacterium tuberculosis*), kao i bacilitiol (*Bacillus subtilis*), ergotionein i ovotiol, koji svi pokazuju antioksidativna svojstva (Deponte, 2013).

Nije potpuno jasno zašto je GSH postao centralno redukciono sredstvo većine organizama. Pretpostavlja se da je to rezultat dostupnosti njegovih prekursora - glutamata, cisteina i glicina - iz životne sredine u ranim fazama evolucije. U poređenju sa slobodnim cisteinom, GSH ispoljava višestruke prednosti: učestvuje u sintezi proteina i detoksifikaciji ćelija, poseduje funkcionalne grupe (γ -glutamil i glicin) koje omogućavaju visoku specifičnost prepoznavanja supstrata i štiti amino- i karboksilne grupe od spontane autooksidacije i transfera acil grupa. Imajući u vidu da tioli mogu delovati i kao izvor ROS, GSH predstavlja hemijski stabilnu i funkcionalno optimalnu formu tiola u održavanju redoks homeostaze (Deponte, 2013).

GSH učestvuje u brojnim fundamentalnim procesima, uključujući regulaciju ćelijskih signalnih puteva, sintezu i reparaciju DNK, transport aminokiselina, kao i regulaciju ćelijskog ciklusa i apoptoze (Pócsi et al., 2004; Bachhawat et al., 2013; Aaseth et al., 2016).

Kod gljiva, prolazna hiperoksidativna stanja sa akumulacijom ROS i aktivacijom antioksidativnih enzima iniciraju procese ćelijske diferencijacije kao što su klijanje, konidijacija, dimorfna konverzija i autoliza. Na primer, kod *N. crassa* detektovana je redoks neravnoteža neposredno pre svakog morfogenetskog koraka sazrevanja, uključujući produkciju singlet kiseonika tokom formiranja konidija. Poremećaj redoks statusa tokom prelaza između faza rasta i pod dejstvom selenita može biti signal za transkripciju ili diferencijaciju ćelija. Redoks neravnoteža stoga može biti funkcionalni pokretač morfogenetskih procesa, a ne samo indikator stresa. Suprotno tome, kod *P. chrysogenum* i *Acremonium chrysogenum* morfološke promene u stacionarnoj i autolitičkoj fazi ne prate promene u odnosu GSH:GSSG, što ukazuje da redoks signalizacija nije univerzalni okidač diferencijacije. Slično, kod *C. albicans* uočeno je značajno smanjenje intracelularnog GSH tokom dimorfne konverzije, verovatno zbog povećane aktivnosti γ -glutamyltransferaze. Veza između GSH, ROS i starenja gljiva varira među vrstama. Kod *S. cerevisiae*, starenje i apoptoza su povezani sa mitohondrijalnom akumulacijom ROS i GSH. Nasuprot tome, kod *A. nidulans*, degradacija GSH prethodi autolizi, što ukazuje da GSH/GSSG status verovatno ne učestvuje direktno u signalizaciji tog procesa. Kod *P. chrysogenum*, porast ROS tokom post-autolitičke faze upućuje na moguću ulogu oksidativnog stresa u starenju (Pócsi et al., 2004).

GSH ne samo da neutrališe ROS kroz neenzimske reakcije, već obezbeđuje elektrone za GPx i druge enzime, čime direktno doprinosi ćelijskoj redoks ravnoteži (Awadallah, 2013; Sato et al., 2009). U interakciji sa radikalima kiseonika, azota i ugljenika, GSH formira tiil radikale koji dalje mogu izazvati disulfidaciju proteinskih tiola. Ovaj proces, poznat kao S-tiolacija, može inaktivirati enzime, ali takođe štiti proteine od trajne oksidacije (Pócsi et al., 2004). U sistemu glutaciona ključnu ulogu imaju enzimi poput GPx, GR, GST i glutaredoksina. Pored toga, GSH obnavlja antioksidanse poput vitamina C i E i, kao kofaktor GPx, podržava antioksidativnu aktivnost (Aaseth et al., 2016).



Slika 9: Šematski prikaz plejotropne uloge glutathiona u regulaciji osnovnih ćelijskih procesa (modifikovano iz Kalinina et al., 2014 i Cassier-Chauvat et al., 2023).

GSH učestvuje u redoks reakcijama razmene tiol/disulfid veza, važnim za regulaciju enzimske aktivnosti i stabilnost proteina. Ove reakcije doprinose i oksidativnoj signalizaciji i obnavljanju disulfida u ER ili periplazmi (Jacob et al., 2003). Glutathionilacija proteina i malih molekula može biti reverzibilna ili se razgrađuje pomoću GR ili TrxR sistema (Deponte, 2013). GSH redukuje hidroperokside preko GPx i određenih GST i Grx, a potencijalno i preko GSH-zavisnih peroksiredoksina, iako se konstanta brzine ovih enzima pokazala znatno nižom od one za CAT ili kanonske tiol/selenol zavisne hidroperoksidaze Prx i GPx (Deponte, 2013). U putu glioksalaze, GSH učestvuje u detoksifikaciji 2-oksoaldehida, naročito metilglioksala, putem konverzije u netoksičnu 2-hidroksikarboksilnu kiselinu. Ovaj put je esencijalan za prevenciju akumulacije proizvoda glikacije (Deponte, 2013). *Hansenula polymorpha*, kao i *Kloeckera* sp. i *Pichia* sp., su gljive koje proizvode više peroksizoma kada se uzgajaju na podlogama sa metanolom kao izvorom ugljenika. Formaldehid nastao u peroksizomima razlaže se pomoću GSH-zavisnih enzima. Rast na metanolu prati i povećana ekspresija γ GCS, zavisna od redoks-regulisane aktivacije transkripcionih faktora poput YAP1 (Pócsi et al., 2004).

Redoks-nezavisne uloge GSH uključuju biosintezu mitohondrijalnih Fe-S proteina i skladištenje azota i sumpora tokom gladovanja (Bachhawat et al., 2013; Bakti et al., 2017). Takođe, GSH učestvuje u homeostazi metala i detoksifikaciji ksenobiotika. Mnogi ksenobiotici spontano reaguju sa tiolnom grupom GSH ili formiraju glutathion S-konjugate, čime započinje eliminacija toksina iz ćelija (Aaseth et al., 2016; Sato et al., 2011).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj ove disertacije je ispitivanje odgovora filamentozne gljive *P. blakesleeanus* na uticaj egzogenog selenita i karakterizacija biološki proizvedenih SeNP u procesu redukcije selenita.

Specifični ciljevi disertacije podrazumevaju:

1. Utvrđivanje da li je i u kojim koncentracijama izlaganje neorganskom selenitu toksično za micelije gljive *P. blakesleeanus*.

1.1 Toksični efekat selenita na micelijum gljive *P. blakesleeanus* biće utvrđen kvantifikacijom koncentraciono zavisnog efekta selenita na micelije gljive merenjem biomase. Ovaj rezultat će omogućiti definisanje granica tolerancije i uslova za dalja ispitivanja selenita u neletalnim koncentracijama po gljivu.

2. Utvrđivanje da li selenit uzrokuje pojavu oksidativnog stresa i koji mehanizmi odbrane se prilikom stresa aktiviraju kod ove gljive.

2.1 Analizom aktivnosti enzima uključenih u metabolizam glutaciona i enzima antioksidativnog sistema gljive biće utvrđeno da li selenit deluje kao prooksidant. Ova analiza doprineće razumevanju sposobnosti održanja ćelijske redoks homeostaze gljive pod uticajem selenita.

3. Identifikacija, morfološka, strukturna i hemijska karakterizacija i distribucija biološki proizvedenih SeNP, kao i mehanizam njihovog nastanka tokom procesa redukcije selenita od strane micelija gljive.

3.1 Biće izvršena kvantitativna procena raspodele selena nakon tretiranja između micelije gljive i medijuma za gajenje.

3.2 Biće ispitana lokalizacija selena u svežem micelijumu gljive.

3.3 Utvrđivanje i karakterizacija sintetisanih SeNP će obuhvatiti:

3.3.1 Određivanje dimenzija SeNP.

3.3.2 Određivanje sastava i oksidacionih stanja selena u sastavu SeNP.

3.3.3 Utvrđivanje strukturnih svojstava SeNP.

Ovaj multidisciplinarni pristup omogućiće povezivanje fizioloških, biohemijskih i nanostrukturnih efekata tretmana selenitom kod model-organizma, gljive *P. blakesleeanus*, čime se doprinosi fundamentalnom razumevanju interakcija

mikroorganizama sa metaloidima, kao i potencijalnoj ekološkoj i tehnološkoj valorizaciji biosintetisanih SeNP.

3. MATERIJAL I METODE

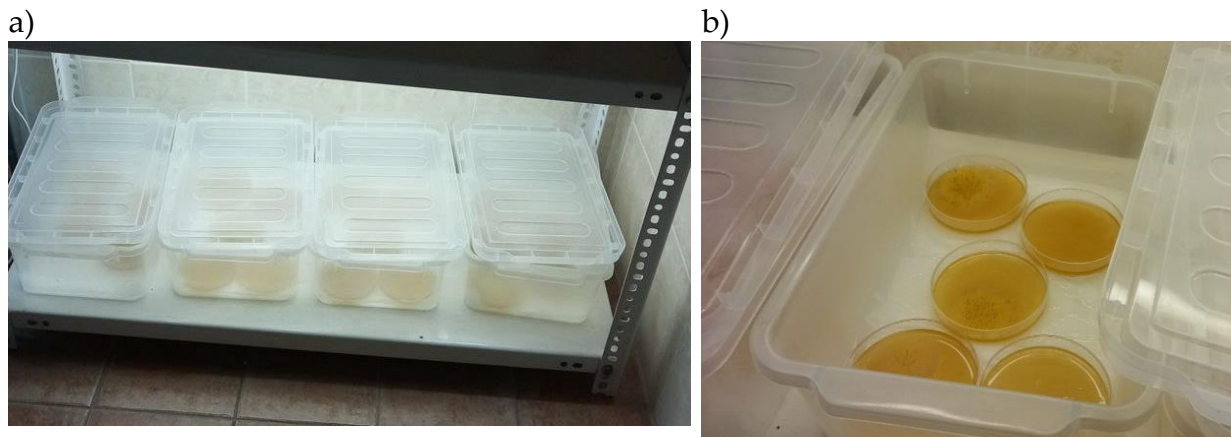
3.1. Eksperimentalni objekat

Kao eksperimentalni objekat u ovom radu je korišćen divlji soj NRRL 1555(-) gljive *Phycomyces blakesleeanus* (Burgeff).

3.1.1. Uzgoj *P. blakesleeanus*

3.1.1.1 Uzgoj micelije gljive radi proizvodnje spora

Vegetativne spore gljive *P. blakesleeanus* su čuvane u zamrzivaču u koncentraciji od 10^7 spora/mL. Pre sađenja štok spora je razblažen do koncentracije od 10^2 spora/mL i inkubiran 15 minuta na temperaturi od 49°C , da bi se aktivirao proces klijanja. Spore su sejane na čvrstom krompirovom medijumu. Krompirov medijum je pripreman tako što je 200 g krompira kuvano sat vremena u 1 L destilovane vode. Potom je krompir proceden kroz dvoslojnu gazu i zapremina filtrata dopunjena destilovanom vodom do zapremine 1 L. Filtrat je ponovo zagrevan do ključanja. U ključali filtrat je dodavano 15 g agara, 20 g D-glukoze, 1 mg vitamina B1 i 1,5 g ekstrakta kvasca. pH ovako pripremljenog medijuma se uvek kreće oko 7 i nije ga potrebno korigovati. Dobijeni medijum je autoklaviran 25 minuta na temperaturi od 114°C , odmah nakon toga je sterilno razlivan u Petri posude prečnika 9 cm i visine 1 cm do nivoa od $\sim 0,5$ cm (20 mL) i ostavljan da se ohladi i stegne. 100 μL aktiviranih spora je pipetom dodavano u svaku Petri posudu. Gljive su gajene u komori za uzgoj, smeštene u delimično poklopljenim plastičnim kutijama i izložene kontinuiranom osvetljenju pomoću belog fluorescentnog svetla jačine 10 W/m^2 (Slika 10a). Platične kutije su prethodno oprane i sterilisane pod UV lampom. Na dno kutija je stavljen papirni ubrus natopljen destilovanom vodom radi obezbeđivanja potrebne vlažnosti vazduha za rast gljive (Slika 10b). Nakon dva dana inkubacije, kutije su otklapanne da bi se sprečilo lepljenje sporangiofora za poklopce. Temperatura u komori se održava na temperaturi od 20°C , a relativna vlažnost vazduha na 95%. Posle 4 dana rasta, gljive dostižu poslednji stepen razvoja sporangiofora. Zrele sporangiofore se potapaju u vodu što dovodi do pucanja opni sporangiofora i oslobađanja spora. Takav rastvor je razblažen vodom u odnosu 1:1,5 i na taj način smo dobili štok spora koncentracije 10^7 (izmereno pomoću hemocitometra) koji je čuvan u zamrzivaču na temperaturi -20°C i korišćen za uzgoj micelije u narednim eksperimentima. Ovako dobijeni štok je raspoređen u više sterilnih bočica zapremine 2 mL čime se sprečava kontinuirano otapanje i zamrzavanje čitave količine spora već je korišćen samo njihov manji deo.



Slika 10: Postavka gajenja gljive *P. blakesleeanus* radi dobijanja spora za uzgoj. **a)** Spore zasejane u Petri posude koje su u delimično poklopljenim plastičnim kutijama u komori za gajenje. **b)** Micelija nakon približno dva dana rasta u kutiji na čijem dnu se nalazi papirni ubrus natopljen vodom.

3.1.1.2. Uzgoj micelije

Pre sađenja su vegetativne spore gljive *P. blakesleeanus* inkubirane 15 minuta u vodenom kupatilu na temperaturi od 49°C, da bi se aktivirao proces klijanja, a zatim razblažene 10 puta dejonizovanom vodom, do koncentracije 10⁶ spora/mL. Tokom inkubacije je rastvor spora promućkan dva puta. Micelija je gajena u standardnom minimalnom medijumu (Sutter, 1975) sledećeg sastava (po 1 L medijuma):

<i>D-glukoza</i>	20 g
<i>L-asparagin monohidrat</i>	2 g
<i>KH₂PO₄</i>	5 g
<i>MgSO₄ x 7H₂O</i>	500 mg
<i>štok mikroelemenata</i>	10 mL

Štok mikroelemenata se pravi 100 puta koncentrovaniji i čuva u frižideru. Sastoji se od (po 1 L konačnog medijuma):

<i>CaCl₂</i>	28 mg
<i>vitamin B1 (tiamin hidrohlorid)</i>	1 mg
<i>limunska kiselina</i>	2 mg
<i>Fe(NO₃)₃ x 9H₂O</i>	1,5 mg
<i>ZnSO₄ x 7H₂O</i>	1 mg
<i>MnSO₄ x H₂O</i>	300 µg

$CuSO_4 \times 5H_2O$	50 μ g
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	50 μ g

Neposredno pre zasejavanja, minimalni medijum je je autoklaviran 25 minuta na temperaturi od 114°C. Rastvor glukoze je sterilisan zasebno zbog rizika od karamelizacije šećera pri izlaganju visokoj temperaturi. Ovako pripremljen medijum je pH ~ 4,5, što je idealna pH vrednost za gajenje *P. blakesleeanus* (Martínez-Cadena et al., 1995). Micelijum gljive je gajen u staklenim erlenmajerima sa sterilnim čepovima od vate. Veličina erlenmajera je zavisila od potreba konkretnog eksperimenta a zapremina kulture je iznosila 40-50% nominalne zapremine erlenmajera da bi se obezbedio odgovarajući odnos površine i zapremine potreban za razmenu gasova. Erlenmajeri su inokulirani sa aktivnim sporama u finalnoj koncentraciji 10⁵/mL. Da bi se omogućila konstantna oksigenacija medijuma u toku gajenja, erlenmajerove boce su postavljane na orbitalnu mešalicu na 120 obrtaja u minuti u komori za uzgoj koja je bila osvetljena kontinuiranom belom fluorescentnom svetlošću jačine 10 W/m², pri temperaturi od 20°C tokom 24 h.

3.1.1.3 Natrijum selenit/selenat

Za potrebe tretiranja micelija gljive su korišćeni sveže pripremljeni rastvori natrijum selenita (Na₂SeO₃) i selenata (Na₂SeO₄) koncentracije 200 mM u 10 mM Na-Pi (natrijum fosfatni puter).

3.1.1.4 Merenje biomase

Za merenja biomase micelija je uzgajana u erlenmajerima od 100 mL tokom 12 do 68 sati u tečnom medijumu. Nakon određenog vremenskog perioda rasta (12 h, 16 h, 20 h, 24 h, 28 h, 32 h, 36 h, 40 h, 44 h, 48 h, 52 h, 56 h, 60 h, 64 h i 68 h) biomasa je filtrirana pomoću vakuum pumpe na prethodno odmerenim filter papirima, a masa je određivana na vagi (Sartorius) tačnosti 10⁻⁴ g. Radi određivanja suve biomase, micelija je osušena u sušnici na 50°C tokom 24 h, a zatim je rehidrirana u uslovima sobne temperature i vlažnosti vazduha tokom još 24 h radi nadoknađivanja sadržaja vode u samom filter papiru. Vrednosti prikazane u ovoj tezi su dobijene na osnovu tri nezavisna gajenja gljive.

3.1.1.5 Određivanje uticaja dužine tretmana selenitom na rast micelija

Ispitan je uticaj Na₂SeO₃ na rast micelija *P. blakesleeanus* zbog metaboličkih i eventualno toksičnih efekata. Micelija je uzgajana u erlenmajerima nakon čega je filtrirana i isprana, a sveža biomasa (*engl.* fresh weight - FW) podeljena na jednake delove koji su prebacivani u erlenmajere od 100 mL sa 20 mL svežeg medijuma bez i u prisustvu

natrijum selenita (u koncentracijama 10, 25, 50, 100, 250 i 500 μM , 1mM i 10 mM). Nakon 10 sati rasta u svežem medijumu sa i bez selenita, micelija je filtrirana pomoću vakuum pumpe i ispirana sa po 20 mL Na-Pi koncentracije 10 mM i pH vrednosti 7,5 uz dodatak 1 M etilendiamintetrasirćetne kiseline (*engl.* ethylenediaminetetraacetic acid – EDTA). Isprani medijum je sačuvan u frižideru u pojedinačnim vijalama zapremine 50 mL na temperaturi -20°C . Isprani uzorci su sušeni na filter papiru u sušnici 24 sata na temperaturi od 50°C . Suva masa uzoraka je određivana na vagi proizvođača Sartorius tačnosti 10^{-4}g . Medijum i osušeni uzorci su korišćeni za merenja sadržaja selena indukivano spregnutom plazmom sa optičkom emisionom spektroskopijom (*engl.* Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy – ICP-OES). Prirast biomase je određivan u tri nezavisna eksperimenta sa po dva ponavljanja ($n = 6$).

Vremenski zavisna toksičnost Na_2SeO_3 je ispitana utvrđivanjem efekta 100 μM rastvora Na_2SeO_3 na miceliju gljive *P. blakesleeanus*, koja je prethodno gajena 24 h, izlaganjem tokom 30 minuta, 1 h, 3 h, 24 h i 48 h. U svim slučajevima, izlaganje micelije Na_2SeO_3 izvedeno je u istom odnosu vlažne biomase i rastvora Na_2SeO_3 u svežem medijumu ($\sim 300\text{ mg}/20\text{ mL}$ medijuma) kako bi se izbegao mogući efekat količine biomase na difuziju Na_2SeO_3 . Da bi se kvantitativno uporedila održivost micelija pod stresnim i kontrolnim uslovima, korišćena je stopa rasta micelija koja je predstavljala približnu vrednost nagiba krive rasta tokom eksponencijalne faze.

3.2 Biohemijaska ispitivanja

Za eksperimente određivanja sadržaja proteina, enzima i glutaciona je gljiva uzgajana prema postupku opisanom u prethodnom odeljku. Nakon 24 časa rasta micelija je filtrirana a jednake količine sveže biomase su odmerene u manje erlenmajere koji su sadržali 20 mL svežeg minimalnog medijuma za uzgoj *P. blakesleeanus*. Uzorci su tretirani sa 10 μL 200 mM pripremljenog štoka Na_2SeO_3 (finalna koncentracija 100 μM) i to u vremenskom trajanju od 30 minuta, 1 h, 3 h, 24 h i 48 h. U kontrolne uzorke je dodat samo Na-Pi pufer odgovarajuće zapremine. Radi pripreme uzoraka za eksperimente određivanja sadržaja proteina, enzima i glutaciona je izvršena homogenizacija micelija nakon isteka vremena tretiranja Na_2SeO_3 .

Za određivanje aktivnosti enzima i sadržaja proteina je nakon tretmana po 100 mg filtrirane biomase odmereno u sterilne bočice u koje je zatim ubačena kuglica za maceriranje tkiva (5 mm) i 0,5 mL 50 mM K-Pi (kalijum fosfatni pufer) pH = 7,2. Homogenizacija je izvršena pomoću uređaja *TissueLyserII* (Quiagen, Nemačka) na 30 Hz tokom 1 minuta. Pre otvaranja, uzorci su vrlo kratko centrifugirani (4°C , 17000 G, *Eppendorf resort 5415R*, Nemačka) da bi se potencijalni sadržaj iz čepa spustio, a zatim je svakom uzorku dodato po još 0,5 mL 50 mM K-Pi pH = 7,2. Uzorci su potom promućkani i ostavljeni na ledu tokom 15 minuta, uz konstantno mešanje, a zatim su centrifugirani

još 15 minuta pri istim parametrima, da bi se razdvojile kuglice i ćelijski zidovi od supernatanta. Dobijeni supernatant je zatim odliven u nove bočice i korišćen za određivanje sadržaja proteina, peroksidaza (*engl.* peroxidase – POD) i GST. Za određivanje preostalih enzima je upotrebljen isti pufer, ali sa dodatkom 1 mM fenilmetilsulfonil fluorida (*engl.* phenylmethylsulfonyl fluoride – PMSF), kao inhibitora proteaza i 1 mM D-izo-askorbata, kao antioksidanta. Odnos vlažne biomase i pufera je iznosio 1:5. Supernatanti su do izvođenja eksperimenata čuvani u zamrzivaču na -80°C.

Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima, kao i spektara eksudata micelije gljive *P. blakesleeanus*, je izvršeno na Cary 60 UV-Vis spektrofotometru (Agilent Technologies, Santa Klara, Kalifornija, SAD) u kivetama zapremine 1 mL.

Za eksperimente određivanja sadržaja glutaciona je odmereno po 100 mg filtrirane biomase. Homogenizacija je izvršena pomoću uređaja *TissueLyserII* (Quiagen, Nemačka) na 30 Hz tokom 1 minuta. Potom je dodato po 0,5 mL rastvora za ekstrakciju (0,1 M HCl x 1 mM EDTA i 43 µL 9,2 M HClO₄) čime su uzorci deproteinizovani, a zatim centrifugirani 15 minuta na 17000 G i 4°C. Supernatanti su neutralisani tako što je u svaki uzorak dodato 0,5 mL 2 M K₂HPO₄, a zatim su centrifugirani još 5 minuta na 5000 G, 4°C. Dobijeni supernatanti su odliveni u nove bočice i odmah korišćeni za determinaciju sadržaja ukupnog glutaciona, razblaženi 10 puta sa 125 mM Na-Pi puferom pH = 7,5 sa dodatkom 6,3 mM EDTA. Derivatizacija nerazblaženih uzoraka služi za određivanje koncentracije oksidovanog glutaciona i vrši se inkubacijom uzoraka oko 40 minuta na 25°C, sa 295 mM akrilonitrilom i 125 mM Na-Pi puferom x 6,3 mM EDTA pH = 8. Konjugacijom GSH sa akrilonitrilom se GSH uklanja iz uzorka. Rezultati su preračunati u odnosu na standardne rastvore GSH (koncentracije 5-20 mM) i GSSG (koncentracije 2-10 mM).

3.2.1 Određivanje sadržaja proteina

Koncentracija proteina je određivana metodom Bredforda (Bradford, 1976). Kao standardni protein upotrebljen je goveđi serum albumin (*engl.* Bovine Serum Albumin – BSA). Apsorbanca je merena spektrofotometrijski nakon 20 minuta razvoja reakcije na talasnoj dužini 620 nm. Uzorci su po potrebi razblaženi puferom, dok je odnos zapremine prilagođen (uzorak : boja = 5 : 200) tako da odgovara čitaču mikrotitar pločica.

3.2.2 Određivanje aktivnosti CAT

Aktivnost CAT je merena pomoću kiseonične elektrode tipa Klark (Clark, 1953) prema metodi Del Río et al. (1977). Tokom merenja, temperatura od 25°C je održavana pomoću protočnog vodenog kupatila. Reakcija se odvijala u 100 mM K-Pi puferu pH vrednosti 7,5 i početne koncentracije kiseonika između 200 i 300 nmol/mL. U reakcionu

smešu je dodavano po 12 μL H_2O_2 (12 mM) i 2-10 μL uzorka zbog velike aktivnosti. Softveri *Oxygraph 32* i *Logger Pro* su beležili promenu koncentracije kiseonika (nM) tokom vremena. Aktivnost enzima CAT je izražena po mg sadržaja proteina.

Razdvajanje izoformi CAT i SOD je izvršeno pomoću native elektroforeze na poliakrilamidnom gelu (*engl.* Polyacrylamide Gel Electrophoresis – PAGE), metodom Lemlija (Laemmli, 1970). Pripremljen je 8% gel za razdvajanje koji je pogodan za razdvajanje proteina veličine 50-200 kDa, u koji spadaju i subjedinice nativnih molekula CAT i SOD (55-85 kDa, odnosno ~ 65 kDa). Ovaj gel su činili 8% akrilamid, 0,1% amonijum persulfat, 1,5 M Tris-HCl pufer pH vrednosti 8,8 i 0,06% N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (*engl.* N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine – TEMED) koji se kao polimerizator poslednji dodaje u smešu. Gel za koncentrovanje uzoraka je bio 4% (4% akrilamid, 0,1% amonijum persulfat, 0,126 M Tris-HCl pufer pH vrednosti 6,8 i 0,1% TEMED). Uzorcima je dodat glicerol a koncentracija proteina je podešena tako da 18 μL uzorka sadrži 20 μg proteina. U svaki bunarčić na gelu je nanošeno po 18 μL uzorka. Aktivnost SOD je vizuelizovana metodom Beauchamp i Fridovich (1971). Kao boja za praćenje elektroforetskog razdvajanja proteina na gelu je korišćena 0,1% brom fenol plavo. Elektroforeza je vršena tokom 1,5 h strujom jačine 40 mA, napona 200 V i snage 9 W. Pufer za elektroforezu je sadržao 24,8 mM tris(hidroksimetil)aminometan (*engl.* Tris(hydroxymethyl)aminomethane – TRIS) i 191,8 mM glicin u dH_2O , pH vrednosti 8,3. Nakon isteka vremena su gelovi dobro isprani destilovanom vodom i obojeni rastvorom za bojenje.

Boja za detekciju SOD se sastojala od 50 mM K-Pi pufera pH vrednosti 7,8 (konačna zapremina 25 mL), nitro plavi tetrazolijum hlorid (*engl.* Nitro Blue Tetrazolium – NBT) koncentracije 0,48 mM (5,5 mg/25 mL), 8,4 μM riboflavina (0,0015 g/25 mL), 200 μL EDTA (konačne koncentracije 1 mM) i 5 μL TEMED (konačne koncentracije 0,2 mM). Da bi se razlikovale forme SOD, pre bojenja su gelovi inkubirani u 100 mM K-Pi puferu (pH = 7,8) sa dodatkom 5 mM KCN ili 5 mM H_2O_2 . KCN inhibira Cu/Zn-SOD tako što formira kompleks sa metalnim centrom molekula čime se blokira transfer elektrona i prekida antioksidativna aktivnost enzima. MnSOD je rezistentna na KCN ali osetljiva prema visokim koncentracijama peroksida. Nakon inkubacije, gelovi su temeljno ispirani sa velikom količinom destilovane vode. Tako pripremljeni gelovi su tokom ~ 10 minuta pažljivo osvetljeni veštačkom UV svetlošću radi izazivanja fotohemijske reakcije. Izabran je izvor veštačke svetlosti radije nego prirodna sunčeva svetlost zbog slabijeg intenziteta (s obzirom na to da je eksperiment vršen tokom letnjeg perioda) i samim tim bolje kontrole brzine razvoja fotohemijske reakcije koja izaziva tamnjenje gela.

Prisustvo CAT je detektovano bojenjem gela u smeši 1% fericijanida ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) i 1% FeCl_3 nakon inkubacije u 5 mM H_2O_2 , prema Woodbury et al. (1971). Inkubacija gelova u 5 mM H_2O_2 je vršena u tami tokom 30 minuta nakon čega su ponovo obilno isprani destilovanom vodom. Peroksid obezbeđuje sredinu u kojoj CAT deluje a

ispiranjem se uklanja višak H₂O₂. Soli gvožđa reaguju sa rezidualnim H₂O₂ u gelu tako što formiraju plavo obojeni kompleks. Mesta na gelu gde je došlo do razlaganja H₂O₂ ostaju neobojena što ukazuje na aktivnost CAT.

Svi koraci su izvedeni pri sobnoj temperaturi.

3.2.3 Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti SOD

Aktivnost enzima SOD je određivana indirektno, putem evaluacije redukcije citohroma *c*, u sledećim reakcijama:

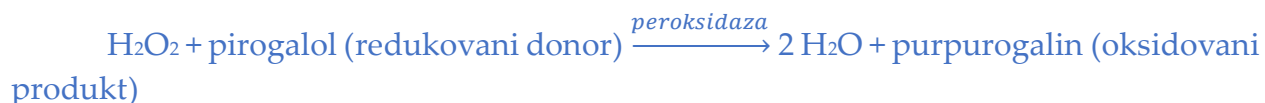


Superoksid redukuje citohrom *c*. Međutim, u prisustvu SOD je stopa redukcije smanjena zbog toga što dolazi do kompeticije između SOD i citohroma *c*.

Jedna jedinica je definisana kao količina SOD potrebna za inhibiciju stope redukcije citohroma *c* za 50% na 30°C. Po 5 μL uzorka je dodato reakcionoj smeši (50 μM ksantin u 1 mM NaOH, 0,001 U ksantin oksidaze i 10 μM citohroma *c* u 50 mM K-Pi puferu pH vrednosti 7,8 sa 1 mM EDTA) do ukupne zapremine 1 mL. Apsorbancija je merena na 550 nm tokom 1,5 minuta. Aktivnost enzima je izražena po jedinici zapremine uzorka (U/ml) kao i prema količini proteina (U/mg).

3.2.4 Određivanje aktivnosti POD

Determinacija enzimske aktivnosti POD upotrebom pirogalola kao supstrata, odnosno donora elektrona, određuje se spektrofotometrijski na talasnoj dužini 420 nm prema reakciji:



Prema Maehly & Chance (1954), jedna jedinica POD (U) se definiše kao količina enzima koja je potrebna za formiranje 1 mg purpurogalina iz pirogalola, za 20 sekundi pri pH vrednosti 6 i temperaturi od 20°C. Prema modernoj definiciji 1 U POD odgovara količini enzima koja katalizuje konverziju 1 μM pirogalola u purpurogalin tokom 1 minuta reakcije, u uslovima izvođenja esej. Za ovaj esej su korišćeni rastvori pirogalola

koncentracije 42 mM i 8 mM H₂O₂. Reakcija se odvijala tokom 10 minuta u K-Pi puferu pH vrednosti 6 i koncentracije 50 mM, a zapremina uzorka je iznosila 50-100 µL.

3.2.5 Određivanje aktivnosti GPx

Determinacija aktivnosti GPx se vršila spektrofotometrijski, metodom koju je opisao Drotar (Drotar et al., 1985). Metoda se bazira na reakciji oksidacije GSH do GSSG koju katalizuje enzim GPx:



Ova reakcija se zatim kompletira recikliranjem GSSG u GSH pomoću GR i NADPH:



Praćenje potrošnje NADPH se manifestuje smanjenjem apsorbcije NADPH tokom oksidacije NADPH u NADP⁺, što je indirektni pokazatelj aktivnosti GPx, pošto je GPx faktor koji ograničava brzinu gore pomenutih spregnutih reakcija.

Reakcionu smešu ukupne zapremine 1 mL su činili 2 mM GSH, 200 µM NADPH, 2,5 U GR i 2 mM kumen hidroperoksid u 50 mM K-Pi puferu sa 1 mM EDTA, pH vrednosti 7. Upotreba kumen hidroperoksida kao supstrata omogućava merenje aktivnosti GPx koje sadrže selen, kao i onih koje ga ne sadrže. Promena apsorbcije je merena na 340 nm tokom 5-10 minuta na 25°C. Zapremina uzorka je iznosila 20-100 µL. Početna apsorbcija se kretala od 0,8 do 1,1.

3.2.6 Određivanje aktivnosti GR

Aktivnost enzima GR je određivana metodom Smith et al. (1988). U ovom enzimskom eseju GR redukuje GSSG u GSH, koji zatim reaguje sa 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoičnom kiselinom (*engl.* 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) – DTNB).



U reakciji tiola sa DTNB dolazi do raskidanja disulfidnih veza i nastanka TNB⁻ (*engl.* 2-nitro-5-thiobenzoate - 2-nitro-5-tiobenzoat), koji pri neutralnim i alkalnim pH uslovima jonizuje u TNB²⁻.



TNB²⁻ jon daje žutu boju rastvoru. Aktivnost GR se meri indirektno promenom apsorbancije uzrokovane redukcijom DTNB na 412 nm, sa koeficijentom ekstinkcije $\epsilon(\text{TNB}) = 14,15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Reakcionu smešu su činili 0,75 mM DTNB, 0,1 mM NADPH, 20 μM GSSG u 50 mM K-Pi pufer pH vrednosti 7,5, konačne zapremine 1 mL. Zapremina uzorka je iznosila 100 μL . Početna apsorbancija je iznosila od 0,09 do 0,15.

3.2.7 Određivanje aktivnosti GST

Enzimski esej za određivanje aktivnosti GST je zasnovan na GST-katalizovanoj reakciji između GSH i supstrata 1-hloro-2,4-dinitrobenzena (*engl.* 1-chloro-2,4-dinitrobenzene – CDNB) prema metodi Habig et al. (1974). CDNB je pogodan za najširi spektar detektabilnosti GST izoenzima (npr. alfa-, mu-, pi- i druge GST izoforme), te je ovaj esej namenjen za merenje ukupne GST aktivnosti. Konjugacijom tiolne grupe glutaciona sa CDNB supstratom se dobija GS-DNB, dinitrofenil tioetar, što dovodi do povećanja apsorbancije na 340 nm.



Jedna jedinica GST je definisana kao količina enzima koji proizvodi 1 μmol GS-DNB konjugata/min u uslovima enzimskog eseja.

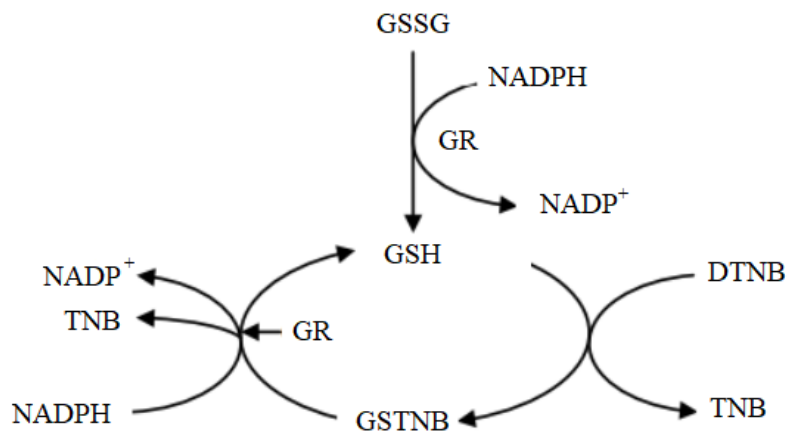
Reakcionu smešu su činili 1 mM CDNB i 1 mM GSH u 50 mM K-Pi puferu pH vrednosti 6,5. U reakcionu smešu je dodavano po 100-150 μL uzorka do konačne zapremine reakcione smeše 1 mL a promena apsorbancije je praćena tokom 3-5 minuta. Početna apsorbancija je iznosila oko 0,4.

3.2.8 Određivanje sadržaja ukupnog i oksidovanog glutaciona

Glutacion je analiziran metodom recikliranja pomoću DTNB i GR, pri čemu se formira žuto obojen TNB, čija se koncentracija se meri spektrofotometrijski na 412 nm (Tietze, 1969). Količina TNB je proporcionalna sadržaju GSH, koji se procenjuje poređenjem sa standardnom krivom. Ova metoda detektuje količinu GSH, GSSG i glutaciona vezanog u obliku disulfida sa drugim tiolima, uz visoku osetljivost (10–144 mol) i specifičnost zasnovanu na enzimu GR.

Za selektivno određivanje količine GSSG se koristi supstanca koja blokira GSH. Prvobitno je korišćen NEM (Griffith, 1980), ali budući da je inhibitor enzima zamenjen je sa 2-VP, koji ne inhibira enzime ali ima neprijatan miris i lako polimerizuje. Zbog tih ograničenja, Matsumoto et al. (1996) su uveli akrilonitril kao alternativni reagens - što je i primenjeno u ovoj tezi.

U ovoj modifikovanoj metodi, GSSG se redukuje u GSH pomoću NADPH i GR, dok se GSH vezuje sa akrilonitrilom, čime se omogućava pojedinačna kvantifikacija GSH i GSSG bez potrebe za uklanjanjem reagensa. Sistem recikliranja dodatno poboljšava osetljivost i efikasnost detekcije ukupnog glutaciona.



Slika 11: Enzimatsko recikliranje redukovanog glutaciona (preuzeto sa https://cdn.gbiosciences.com/pdfs/protocol/786-075_protocol.pdf).

Reakcionu smešu za određivanje ukupnog glutaciona su činili rastvori (u 1 mL reakcione smeše) 0,2 mM NADPH, 0,6 mM DTNB, 0,6 U GR i 125 mM Na-Pi pufer sa 6,3 mM EDTA pH vrednosti 7,5. Kao uzorak je korišćen supernatant dobijen na način opisan u poglavlju 3.2. Promena optičke gustine reakcije je praćena na 412 nm u trajanju od 2-3 minuta. Početna apsorbanacija je iznosila ~ 0,3.

Za određivanje oksidovanog glutaciona je prethodno izvršena derivatizacija uzoraka, na način opisan u poglavlju 3.2, a zatim je urađen esej kao za ukupni glutation, bez razblaživanja uzoraka. Količina redukovanog glutaciona je dobijena indirektno, izračunavanjem razlike između količine ukupnog i oksidovanog glutaciona.

3.3 Priprema micelije za skenirajuću elektronsku mikroskopiju sa energetski disperzionom spektroskopijom X-zračenja (*engl.* Scanning Electron Microscopy - Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy - SEM-EDS)

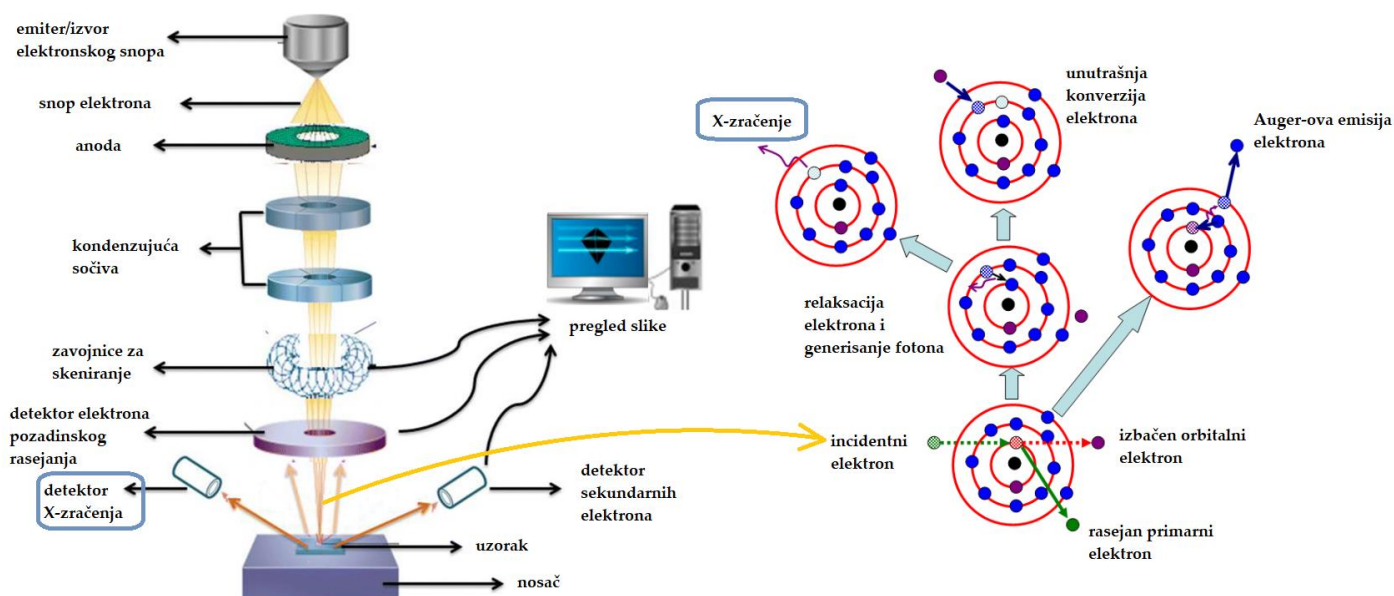
Pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije sa energetski disperzionom spektroskopijom X-zračenja su ustanovljeni morfoloija i elementarni sastav SeNP.

Za potrebe SEM-EDS merenja, micelija starosti 24 sata je procedena vakuum pumpom i isprana modifikovanim minimalnim medijumom bez fosfata i mikroelemenata. U sterilne bočice je odmereno je po 200 mg uzoraka koji su zatim inkubirani 24 sata u 1 mL svežeg medijuma sa dodatkom natrijum selenita (Se⁴⁺) i natrijum selenata (Se⁶⁺) u konačnoj koncentraciji 10 mM. Micelija tretirana 10 mM

rastvorom Na_2SeO_3 je nakon 24 h isprana dva puta centrifugiranjem (4500 G) tokom 10 min 50 mM K-Pi puferom pH vrednosti 6. Uzorci su uronjeni u 3% rastvor glutaraldehida (GA) u istom medijumu tokom 30 min na sobnoj temperaturi, nakon čega su isprani Na-Pi puferom i potom fiksirani u 3% rastvoru GA tokom noći na temperaturi 4°C. Nakon toga, uzorci su dehidrirani u rastvorima etanola rastućih koncentracija (30%, 50%, 70% i 90%) od po 1 h, zatim u hloroformu pa u 100% etanolu tokom 1 h, nakon čega su ostavljeni tokom noći u 100% etanolu na 4°C. Uzorci su sušeni u sušaču *Critical Point Dryer* K850 CPD (Quorum Technologies, UK), prekriveni zlatnim filmom raspršivanjem tokom 100 s na 30 mA (Baltec SCD 005), i potom ispitani skenirajućim elektronskim mikroskopom (JSM-6390LV, JEOL USA, Inc).

EDS analiza je vršena na površini od $500 \mu\text{m}^2$ po uzorku (EDS, Oxford Aztec X-max).

Za SEM-EDS analizu rastvorljive frakcije, micelija tretirana selenitom je ispirana i filtrirana na vakuum pumpi, a zatim resuspendovana u dejonizovanoj vodi u odnosu 1:20 (w/v). Uzorci su nakon toga centrifugirani na 15000 G tokom 10 minuta da bi se izdvojio eksudat za analizu. Eksudat je sakupljen i filtriran kroz membranu sa porama prečnika $0,22 \mu\text{m}$. Alikvoti od $5 \mu\text{L}$ eksudata su postavljeni na SEM rešetku obloženu ugljenikom i osušeni na vazduhu pre merenja. Uzorci su postavljeni na nosač i tokom merenja hlađeni mlazom tečnog azota. Putem SEM (Vega TS 5130MM) su dobijene elektronske mikrofotografije pri naponu od 30 V. EDS merenja su vršena na 5 različitih pozicija od 4 uzorka izabrana na osnovu distribucije SeNP na SEM mikrografijama.

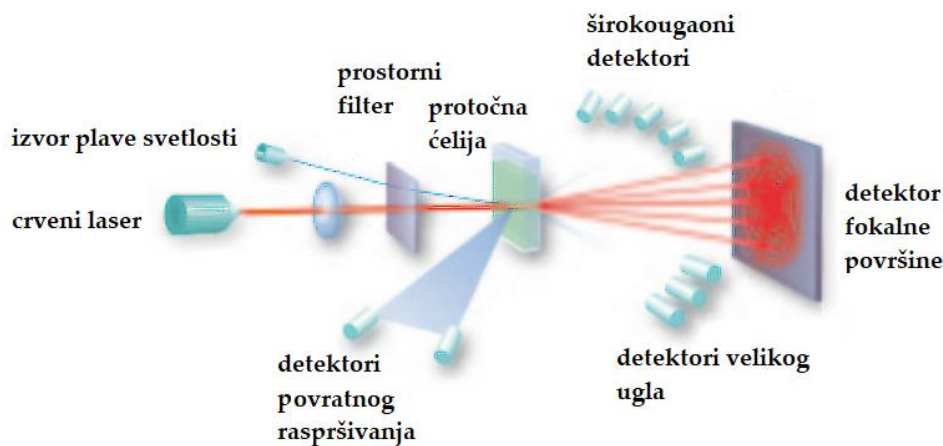


Slika 12: Šematski prikaz SEM uređaja. **Levo:** izvor elektrona emituje elektrone koji formiraju snop. SEM tehniku karakteriše nanometarska prostorna rezolucija jer je De Brojjeva (*engl.* Louis de Broglie) talasna dužina snopa elektrona koji se koristi daleko manja od optičkih talasnih

dužina te se na taj način prevazilazi ograničenje optičke difrakcije. Set sočiva aparature fokusira elektronski snop na površinu uzorka. Napon od 0,1 do 50 keV između katode i anode ubrzava elektrone pre nego što dopru do uzorka. Slika se formira kombinacijom signala koji uključuje sekundarne elektrone, povratno rasejane elektrone, elektrone povratno rasejane difrakcijom, fotone, vidljivu svetlost i toplotu. Sekundarni elektroni i povratno rasejani elektroni su glavni činioци u stvaranju slike uzoraka. Sekundarni elektroni daju informacije o morfologiji i topografiji uzorka, dok se povratno rasejani elektroni koriste za određivanje kontrasta u sastavu višefaznih uzoraka. **Desno:** u kombinaciji SEM sa EDS tehnikom, analizom dobijenih X-zraka se otkriva hemijski sastav uzorka. X-zračenje nastaje tako što snop elektrona izbacuje elektrone iz unutrašnje orbitale čije mesto zatim zauzimaju elektroni iz viših orbitala. Kretanjem elektrona iz više u nižu orbitalu se oslobađa energija u obliku X-zračenja, koja je jedinstvena za svaki element (modifikovano iz Sarkar et al., 2023; Munir et al., 2021 i Liao, 2006).

3.3.1 Metoda direktnog raspršivanja svetlosti

Distribucija raspodele veličina čestica u eksudatu je određena pomoću spektroskopske metode dinamičkog rasejanja svetlosti (*engl.* Dynamic Light Scattering - DLS), primenom laserskog analizatora veličine čestica raspršivanja svetlosti (*engl.* particle size analyser - PSA) (Mastersizer 2000; Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, Velika Britanija, Slika 13), čiji je opseg merenja od 20 nm do 2000 μm . Pre merenja svi uzorci tretirani su u ultrazvučnom kupatilu tokom 5 minuta.



Slika 13: Princip rada laserskog analizatora veličine čestica raspršivanja svetlosti Mastersizer 2000 (modifikovano iz <https://www.htds.fr/wp-content/uploads/2019/04/Instrumentation-analytique-Analyses-particules-Granulometre-MS2000-2.pdf>)

Aparat na osnovu pravca i intenziteta difrakcije laserske svetlosti određuje veličinu čestica. Opremljen je sa dva lasera, crvenim i plavim.

Parametri crvenog lasera su sledeći:

- Laserski proizvod klase IIIa, odnosno 3R (IEC60825-1(1993)+A1(1997)+A2(2001)), u skladu sa CDRH (Centar za aparate i radiološko zdravlje) i CE propisima Evropske Unije
- Tip lasera: HeNe gasni laser
- Maksimalna izlazna snaga: 4 mV
- Prečnik snopa: 0,63 mm ($1/e^2$)
- Divergencija zraka: 1,5 mrad
- Talasna dužina snopa: 633 nm

Plavi laser karakterišu:

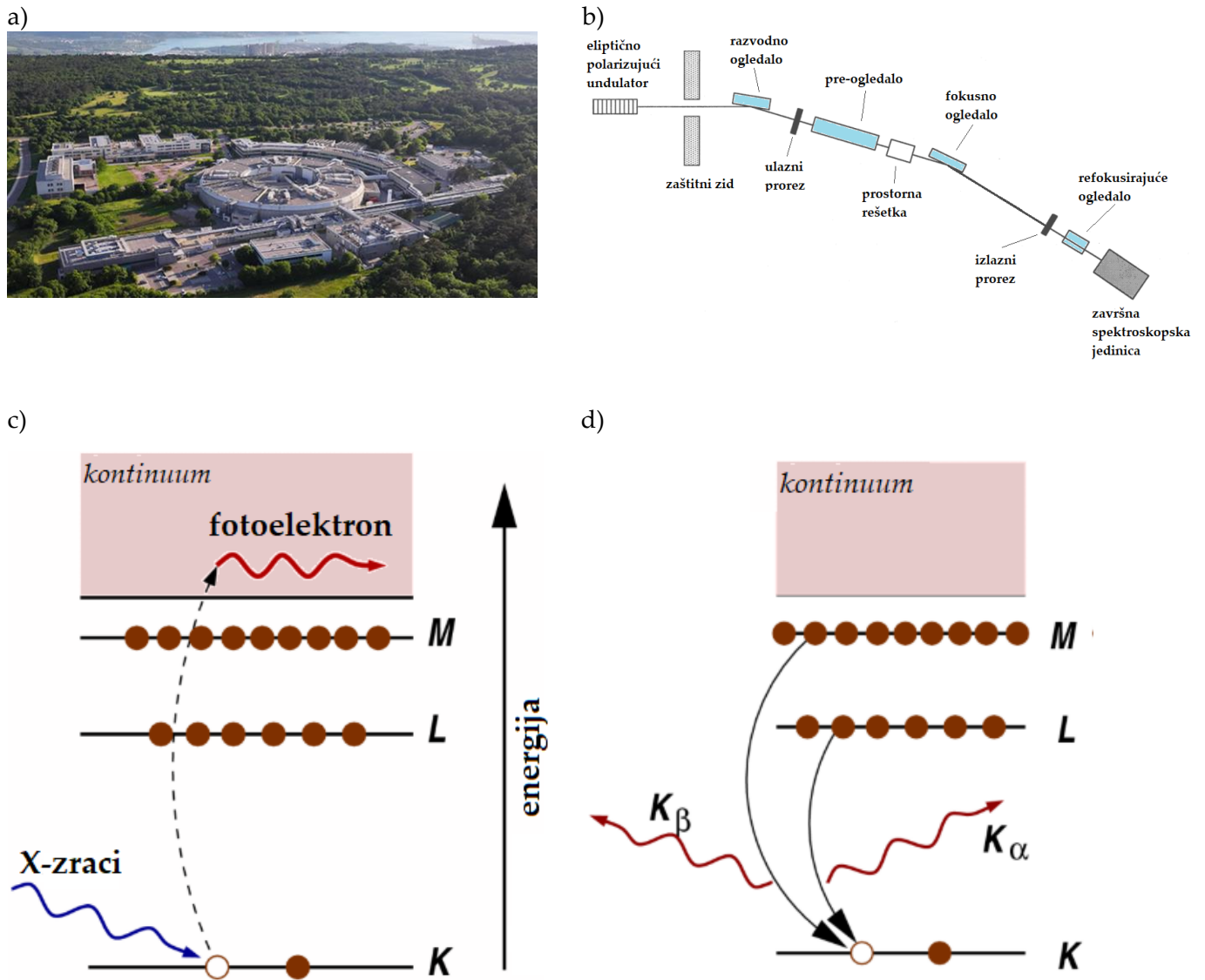
- Talasna dužina snopa: 466 nm
- Tip lasera: LED

Ukupno 52 detektora su pozicionirana oko ravne protočne ćelije. Svrha plavog lasera i detektora povratnog rasejanja je detekcija čestica raspona veličina u Rajlijevom režimu. Instrument je prilagođen za obradu uzorka zapremine 10 mL do 1 L. Uzorak se ubacuje u jedinicu za raspršivanje i po potrebi se dodaje još uzorka ili vode dok se ne postigne zamračenje svetlosti u idealnom opsegu, odnosno 10-20 (broj označava procenat izubljene svetlosti zbog rasejanja ili apsorpcije). Tip disperzije uzorka može biti suvi, vlažni ili mešoviti. Uređaj zatim vrši po tri merenja na svakom uzorku. Raspršivač je potrebno dobro očistiti vodom pre i nakon svakog merenja. Podaci se zatim analiziraju pomoću povezanog softvera, nakon biranja modela rasejanja svetlosti. Moguće je podesiti različite indekse prelamanja za plavu i crvenu talasnu dužinu (plavi i crveni laser), čime se uzimaju u obzir spektralne varijacije u indeksu prelamanja. Za svaki uzorak se može postaviti samo jedan indeks prelamanja što otežava izbor indeksa prelamanja za nehomogen uzorak. Distribucija izračunatih veličina čestica se prikazuje u softveru putem histograma.

3.3.2 Apsorpciona rendgenska spektroskopija sinhrotronskog izvora zračenja (engl. X-ray Absorption Near Edge Spectroscopy - XANES) i Ramanska spektroskopija - utvrđivanje oksidacionih stanja i karakterizacija kristalnog uređenja SeNP

Micelija tretirana 0,5 i 10 mM rastvorom Na_2SeO_3 je filtrirana na vakuum pumpi i resuspendovana u dejonizovanoj vodi u odnosu od 1:20 (w/v). Alikvoti suspenzije micelije zapremine 5 μL su postavljeni na Mylar film prečnika 2,5 μm , pričvršćeni za držač uzoraka i liofilizovani preko noći. XANES merenja su izvedena pomoću niskofrekventne rendgenske fluorescentne mikroskopije bazirana na sinhrotronskim izvorima zraka (engl. X-ray Fluorescence – XRF) u eksperimentalnoj stanici sinhrotrona *Elettra* (Trst, Italija). Uzorci su skenirani rendgenskim zracima u prostornoj rezoluciji 200 μm (horizontalno)

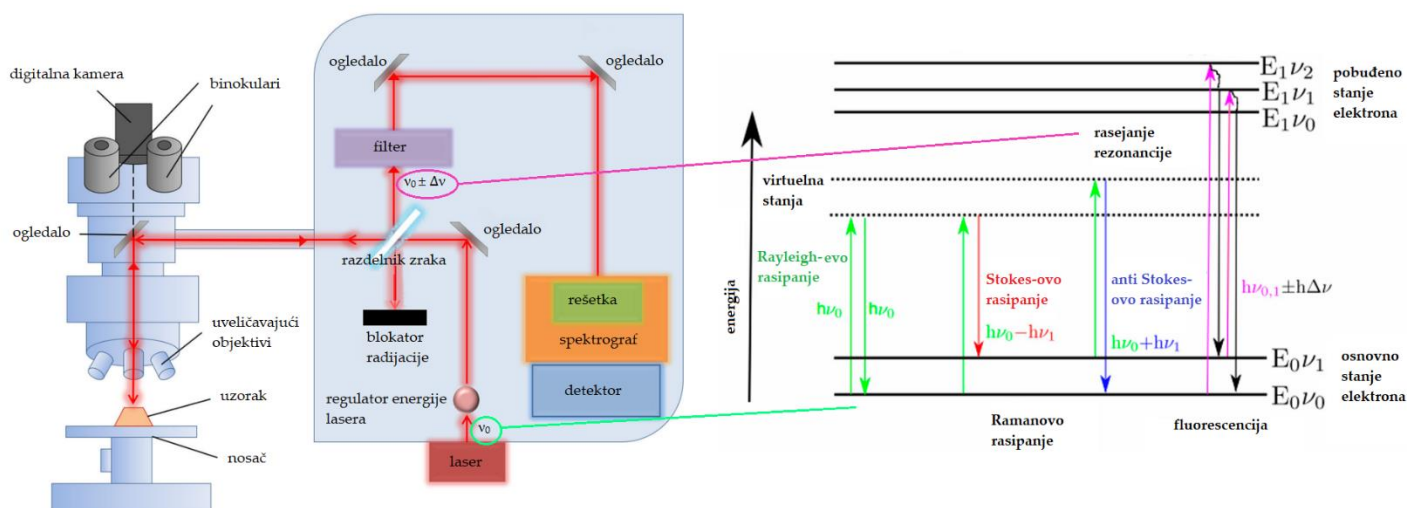
x 100 μm (vertikalno). XANES spektri su dobijeni u fluorescentnom režimu korišćenjem silikonskog detektora pomeraja (Silicon Drift Detector, SDD) (XFlash 5030, Bruker Nano GmbH, Nemačka). Spektri su prikupljeni u rasponu energija od 12500 do 12900 eV, u energetskej rezoluciji od 4 eV u regionu pre nagle promene apsorpcionog koeficijenta (*engl.* absorption edge), 0,2 eV u opsegu najintenzivnijih promena apsorpcionog koeficijenta (*engl.* edge), i $\Delta k = 0,05 \text{ \AA}^{-1}$ u oblasti nakon toga (*engl.* post-edge). Eksperimentalni spektri su obrađeni softverskim paketom DEMETER. Radi utvrđivanja valence selena sadržanog u miceliji gljive, spektri su upoređivani sa snimljenim standardama (Se^0 , Se^{4+} iz Na_2SeO_3 i Se^{2-} iz DMSe) i literaturnim podacima.



Slika 14: a) Elettra Sincrotrone Trieste, multidisciplinarni istraživački centar (preuzeto sa <https://www.elettra.eu/index.html>). b) Šematski prikaz tipičnog izvora zračenja za XANES.

XANES se koristi za određivanje strukturnih karakteristika elementa od interesa u širokom opsegu energija (~ 500 eV do 500 keV) u specijalno konstruisanom postrojenju, sinhrotronu. c) U ovom energetsom režimu, materija apsorbuje zračenje kroz fotoelektrični efekat. Energija veze elektrona atoma (obično 1s ili 2p) mora biti manja od energije upadnog rendgenskog zraka da bi elektron bio emitovan. Rendgenski zraci energije jednake energiji veze jednog od najčvršće vezanih elektrona bivaju apsorbirani od strane atoma oslobađajući elektrone koji bivaju emitovani na neki od viših energetskih nivoa u skladu sa dipol-dipol pravilom prelaza, ili u kontinuum. d) Nakon apsorpcije rendgenskih zraka, elektroni sa viših energetskih nivoa popunjavaju upražnjena mesta u cilju postizanja stabilnosti atoma, dok se energija jednaka razlici energetskih stanja nivoa sa kojeg elektron prelazi na niži nivo i energije nižeg nivoa oslobađa u vidu fotonskog zračenja iste energije (radijacioni proces). Na slici je predstavljen jedan vid raspada, rendgenska fluorescencija, pri kojoj elektron više energije na nivou jezgra popunjava prazninu na nižem nivou jezgra pritom izbacujući rendgenski zrak definisane energije (elektron sa nivoa L koji prelazi u nivo K odaje energiju K_{α}). Energije fluorescencije su karakteristične za atom i stoga služe za identifikaciju atoma (modifikovano iz Young et al., 2002 i Newville, 2014).

Ramanovi spektri su snimljeni na Thermo DXR Raman mikroskopu. Alikvoti od 5 μL suspenzije micelije su postavljeni na zlatne ploče i mereni pod uvećanjem mikroskopa od 50x, koristeći 532 nm lasersku ekscitacionu liniju konstantne snage od 10 mW. Vreme ekspozicije je bilo 30 s, sa ukupno 10 ekspozicija od po 900 linija/mm i prorezom spektrografa od 50 μm . Automatska korekcija fluorescencije je uklonjena korišćenjem OMNIC softvera (Thermo Fisher Scientific).



Slika 15: Ramanova mikroskopija. Ramanova spektroskopija se zasniva na Ramanovom efektu, koji podrazumeva neelastično rasejanje upadnog monohromatskog elektromagnetnog zračenja kroz interakciju sa kristalnom rešetkom ili molekularnom strukturom (Chandra et al., 2024; Deluca et al., 2023). Različiti mehanizmi pobuđivanja mogu dovesti do Ramanovog

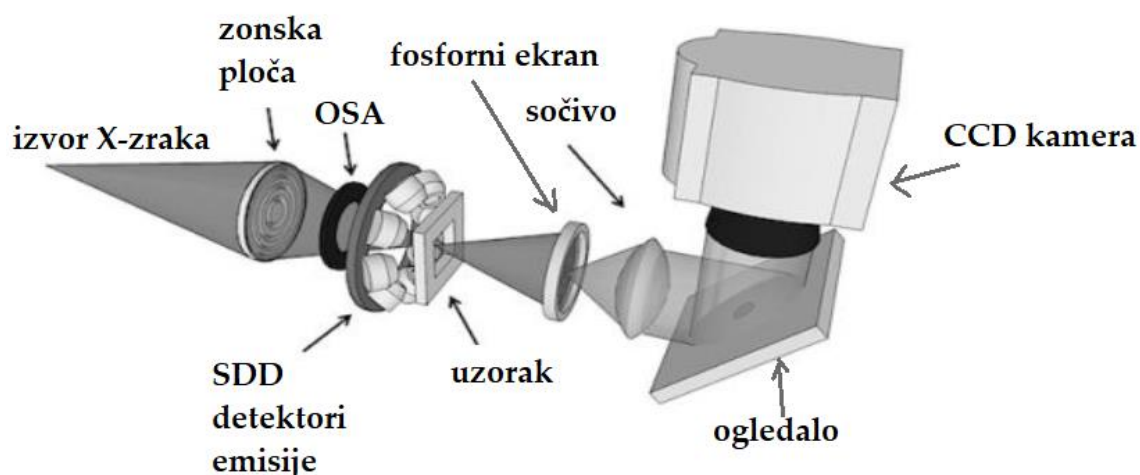
rasejanja, ali najveći doprinos ovom fenomenu potiče od optičkih fotona, tj. kvantizovanih vibracija kristalne rešetke (Deluca et al., 2023). Za proizvodnju monohromatske svetlosti se koriste laseri u vidljivom, bliskom infracrvenom ili bliskom ultraljubičastom rasponu spektra, kao i rendgensko zračenje (Chandra et al., 2024). Energija i pravac upadnih fotona lasera se menjaju u intreakciji sa sistemom, što rezultira neelastičnim rasejanjem različite energije od energije incidentnog zraka. Promene u frekvenciji i talasnoj dužini mogu se koristiti za identifikaciju promene energije rasejane svetlosti. Mehanizmi rasejanja (Stoksovo, anti Stoksovo i Rajlijevo rasejanje) odgovaraju gubitku ili dobitku energije fotona. Stoksov proces podrazumeva apsorpciju energije od strane atoma, dok je energija rasejanog fotona manja od energije incidentnog fotona. Ovaj proces je statistički verovatniji na sobnoj temperaturi, što ga čini intenzivnijim i češće analiziranim. Pri Rajlijevom rasejanju nema promene energije, a promene frekvencije su simetrične. Anti Stoksovo rasejanje karakteriše veća energija rasejanog fotona od energije incidentnog fotona, što znači da atom gubi energiju. Ramanova spektroskopija je veoma osetljiva na faktore koji utiču na energiju optičkih fotona, što uključuje formiranje ili cepanje hemijskih veza, fazne prelaze, stres ili defekte strukture rešetke, a sve se to može detektovati kroz promene u Ramanovom spektru koje su predstavljene kao razlika u frekvenciji fotona lasera i rasejane svetlosti u cm^{-1} (Chandra et al., 2024; Deluca et al., 2023). **Levo:** šematski dijagram Ramanovog mikroskopa. **Desno:** istaknuta su osnovna rasipanja i fluorescentne ekscitacije uzorka nakon upotrebe izvora monohromatske svetlosti (lasera) frekvencije ν_0 . Ramanovi mehanizmi rasipanja sa karakterističnim promenama frekvencije $\Delta\nu$ koja odgovara razlici između vibracionih energetske nivoa (modifikovano iz Zapata et al., 2020 i Sarkar et al., 2023).

Za ekstrakciju rastvorljive frakcije, micelija je filtrirana i isprana na vakuum pumpi a zatim homogenizovana pomoću kuglica od nerđajućeg čelika prečnika 5 mm u *TissueLyserII* (Quiagen, Nemačka) pri frekvenciji od 30/s tokom 1 min. Macerirana biomasa je zatim resuspendovana u 50 mM K-Pi puferu pH vrednosti 7,2 u odnosu 1:2,5 (w/v). Homogenat je mućkan na ledu 30 min, a zatim centrifugiran 15 min na 15000 G. Supernatant je odliven i dalje centrifugiran na 100000 G tokom 30 minuta, radi odstranjivanja delova ćelijske membrane i organela. Dobijena rastvorljiva frakcija je podeljena na alikvote zapremine 1 mL koji su sačuvani na -80°C do upotrebe.

3.3.3 Rendgenska fluorescentna mikroskopija niskih energija bazirana na sinhrotronskim izvorima zraka (*soft XRF*)

Usvajanje Se i njegova prostorna distribucija u ćelijama su istraženi pomoću XRF. Za ove eksperimente micelija je sakupljena nakon 24 h, dostižući eksponencijalnu fazu rasta. Micelija je inkubirana u medijumu sa 0,5, 1 i 10 mM rastvorom Na_2SeO_3 tokom različitih perioda inkubacije (1 h, 10 h, 24 h i 72 h), nakon čega su isprani i resuspendovani u dejonizovanoj vodi u odnosu 1:20 (w/v). Alikvoti suspenzije micelije zapremine 5 μL postavljeni su na membranu od silicijum nitrida debljine 100 nm, površine $1 \times 1 \text{ mm}^2$ i

liofilizovani preko noći. XRF merenja su obavljena na TwinMic eksperimentalnoj stanici postavljenoj u sinhrotronskom postrojenju *Elettra* (Trst, Italija). Silikonsko-nitridne membrane su postavljene i fiksirane na držaču uzoraka normalno na pravac fokusiranog snopa za merenja koja su obavljena u uslovima ultra-visokog vakuuma. Energija pobude od 1750 eV, potrebna za ekscitaciju L-elektrona Se, podešena je izborom optimalne faze faznog undulatora umetnutog u pravolinijski deo akumulacionog prstena u kome elektroni cirkulišu brzinama bliskim brzini svetlosti i refokusiranjem zraka na monohromator koji se sastoji od difrakcione rešetke i ravnog ogledala u cilju podešavanja energije za eksperimente. Konačna prostorna rezolucija je postignuta izborom kružnog otvora željenih dimenzija koji predstavlja sekundarni izvor zraka. Fotoni se fokusiraju pomoću difrakcionog optičkog sistema koji se sastoji od kružne difrakcione rešetke sastavljene od naizmenično pravilno raspoređenih transparentnih i netransparentnih prstenova (*engl.* Fresnel zone plate), netransparentnog prstena sa centrom na osi simetrije rešetke koji blokira više harmonike, propuštajući samo snop koji odgovara prvom difrakcionom maksimumu. Uzorci su skenirani snopom fotona makroskopski konstantnog prostornog položaja, dobijenog difrakcijom na kružnoj difrakcionoj rešetki, fokusiranim u ravni uzorka koja se lateralno prostire duž dva uzajamno normalna pravca koja čine ravan normalnu na izvorni fotonski snop. Hemijske mape dobijene su primenom sistema od 8 SDD detektora radijalno raspoređenih u neposrednoj blizini uzorka pokrivajući PUN čvrst ugao u cilju detekcije maksimalnog broja ozračenih fotona. Istovremeno, apsorpcione i slike diferencijalne faze uzorka su dobijene u transmissionom režimu korišćenjem STXM koji se sastoji od sistema za konverziju vidljive svetlosti koji usmerava odlazeće fotone ka brzo-očitavajućoj CCD kameri postavljenoj na vrhu vakuumske komore (Slika 16).



Slika 16: Šematski prikaz TwinMic u STXM režimu rada. OSA predstavlja otvor blende za odabir reda difrakcije. SDD su silicijumski drift detektori. Sistem za konverziju vidljive svetlosti, koji usmerava fotone ka CCD kameri, čine fosforni ekran, sočivo i ogledalo pod uglom

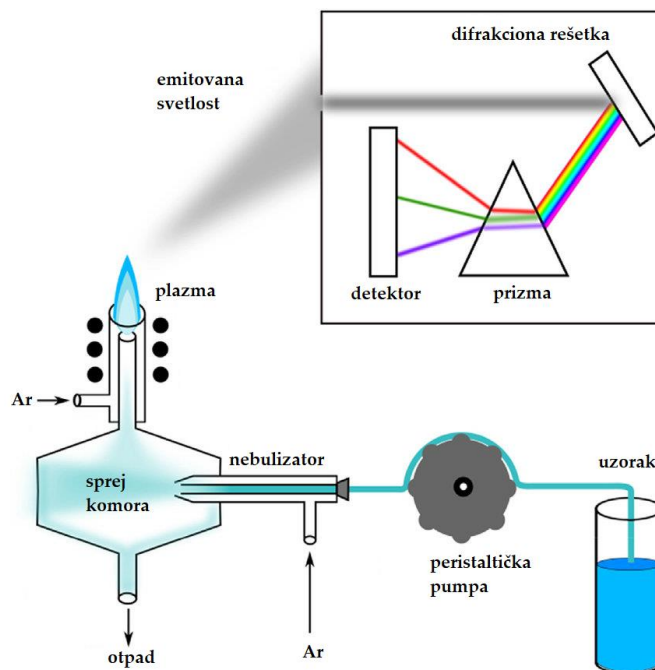
45° (modifikovano sa <https://www.elettra.eu/lightsources/elettra/elettra-beamlines/twinmic/twinmic-microscope.html> i Kourousias et al., 2023).

Prikupljeni podaci o fluorescenciji obrađeni su korišćenjem softverskog paketa otvorenog koda PyMca.

3.3.4 Indukovano spregnuta plazma sa optičkom emisionom spektrometrijom (ICP-OES)

Pomoću ove metode je izmerena koncentracija selena u medijumu za gajenje i miceliji gljive nakon tretiranja natrijum selenitom. Uzorci medijuma su bili tečni, dobijeni nakon ispiranja micelije na vakuum pumpi, dok su uzorci biomase bili osušeni, kao što je opisano u poglavlju 3.1.1.5.

Priprema uzoraka je izvršena mikrotalasnom digestijom. Totalna digestija (mineralizacija) uzoraka je urađena u mikrotalasnom digestoru Advanced Microwave Digestion System (ETHOS 1, Milestone, Italija) korišćenjem HPR-1000/10S segmentiranog rotora koji radi pod visokim pritiskom. Uzorci su odmereni direktno u kvarcne inserte (QS-50 quartz inserts P/N 34042), čija je uloga obezbeđivanje maksimalne zaštite od kontaminacije tokom pripreme. Za uzorke biomase je uzeta celokupna dostavljena masa uzorka. Tačna masa je izmerena na analitičkoj vagi sa tačnošću od $\pm 0,1$ mg (10-80 mg suve biomase). Tečni uzorci (medijum) su kompletno odleđeni tokom noći na sobnoj temperaturi, a potom su homogenizovani tokom 10 min u ultrazvučnom kupatilu. Za digestiju je automatskom mikropipetom odmereno 9,5 mL uzorka medijuma i direktno stavljeno u kvarcne inserte. U oba tipa uzoraka (medijum i biomasa) su potom dodati oksidacioni agensi. Kao oksidacioni agensi za totalnu mineralizaciju su korišćeni 4,5 mL ultra-čiste HNO_3 (65 wt.%, Suprapur®, Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka) i 0,5 mL H_2O_2 (30 wt.%, Suprapur®, Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka). Kivete su složene u nosač kiveta i zatvorene po protokolu koji propisuje proizvođač. Digestija je izvedena tokom 20 minuta, pri konstantnoj temperaturi od 180°C i pritisku od 100 bara. Nakon digestije i hlađenja rastvora do sobne temperature, rastvor je razblažen do fiksne zapremine od 10 mL u samom kvarcnom sudu. Za razblaženje je korišćena ultra-čista dejonizovana voda električne provodljivosti od $0,05 \mu\text{S}/\text{cm}$. Ultra-čista voda je pripremljena u aparatu Barnstead™ GenPure™ Pro (Thermo Scientific, Nemačka).



Slika 17: Šematski prikaz principa rada ICP-OES. Uzorak se pomoću peristaltičke pumpe unosi u sistem introdukcije uzorka, koji čine nebulizator i sprej komora. Struja argona u nebulizatoru razbija interfejs tečnost – gas čime se formiraju aerosoli, odnosno nebula. U sprej komori se aerosoli razdvajaju prema veličini kapljice tako da samo mali deo tečnosti nastavlja put do plazme. Plazma se formira kada se argon unese u snažno elektromagnetno polje. Čestice aerosoli se u plazmi vaporizuju, atomizuju i na kraju jonizuju. Energija plazme (~ 6000 K) je dovoljno visoka da ekscituje elektrone u atomima i jonima. Tokom raspada ekscitovanog stanja, joni emituju fotone talasne dužine karakteristične za svaki element. Emitovana svetlost, sastavljena od fotona različitih talasnih dužina, se fokusira na difrakcionu rešetku i prolazi kroz prizmu koja razdvaja spektar na pojedinačne talasne dužine. Prebrojavanjem emitovanih fotona se precizno detektuje količina pojedinačnih elemenata u tečnom uzorku (modifikovano iz Cherevko & Mayrhofer, 2018).

Koncentracija selena u dobijenim rastvorima je izmerena pomoću ICP-OES i izražena u $\mu\text{g/L}$. ICP-OES merenje je urađeno na instrumentu model *Thermo Scientific iCAP 6500 Duo ICP* (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, UK) sa iTEVA operacionim softverom. Uzorak je u plazmu uveden direktnom aspiracijom tečnog uzorka. Standardni rastvori korišćeni za kalibraciju instrumenta u adekvatnom koncentracionom opsegu (1-50000 $\mu\text{g/L}$) je bio sertifikovani standardni rastvor selena, Specpure®, Se 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Nemačka). Koeficijent korelacije je iznosio 0.999934. Kvantifikacija je rađena na talasnoj dužini emisije Se I 196,09 nm. Za svaki uzorak ICP-OES merenje je rađeno u dva ponavljanja ($n = 2$). Relativna standardna devijacija ponovljenih merenje je bila $\text{RSD} < 5\%$. Limit detekcije za selen (LOD) je iznosio 1,919 $\mu\text{g/L}$, a limit kvantifikacije (LOQ) je iznosio 6,398 $\mu\text{g/L}$. Na osnovu izmerenih koncentracija

selena u rastvoru, izmerene mase/zapremine uzorka i razblaženja, urađen je preračun konačne koncentracije selena u uzorcima. Proces analitičke kontrole kvaliteta (analytical process quality control, QC), je urađen pomoću sertifikovanog referentnog materijala (certified reference material, CRM) ribljeg proteina za metale u tragovima (fish protein for trace metals DORM 4, NRCC, National Research Council Canada, Ottawa, Ontario Kanada). Postignuto poklapanje sa sertifikovanom vrednošću (*engl.* recovery) za selen je iznosilo 99,6%.

3.4. Statistička analiza rezultata

Urađeno je ukupno 6 ciklusa uzgoja gljive, a svi eksperimenti su uspešno izvedeni najmanje 4 puta. Na slikama su predstavljeni rezultati dobijeni iz nezavisnih eksperimenata (uzgoja) i izraženi kao srednja vrednost \pm standardna greška.

Statistička značajnost razlika između kontrolnih i tretiranih uzoraka je utvrđena korišćenjem jednosmernog ANOVA testa sa 0,05 nivoa značajnosti ($P \leq 0,05$). Poređenje parova rezultata gde je utvrđena statistička značajnost je u određenim slučajevima analizirano putem Holm-Sidak testa, što je naznačeno obojenim slovima (a,b,c) na graficima. Boja slova označava grupe uzoraka, gde su kontrolni uzorci označeni plavom, a tretirani narandžastom bojom. Razlike između tretmana i odgovarajućih kontrola su u drugim slučajevima testirane korišćenjem studentovog t-testa i označene zvezdicom (*) na graficima. Gde je utvrđena velika varijabilnost rezultata između serija, izvršena je normalizacija rezultata unutar serija tako što je prosečna vrednost kontrolnih grupa označena kao 100% dok su vrednosti tretiranih uzoraka izražene u relativnom odnosu na tu vrednost. Ovakvi podaci su obrađeni pomoću Mann-Whitney *U*-testa. Korišćeni su softveri Origin 6.1 (OriginLab Corporation, Northampton, SAD) i Sigma Plot 15.0 (Inpixon HQ, Palo Alto, CA, SAD).

Za analizu međusobnog odnosa stadijuma razvića gljive i tretmana selenitom i njihovog uticaja na antioksidativne enzime i sadržaj glutaciona korišćena je analiza glavnih komponenti zasnovana na matrici korelacija (*engl.* Principal Component Analysis - PCA). PCA je izvršena upotrebom XLSTAT softvera (verzija 7.5.2, Addinsoft).

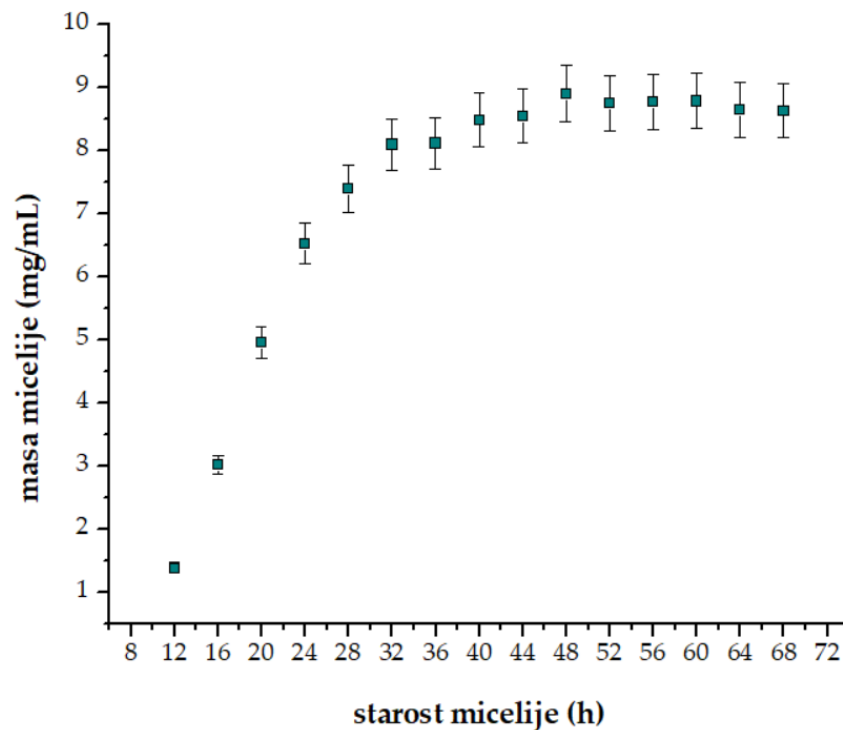
3.5. Reagensi

Sve hemikalije su analitičkog kvaliteta i pribavljene od proizvođača Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Nemačka).

4. REZULTATI

4.1 Kriva rasta *P. blakesleeanus*

Kao mera rasta micelijuma gljive je urađena kriva rasta micelijuma po jedinici zapremine medijuma (Slika 18). Zavisnost biomase od uzrasta gljive je jasno sigmoidalna ($r^2 = 0,9924$, $F = 4339,6651$, $P < 0,0001$).

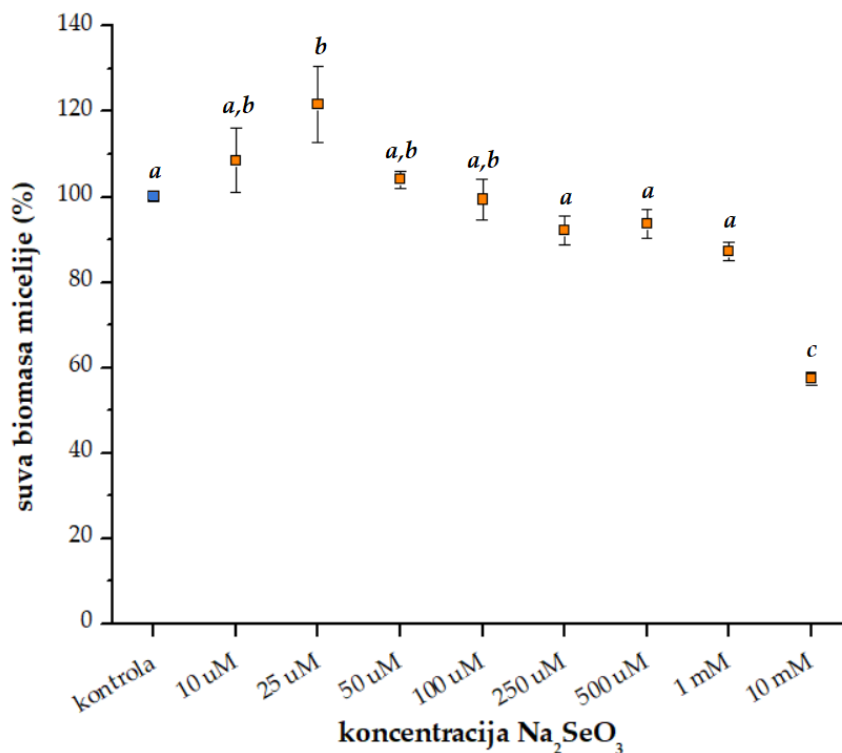


Slika 18: Kriva rasta micelijuma *P. blakesleeanus* u tečnom minimalnom medijumu, izražena u mg suve biomase po mL medijuma. Prikazane su srednje vrednosti iz tri nezavisne serije gajenja, sa standardnim greškama ($n = 6$). Eksponecionalna faza rasta traje do ~36 h starosti, nakon čega gljiva ulazi u stacionarnu fazu.

Eksponecijalna faza rasta kod gljive *P. blakesleeanus* gajene u erlenmajeru počinje na ~ 16 sati starosti, a završava se ~ 36 sati nakon zasejavanja, kada micelijum ulazi u stacionarnu fazu rasta.

4.2 Uticaj selenita na rast micelijuma *P. blakesleeanus*

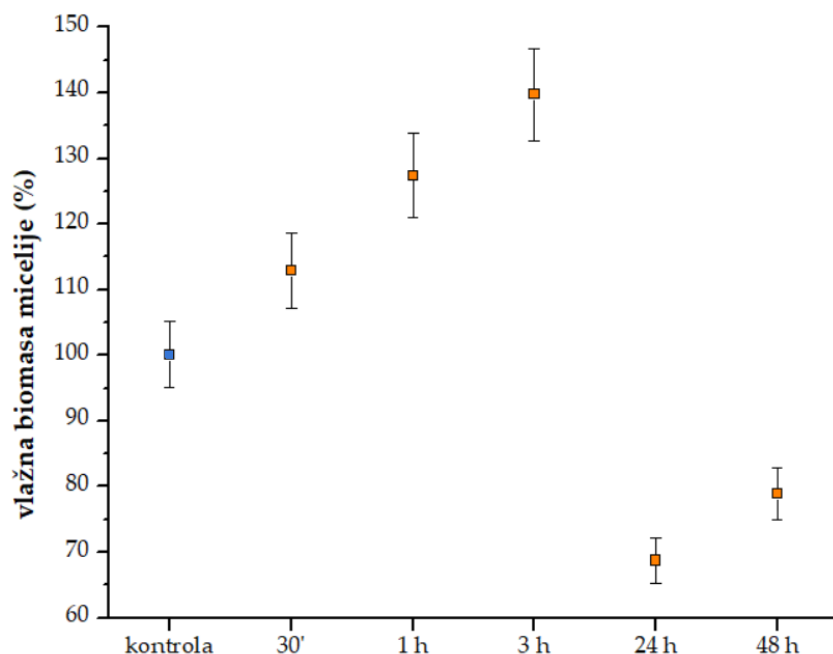
Toksičnost Na_2SeO_3 je ispitivana na 24 h starom micelijumu *P. blakesleeanus* (eksponencijalna faza rasta). U prvom eksperimentu (Slika 19) ispitana je koncentraciona zavisnost toksičnosti Na_2SeO_3 tokom 10 h inkubacije. Prisustvo oksianjona selenita u medijumu kulture je izazvalo različite efekte na rast *P. blakesleeanus* u toku inkubacije. Utvrđena je statistička značajnost u razlici prinosa biomase između kontrole i micelijuma tretiranog sa Na_2SeO_3 ($P = 0,041$). Toksični efekat Na_2SeO_3 se ogleda u značajnom smanjenju prinosa biomase gljive pri inkubaciji u medijumu sa višim koncentracijama Na_2SeO_3 , počevši sa $0,5 \text{ mM}$ Na_2SeO_3 . Sa povećanjem koncentracije Na_2SeO_3 dolazi do smanjenja brzine rasta. Dodatak Na_2SeO_3 u koncentraciji od 10 mM potpuno inhibira rast gljive gde je zabeležen $\sim 40\%$ manji prirast biomase u poređenju sa kontrolom (Slika 19). Međutim, prilikom tretmana nižim koncentracijama Na_2SeO_3 ($10\text{-}100 \mu\text{M}$) nije primećen negativan uticaj na vijabilnost gljive. Štaviše, *P. blakesleeanus* pokazuje visoku otpornost na niske koncentracije Na_2SeO_3 , a evidentirano je i stimulatívno dejstvo Na_2SeO_3 na prirast biomase pri koncentraciji od $25 \mu\text{M}$.



Slika 19: Uticaj različitih koncentracija Na_2SeO_3 ($10 \mu\text{M}$ do 10 mM) na produkciju biomase *P. blakesleeanus* nakon 10 h kultivacije. Vrednosti su normalizovane u odnosu na kontrolu (100%). Srednje vrednosti su predstavljene na osnovu tri nezavisna gajenja, svako sa po dva uzorka ($n = 6$), uz standardne greške. Statistička značajnost razlika je utvrđena

jednosmernim ANOVA testom ($P < 0,05$), koji je praćen Holm-Sidakovim testom, i naznačena je slovima (a, b, c) iznad kolona.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da tokom faze eksponencijalnog rasta *P. blakesleeanus* pokazuje izuzetnu otpornost na oksidativni stres izazvan rastvorom Na_2SeO_3 koncentracije od $10 \mu\text{M}$ do $250 \mu\text{M}$.



Slika 20: Uticaj $100 \mu\text{M}$ rastvora Na_2SeO_3 na produkciju biomase *P. blakesleeanus* tokom različitog vremena izlaganja. Prikazane su srednje vrednosti ($n = 5$) normalizovane na kontrolu (100%), uz standardne greške. Jednosmernim ANOVA testom ($P < 0,05$) nije utvrđena statistička značajnost između grupa ($P = 0,36$).

Za ispitivanje vremenske zavisnosti toksičnosti je odabrana koncentracija $100 \mu\text{M}$ Na_2SeO_3 kao fiziološki značajna a bez toksičnog efekta u prethodnom eksperimentu. Izlaganje gljive stare 24 h $100 \mu\text{M}$ rastvoru Na_2SeO_3 tokom perioda od 30 minuta, 1 h, 3 h, 24 h i 48 h nije dovelo do značajnih razlika u odnosu biomase između kontrole i tretiranih uzoraka.

4.3 Sadržaj proteina

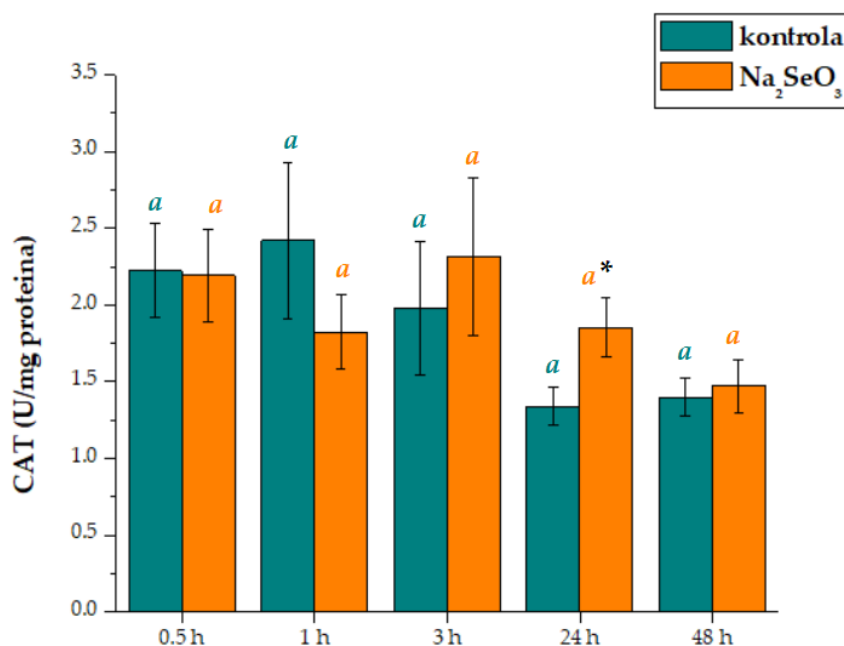
Sadržaj proteina kod *P. blakesleeanus* u okviru pojedinačnih serija gajenja gljive je ostao nepromenjen, bez obzira na to da li su uzorci tretirani Na_2SeO_3 ili ne, dok su razlike uočene između sadržaja proteina različitih serija koje nisu kultivisane istovremeno.

Razlike u sadržaju proteina između različitih serija gajenja se najverovatnije mogu pripisati faktorima vezanim za uzgoj, koje nije moguće precizno kontrolisati.

Sadržaj proteina je iznosio od 0,78-2,57 mg/mL medijuma, odnosno 7,66-12,61 mg/gFW micelijuma. Odnos između vlažne i suve biomase iznosi približno 6,5 : 1.

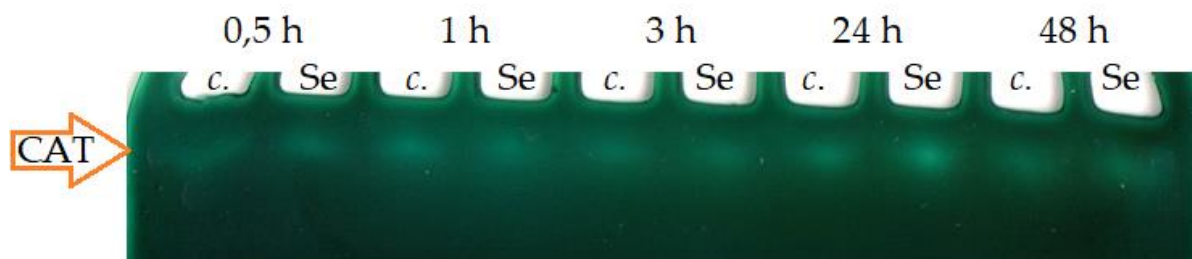
4.4 Aktivnost CAT

Aktivnost CAT pokazuje opšti trend pada sa starošću kulture (Slika 21), ali ove promene nisu statistički značajne. Kada se micelijum star 24 h premesti u svež medijum, aktivnost CAT ostaje stabilna prva 3 sata, kada počinje da opada, što se vremenski podudara sa ulaskom u stacionarnu fazu rasta gljive. Pri dodavanju Na_2SeO_3 dolazi do blagog, ali statistički značajnog, povećanja aktivnosti CAT nakon 24 sata u poređenju sa kontrolnim uslovima. Međutim, ovo je samo prolazno povećanje aktivnosti CAT koje se vraća na kontrolne nivoe do 48 sati izlaganja, što ukazuje na kratkoročnu aktivaciju ovog enzima kao odgovor na stres izazvan Na_2SeO_3 .



Slika 21: Efekat 100 μM rastvora Na_2SeO_3 na specifičnu aktivnost CAT u miceliji *P. blakesleeanus*. Srednje vrednosti parametara su predstavljene na osnovu tri nezavisna gajenja, svako sa po dva uzorka ($n = 6$), uz standardne greške. Statistička značajnost razlika je utvrđena jednosmernim ANOVA testom ($P < 0,05$), koji je praćen Holm-Sidakovim testom, i naznačena je slovima iznad kolona. Boja slova označava parove poređenih uzoraka (kontrola – zeleno, tretman Na_2SeO_3 – narandžasto). Zvezdicom su označene statistički značajne razlike utvrđene studentovim t-testom između tretiranih uzoraka i odgovarajućih kontrola.

Povišena aktivnost CAT nakon 24 sata tretmana je jasno vidljiva i na gelu (Slika 22).

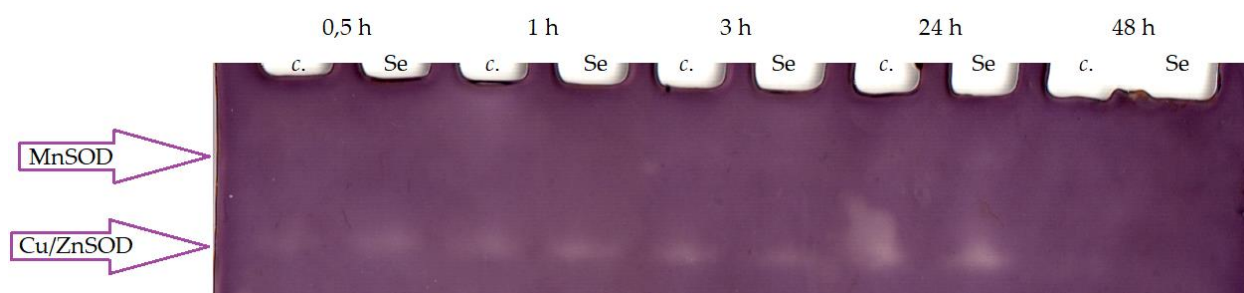


Slika 22: Gel elektroforegram aktivnosti CAT proteinskih ekstrakata micelije *P. blakesleeanus* nakon kultivacije u medijumu sa 100 μM Na_2SeO_3 (c. – kontrolni uzorci, Se – tretman Na_2SeO_3 , strelica ukazuje na aktivnost enzima vidljivu na gelu).

4.5 Aktivnost SOD

Aktivnost enzima SOD u uzorcima je bila previše niska da bi bila merljiva spektrofotometrijskom metodom, pa je prikazano samo razdvajanje izoformi SOD na gelu.

Nakon elektroforetskog razdvajanja proteina i bojenja gela, prisustvo SOD se zapaža kao neobojena traka na tamnoj pozadini gela. Može se uočiti da uzorci micelije *P. blakesleeanus* sadrže dve forme SOD (MnSOD kao gornja slaba linija u gornjem delu gela i Cu/ZnSOD kao jasnije vidljiva donja linija, Slika 23).



Slika 23: Gel elektroforegram aktivnosti SOD proteinskih ekstrakata micelije *P. blakesleeanus* nakon kultivacije u medijumu sa 100 μM Na_2SeO_3 (c. – kontrolni uzorci, Se – tretman Na_2SeO_3 , strelica ukazuje na aktivnosti potencijalnih izoformi enzima vidljivih na gelu).

Aktivnost SOD izoformi je bila neznatno povišena nakon 24 sata, što je praćeno padom aktivnosti nakon 48 sati.

4.6 Aktivnost POD

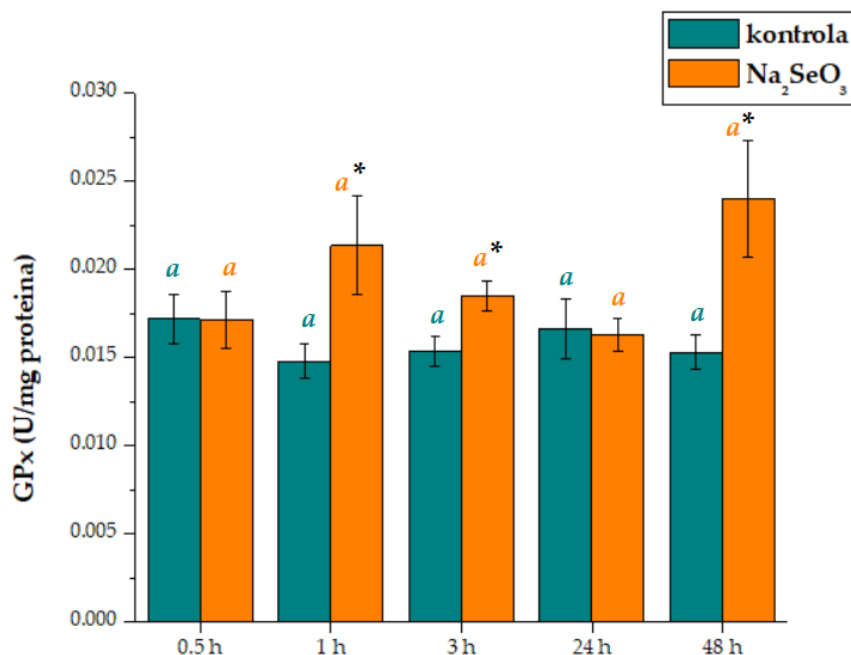
Spektrofotometrijskim određivanjem enzimske aktivnosti POD je pokazana veoma niska aktivnost u svim uzorcima (Tabela 4). Najviša, i jedina merljiva aktivnost je izmerena 30 minuta nakon tretmana Na_2SeO_3 , kada je ispoljena dvostruko viša aktivnost u odnosu na odgovarajući kontrolni uzorak. Aktivnost POD nakon 1 h, 24 h i 96 h tretmana nije bila merljiva, mada je zapremina uzorka povećana sa početnih 70 μL na 200 μL u reakcionoj smeši.

Tabela 4: Efekat 100 μM rastvora Na_2SeO_3 na specifičnu aktivnost POD u miceliji *P. blakesleeanus*.

trajanje tretmana	aktivnost POD (U/mg proteina)		zapremina	
	u kontroli	u uzorku tretiranom sa Na_2SeO_3	kontrole	uzorka tretiranog sa Na_2SeO_3
30 minuta	0.0035	0.0078	50 μL	70 μL
1 sat	-	-	100 μL	100 μL
24 sata	-	-	100 μL	100 μL
96 sati	-	-	200 μL	200 μL

4.7 Aktivnost GPx

Aktivnost enzima GPx je vršena spektrofotometrijski (Drotar et al., 1985). Uočena je statistički značajna razlika između sadržaja GPx kontrolnih uzoraka i uzoraka tretiranih Na_2SeO_3 nakon 1 sata i 48 sati ($P = 0,02$). Zapaža se relativno ujednačena aktivnost ovog enzima tokom vremena u kontrolnim uzorcima i povišena aktivnost u tretiranim uzorcima (Slika 24).

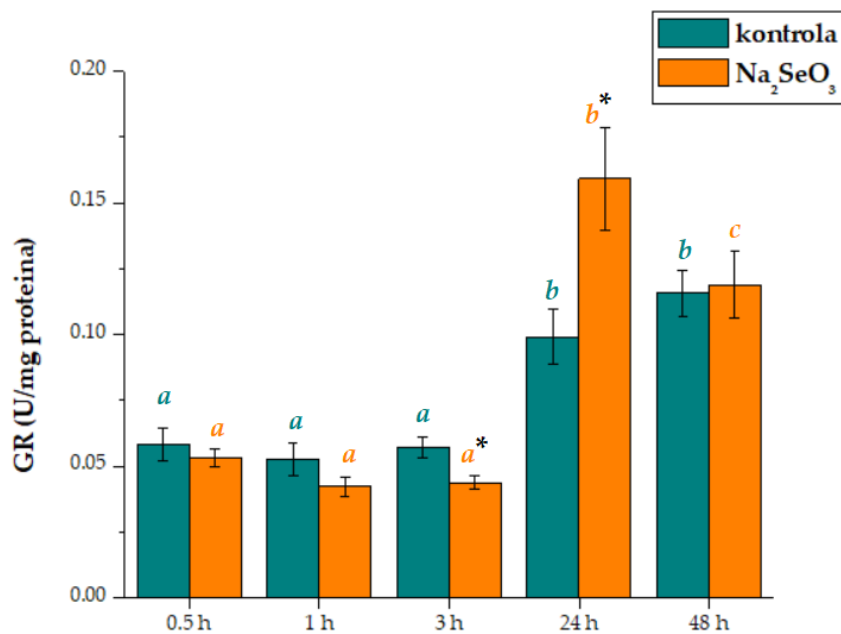


Slika 24: Efekat 100 μ M rastvora Na_2SeO_3 na specifičnu aktivnost GPx u miceliji *P. blakesleeanus*. Srednje vrednosti parametara su predstavljene na osnovu tri nezavisna gajenja, svako sa po dva uzorka ($n = 6$), uz standardne greške. Statistička značajnost razlika je utvrđena jednosmernim ANOVA testom ($P < 0,05$), koji je praćen Holm-Sidakovim testom, i naznačena je slovima iznad kolona. Boja slova označava parove poređenih uzoraka (kontrola – zeleno, tretman Na_2SeO_3 – narandžasto). Zvezdicom su označene statistički značajne razlike utvrđene studentovim t-testom između tretiranih uzoraka i odgovarajućih kontrola.

Efekat Na_2SeO_3 na aktivnost GPx je naročito izražen nakon 1 h, 3 h i 48 h izlaganja micelijuma, gde postoji statistička značajnost. Aktivnost GPx nakon 30 minuta tretmana je najbliža aktivnosti kod kontrolnih uzoraka, dok je nakon 48 h kod tretiranih uzoraka zabeležena najviša aktivnost ovog enzima.

4.8 Aktivnost GR

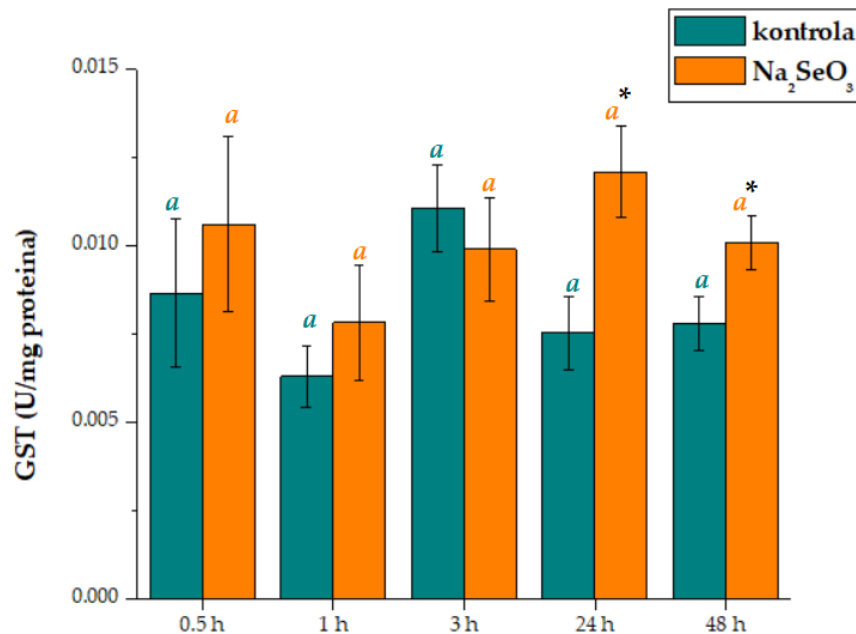
Metodom Smith et al. (1988) je izvršeno spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima GR. Uočen je statistički značajan uticaj Na_2SeO_3 na aktivnost GR u uzorcima micelijuma *P. blakesleeanus* nakon 3 i 24 sata kultivacije. Aktivnost GR u tretiranim uzorcima opada u odnosu na kontrolu u početku izlaganja (do 3 h), da bi dostigla zapaženo povećanje aktivnosti ($\sim 46,45\%$) u odnosu na odgovarajuće kontrolne uzorke (Slika 25). Kod uzoraka izlaganih tokom 30 minuta, 1 h i 3 h je uočen blagi inhibitoran uticaj Na_2SeO_3 na aktivnost GR, što objašnjava povećan udeo oksidovanog glutationa u uzorcima (Slika 28). Povećanje aktivnosti GR prati smanjenje sadržaja GSH.



Slika 25: Efekat 100 μ M rastvora Na_2SeO_3 na specifičnu aktivnost GR u miceliji *P. blakesleeanus*. Srednje vrednosti parametara su predstavljene na osnovu tri nezavisna gajenja, svako sa po dva uzorka ($n = 6$), uz standardne greške. Statistička značajnost razlika je utvrđena jednosmernim ANOVA testom ($P < 0,05$), koji je praćen Holm-Sidakovim testom, i naznačena je slovima iznad kolona. Boja slova označava parove poređenih uzoraka (kontrola – zeleno, tretman Na_2SeO_3 – narandžasto). Zvezdicom su označene statistički značajne razlike utvrđene studentovim t-testom između tretiranih uzoraka i odgovarajućih kontrola.

4.9 Aktivnost GST

Spektrofotometrijskim određivanjem aktivnosti GST (Habig et al., 1974) je zabeležen statistički značajan uticaj Na_2SeO_3 na aktivnost GST u uzorcima micelijuma *P. blakesleeanus* nakon 24 i 48 sati. Izmerena aktivnost enzima kontrola i uzoraka tretiranih 30 minuta, 1 h i 3 h je bila relativno ujednačena, bez pokazane zavisnosti od dužine tretmana. Povećana aktivnost u kasnijim vremenskim tačkama se, kao u slučaju GR, može objasniti promenama u sadržaju GSH.

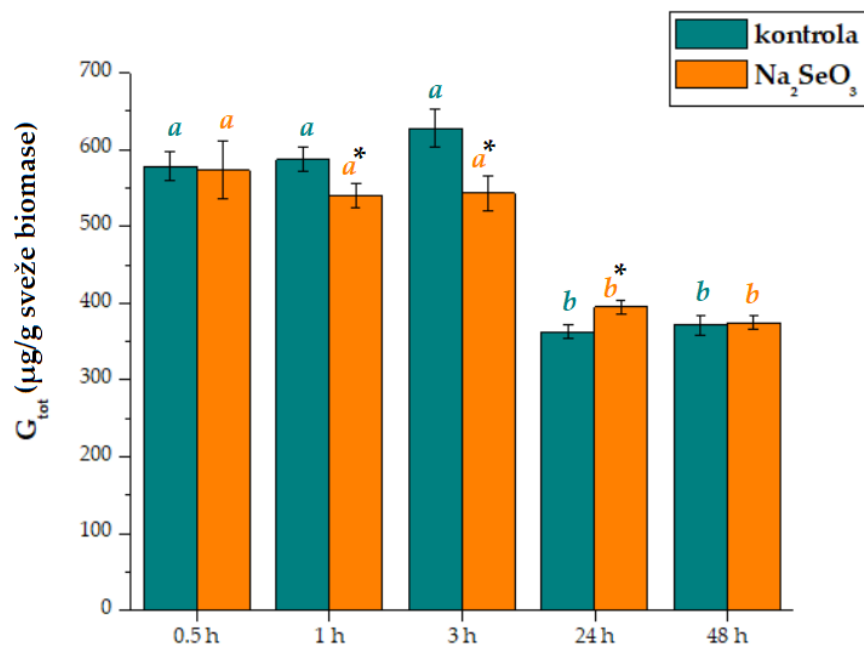


Slika 26: Efekat 100 μM rastvora Na_2SeO_3 na specifičnu aktivnost GST u miceliji *P. blakesleeanus*. Srednje vrednosti parametara su predstavljene na osnovu tri nezavisna gajenja, svako sa po dva uzorka ($n = 6$), uz standardne greške. Statistička značajnost razlika je utvrđena jednosmernim ANOVA testom ($P < 0,05$), koji je praćen Holm-Sidakovim testom, i naznačena je slovima iznad kolona. Boja slova označava parove poređenih uzoraka (kontrola – zeleno, tretman Na_2SeO_3 – narandžasto). Zvezdicom su označene statistički značajne razlike utvrđene studentovim t-testom između tretiranih uzoraka i odgovarajućih kontrola.

4.10 Sadržaj ukupnog (GSSG+GSH) i oksidovanog glutationa (GSSG)

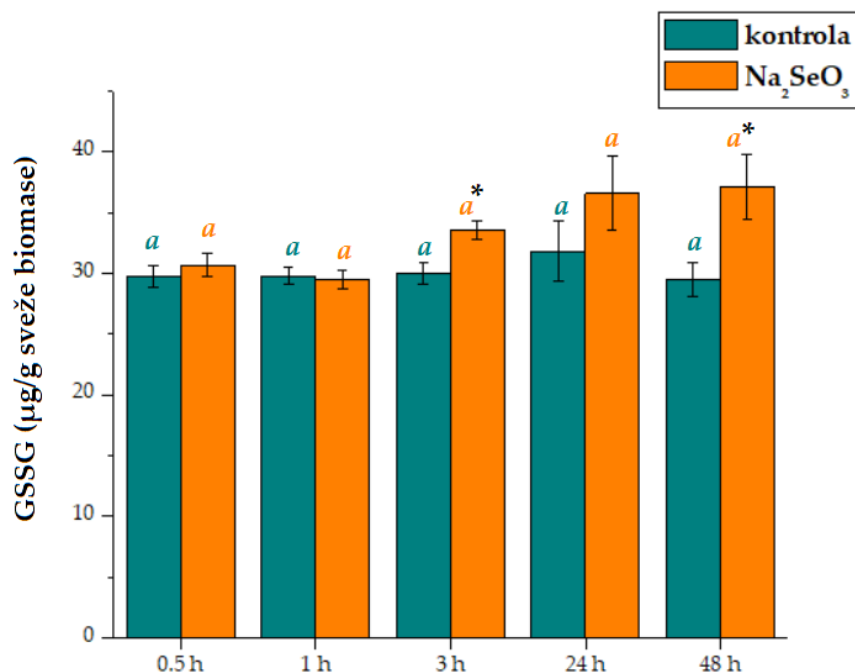
Utvrđeno je postojanje linearnog odnosa između promene u apsorpciji na 420 nm i koncentracije GSH u reakcionoj smeši.

Koncentracija ukupnog glutationa je prikazana u $\mu\text{g/g}$ sveže biomase uzorka (Slika 27). Uočen je značajan pad količine ukupnog glutationa tokom vremena, kako u kontrolnim, tako i u tretiranim uzorcima. I u prisustvu i odsustvu Na_2SeO_3 dolazi do pada količine ukupnog glutationa nakon 24 h ali uz značajan porast udela oksidovanog glutationa (Slika 28).



Slika 27: Uticaj 100 µM rastvora Na₂SeO₃ na promenu ukupne količine glutaciona (G_{tot}) u micelijumu *P. blakesleeanus*. Srednje vrednosti parametara su predstavljene na osnovu tri nezavisna gajenja, svako sa po dva uzorka (n = 6), uz standardne greške. Statistička značajnost razlika je utvrđena jednosmernim ANOVA testom (P < 0,05), koji je praćen Holm-Sidakovim testom, i naznačena je slovima iznad kolona. Boja slova označava parove poređenih uzoraka (kontrola – zeleno, tretman Na₂SeO₃ – narandžasto). Zvezdicom su označene statistički značajne razlike utvrđene studentovim t-testom između tretiranih uzoraka i odgovarajućih kontrola.

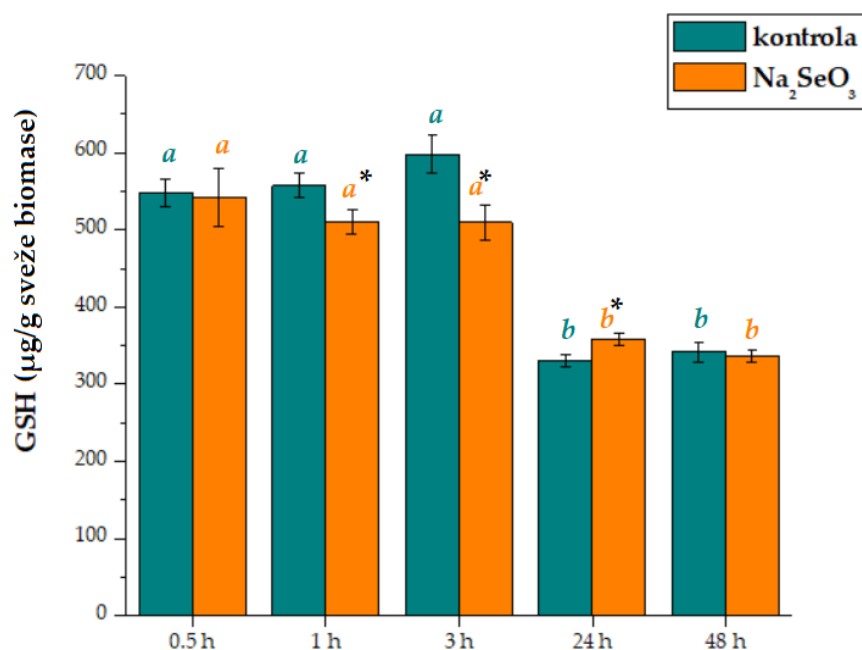
Tretman Na₂SeO₃ je doveo do promene odnosa GSH/GSSG tokom tretmana (Slika 30) što sugeriše da Na₂SeO₃ inhibira aktivnost GR, u skladu sa rezultatima prikazanim u poglavlju 4.8. Statistički značajne razlike u količini ukupnog glutaciona između kontrolnih i tretiranih uzoraka su uočene nakon 1, 3 i 24 sata.



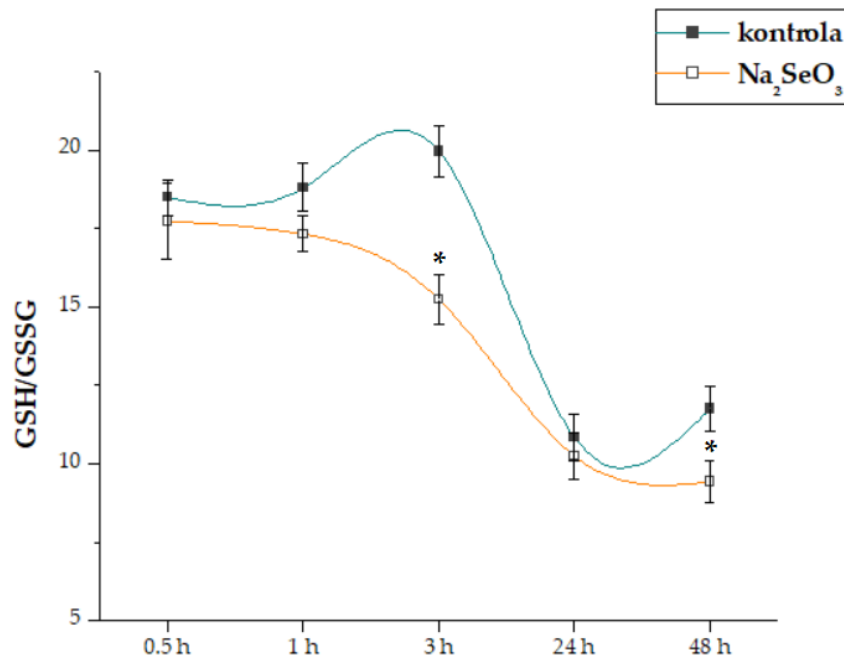
Slika 28: Uticaj 100 µM rastvora Na₂SeO₃ na promenu sadržaja oksidovanog glutationa (GSSG) u miceliji *P. blakesleeanus*. Srednje vrednosti parametara su predstavljene na osnovu tri nezavisna gajenja, svako sa po dva uzorka (n = 6), uz standardne greške. Statistička značajnost razlika je utvrđena jednosmernim ANOVA testom ($P < 0,05$), koji je praćen Holm-Sidakovim testom, i naznačena je slovima iznad kolona. Boja slova označava parove poređenih uzoraka (kontrola – zeleno, tretman Na₂SeO₃ – narandžasto). Zvezdicom su označene statistički značajne razlike utvrđene studentovim t-testom između tretiranih uzoraka i odgovarajućih kontrola.

Koncentracija oksidovanog glutationa se povećava tokom vremena izlaganja *P. blakesleeanus* Na₂SeO₃, s tim da statistički značajna razlika postoji nakon 3 h i 48 h. Koncentracija GSSG u kontrolnim uzorcima generalno prati ovu tendenciju porasta količine GSSG s tim da je koncentracija GSSG u uzorcima nakon 48 h izlaganja Na₂SeO₃ značajno veća nego u kontrolnim uzorcima.

Dodavanjem Na_2SeO_3 došlo je do značajnog smanjenja sadržaja GSH nakon 1 i 3 sata i porasta sadržaja kod tretiranih uzoraka nakon 24 sata (Slika 29).



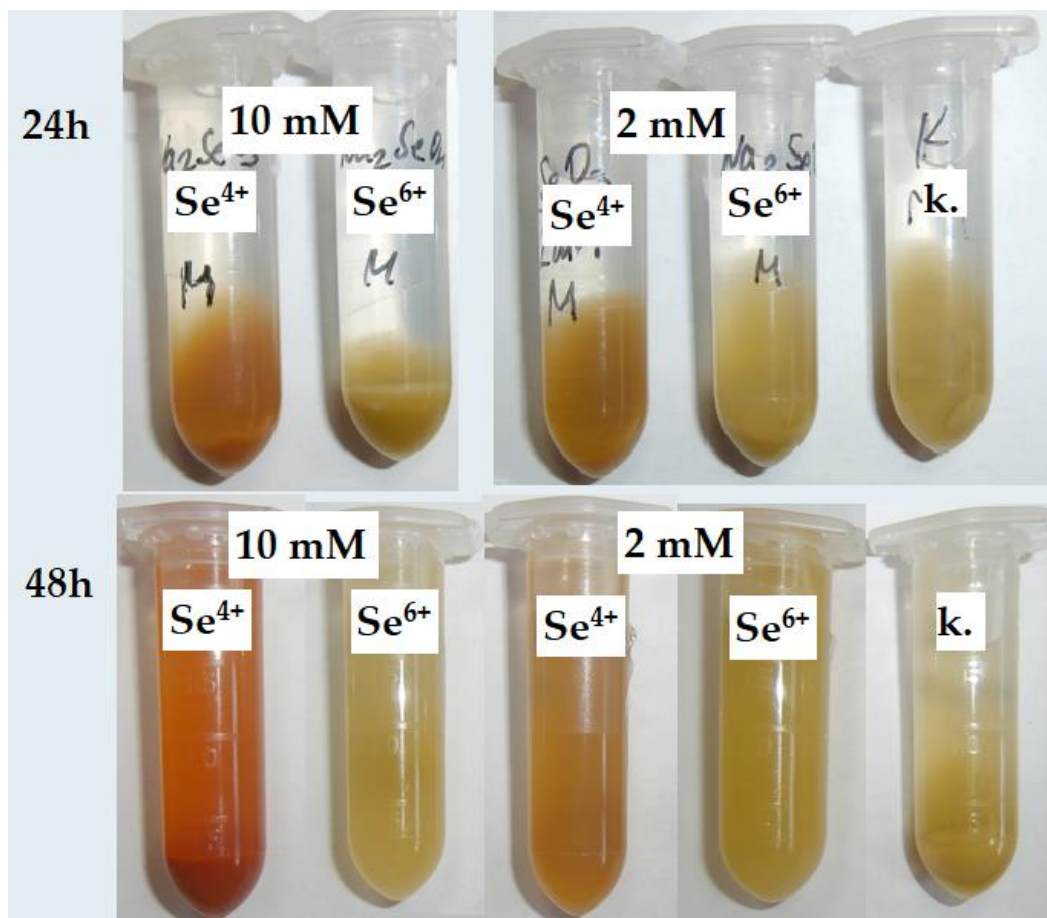
Slika 29: Uticaj 100 μM rastvora Na_2SeO_3 na promenu sadržaja redukovano glutationa (GSH) u miceliji *P. blakesleeanus*. Srednje vrednosti parametara su predstavljene na osnovu tri nezavisna gajenja, svako sa po dva uzorka ($n = 6$), uz standardne greške. Statistička značajnost razlika je utvrđena jednosmernim ANOVA testom ($P < 0,05$), koji je praćen Holm-Sidakovim testom, i naznačena je slovima iznad kolona. Boja slova označava parove poređenih uzoraka (kontrola – zeleno, tretman Na_2SeO_3 – narandžasto). Zvezdicom su označene statistički značajne razlike utvrđene studentovim t-testom između tretiranih uzoraka i odgovarajućih kontrola.



Slika 30: Uticaj 100 μM rastvora Na_2SeO_3 na promenu odnosa redukovanog (GSH) i oksidovanog glutationa (GSSG) u miceliji *P. blakesleeanus*. Srednje vrednosti parametara su predstavljene na osnovu tri nezavisna gajenja, svako sa po dva uzorka ($n = 6$), uz standardne greške. Statistička značajnost razlika je utvrđena jednosmernim ANOVA testom ($P < 0,05$). Zvezdicom su označene statistički značajne razlike utvrđene studentovim t-testom između tretiranih uzoraka i odgovarajućih kontrola.

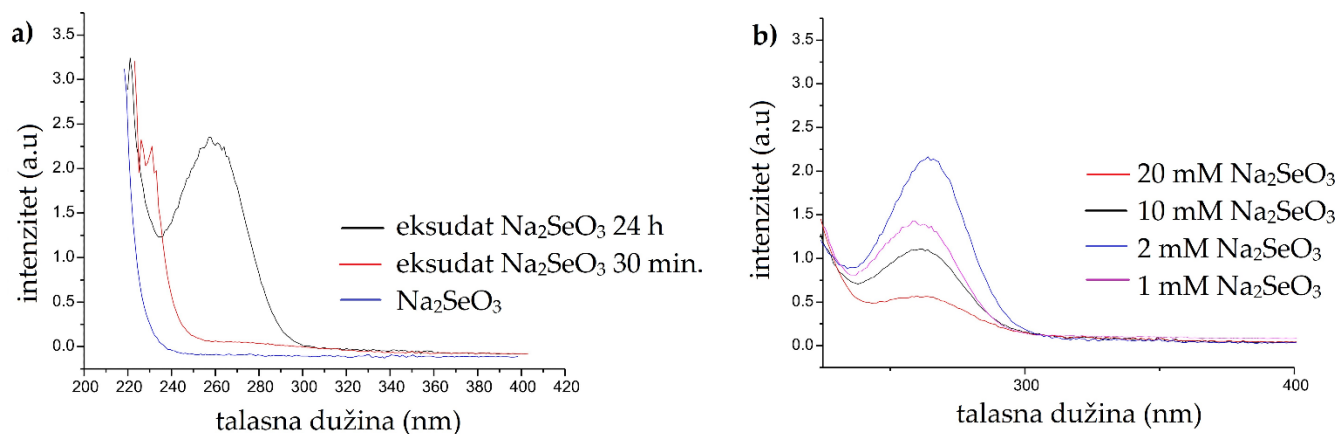
4.11 SeNP

Sposobnost usvajanja Na_2SeO_3 i redukcije do elementarnog selena u obliku SeNP je ispitivana na 24 h starim micelijama gljive *P. blakesleeanus*. Proces redukcije je vizuelizovan promenama boje micelijuma tretiranog Na_2SeO_3 i Na_2SeO_4 tokom 24 i 48 sati (Slika 31). Tokom ovog perioda uzorak koji sadrži Na_2SeO_4 ostao je vizuelno nepromenjen i ova sličnost sa netretiranim micelijumom je zadržana čak i tokom produženog perioda do 7. dana tretmana. S druge strane, prva značajna indikacija promene boje desila se oko 1 h nakon dodavanja 10 mM Na_2SeO_3 kada je micelija počela da ispoljava crvenkasto-žutu boju, postajući crvena nakon 24 h tretmana, što ukazuje na redukciju Na_2SeO_3 . Dodavanje 10 mM Na_2SeO_3 dovelo je do promene boje u crveno-žutu u roku od 1-2 sata. Oštar miris tretiranih uzoraka ukazao je na formiranje isparljivih jedinjenja selena. Nakon 24 sata inkubacije sa 2 mM i 10 mM Na_2SeO_3 , micelijum je razdvojen od medijuma centrifugiranjem u sterilnim bočicama, a zatim ispran 3 puta u sterilnoj dejonizovanoj vodi.



Slika 31: Promena boje micelije *P. blakesleeanus* nakon 24 h (gore) i 48 h (dole) tretmana natrijum selenitom (Se^{4+}) i natrijum selenatom (Se^{6+}) koncentracija 2 i 10 mM. Ističe se crvena obojenost micelije i medijuma uzoraka tretiranih Na_2SeO_3 koncentracije 2 i 10 mM nakon 24 i 48 h, što ukazuje na formiranje SeNP. Boja micelije tretirane Na_2SeO_4 je istovetna boji kontrolnih uzoraka (k.) gde nema vizuelizacije akumulacije SeNP.

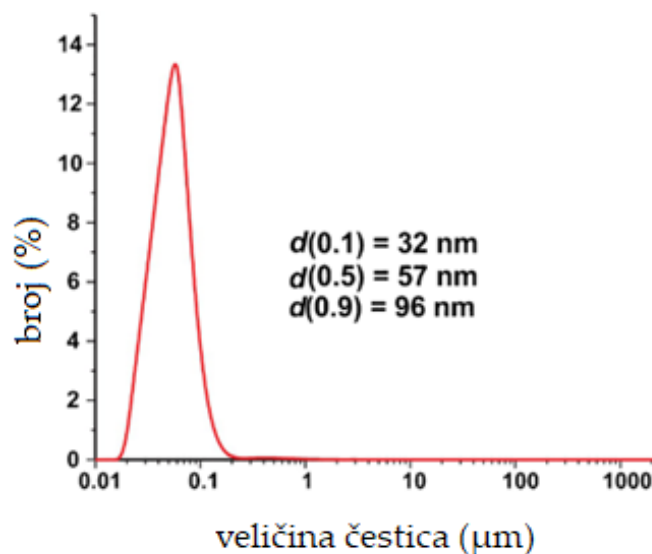
Da bi se odredilo mesto akumulacije SeNP, ćelijski eksudati su dalje okarakterisani ultravioletnom vidljivom spektroskopijom (*engl.* Ultraviolet Visible Spectroscopy – UV VIS spektroskopija) (Slika 32a). Eksudat sakupljen posle 30 minuta tretmana Na_2SeO_3 nije sadržao SeNP. S druge strane, karakteristike apsorpcije uzoraka tretiranih Na_2SeO_3 24 h su pokazale zavisnost od koncentracije dodatog Na_2SeO_3 (Slika 32b). Sa povećanjem koncentracije Na_2SeO_3 se ispostavilo da signal SeNP dostiže svoj maksimum kod uzoraka tretiranih 2 mM Na_2SeO_3 , a zatim se smanjuje kod uzoraka tretiranih 10 mM Na_2SeO_3 , što sugeriše da pri višim koncentracijama Na_2SeO_3 toksični efekat nadmašuje redukcioni kapacitet gljive *P. blakesleeanus*.



Slika 32: UV VIS spektri eksudata micelije *P. blakesleeanus* tretirane Na_2SeO_3 . a) Micelije tretirane 24 h (crno) i 30 minuta (crveno), referentni standard Na_2SeO_3 (plavo). Ističe se traka uzorka tretiranog 24 h. b) Uzorci tretirani različitim koncentracijama Na_2SeO_3 ; 20 mM (crveno), 10 mM (crno), 2 mM (plavo) i 1 mM (ljubičasto). Energija apsorpcije dostiže svoj maksimum pri tretmanu 2 mM Na_2SeO_3 .

Analizom položaja, oblika i intenziteta karakterističnih apsorpcionih traka spektra utvrđeno je prisustvo SeNP prosečnog prečnika ispod 100 nm (Lin & Wang, 2005; Zare et al., 2013). Tipična široka apsorpciona traka karakteristična za SeNP se nalazi u rasponu 250–300 nm (González-Salitre et al., 2025), što je veoma uočljivo na spektru gljive tretirane 24 h. Manje, uniformne čestice karakterišu apsorpcija na nižim talasnim dužinama i uže trake, dok se kod čestica većih dimenzija energija apsorpcije pomera ka većim talasnim dužinama a trake su šire (Lin & Wang, 2005). Šire trake mogu označavati pojavu agregacija ili distribuciju čestica različitih veličina. Kalibracijom oblika i položaja spektra se može pretpostaviti veličina čestica (González-Salitre et al., 2025).

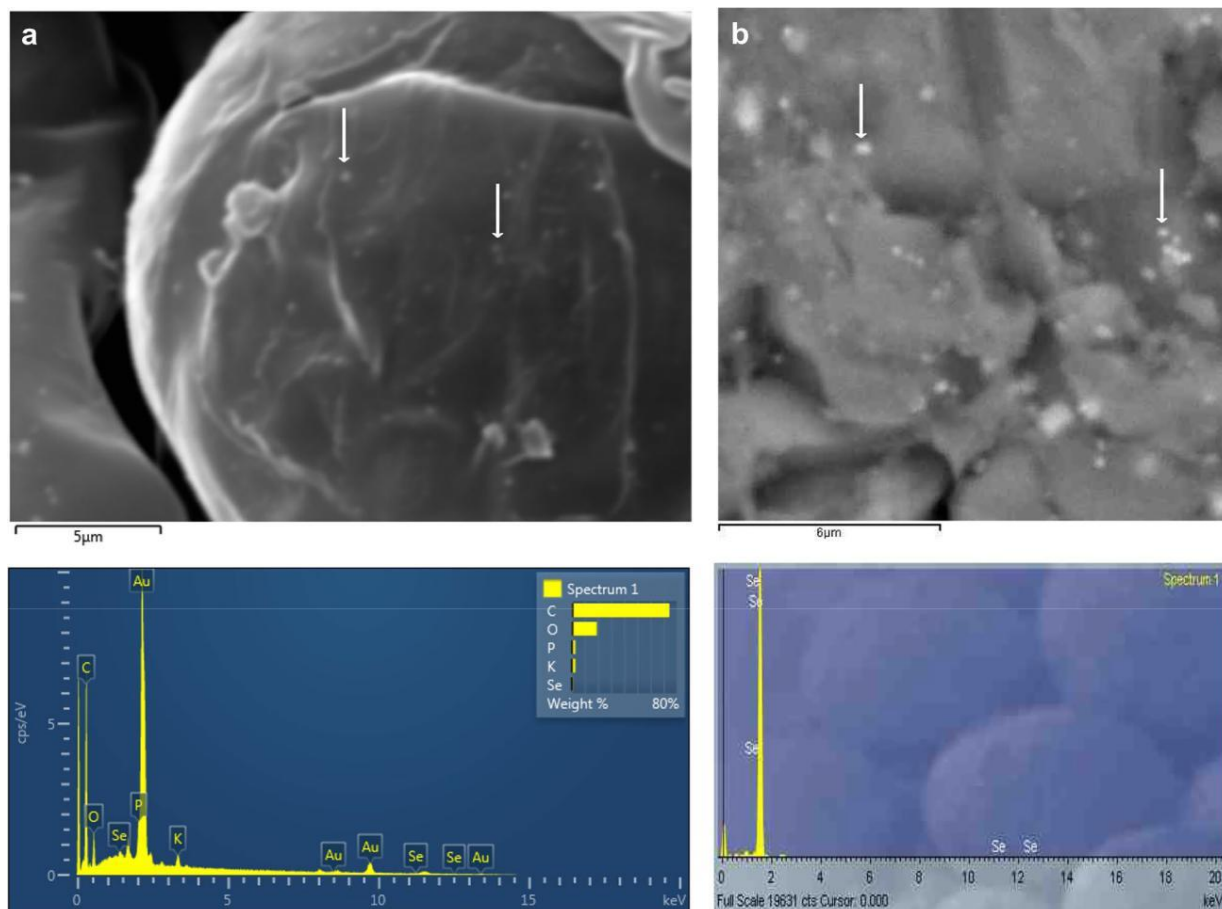
Raspodela veličine SeNP je određena pomoću DLS.



Slika 33: Distribucija veličina SeNP proizvedenih od 28 h stare micelije *P. blakesleeanus* izmerena putem DLS metode. Distribucija, data kao funkcija veličine i broja SeNP u eksudatu micelije, otkriva SeNP u rasponu veličina 32 do 95 nm.

Utvrđeno je da su prečnici svih SeNP bili u opsegu od 32-95 nm, sa prosečnom vrednošću od 57 nm. Pošto je veličina SeNP ključna za njihovu funkcionalnost, dobra karakteristika redukcije Na_2SeO_3 na SeNP od strane *P. blakesleeanus* je to što se njihova veličina nije promenila čak ni kada je tretman produžen na 48 h.

Pošto vidljive promene boje izazvane selenom mogu doći iz ekstracelularnog ili površinskog dela uzorka, prisustvo SeNP je ispitano pomoću SEM-EDS (Slika 34). EDS mikroanaliza suspenzije micelijuma ili eksudata pokazala je karakteristične signale selena na 1,4 (SeL α), 11,2 (SeK α) i 12,5 (SeK β) keV što otkriva različito okruženje selena. Naime, sferne SeNP mogu biti pričvršćene za spoljašnjost ćelija, ali i smeštene u unutrašnjosti ćelije. Prinos SeL α (1,4 keV) linija je znatno manji pa je samim tim i njihov intenzitet manji te se ne može precizno kvantifikovati. SeK α i SeK β (11,2 i 12,5 keV) potiču iz dubljih slojeva uzorka i podrazumevaju upotrebu većeg napona, koji podrazumeva elektrone sa većom energijom. Napon od 30 kV, koji se koristi za pretvaranje električne u kinetičku energiju elektrona, ubrzava elektrone i obezbeđuje veću moć penetracije u uzorak i daje mikro radiografski prikaz Se ne samo na površini, već i kroz čitavu zapreminu uzorka. Što se tiče intaktnog micelijuma, pored vodonika i kiseonika su detektovane i merljive količine selena i sumpora (karakteristični signal SK α na 2,3 keV). Signal selena u eksudatu je bio lišen bilo kakvih drugih signala koji pripadaju ćelijskim komponentama.



Slika 34: SEM (gore) i EDS (dole) micelije starosti 28h (a) i eksudata micelije tretirane 10 mM Na₂SeO₃ tokom 24 h (b). SeNP je označen strelicama.

Strukturne karakteristike akumuliranog Se su dobijene XANES spektroskopijom. Spektri (Slika 35) se mogu tumačiti poređenjem sa standardima i podacima iz literature.

Poređenjem spektra micelije tretirane 0,5 mM Na₂SeO₃ tokom 24 h i referentnih spektara Na₂SeO₃ i Se⁰ (Slika 35a), primećuje se približno podudaranje energija apsorpcije Se⁰ i Se iz micelije inkubirane sa Na₂SeO₃, ali i znatno niža energija apsorpcije (kao i oksidaciono stanje elementa) u odnosu na Se⁴⁺ što ukazuje na proces redukcije koji se odigrao tokom 24 h tretmana. Tokom kraćih vremena inkubacije (1 h i 3 h, Slika 35c) dominira Se⁴⁺, ali tokom duže inkubacije dolazi do značajnije redukcije i povećanja udela Se⁰ (ili selenida i/ili organskih jedinjenja selen). Do 24 h, Se⁰ postaje značajna ili dominantna komponenta.

Poređenjem signala Se⁴⁺ i Se⁰ (Slika 35b) se može potvrditi nastanak Se⁰ u početnoj fazi redukcije Se u miceliji inkubiranoj u 0,5 mM Na₂SeO₃, uz moguće prisustvo međuprodukata. Ova pretpostavka se zasniva na vrednosti apsorpcione energije i obliku

spektra, gde je maksimum prvog izvoda spektra za 1 h pomenen prema nižim energijama u odnosu na Se^{4+} ali se ne preklapa u potpunosti sa Se^0 .

Spektre micelija inkubiranih 1 h, 3 h i 24 h u 0,5 mM rastvoru Na_2SeO_3 (Slika 35c) karakteriše pomeranje energije apsorpcije K-elektrona tokom vremena (3 h, 24 h) prema nižim vrednostima, što uz promenu oblika spektra upućuje na proces redukcije, slično spektru prikazanom na Slici 34a.

U priloženim spektrima micelije tretirane niskom koncentracijom Na_2SeO_3 se vidi pomeranje apsorpcione energije K-elektrona u odnosu na standard selena, što navodi na zaključak da dominira proces redukcije, odnosno prelaz Se^{4+} u Se^0 ili druge oblike selena koje karakteriše oscilacioni maksimum blizak Se^0 (npr. Se^{2+} , Se^{1+}).

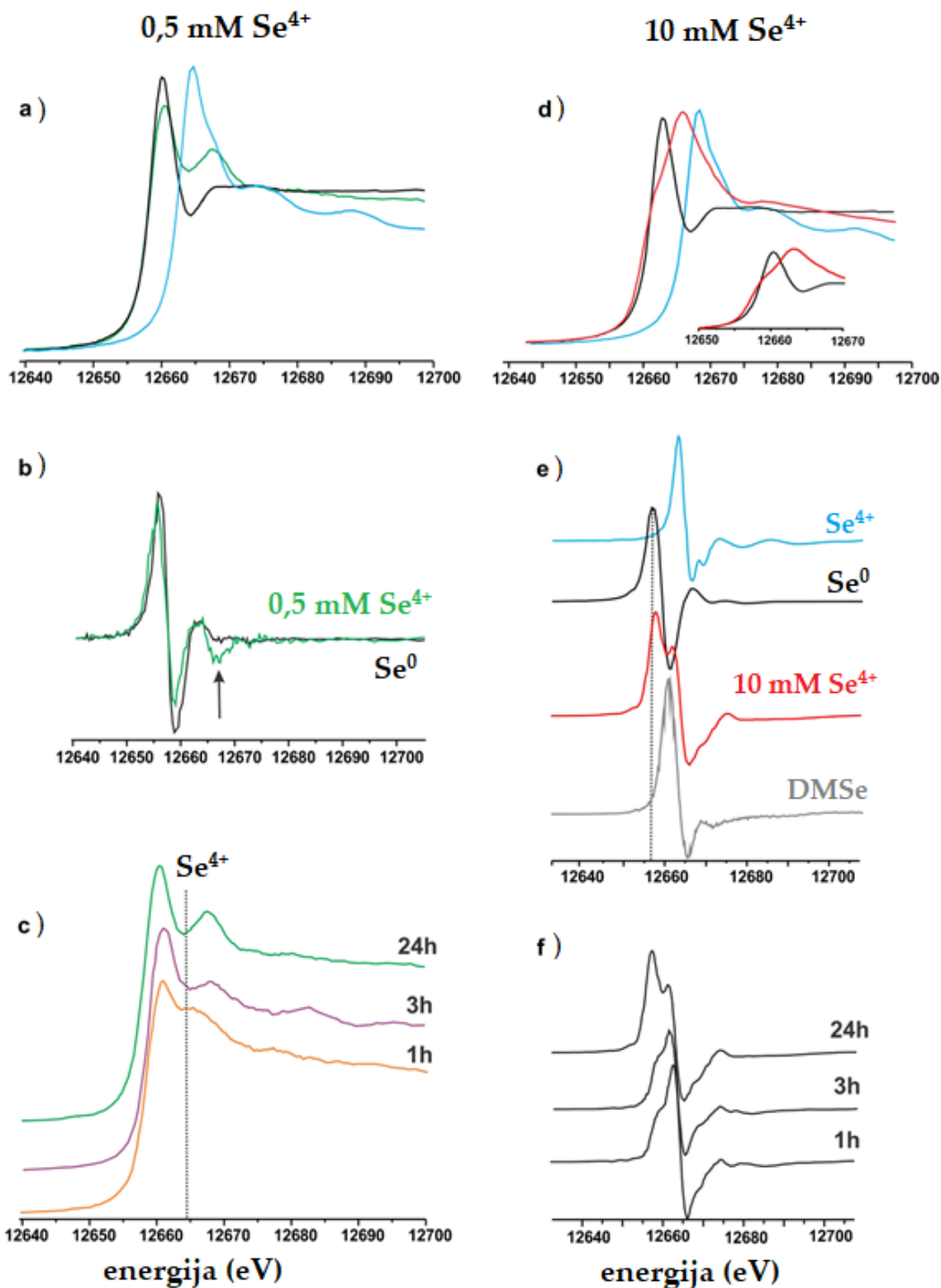
Spektar micelije tretirane 10 mM Na_2SeO_3 tokom 1 h, 3 h i 24 h (Slika 35d) karakteriše veći doprinos signala čiji je maksimum oko 12,663 eV. Kao nova komponenta spektra se uočava oscilacioni maksimum na 12,658.5 eV što indikuje prisustvo redukovane forme selena, najverovatnije monokliničnih ili ortorombičnih alotropa zbog vidljive crvene obojenosti uzoraka, ili Se-S kompleksa (signal Se^{2-}), DMSe ili mešavina Se^{2-} i Se^0 zbog nižeg intenziteta signala. Nastanak Se^0 je sporiji ili nepotpun u poređenju sa tretmanom micelije 0,5 mM Na_2SeO_3 . Pri visokoj koncentraciji Na_2SeO_3 veći deo selena ostaje u obliku Se^{4+} i nakon 24 h, sa manjom frakcijom u redukovanom/elementarnom obliku.

Prvi izvod spektra micelije tretirane 10 mM Na_2SeO_3 24 h (Slika 35e) sadrži dva maksimuma koji po energijama odgovaraju referentnim maksimumima Se^{4+} i DMSe/ Se^0 što se može objasniti prisustvom mešavine Se^{4+} i volatilnih/organskih oblika selena, ali u manjoj meri nego u uzorcima tretiranim 0,5 mM Na_2SeO_3 tokom istog vremenskog perioda. Prisustvo volatilnih derivata u ovoj fazi je okarakterisano i prisustvom karakterističnog mirisa.

Promene položaja i relativnih doprinosa oblika Se u prvom izvodu spektra micelije tretirane 10 mM Na_2SeO_3 1 h, 3 h i 24 h (Slika 35f) su manje izražene nego pri 0,5 mM Na_2SeO_3 , što sugeriše sporiju kinetiku redukcije i/ili formiranje volatilnih/organskih jedinjenja selena, što je praćeno potpunom eliminacijom Na_2SeO_3 .

Pri višoj koncentraciji Na_2SeO_3 većina selena je u obliku Se^{4+} u toku merenja, dok je nastanak Se^0 i/ili DMSe sporiji i/ili manji u udelu, uz istovremeno stvaranje volatilnih/organskih komponenti, u meri koja zavisi od vremena inkubacije.

Formiranje Se-S ili organskih jedinjenja Se se može prikriti zbog preklapanja sa opsegom energije apsorpcije Se^0 , što je moguće rasvetliti Ramanovom spektroskopijom.



Slika 35: XANES spektri micelije gljive *P. blakesleeanus* tretirane Na_2SeO_3 . a) Referentni standardi Se^0 (crno) i Na_2SeO_3 (plavo) i micelija inkubirana 24 h sa 0,5 mM Na_2SeO_3 (zeleno); b) Prvi izvodi spektara referentnog standarda Se^0 i micelije tretirane Na_2SeO_3 tokom 1 h; c) Micelija inkubirana 1 h sa 0,5 mM Na_2SeO_3 (narandžasto), 3 h (ljubičasto), i 24 h (zeleno); d) Micelija inkubirana sa 10 mM Na_2SeO_3 tokom 24 h (crveno) i referentni standard za Se^0 (crno) i Na_2SeO_3

(plavo); e) Prvi izvodi spektara za Se^0 , Na_2SeO_3 i referentni standard za dimetilselenid (DMSe) i micelija tretirana 24 h sa 10 mM Na_2SeO_3 ; f) Prvi izvodi spektara micelije tretirane 1 h, 3 h i 24 h sa 10 mM Na_2SeO_3 .

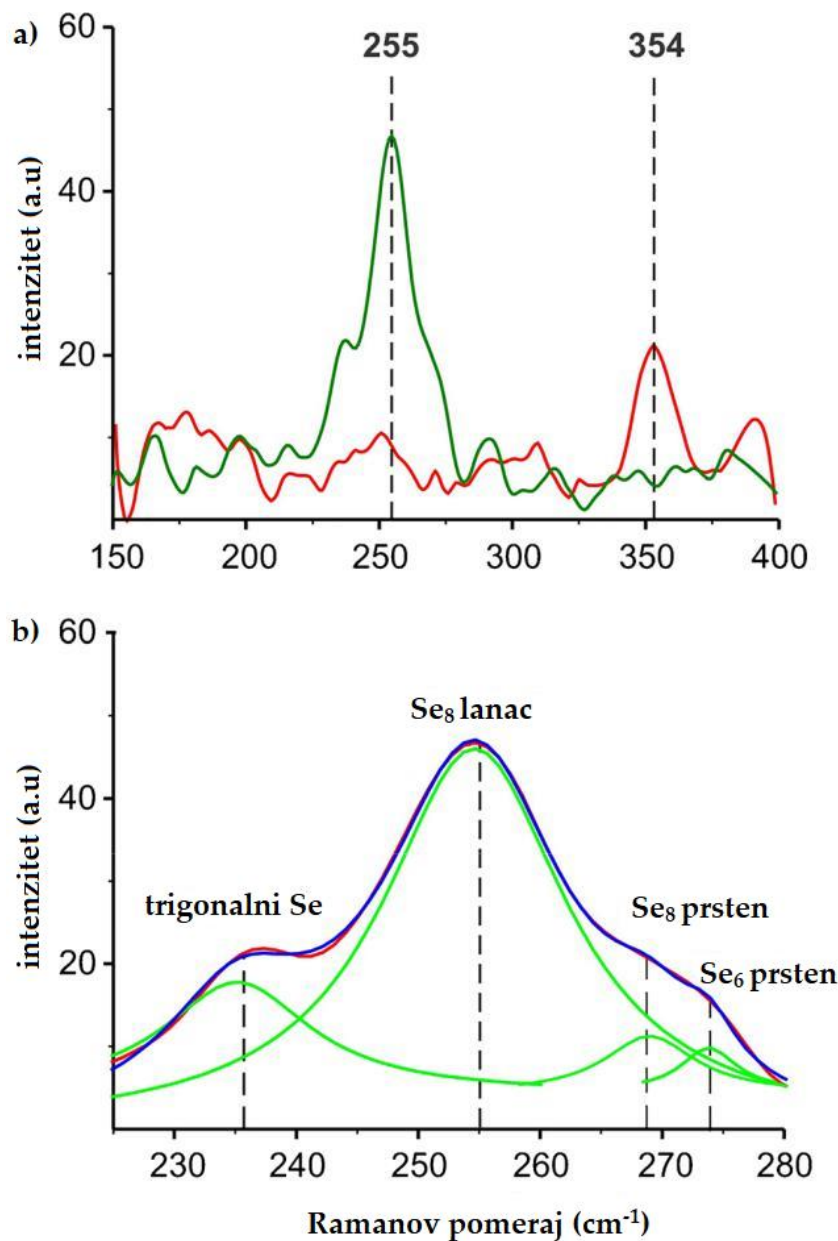
Koordinaciona geometrija proizvedenih SeNP je određen Ramanovom spektroskopijom (Slika 36). Ramanova spektroskopija zasniva se na promeni polarnosti funkcionalnih grupa unutar molekula tokom njihove vibracije (Paul et al., 2024). U slučaju Se, dva atoma su povezana dvostrukom vezom, koja se sastoji od jače σ -veze i slabije π -veze. Zbog relativne slabosti π -veze, elektronski oblak koji formira vezu lako se deformiše pod uticajem laserskog zračenja, odnosno električnog polja, što rezultira intenzivnim Ramanovim signalom (Paul et al., 2024). Selen je težak atom u poređenju sa ugljenikom ili vodonikom, čije vibracije se nalaze na višim energijama. Osim toga, slabija π -veza dodatno smanjuje energiju vibracije. Pošto se molekulske vibracije mogu približno opisati modelom harmonijskog oscilatora, energija vibracije je proporcionalna jačini veze, a obrnuto proporcionalna masi atoma (Jang, 2023). Kod teških atoma i slabih veza, vibracije molekula se javljaju na nižim energijama, što znači na nižim frekvencijama, odnosno nižim talasnim brojevima u Ramanovom spektru (Pakhomov et al., 2011). Zbog toga se karakteristične Ramanove trake jedinjenja Se nalaze u oblasti malih talasnih brojeva, što je u skladu sa njihovom strukturom i vibracionim svojstvima. Talasni broj je obrnuto proporcionalan talasnoj dužini i predstavlja broj talasa po jedinici rastojanja, dok je talasna dužina rastojanje između dve najbliže tačke koje osciluju u istoj fazi. Spektralne karakteristike SeNP su stoga procenjene u oblasti malih talasnih brojeva, karakterističnih za vibracione trake SeNP.

Najintenzivnija Ramanova traka je detektovana na 255 cm^{-1} (Slika 36a, zeleno) i odgovara simetričnoj vibraciji istezanja Se-Se veze, karakterističnoj za elementarni selen, naročito trigonalnu alotropsku modifikaciju (Se_8 prstenovi kristalnog selena). Intenzitet signala sugerije značajnu akumulaciju Se^0 u biomasi. Ova traka je tipična za polimerni ili alifatični oblik elementarnog selena, koji se često formira kao produkt biološke redukcije selenita. Takođe, primećuje se i traka na manjoj vrednosti talasnog broja ove intenzivne trake čiji je centar na oko 236 cm^{-1} , što je karakteristika vibracija istezanja Se-Se veze amorfni oblika selena, naročito lančanih Se_n struktura. Ovaj signal upućuje na delimičnu redukciju Se^{4+} , sa nekompletnom kristalizacijom, što može biti dinamična prelazna faza između redukcije Na_2SeO_3 i formiranja SeNP ili DMSe. Širokopojasna traka niskog intenziteta na 354 cm^{-1} (Slika 36a, crveno) sugerije prisustvo DMSe ili jedinjenja organoselena.

Radi provere da li se maksimum na strani veće talasne dužine glavnog signala može pripisati vibracionom pojasu Se_8 prstenastih struktura, izvršena je dekonvolucija grupe signala na oko 255 cm^{-1} (Slika 36b). Koristeći dekonvolucije Lorencovim oblikom signala, identifikovane su četiri intenzivne trake, karakteristične za različite strukturne

oblike selena. Pored dve glavne trake (na 255 cm^{-1} i 236 cm^{-1}), otkriveni su signali nižeg intenziteta sa centrom na 268 i 274 cm^{-1} . Iako je zbog male koncentracije Se u uzorku odnos signal-šum u spektrima bio nešto veći što je otežalo interpretaciju signala nižih intenziteta, uzet je u obzir i deo spektra od $60 - 180\text{ cm}^{-1}$. U spektru su detektovana tri široka signala. Prvi na frekvenciji od oko 73 cm^{-1} potiče od vibracionog savijanja Se_8 prstena i, zajedno sa rastegljivom vezom prstena Se_8 postavljenom na 268 cm^{-1} , potvrđuje postojanje ovog strukturnog oblika SeNP. S druge strane, vibracije na $109, 135$ i 274 cm^{-1} pripadaju vibracionom modu deformacije i istežanja prstenaste veze Se_6 . Sve ovo upućuje na zaključak da je glavni proizvod redukcije Na_2SeO_3 mešavina visoko simetričnih monokliničnih Se_8 monomernih jedinica D_{4h} grupe simetrije (tačkaste simetrije) i Se_6 prstenaste strukture (Salaneck et al., 1977).

Kako su glavne strukturne karakteristike SeNP dobijene Ramanovom spektroskopijom, isti metod je primenjen za testiranje hipoteze o nemogućnosti redukcije ekstracelularno dodatog Na_2SeO_4 . Ovaj metod je potvrdio hipotezu da micelijum *P. blakesleeanus* nema sposobnost redukcije ovog oblika selena.

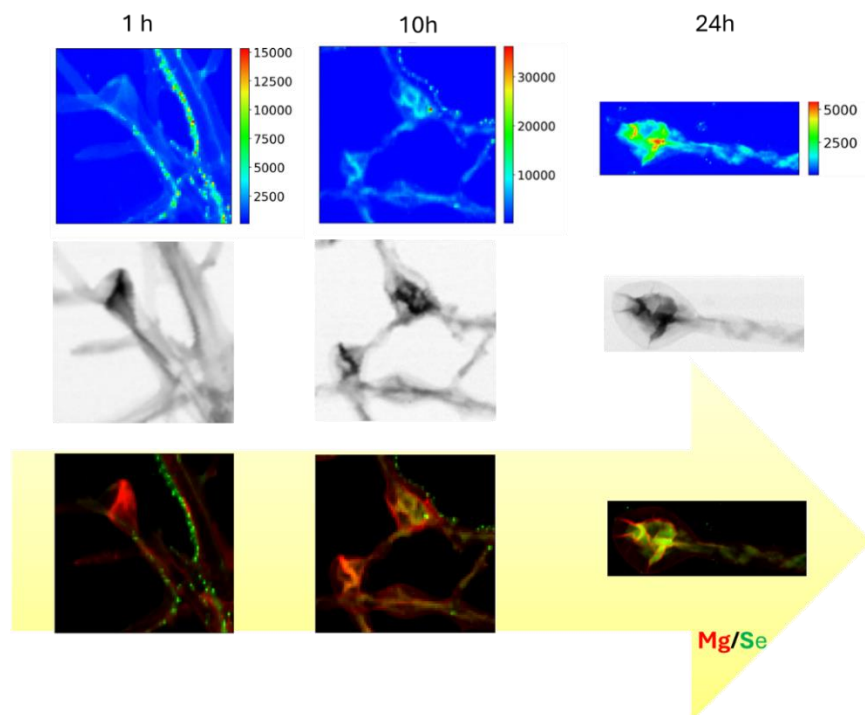


Slika 36: Ramanov spektar micelije gljive *P. blakesleeanus* tretirane 10 mM Na₂SeO₃ tokom 28 h. a) Spektar micelijuma (zeleno) sa najintenzivnijom trakom na 255 cm⁻¹, karakterističnom vibracionom trakom za SeNP, i rastvorljiva frakcija (crveno) sa širokom trakom na 354 cm⁻¹ koja je najverovatnije rezultat reakcije intracelularnog selena i proteina koji sadrže sumpor. b) Dekonvolucija glavne trake micelijuma na 255 cm⁻¹ otkriva predominantne monoklične Se₈ lance zajedno sa trigonalnim lancima Se polimera, prstenastim strukturama Se₈ i Se₆.

Prostorna distribucija unutarćelijskog selena je utvrđena korišćenjem specijalizovane tehnike XRF, rendgenske fluorescentne mikroskopije niskih energija

sinhrotronskog zračenja (LEXFM) u kombinaciji sa skenirajućom transmisionom rendgenskom mikroskopijom (STXM). Optimalni signal je dobijen za uzorke tretirane već sa 0,5 mM Se. Na osnovu podataka krive rasta, za XFM merenja odabran je uzorak inkubiran u 0,5 mM (skoro bez uticaja na rast gljive), 1 mM (manji, ali ne statistički značajan inhibicioni efekat Se) i 10 mM (značajni, ali ne i letalni efekat Se). Zbog nedostatka bolje izolovanih primeraka, gusta distribucija hifa izazvala je često preklapanje i spajanje nekoliko ćelija. Sve XFM mape su dobijene sa prostornom rezolucijom od 1 μm . Pored prostorne distribucije selena, prikazane su mape preklapanja Mg i Se da bi se stekao bolji uvid u ćelijsku lokaciju Se. Mg u micelijumu *P. blakesleeanus* je uglavnom raspoređen u ćelijskoj membrani, što u 2D prikazu ističe oblik ćelije, a na dijagramu preklapanja pruža jasnije informacije o raspodeli Se. S druge strane, odgovarajuće STXM apsorpcione slike pokazuju morfologiju ćelije, koja povrh toga može uticati na broj detektovanih XRF fotona. To znači da ponekad veći broj detektovanih fotona može jednostavno biti posledica veće apsorpcije dela ćelije koji je deblji ili gušći, i stoga se prilikom tumačenja hemijskih mapa to mora uzeti u obzir.

Se je u prvom satu inkubacije (Slika 37) raspoređen u ekstracelularnom prostoru ili ćelijskom zidu. Zatim, posle 10 h, dolazi do evidentne intracelularne distribucije selena. Nakon 24 h selen je potpuno ugrađen u ćelije gljive.

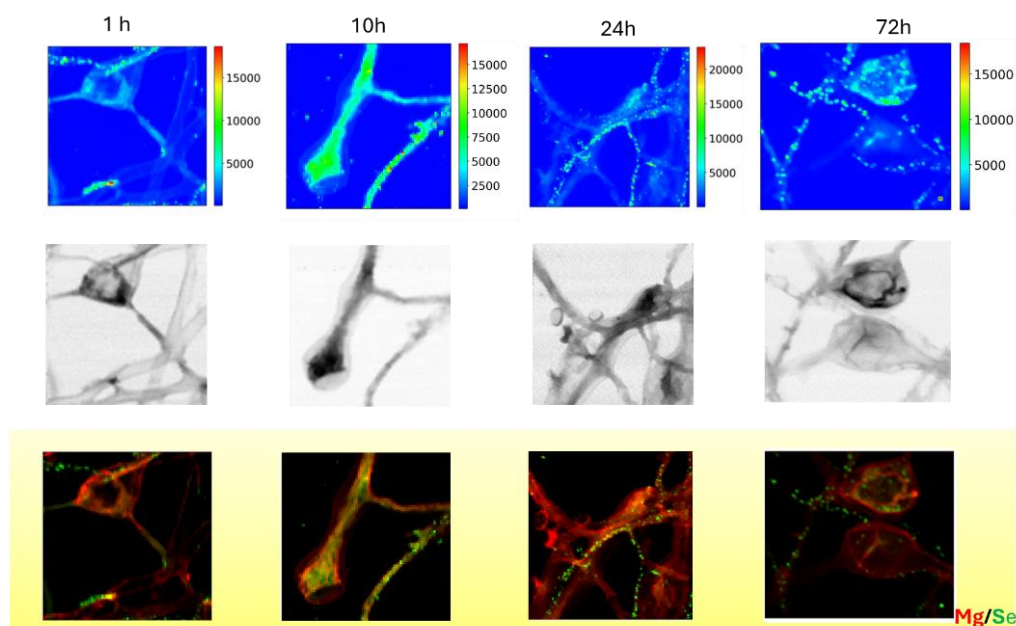


Slika 37: XFM mapa selena micelije tretirane Na_2SeO_3 koncentracije 0,5 mM tokom 1 h, 10 h i 24 h (prikazano u gornjem redu). Odgovarajuće STXM slike apsorpcije su prikazane u

srednjem redu. Preklapanje XFM signala Mg (crveno) i Se (zeleno) u istovetnim uzorcima (donji red).

Mnogo manja koncentracija Se u uzorku od 24 h je rezultat isparavanja velike količine metabolisanog Se usled detoksifikacije.

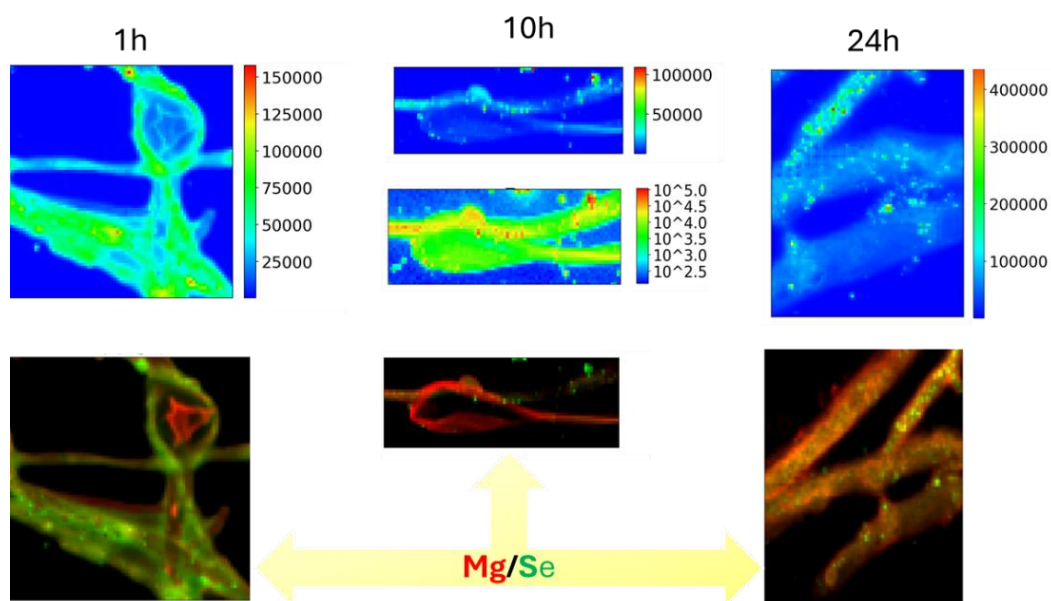
Situacija je drugačija u uzorcima inkubiranim u 1 mM Se gde, iako način internalizacije prati sličan trend, formiranje SeNP na površini ćelije postaje vidljivo nakon 10 h inkubacije. Glavni deo selena ostaje rasprostranjen u međucelijskom prostoru. Kao što sugerišu rezultati biohemijskih merenja, ovo je tačka kada dolazi do značajnih metaboličkih promena kod gljive. Konačni rezultat ćelijskog delovanja je vidljiv u uzorku inkubiranom 24 h u rastvoru Na_2SeO_3 gde je otkriveno prisustvo SeNP praćeno ravnomernom intracelularnom distribucijom. Za duže vreme izlaganja (72 h) doprinos SeNP ukupnom sadržaju selena je još očigledniji. Otuda vidljiva ravnomerna distribucija selena je evidentna samo iz regiona gusto raspoređenih hifa koji zbog više ćelijskog materijala daju jači apsorpcioni signal.



Slika 38: XFM mapa micelija tretiranih 1 mM Na_2SeO_3 tokom 1 h, 10 h, 24 h i 72 h je prikazana u gornjem redu. Broj merenja za uzorke sa različitim fluksom (prostorne rezolucije od $0,5 \mu\text{m}$) se množi sa faktorom 3,6 da bi se mogao uporediti sa uzorcima merenim sa većim prečnikom sekundarnog izvora. Odgovarajuće STXM slike apsorpcije su prikazane u srednjem redu. Donji red pokazuje preklapanje XFM signala Mg (crveno) i Se (zeleno) u istim delovima uzoraka.

XFM mape dva najduža vremena inkubacije snimane su sa prostornom rezolucijom od 500 nm zbog preciznije detekcije agregata mogućih nančestica. Veća rezolucija se postiže smanjivanjem otvora koji služi kao primarni sekundarni izvor primarnih fotona. Zbog toga je broj primarnih fotona izvornog zraka manji i prema tome ukupan broj detektovanih, sekundarnih, fotona je pomnožen sa faktorom 3,6. Sekundarni fotoni nastaju oslobađanjem viška energije prilikom prelaska elektrona sa više energetske orbitale u upražnjeno mesto na nižoj orbitali. Preklapajući dijagrami raspodele Mg (crveno) i Se (zeleno) svedoče istovremeno o vremenskom toku transformacije selena vođene micelijumom. Pored toga, intenzitet crvenog signala Mg potvrđuje njegovu najveću količinu u ćelijskoj membrani, dok je Se distribuiran i u nuklearnoj frakciji i u citosolu.

Sledeći korak u odgovoru gljive na prisustvo Na_2SeO_3 bio je usmeren ka, prema podacima krive rasta, opasnijoj koncentraciji Na_2SeO_3 (10 mM).



Slika 39: XFM mape Se kod micelija tretiranih sa 10 mM Na_2SeO_3 tokom 1 h, 10 h i 24 h prikazane su u gornjem redu. Za uzorke od 10 sati, brojanja su takođe prikazana u logaritamskoj skali. Broj brojanja za merenja sa različitim fluksom (prostorna rezolucija od 0,3 μm) se množi sa faktorom 12 da bi se mogao porediti sa onima merenim sa većim prečnikom sekundarnog izvora. Donji red pokazuje preklapanje XFM signala Mg (crveno) i Se (zeleno) za iste delove uzoraka.

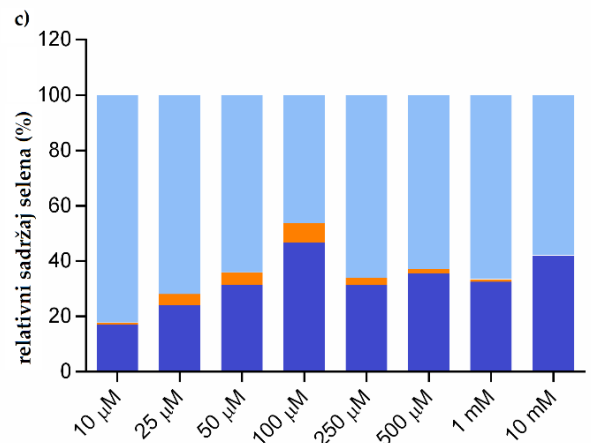
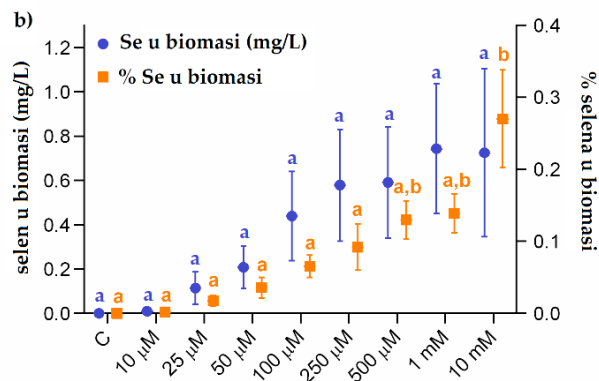
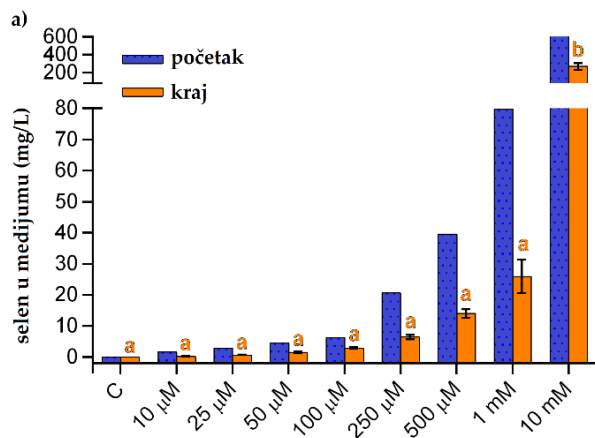
Broj detektovanih fotona je bio mnogo veći zbog veće početne koncentracije Se. U ćelijama inkubiranim 1 h je vidljivo prisustvo Se na površini ćelija, ili oko ćelije. U uzorku od 10 h, čini se da se Se zadržao u ekstraćelijskom prostoru ili vezan za površinu, ali nakon promene linearne u logaritamsku skalu (zbog ogromnog broja brojanja u

poređenju sa prethodnim tretmanima), može se identifikovati i intracelularna distribucija. Ipak, ujednačena 2D distribucija sugeriše ćelijsku membranu kao kompartment sa dominantnom koncentracijom Se. Istovremeno, jedan deo selena uopšte nije apsorbovan. Nakon 24 h od tretmana, SeNP su predstavljale značajan deo Se sa još uvek visokim procentom drugih vrsta.

4.12 ICP analiza

Rast micelija u medijumima koji sadrže različite koncentracije rastvora Na_2SeO_3 ($10 \mu\text{M}$ – 10mM) rezultirao je smanjenjem koncentracije selena u medijumu (Slika 40a) i delimičnim obogaćivanjem micelijuma selenom (Slika 40b). Nakon 10 sati kultivacije, zbir ukupnog Se u medijumu i u micelijumu bio je niži od koncentracije u odgovarajućem početnom medijumu, što ukazuje da je oko 60% prvobitno prisutnog selena izgubljeno (osim najniže koncentracije Na_2SeO_3 , gde je gubitak bio oko 80%) (Slika 40c) u obliku isparljivih derivata selena, što je potvrđeno primetnim karakterističnim mirisom kultura.

Udeo selena u suvoj biomasi povećavao se sa povećanjem koncentracije selena (Slika 40b, narandžasto), dostižući maksimum sa tretmanom od 10mM , ali je sadržaj Se u biomasi po uzorku dostigao maksimum sa tretmanom od 1mM (Slika 40b, plavo). Ovo se može pripisati značajnoj stagnaciji rasta sa tretmanom 10mM rastvora Na_2SeO_3 . Relativne količine selena u medijumu, biomasi i atmosferi nakon 10 sati tretmana sa rastućim koncentracijama selena prikazane su na Slici 43c. Isparavanje derivata selena preovladava sa nižim koncentracijama tretmana i ima najmanji udeo u tretmanu od $100 \mu\text{M}$. Iako je koncentracija selena u medijumu i dalje značajna nakon 10 sati inkubacije, treba uzeti u obzir da *P. blakesleenus* proizvodi SeNP koje se nalaze na površini hifa i u samom medijumu.



isparljiva frakcija	82.26	71.90	64.03	46.37	65.96	62.96	66.53	57.93
micelijum	0.61	4.04	4.61	7.01	2.81	1.49	0.93	0.11
medijum	17.13	24.06	31.37	46.62	31.23	35.54	32.54	41.96

Slika 40: Sadržaj selena nakon 10 sati kultivacije micelija u medijumu sa različitim koncentracijama Na_2SeO_3 (10 μM – 10 mM). a) Koncentracija selena u medijumu pre (početak,

početni rastvor medijuma, $n = 1$) i posle kultivacije micelijuma (kraj, $n = 3$) tokom 10 sati. **b)** Koncentracija selena u micelijumu po 1 L uzorka (leva osa, plave tačke, $n = 3$); procentualni udeo selena u biomasi (desna osa, narandžasti kvadrati, $n = 3$). **c)** Relativni udeo selena u medijumu, micelijumu i isparljivoj frakciji nakon 10 sati tretmana. Statistička značajnost razlika je utvrđena jednosmernim ANOVA testom ($P < 0,05$), koji je praćen Holm-Sidakovim testom, i naznačena je slovima iznad kolona. Boja slova označava parove poređenih uzoraka. ICP analiza svežeg medijuma je vršena na po jednom medijumu po koncentraciji, dok je koncentracija selena u miceliji i medijumu nakon kultivacije vršena na 3 uzorka po koncentraciji ($n = 3$).

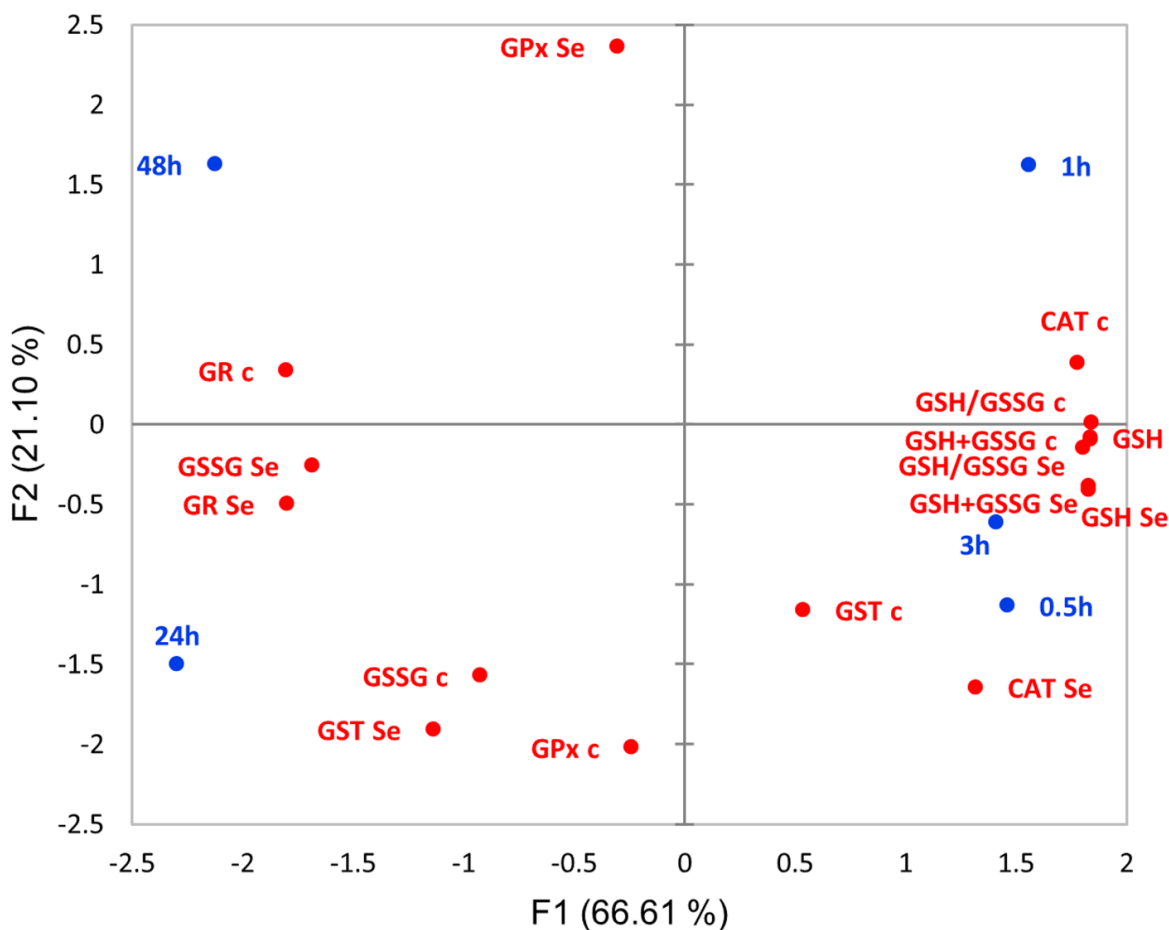
4.13 PCA analiza

Da bi se sumirali međusobni odnosi faze rasta i efekata $100 \mu\text{M Na}_2\text{SeO}_3$ na sadržaj glutationa i aktivnost antioksidativnih enzima, izvršena je PCA analiza. Rezultati su predstavljeni kao dvodimenzionalni grafikon (biplot) koji povezuje efekte dužine rasta i suplementacije selenom (Slika 41). Zadržane su dve faktorijalne ose – glavne komponente. F1 osa označava primarni izvor razlika među uzorcima i nosi 66,61% varijanse. F2 osa nosi manju varijabilnost od F1 ose (21,10% ukupne varijanse), međutim i dalje doprinosi značajnom sekundarnom razdvajanju uzoraka. Analiza PCA ravni pokazuje oštro razdvajanje duž F1 ose između kratko tretiranih uzoraka (0,5 h, 1 h i 3 h) koji su grupisani na njenom pozitivnom kraju i duže tretiranih uzoraka (24 h i 48 h) grupisanih na njenom negativnom kraju. Kako su i uzorci tretirani Na_2SeO_3 i njima odgovarajuće kontrole u slučaju CAT, GR i većine parametara vezanih za glutation smešteni na istom kraju F1 ose, uočeno razdvajanje ne može biti posledica tretmana Na_2SeO_3 već starosti micelije. Kako F1 osa objašnjava veći deo varijabilnosti to znači da promene tokom razvića micelije imaju značajniji uticaj na elemente antioksidativnog sistema u odnosu na tretman Na_2SeO_3 . Uočena razvojna promena koja se dešava između trećeg i 27. sata tretmana, što odgovara micelijumima starim 27 h i 45 h i predstavljena je padom sktivnosti CAT i koncentracije GSSG, a porastom aktivnosti GR, je najverovatnije izazvana prelaskom micelije iz eksponencijalne u stacionarnu fazu rasta.

Aktivnost GPx između kontrolnih uzoraka i uzoraka tretiranih Na_2SeO_3 je oštro razdvojena duž F2 ose. Stoga se F2 osa može direktno povezati sa efektima izazvanim tretmanom Na_2SeO_3 . U slučaju GPx, tretman Na_2SeO_3 dovodi do porasta aktivnosti i smešta tretirane uzorke na pozitivnan kraju F2 ose, dok su kontrolni uzorci na negativnom kraju F2 ose.

U slučaju koncentracije GSSG i aktivnosti GST, kontrolni i uzorci tretirani Na_2SeO_3 su razdvojeni i duž F1 i duž F2 ose. U oba slučaja su kontrolni uzorci smešteni bliže F2 osi što ukazuje na gotovo potpuno odsustvo razvojnih promena. Međutim, usled porasta koncentracije GSSG u uzorcima koji su bili tretirani 24 h i 48 h u odnosu na kratkotrajno tretirane uzorke, koncentracija GSSG tretiranih uzoraka je smeštena na negativnom kraju F1 ose što ukazuje da je tretman Na_2SeO_3 uzrokovao razvojnu promenu koja je izostala u

kontroli. Sličan porast aktivnosti kod uzoraka tretiranih Na_2SeO_3 24 h je uočen u slučaju GST, ali je razvojna promena ostala nedovoljno uočljiva usled mnogo veće varijabilnosti u aktivnosti ovog enzima kod kraće tretiranih uzoraka (0,5 h, 1 h i 3 h) smeštajući ove uzorke u donji levi ugao PCA ravni.



Slika 41: Analiza glavnih komponenti korelacione matrice (PCA), biplot biohemijskih parametara micelije *P. blakesleenus* u kontrolnoj grupi (c) i uzorcima tretiranim sa $100 \mu\text{M}$ Na_2SeO_3 (Se), 0,5, 1, 3, 24 i 48 sati nakon tretmana. Diferencijacija duž F1 ose označava 66,6% varijacije i uglavnom se odnosi na stadijume razvića gljive (eksponencijalna ili stacionarna faza). Diferencijacija duž F2 ose objašnjava 21% varijabilnosti gde se razlike mogu pripisati tretmanu Na_2SeO_3 .

Buduća identifikacija pravca orijentacije i dužine vektora biohemijskih parametara bi bila korisna u daljem rasvetljavanju varijanse podataka, kao i u potencijalnoj identifikaciji markera za prelazak iz rane u kasnu fazu rasta ili za razlikovanje promena izazvanih selenitom od normalnih razvojnih promena.

5. DISKUSIJA

P. blakesleeanus je isključivo aerobna končasta gljiva koja se koristi u mnogim fiziološkim, genetičkim, metaboličkim i ekološkim istraživanjima. Studija o fiziološkim odgovorima ove gljive na oksidativni stres može pružiti važne informacije o preživljavanju ove i drugih filamentoznih gljiva, kao i njihovom uticaju na proizvodnju bioaktivnih jedinjenja (De Castro et al., 2013). U ovoj tezi je izvršena analiza komponenti sistema antioksidativne odbrane kod filamentozne gljive *P. blakesleeanus* i ispitivan odgovor ove gljive na prisustvo toksičnog oblika selena kroz identifikaciju vrsta usvojenih i akumuliranih u gljivi sa posebnim akcentom na proizvodnju potencijalno korisnih SeNP, kao i prostornu distribuciju selena u ćeliji.

5.1 Toksičnost selenita

Toksičnost selena je kompleksan fenomen koji utiče na organizme u svim domenima života. Selen je neophodan mikroelement koji u višim koncentracijama, posebno u obliku selenita i/ili selenata, može poremetiti ćelijsku homeostazu (Lv et al., 2021).

Osnovni mehanizam toksičnosti selena je indukcija oksidativnog stresa usled prooksidativnog delovanja. Neorganske vrste selena, posebno selenit, mogu reagovati sa intracelularnim tiolima poput GSH, formirajući reaktivne intermedijere kao što su selenotrisulfidi. Ovi intermedijeri generišu ROS, što dovodi do oksidativnog oštećenja lipida, proteina i nukleinskih kiselina (Mézes & Balogh, 2009).

Se-analozi aminokiselina koje sadrže sumpor, SeCys i SeMet, se mogu pogrešno ugraditi u proteine umesto Cys i Met. Ova pogrešna ugradnja menja konformaciju i funkcionalnost proteina, doprinoseći citotoksičnosti selena (Mézes & Balogh, 2009).

Detoksifikacija često uključuje metilaciju selenida do isparljivih jedinjenja poput DMSe ili DMDSe. Međutim, ovi derivati takođe mogu generisati ROS i doprineti toksičnosti ako se ne izluče efikasno iz ćelije (Mézes & Balogh, 2009).

Gljive ispoljavaju nekoliko specifičnih reakcija na selen. Izlaganje selenitu može izazvati oksidativni stres u ćelijama gljiva, pokrećući povećanje aktivnosti enzima zaštite od oksidativnih oštećenja. Međutim, prekomerne količine ROS mogu nadvladati ove odbrambene mehanizme, što dovodi do oštećenja ćelija (Sabuda et al., 2020). Selenit reaguje sa GSH, iscrpljujući intracelularni sadržaj tiola i oštećujući kapacitet održanja oksidativne ravnoteže, što smanjuje redoks potencijal ćelije i remeti signalne puteve zavisne od ROS (Mézes & Balogh, 2009). Selen se može akumulirati u ćelijskom zidu, vakuolama ili citoplazmi gljiva. Neke gljive, uključujući *P. blakesleeanus*, redukuju selenit do elementarnog selena, formirajući SeNP (Žižić et al., 2022). Visoke koncentracije

selenita mogu dovesti i do formiranja Se–S organskih jedinjenja. Ove biotransformacije su strategija detoksifikacije, ali pri višim koncentracijama selenita može doći do akumulacije toksičnih derivata poput metilovanih selenida. Prema *in vitro* studijama, ćelijska proizvodnja superoksida je rezultat reakcija između selenita i ćelijskih sulfhidrilnih jedinjenja, poput redukovanog glutationa ili redukovanih cisteinskih ostataka proteina (Bébién et al., 2002).

Ćelije kvasca tretirane selenitom su sklone dvostrukom prekidu DNK lanca i pokazuju povećanu stopu mutacija (Herrero & Wellinger, 2015). Nekoliko vrsta Ascomycota redukuje selenit i selenat do elementarnog selenita, međutim pri višim koncentracijama selenita dolazi do inhibicije rasta, što potvrđuje toksičnost zavisnu od doze (Rosenfeld et al., 2017). Micelija *P. blakesleeanus* je pokazala izuzetnu otpornost prilikom gajenja u medijumu obogaćenom selenom. Na osnovu prikazanih rezultata (Slika 19), toksičnost selenita kod *P. blakesleeanus* ispoljava jasnu zavisnost od doze. Pri niskim, mikromolarnim koncentracijama, selenit nije samo netoksičan, već zapravo stimuliše rast, pokazujući hormetički efekat na proizvodnju biomase gljive, kao i kod nekih drugih gljiva (Kim et al., 2014; Vetchinkina et al., 2013; J. Wang et al., 2016). Podsticanje rasta micelijuma niskom koncentracijom selenita je prethodno pokazano kod različitih vrsta gljiva (Kim et al., 2014; J. Wang et al., 2016; Xu et al., 2021), iako je opseg koncentracija selenita u tretmanu bio različit. Selenit u opsegu koncentracija od 50 μM – 1 mM nije imao statistički značajan efekat na proizvodnju biomase *P. blakesleeanus*. Sa porastom koncentracije selenita na 250 μM dolazi do blage inhibicije rasta (oko 10%), ali ovaj nivo inhibicije nije statistički značajan da bi se smatrao toksičnim efektom. Tek kada koncentracija selenita pređe 1 mM, gljiva ispoljava umanjeno rast, dok 10 mM rastvor selenita dovodi do jasnog, statistički značajnog smanjenja biomase (~ 40%), mada je 10 mM značajno veća doza u poređenju sa drugim eksperimentalnim uslovima (Liang et al., 2019; J. Wang et al., 2016; Espinosa-Ortiz et al., 2015; H. Shao et al., 2019; Angelova et al., 2005; Rosenfeld et al., 2017) i ukazuje na veoma visoku toleranciju *P. blakesleeanus* prema selenitu.

Ova zapažanja sugerišu da *P. blakesleeanus* pokazuje otpornost, pa čak i ima koristi od niskih koncentracija selenita – verovatno zbog adaptivnih ili mehanizama detoksifikacije – dok samo mnogo veće koncentracije dovode do značajne toksičnosti. Ovaj hormetički odgovor naglašava važnost doze prilikom procene efekata potencijalno toksičnih jedinjenja. Pored ovih nalaza, zanimljivo je razmotriti šire implikacije: koncentraciono zavisni efekti su uobičajeni u toksikologiji i ističu kako supstance koje ispoljavaju štetan efekat u visokim dozama mogu imati korisnu ulogu u niskim dozama. Ovo bi moglo biti od posebnog interesa u naukama o životnoj sredini ili industrijskim primenama gde je upravljanje izloženostima od velike važnosti.

5.2 Sadržaj proteina

Ukupan sadržaj proteina u miceliji ostaje nepromenjen bez obzira na fazu rasta i tretman selenitom. Konkretno, nivo proteina je u svim uzorcima iznosio $57,8 \pm 1,3$ μg po gramu suve mase (Poglavlje 4.3).

Ova konstantnost može ukazivati na veoma robusnu metaboličku homeostazu gljive, gde uprkos izlaganju selenitu, gljiva održava mehanizam sinteze proteina pod dejstvom selenita. Iako apsorpcija selenita i naknadne biohemijske transformacije (kao što su proizvodnja SeNP ili modulacija specifičnih antioksidativnih enzima) mogu zahtevati aktivaciju ili povećanu ekspresiju određenih proteina, ove promene se ne odražavaju promenom ukupnog sadržaja proteina. Ovako stabilan ukupni sadržaj proteina implicira da su metabolički putevi važni za održavanje ćelijske homeostaze i rast očuvani i tokom izlaganja selenitu, biohemijskom stresu ili transformacijama izazvanim selenitom. Ovo zapažanje se može protumačiti postojanjem specifičnih odgovora gljive na prisustvo selena koje se dešava umesto odvijanja značajnih metaboličkih promena. Prethodna istraživanja na gljivi *A. niger* pokazali su da se koncentracija proteina smanjuje u uslovima oksidativnog stresa (Bai et al., 2004). Kod *S. cerevisiae*, izloženost H_2O_2 rezultira usporavanjem procesa biosinteze proteina i stimulacijom puteva razgradnje proteina (Godon et al., 1998).

Činjenica da tretman različitim koncentracijama selenita ne dovodi do promena u sadržaju proteina sugerise da gljiva može da kontroliše metabolizam selena bez ugrožavanja osnovnih ćelijskih funkcija. Ova odlika je odličan preduslov sa biotehnoološke perspektive, posebno u primenama poput bioremedijacije ili kontrolisane biosinteze SeNP, gde je konzistentna metabolička aktivnost ključna.

5.3 Biohemijski parametri

Biohemijski parametri pružaju detaljan prikaz uticaja $100 \mu\text{M}$ rastvor selenita na antioksidativni mehanizam gljive *P. blakesleeanus*, posebno u poređenju sa trendovima kod kontrolnih uzoraka. Koncentracija selenita od $100 \mu\text{M}$ je odabrana zato što ne utiče statistički značajno na rast micelijuma. Metabolizam gljiva tokom redukcije selenita bio je u fokusu različitih studija, međutim, većina se bavila karakterizacijom biosintetisanih SeNP ili biomolekula, njihovom biološkom aktivnošću i potencijalnom upotrebom dok su mnogi procesi biotransformacije selena još uvek nejasni (Espinosa-Ortiz et al., 2015; Liang et al., 2019; Malinowska et al., 2009; Vetchinkina et al., 2013; Hashem et al., 2021; Faramarzi et al., 2020; Hussein et al., 2022). Mehanizmi sinteze SeNP su uglavnom proučavani kod bakterija (Y. Tan et al., 2016; D. B. Li et al., 2014; Liu et al., 2018) i različiti enzimi su predloženi kao katalizatori tokom sinteze SeNP. Neke studije su se bavile efektima selenita na metabolizam gljiva (Y. Y. Ren et al., 2020; Kim et al., 2014;

Milovanović et al., 2014), ali mehanizam sinteze SeNP i efekti selenita na antioksidativni metabolizam gljiva još uvek nisu potpuno rasvetljeni.

Biohemijske analize pokazuju da izlaganje selenitu pri koncentraciji 100 μM pokreće rani antioksidativni odgovor. Elektroforetske analize otkrivaju dve različite izoforme SOD, Mn-zavisnu SOD i Cu/ZnSOD (Slika 23), kao i jednu izoformu CAT (Slika 22). Ovi nalazi su u skladu sa prethodnim istraživanjima gde su kod *P. blakesleeanus*, kao i kod drugih filamentoznih gljiva, utvrđene dve forme SOD, Cu/ZnSOD i MnSOD (Gessler et al., 2007). Kvasac poseduje dva CAT izoenzima, u citosolu i u peroksizomima i mitohondrijama (H. Shao et al., 2019), dok je kod *P. blakesleeanus* u ovom radu utvrđeno prisustvo samo jedne izoforme CAT. Broj izoformi CAT kod gljiva varira u zavisnosti od vrste, i dok tačan broj kod *P. blakesleeanus* do sada nije utvrđen, studije sugerišu da je aktivnost CAT kod ove vrste razvojno regulisana i da reaguje na signale iz okoline kao što su svetlost i prisustvo cinka (Hilgenberg et al., 1981). Pokazano je da aktivnost različitih izoformi CAT kod gljiva zavisi od prirode stresora (Zamocky et al., 2008). Sa druge strane, utvrđene su barem tri izoforme CAT kod *A. nidulans* (Johnson et al., 2003), pet kod *Penicillium griseofulvum* (Stoyancheva et al., 2022) i više izoformi kod *N. crassa*, *A. fumigatus* i *Talaromyces marneffeii*, uključujući dvofunkcionalne CAT-POD (Stoyancheva et al., 2022). Aktivnosti CAT i SOD utvrđene u ovoj tezi su blago povećane nakon 24 sata izlaganja, što ne implicira buran odgovor radi eliminacije bilo kakvog oksidativnog stresa izazvanog selenom. Međutim, nakon 48 sati, aktivnost ovih enzima opada, što bi moglo da sugeriše da je početno povećanje ekspresije ili prolazni adaptivni odgovor ili da produženo izlaganje dovodi do regulatornog prilagođavanja, smanjenja ekspresije ili iscrpljivanja enzima odbrane. Diferencijalna ekspresija aktivnosti CAT i SOD u zavisnosti od faze rasta je već opisana kod *P. blakesleeanus*, gde se ekspresija CAT ističe u ekspanzionalnoj fazi, a SOD u stacionarnoj fazi rasta gljive (De Castro et al., 2013). Cu/ZnSOD i MnSOD izoforme su neophodne za normalan životni ciklus kod filamentoznih gljiva i kvasaca (Gessler et al., 2007). Nivo SOD opada starenjem, dok se generisanje slobodnih radikala povećava (Ighodaro & Akinloye, 2018). Pad ekspresije SOD gena izaziva povećanu osetljivost na agense koji dovode do oksidativnog stresa, kao i do smanjenja nivoa glutaciona. Gubitak SOD dramatično smanjuje životni vek *S. cerevisiae* (H. Shao et al., 2019), gde su Cu/ZnSOD i MnSOD potrebni u kasnoj stacionarnoj fazi rasta za zaštitu mitohondrijalnih proteina od oksidativnog stresa (Gessler et al., 2007). Niska aktivnost SOD među uzorcima gljive *P. blakesleeanus* se može objasniti različitim faktorima. Laboratorijski uslovi gajenja kao i vrsta korišćenog stresora su nesumnjivo uticali na ekspresiju gena SOD (Bébién et al., 2002). Ranije je tvrđeno postojanje razlika u nivou ekspresije enzima u odnosu na tip stresora koji se koristi. Tako je pod dejstvom peroksida aktivnost CAT znatno viša od aktivnosti SOD (De Castro et al., 2013), dok je suprotno pokazano pod dejstvom parakvata (Angelova et al., 2005). Nasuprot ovom zapažanju, kod gljiva *N. crassa* i *Xanthomonas oryzae* je znatno povećana

aktivnosti CAT pod dejstvom parakvata (Chary & Natvig, 1989). Aktivnosti CAT kod gljive *G. lucidum* tretirane sirćetnom kiselinom su dvostruko niže od aktivnosti u kontroli (A. Ren et al., 2017). Ukupna aktivnost izoformi SOD (SodA i SodB) kod *E. coli* je značajno povećana kao odgovor na tretmane selenitom i selenatom. Oksidativni stres izazvan parakvatom ili vodonik peroksidom indukuje ekspresiju izoforme sodA, ali ne i sodB. Nasuprot tome, sodB je hiper ekspimiran pri povećanoj koncentraciji gvožđa, što je istovremeno stanje koje umanjuje ekspresiju sodA. Sojevi *E. coli* kojima nedostaju geni koji kodiraju SOD su preosetljivi kako na selenit tako i na selenat. Aktivnost SOD je u ovom slučaju od suštinskog značaja za toleranciju prema oksianjonima selena, što sugerira da je proizvodnja superoksida glavni mehanizam toksičnosti selena u živim sistemima (Bébién et al., 2002). Ukupna aktivnost SOD raste tokom klijanja konidija *N. crassa* i prelaskom u stacionarnu fazu, što ukazuje da osim zaštitne uloge ovaj enzim ima i ulogu u razviću *N. crassa* (Belozerskaya & Gessler, 2006). Cyrne et al. (2003) utvrdili su da oksidativni stres modifikuje ekspresiju SOD izoformi na složen način, na transkripcionom, posttranskripcionom, translacionom i posttranslacionom nivou (De Castro et al., 2013). Različiti uslovi koje različite laboratorije koriste za indukciju oksidativnog stresa kod gljiva, kao što su dostupnost nutrijenata (Qiang Wang et al., 2021), vrsta stresora (Broxton & Culotta, 2016), pH, temperatura, faza rasta (Yin et al., 2015), verovatno su uzrok ovih različitih ponašanja jer mogu znatno uticati na ekspresiju i lokalizaciju enzima kod gljiva. Ove razlike su specifične za vrstu, a mogu postojati i među različitim sojevima iste vrste. Poznato je da se SOD inaktivše izlaganjem H₂O₂, dok su CAT i GPx inaktivirani superoksidom (Pigeolet et al., 1990). Tretman natrijum selenitom snižava, u zavisnosti od doze, nivo ekspresije MnSOD kod makrofaga linije J744.2 tako što inhibira transkripcione faktore koji regulišu sintezu ovog enzima (Shilo et al., 2005).

Aktivnost CAT pokazuje statistički značajno povećanje nakon 24 h izlaganja selenitu, što je usaglašeno sa nekim podacima iz literature. Kod *S. cerevisiae* aktivnost CAT je najviša tokom eksponencijalnog rasta, ali se visoke vrednosti (preko 50%) zadržavaju i u stacionarnoj fazi. U odmaklim stacionarnim fazama kultura kvasca ove vrednosti dalje rastu. Međutim, kod stacionarnih kultura *P. blakesleeanus* (60 h) pri normalnim uslovima nije detektovana aktivnost CAT (De Castro et al., 2013). Nasuprot tome, kod *Shiraia bambusicola* je aktivnost CAT blago inhibirana nakon 24 h izlaganja H₂O₂, a do porasta aktivnosti dolazi nakon 48 h, dostižući maksimalni nivo nakon 72 h (Deng et al., 2016).

Prema rezultatima dobijenim *in vitro* (Kramer & Ames, 1988), vodonik peroksid se pretežno formira pri niskoj koncentraciji tiola, a superoksid se uglavnom proizvodi pri visokoj koncentraciji tiola. Ovi podaci podupiru teoriju da je proizvodnja superoksida glavni okidač toksičnosti soli selena. U anaerobnim uslovima u kojima se ne može proizvesti superoksid, selenit je takođe toksičan, iako u većim koncentracijama nego u

aerobnim uslovima, što ukazuje i na postojanje drugih pravaca toksičnih efekata soli selena (Bébién et al., 2002). Otpornost *P. blakesleeanus* na stresore zavisi od faze rasta gljive i može se objasniti različitim odgovorom na oksidativni stres u obe faze. U fazi eksponencijalnog rasta, izuzetna vitalnost gljive je u osnovi posledica prisustva CAT, GPx, visokog nivoa GSH i, verovatno, GST. S druge strane, u stacionarnoj fazi (kada pri fiziološkim uslovima već dolazi do oksidativnih oštećenja usled starenja), preživljavanje gljive pod uslovima oksidativnog stresa je pripisana prisustvu SOD, GPx i GST i sekundarnih metabolita (De Castro et al., 2013). Kod *P. blakesleeanus* u eksperimentima ove disertacije već početkom izlaganja selenitu (30 minuta) visoka aktivnost GPx je praćena i jedinim zabeleženim skokom aktivnosti POD. Mogući razlog za nemerljivu aktivnost POD u kasnijim vremenskim tačkama je značajno niža konstanta brzine reakcija POD u odnosu na konstante brzina GPx i CAT (Deponte, 2013), čija aktivnost se povećava (GPx na 1 i 3 h, CAT na 3 i 24 h, zatim ponovo GPx na 48 h).

Aktivnosti GPx i GST su uključene u odgovor na stres uklanjanjem različitih peroksida i ksenobiotika (Wangsaunt & Pongpom, 2022), i pojačane su kod vrsta roda *Candida* tretiranih selenitom (Kieliszek et al., 2020). Gotovo momentalno povećanje aktivnosti GPx (1 sat nakon tretmana selenitom, Slika 24) ukazuje na brzu mobilizaciju antioksidativne odbrane što minimalizuje rani oksidativni uticaj na ćeliju, dok povećanje aktivnosti GST u kasnijim fazama izlaganja selenitu (24 i 48 sati, Slika 26) ukazuje na održivi ili sekundarni odgovor. Ovaj odloženi odgovor gljive pokazuje da uloga GST može biti više povezana sa odgovorom na sekundarna ili akumulirana oksidativna oštećenja, kao što su oksidovani molekuli i nusproizvodi nastali tokom dužeg izlaganja selenitu. Prekomerna aktivnost GST može dovesti do povećane toksičnosti selena kod mutanata kvasca zbog smanjenja citoplazmatskog sadržaja GSH (Pinson et al., 2000). Iako sadržaj H₂O₂ nije meren u okviru ove disertacije, može se pretpostaviti da se on generiše u ćeliji kao rezultat viška selenita (Wu et al., 2016). GST su otkrivene kod više od 20 sojeva među kojima i nekoliko rodova kvasca, npr. *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Issatchenkia*, *Rhodotorula* i filamentoznih gljiva, npr. *Aspergillus*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Mucor*, *Phanerochaete* i *Yarrowia*. Različite oblike GST indukuju različiti ksenobiotici. Citosolne GST su prečišćene kod filamentnih gljiva, uključujući *F. oxysporum*, *Mucor javanicus*, *Issatchenkia orientalis*, *P. chrysosporium* i *Yarrowia lipolytica* (Pócsi et al., 2004). Rani radovi na gljivama pokazuju da su GST gljiva vrlo raznolike, kako strukturno tako i funkcionalno, i da se aktivnosti njihovih GST značajno razlikuju među vrstama, sa niskim specifičnim aktivnostima. Verovatno je da se ova niska aktivnost javlja jer većina GST gljiva pripada Theta klasi enzima, koji obično pokazuju nisku aktivnost sa CDNB (Fraser et al., 2002; McGoldrick et al., 2005). Kod *A. nidulans* nije otkrivena aktivnost GST (Fraser et al., 2002), dok je kod *S. pombe* aktivnost GST indukovana hloridima (McGoldrick et al., 2005). Kod *P. chrysogenum*, specifična GST aktivnost je povišena samo u prisustvu agensa koji generišu superoksid (Pócsi et al.,

2004). Aktivnost GST kod *P. blakesleeanus* tretiranim H₂O₂ bila je povećana u većoj meri u stacionarnoj fazi nego u fazi eksponencijalnog rasta (De Castro et al., 2013), što je slično ovde prikazanim rezultatima.

Dodatna istraživanja su neophodna radi povezivanja ovih rezultata sa obrascima dinamike ekspresije gena, radi utvrđivanja učešća potencijalno različitih izoformi GPx sa različitom kinetikom i afinitetom prema supstratu uključenim u oksidativni stres micelijuma *P. blakesleeanus*. Brojna kinetička merenja jasno su pokazala da različite GPx-izoforme deluju putem ping-pong mehanizma, što znači da ne postoji ternarni kompleks koji uključuje peroksid, GSH i GPx, već se reakcija sastoji od dva koraka, oksidativne polureakcije i reduktivne polureakcije (Toppo et al., 2009; Günzler et al., 1972; Flohe et al., 1973). Ovakav mehanizam čini reakciju veoma efikasnom jer nema intermedijarnog proizvoda koji bi uticao inhibitory na njen tok. Pretpostavka je da ireverzibilno uklanjanje hidroperoksida zavisi samo od koncentracija GPx i hidroperoksida, neposrednog kontakta oba molekula i konstante brzine oksidativne polureakcije (Deponte, 2013).

Iz rezultata ovde izvedenih eksperimenata, može se uočiti da GPx i CAT ispoljavaju alternativnu dinamiku kao enzimi koji prvenstveno uklanjaju H₂O₂, gde GPx deluje kao primarni enzim koji se aktivira odmah nakon primene selenita radi eliminacije H₂O₂, dok CAT preuzima ovu ulogu privremeno tokom metaboličke promene, kada dolazi do naglog smanjenja raspoloživog GSH. Nakon adaptacije na novo metaboličko stanje, GPx nastavlja svoju ulogu u uklanjanju H₂O₂. U prethodnim studijama je već opisana regulacija aktivnosti CAT i GPx redoks stanjem ćelije gde ovi enzimi deluju paralelno ili naizmenično u zavisnosti od nivoa ROS (Deponte, 2013). Niži nivo aktivnosti GPx od aktivnosti CAT je zabeležen kod različitih gljiva, kao što su *P. chrysogenum* (Emri et al., 1997), *C. albicans* (Jamieson et al., 1996), *S. cerevisiae* (Inoue et al., 1999), i *A. niger* (Q. Li et al., 2008). GPx ispoljava pojačanu aktivnost kod vrsta roda *Candida* tretiranih selenitom (Kieliszek et al., 2020). U eksperimentima u okviru ove disertacije nije vršeno određivanje koncentracije peroksida u micelijumu *P. blakesleeanus*, međutim pretpostavlja se da tretman selenitom izaziva pojačanu produkciju peroksida, na šta ukazuje i sama dinamika aktivnosti enzima CAT i GPx u dobijenim rezultatima. Radi dobijanja jasnije slike svakako bi trebalo u naredna istraživanja uključiti i kvantifikaciju peroksida i superoksida upotrebom fluorescentnih sonda pod uslovima stresa, kao što je urađeno u nekim prethodnim radovima (Drotar et al., 1985; Deng et al., 2016; Papapostolou & Georgiou, 2010; Yaakoub et al., 2022). Kod *S. cerevisiae* je zabeležena akumulacija unutarćelijskog H₂O₂ nakon tretmana selenitom (Herrero & Wellinger, 2015). Slično ovde prikazanim rezultatima, nakon izlaganja kulture *S. bambusicola* peroksidu, aktivnost GPx se povećala nakon 48 h a najviši nivo aktivnosti je dostigla nakon 72 sata (Deng et al., 2016).

Aktivnost GR se smanjuje u prva 3 sata izlaganja selenitu (pad koji je statistički značajan), ali se zatim značajno povećava do 24 sata (Slika 25). Ovaj obrazac može se protumačiti kao brzo, ali prolazno, prilagođavanje praćeno snažnim povećanjem antioksidativnog odbrambenog sistema, posebno u GR-zavisnom putu. Dok aktivnost GR generalno prirodno raste sa starenjem i u kontrolnim i u tretiranim uzorcima, sadržaj GSH opada, što odražava promenu ćelijske redoks homeostaze sa starenjem. Smanjenje sadržaja GSH nakon tretmana selenitom već je pokazano kod gljiva (Wu et al., 2016; He et al., 2024). U uzorcima *P. blakesleeanus* tretiranim selenitom je ovaj put modifikovan tako da selenit indukuje još veće povećanje aktivnosti GR. Ovo povećanje prevazilazi pad sadržaja GSH povezan sa starenjem, što na kraju rezultira višim nivoima GSH u uzorcima tretiranim selenitom 24 h u poređenju sa kontrolnim uzorcima, međutim, kod *S. bambusicola* (Deng et al., 2016) i *P. blakesleeanus* (De Castro et al., 2013) tretiranim peroksidom zabeležena je veća aktivnost GPx od aktivnosti GR, što ukazuje na moguć različit uticaj različitih stresora na ekspresiju gena.

Neophodnost merenja sadržaja glutaciona proizilazi iz njegovog značaja kao glavnog intracelularnog neenzimskog antioksidansa i kao osetljivog indikatora oksidativnog stresa (Awadallah, 2013). Gljive regulišu sintezu GSH pod uticajem ROS tako što dolazi do povećanja sinteze, ali produženi stres može iscrpeti ćelijski sadržaj GSH (Traynor et al., 2019).

Ukupan sadržaj glutaciona u kontrolnom i u micelijumu tretiranom selenitom značajno opada nakon 24 sata kultivacije (za oko jednu trećinu), što ukazuje na smanjenje sadržaja redukovano oblika glutaciona. Povećana stopa konverzije GSH u GSSG je direktan pokazatelj oksidativnog stresa. Nivoi glutaciona se stabilizuju nakon 48 sati kultivacije. U kontrolnim uzorcima promena sadržaja GSSG nije statistički značajna. Nasuprot tome, uzorci tretirani selenitom pokazuju značajno povećanje sadržaja GSSG već nakon 3 sata od početka izlaganja selenitu što označava smanjenje redukcionog potencijala ćelije, jer ćelija aktivno vrši detoksifikaciju trošeći GSH kao deo svog odbrambenog mehanizma. Ravnoteža odnosa GSH/GSSG je strogo regulisana redukcijom GSSG pomoću GR i izbacivanjem S-konjugata, čime se održava ćelijska homeostaza, stoga poremećaji ovog odnosa dovode do promene redoks statusa i, u krajnjem slučaju, do apoptoze ćelije (Zhu et al., 2011).

Promena sadržaja glutaciona nakon 24 sata kultivacije ujedno predstavlja i prelaz između eksponencijalne i stacionarne faze rasta gljive, jer je neravnoteža GSH/GSSG jedan od signala koji mogu pokrenuti reprogramiranje ekspresije gena koji upravljaju morfološkim tranzicijama kod gljiva (Pócsi et al., 2004). GSH i enzimi glutaciona igraju vrlo važnu ulogu u klijanju konidiospora gljiva (Bakti et al., 2017). Pored ovog razvojnog efekta na ukupan sadržaj glutaciona i redoks status, tretman selenitom dovodi do dodatne neravnoteže u GSH/GSSG sistemu. Kao glavni regulator ćelijskog redoks statusa i redoks signalizacije (Vašková et al., 2023), odnos GSH/GSSG utiče na mnoge ćelijske

procesu. Tretman selenitom kod *S. cerevisiae* izaziva promene u intracelularnom redukcionom potencijalu tako što dovodi do smanjenja odnosa GSH/GSSG u ćeliji, pored smanjenja količine ukupnog glutationa. Pad unutarćelijske koncentracije GSH ograničava aktivnost enzima za detoksifikaciju zavisnih od GSH, i na taj način dovodi do akumulacije ROS i oštećenja makromolekula. U ovom slučaju, pad unutarćelijskog sadržaja glutationa se ne može jednostavno objasniti smanjenjem citosolnog sadržaja GSH zbog redukcije selenita, već se mora uzeti u obzir složena funkcija pumpe Ycf1 koja transportuje GSSG i GSSeSG u vakuole. U vakuolama se GSSeSG transformiše u GSSG i selenid. U slučaju *S. cerevisiae*, selenid ponovo difunduje u citosol, dok se GSSG zadržava u vakuoli uzrokujući iscrpljivanje citosolnog glutationa (Herrero & Wellinger, 2015). Sadržaj GSH kod *S. bambusicola* pokazuje sličan obrazac promena prilikom izlaganja gljive peroksidu (Deng et al., 2016). Gljiva *A. niger* se prilagođava delovanju peroksida redukcijom rasta i indukcijom aktivnosti brojnih antioksidativnih enzima, uključujući sistem glutationa. Pod uticajem peroksida se unutarćelijski sadržaj glutationa *A. niger* povećava, dok redoks stanje glutationa postaje više oksidovano (Q. Li et al., 2008). Metabolizam glutationa je usko povezan sa odgovorom na oksidativni i druge vrste stresa iz okoline. Njegovo razumevanje je od interesa za prehrambenu i farmaceutsku industriju, koje često koriste kvasce i druge gljive pod stresnim uslovima u različitim bioprocesima (Pócsi et al., 2004).

Na osnovu prikazanih rezultata se može reći da selenit u koncentraciji od 100 μM izaziva ranu, ali kontrolisanu aktivaciju zaštite od oksidativnog stresa u micelijumu *P. blakesleeanus*. Neposredno nakon tretmana selenitom se aktiviraju enzimi SOD, CAT i najviše GPx koji neutrališu superoksid anjon radikal i peroksid, dok se GST uključuje u kasnijoj fazi tretmana gde učestvuje u eliminaciji oksidovanih molekula i sekundarnoj detoksifikaciji. GPx i GST ispoljavaju vremenski razdvojene i funkcionalno komplementarne uloge. Statistički značajan porast aktivnosti GR nakon 24 h od izlaganja selenitu doprinosi održanju redukujuće sredine ćelija uprkos fiziološki prirodnom padu količine GSH koji se tada dešava usled starenja. Ova adaptacija omogućava oporavak redukcionog kapaciteta ćelije. Narušavanje odnosa GSH/GSSG u ranoj fazi tretmana implicira stres izazvan selenitom, dok rebalans nakon 48 h može biti posledica pojačane aktivnosti GR i biosinteze GSH, što bi ukazivalo na funkcionalnu otpornost gljive. Selenit pokreće enzimski odgovor koji zavisi od faze rasta, tako što u eksponencijalnoj fazi dominiraju GPx i CAT, dok u kasnijim fazama rastu aktivnosti SOD i GST. Ovakva fazna prilagodljivost čini *P. blakesleeanus* otpornijom na oksidativni stres.

Analiza PCA matriksa (Slika 41) pruža integrisani pogled na to kako i razvojni stadijum micelijuma i prisustvo 100 μM selenita utiču na ukupni sadržaj ćelijskog glutationa i odgovore antioksidativnih enzima. Identifikovane su dve glavne faktorijalne ose: F1, koja označava 66,61% varijanse, dominirana je razvojnim promenama gljive, dok

F2 označava 21,10% varijanse i prvenstveno odražava specifične efekte samog tretmana selenitom.

Jasna razdvojenost duž F1 ose razlikuje kratkoročno tretirane uzorke (0,5, 1 i 3 sata) od dugoročno tretiranih uzoraka (24 i 48 sati). I uzorci tretirani selenitom i kontrolni uzorci se grupišu duž F1 u odnosu na većinu parametara ćelijskog glutaciona, kao i aktivnosti CAT i GR. Ovo ukazuje da je glavni izvor varijabilnosti ovih parametara posledica starosti ili faze rasta micelijuma, a ne prisustva selenita. Kako micelijum prelazi iz eksponencijalne faze (oko 27 sati) u stacionarnu fazu (45 sati), dolazi do smanjenja sadržaja glutaciona i CAT aktivnosti, i pratećeg povećanja GR aktivnosti.

Aktivnost GPx je oštro podeljena duž F2 ose, pri čemu je njena aktivnost značajno povećana u uzorcima tretiranim selenitom u poređenju sa kontrolama. Ovo jasno razdvajanje ukazuje na to da selenit utiče na brzo povećanje aktivnost GPx. Štaviše, dok se aktivnost GST takođe povećava kao odgovor na prisustvo selenita, varijabilnost aktivnosti GST u ranim fazama tretmana selenitom maskira razvojni trend aktivnosti ovog enzima. I koncentracija GSSG i GST aktivnost pokazuju razdvajanje duž obe ose, naglašavajući da selenit ne samo da indukuje promene slične razvojnoj promeni (što se vidi po povećanju GSSG nakon 24 sata) već dodaje i sopstvenu meru varijabilnosti.

PCA analiza navodi na zaključak da su razvojne promene gljive dominantni faktor koji utiče na njen antioksidativni sistem. Suplementacija selenitom ima specifične efekte, a najznačajniji su brzo i kontinuirano povećanje GPx aktivnosti, a kasnije i povećanje GST aktivnosti i nivoa GSSG. Ovi efekti u suštini oponašaju i pojačavaju neke od razvojnih promena koje se vide u aktivnosti GR i sadržaju GSSG, što sugerise da selenit može pokrenuti ili ubrzati aspekte prirodnog odgovora na starenje u antioksidativnom sistemu.

Tretman selenitom u micelijumu *P. blakesleeanus* indukuje snažnu, vremenski zavisnu modulaciju ključnih antioksidativnih enzima. Gljiva ne samo da se nosi sa izazovom promene aktivnosti enzima (sa ranom aktivacijom GPx praćenom kasnijim angažovanjem GST), već i prilagođavanjem redoks balansa putem povišenja aktivnosti GR i nivoa GSSG. Ovako odmeren odgovor ukazuje da čak i pri koncentracijama koje ne inhibiraju rast (100 μ M), selenit deluje kao signal za aktivaciju i modifikaciju antioksidativnog odbrambenog sistema, pripremajući ćeliju da opstane tokom oksidativnog stresa, dok istovremeno vrši procese transformacije i detoksifikacije selena. Ne može se zanemariti značaj drugih neenzimskih antioksidanata u tom procesu, poput D-EAA i D-EAAG, koji nisu bili obuhvaćeni u eksperimentima ove teze ali su prirodno prisutni kod *P. blakesleeanus* i imaju važnu ulogu u održavanju sadržaja GSH, budući da su mogući supstrati enzima za reciklažu GSH kao što je opisano kod biljaka (Smirnof, 2000).

Ova zapažanja otvaraju dalja pitanja o tome kako takve biohemijske adaptacije mogu doprineti drugim transformacijama povezanim sa selenom (npr. formiranju SeNP),

ili kako se slične strategije primenjuju kod drugih organizama koji se suočavaju sa oksidativnim izazovima. U okviru budućih istraživanja bi bilo značajno utvrditi koje (izo)forme enzima GPx, CAT i GST učestvuju u detoksifikaciji selenita kod *P. blakesleeanus* korišćenjem tehnika kvantitativne polimerazne lančane reakcije sa reverznom transkripcijom (*engl.* Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction - RT-qPCR), Western blot i eventualno sekvencioniranjem gena i analizom promotora. U fokusu bi mogla biti i identifikacija faktora transkripcije kao i analiza transportnih sistema GSH.

5.4 Usvajanje i biotransformacija selena

Sposobnost gljive *P. blakesleeanus* da redukuje selenit (Se^{4+}) i selenat (Se^{6+}) ispitivana je na 28 sati staroj miceliji (eksponencijalna faza rasta), pri čemu je redukcija najpre vizuelno praćena promenama boje tokom 24 sata tretmana. Micelija prirodno ima žuto-narandžastu boju usled prisustva β -karotena (Mehta et al., 1997), svetlocrvena nijansa je u uzorcima tretiranim sa 2 mM Na_2SeO_3 bila jedva primetna, dok je u uzorcima sa 10 mM Na_2SeO_3 bila veoma intenzivna (Slika 31). Ova promena ukazuje na sposobnost gljive da redukuje Na_2SeO_3 do elementarnog selena i formira SeNP. Vizuelne promene su bile uočljive već nakon 1 – 2 sata tretmana.

Intenzivno crvena boja isprane micelije nakon 24 h može poticati od intracelularno formiranih SeNP ili SeNP adsorbovanih na ćelijski zid. Bledocrvena boja supernatanta potencijalno ukazuje na prisustvo SeNP oslobođenih usled degradacije ćelija ili njihovog odvajanja sa površine ćelijskog zida. Da bi se isključili efekti potencijalne abiotske redukcije, 10 mM selenit je dodat u svežu podlogu, medijum filtriran nakon 28 h rasta gljive, i toplotno inaktivirani micelijum. Ni u jednom slučaju nije došlo do promena boje ni nakon 7 dana inkubacije, što potvrđuje da je živa micelija neophodna za redukciju Na_2SeO_3 i biosintezu SeNP. U skladu sa ranijim studijama na *Fusarium* sp. i *Trichoderma reesei* (Gharieb et al., 1995), i ovde je potvrđena zavisnost procesa redukcije od metabolički aktivnih ćelija.

Poznato je da se biosinteza SeNP kod različitih organizama odvija intracelularno ili ekstracelularno (Ruiz-Fresneda et al., 2023; Pinel-Cabello et al., 2021). Kod *Fusarium* sp. i *T. reesei*, SeNP se akumuliraju u vakuolama i na ćelijskom zidu (Gharieb et al., 1995). Nadalje, utvrđeno je da gljive efikasnije uklanjaju Na_2SeO_3 nego Na_2SeO_4 , pri čemu se Se^0 formira kao biomineral, dok Na_2SeO_4 ostaje stabilan i ne redukuje se u prisustvu micelija (Sabuda et al., 2020). Rezultati ovog rada potvrđuju da *P. blakesleeanus* efikasno redukuje Na_2SeO_3 do Se^0 i vrši sintezu isparljivih jedinjenja selena, s tim da formirane SeNP mogu biti locirane intracelularno ili adsorbovane na ćelijski zid.

Poseban ekonomski značaj ima ekstracelularna sinteza SeNP, jer omogućava izolaciju čestica bez potrebe za degradacijom ćelija (Liang et al., 2019), dok intracelularna

sinteza doprinosi biostabilizaciji selena i sprečava njegovu migraciju u životnu sredinu (Vogel et al., 2018). Bledocrvena boja supernatanta ukazuje na ekstracelularne SeNP, što je potvrđeno SEM-EDS analizom (Slika 34). Spektri SEM-EDS analize pokazali su karakteristične signale prelaza elektrona selena iz L ljuske u K ljusku na 11,2 (SeK α) keV, iz M ljuske u L ljusku na 1,4 (SeL α) keV i iz M ljuske u K ljusku na 12,5 (SeK β) keV (Kessi & Hanselmann, 2004; Kheradmand et al., 2014; Zheng et al., 2014; Cremonini et al., 2016), koji ukazuju na prisustvo selena, kako na površini tako i u dubljim slojevima uzorka. Ovakvi rezultati su već dobijeni kod nekih bakterija (Tabibi et al., 2023). Iako EDS ne daje direktne informacije o oksidacionom stanju, prisustvo ovih signala može ukazivati na različite forme selena (npr. Se⁰, Se-S kompleksi, oksidi) koje se nalaze u različitim hemijskim mikrokruženjima (npr. u ćelijama ili u eksudatu). U miceliji su, pored ugljenika i kiseonika, koji mogu poticati iz interakcije sa proteinima ili membranama (Tabibi et al., 2023) detektovani i kalijum i fosfor iz pufera korišćenog za ispiranje. Čisti signali selena, bez signala ćelijskih komponenti, poticali su iz eksudata, što je značajno za potencijalnu primenu u izolaciji čistih SeNP.

DLS analiza je pokazala da SeNP u eksudatu, nakon 24 h tretmana, imaju prosečan prečnik od 57 nm. Iako se termin "nanočestice" odnosi na čestice prečnika do 1000 nm, biogeni SeNP prečnika < 200 nm, koji imaju veću biološku aktivnost, retko se registruju u biološkim sistemima (Dwivedi et al., 2013; Prasad et al., 2013). Veličina utiče na biološku aktivnost SeNP jer veći odnos površine i zapremine omogućava efikasniju interakciju sa ciljanim strukturama (Peng et al., 2007; Piacenza et al., 2020). SeNP proizvedene od strane *P. blakesleeanus*, veličine 32-95 nm, imaju značajan potencijal primene. Na primer, površinsko-zapremiski odnos čestice prečnika 32 nm je oko tri puta veći nego kod one prečnika 95 nm.

Redukcija Na₂SeO₃ i/ili Na₂SeO₄ i sinteza SeNP različitih veličina dokumentovana je kod brojnih mikroorganizama (Husen & Siddiqi, 2014; Wadhwani et al., 2016; Y. Tan et al., 2016; Z. Y. Li et al., 2003). Neke halofilne bakterije sintetišu SeNP prečnika 30-100 nm (Tabibi et al., 2023). Bakterija *Bacillus selenitireducens* formira SeNP veličine do 200 nm (Liang et al., 2019), dok *Zoogloea ramigera* proizvodi čestice prečnika 30-150 nm (Srivastava & Mukhopadhyay, 2012). Gljiva *A. terreus* sintetiše SeNP prosečne veličine 47 nm (Zare et al., 2013), a *Phanerochaete chrysosporium* proizvodi čestice od 30-400 nm (Espinosa-Ortiz et al., 2015). *Saccharomyces boulardii* sintetiše SeNP prečnika oko 80 nm (González-Salitre et al., 2025). Arhea *Halogeometricum* sp. formira SeNP veličine 30-350 nm (Abdollahnia et al., 2020). Kvantifikacijom redukcije Se⁴⁺ i Se⁶⁺ kod šest vrsta gljiva utvrđeno je da je Na₂SeO₃ redukovan u većoj meri, uz formiranje SeNP prečnika 50-300 nm (Rosenfeld et al., 2017). Hemijski sintetisane SeNP su prečnika 20-240 nm (Lin & Wang, 2005).

S obzirom na to da se barem deo procesa sinteze SeNP odvija intracelularno, dobijeni rezultati ukazuju da je smanjeno zadržavanje selena u micelijumu pri višim koncentracijama selenita u medijumu delimično posledica oštećenja ćelijske membrane i

zida, što dovodi do oslobađanja intracelularno sintetisanih SeNP. Ranije je pokazano da selenit narušava integritet ćelijske membrane i strukturu ćelijskog zida kod gljiva, bilo indirektno putem unutarćelijske akumulacije, ili direktno izazivajući oksidativna oštećenja, što doprinosi njegovoj toksičnosti (Gharieb et al., 1995; Izquierdo et al., 2010; Wu et al., 2016; Xu et al., 2023).

Ovi nalazi su u skladu sa prethodnim istraživanjima metabolizma selena, naročito u pogledu mehanizama njegove apsorpcije, transformacije i detoksifikacije. Na primer, studije na biljkama akumulatorima selena pokazuju razliku između metaboličkih puteva neorganskih i organskih oblika ovog elementa (Ogra et al., 2016). Takođe, selen se kod biljaka ponaša kao zaštitni faktor u prisustvu toksičnih metala, pri čemu reguliše aktivnosti antioksidativnih enzima i ublažava oksidativni stres (Jiang et al., 2021).

Tokom procesa biotransformacije selenita kod gljiva, već je utvrđeno da dolazi do formiranja isparljivih jedinjenja selena, posebno metilovanih derivata (Xu et al., 2023). Sinteza ovih jedinjenja predstavlja deo strategije detoksifikacije i podrazumeva proizvodnju DMSe i DMDS_e, što je već ranije pokazano kod filamentoznih gljiva (Urík et al., 2016). Vrste roda *Penicillium* volatilizuju do 8,8% ukupnog selena u vidu DMSe pod aerobnim uslovima, kako u fazi rasta, tako i u stacionarnoj fazi (Brady et al., 1996). Šest vrsta roda Ascomycota je transformisalo 15-20% selenita/selenata u isparljive derivate, u zavisnosti od vrste gljive i koncentracije selena, pri čemu je volatilizacija bila efikasnija pri nižim koncentracijama selena (Rosenfeld et al., 2017), što je u skladu sa ovde prikazanim rezultatima. *Alternaria alternata* pokazuje sličan obrazac: sporije uklanjanje Na₂SeO₃ pri višim koncentracijama. Međutim, ovaj trend je suprotan kod *Paraphaeosphaeria sporulosa*, što potvrđuje da su metabolički odgovori specifični za vrstu i soj gljive (Santelli et al., 2023). Kod *G. lucidum*, tretman selenitom pokreće aktivaciju metaboličkih puteva koji uključuju sintezu do 10 različitih vrsta metilovanih derivata selena i regulaciju ekspresije membranskih proteina (Xu et al., 2023). Formiranje selenida je takođe zabeleženo kod bakterija kao što su *Salmonella enterica*, *Micrococcus lactilyticus*, *Clostridium pasteurianum* i *Desulfovibrio desulfuricans*, kada su izložene selenitu (Nancharaiyah & Lens, 2015). Metabolički putevi apsorpcije, transformacije i detoksifikacije selena značajno variraju među mikroorganizmima (Wells & Stolz, 2020), pa čak i među višim organizmima, poput nematoda (Rohn et al., 2018), što potvrđuje specifičnost metabolizma selena u odnosu na vrstu organizma i soj.

P. blakesleeanus proizvodi isparljiva metilovana jedinjenja selena, uključujući DMSe, tokom izlaganja selenitu, dok se gotovo polovina početne koncentracije selena iz medijuma gubi tokom kultivacije, što bi moglo objasniti visoku toleranciju ove gljive prema selenitu. Na osnovu dobijenih rezultata ICP analize (Slika 40), može se zaključiti da pri nižim koncentracijama selenita (< 0,5 mM) dominira volatilizacija kao mehanizam detoksifikacije, što prerasta u kombinovani odgovor volatilizacije i redukcije pri povećanju koncentracije Na₂SeO₃ (0,5-2 mM) i početak sinteze SeNP, a pri najvišim

koncentracijama (>2 mM) dominantan je proces redukcije i akumulacije SeNP koji karakterišu crvena boja micelije, veća zasićenost metabolizma i moguće oštećenje membrane. Redukcija i metilacija predstavljaju ključne adaptivne strategije koje gljiva koristi za neutralizaciju selenita. Može se reći da se ova dva procesa ne isključuju, već dopunjuju. Preusmeravanje metaboličkih procesa sa volatilizacije na sintezu SeNP se može nazvati strategijom detoksifikacije zavisnom od koncentracije selenita. Redukcija Na_2SeO_3 se generalno smatra fundamentalnim mehanizmom detoksifikacije kod gljiva (J. Wang et al., 2016), dok metilacija predstavlja način eliminacije i smanjenja njegove bioaktivnosti.

Pri koncentraciji selenita od 100 μM , *P. blakesleeanus* ispoljava efikasno usvajanje i zadržavanje selena, gde se oko polovine početne koncentracije Na_2SeO_3 u medijumu i miceliji zadržava. Pri ovoj koncentraciji je i najefikasnija ugradnja selena u biomasu, oko 7%. Slična efikasnost usvajanja Se^{4+} je utvrđena kod nekih vrsta roda Ascomycota koje su oko 20% Se^{4+} ugradile u biomasu (Rosenfeld et al., 2017). Ovo efikasno usvajanje pri izlaganju *P. blakesleeanus* selenitu je značajno, posebno kada se uporedi sa koncentracijama Se^{4+} u životnoj sredini zabeleženim u visoko kontaminiranim zemljištima, što sugerise da je 100 μM koncentracija Se^{4+} i ekološki i eksperimentalno relevantna. Pošto je većina selena na kraju tretmana detektovana u medijumu, a ne u micelijumu, potrebno je izvršiti analizu specijacije selena u medijumu kako bi se utvrdilo da li je ekstracelularni selen bio prethodno nemetabolizovan ili je transformisan intra- ili ekstracelularno. Distribucija različitih oblika i oksidacionih stanja selena u medijumu nije bila predmet ove disertacije, ali uglavnom zavisi od redukcionog potencijala sredine (Guo et al., 2023), pH vrednosti (Farkas et al., 2021; Guo et al., 2023) i koncentracije selena (Rosenfeld et al., 2017). Dalja istraživanja na ovu temu mogu baciti više svetla na biotransformacije selena koje se javljaju pri interakciji sa micelijumom *P. blakesleeanus*.

Rezultati dobijeni XRF analizama rasvetljavaju prostornu i vremensku dinamiku transformacije i lokalizacije selena u miceliji *P. blakesleeanus*. XFM mape visoke prostorne rezolucije (Slika 37) potvrđuju da se selen u početnim fazama inkubacije 0,5 mM Na_2SeO_3 (1 h) primarno lokalizuje na površini ćelije i/ili u ćelijskom zidu, što ukazuje na aktivno usvajanje i kompartmentilizaciju selena, nasuprot pasivnoj difuziji, dok se nakon 10 h beleži jasno izražena intracelularna distribucija. Nakon 24 h, selen je gotovo u potpunosti ugrađen u ćeliju, što ukazuje na progresivnu internalizaciju. Preklapanje slika signala selena sa signalom magnezijuma sugerise da se akumulacija oba elementa odvija u istim regionima micelije, kao što su mitohondrije, vezikule ili vakuole.

Kod uzoraka inkubiranih 1 mM Na_2SeO_3 (Slika 38) primećuje se i površinska akumulacija SeNP nakon 10 h, čime se sugerise da proces redukcije započinje u prostoru neposrednog kontakta ćelije i spoljašnje sredine. Iako unutrašnja distribucija selena i dalje prati sličan obrazac, većina ostaje van ćelija. Ova vremenska tačka se poklapa sa biohemijski zabeleženim promenama, ukazujući na fazni prelaz u metabolizmu selena.

Uz povećanje koncentracije Na_2SeO_3 na 10 mM (Slika 39), broj detektovanih fotona eksponencijalno raste, što zahteva logaritamsko skaliranje intenziteta detektovanog Se radi adekvatnog očitavanja rezultata. Širok raspon detekcije (10^2 - 10^5) omogućuje vizuelizaciju selena različitih koncentracija u različitim regionima micelije. Nakon 10 h, selen je uglavnom vezan za ćelijsku membranu, dok je intracelularna distribucija primetna tek kroz skaliranu analizu. Nakon 24 h inkubacije, dominira prisustvo SeNP uz još uvek značajan udeo netransformiranog selena, a verovatno i prisustvo transformiranih Se-S kompleksa ili organskih jedinjenja selena. Ova zasićenost ukazuje na dostizanje maksimalnih kapaciteta detoksifikacije gljive.

Progresija od početnog ekstracelularnog prisustva do intracelularne asimilacije u roku od 24 h sugeriše dobro organizovan mehanizam apsorpcije selena. Znatno manji sadržaj selena u uzorcima od 24 h u odnosu na početnu koncentraciju ukazuje na isparavanje velike količine metabolisanog selena, što potvrđuje da su redukcija i metilacija selena osnovni zaštitni mehanizam koji gljiva koristi prilikom detoksifikacije selena.

Preklapajući Mg-Se dijagrami potvrđuju dominantnu lokalizaciju magnezijuma unutar ćelijske membrane (Slike 36, 37, 38) kao što je već pokazano kod ove gljive (Žižić et al., 2015) i podudara se sa njegovom prostornom distribucijom kod kvasca (Zhang et al., 1997), gde je magnezijum upotrebljen kao strukturni marker za definisanje ćelijskih odeljaka. Distribucija selena i u citosolu *P. blakesleanus* potvrđuje da selen dospeva u više funkcionalnih odeljaka ćelije, ukazujući na aktivnu regulaciju intracelularne distribucije i potencijalnu selektivnu inkorporaciju. Lokalizacija selena je ovom tehnikom utvrđena i kod mikoriznih gljiva *Rhizophagus clarus* i *Dentiscutata heterogama* unutar vezikula i spora, nakon prihrane biljke-simbionta selenom (Ananias et al., 2025), kao i u miceliji *Alternaria tenuissima* gajenoj na podlozi sa selenitom (Lindblom et al., 2018), u obliku Se^0 i organskih jedinjenja selena.

Ovo istraživanje je među prvima koje pruža uvid u prostorno-vremensku distribuciju selena kod filamentoznih gljiva. Dobijeni rezultati pokazuju da u ranim fazama izlaganja selenitu dominira površinska akumulacija selena, koja se zatim usmerava ka intracelularnoj lokalizaciji sa povećanjem trajanja izlaganja. U uslovima povećane koncentracije Na_2SeO_3 dolazi do izraženije redukcije i formiranja SeNP. Ove promene sugerišu postojanje mehanizama detoksifikacije koji uključuju kompartmentalizaciju unutar membrane, intracelularnu redistribuciju i progresivnu specijaciju ka manje toksičnim oblicima selena.

XANES spektroskopija (Slika 35) se koristi za određivanje oksidacionog stanja atoma na osnovu položaja i oblika glavnog maksimuma apsorpcije K-elektrona, pri čemu se često uzima maksimum prvog izvoda spektra kao mera položaja energije jonizacije (Ryser et al., 2005). XANES spektroskopiju karakteriše osetljivost prema oksidacionom stanju i koordinacionoj hemiji apsorbujućeg atoma, zbog toga što apsorpcija rendgenskih zraka pri energijama blizu i iznad vezivnih energija elektrona iz unutrašnjih ljuski atoma

zavisi od hemijskog i fizičkog okruženja atoma (Newville, 2014). Rendgensko zračenje predstavlja elektromagnetno zračenje u opsegu od približno 500 eV do 500 keV, gde materija apsorbira zračenje putem fotoelektričnog efekta. Fotone rendgenskog zračenja apsorbiraju elektroni unutrašnjih ljuski atoma, kao što su 1s ili 2p. Za ove vrste eksperimenata je neophodan sinhrotronski izvor zračenja visoke energetske rezolucije i koherentnosti, koji uz intenzivne i energetske podesive zrake omogućavaju mnogobrojne eksperimentalne konfiguracije. Apsorpcija se dešava samo ako je energija fotona veća od energije vezivanja elektrona. Višak energije prenosi se fotoelektronu koji napušta atom, dok se u jezgri formira upražnjeno mesto (Newville, 2014). Ovaj proces čini osnovu XANES spektroskopije (Newville, 2014) koja na taj način omogućuje praćenje specijacije i oksidacionih promena selena u micelijumu *P. blakesleeanus*, bez potrebe za hemijskom ekstrakcijom (Bluemlein et al., 2008).

Međutim, položaj oscilacionog maksimuma ne mora uvek biti u korelaciji sa oksidacionim brojem jer ga menja elektronska gustina, na koju utiče stepen kovalentnosti veze. Zbog visoke kovalentnosti kod Se^{2-} i nejasnih oksidacionih stanja nekih jedinjenja selena (npr. FeSe_2), određivanje oksidacionog stanja samo na osnovu maksimuma energije apsorpcije nije precizno. Energija apsorpcije K-elektrona selena je ipak vrlo osetljiva na lokalno okruženje, kao što su kristalno stanje i alotropska modifikacija, dok su energije jonizacije Se^{4+} i Se^{6+} relativno stabilne (Ryser et al., 2005).

Kao referentne energije apsorpcije K-elektrona selena i njegovih jedinjenja su korišćeni prethodno utvrđeni rasponi energija (Ryser et al., 2005). Tako je vrednost energije apsorpcije Se^{2-} (npr. CuSe , SeS_2 , FeSe_2) oko 12,656 – 12,659.5 eV, Se^0 (monoklinični i ortorombični) ~ 12,658 eV, Se^{4+} ~ 12,662 eV i Se^{6+} ~ 12,664 eV, pri čemu se može uočiti da je porast vrednosti energije praćen povećanjem oksidacionog stanja. Energije apsorpcije selenida i organskih jedinjenja Se spadaju u slične, ali delimično preklapajuće opsege (12,656 – 12,658 eV i 12,657.5 – 12,659.5 eV). Energija apsorpcije je koristan pokazatelj oksidacionog stanja, ali pouzdanu specijaciju daju tek kombinovana analiza položaja oscilacionog maksimuma, oblika signala i poređenje sa prethodno poznatim referencama (Ryser et al., 2005).

Koeficijent apsorpcije odražava verovatnoću apsorpcije i zavisi od gustine uzorka, atomskog broja, atomske mase i energije fotona. Različiti elementi imaju značajno različite koeficijente, što omogućava njihovu identifikaciju. Kada energija fotona odgovara energiji vezivanja elektrona, dolazi do naglog porasta apsorpcionog koeficijenta. Nakon apsorpcije, atom prelazi u pobuđeno stanje koje se brzo raspada putem rendgenske fluorescencije, gde elektron iz više ljuske popunjava upražnjeno mesto, emitujući karakterističan rendgenski zrak, ili putem Ožeovog efekta (*engl.* Meitner-Auger effect), pri čemu se drugi elektron izbacuje iz atoma ali bez emisije fotona (Newville, 2014). Iako je Ožeova emisija dominantan proces pri energijama zračenja nižim od 2 keV (Newville, 2014), verovatnoća fluorescencije je i dalje visoka. Ovde

prikazani rezultati omogućavaju dinamičan uvid u promenu oblika selena kroz više vremenskih tačaka, što je u ovakvom obimu kod gljiva slabo zastupljeno u literaturi. Ova metoda ranije je uspešno primenjena za ispitivanje oksidacionih stanja i simetrije vanadijuma kod iste gljive (Žižić et al., 2015), a u ovom istraživanju korišćena je za praćenje transformacije selenita pri različitim koncentracijama i vremenima inkubacije.

Pri niskoj koncentraciji Na_2SeO_3 (0,5 mM), već nakon 1 h energija veze 1s elektrona selena postaje niža u odnosu na standard selenita, što ukazuje na redukciju. Nakon 3 h ta je vrednost nepromenjena, što ukazuje na brzu redukciju selenita i detoksifikaciju bez vidljive sinteze SeNP. Zbog sličnosti vrednosti apsorpcione energije K-elektrona različitih oksidacionih stanja selena, nije moguće odrediti tačan oksidacioni oblik. Prisustvo dodatnog signala na 12,667 eV i prvi izvod spektra potvrđuju formiranje Se-S veza (Ruiz-Fresneda et al., 2020), verovatno putem konjugacije sa glutationom, dok se ne može isključiti doprinos organskih Se-C metabolita (npr. SeMet, SeCys) (Weekley et al., 2011; Yu et al., 2018).

Kod visoke koncentracije selenita (10 mM), promena u spektru je još izraženija. Već nakon 1 h selenit je potpuno eliminisan, a dominira signal Se^{2-} , najverovatnije u obliku metilselenola. Ovo ukazuje na izraženu volatilizaciju kao ranu adaptivnu strategiju detoksifikacije. Kako vreme inkubacije odmiče, udeo Se^0 raste, što potvrđuje koncentraciono-zavisnu smenu mehanizama: od metilacije ka redukciji selenita. Nasuprot ovim nalazima, kod *G. lucidum* je formiranje metilovanih oblika detektovana tek nakon 24-48 h (Xu et al., 2023).

Oscilacioni maksimum na 12,658.5 eV, koji je uočen kao nova komponenta, i karakterističan signal na 12,663 eV (24 h, 10 mM) ukazuju na istovremeno prisustvo dve vrste Se (Se^0 i Se^{2-}) (Chasteen, 1993; Chasteen & Bentley, 2003; Van Fleet-Stalder et al., 2000; Ruiz-Fresneda et al., 2020; Ghariieb et al., 1995; Brady et al., 1996; Rosenfeld et al., 2017; Vriens et al., 2016; Fan et al., 1997), što pokazuje složenost i prilagodljivost mehanizama detoksifikacije gde su redukcija i metilacija paralelni procesi. Vrednost apsorpcione energije K-elektrona Se^0 na dobijenim spektrima, kao i uočljiva crvena boja, ukazuju da ovaj oscilacioni maksimum potiče od elementarnog crvenog selena (Lenz et al., 2008), koji se može pojaviti u nekoliko kristalnih alotropa, kao što su monoklinični, trigonalni, staklasti, amorfni i kubni (Vogel et al., 2018; Cherin & Unger, 1967). Karakteristike spektra u oblasti energije neposredno nakon energije jonizacije mogu odrražavati prisustvo metilovanih jedinjenja selena, čija je osnovna energija apsorpcije K-elektrona pozicionirana između vrednosti tipičnih za Se^0 i Se^{4+} (Chasteen, 1993; Van Fleet-Stalder et al., 2000), sa rastojanjima koja u potpunosti odgovaraju ranije dobijenim vrednostima za DMSe, Se^0 i Se^{4+} (Van Fleet-Stalder et al., 2000), na šta upućuje i karakterističan miris.

Pri nižim koncentracijama se transformacija selena pokazala sporijom, što sugeriše da visoke koncentracije selenita pokreću alternativne ili dodatne mehanizme eliminacije.

Redukcija selena pri 0,5 i 1 mM ranije je detektovana pojavom SeNP, dok se inkubacijom 10 mM selenitom taj odgovor odlaže, što implicira zasićenje ćelijskog redoks kapaciteta i sporiju adaptaciju. Kasniji veći udeo SeNP i Se²⁻ oblika pokazuje da gljiva sukcesivno uključuje redukciju i metilaciju radi zaštite od oksidativnih oštećenja.

Kod micelije tretirane 10 mM Na₂SeO₄ spektroskopski nisu uočene promene, što potvrđuje da *P. blakesleeanus* nema sposobnost biotransformacije selenata pri ovde primenjenim eksperimentalnim uslovima, nasuprot ranije utvrđenoj sintezi selenobiotina pri suplementaciji ove gljive selenatom (Lindblow-Kull et al., 1980). Selenat je manje reaktivan i stabilniji oblik selena u oksidujućoj sredini, stoga mnoge gljive, kao *Fusarium* sp. i *T. reesei*, pokazuju veću redukcionu aktivnost prema selenitu (Gharieb et al., 1995). Nepostojanje aktivnog mehanizma transformacije Na₂SeO₄ kod *P. blakesleeanus* se objašnjava nedostatkom specifičnih reduktaza (Qidong Wang et al., 2025) ili vrlo niskom stopom usvajanja ovog oksianjona, u suprotnosti sa *G. lucidum* kod koje su utvrđeni specifični membranski transporteri i selenat reduktaze (Xu et al., 2023).

Struktura SeNP formiranih tokom inkubacije micelije *P. blakesleeanus* 10 mM rastvorom selenita tokom 24 sata analizirana je Ramanovom spektroskopijom (Slika 36).

Najintenzivnija traka na 255 cm⁻¹ je produkt simetričnih vibracija Se–Se veze, što ukazuje na prisustvo elementarnog selena u obliku monokliničnih Se₈ prstenova kristalnog α-Se ili amornog γ-Se (Carini et al., 1980; Marple et al., 2014; Oremland et al., 2004; Poborchii et al., 1997; Kohara et al., 1998). Međutim, odstupanja od idealnog Lorencovog profila, kao i širenje trake, ukazuju na prisustvo amornog Se⁰, što je u skladu sa nalazima kod bakterija (Goldan et al., 2016), mada može biti posledica prisustva krupnijih SeNP (T. Wang et al., 2010) ili nepravilnost u slaganju lanaca selena (Marple et al., 2014).

Traka na oko 236 cm⁻¹, karakteristična za amorfni trigonalni oblik (*t*-Se) ili polimerne lance selena (Se_n), nastaje kombinovanim simetričnim i antisimetričnim vibracijama istezanja helikalnog lanca, dodatno ukazuje na formiranje amornih SeNP (Carini et al., 1980; Marple et al., 2014; Goldan et al., 2016; Lucovsky et al., 1967; Brodsky et al., 1972). Dekonvolucijom glavne trake (255 cm⁻¹) identifikovane su dodatne vibracije na 268 i 274 cm⁻¹ koje odgovaraju savijanju Se₈ i istezanju prstenaste veze Se₆ (Poborchii et al., 1997, 1998), vrlo slično spektru *Rhizopus arrhizus* (Gharieb et al., 2023). Ovi ciklični alotropi selena, uključujući Se₆ i Se₈ prstenaste strukture, mogu se javiti kao prelazne faze između amornog i kristalnog selena (Minaev et al., 2005; Marple et al., 2017).

Dva najčešća alotropa kristalnih SeNP indukuju pojavu vibracionih traka na 233 i 251 cm⁻¹ (Mooradian & Wright, 1969), stoga bi se njihovo pomeranje kod *P. blakesleeanus* ka višim talasnim brojevima (236 i 255 cm⁻¹) moglo objasniti prisustvom više amornih oblika selena (Brodsky et al., 1972). Slična manje uređena amorfna struktura indukovana procesom polimerizacije je primećena kod susednog elementa, sumpora (Goldan et al., 2016).

Dominantna traka na 255 cm^{-1} i sporedne trake na 236 cm^{-1} , 268 cm^{-1} i 274 cm^{-1} su u skladu sa prethodnim studijama na bakterijama (Oremland et al., 2004; Poborchii et al., 1997; Tugarova et al., 2018), s tim da ovde pokazuju znatno veću spektralnu rezoluciju i potvrđuju višestruke alotropske oblike seleno. U poređenju sa *A. tenuissima*, koja prvenstveno generiše Se–S komplekse i selenodiglutination (Lindblom et al., 2018), *P. blakesleeanus* ispoljava izraženiju tendenciju ka formiranju stabilnog Se^0 . Slično, *Nigrospora guilinensis* ispoljava trake na 255 cm^{-1} i 270 cm^{-1} , ali Se-S interakcije nisu uočene (Singh et al., 2024).

U citosolnoj frakciji je otkrivena široka traka na 354 cm^{-1} , koja verovatno potiče od Se–S kompleksa nastalih intracelularno kroz interakciju seleno sa proteinskim komponentama koje sadrže sumpor (Poborchii, 1996). Sličan signal opisan je kod bakterije *Azospirillum brasilense* i povezan sa formiranjem Se_6S_2 klastera (Vogel et al., 2018). Pošto EDS analize ukazuju na čiste SeNP, pretpostavlja se da je Se–S interakcija prelazna faza u procesu redukcije (Eswayah et al., 2016), što se podudara sa predloženim putem preko selenodiglutinationa kod bakterija i gljiva (Wadhvani et al., 2016; Kessi & Hanselmann, 2004; Lindblom et al., 2018).

Ramanova spektroskopija uzoraka tretiranih selenatom nije pokazala razlike u odnosu na kontrolne uzorke, što potvrđuje da *P. blakesleeanus* ne redukuje Na_2SeO_4 u SeNP pod uslovima ovog eksperimenta. Ovo je u skladu sa poznatim mehanizmima disimilatorne redukcije selenata kod anaerobnih bakterija (Schröder et al., 1997; Oremland et al., 2004; Yee et al., 2007), dok kod aerobnih gljiva i bakterija ovakav proces nije dokumentovan (Avenidaño et al., 2016).

Rezultati XANES spektroskopije, pomeranje apsorpcione energije K-elektrona na $12,658.5\text{ eV}$, i postojanje izraženih traka na 236 cm^{-1} i na 255 cm^{-1} u Ramanovom spektru, ukazuju da je selen u uzorku micelije *P. blakesleeanus* tretirane $10\text{ mM Na}_2\text{SeO}_3$ pretežno u redukovanom stanju. Kombinovanjem ovih podataka može se zaključiti da micelija ne samo da efikasno redukuje selenit u Se^0 , već da se deo seleno zadržava u amorfnom obliku, verovatno kao prelazna faza u procesu biotransformacije. Ova specijacija sugeruje postojanje dinamičnog mehanizma detoksifikacije, u kojem se selen najpre taloži kao amorfni Se_n , a zatim reorganizuje u stabilniji elementarni oblik. Ramanovom analizom potvrđeno je da *P. blakesleeanus* redukuje Na_2SeO_3 u mešovitu formu amorfnih i kristalnih SeNP, uključujući Se_8 lančane i Se_6 prstenaste strukture, uz moguće formiranje Se–S intermedijera. Spektralna analiza sugeruje da detoksifikacija seleno započinje intracelularno, pri čemu gljiva koristi tiolne grupe za inicijalno vezivanje, a zatim prelazi na formiranje stabilnih i ekstracelularno akumuliranih SeNP. Prisustvo DMSe i odsustvo redukcije Na_2SeO_4 podržavaju hipotezu da je metabolizam seleno kod ove gljive adaptivna strategija usmerena na eliminaciju toksičnosti, a ne nutritivna potreba.

SeNP koje proizvodi *P. blakesleeanus* karakteriše visok prirodni polimorfizam, što je potvrđeno Ramanovom spektroskopijom. Nasuprot tome, hemijski sintetisane SeNP

ispoljavaju tipičnu kristalnu strukturu Se^0 , sa optičkim svojstvima zavisnim od veličine i veličinom koja je modulirana koncentracijom redukujućeg sredstva (Lin & Wang, 2005). Ovi podaci naglašavaju jedinstveni potencijal *P. blakesleeanus* za sintezu biokompatibilnih, bio i redoks aktivnih SeNP širokog spektra primene.

6. ZAKLJUČAK

U ovoj tezi je ispitan biohemijski odgovor filamentozne gljive *P. blakesleeanus* na uticaj egzogenog selenita i okarakterisane su biološki sintetisane SeNP u procesu redukcije natrijum selenita.

1. Merenjem prirasta biomase gljive pod dejstvom selenita je utvrđen toksični efekat selenita na micelijum gljive koja ispoljava zavisnost od doze. Pri tretmanu visokim koncentracijama selenita (1-10 mM) gljiva ispoljava usporen rast i smanjenje prirasta biomase. Pri niskim koncentracijama (do 50 μ M) efekat selenita na rast gljive je hormetički.
2. Ispitivanjem aktivnosti enzima metabolizma glutationa i enzima sistema zaštite od oksidativnih oštećenja gljive utvrđen je uticaj selenita, kao i razvojnog stadijuma gljive, na ukupni sadržaj glutationa i aktivnost antioksidativnih enzima. Specifični zaključci su sledeći:
 - Sadržaj GSH i ukupnog glutationa je visok tokom eksponencijalne faze rasta, zatim dolazi do pada sadržaja u stacionarnoj fazi. Sadržaj GSSG se povećava tokom vremena i naročito raste u stacionarnoj fazi rasta čime se menja odnos GSH/GSSG.
 - Aktivnost GST i sadržaj GSSG ispoljavaju pozitivnu modulisanost tokom vremena, kako pod uticajem selenita, tako i usled razvojnih promena gljive.
 - Aktivnost GPx je snažno indukovana pod uticajem selenita.
 - Aktivnost CAT je najviša tokom kasne eksponencijalne faze rasta.
 - Prelaz u stacionarnu fazu rasta je praćen smanjenjem sadržaja većine parametara metabolizma glutationa i aktivnosti CAT, uz povećanje aktivnosti GR i SOD.
 - Dominantni faktor koji utiče na antioksidativni sistem gljive su razvojne promene, dok selenit specifično pokreće i/ili ubrzava prirodni metabolički odgovor gljive na proces starenja.
3. Sadržaj selena u biomasi gljive raste sa koncentracijom, ali dostiže svoj maksimum pri tretmanu 1 mM selenitom. Količina selena u medijumu za gajenje gljive nakon tretiranja selenitom se smanjuje. Ukupna količina selena u medijumu i micelijumu nakon 10 h kultivacije ukazuje na veliki gubitak početne količine selena (60-80%) koji je transformisan u isparljive derivate. Veći udeo isparljive frakcije je prisutan pri manjim koncentracijama selena (10 μ M).

4. Na osnovu rezultata SEM-EDS i XRF-XFM, internalizacija seleno počinje već nakon 1 h od izlaganja selenitu. Formiranje SeNP postaje vidljivo na površini ćelija nakon 10 h tretmana, dok je intracelularna distribucija uočljiva nakon 24 h. Sa povećanjem koncentracije selenita i dužine tretmana, evidentno je favorizovanje sinteze SeNP intra- i ekstracelularno. Uz niže koncentracije selenita gljiva se oslobađa viška seleno sintezom isparljivih derivata.
5. Iz eksperimenata karakterizacije SeNP izvedeni su sledeći zaključci:
 - EDS spektri suspenzije micelijuma ili eksudata su pokazali karakteristične signale seleno na 1,4 (SeL α), 11,2 (SeK α) i 12,5 (SeK β) keV.
 - DLS metodom je utvrđena distribucija veličine prečnika SeNP od 32 do 95 nm, sa prosečnom vrednošću od 57 nm, čime se SeNP koji sintetiše gljiva *P. blakesleeanus* svrstava u prave nanočestice.
 - XANES spektri micelijuma gljive ukazuju na redukciju selenita crvenim pomerajem apsorpcione ivice u odnosu na standardni spektar seleno. Ustanovljena je i nova komponenta spektra kao rame na 12,658.5 eV. Nakon 1h inkubacije sa 10 mM selenitom, selenit je potpuno uklonjen i transformisan u manje toksične oblike među kojima preovlađuje isparljivi selenid.
 - Strukturni raspored sintetisanih SeNP je određen Ramanovom spektroskopijom u spektralnoj oblasti niske talasne dužine karakterističnoj za vibracione trake SeNP (255 cm⁻¹). Dekonvolucijom trake niske talasne dužine sa centrom na 236 cm⁻¹ utvrđeno je da je dobijeni SeNP mešavina monoklinskih Se₈ monomernih jedinica D_{4h} grupe simetrije i Se₆ prstenaste strukture.

Ovi rezultati pružaju uvid o metabolizmu seleno kod gljive *P. blakesleeanus*, pokazujući i biohemijsku adaptaciju i prostornu dinamiku procesa detoksifikacije. Potencijalna biotehnoška primena ove gljive se zasniva na sposobnosti redukcije selenita i sintezi pravih SeNP. U kontekstu istraživanja sprovedenog tokom izrade ove teze, SeNP se može predstaviti kao most između biohemije i nano-inženjeringa. Biotransformacija seleno pomoću *P. blakesleeanus* pruža ekološki put sinteze čistih SeNP koji karakteriše jedinstveni skup osobina, kao što su bioaktivnost, biokompatibilnost i niska toksičnost u poređenju sa drugim oblicima seleno. Antioksidativne i antimikrobiološke osobine SeNP su od značaja u medicini, dok bi kreiranje bio-nanokompozita kontrolisanom sintezom SeNP potencijano vodilo do stvaranja materijala sa jedinstvenim osobinama korisnim u terapeutici, biosenzorima i industriji.

7. LITERATURA

Aaseth, J., Gerhardsson, L., Skaug, M. A., Alexander, J. (2016) Chapter 1 - General Chemistry of Metal Toxicity and Basis for Metal Complexation. In: Aaseth, J., Crisponi, G., Andersen, O. (eds) Chelation Therapy in the Treatment of Metal Intoxication. Academic Press, 1-33. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803072-1.00001-8>

Abdollahnia, M., Makhdoumi, A., Mashreghi, M., Eshghi, H. (2020) Exploring the potentials of halophilic prokaryotes from a solar saltern for synthesizing nanoparticles: The case of silver and selenium. PLoS ONE, 15(3): e0229886. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229886>

Adebayo, A. H., Yakubu, O. F., Bakare-Akpata, O. (2020) Uptake, Metabolism and Toxicity of Selenium in Tropical Plants. Importance of Selenium in the Environment and Human Health. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.90295>

Ananias, S. B., Cardoso, A. A. S., Silva Júnior, E. C., Oliveira, C. (2025) Selenium compartmentalization in arbuscular mycorrhizal fungi associated with brachiaria grass. Ciênc. Agrotec., 49: e022224. <https://doi.org/10.1590/1413-7054202549022224>

Angelova, M. B., Pashova, S. B., Spasova, B. K., Vassilev, S. V., Slokoska, L. S. (2005) Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. Mycol. Res., 109(2): 150–158. <https://doi.org/10.1017/S0953756204001352>

Araie, H., Sakamoto, K., Suzuki, I., Shiraiwa, Y. (2011) Characterization of the Selenite Uptake Mechanism in the Coccolithophore *Emiliana huxleyi* (Haptophyta). Plant Cell Physiol., 52(7): 1204-1210. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr070>

Avendaño, R., Chaves, N., Fuentes, P., Sánchez, E., Jiménez J. I., Chavarría, M. (2016) Production of selenium nanoparticles in *Pseudomonas putida* KT2440. Scientific Reports, 6(37155): 1-9. <https://doi.org/10.1038/srep37155>

Avery, J. C., Hoffmann, P. R. (2018) Selenium, Selenoproteins, and Immunity. Nutrients, 10(9), 1203. <https://doi.org/10.3390/nu10091203>

Awadallah, S. (2013) Chapter Three - Protein Antioxidants in Thalassemia. Advances in Clinical Chemistry, 60: 85-128. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-407681-5.00003-9>

Bachhawat, A. K., Thakur, A., Kaur, J., Zulkifli, M. (2013) Glutathione transporters. Biochimica et Biophysica Acta, 1830(5): 3154-3164. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.018>

Bai, Z., Harvey, L. M., White, S., McNeil, B. (2004) Effects of oxidative stress on production of heterologous and native protein, and culture morphology in batch and chemostat cultures of *Aspergillus niger* (B1-D). *Enzyme and Microbial Technology*, 34(1): 10-21. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.07.008>

Bakti, F., Király, A., Orosz, E., Miskei, M., Emri, T., Leiter, E., Pócsi, I. (2017) Study on the glutathione metabolism of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 64(3), 255-272. <https://doi.org/10.1556/030.64.2017.003>

Baroja-Mazo, A., del Valle, P., Rúa, J., de Cima, S., Busto, F., de Arriaga, D., Smirnoff, N. (2005) Characterisation and biosynthesis of D-erythroascorbic acid in *Phycomyces blakesleeanus*. *Fungal Genet Biol.*, 42(5): 390-402. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.01.005>

Beauchamp, C., Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1): 276-287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)

Bébien, M., Lagniel, G., Garin, J., Touati, D., Verméglio, A., Labarre, J. (2002) Involvement of Superoxide Dismutases in the Response of *Escherichia coli* to Selenium Oxides. *Journal of Bacteriology*, 184(6): 1556-1564. <https://doi.org/10.1128/jb.184.6.1556-1564.2002>

Belozerskaya, T. A., Gessler, N. N. (2006) Oxidative Stress and Differentiation in *Neurospora crassa*. *Microbiology*, 75(4): 427-431. <https://doi.org/10.1134/S0026261706040102>

Bergman, K., Burke, P. V., Cerdá-Olmedo, E., David, C. N., Delbrück, M., Foster, K. W., Goodell, E. W., Heisenberg, M., Meissner, G., Zalokar, M., Dennison, D. S., Shropshire, W., Jr. (1969) *Phycomyces*. *Bacteriological Reviews*, 33(1): 99-157. <https://doi.org/10.1128/br.33.1.99-157.1969>

Bianchi, S. R., Amaral, C. D. B., Silva, C. S., Nogueira, A. R. A. (2017) Determination of Selenium in Bovine Semen by ICP-MS Using Formic Acid for Sample Preparation. *J. Braz. Chem. Soc.*, 28(12): 2357-2364. <https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20170089>

Bluemlein, K., Raab, A., Meharg, A. A., Charnock, J. M., Feldmann, J. (2008) Can we trust mass spectrometry for determination of arsenic peptides in plants: comparison of LC-ICP-MS and LC-ES-MS/ICP-MS with XANES/EXAFS in analysis of *Thunbergia alata*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390: 1739-1751. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1724-y>

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 7(72): 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Brady, J. M., Tobin, J. M., Gadd, G. M. (1996) Volatilization of selenite in aqueous medium by a *Penicillium* species. *Mycological Research*, 100(8): 955-961. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80048-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80048-7)

Brodsky, M. H., Gambino, R. J., Smith, J. E. Jr., Yacoby, Y. (1972) The Raman Spectrum of Amorphous Tellurium. *Physica Status Solidi (b)*, 52(2): 609-614. <https://doi.org/10.1002/pssb.2220520229>

Broxton, C. N., Culotta, V. C. (2016) SOD Enzymes and Microbial Pathogens: Surviving the Oxidative Storm of Infection. *PLoS Pathog* 12(1): e1005295. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005295>

Burau, R. G. (1985) Environmental chemistry of selenium. *California Agriculture* 39(7): 16-18.

Burton, G. J., Jauniaux, E. (2011) Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 25(3): 287–299. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>

Butler, C. S., Debieux, C. M., Dridge, E. J., Splatt, P., Wright, M. (2012) Biomineralization of selenium by the selenate-respiring bacterium *Thauera selenatis*. *Biochem. Soc. Trans.*, 40(6): 1239–1243. <https://doi.org/10.1042/BST20120087>

Carini, G., Cutroni, M., Galli, G., Migliardo, P., Wanderlingh, F. (1980) Raman scattering in *a*-Se bulk near T_g. *Solid State Communications*, 33(11): 1139-1141. [https://doi.org/10.1016/0038-1098\(80\)91092-3](https://doi.org/10.1016/0038-1098(80)91092-3)

Cassier-Chauvat, C., Marceau, F., Farci, S., Ouchane, S., Chauvat, F. (2023) The Glutathione System: A Journey from Cyanobacteria to Higher Eukaryotes. *Antioxidants* 12(6), 1199. <https://doi.org/10.3390/antiox12061199>

Cerdá-Olmedo, E. (2001) *Phycomyces* and the biology of light and color. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(5): 503-512. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00588.x>

Chakraborty, S., Rene, E. R., Lens, P. N. (2019) Reduction of selenite to elemental Se(0) with simultaneous degradation of phenol by co-cultures of *Phanerochaete chrysosporium* and *Delftia lacustris*. *Journal of Microbiology*, 57: 738-747. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-9042-6>

Chandra, A., Kumar, V., Garnaik, U. C., Dada, R., Qamar, I., Goel, V. K., Agarwal, S. (2024) Unveiling the Molecular Secrets: A Comprehensive Review of Raman

Spectroscopy in Biological Research. ASC Omega, 9(51): 50049–50063. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c00591>

Chary, P., Natvig, D. O. (1989) Evidence for Three Differentially Regulated Catalase Genes in *Neurospora crassa*: Effects of Oxidative Stress, Heat Shock and Development. Journal of Bacteriology, 171(5): 2646-2652. <https://doi.org/10.1128/jb.171.5.2646-2652.1989>

Chasteen, T. G. (1993) Confusion between dimethyl selenenyl sulfide and dimethyl selenone released by bacteria. Appl Organomet Chem., 7(5): 335–342. <https://doi.org/10.1002/aoc.590070507>

Chasteen, T. G., Bentley, R. (2003) Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants. Chemical Reviews, 103(1): 1–25. <https://doi.org/10.1021/cr010210+>

Chaudhary, S., Polaino, S., Shakya, V. P. S., Idnurm, A. (2013) A New Genetic Linkage Map of the Zygomycete Fungus *Phycomyces blakesleeanus*. PLoS ONE 8(3): e58931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058931>

Cherevko, S., Mayrhofer, K. J. J. (2018) On-Line Inductively Coupled Plasma Spectrometry in Electrochemistry: Basic Principles and Applications. Encyclopedia of Interfacial Chemistry: Surface Science and Electrochemistry, vol. 1, 326-335. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13292-5>

Cherin, P., Unger, P. (1967) The crystal structure of trigonal selenium. Inorganic Chemistry, 6(8): 1589–1591. <https://doi.org/10.1021/ic50054a037>

Clark, L. C. Jr., Ioff, R., Granger, D., Taylor, Z. (1953) Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. J Appl Physiol., 6(3): 189-193. <https://doi.org/10.1152/jappl.1953.6.3.189>

Cremonini, E., Zonaro, E., Donini, M., Lampis, S., Boaretti, M., Dusi, S., Melotti, P., Lleo, M. M., Vallini, G. (2016) Biogenic selenium nanoparticles: characterization, antimicrobial activity and effects on human dendritic cells and fibroblasts. Microb Biotechnol., 9(6): 758–771. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12374>

Crockford, A.J., Davis, G.A., Williams, H. D. (1995) Evidence for cell-density-dependent regulation of catalase activity in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. Microbiology Society, 141(4): 843-851. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-4-843>

Csiszár, J., Lantos, E., Tari, I., Madoşă, E., Wodala, B., Vashegyi, Á., Horváth, F., Pécsváradi, A., Szabó, M., Bartha, B., Gallé, Á., Lazăr, A., Coradini, G., M. Staicu, M., Postelnicu, S., Mihacea, S., Nedelea, G., Erdei, L. (2007) Antioxidant enzyme activities in

Allium species and their cultivars under water stress. *Plant Soil Environ.*, 53(12): 517–523.
<https://doi.org/10.17221/2192-PSE>

Cyrne, L., Martins, L., Fernandes, L., Marinho, H. S. (2003) Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(3): 385-393.
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01300-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01300-X)

De Castro, C., del Valle, P., Rúa, J., García-Armesto, M. R., Gutiérrez-Larraínzar, M., Busto, F., de Arriaga, D. (2013) Antioxidant defence system during exponential and stationary growth phases of *Phycomyces blakesleeanus*: Response to oxidative stress by hydrogen peroxide. *Fungal Biology*, 117(4): 275-287.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.03.001>

Del Río, L. A., Ortega, M. G., López, A. L., Gorgé, J. L. (1977) A More Sensitive Modification of the Catalase Assay with the Clark Oxygen Electrode: Application to the kinetic study of the pea leaf enzyme. *Analytical Biochemistry*, 80(2): 409-415.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90662-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90662-5)

Deluca, M., Hu, H., Popov, M. N., Spitaler, J., Dieing, T. (2023) Advantages and developments of Raman spectroscopy for electroceramics. *Communications Materials*, 4(78). <https://doi.org/10.1038/s43246-023-00400-4>

Deng, H., Chen, J., Gao, R., Liao, X., Cai, Y. (2016) Adaptive Responses to Oxidative Stress in the Filamentous Fungal *Shiraia bambusicola*. *Molecules*, 21(9): 1118.
<https://doi.org/10.3390/molecules21091118>

Deponte, M. (2013) Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(5): 3217-3266. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018>

Drotar, A., Phelps, P., Fall, R. (1985) Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Science*, 42(1): 35-40. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(85\)90025-1](https://doi.org/10.1016/0168-9452(85)90025-1)

Dwivedi, S., AlKhedhairi, A. A., Ahamed, M., Musarrat, J. (2013) Biomimetic Synthesis of Selenium Nanospheres by Bacterial Strain JS-11 and Its Role as a Biosensor for Nanotoxicity Assessment: A Novel Se-Bioassay. *PLoS ONE* 8(3): e57404.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057404>

Elettra Sincrotrone Trieste. [Online]. <https://www.elettra.eu/index.html>

Elettra TwinMic Microscope. [Online].
<https://www.elettra.eu/lightsources/elettra/elettra-beamlines/twinmic/twinmic-microscope.html>

Emri, T., Pócsi, I., Szentirmai, A. (1997) Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*. *Free Radic Biol Med.*, 23(5): 809-814. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(97\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(97)00065-8)

Emri, T., Szarvas, V., Orosz, E., Antal, K., Park, H., Han, K., Yu, J., Pócsi, I. (2015) Core oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. *BMC Genomics*, 16(478). <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1705-z>

Espinosa-Ortiz, E. J., Gonzalez-Gil, G., Saikaly, P. E., van Hullebusch, E. D., Lens, P. N. L. (2015) Effects of selenium oxyanions on the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 99: 2405-2418. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6127-3>

Eswayah, A. S., Smith, T. J., Gardiner, P. H. E. (2016) Microbial transformations of selenium species of relevance to bioremediation. *Appl Environ Microbiol.*, 82: 4848–4859. <https://doi.org/10.1128/AEM.00877-16>

Fahey, R. C., Brody, S., Mikolajczyk, S. D. (1975) Changes in the glutathione thiol-disulfide status of *Neurospora crassa* conidia during germination and aging. *Journal of Bacteriology*, 121(1): 144-151. <https://doi.org/10.1128/jb.121.1.144-151.1975>

Fan, T. W. M., Lane, A. N., Higashi, R. M. (1997) Selenium Biotransformations by a Euryhaline Microalga Isolated from a Saline Evaporation Pond. *Environmental Science & Technology*, 31(2): 569–576. <https://doi.org/10.1021/es960471e>

Faramarzi, S., Anzabi, Y., Jafarizadeh-Malmiri, H. (2020) Nanobiotechnology approach in intracellular selenium nanoparticle synthesis using *Saccharomyces cerevisiae*-fabrication and characterization. *Arch. Microbiol.*, 202(5): 1203-1209. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01831-0>.

Farkas, B., Vojtková, H., Bujdoš, M., Kolenčík, M., Šebesta, M., Matulová, M., Duborská, E., Danko, M., Kim, H., Kučová, K., Kisová, Z., Matúš, P., & Urík, M. (2021) Fungal Mobilization of Selenium in the Presence of Hausmannite and Ferric Oxyhydroxides. *Journal of Fungi*, 7(10): 810. <https://doi.org/10.3390/jof7100810>

Fesharaki, P. J., Nazari, P., Shakibaie, M., Rezaie, S., Banoee, M., Abdollah, i M., Shahverdi, A. R. (2010) Biosynthesis of selenium nanoparticles using *Klebsiella pneumoniae* and their recovery by a simple sterilization process. *Braz J Microbiol.*, 41(2): 461-466. doi: 10.1590/S1517-838220100002000028

Flohé, L., Loschen, G., Günzler, W. A., Eichele, E. (1972) Glutathione peroxidase, V. The kinetic mechanism. Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem., 353(6): 987–999. <https://doi.org/10.1515/bchm2.1972.353.1.987>

Fraser, J. A., Davis, M. A., Hynes, M. J. (2002) A Gene from *Aspergillus nidulans* with Similarity to URE2 of *Saccharomyces cerevisiae* Encodes a Glutathione S-Transferase Which Contributes to Heavy Metal and Xenobiotic Resistance. Applied and Environmental Microbiology, 68: 2802-2808. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2802-2808.2002>

Gadd, G. M. (2007) Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. Mycological Research, 111(1): 3-49. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.12.001>

Gessler, N. N., Aver'yanov, A. A., Belozerskaya, T. A. (2007) Reactive oxygen species in regulation of fungal development. Biochemistry (Moscow), 72(10): 1091–1109. <https://doi.org/10.1134/S0006297907100070>

Gharieb, M. M., Gadd, G. M. (2004) The kinetics of ⁷⁵[Se]-selenite uptake by *Saccharomyces cerevisiae* and the vacuolization response to high concentrations. Mycological Research, 108(12): 1415-1422. <https://doi.org/10.1017/S0953756204001418>

Gharieb, M. M., Soliman, A. M., Omara, M. S. (2025) Biosynthesis of selenium nanoparticles by potential endophytic fungi *Penicillium citrinum* and *Rhizopus arrhizus*: characterization and maximization. Biomass Conv. Bioref., 15: 2319–2328. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-05084-x>

Gharieb, M. M., Wilkinson, S. C., Gadd, G. M. (1995) Reduction of selenium oxyanions by unicellular, polymorphic and filamentous fungi: cellular location of reduced selenium and implications for tolerance. Journal of Industrial Microbiology, 14(3-4): 300-311. <https://doi.org/10.1007/BF01569943>

Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J. M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M. B., Labarre, J. (1998) The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., 273(35): 22480-22489. doi: 10.1074/jbc.273.35.22480

Goldan, A. H., Li, C., Pennycook, S. J., Schneider, J., Blom, A., Zhao, W. (2016) Molecular structure of vapor-deposited amorphous selenium. J. Appl. Phys., 120(13): 135101. <https://doi.org/10.1063/1.4962315>

González-Salitre, L., González-Olivares, L. G., Salazar-Navarro, A. A., Cervantes-García, D., Durán-Hernández, D., Torres-Ramos, R., Beleño-Cabarcas, M. T., Basilio-Cortes, U. A. (2025) Spectroscopic Analysis of Selenium Nanoparticles Synthesized by

Saccharomyces boulardii for the Production of Craft Beer. *Fermentation*, 11(3): 144. <https://doi.org/10.3390/fermentation11030144>

Griffith, O. W. (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry* 106(1): 207-212. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90139-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90139-6)

Günzler, W. A., Vergin, H., Müller, I., Flohé, L. (1972) Glutathione peroxidase VI: the reaction of glutathione peroxidase with various hydroperoxides. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, 353(6): 1001–1004.

Guo, Q., Ye, J., Zeng, J., Chen, L., Korpelainen, H., Li, C. (2023) Selenium species transforming along soil–plant continuum and their beneficial roles for horticultural crops. *Horticulture Research*, 10(2): uhac270. <https://doi.org/10.1093/hr/uhac270>

Gutierrez-Larrainzar, M., de Castro, C., del Valle, P., Rúa, J., García-Armesto, M. R., Busto, F., de Arriaga, D. (2010) Production, Stability, and Antioxidative and Antimicrobial Activities of Two L-Ascorbate Analogues from *Phycomyces blakesleeanus*: D-Erythroascorbate and D-Erythroascorbate Glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19): 10631-10638. DOI: 10.1021/jf102202e

Gyöngyösi, N., Káldi, K. (2014) Interconnections of reactive oxygen species homeostasis and circadian rhythm in *Neurospora crassa*. *Antioxid Redox Signal.*, 20(18): 3007-3023. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.555>

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249(22): 7130-7139. PMID: 4436300

Hariharan, S., Dharmaraj, S. (2020) Selenium and selenoproteins: it's role in regulation of inflammation. *Inflammopharmacol*, 28: 667–695. <https://doi.org/10.1007/s10787-020-00690-x>

Hashem, A. H., Khalil, A. M. A., Reyad, A. M., Salem, S. S. (2021) Biomedical applications of mycosynthesized selenium nanoparticles using *Penicillium expansum* ATTC 36200. *Biol. Trace Elem. Res.*, 199: 3998–4008. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02506-z>

Hatfield, D. L., Gladyshev, V. N. (2002) How Selenium Has Altered Our Understanding of the Genetic Code. *Molecular and Cellular Biology*, 22(11): 3565–3576. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.11.3565-3576.2002>

Hayes, J. D., McLellan, L. I. (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res.*, 31(4): 273-300. <https://doi.org/10.1080/10715769900300851>

He, D., Wu, H., Jiang, H., Zhang, Z., Wang, C., Wang, D., Wei, G. (2024) Screening of Selenium/Glutathione-Enriched *Candida utilis* and Its Anti-inflammatory and Antioxidant Activities in Mice. *Biol Trace Elem Res.*, 202: 2786–2796. <https://doi.org/10.1007/s12011-023-03882-y>

Hernández, J. A., Barba-Espín, G., Diaz-Vivancos, P. (2017) Glutathione-Mediated Biotic Stress Tolerance in Plants. In: Hossain, M., Mostofa, M., Diaz-Vivancos, P., Burritt, D., Fujita, M., Tran, L. S. (eds) *Glutathione in Plant Growth, Development, and Stress Tolerance*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-66682-2_14

Herrero, E., Wellinger, R. E. (2015) Yeast as a model system to study metabolic impact of selenium compounds. *Microbial Cell*, 2(5): 139-149. doi: 10.15698/mic2015.05.200

Hilgenberg, W., Rausch, T., Leuken, H. (1981) The effect of light and zinc on catalase activity during the development of *phycomyces blakesleeanus*. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen (BPP)*, 176(2): 151-156. [https://doi.org/10.1016/S0015-3796\(81\)80087-X](https://doi.org/10.1016/S0015-3796(81)80087-X)

Husain, S., Sultan, R. M. S., Saxena, K., Bano, F., Goyal, R., Chopra, S., Chopra, H., Verma, S. K. (2025) Nano Selenium: A Promising Solution for Infectious Diseases – Current Status and Future Prospects. *Current Pharmaceutical Design*, 31(35): 2795-2819. DOI: 10.2174/0113816128346637250401090138

Husen, A., Siddiqi, K.S. (2014) Plants and microbes assisted selenium nanoparticles: characterization and application. *J Nanobiotechnol*, 12(28). <https://doi.org/10.1186/s12951-014-0028-6>

Hussein, H. G., El-Sayed, E. S. R., Younis, N. A., Hamdy, A. E. H. A., Easa, S. M. (2022) Harnessing endophytic fungi for biosynthesis of selenium nanoparticles and exploring their bioactivities. *AMB Express*, 12(68). <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01408-8>

Idnurm, A., Rodríguez-Romero, J., Corrochano, L. M., Sanz, C., Iturriaga, E. A., Eslava, A. P., Heitman, J. (2006) The *Phycomyces madA* gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(12): 4546-4551. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600633103>

Ighodaro, O. M., Akinloye, O. A. (2018) First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental

role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria Journal of Medicine 54(4): 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>

Inoue, Y., Matsud, T., Sugiyama, K., Izawa, S., Kimura, A. (1999) Genetic Analysis of Glutathione Peroxidase in Oxidative Stress Response of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry, 274(38): 27002-27009. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.38.27002>

Inoue, Y., Tran, L. T., Kamakura, M., Izawa, S., Miki, T., Tsujimoto, Y., Kimura, A. (1995) Oxidative stress response in yeast: glutathione peroxidase of *Hansenula mrakii* is bound to the membrane of both mitochondria and cytoplasm. Biochim. Biophys. Acta, 1245: 325–330. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(95\)00117-4](https://doi.org/10.1016/0304-4165(95)00117-4)

Izquierdo, A., Casas, C., Herrero, E. (2010) Selenite-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*: protective role of glutaredoxins. Microbiology, 156(9). <https://doi.org/10.1099/mic.0.039719-0>

Jacob, C., Giles, G. I., Giles, N. M., Sies, H. (2003) Sulfur and Selenium: The Role of Oxidation State in Protein Structure and Function. Angewandte Chemie International Edition, 42(39): 4742 – 4758. <https://doi.org/10.1002/anie.200300573>

Jain, R., Gonzalez-Gil, G., Singh, V., Van Hullebusch, E. D., Farges, F., Lens, P. N. L. (2014) Biogenic Selenium Nanoparticles: Production, Characterization and Challenges. Biotechnology, 10: 365-394. doi: 10.13140/2.1.4914.8489

Jakubczyk, K., Dec, K., Kałduńska, J., Kawczuga, D., Kochman, J., Janda, K. (2020) Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. Pol Merkur Lekarski, 48(284): 124-127.

Jamieson, D. J., Stephen, D. W. S., Terrière, E. C. (1996) Analysis of the adaptive oxidative stress response of *Candida albicans*. FEMS Microbiology Letters, 138(1): 83–88. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08139.x>

Jamieson, D. J., Stephen, D. W. S., Terrière, E. C. (1996) Analysis of the adaptive oxidative stress response of *Candida albicans*. FEMS Microbiology Letters, 138(1): 83–88. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(96\)00093-6](https://doi.org/10.1016/0378-1097(96)00093-6)

Jang, S. (2023) Harmonic Oscillator and Vibrational Spectroscopy. In: Quantum Mechanics for Chemistry. Springer, Cham., 69-99. https://doi.org/10.1007/978-3-031-30218-3_3

Jiang, H., Lin, W., Jiao, H., Liu, J., Chan, L., Liu, X., Wang, R., Chen, T. (2021) Uptake, transport, and metabolism of selenium and its protective effects against toxic

metals in plants: a review. *Metallomics*, 13(7): mfab040. <https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfab040>

Johnson, H., Whiteford, J. R., Eckert, S. E., Spanu, P. D. (2003) Production and secretion of *Aspergillus nidulans* catalase B in filamentous fungi driven by the promoter and signal peptide of the *Cladosporium fulvum* hydrophobin gene *hcf-1*. *Curr Genet* 44: 155–163. <https://doi.org/10.1007/s00294-003-0421-4>

Jomova, K., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K., Valko, M. (2024) Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. *Arch Toxicol* 98: 1323–1367. <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03696-4>

Jones, D. P. (2006) Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9-10): 1865–1879. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1865>

Kalinina, E. V., Chernov, N. N., Novichkova, M. D. (2014) Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochemistry (Mosc.)*, 79(13): 1562-83. <https://doi.org/10.1134/S0006297914130082>

Kessi, J., Hanselmann, K. W. (2004) Similarities between the Abiotic Reduction of Selenite with Glutathione and the Dissimilatory Reaction Mediated by *Rhodospirillum rubrum* and *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(49): 50662-50669. doi: 10.1074/jbc.M405887200

Kessi, J., Ramuz, M., Wehrli, E., Spycher, M., Bachofen, R. (1999) Reduction of Selenite and Detoxification of Elemental Selenium by the Phototrophic Bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Appl Environ Microbiol.*, 65(11): 4734-4740. doi: 10.1128/aem.65.11.4734-4740.1999

Kheradmand, E., Rafii, F., Yazdi, M. H., Sepahi, A. A., Shahverdi, A. R., Oveisi, M. R. (2014) The antimicrobial effects of selenium nanoparticle-enriched probiotics and their fermented broth against *Candida albicans*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(1): 48. <https://doi.org/10.1186/2008-2231-22-48>

Kieliszek, M., Bierla, K., Jiménez-Lamana, J., Kot, A. M., Alcántara-Durán, J., Piwowarek, K., Błażej, S., Szpunar, J. (2020) Metabolic response of the yeast *Candida utilis* during enrichment in selenium. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(15): 5287. <https://doi.org/10.3390/ijms21155287>

Kieliszek, M., Błażej, S., Gientka, I., Bzducha-Wróbel, A. (2015) Accumulation and metabolism of selenium by yeast cells. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 99: 5373–5382. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6650-x>

Kim, Y. H., Lee, H. S., Kwon, H. J., Patnaik, B. B., Nam, K. W., Han, Y. S., Bang, I. S., Han, M. D. (2014) Effects of different selenium levels on growth and regulation of laccase and versatile peroxidase in white-rot fungus, *Pleurotus eryngii*. World J. Microbiol. Biotechnol., 30: 2101-2109. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1636-x>

Kimura, H., Arima, T. H., Okamura, Y., Oku, T., Sakaguchi, T. (2014) Selenium Recovery and Conversion by a Filamentous Fungus, *Aspergillus oryzae* Strain RIB40. Asia Pacific Journal of Sustainable Agriculture Food and Energy, 2(2): 5-8.

Kohara, S., Goldbach, A., Koura, N., Saboungi, M.-L., Curtiss, L. A. (1998) Vibrational frequencies of small selenium molecules. Chem Phys Lett., 287: 282–288. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(98\)00184-5](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(98)00184-5)

Kondaparthi, P., Flora, S. J. S., Naqvi, S. (2019) Selenium nanoparticles: An insight on its Pro-oxidant and antioxidant properties. Frontiers in Nanoscience and Nanotechnology, 6: 1-5. doi: 10.15761/FNN.1000189

Koolhaas, J. M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S. F., Flügge, G., Korte, S. M., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B., Palanza, P., Richter-Levin, G., Sfogo, A., Steimer, T., Stiedl, O., van Dijk, G., Wöhr, M., Fuchs, E. (2011) Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 35(5): 1291-1301. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.003>

Kourousias, G., Billè, F., Guzzi, F., Ippoliti, M., Bonanni, V., Gianoncelli, A. (2023) Advances in sparse dynamic scanning in spectromicroscopy through compressive sensing. PLoS ONE, 18(11): e0285057. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0285057>

Kramer, G. F., Ames, B. N. (1988) Mechanisms of mutagenicity and toxicity of sodium selenite (Na₂SeO₃) in *Salmonella typhimurium*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 201(1): 169-180. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(88\)90123-6](https://doi.org/10.1016/0027-5107(88)90123-6)

Krumova, K., Cosa, G. (2016) Chapter 1: Overview of Reactive Oxygen Species. In Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences, ed. S. Nonell, C. Flors, S. Nonell, and C. Flors, The Royal Society of Chemistry, 1: 1-21. <https://doi.org/10.1039/9781782622208-00001>

Lenz, M., van Hullebusch, E. D., Farges, F., Nikitenko, S., Borca, C. N., Grolimund, D., Lens, P. N. L. (2008) Selenium speciation assessed by X-ray absorption spectroscopy of sequentially extracted anaerobic biofilms. Environ Sci Technol., 42: 7587–7593. <https://doi.org/10.1021/es800811q>

Li, D. B., Cheng, Y. Y., Wu, C., Li, W. W., Li, N., Yang, Z. C., Tong, Z. H., Yu, H. Q. (2014) Selenite reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 is mediated by fumarate reductase in periplasm. *Sci. Rep.* 4(1): 3735. <https://doi.org/10.1038/srep03735>

Li, G. X., Hu, H., Jiang, C., Schuster, T., Lü, J. (2007) Differential involvement of reactive oxygen species in apoptosis induced by two classes of selenium compounds in human prostate cancer cells. *Int. J. Cancer*, 120(9): 2034–2043. <https://doi.org/10.1002/ijc.22480>

Li, Q., McNeil, B., Harvey, L. M. (2008) Adaptive response to oxidative stress in the filamentous fungus *Aspergillus niger* B1-D. *Free Radical Biology and Medicine*, 3(1): 394-402. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.09.019>

Li, Z. Y., Guo, S. Y., Li, L. (2003) Bioeffects of selenite on the growth of *Spirulina platensis* and its biotransformation. *Bioresource Technology*, 89(2): 171-176. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00041-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00041-5)

Liang, X., Perez, M. A. M. J., Nwoko, K. C., Egbers, P., Feldmann, J., Csetenyi, L., Gadd, G. M. (2019) Fungal formation of selenium and tellurium nanoparticles. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 103: 7241–7259. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09995-6>

Liao, Y. (2006) Practical Electron Microscopy and Database. An Online Book, Second Edition. www.globalsino.com/EM

Lin, Z. H., Wang, C. R. C. (2005) Evidence on the size-dependent absorption spectral evolution of selenium nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*, 92(2-3): 591-594. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2005.02.023>

Lindblom, S. D., Wangeline, A. L., Valdez Barillas, J. R., Devilbiss, B., Fakra, S. C., Pilon-Smits, E. A. H. (2018) Fungal Endophyte *Alternaria tenuissima* Can Affect Growth and Selenium Accumulation in Its Hyperaccumulator Host *Astragalus bisulcatus*. *Front Plant Sci.*, 9: 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01213>

Lindblow-Kull, C., Kull, F. J., Shrift, A. (1980) Evidence for the biosynthesis of selenobiotin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 93(2): 572–576. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(80\)91115-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(80)91115-8)

Liu, W., Wang, Y., Jing, C. (2018) Transcriptome analysis of silver, palladium, and selenium stresses in *Pantoea* sp. *IMH. Chemosphere*, 208: 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.169>

Lucovsky, G., Mooradian, A., Taylor, W., Wright, G. B., Keezer, R. C. (1967) Identification of the fundamental vibrational modes of trigonal, α - monoclinic and

amorphous selenium. *Solid State Communications*, 5(2): 113–117.
[https://doi.org/10.1016/0038-1098\(67\)90006-3](https://doi.org/10.1016/0038-1098(67)90006-3)

Lv, Q., Liang, X., Nong, K., Gong, Z., Qin, T., Qin, X., Wang, D., Zhu, Y. (2021) Advances in Research on the Toxicological Effects of Selenium. *Bull Environ Contam Toxicol*, 106: 715–726. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-03094-3>

Maehly, A. C., Chance, B. (1954) The Assay of Catalases and Peroxidases. *Methods of Biochemical Analysis*, 1: 357–424. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>

Malinowska, E., Krzyczkowski, W., Herold, F., Łapienis, G., Ślusarczyk, J., Suchocki, P., Kuraś, M., Turło, J. (2009) Biosynthesis of selenium-containing polysaccharides with antioxidant activity in liquid culture of *Hericium erinaceum*. *Enzyme Microb. Technol.*, 44(5): 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.12.003>

Marple, M., Badger, J., Hung, I., Gan, Z., Kovnir, K., Sen, S. (2017) Structure of Amorphous Selenium by 2D ⁷⁷Se NMR Spectroscopy: An End to the Dilemma of Chain versus Ring. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(33): 9777–9781. <https://doi.org/10.1002/anie.201704323>

Martínez-Cadena, G., Saavedra-Calixto, J., Messina-Valencia, G., Domínguez-Gutiérrez, G., Novoa-Martínez, G. (1995) Effect of carbon source and pH of the growth medium on spore germination in *Phycomyces blakesleeanus*. *Arch. Microbiol.* 164, 231–234. <https://doi.org/10.1007/BF02529976>

Mastersizer 2000 brochure. Integrated systems for particle sizing. Malvern Instruments, Malvern (UK), 2005. www.malvern.co.uk/ms2000

Mastersizer 2000. [Online]. <https://www.htds.fr/wp-content/uploads/2019/04/Instrumentation-analytique-Analyses-particules-Granulometre-MS2000-2.pdf>

Mastersizer 2000. [Online]. <https://www.htds.fr/wp-content/uploads/2019/04/Instrumentation-analytique-Analyses-particules-Granulometre-MS2000-2.pdf>

Matsumoto, S., Teshigawara, M., Tsuobi, S., Ohmori, S. (1996) Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide in Biological Samples Using Acrylonitrile as a Thiol-Blocking Reagent. *Analytical Sciences*, 12(1): 91–95. <https://doi.org/10.2116/analsci.12.91>

Mattila, H., Österman-Udd, J., Mali, T., Lundell, T. (2022) Basidiomycota Fungi and ROS: Genomic Perspective on Key Enzymes Involved in Generation and Mitigation

of Reactive Oxygen Species. *Front. Fungal Biol.*, 3: 837605
<https://doi.org/10.3389/ffunb.2022.837605>

McDermott, J. R., Rosen, B. P., Liu, Z. (2010) Jen1p: A High Affinity Selenite Transporter in Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 21(22): 3934–3941.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e10-06-0513>

McGoldrick, S., O’Sullivan, S. M., Sheehan, D. (2005) Glutathione transferase-like proteins encoded in genomes of yeasts and fungi: insights into evolution of a multifunctional protein superfamily. *FEMS Microbiology Letters*, 242(1): 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.10.033>

Mehta, B. J., Salgado, L. M., Bejarano, E. R., Cerdá-Olmedo, E. (1997) New mutants of *Phycomyces blakesleeanus* for (beta)-carotene production. *Appl Environ Microbiol.*, 63: 3657–3661. <https://doi.org/10.1128/aem.63.9.3657-3661.1997>

Mézes, M., Balogh, K. (2009) Prooxidant mechanisms of selenium toxicity – a review. *Acta Biologica Szegediensis*, 53(1). <http://www.sci.u-szeged.hu/ABS>

Milovanović, I., Brčeski, I., Stajić, M., Korać, A., Vukojević, J., Knežević, A. (2014) Potential of *Pleurotus ostreatus* mycelium for selenium absorption. *Sci. World J.*, 2014(1): 681834. <https://doi.org/10.1155/2014/681834>

Minaev, V. S., Timoshenkov, S. P., Kalugin, V. V. (2005) Structural and Phase Transformation in Condensed Selenium. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 7(4): 1717-1741.

Mooradian, A., Wright, G. B. (1969) The Raman spectrum of trigonal α -monoclinic and amorphous selenium. In: W. C. Cooper (eds) *The physics of selenium and tellurium*. Proceedings of the international symposium held at Montreal, Canada, October 12–13, 1967. Pergamon Press, 269–276. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-013895-4.50026-X>

Nancharaiyah, Y. V., Lens, P. N. L. (2015) Ecology and biotechnology of selenium-respiring bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 79. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00037-14>

Newville, M. (2014) Fundamentals of XAFS. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 78(1): 33-74. <https://doi.org/10.2138/rmg.2014.78.2>

Niki, E. (1993) Antioxidant Defenses In Eukariotic Cells: An Overview. In: Poli, G., Albano, E., Dianzani, M. U. (eds) *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*. Molecular and Cell Biology Updates. Birkhäuser Basel. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-9116-5_31

O'Donnell, K., Lutzoni, F. M., Ward, T. J., Benny, G. L. (2001) Evolutionary relationships among mucoralean fungi (Zygomycota): Evidence for family polyphyly on a large scale. *Mycologia*, 93:2, 286-297. <https://doi.org/10.1080/00275514.2001.12063160>

Ogra, Y., Ogihara, Y., Anan, Y. (2016) Comparison of the metabolism of inorganic and organic selenium species between two selenium accumulator plants, garlic and Indian mustard. *Metallomics*, 9(1): 61-68. <https://doi.org/10.1039/c6mt00128a>

Oremland, R. S. Herbel, M. J., Blum, J. S., Langley, S., Beveridge, T. J., Ajayan, P. M., Sutto, T., Ellis, A. V., Curran, S. (2004) Structural and Spectral Features of Selenium Nanospheres Produced by Se-Respiring Bacteria. *Appl Environ Microbiol.*, 70. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.52-60.2004>

Pakhomov, P., Khizhnyak, S., Galitsyn, V., Rogova, E., Hartmann, B., Tshmel, A. (2011) Application of the Low Frequency Raman Spectroscopy for Studying Ultra-High Molecular Weight Polyethylenes. *Macromolecular Symposia*, 305(1): 63-72. <https://doi.org/10.1002/masy.201000137>

Papapostolou, J., Georgiou, C. D. (2010) Superoxide radical induces sclerotial differentiation in filamentous phytopathogenic fungi: a superoxide dismutase mimetics study. *Microbiology*, 156(3). <https://doi.org/10.1099/mic.0.034579-0>

Paul, A., Rubenstein, M., Ruffino, A., Masiuk, S., Spanier, J. E., Grinberg, I. (2024) Accuracy and limitations of the bond polarizability model in modeling of Raman scattering from molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.*, 161: 064305. <https://doi.org/10.1063/5.0217227>

Peng, D., Zhang, J., Liu, Q., Taylor E. W. (2007) Size effect of elemental selenium nanoparticles (Nano-Se) at supranutritional levels on selenium accumulation and glutathione S-transferase activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101(10): 1457-1463. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.06.021>

Perrone, D., Monteiro, M., Nunes, J. C. (2015) Chapter 1: The Chemistry of Selenium. In: V. R. Preedy (eds), *Selenium: Chemistry, Analysis, Function and Effects*. The Royal Society of Chemistry, 2015: 3-15. <https://doi.org/10.1039/9781782622215-00003>

Phycomyces *blakesleeanus*. [Online]. <https://www.inaturalist.org/observations/10028162>

Piacenza, E., Presentato, A., Heyne, B., Turner, R. J. (2020) Tunable photoluminescence properties of selenium nanoparticles: biogenic versus chemogenic synthesis. *Nanophotonics*, 9(11): 3615-3628. <https://doi.org/10.1515/nanoph-2020-0239>

Pigeolet, E., Corbisier, P., Houbion, A., Lambert, D., Michiels, C., Raes, M., Zachary, M. D., Remacle, J. (1990) Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev.*, 51(3): 283-97. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(90\)90078-T](https://doi.org/10.1016/0047-6374(90)90078-T)

Pinel-Cabello, M., Chapon, V., Ruiz-Fresneda, M. A., Alpha-Bazin, B., Berthomieu, C., Armengaud, J., Merroun, M. L. (2021) Delineation of cellular stages and identification of key proteins for reduction and biotransformation of Se(IV) by *Stenotrophomonas bentonitica* BII-R7. *Journal of Hazardous Materials*, 418, 126150. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126150>

Pinson, B., Sagot, I., Daignan-Fornier, B. (2000) Identification of genes affecting selenite toxicity and resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, 36(3): 679-687. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01890.x>

Poborchii, V. V. (1996) Polarized Raman and optical absorption spectra of the mordenite single crystals containing sulfur, selenium, or tellurium in the one-dimensional nanochannels. *Chem Phys Lett.*, 251(3-4): 230-234. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(96\)00045-0](https://doi.org/10.1016/0009-2614(96)00045-0)

Poborchii, V. V., Kolobov, A. V., Oyanagi, H., Romanov, S. G., Tanaka, K. (1997) Structure of selenium incorporated into nanochannels of mordenite: dependence on ion exchange and method of incorporation. *Chem Phys Lett.*, 280(1-2): 10-16. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(97\)01086-5](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(97)01086-5)

Pócsi, I., Prade, R. A., Penninckx, M. J. (2004) Glutathione, Altruistic Metabolite in Fungi. *Advances in Microbial Physiology* 49: 1-76. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(04\)49001-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(04)49001-8)

Prasad, K. S., Patel, H., Patel, T., Patel, K., Selvaraj, K. (2013) Biosynthesis of Se nanoparticles and its effect on UV-induced DNA damage. *Colloids Surf B Biointerfaces.*, 103: 261-6. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.029>

Prasad, R., Swamy, V. S. (2013) Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Synthesized by Bark Extract of *Syzygium cumini*. Hindawi Publishing Corporation, *Journal of Nanoparticles*, 2013,431218: 1-6. <https://doi.org/10.1155/2013/431218>

Recikliranje glutationa. [Online]. https://cdn.gbiosciences.com/pdfs/protocol/786-075_protocol.pdf

Ren, A., Liu, R., Miao, Z. G., Zhang, X., Cao, P. F., Chen, T. X., Li, C. Y., Shi, L., Jiang, A. L., Zhao, M. W. (2017) Hydrogen-rich water regulates effects of ROS balance on morphology, growth and secondary metabolism via glutathione peroxidase in *Ganoderma*

lucidum. Environmental Microbiology, 19(2): 566-583. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13498>

Ren, Y. Y., Sun, P. P., Li, H. R., Zhu, Z. Y. (2020) Effects of Na₂SeO₃ on growth, metabolism, antioxidase and enzymes involved in polysaccharide synthesis of *Cordyceps militaris*. Process Biochem. 97: 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.06.018>

Řezanka, T., Sigler, K. (2008) Biologically Active Compounds Of Semi-Metals. Studies in Natural Products Chemistry, 35: 835-921. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(08\)80018-X](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(08)80018-X)

Rohn, I., Marschall, T. A., Kroepfl, N., Jensen, K. B., Aschner, M., Tuck, S., Kuehnelt, D., Schwerdtle, T., Bornhorst, J. (2018) Selenium species-dependent toxicity, bioavailability and metabolic transformations in *Caenorhabditis elegans*. Metallomics, 10(6): 818-827. <https://doi.org/10.1039/c8mt00066b>

Rosenfeld, C. E., Kenyon, J. A., James, B. R., Santelli, C. M. (2017) Selenium (IV, VI) reduction and tolerance by fungi in an oxic environment. Geobiology., 15: 441–52. <https://doi.org/10.1111/gbi.12224>

Ruiz-Fresneda M. A., Fernández-Cantos, M. V., Gómez-Bolívar, J., Eswayah, A. S., Gardiner, P. H. E., Pinel-Cabello, M., Solari, P. L., Merroun, M. L. (2023) Combined bioreduction and volatilization of Se^{VI} by *Stenotrophomonas bentonitica*: Formation of trigonal selenium nanorods and methylated species. Science of The Total Environment, 858(2): 160030. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160030>

Ruiz-Fresneda, M. A., Eswayah, A. S., Romero-González, M., Gardiner, P. H. E., Solari, P. L., Merroun, M. L. (2020) Chemical and structural characterization of Se^{IV} biotransformations by: *Stenotrophomonas bentonitica* into Se⁰ nanostructures and volatiles Se species. Environ Sci Nano., 7: 2140–5215. <https://doi.org/10.1039/d0en00507j>

Ryser, A., Strawn, D. G., Marcus, M. A., Johnson-Maynard, J. L., Gunter, M. E., Moler, G. (2005) Micro-spectroscopic investigation of selenium-bearing minerals from the Western US Phosphate Resource Area. Geochemical Transactions, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1467-4866-6-1>

Sabuda, M. C., Rosenfeld, C. E., DeJournett, T. D., Schroeder, K., Wuolo-Journey, K., Santelli, C. M. (2020) Fungal Bioremediation of Selenium-Contaminated Industrial and Municipal Wastewaters. Front. Microbiol., 11: 2105. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02105>

Salaneck, W. R., Duke, C. B., Paton, A., Griffiths, C., Keezer, R. C. (1977) Electronic structure of monoclinic selenium (Se_s): Comparison with S₈ and trigonal selenium. Phys. Rev. B, 15(2): 1100-1109. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.15.1100>

Santelli, C. M., Sabuda, M. C., Rosenfeld, C. E. (2023) Time-resolved examination of fungal selenium redox transformations. *ACS Earth Space Chem.*, 7(5): 960-971. <https://doi.org/10.1021/acsearthspacechem.2c00288>

Sarkar, S., Diab, H., Thompson, J. (2023) Microplastic Pollution: Chemical Characterization and Impact on Wildlife. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 20: 1745. <https://doi.org/10.3390/ijerph20031745>

Sato, I., Shimatani, K., Fujita, K., Abe, T., Shimizu, M., Fujii, T., Hoshino, T., Takaya, N. (2011) Glutathione Reductase/Glutathione Is Responsible for Cytotoxic Elemental Sulfur Tolerance via Polysulfide Shuttle in Fungi. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(23): 20283-20291. doi: 10.1074/jbc.M111.225979

Sato, I., Shimizu, M., Hoshino, T., Takaya, N. (2009) The Glutathione System of *Aspergillus nidulans* Involves a Fungus-specific Glutathione S-Transferase. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(12): 8042-8053. doi: 10.1074/jbc.M807771200

Schröder, I., Rech, S., Krafft, T., Macy, J. M. (1997) Purification and characterization of the selenate reductase from *Thauera selenatis*. *J Biol Chem.*, 272: 23765–23768. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.38.23765>

Scott, B., Eaton, C. J. (2008) Role of reactive oxygen species in fungal cellular differentiations. *Current Opinion in Microbiology*, 11: 488-493. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.10.008>

Selye, H. (1976) Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *CMA Journal*, 115(1): 53–56.

Shao, H., Tu, Y., Wang, Y., Jiang, C., Ma, L., Hu, Z., Wang, J., Zeng, B., He, B. (2019) Oxidative Stress Response of *Aspergillus oryzae* Induced by Hydrogen Peroxide and Menadione Sodium Bisulfite. *Microorganisms*, 7(8): 225. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080225>

Shao, Y. Y., Seib, P. A., Kramer, K. J., Van Galen, D. A. (1993) Synthesis and properties of D-erythroascorbic acid and its vitamin C activity in the tobacco hornworm (*Manduca sexta*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(9): 1391-1396. <https://doi.org/10.1021/jf00033a009>

Shilo, S., Aharoni-Simon, M., Tirosh, O. (2005) Selenium Attenuates Expression of MnSOD and Uncoupling Protein 2 in J774.2 Macrophages: Molecular Mechanism for Its Cell-Death and Antiinflammatory Activity. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(1-2): 276-286. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.27>

Sies, H. (2020) Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants*, 9(9): 852. <https://doi.org/10.3390/antiox9090852>

Sies, H., Berndt, C., Jones, D. P. (2017) Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86: 715-748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>

Smirnoff, N. (2000) Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* 2000 Jun; 3(3): 229-235.

Smith, I. K., Vierheller, T. L., Thorne, C. A. (1988) Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Analytical biochemistry*, 175(2): 408-413.

Srivastava, N., Mukhopadhyay, M. (2012) Biosynthesis and structural characterization of selenium nanoparticles mediated by *Zooglea ramigera*. *Powder Technology*, 244: 26-29. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2013.03.050>

Stoyancheva, G., Dishliyska, V., Miteva-Staleva, J., Kostadinova, N., Abrashev, R., Angelova, M., Krumova, E. (2022) Sequencing and gene expression analysis of catalase genes in Antarctic fungal strain *Penicillium griseofulvum* P29. *Polar Biology*, 45: 437–447. <https://doi.org/10.1007/s00300-021-03001-4>

Sutter, R. P. (1975) Mutations Affecting Sexual Development in *Phycomyces Blakesleanus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72(1): 127-130. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.1.127>

Tabibi, M., Aghaei, S., Amoozegar, A. M., Nazari, R., Zolfaghari, M. R. (2023) Characterization of green synthesized selenium nanoparticles (SeNPs) in two different indigenous halophilic bacteria. *BMC Chemistry*, 17(115). <https://doi.org/10.1186/s13065-023-01034-w>

Tan, L. C., Nancharaiah, Y. V., van Hullebusch, E. D., Lens, P. N. L. (2016) Selenium: environmental significance, pollution, and biological treatment technologies. *Biotechnology Advances*, 34(5): 886-907. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.05.005>

Tan, Y., Yao, R., Wang, R., Wang, D., Wang, G., Zheng, S. (2016) Reduction of selenite to Se(0) nanoparticles by filamentous bacterium *Streptomyces* sp. ES2-5 isolated from a selenium mining soil. *Microb Cell Fact.*, 15, 157. doi: 10.1186/s12934-016-0554-z

Tietze F., (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.*, 27(3): 502-522. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(69\)90064-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(69)90064-5)

Toppo, S., Flohé, L., Ursini, F., Vanin, S., Maiorino, M. (2009) Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochim. Biophys. Acta*, 1790(11): 1486–1500. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.04.007>

Traynor, A. M., Sheridan, K., Jones, G. W., Calera, J. A., Doyle, S. (2019) Involvement of Sulfur in the Biosynthesis of Essential Metabolites in Pathogenic Fungi of Animals, Particularly *Aspergillus* spp.: Molecular and Therapeutic Implications. *Front. Microbiol.*, 10:2859. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02859>

Tudzynski, P., Heller, J., Siegmund, U. (2012) Reactive oxygen species generation in fungal development and pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 15(6): 653-659. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.10.002>

Tugarova, A. V., Mamchenkova, P. V., Dyatlova, Y. A., Kamnev, A. A. (2018) FTIR and Raman spectroscopic studies of selenium nanoparticles synthesised by the bacterium *Azospirillum thiophilum*. *Spectrochim Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc.*, 192: 458–463. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.11.050>

Urík, M., Boriová, K., Bujdoš, M., Matúš, P. (2016) Fungal Selenium(VI) Accumulation and Biotransformation – Filamentous Fungi in Selenate Contaminated Aqueous Media Remediation. *CLEAN - Soil, Air, Water*, 44(6): 610-614. <https://doi.org/10.1002/clen.201500100>

Van Fleet-Stalder, V., Chasteen, T. G., Pickering, I. J., George, G. N., Prince, R. C. (2000) Fate of selenate and selenite metabolized by *Rhodobacter sphaeroides*. *Appl Environ Microbiol.*, 66: 4849–4853. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.4849-4853.2000>

Vašková, J., Kočan, L., Vaško, L., Perjési, P. (2023) Glutathione-related enzymes and proteins: a review. *Molecules*, 28(3): 1447. <https://doi.org/10.3390/molecules28031447>

Vetchinkina, E., Loshchinina, E., Kursky, V., Nikitina, V. (2013) Reduction of organic and inorganic selenium compounds by the edible medicinal basidiomycete *Lentinula edodes* and the accumulation of elemental selenium nanoparticles in its mycelium. *Journal of Microbiology* 51 (6): 829–835.

Vogel, M., Fischer, S., Maffert, A., Hübner, R., Scheinost, A. C., Franzen, C., Steudtner, R. (2018) Biotransformation and detoxification of selenite by microbial biogenesis of selenium-sulfur nanoparticles. *J Hazard Mater.*, 344: 749–757. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.10.034>

Vriens, B., Behra, R., Voegelin, A., Zupanic, A., Winkel, L. H. E. (2016) Selenium uptake and methylation by the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ Sci Technol.*, 50(2): 711–720. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04169>

Wadhvani, S. A., Shedbalkar, U. U., Singh, R., Chopade, B. A. (2016) Biogenic selenium nanoparticles: current status and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(6): 2555–2566. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7300-7>

Wang, G. (2016) Reactive Oxygen Species. In: Schwab, M. (eds) *Encyclopedia of Cancer*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-46875-3_4966

Wang, J., Wang, B., Zhang, D., Wu, Y. (2016) Selenium uptake, tolerance and reduction in *Flammulina velutipes* supplied with selenite. *PeerJ*, 4: e1993. doi: 10.7717/peerj.1993.

Wang, Q., Pokhrel, A., Coleman, J. J. (2021) The Extracellular Superoxide Dismutase Sod5 From *Fusarium oxysporum* Is Localized in Response to External Stimuli and Contributes to Fungal Pathogenicity. *Sec. Plant Pathogen Interactions*, 12: 608861. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.608861>

Wang, Q., Zhang, J., Liang, J., Wang, Y., Ren, C., Chen, X., Cheng, D., Zhang, H., Liu, H. (2025) Genomic Insights into Selenate Reduction by Anaerobacillus Species. *Microorganisms*, 13(3): 659. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13030659>

Wang, T., Yang, L., Zhang, B., Liu, J. (2010) Extracellular biosynthesis and transformation of selenium nanoparticles and application in H₂O₂ biosensor. *Colloids Surf B Biointerfaces.*, 80: 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.05.041>

Wang, Y., Yan, X., Fu, L. (2013) Effect of selenium nanoparticles with different sizes in primary cultured intestinal epithelial cells of crucian carp, *Carassius auratus gibelio*. *International Journal of Nanomedicine*, 8(1): 4007-4013. <https://doi.org/10.2147/IJN.S43691>

Wangsanut, T., Pongpom, M. (2022) The Role of the Glutathione System in Stress Adaptation, Morphogenesis and Virulence of Pathogenic Fungi. *Int. J. Mol. Sci.*, 23(18): 10645. <https://doi.org/10.3390/ijms231810645>

Weekley, C. M., Aitken, J. B., Vogt, S., Finney, L. A., Paterson, D. J., De Jonge, M. D., Howard, D. L., Musgrave, I. F., Harris, H. H. (2011) Uptake, distribution, and speciation of selenoamino acids by human cancer cells: X-ray absorption and fluorescence methods. *Biochemistry*, 50: 1641–1650. <https://doi.org/10.1021/bi101678a>

Wells, M., Stolz, J. F. (2020) Microbial selenium metabolism: a brief history, biogeochemistry and ecophysiology. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(12): faa209. <https://doi.org/10.1093/femsec/faa209>

Werkneh, A. A., Rene, E. R., Lens, P. N. L. (2017) Simultaneous removal of selenite and phenol from wastewater in an upflow fungal pellet bioreactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(4): 1003-1011. <https://doi.org/10.1002/jctb.5452>

Wood, N. J., Sørensen, J. (2001) Catalase and superoxide dismutase activity in ammonia-oxidising bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 38(1): 53–58. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(01\)00173-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(01)00173-8)

Woodbury, W., Spencer, A. K., Stahman, M. A. (1971) An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal Biochem.*, 44(1): 301-305. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90375-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90375-7)

Wu, Z., Yin, X., Bañuelos, G. S., Lin, Z. Q., Zhu, Z., Liu, Y., Yuan, L., Li, M. (2016) Effect of selenium on control of postharvest gray mold of tomato fruit and the possible mechanisms involved. *Front. Microbiol.* 6, 1441. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01441>

Xu, M., Zhu, S., Li, Y., Xu, S., Shi, G., Ding, Z. (2021) Effect of selenium on mushroom growth and metabolism: A review. *Trends Food Sci. Technol.*, 118(A): 328-340. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.10.018>

Xu, M., Zhu, S., Wang, Q., Chen, L., Li, Y., Xu, S., Gu, Z., Shi, G., Ding, Z. (2023) Pivotal biological processes and proteins for selenite reduction and methylation in *Ganoderma lucidum*. *J. Hazard. Mater.*, 444(B): 130409. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130409>

Yaakoub, H., Mina, S., Calenda, A., Bouchara, J. P., Papon, N. (2022) Oxidative stress response pathways in fungi. *Cell. Mol. Life Sci.*, 79(333). <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04353-8>

Yee, N., Ma, J., Dalia, A., Boonfueng, T., Kobayashi, D. Y. (2007) Se(VI) reduction and the precipitation of Se(0) by the facultative bacterium *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 are regulated by FNR. *Appl Environ Microbiol.*, 73: 1914–1920. <https://doi.org/10.1128/AEM.02542-06>

Yin, C., Zhao, W., Zhu, J., Zheng, L., Chen, L., Ma, A. (2015) Cloning and characterization of a differentially expressed mitochondrial manganese superoxide dismutase gene from *Pleurotus ostreatus*. *Ann Microbiol.*, 65: 1597–1606. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0999-4>

Young, A. T., Arenholz, E., Feng, J., Padmore, H., Marks, S., Schlueter, R., Hoyer, E., Kelez, N., Steier, C. (2002) A Soft X-Ray Undulator Beamline at the Advanced Light Source with Circular and Variable Linear Polarization for the Spectroscopy and Microscopy of Magnetic Materials. *Surface Review and Letters*, 9(01): 549-554. <https://doi.org/10.1142/S0218625X02002622>

Yu, Q., Boyanov, M. I., Liu, J., Kemner, K. M., Fein, J. B. (2018) Adsorption of selenite onto *Bacillus subtilis*: the overlooked role of cell envelope sulfhydryl sites in the microbial conversion of Se(IV). *Environ Sci Technol.*, 52(18): 10400–10407. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02280>

Zamocky, M., Furtmüller, P. G., Obinger, C. (2008) Evolution of Catalases from Bacteria to Humans. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(9): 1527–1548. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2046>

Zapata, F., López-Fernández, A., Ortega-Ojeda, F., Montalvo, G., García-Ruiz, C. (2020) A practical beginner's guide to Raman microscopy. *Applied Spectroscopy Reviews*, 56(6): 439-462. <https://doi.org/10.1080/05704928.2020.1797761>

Zare, B., Babaie, S., Setayesh, N., Shahverdi, A. R. (2013) Isolation and characterization of a fungus for extracellular synthesis of small selenium nanoparticles. *Nanomedicine Journal*, 1(1): 13-19. doi: 10.7508/nmj.2013.01.002

Zhang, A., Cheng, T. O., Wu, X. Y., Altura, B. T., Altura, B.M. (1997) Extracellular Mg²⁺ regulates intracellular Mg²⁺ and its subcellular compartmentation in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell. Mol. Life Sci.*, 53: 69-72. <https://doi.org/10.1007/PL00000581>

Zhao, H., Chen, J., Liu, J., Han, B. (2015) Transcriptome analysis reveals the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *RSC Advances*, 5(29): 22923-22934. <https://doi.org/10.1039/C4RA14600J>

Zheng, S., Su, J., Wang, L., Yao, R., Wang, D., Deng, Y., Wang, R., Wang, G., Rensing, C. (2014) Selenite reduction by the obligate aerobic bacterium *Comamonas testosteroni* S44 isolated from a metal-contaminated soil. *BMC Microbiology*, 14(204). <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0204-8>

Zhu, J., Krom, B. P., Sanglard, D., Intapa, C., Dawson, C. C., Peters, B. M., Shirliff, M. E., Jabra-Rizk, M. A. (2011) Farnesol-Induced Apoptosis in *Candida albicans* Is Mediated by Cdr1-p Extrusion and Depletion of Intracellular Glutathione. *PLoS ONE* 6(12): e28830. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028830>

Žižić, M., Dučić, T., Grolimund, D., Bajuk-Bogdanović, D., Nikolić, M., Stanić, M., Križak, S., Zakrzewska, J. (2015) X-ray absorption near-edge structure microspectroscopy study of vanadium speciation in *Phycomyces blakesleeanus* mycelium. *Anal Bioanal Chem.*, 407: 7487–7496. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8916-7>

Žižić, M., Stanić, M., Aquilanti, G., Bajuk-Bogdanović, D., Branković, G., Rodić, I., Živić, M., Zakrzewska, J. (2022) Biotransformation of selenium in the mycelium of the

fungus *Phycomyces blakesleanus*. Anal. Bioanal. Chem., 414(20): 6213-6222.
<https://doi.org/10.1007/s00216-022-04191-4>

Biografija autora

Ivanka Rodić je rođena 16. januara 1984. godine u Rijeci, a osnovno i srednje obrazovanje je završila u Vrbasu. Godine 2003. je upisala Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, smer Diplomirani biolog, a 2008. godine diplomirala na temi „Fenotipska varijabilnost konspecifičkih populacija vrste *Eristalis tenax* (Diptera: Syrphidae)“ za koji je nagrađena „Izuzetnom nagradom za naučni i stručni rad“ od Univerziteta u Novom Sadu. Na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu je 2009. upisala master studije iz studijske oblasti Genetika, oplemenjivanje biljaka i semenarstvo, a 2012. godine stekla zvanje Master inženjer poljoprivrede na temi „Detekcija i identifikacija specifičnih genetičkih modifikacija soje“. Tokom master studija bila je zaposlena kao nastavnik biologije u gimnaziji „Žarko Zrenjanin“ u Vrbasu.

Multidisciplinarnu doktorsku studiju pri Univerzitetu u Beogradu je upisala 2015. godine na smeru Biofizika. Eksperimentalni deo teze je radila na Institutu za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu, Odsek za nauku o živim sistemima, kao i na Institutu za Botaniku i Botaničkoj bašti „Jevremovac“ na Katedri za fiziologiju i molekularnu biologiju biljaka pri Biološkom fakultetu u Beogradu. Prilikom izrade disertacije, Ivanka se bavila proučavanjem uticaja selenita na micelijum gljive *Phycomyces blakesleeanus* primenom različitih fizičko-hemijskih metoda, kao što su UV-VIS spektrofotometrija, XANES i Ramanska spektroskopija. Rezultati ovih istraživanja su do sada predstavljeni na nacionalnim i međunarodnim naučnim skupovima i objavljeni u dve publikacije u međunarodnim akademskim časopisima.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Иванка Родић

Број индекса 122/2015

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Адаптивни одговор гљиве *Phycomyces blakesleeanus* на оксидативни стрес индукован селенимом“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Иванка Родић

Број индекса 122/2015

Студијски програм Биофизика

Наслов рада Адаптивни одговор гљиве *Phycomyces blakesleeanus* на оксидативни
стрес индукован селенимом

Ментори Др Тијана Цветић Антић

Др Милан Жижич

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Адаптивни одговор гљиве *Phycomyces blakesleeanus* на оксидативни стрес индукован селенитом

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.