

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**AGRONOMSKI FAKULTET**

Marta Bedek

**Fizikalno-kemijska karakterizacija i mehanizmi otpuštanja**  
***Trichoderma viride* spora i kalcijevih iona iz mikrosfera kalcijevog**  
**alginata**

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je u laboratoriju Zavoda za kemiju pod vodstvom mentora izv. prof. dr. sc. Marka Vincekovića i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2017./2018.

## POPIS KRATICA

ALG/Ca	mikrosfera kalcijevog alginata
ALG/Ca+TV	mikrosfera kalcijevog alginata sa sporama <i>T.viride</i>
CaCl <sub>2</sub>	kalcijev klorid
CLSM	engl. Confocal Laser Scanning Microscopy (konfokalni laserski pretražni mikroskop)
DLS	engl. Dynamic Light Scattering (dinamičko raspršenje svjetlosti)
FTIR	engl. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Fourierova transformacija infracrvene spektroskopije)
nm	nanometar
NS	broj spora
PDA	krumpirov dekstrozni agar
PDB	krumpirov dekstrozni bujon
R <sup>2</sup>	koeficijent korelacije
SEM	engl. Scanning Electron Microscope
STP	izolat
TV	<i>Trichoderma viride</i>
μl	mikrolitar
μm	mikrometar

## SADRŽAJ RADA

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Inkapsulacija.....	1
1.2. Uporaba mikročestica u poljoprivredi.....	2
1.3. Inkapsulacija metodom ionskog geliranja.....	4
1.4. <i>Trichoderma viride</i> ( <i>T. viride</i> ) .....	5
1.5. Kalcijev ion – Ca <sup>2+</sup> .....	7
1.6. Simultana inkapsulacija spora <i>T. viride</i> i kalcija.....	9
<b>2. HIPOTEZA I OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA .....</b>	<b>12</b>
2.1. Hipoteza .....	12
2.2. Opći i specifični ciljevi rada.....	12
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>13</b>
3.1. Materijali .....	13
3.2. Uzgoj <i>Trichoderme viride</i> .....	13
3.3. Priprava mikrosfera .....	13
3.4. Metode.....	15
3.4.1. Utjecaj koncentracije kalcija na bioaktivnost <i>T. viride</i> .....	15
3.4.2. Utjecaj koncentracije kalcija na vegetativan rast i sporulaciju.....	15
3.4.3. Utjecaj kationa kalcija na sporulaciju <i>T. viride</i> u mikrosferama .....	15
3.4.4. Električni naboj i veličina <i>T. viride</i> spora suspendiranih u vodi.....	16
3.4.5. Fourierova transformacija infracrvene spektroskopije .....	16
3.4.6. Mikroskopska promatranja .....	17
3.4.7. Metode fizikalno-kemijske karakterizacije agroformulacija mikrosfera .....	17
3.4.7.1. Učinkovitost inkapsulacije .....	17
3.4.7.2. Kapacitet inkapsulacije.....	18
3.4.7.3. Stupanj bubrenja .....	19
3.4.8. <i>In vitro</i> otpuštanje bioaktivnih tvari iz mikrosfera .....	19
3.4.9. Statistička analiza.....	20
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>21</b>
4.1. Međudjelovanja spora <i>T. viride</i> i kalcijevih iona.....	21
4.1.1. Električni naboj i veličina spora <i>T. viride</i> suspendiranih u vodi.....	21
4.1.2. Utjecaj kalcijevih iona na rast i sporulaciju <i>T. viride</i> .....	23

4.1.3.	Identifikacija međudjelovanja iona kalcija, spora <i>T. viride</i> i natrijevog alginata...	26
4.2.	Fizikalno-kemijska karakterizacija mikrosfera .....	28
4.2.1.	Učinkovitost i kapacitet inkapsulacije i stupanj bubrenja.....	28
4.2.2.	Morfologija i veličina mikrosfera .....	30
4.2.3.	Identifikacija molekulskih međudjelovanja u mikrosferama.....	33
4.2.4.	<i>In vitro</i> otpuštanje <i>T. viride</i> spora i iona kalcija iz mikrosfera .....	34
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA .....</b>	<b>38</b>
5.1.	Međudjelovanja spora <i>T. viride</i> i kalcijevih iona.....	38
5.1.1.	Električni naboj i veličina spora <i>T. viride</i> suspendiranih u vodi.....	39
5.1.2.	Utjecaj kalcijevih iona na rast i sporulaciju <i>T. viride</i> .....	39
5.1.3.	Identifikacija međudjelovanja iona kalcija, spora <i>T. viride</i> i natrijevog alginata... 40	
5.2.	Fizikalno-kemijska karakterizacija mikrosfera .....	40
5.2.1.	Kapacitet inkapsulacije i stupanj bubrenja .....	41
5.2.2.	Morfologija i veličina mikrosfera .....	42
5.2.3.	Identifikacija molekulskih međudjelovanja u mikrosferama.....	42
5.2.4.	<i>In vitro</i> otpuštanje <i>T. viride</i> spora i iona kalcija iz mikrosfera .....	43
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>45</b>
<b>7.</b>	<b>ZAHVALE .....</b>	<b>47</b>
<b>8.</b>	<b>POPIS LITERATURE .....</b>	<b>48</b>
<b>9.</b>	<b>SAŽETAK .....</b>	<b>58</b>
<b>10.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>59</b>

## 1. UVOD

### 1.1. Inkapsulacija

Inkapsulacija je proces kojim se aktivni sastojci (čvrsti, tekući ili plinoviti) imobiliziraju u čestice (jezgra) koje kontrolirano otpuštaju aktivne sastojke (Gallo i Carbo, 2010). Tehnologija inkapsuliranja omogućuje osjetljivim materijalima da se fizički obaviju zaštitnim materijalom, kako bi se aktivni sastojci zaštitili od neželjenih međudjelovanja, vremenskih utjecaja, gubitaka isparavanjem i slično. (Ferrándiz i sur., 2017). S obzirom na veličinu nastale čestice dijele se na nanočestice (10-1000 nm), mikročestice (2-2000 µm) i makročestice (> 2000 µm) (Singh i sur., 2010). Čestice mogu biti pravilnog i nepravilnog oblika te se s obzirom na morfologiju mogu klasificirati kao: mononuklearne i polinuklearne kapsule i sfere (Gallo i Carbo, 2010). Mononuklearne kapsule imaju jezgru okruženu membranom, polinuklearne imaju više jezgri unutar membrane, dok je sfera jezgra bez membrane ili bilo kojeg drugog vanjskog sloja. Uz ove tri osnovne klasifikacije, kapsule mogu biti i dvojezgrene i višeslojne mikrokapsule s jednom jezgrom ili mogu formirati skupinu kapsula (Kumar Das i sur., 2011).

Postoje brojne metode za pripravu mikročestica, a njihov izbor ovisi o karakteristikama materijala jezgre i svojstvima aktivnih sastojaka. Metode inkapsulacije se dijele na: fizikalne (sušenje raspršivanjem, centrifugalna ekstruzija, sferizacija ekstruzijom, procesi koji koriste superkritične fluide), fizikalno-kemijske (ionsko geliranje, hlađenje raspršivanjem, ekstrakcija otapala isparavanjem, jednostavna i kompleksna koacervacija) i kemijske (granična polimerizacija, umrežavanje, *in situ* polimerizacija itd.) (Gallo i Carbo, 2010; Teixeira da Silva i sur., 2014). *In situ* polimerizacija je jedna od najjednostavnijih i najčešće korištenih metoda mikroinkapsuliranja (Milošević i sur., 2017). Izbor metode inkapsulacije ovisi o vrsti i veličini aktivnih sastojaka, primjeni mikročestica, fizičkim i kemijskim svojstvima jezgre i membrane, mehanizmu oslobađanja aktivnih sastojaka, uvjetima okoline te troškovima. Ispravan odabir materijala za mikročestice je vrlo važan jer utječe na učinkovitost i stabilnost inkapsulacije. Materijali mogu biti odabrani iz širokog raspona prirodnih i sintetičkih polimera, uključujući ugljikohidrate (škrob, modificirani škrob, saharoza, celuloza, dekstrin i kitozan), proteine (želatina, gluten, albumin, kazein), gume (karagenan, guma arabika, alginat), lipide (monogliceride i digliceride, parafin,

vosak, hidrogenirana ulja i masti) ili anorganske materijale (kalcijev sulfat i silikati) (Teixeira da Silva i sur., 2014; Ferrándiz i sur., 2017). Za pripremu kapsula potrebno je odabrati materijal za oblaganje koji ne smije reagirati s aktivnim sastojcima i difundirati u jezgru, mora imati sposobnost pričvršćivanja i održavanja jezgre unutar kapsule te imati sposobnost pružanja maksimalne zaštite jezgre (Teixeira da Silva i sur., 2014; Singh i sur., 2010).

Mikroinkapsuliranje lijekova prvi put je istraženo 1931. godine, pripremom želatinskih sfera korištenjem tehnike koacervacije (Kumar Das i sur., 2011). Međutim, prava proizvodnja mikrokapsula započela je 1950-ih, kada su Green i Schleicher složenom koacervacijom želatine i gume arabike proizveli obojene mikrokapsule za proizvodnju indigo papira (Yoshizawa, 2004; Camargos Braga, 2015). Na gornji list papira nanijeli su premaz mikrokapsulirane bezbojne tinte, a sredstvo za razvijanje na sljedeći list. Prilikom pritiska pisanjem, kapsule su se prekrile i tinta je reagirala sa sredstvom kako bi se dobila tamna boja kopije (Vladislavljević, 2012). Od tada se tehnologija mikroinkapsuliranja stalno poboljšava, mijenja i prilagođava za različite potrebe tako da se osim u grafičkoj industriji koristi i u medicini, farmaciji (lijekovi), poljoprivredi (agrokemikalije, ishrana/zaštita bilja), građevinarstvu, kemijskoj industriji (enzimi), prehrambenoj industriji (arome), biotehnologiji, kozmetičkoj industriji (mirisi), fotografiji, elektrici, tekstilu i industriji (Milošević i sur., 2017; Vladislavljević, 2012; Gallo i Carbo, 2010).

### **1.2. Uporaba mikročestica u poljoprivredi**

Uporaba sredstava za zaštitu bilja u poljoprivredi ima značajne posljedice za okoliš, sigurnost hrane, kao i na zdravlje ljudi jer su neki od njih postojani organski zagađivači. Iako su agrokemikalije prisutne u okolišu u malim količinama, neke se prenose na velike udaljenosti zbog globalne cirkulacije, te su prisutne i u područjima u kojima se nikada nisu koristile. Agrokemikalije su legitiman i koristan alat koji može osigurati značajne prednosti za naše društvo. Da bi se povećale ove prednosti, potrebno ih je koristiti na siguran i učinkovit način, a pogrešna primjena može uzrokovati štetu za ljude i okoliš. Kako bi se smanjila ukupna izloženost agrokemikalijama, koje mogu završiti u okolišu, diljem svijeta smanjuje se njihovo korištenje i uvode uravnotežene agrotehničke mjere uz minimalnu uporabu agrokemikalija. To je potaklo razvoj novih generacija agroformulacija, od koji treba posebno istaknuti agroformulacije s mikročesticama.

Korištenje agroformulacija s mikrokapsulama počelo je s inkapsuliranjem pesticida i gnojiva. Inkapsulacija pesticida i gnojiva se koristi za poboljšanje kontroliranog otpuštanja tvari, smanjenje količine pesticida i gnojiva za učinkovito korištenje, smanjenje učestalosti tretmana, a time i potrebnih radova za poljoprivrednika, te za smanjenje štetnosti na ljude i okoliš (Oxley 2015; Steinbrenner i Bratz, 2015). Osim navedenih, mikroinkapsulacija nudi niz drugih prednosti kao što su zaštita kemikalija od degradirajućih reakcija (oksidacija, dehidratacija), omogućuje rukovanje tekućinama kao krutim tvarima, sigurno i praktično rukovanje otrovnim tvarima, smanjenje fitotoksičnosti na usjeve, smanjenje propuštanja u podzemne vode i drugo (Kumar Das i sur., 2011; Bashir i sur., 2016; Knowles, 2008). Brzina oslobađanja aktivnog sastojka može se kontrolirati određivanjem veličine kapsula, debljine polimerne membrane i stupnja umrežavanja ili poroznosti polimera (Knowles, 2008). Međutim, unatoč mogućnosti kontrole svojstava i karakteristika mikrokapsula, primjena istih u poljoprivredi predstavlja izazov zbog činjenice da su uvjeti okoliša tijekom i nakon njihove primjene drugačiji i varijabilni što često dovodi do nerealnih količina ili neravnomjerne pokrivenosti tla (Steinbrenner i Bratz, 2015). Kod uporabe mikrokapsula u poljoprivredi, važno je koristiti biorazgradive i netoksične polimere.

Formulacije mikrokapsula se u poljoprivredi najčešće koriste za primjenu pesticida. Prednost takvog oblika zaštite bilja je u tome što se poboljšava iskorištenje pesticida, a ujedno se djeluje i na smanjenje onečišćenja okoliša (Liu i sur., 2017). Pesticidi se inkapsuliraju kako bi se oslobodili tijekom duljeg vremena, čime bi poljoprivrednici mogli primjenjivati pesticide rjeđe, umjesto da koriste vrlo visoko koncentrirane pripravke, nakon čega slijedi ponovna primjena radi gubitka učinkovitosti zbog ispiranja, isparavanja i degradacije (Vladislavljević, 2012). Primjer vrlo toksičnog karbamat pesticida je aldikarb. Kako bi se smanjio problem toksičnosti ovog pesticida za sisavce, pripremljene su mikrokapsule aldikarba koje koriste karboksimetil celulozu (CMC) kao biorazgradivi materijal međusobno povezan s aluminijskim kloridom. Također značajan zagađivač u okolišu je endosulfan, insekticid u obliku tekućeg koncentrata za emulziju, inkapsuliran u formulaciju mikrokapsula dobivenih povezivanjem biopolimera natrijevog alginata s kalcijevim ionima u gelu (Roy i sur., 2009). Ovaj biopolimer ne utječe na inkapsuliranu aktivnost spoja, a pogodan je za inkapsulaciju jer pokazuje visoku čvrstoću i znatno utječe na mehaničku stabilnost sfera (Ferrándiz i sur., 2017).



### 1.3. Inkapsulacija metodom ionskog geliranja

Ionsko geliranje je metoda koja se temelji na svojstvu polisaharida da geliraju u vodenim otopinama u prisutnosti dvo- i trovalentnih iona. Ova metoda koristi vrlo blage uvjete, zadržava aktivnosti molekula tijekom inkapsulacije, a koristeći reverzibilno fizičko poprečno povezivanje polisaharidnih lanaca elektrostatskom interakcijom. Glavna prednost u odnosu na kemijsko umrežavanje je izbjegavanje korištenja toksičnih reagensa i drugi neželjeni učinci (Usmiati i sur., 2014).

Polisaharidi (alginat, gelan guma, pektin i dr.) se u procesu ionskog geliranja otapaju u vodi ili u slabo kiselom mediju (kitozan), pri čemu se otopina polisaharida istiskuje iglom ili mlaznicom, uz konstantno miješanje, u otopinu koja sadrži, najčešće, katione suprotnog naboja. Ioni suprotnog naboja koji se koriste za ionsko geliranje mogu se podijeliti u dvije glavne skupine:

1. Ioni niske molekulske mase (nastali disocijacijom soli:  $MgCl_2$ ,  $BaCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $CoCl_2$ ,  $CuCl_2$  te pirofosfat, tripolifosfat, tetrapolifosfat, oktapolifosfat, heksametafosfat i  $[Fe(CN)_6]^{-4}/[Fe(CN)_6]^{-3}$ ,
2. Ioni visoke molekulske mase (npr. lauril sulfat, oktil sulfat, cetilstearyl sulfat, heksadecil sulfat).

U ovom radu istraživane su sfere mikroveličina, tj. mikrosfere pripravljene ionskim geliranjem. Otopina polisaharida se dodaje u otopinu gelirajućeg kationa koji se veže na lance polisaharida suprotnog naboja, dolazi do umrežavanja i taloženja okruglih čestica kao npr. kod miješanja natrijevog alginata s kalcijevim kloridom, odnosno kalcijevim ionima. Mikrosfere se nakon postupka odstrane filtriranjem, isperu destiliranom vodom i osuše (Racovitá i sur., 2009; Munin i Edwards-Lévy, 2011).

Mnogi se polimeri mogu upotrijebiti za pripravu mikročestica, a najviše se koriste polimeri prirodnog podrijetla, biopolimeri. Biopolimeri su biorazgradivi, nalaze se u velikim količinama u prirodi, obnovljivi su, nisu toksični i relativno su jeftini. Oni imaju sva svojstva sintetičkih spojeva, ali s većim stupnjem molekulske složenosti koja se postiže samo u prirodnim sustavima. Druga važno svojstvo biopolimera je visok sadržaj funkcionalnih skupina, uključujući hidroksi, amino i karboksilne skupine koje omogućuju modificiranje njihovih svojstava promjenom fizikalno-kemijskih uvjeta sredine (sastav medija, temperatura i pH) (Usmiati i sur., 2014). Polisaharidi, kao

što su kitozan i alginat, su biopolimeri dobro poznati po sposobnosti stvaranja mikročestica ionskim geliranjem. Koriste se pojedinačno ili kao polielektrolitni kompleksi (Fan i sur., 2011). Prednost korištenja kompleksa alginata i kitozana je mogućnost podešavanja strukture i fizičko-kemijskih svojstva mikrokapsula kontrolom stupnja asocijacije funkcionalnih skupina (Lawrie i sur. 2007).

Polisaharidi (alginat, gellan guma, kitozan i pektin) se dobivaju iz poljoprivrednih sirovina ili ljuska rakova (Racovića i sur., 2009). Alginat je natrijeva sol alginske kiseline, dobiven od smeđih morskih algi. Alginat sadrži dvije uronske kiseline,  $\alpha$ -L-guluronske i  $\beta$ -D-manuronske kiseline povezane  $\alpha$ -glikozidnom vezom. Monomeri M i G povezani su 1  $\rightarrow$  4 glikozidnim vezama stvarajući homopolimerne M- ili G-blokove i MG heteropolimerne blokove (Racovića i sur., 2009; Ahirrao i sur., 2013). Alginati s visokim sadržajem guluronske kiseline razvijaju čvršće, poroznije gelove koji su postojaniji dulje razdoblje dok alginati bogati ostacima manuronske kiseline razvijaju mekše, manje porozne gelove koji se s vremenom raspadaju. Poliguluronatne jedinice u molekulama alginata stvaraju keliranu strukturu s metalnim ionima zvanu model „kutija za jaja“ (egg box). Takav spoj između lanaca kinetički je stabilan prema disocijaciji, dok polimanuronatne jedinice pokazuju normalne polielektrolitske karakteristike vezanja kationa. Ta međudjelovanja rezultiraju stvaranjem okruglih mikročestica (Racovića i sur., 2009). Alginatne mikrosfere mogu se dodatno omotati polikationskim polimerom, jer elektrostatska međudjelovanja karboksilnih skupina alginata s polikationskim polimerom dodatno zatvara jezgru, poboljšavajući zadržavanje ili potencijalno oslobađanja aktivne tvari (Fujiwara i sur., 2013).

#### **1.4. *Trichoderma viride* (T. viride)**

Gljive roda *Trichoderma* spominju se od 1920-ih zbog sposobnosti da sudjeluju u razgradnji biljnih ostataka u tlu te da kao biokontrolni agensi djeluju protiv biljnih patogena. *Trichoderma* sojevi provode biokontrolu protiv gljivičnih fitopatogena: neizravno (natječući se za hranjive tvari i prostor, modificirajući uvjete okoline, potičući rast biljaka- biofertilizacija, mehanizme obrane te antibiozu) ili izravno (mehanizmima poput mikoparazitizma). Ovi neizravni i izravni mehanizmi ovise o sojevima *Trichoderme*, antagoniziranoj gljivi, biljci, uvjetima okoline, dostupnosti

hranjivih tvari, pH, temperaturi i koncentraciji željeza. (Benítez i sur., 2004; Topolovec-Pintarić i sur., 2013; Harman, 2006). Proizvodnja specifičnih spojeva i metabolita poput hidrolitičkih enzima, čimbenika rasta biljaka, antibiotika, siderofora, ugljikovih i dušikovih permeaza omogućuje aktivaciju svakog mehanizma. Najčešći biološki kontrolni agensi roda *Trichoderma* su sojevi *T. viride*, *T. virens* i *T. harzianum*. Oni kontroliraju askomicete, deuteromicete i bazidiomicete koje se prenose tлом, ali i patogene koji se prenose zrakom. Svojstva kao što su mogućnosti preživljavanja u vrlo nepovoljnim uvjetima, visok reproduktivan kapacitet, sposobnosti modificiranja okoline (zakiseljavanje), učinkovitosti u korištenju hranjivih tvari, snažna agresivnost protiv fitopatogenih gljiva i učinkovitosti u promicanju rasta biljaka i obrane mehanizma učinile su *Trichoderma* važnim biološki kontrolnim agensom (Benítez i sur., 2004).

Inokulacijom u tlo *Trichoderma* sojevi brzo rastu jer su prirodno otporni na mnoge toksične spojeve, uključujući herbicide, fungicide i pesticide poput DDT i fenolnih spojeva, a pretpostavlja se da je otpornost povezana s prisutnošću ABC transportnih sustava (Benítez i sur., 2004). Ulaskom u tlo *Trichoderme* koloniziraju površinu korijena (čak prodiru u epidermu i nekoliko staničnih slojeva ispod nje) uspostavljajući pseudomikorizini odnos s biljkom domaćinom (Benítez i sur., 2004; Harman, 2006). Tada počinju s proizvodnjom metaboličkih spojeva kao što su alometikin, trikolin, peptabol, antibiotici, 6-pentil- $\alpha$ -piron, viridin, gliovirina, glisoprenin i drugi koji uzrokuju povećanu otpornosti biljaka. Biljke reagiraju protiv napada gljiva sintetiziranjem i nakupljanjem flavonoida i terpenoida, fenolnih derivata, fitoaleksina, aglikona i drugih antimikrobnih spojeva. Metabolički proizvodi različitih sojeva *Trichoderma* nisu isti za različite biljne vrste (Benítez i sur., 2004; Topolovec-Pintarić i sur., 2013).

Jedan od glavnih čimbenika koji utječe na aktivnost *Trichoderma* je pH okoliša. Ona je učinkovitija u kiselijim nego alkalnim tlima što može regulirati sustavom za reagiranje osjetljivim na pH pod nazivom PacC. To je transkripcijski aktivator genskih receptora koji reagira na alkalne i kisele uvjete. Radi boljeg razvoja u kiselom mediju većina *Trichoderma* sojeva zakiseli okolinu izlučivanjem organskih kiselina, kao što su glukonska, limunska ili fumarna kiselina. One omogućuju rastvaranje fosfata, mikronutrijenata i mineralnih kationa (željezo, mangan i magnezij). Takva mogućnost modifikacije pH i prilagodbe vlastitog metabolizma određuje sposobnost roda *Trichoderma* da uspješno kolonizira ciljanog domaćina i poveća njegovu otpornost na fitopatogene zaraze (Benítez i sur., 2004).

*Trichoderma viride* Pers. jedna je od vrsta roda *Trichoderma*, a naziva se još i *T. lignorum* (Tode) Harz. Ima brzo rastuće kolonije (5-9 cm) i konidiofore koje obično nisu jako razgranate te mogu biti pojedinačne i uparene. Nadalje, ima fialidele koje su također pojedinačne ili uparene, veličine  $8-14 \times 2.4-3.0 \mu\text{m}$  i okrugle do elipsoidne konidije, obično zelene, plavkaste do tamnozelene, veličine  $4,0-4,8 \times 3,5-4,0 \mu\text{m}$  (Gams i Bissett, 2002).

### **1.5. Kalcijev ion – $\text{Ca}^{2+}$**

Kalcij je netoksičan mineralni element koji sudjeluje u izgradnji različitih kompleksnih spojeva. Ima mnogobrojne uloge u tlu, biljkama i mikroflori. Kalcij utječe na kemijska i fiziološka svojstva tla, održava stabilnost i propustljivost stanične membrane, regulira transport iona, kontrolira ponašanje aktivnosti enzima stanične stijenke, nakuplja se u kloroplastima, vakuolama, mitohondrijima, kromosomima, jezgri, staničnim stijenkama te je direktno uključen kao sekundaran glasnik u stanici (Vukadinović i Lončarić, 1997; Hadi i Karimi, 2012). Kao sekundaran glasnik brojnih biljnih signalnih putova prenosi širok raspon okolišnih i razvojnih podražaja odgovarajućim fiziološkim odgovorima (Lecourieux i sur., 2006). U tlu, kalcij nalazimo u obliku kalcita ( $\text{CaCO}_3$ ), dolomita ( $\text{CaCO}_3 \cdot \text{MgCO}_3$ ), gipsa ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), različitih kalcijevih fosfata itd.. Kalcij utječe na pH tla čime djeluje i na raspoloživost nekih drugih elemenata kao što su B, Fe, Mn, Zn i Cu. Važan je i za održavanje strukture tla povećavajući njegovu biogenost, odnosno djelujući povoljno na procese amonifikacije, nitrifikacije, biološke fiksacije dušika itd. (Vukadinović i Lončarić, 1997).

Biljke metaboliziraju kalcij u ionskom obliku  $\text{Ca}^{2+}$  čije je usvajanje sporije od ostalih elemenata posebice ako je veće usvajanje nitrata, sulfata i klorida. Kreće se u biljkama putem ksilema dok je kretanje floemom vrlo slabo ili ga uopće nema (Sonneveld i Voogt, 2009). Može proći kroz korijen, bilo kroz ćeliju citoplazme povezanu s plazmodezmom (simplast) ili kroz razmake između stanica (apoplast). Kalcijevi ioni ulaze u biljne stanice kroz  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabilne ionske kanale u njihovim plazmatskim membranama (White i Broadley, 2003). Bolju mobilnost  $\text{Ca}^{2+}$  omogućit će gnojidba sa  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  i folijarna primjena Ca-oksalatnog i Ca-kelatnog oblika. Kalcij je faktor sinteze oksaloctene kiseline pa tako utječe na opskrbu biljaka elementima K, Na, N, P i B. Raspodjela  $\text{Ca}^{2+}$  između biljnih organa, pa čak i unutar organa, pokazuje velike varijacije stoga ga

ima manje u korijenu u odnosu na listove te ga je isto tako manje u mlađem nego u starijem lišću. Kalcij sudjeluje u neutralizaciji suviše kiselosti staničnog sadržaja kao Ca-fosfatni pufer. Značajan je za djelovanje fitohormona, primjerice  $\beta$ -indoloctene kiseline, kojom utječe na rast biljaka i aktivnost apikalnih meristema. Uz povećanje otpornosti na povećan sadržaj soli u tlu, kalcij ima i zaštitnu ulogu od toksičnog suviška mikroelemenata (Vukadinović i Lončarić, 1997; Sonneveld i Voogt, 2009). Koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  u biljnim organima je drugačije raspoređena: razmjerna je u listovima i nerazmjerna u plodovima. Takva različita koncentracija javlja se zbog činjenice da plodovi primaju vodu preko floema, a kako je voda relativno siromašna s  $\text{Ca}^{2+}$  do plodova ne dolazi dovoljna količina tog iona. Isto tako, površina plodova u odnosu na ukupnu masu je uvijek manja u usporedbi s lišćem, pa je i transpiracija plodova relativno mala, a kada je ona smanjena, sukladno tome, smanjuje se i koncentracija kalcijevih iona u plodovima. Međutim, kada se smanji transpiracija u listovima, poboljšava se transport  $\text{Ca}^{2+}$  prema plodovima biljaka (Sonneveld i Voogt, 2009). Vlaga zraka je još jedan čimbenik koji utječe na transport kalcija. Ona je, naravno, u korelaciji s temperaturom jer se povećanjem temperature povećava i vlaga što dovodi do veće transpiracije i apsorpcije  $\text{Ca}^{2+}$  u listovima. Hlađenjem, odnosno smanjenjem temperature koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  u listovima se smanjuje, a u plodovima povećava (Sonneveld i Voogt, 2009; Combrink, 2013). Kako je kalcijev ion često povezan s otpornosti na bolesti, njegovo povećanje u organima omogućuje veću prirodnu otpornosti te ima važnu ulogu u stvaranju proteina i transportu ugljikohidrata u biljkama (Conway i sur., 1994; Bolat i Kara, 2017).

Njegov nedostatak izaziva pojačanu aktivnost enzima pektinaze što uzrokuje autolizu staničnih stijenki parenhimskih stanica. Javljaju se tamnosmeđe zone s odrvenjelim i začepljenim provodnim sustavima. Takva boja potječe od melaninskih tvari nastalih zbog oksidacije slobodnih fenola u kinone (Vukadinović i Lončarić., 1997). Jedan od najpoznatijih simptoma nedostatka  $\text{Ca}^{2+}$  javlja se u lisnatom povrću u obliku glave, kao što je salata koju okružuje mlado lišće koje je tako isključeno iz transpiracije. Takvi zatvoreni listovi ne transpiriraju pa se samim time i slabo opskrbljuju s  $\text{Ca}^{2+}$  čija koncentracija ovisi o transpiraciji. Simptomi se nazivaju “rubna palež lista” zelene salate. Kineski kupus i celer su također kulture s poznatim simptomima nedostatka  $\text{Ca}^{2+}$  koji se karakteriziraju kao rubna palež kod kupusa ili “crno srce korijena” kod celera. Koncentracije kalcijevih iona u listovima takvih usjeva su karakterizirane jakim padom od vanjskog prema unutarnjem lišću i od ruba prema sredini (Sonneveld i Voogt, 2009). Nedostatak kalcijevih iona u biljkama usporava rast meristemskog tkiva. Rast se zaustavlja na pupoljcima i na

vrhovima korijena što dovodi do zaustavljanja rasta cijele biljke (Bolat i sur., 2017). Prisutnosti visokih razina drugih kationa može ograničiti usvajanje  $\text{Ca}^{2+}$ . Izuzetno snažan supresor usvajanja  $\text{Ca}^{2+}$  je  $\text{NH}_4^+$  ion (Combrink, 2013). Nedostatak  $\text{Ca}^{2+}$  može se pojaviti i u stabljici cvjetnih usjeva pa one postaju "staklaste", gube snagu te se savijaju (Sonneveld i Voogt, 2009).

Problemi s previsokom koncentracijom  $\text{Ca}^{2+}$  u biljnim tkivima mogu se naći samo u plodovima. Tako se kod rajčice javljaju "zlatne mrlje", a kod slatke paprike male zelene mrlje s promjerom nekoliko mm u boji ploda. Oba poremećaja povezana su s visokim koncentracijama  $\text{Ca}^{2+}$  u plodu i praćeni su kristalima soli u stanicama ploda. Takvi se kristali sastoje od smjese mono- i dihidratnog oblika kalcijevog oksalata ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  i  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) pa su stoga mrlje na plodu smatrane simptomima viška  $\text{Ca}^{2+}$  (Sonneveld i Voogt, 2009). Previše kalcijevih iona može dovesti do problema jer se učvršćivanjem staničnih zidova može ograničiti sposobnost plodova da se prošire, te tako dolazi do pucanja plodova (Combrink, 2013).

Pokazalo se da kalcijevi ioni sprečavaju štetne učinke saliniteta na biljke. Različiti stresni uvjeti, uključivši sušu, slanost, toplinski šok i hladni šok izazivaju nakupine  $\text{Ca}^{2+}$  u citosolu. Uloga  $\text{Ca}^{2+}$  kao drugog glasnika u mnogim biološkim sustavima, ukazuje na to da se biljke mogu prilagoditi slanim sredinama aktivirajući signalni transdukcijski sustav koji uključuje  $\text{Ca}^{2+}$ . Višak  $\text{NaCl}$  u slanim tlima može izravno utjecati na unos hranjivih tvari npr. smanjenjem apsorpcije kalcijevih iona i nitratnih iona, natrijevim i kloridnim ionima. Salinitet inhibira rast biljaka toksičnim ionima (najčešće  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$ ), osmotskim stresom (koji rezultira „fiziološkom sušom“) i nutritivnom neravnotežom. Kalcijev ion je posebno važan kod biljaka izloženim slanom tlu zbog svoje uloge u smanjenju apsorpcije  $\text{Na}^+$  i povećanja unosa  $\text{K}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$ , što rezultira rastom biljke. Visoke koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  mogu smanjiti propusnost plazmatske membrane na  $\text{Na}^+$  i promijeniti svojstva stanične stijenke koja dovode do smanjenja  $\text{Na}^+$  (Hadi i Karimi, 2012). Razine EC (električne vodljivosti) utječu obrnuto na koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  u različitim biljnim organima. (Sonneveld i Voogt, 2009).

### **1.6. Simultana inkapsulacija spora *T. viride* i kalcija**

Trendovi primjene inkapsulacije u poljoprivredi su usmjereni na pripravu novih agroformulacija, odnosno na pripravu formulacija mikročestica s dva i više aktivna sastojaka. Unatoč nizu metoda

za inkapsulaciju aktivnih sastojaka, malo je podataka u literaturi o simultanoj inkapsulaciji i isporuci bioloških i kemijskih sastojaka (Vinceković i sur., 2016, 2017). Glavni problemi su: (i) odabir mikročestice u koju se mogu inkapsulirati biološki i kemijski aktivan sastojak i (ii) prisutnost aktivnih sastojaka u istom odjeljku ne bi smjela umanjiti njihove aktivnosti. Ovisno o fizičko-kemijskim karakteristikama bioaktivnih sastojaka potrebno je odabrati najbolje metode pripreme mikročestica kako bi se postigla efikasna simultana inkapsulacija. Međutim, kontrola molekula na toj razini zahtijeva sveobuhvatno razumijevanje strukture i dinamičkih svojstava tih sustava u različitim uvjetima. Kontrolirano otpuštanje i uspješna isporuka je poželjna i ostvarljiva karakteristika svih sustava za isporuku aktivnih sastojaka, međutim njihova priprava zahtijeva optimizaciju svih parametara tijekom proizvodnje.

Zbog pogodnosti u zaštiti bilja i prihrani, kao i njihovu kompatibilnost, *T. viride* spore i kalcijevi ioni su prikladan par za simultanu inkapsulaciju u mikrosfere alginata. Značaj gljive *T. viride* očituje se u svojstvima, kao što su mogućnosti preživljavanja u vrlo nepovoljnim uvjetima, sposobnosti zakiseljavanja okoline koju nastanjuje, visok reproduktivni kapacitet, snažna agresivnost protiv fitopatogenih gljiva, učinkovitosti u korištenju hranjivih tvari i poticanju rasta biljaka (Benítez i sur., 2004). Sve češća potreba za njenom primjenom u uzgoju bilja javlja se radi sposobnosti da mikoparazitira patogene gljive, stimulira proizvodnju fitohormona, razgrađuje biljne ostatke u tlu itd. (Benítez i sur., 2004; Vinceković i sur., 2016). Kalcijev ion je esencijalno biljno hranjivo koje je biljkama važno radi zadržavanja strukture i funkcionalnosti membrana, stabiliziranja strukture stanične stijenke, reguliranja ionskog transporta, kontroliranja ponašanja ionske te aktivnosti enzima stanične stijenke (Hadi i Karimi, 2012; White i Broadley, 2003). Čimbenici koji potiču njegov nedostatak mogu biti klimatski uvjeti (tlak vodene pare, temperatura zraka i radijacija), uvjeti u zoni korijena (osmotski potencijal, zaslanjenost i koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  u odnosu na druge katione), osjetljivost sorte (Sonneveld i Voogt, 2009).

Inkapsuliranje bioaktivnih tvari unutar gela kalcijevog alginata nudi prednosti kao što su: biokompatibilnost, jednostavnost izrade, sigurnost za okoliš i niski troškovi (Sarrocco i sur., 2004; Blandino i sur., 1999). Međutim, ovaj postupak ima i određene nedostatke kao što su niska stabilnost i visoka poroznost te smanjena viskoznost i čvrstoća kalcijevog gela uslijed toplinske obrade (Blandino i sur., 2000; Sarrocco i sur., 2004). Izuzev toga, inkapsulacija se sve češće primjenjuje u poljoprivredi radi mogućnosti kontroliranog i usporenog otpuštanja aktivnog

sredstva, produljenog učinka gnojidbe ali i jednostavnosti primjene, jer bi jedna primjena bila dovoljna za zadovoljavanje biljnih potreba tijekom vegetacije. To dovodi i do pozitivnog ekološkog aspekta jer će se smanjenim brojem mehanizacijskih prolaza smanjiti zbijanje tla što će korijenu omogućiti bolje uvjete za rast i razvoj (Vinceković i sur., 2016).

Alginat je najčešće korišten biopolimer za pripremu mikrosfera zato što se inkapsulacija provodi u vrlo blagim uvjetima. Sastoji se od ugvjivodičnih lanaca koji imaju sposobnost stvaranja gela dodatkom dvovalentnih ili polivalentnih kationa, od kojih je najpoznatiji  $\text{Ca}^{2+}$  ion. Kationi povezuju lance alginata u trodimenzionalnu mrežu gela. Geliranje kalcijevog alginata je trenutni i nepovratan proces koji ovisi o monomernom sastavu alginata, strukturi blokova, molekularnoj veličini i koncentraciji alginata te kalcijevih iona. (Blandino i sur., 1999). Brzina geliranja je važan čimbenik u kontroli homogenosti i čvrstoće mikrosfere. Pri niskim koncentracijama gelirajućeg kationa nastaje homogena struktura gela s boljim mehaničkim svojstvima. Suprotno tome, povećanjem koncentracije kationa povećava se brzina geliranja, struktura gela je postaje nehomogena i difuzija je usporena.

Nedavna istraživanja su pokazala da koncentracija gelirajućeg kationa, a naročito prisutnost kitozanskog omotača utječu na fizikalno-kemijska svojstva te kinetiku i mehanizam oslobađanja spora *T. viride* iz mikrokapsula (Vinceković i sur., 2016, 2017). Pri tome se oslobađaju i kationi, a njihovo oslobađanje ovisi o koncentraciji iona, ali i o vrsti soli u otopini ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$  ili  $\text{MgCl}_2$ ) pa je iz tog razloga oslobađanje kationa slabo u čistoj vodi, a poboljšano u otopinama soli (Vreeker i sur., 2008). Što se tiče inkapsulacije spora *T. viride* i kalcija, u istraživanju Topolovec-Pintarić i sur. (2017), utvrđeno je kako gljiva omogućuje biljci lakšu dostupnost tom ionu, a time i brži rast.



## **2. HIPOTEZA I OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA**

### **2.1. Hipoteza**

Pretpostavka ovog istraživanja je da bolje razumijevanje molekulskih međudjelovanja u složenim biopolimernim mikrosferama s biološkim i kemijskim sastojkom temelj razvoju novih agroformulacija sa specifično usklađenim svojstvima za ekološku poljoprivrednu proizvodnju.

### **2.2. Opći i specifični ciljevi rada**

Cilj ovog istraživanja je pripremiti mikrosfere alginata istodobno ispunjenih s kemijskim ( $\text{Ca}^{2+}$ ) i biološki aktivnim sastojkom, biljnim promotorom rasta (gljivom iz roda *T. viride*), te provesti fizikalno-kemijsku karakterizaciju i odrediti mehanizme otpuštanja bioaktivnih tvari u svrhu jednostavne i sigurne primjene u ishrani i zaštiti bilja.

Specifični ciljevi rada su:

1. Priprava novih agroformulacija, mikrosfera kalcijevog alginata s inkapsuliranom *T. viride* postupkom ionskog geliranja.
2. Određivanje učinkovitosti i kapaciteta inkapsulacije kalcijevih iona ( $\text{Ca}^{2+}$ ) i spora *T. viride* u mikrosfere te bubrenja.
3. Istraživanje morfoloških karakteristika pripremljenih mikrosfera.
4. Istraživanje kinetike otpuštanja spora *T. viride* i kalcijevih iona ( $\text{Ca}^{2+}$ ) iz mikrosfera.
5. Određivanje mehanizama otpuštanja spora *T. viride* i kalcijevih iona ( $\text{Ca}^{2+}$ ) iz mikrosfera.

## **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. Materijali**

Natrijev alginat niske viskoznosti (CAS broj: 9005-38-3) kupljen je od tvrtke Sigma Aldrich (USA). Kalcij klorid bio je od tvrtke Kemika (Hrvatska), a fluorescentne boje, eozin i Rhodamin 123 od Fluka (Buchs, Švicarska). Sve ostale kemikalije bile su analitičke čistoće i korištene su bez daljnjeg pročišćavanja.

U pokusima je korišten autohtoni izolat *T. viride* (skraćena STP) koji potječe iz parazitirane sklerocije *Sclerotinia sclerotiorum* (Topolovec-Pintarić i sur., 2013). STP je uzgojen 10 dana u krumpirovom dekstroznom bujonu (PDB, Biolife, Italija) pod konstantnom aeracijom na 22° C.

### **3.2. Uzgoj *Trichoderme viride***

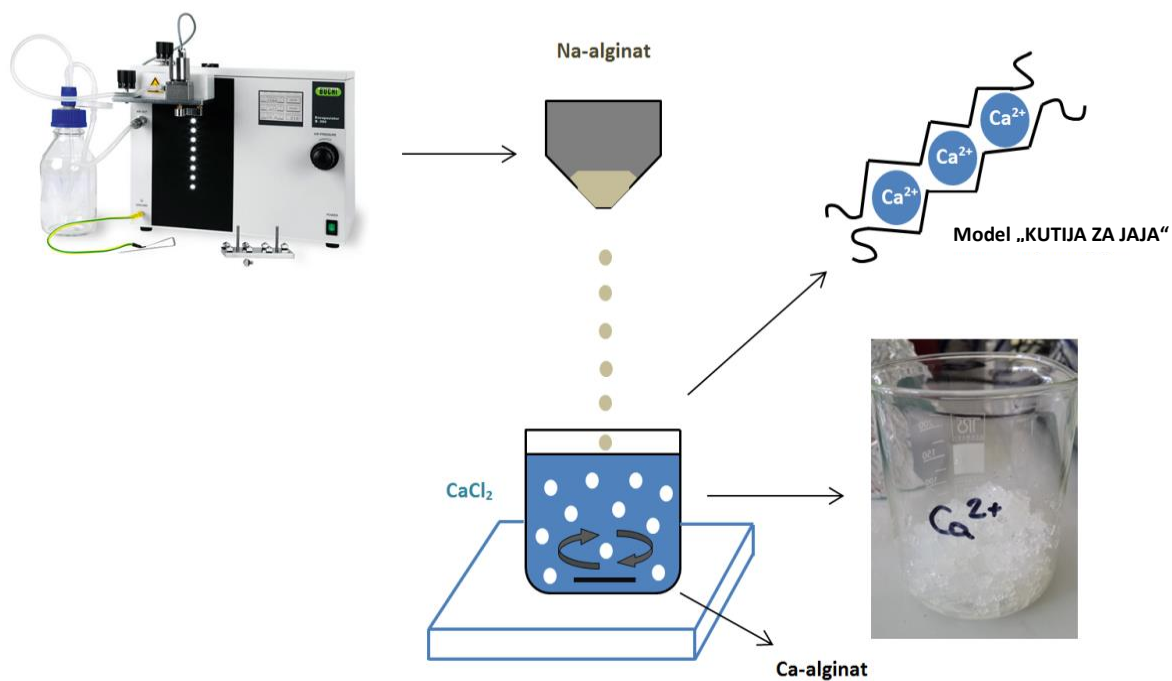
U pokusu je korišten soj *T. viride* STP 8 koji potječe iz sklerocije *Sclerotinia sclerotiorum*. Kultura izolata uzgojena je u Petrijevim zdjelicama promjera 10 cm koje su obložene s 20 ml krumpirovog dekstroznog agara (PDA, Biolife, Italija). Zdjelice su potom inkubirane u inkubatoru na 25° C tijekom 7 dana do pojave konidija. Nakon inkubacije špatulom se s Petrijevih zdjelica struže biomasa hifa i konidija, bez agara, te stavlja u otopinu natrijevog alginata. Zatim se sve izmiješa štapnim mikserom i profiltrira kroz dvoslojni muslin.

### **3.3. Priprava mikrosfera**

Postupkom ionskog geliranja pripravljene su dvije vrste mikrosfera, bez spora *T. viride* (ALG/Ca), te s njima (ALG/(Ca+Tv)). Priprava mikrosfera obavlja se u vrlo blagim uvjetima pri sobnoj temperaturi. Izrada mikrosfera ALG/Ca ili ALG/(Ca+Tv) počinje dokapavanjem 100 ml otopine natrijevog alginata inkapsulatorom Büchi - Encapsukator B-390 (BÜCHI Labortechnik AG, Švicarska) u 100 ml otopine CaCl<sub>2</sub> (Slika 1). Koncentracija natrijevog alginata bila je konstantna (1,5% w/v), dok su koncentracije otopine kalcijevog klorida varirale od 0,5 do 2,0 mol dm<sup>-3</sup>. Otopina natrijevog alginata ili smjesa natrijevog alginata i *T. viride* spora propušta se kroz

### 3. MATERIJALI I METODE

mlaznicu veličine 300  $\mu\text{m}$  pri frekvenciji vibracija od 800 Hz i tlaku od 120 mbar (Encapsulator Büchi-B390, BÜCHI Labortechnik AG, Švicarska). Mikrosfere koje su gotovo trenutno nastale sadrže *T. viride* u mreži kalcijevog alginata i miješaju na magnetnoj miješalici (IKA topolino, USA) oko 30 min kako bi dodatno očvrsnule. Potom se filtriraju kroz jednoslojni muslin i ispiru 3x s destiliranom vodom kako bi se isprao suvišan  $\text{CaCl}_2$ .



**Slika 1.** Shematski prikaz pripreme mikrosfera kalcijevog alginata

#### **3.4. Metode**

##### **3.4.1. Utjecaj koncentracije kalcija na bioaktivnost *T. viride***

Da bi se potvrdila vegetativna sposobnost rasta i sporulacija *T. viride* u prisutnosti kationa kalcija, provedena su dva seta eksperimenata. U prvom su suspenzije *T. viride* spora ostavljene u otopini s različitim koncentracijama kalcijevog klorida (10 dana) ili inokulirane na PDA supstratu. U drugom setu je praćena promjena količine inkapsuliranih spora u mikrosferama u različitim vremenskim razmacima (1, 10 i 20 dana).

##### **3.4.2. Utjecaj koncentracije kalcija na vegetativan rast i sporulaciju**

Izolat *T. viride* sačuvan je na PDA u Petrijevim zdjelicama (promjera 10 cm) i natopljen s 15 ml kalcijevog klorida (od 0,5 do 2,0 mol dm<sup>-3</sup>). Suspenzije su prebaćene u plastične epruvete (15 ml) i zatvorene. Alikvoti svake suspenzije (300 µl) su inokulirani na PDA supstrat (Petrijeve zdjelice promjera 10 cm), zatvoreni i kultivirani u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi tijekom 10 dana. Broj spora u suspenzijama određen je s hemocitometrom pomoću Neubauerove komorice za brojanje (Hirschmann EM Techcolor, Njemačka). Vizualno se promatrao izgled *T. viride* micelija oko mikrosfera u Petrijevim zdjelicama. Kontrolni uzorci su pripremljeni s fiziološkom otopinom.

##### **3.4.3. Utjecaj kationa kalcija na sporulaciju *T. viride* u mikrosferama**

Sporulacijska sposobnost inkapsulirane *T. viride* ispitana je mjerenjem promjena broja spora po 1 g mikrosfera (NS/g) na svježe pripremljenim mikrosferama te 1, 10 i 20 dana nakon punjenja. Uzorci za mjerenja su pripremljeni otapanjem 10 g mikrosfera u 100 ml NaHCO<sub>3</sub> (0.2 mol dm<sup>-3</sup>) i Na<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O (0.06 mol dm<sup>-3</sup>) i miješani na magnetskoj miješalici (IKA topolino, USA) 30 minuta na sobnoj temperaturi. Tijekom cijelog ispitivanja bili su osigurani sterilni uvjeti. Pet mililitara uzorka filtrira se kroz steriliziranu tkaninu muslina (Trinci, 1974). Broj spora određen je spektrofotometrijski metodom Waghunde i sur. (Waghunde i sur., 2010). Apsorbancija je mjerena

na 550 nm korištenjem UV-VIS spektrofotometra (Shimadzu, UV-1700). Osnovna otopina korištena za kalibracijsku krivulju je razrijeđena steriliziranom destiliranom vodom. Broj spora u osnovnoj otopini određen je s hemocitometrom pomoću Neubauerove komorice za brojenje (Hirschmann EM Techcolor, Njemačka).

#### **3.4.4. Električni naboj i veličina *T. viride* spora suspendiranih u vodi**

Električni naboj i zeta potencijal ( $\zeta$ /mV) *T. viride* spora suspendiranih u vodi i otopini kalcijevog klorida (variraju od 0,005 do 2,0 mol dm<sup>-3</sup>) izmjerene su pomoću Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). Zetasizer Nano ZS pomoću Henryove jednadžbe ( $u = (2\varepsilon\zeta f(Ka))/3\eta$ ) sa  $f(Ka) = 1,5$  (Smoluchowski aproksimacija) mjeri elektroforetsku pokretljivost ( $u$ ) i izračuna zeta potencijal ( $\zeta$ ) agregata. Zeta potencijal je uzet kao srednja vrijednost od tri do šest mjerenja.

DLS mjerenja provedena su pod kutem raspršivanja od 173°. Funkcija korelacije intenziteta analizirana je korištenjem softvera CONTIN za kvantificiranje raspodjele agregata (Provencher, 1982). Einstein-Stokesovom jednadžbom procijenjen je hidrodinamički promjer ( $d$ ) uz pretpostavku da je sferičan agregat ( $d = k_B T / 6\pi\eta D$ , gdje  $k_B$  je Boltzmannova konstanta,  $T$  je temperatura,  $\eta$  je viskoznost otapala i  $D$  je vidljivi difuzijski koeficijent translacije). Distribucije veličine su prikazane kao raspodjela volumena budući da u polidisperznoj suspenziji distribucija veličine intenziteta koju daje DLS precjenjuju udio većih čestica. U vrlo polidisperznom uzorku i/ili kod jakih međudjelovanja čestica, značenje prosječne veličine čestica nije izravno (Viseau i sur., 2001). Zbog toga smo primijenili podatke volumne raspodjele samo kao sredstvo potvrđivanja prisutnosti agregata, kako bismo odredili relativne distribucije veličine čestica u otopinama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od najmanje tri do šest mjerenja.

#### **3.4.5. Fourierova transformacija infracrvene spektroskopije**

Fourierovom transformacijom infracrvene spektroskopije (FTIR) zabilježeni su spektri FTIR instrumentom - Cary 660 FTIR (MIR sustav) (Agilent Technologies, USA). Uzorci su pomiješani

s kalijevim bromidom da se dobiju gel pelete. Spektralno skeniranje provedeno je u rasponu od 500-4000  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **3.4.6. Mikroskopska promatranja**

Prosječan promjer i oblici mikrosfera promatrani su stereomikroskopom Leica MZ16a (Leica Microsystems Ltd., Švicarska) pomoću Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, verzija E\_LCmicro\_09Okt2009. Promjeri su mjereni na oko 100 mikrosfera.

Površine osušenih *T. viride* spora i mikrosfera istražene su elektronskim pretražnim mikroskopom (SEM, FE-SEM, model JSM-7000F, Jeol Ltd., Japan). Uzorci su postavljeni na visoko vodljivu grafitnu traku. Softver ImageJ koristio se za određivanje veličine *T. viride* spora i spora na površini mikrosfera.

Suspenzija spora *T. viride* i mikrosfere ispitivani su pomoću konfokalnog laserskog pretražnog mikroskopa (CLSM, TCP SP2, Leica Lasertechnik, Njemačka). Mikroskop je radio u prolaznom i fluorescentnom svjetlu (80 kV). Mikrosfere su obojene fluorescentnom bojom eozinom (0,01% (w/v)), dok su spore *T. viride* označene Rhodaminom 123 (otopina 0,05% (w/v)), ostavljene 30 minuta, isprane i korištene za pripremu mikrosfera ALG / (Ca + Tv). Svi uzorci za mikroskopsko promatranje pripremljeni su pri sobnoj temperaturi.

#### **3.4.7. Metode fizikalno-kemijske karakterizacije agroformulacija mikrosfera**

##### **3.4.7.1. Učinkovitost inkapsulacije**

Učinkovitost inkapsuliranja (LE) izračunata je iz početne koncentracije kalcijevih iona ( $c_{tot}$ ) i sadržaja kalcijevih iona u suhim mikrosferama ( $c_{load}$ ) metodom Xue i sur. (2004). Učinkovitost inkapsulacije izražena je kao postotak ukupnog kalcija ( $c_{tot}$ ) i izračunat je jednadžbom:

$$LE = (c_{load}/c_{tot}) \times 100$$

gdje je  $c_{load} = c_{tot} - c_f$ , a  $c_f$  je koncentracija kalcijevih iona u filtratu.

Koncentracija iona kalcija je određena u filtratu nakon formiranja mikrosfera. Pipetom se odmjeri 10 µl otopine, prebaci u epruvete te na to doda 990 µl destilirane vode. Dobivenu otopinu je potrebno vorteksirati te otpipetirati 2,5 ml i dodati 50 µl arsenazo otopine (0,001 mol dm<sup>-3</sup>). Ponovno se otopina vorteksira i ostavi u mraku 15 minuta nakon čega slijedi očitavanje vrijednosti na spektrofotometru pri  $\lambda = 650$  nm.

Učinkovitost inkapsulacije spora *T. viride* u mikrosfere pripravljene s različitim koncentracijama kalcijevih iona određena je istim postupkom. Kako u filtratu nakon pripreve mikrosfera nije bilo prisutnih spora *T. viride*, postignuta je gotovo 100%-tna učinkovitost inkapsulacije spora.

Koncentracija *T. viride* spora izražena kao broj spora po 1 g suhe mikrosfera (NS/g) na  $\lambda = 550$  nm pomoću spektrofotometra (Shimadzu, UV-1700 ).

#### **3.4.7.2. Kapacitet inkapsulacije**

Vlažne mikrosfere ispunjene bioaktivnim agensom sušene su na zraku pri sobnoj temperaturi tijekom nekoliko dana sve dok tekućina nije isparila. Sadržaj kalcija određen je otapanjem 0,5 g mikrosfera u 25 ml smjese od 16,80 g (0,2 mol dm<sup>-3</sup>) NaHCO<sub>3</sub> i 17,65 g (0,06 mol dm<sup>-3</sup>) Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O pri pH 8. Smjesa pufera i mikrosfera stavljena je na magnetnu miješalicu (IKA topolino) na 400 rpm, dok se sve mikrosfere u potpunosti nisu otopile. Dobivena otopina je filtrirana kroz dvostruki muslin, a koncentracija kalcijevih iona u filtratu je određena UV-VIS spektrofotometrom (Shimadzu, UV-1700, Japan). Kapacitet inkapsulacije (LC) izražen je kao količina Ca<sup>2+</sup> u mmol dm<sup>-3</sup> za 1 g suhih mikrosfera i izračunat jednadžbom:

$$LC_{Ca} = (c_{Ca} \times V/w_c)$$

gdje je  $c_{Ca}$  koncentracija kalcijevih iona u uzorku,  $V$  je volumen uzorka, a  $w_c$  je težina mikrosfera.

Sadržaj *T. viride* spora određen je otapanjem 0,5 g mikrokapsula u 25 ml smjese 16,80 g (0,2 mol dm<sup>-3</sup>) NaHCO<sub>3</sub> i 17,65 g (0,06 mol dm<sup>-3</sup>) Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O. Kapacitet ispune *T. viride* spora (LC<sub>Tv</sub>) izražen kao broj spora po 1 g suhih mikrosfera (NS/g) i izračunat je jednadžbom:

$$LC_{Tv} = (c_{NS} \times V/w_c)$$

gdje je  $c_{NS}$  koncentracija *T. viride* spora u uzorku,  $V$  je volumen uzorka, a  $w_c$  je težina mikrosfera. Mjerenja su ponovljena tri puta.

#### **3.4.7.3. Stupanj bubrenja**

Bubrenje mikrosfera ovisi, između ostalog, o svojstvu sredstva za otapanje stoga, kako bi se izbjegao utjecaj elektrolita iz puferskih otopina stupanj bubrenja ( $S_w$ ) određen je za mikrosfere dispergirane u deioniziranoj vodi. Izvagano je 10 mg mikrosfera u epruvete i potom je dodano 10 ml destilirane vode. Mikrosfere su zatim ostavljene da bubre na sobnoj temperaturi tijekom tri sata da se postigne ravnoteža. Težina vlažnih nabubrenih mikrosfera određena je vaganjem nakon upijanja vlage s površine mikrosfera pomoću filter papira.  $S_w$  je izračunat pomoću jednadžbe:

$$S_w \% = \frac{w_t - w_0}{w_0}$$

gdje je  $w_t$  težina nabubrenih mikrosfera, a  $w_0$  je težina suhih. Sva su mjerenja ponavljana tri puta, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost s odgovarajućom standardnom devijacijom.

#### **3.4.8. *In vitro* otpuštanje bioaktivnih tvari iz mikrosfera**

Istraživanja *in vitro* otpuštanja kalcija iz ALG/Ca i ALG/(Ca + Tv) ispitivana su dispergiranjem mikrosfera u deioniziranoj vodi i ostavljanjem da stoje tijekom pokusa, bez miješanja, na sobnoj temperaturi. Uzorci su pripremljeni dispergiranjem mikrosfera (30 g) u 100 ml deionizirane vode. U odgovarajućim vremenskim razmacima, disperzija je miješana 60 sekundi, alikvoti su uzeti i koncentracija je određena spektrofotometrijski pri  $\lambda = 650$  nm uz prethodno dodavanje arsenazo otopine kao što je opisano u postupku 3.4.7.1.

Istraživanja oslobađanja spora *T. viride* iz mikrosfera ALG/(Ca+Tv) provedena su na sobnoj temperaturi. Mikrosfere (30 g) ispunjene kalcijem i sporama *T. viride* dispergirane su u 100 ml deionizirane vode i ostavljene da stoje bez miješanja tijekom eksperimenata. U odgovarajućim intervalima disperzija je miješana 60 sekundi, alikvoti su uzeti i broj spora određen



spektrofotometrijski pri  $\lambda = 550$  nm metodom Waghunde i sur. (2010). Rezultati su prikazani kao frakcija otpuštenih *T. viride* spora ili kalcija pomoću jednadžbe:

$$f = \frac{R_t}{R_{tot}}$$

gdje  $f$  predstavlja frakciju *T. viride* ili kalcijevih iona koji se ispuštaju,  $R_t$  je količina *T. viride* ili kalcija ispuštenog u vremenu  $t$ , a  $R_{tot}$  je ukupna količina spora *T. viride* ili kalcija u mikrosferama.

Sva mjerenja su ponavljana tri puta, a rezultati su prikazani uz standardnu devijaciju.

#### **3.4.9. Statistička analiza**

Rezultati su obrađeni pomoću Microsoft Excel 2016 i XLSTAT statističkog softverskog dodatka.

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

## **4. REZULTATI**

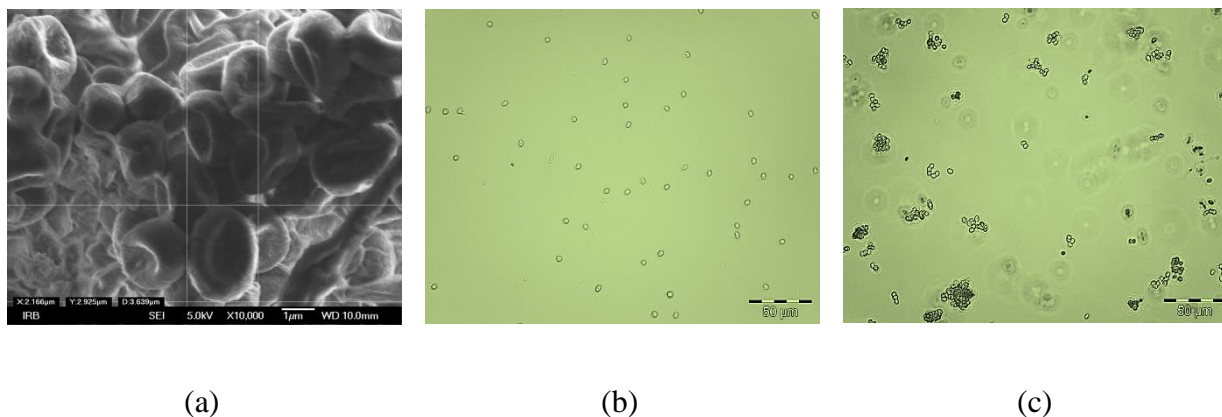
Dobiveni rezultati prikazani su u dva dijela. U prvom dijelu analizirana su međudjelovanja spora *T. viride* i kalcijevih iona. U drugom dijelu opisana su fizikalno-kemijska svojstva mikrosfera pripremljenih pri različitim koncentracijama kalcijevog klorida bez i sa sporama *T. viride*.

### **4.1. Međudjelovanja spora *T. viride* i kalcijevih iona**

Sporulacija i rast *Trichoderma* vrste ovise o međusobnom djelovanju različitih čimbenika okoline među kojima kalcij igra važnu ulogu. Da bi se testirala bioaktivnost spora *T. viride* u prisutnosti različitih koncentracija kalcijevog klorida, rast i sporulacija ispitivani su u suspenzijama, inokulirani na PDA supstratu, te ispunjeni u mikrosfere.

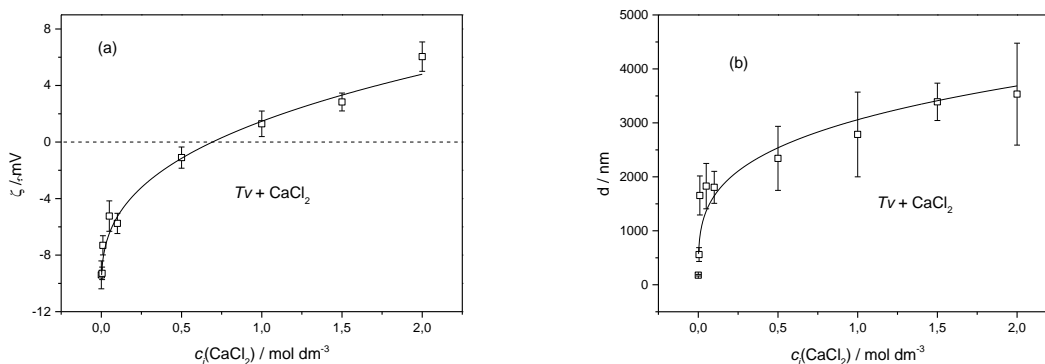
#### **4.1.1. Električni naboj i veličina spora *T. viride* suspendiranih u vodi**

Na Slici 2 prikazana je SEM mikrofotografija suhih *T. viride* spora i CLSM mikrofotografija spora suspendiranih u otopini kalcijevog klorida. Suhe spore *T. viride* približno istih veličina (oko 3,6  $\mu\text{m}$ ) slične su po obliku sporama *Penicilliuma* (Ye i sur., 2002) i *Aspergillus* (Kwon-Chung i Sugui, 2013) (Slika 2a). Ovi oblici spora su pokazali duboke površinske rupe, koje su možda bile povezane s gubitkom dijelova stijenke spora, dijelovima membrane spora, ili čak materijalom unutar.



**Slika 2.** (a) SEM slika suhих *T. viride* spora, (b) i (c) slike svjetlosne mikroskopije spora *T. viride* suspendiranih u otopini kalcijevog klorida kod 0,005 mol dm<sup>-3</sup> i 1,5 mol dm<sup>-3</sup>. Broj *T. viride* spora, NS =  $1.8 \cdot 10^6$  ml<sup>-1</sup>. Na slikama su prikazana i odgovarajuća mjerila.

Slika 2b prikazuje kako se spore *T. viride* relativno lako suspendiraju u vodi što ukazuje na prevladavajuću površinsku hidrofilnost. Spore suspendirane u vodi pri koncentraciji od  $1.8 \times 10^{-6}$  ml<sup>-1</sup> su negativno nabijene (zeta potencijal -9 mV). Negativan naboj proizlazi iz različitih funkcionalnih skupina kao što su hidroksilne, karboksilne i amino. Negativan potencijal je u skladu s analizom odnosa između relativne površinske hidrofobnosti i površinskog električnog naboja (Singh i sur., 2004). Uz povećanje koncentracije kalcijevog klorida spore *T. viride* postaju manje negativno nabijene zbog elektrostatskog vezanja kationa kalcija (Slika 3a). Isto tako, pri višoj koncentraciji kalcijevih iona, suspendirane spore *T. viride* pokazuju značajnu agregaciju (Slika 2c).

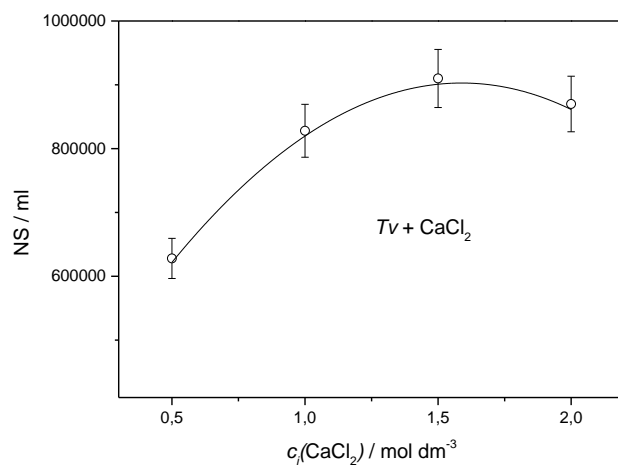


**Slika 3.** Varijacija (a) prosječnog zeta potencijala,  $\zeta$ , i (b) prosječni hidrodinamički promjer,  $d$ , čestica s koncentracijom kalcijevog klorida kod konstantnog broja *T. viride* spora u suspenziji  $\text{NS} = 1,8 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ .

Utjecaj na veličinu čestica u suspenziji spora *T. viride* dodatkom  $\text{Ca}^{2+}$  prikazan je na Slici 3b. Može se vidjeti da pri nižoj koncentraciji kalcijevi ioni nisu značajno promijenili veličinu čestica. Povećanjem koncentracije kalcijevih iona od 0,005 do 2 mol dm<sup>-3</sup> površina spora postaje manje negativno nabijena zbog vezanja kalcijevih iona, odnosno elektrostatskih međudjelovanja  $\text{Ca}^{2+}$  i *T. viride* i spore agregiraju.

#### 4.1.2. Utjecaj kalcijevih iona na rast i sporulaciju *T. viride*

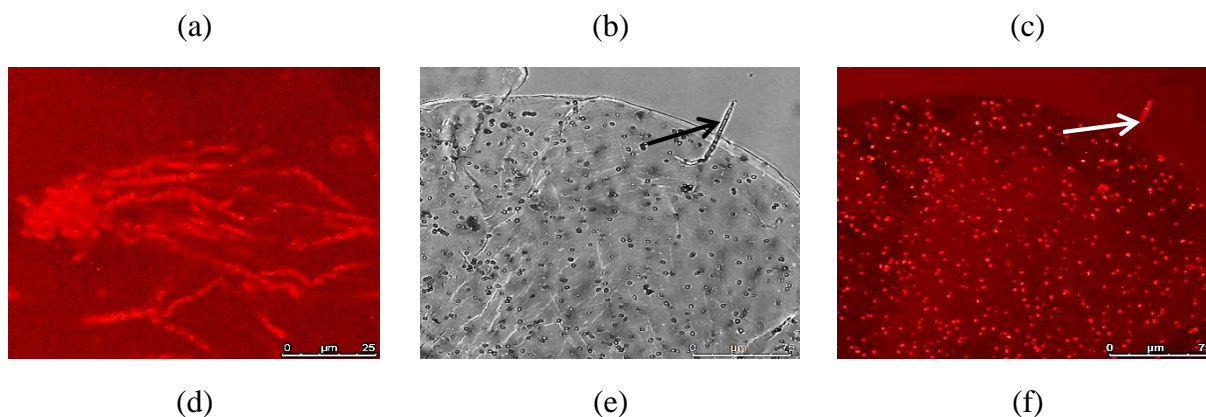
Promjene spora *T. viride* suspendiranih u otopinama kalcijevog klorida prikazuje Slika 4. Uz povećanje koncentracije kalcija povećao se i broj spora, što ukazuje na pozitivan utjecaj kalcija na klijavost. Najbolji prinos spora je zabilježen na 1,5 mol dm<sup>-3</sup>. Kod usporedbe s kontrolnom suspenzijom ( $\text{NS/ml} = 5 \cdot 10^6$ ), broj spora bio je manji za gotovo jedan red veličine, što ukazuje da dodatak kalcijevih iona malo ometa klijavost, ali ju ne sprječava. Rezultati sporulacije ovisne o koncentraciji u suspenziji ili rastu micelija i sporulacije na PDA supstratu su u skladu s literaturnim podacima.



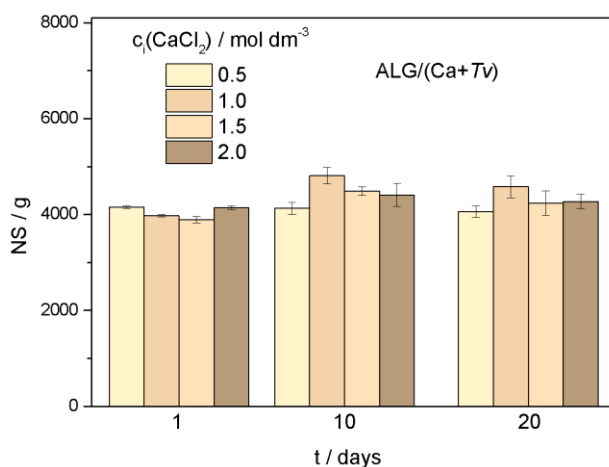
**Slika 4.** Promjena broja spora *T. viride*, NS / ml, suspendirane u otopinama s različitim koncentracijama kalcijevog klorida,  $c_i(\text{CaCl}_2)$ .

Slika 5a prikazuje mikrofotografiju svježe pripravljene mikrosfere s vidljivo raspoređenim sporama *T. viride* unutar mikrosfere. Nakon 10 dana starenja na zdjelicama, pri sobnoj temperaturi, mikrosfere postaju vidljivo okružene zelenim micelijima (Slika 5b). Presjek kroz ALG/(Ca + *Tv*) mikrosferu prikazuje stvaranje razgrananih hifa unutar matrice (Slike 5c,d). Vidljiva je prisutnost brojnih spora i nekoliko klica (označeno strelicom) koje prodiru kroz površinu mikrosfere (Slika 5e,f). CLSM mikrofotografije sa Slike 5c do 5f jasno pokazuju da miceliji prisutni oko mikrosfera nastaju klijanjem unutar matriksa i prodiranjem klica kroz površinu mikrosfera.





**Slika 5.** (a) Mikrofotografija mikrosfere dobivena uz polarizirano svjetlo; (b) zdjelica s mikrosferama okruženim *T. viride* micelijem; CLSM mikrofotografije micelija koji raste unutar mikrosfere u (c) prolaznom i (d) fluorescencijskom svjetlu, dio mikrosfere s klicom koja prodire kroz površinu (označeno strelicom) u (e) prolaznom i (f) fluorescencijskom svjetlu. ALG/(Ca + *Tv*) mikrosfere su pripravljene pri različitim početnim koncentracijama kalcijevog klorida,  $c_i(\text{CaCl}_2) = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ , i broj *T. viride* spora,  $\text{NS} = 1.8 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ . Oznake za veličine se nalaze na slikama.



**Slika 6.** Promjena broja spora *T. viride*, NS / g, u ALG/(Ca + Tv) mikrosferama pripravljenim pri različitim početnim koncentracijama kalcijevog klorida,  $c_i(\text{CaCl}_2)$ , nakon 1, 10 i 20 dana od ispune. Rezultati su prikazani s odgovarajućim standardnim devijacijama.

Promjenu broja spora u mikrosferama tijekom vremena prikazuje Slika 6. Tijekom 10 dana skladištenja broj spora *T. viride* u mikrosferi se povećao, a nakon 20 dana NS je nešto manji. Međutim, još je uvijek ostao veći od broja spora u svježe pripravljenim mikrosferama (prvi dan). Pokusi su pokazali da *T. viride* daje najbolji prinos biomase u mikrosferama pripravljenim pri 1 mol dm<sup>-3</sup> početne koncentracije kalcijevog klorida.

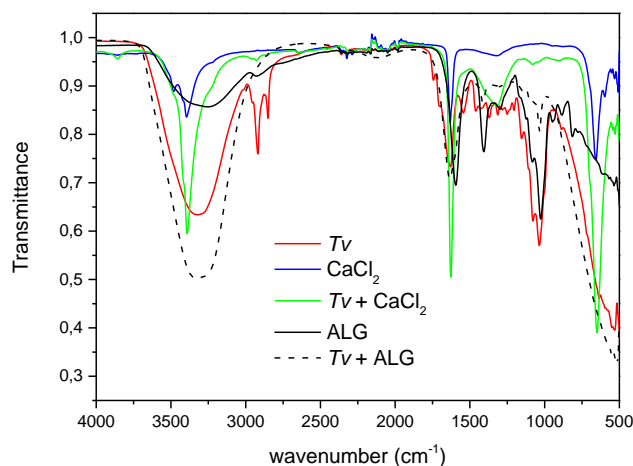
#### 4.1.3. Identifikacija međudjelovanja iona kalcija, spora *T. viride* i natrijevog alginata

Informacije o molekulskim međudjelovanjima kalcijevih iona i spora *T. viride* kao i između spora *T. viride* i natrijevog alginata dobivene su usporedbom FTIR spektara pojedinačnih komponenata i njihovih smjesa (Slika 7). Spektar kalcijevog klorida pokazuje vibracije rastezanja na 3487, 3396, 3224 i 1629 cm<sup>-1</sup>. Karakteristike zabilježenog *T. viride* spektra su: široka vrpca oko 3321 cm<sup>-1</sup>, frekvencije na 2921 i 2854 cm<sup>-1</sup>, mali pik na 2367 cm<sup>-1</sup>, izraženi pik na 1608 cm<sup>-1</sup> i nekoliko manjih pikova između 1500 i 1200 cm<sup>-1</sup>, mali pik na 1545 cm<sup>-1</sup> i jaki pik na 1040 cm<sup>-1</sup>.

Spektar smjese *T. viride* i kalcijevog klorida pokazuje malo intenzivnije i uže –OH i –NH vibracije istezanja oko  $3385\text{ cm}^{-1}$  te značajno smanjenje intenziteta vrpce *T. viride* pri  $2921$  and  $2854\text{ cm}^{-1}$ . Nestajanje malih pikova pri  $1500$  and  $1200\text{ cm}^{-1}$ , pojava pika pri  $1311\text{ cm}^{-1}$ , te pomicanje *T. viride* vrpce od  $3321$ ,  $1608$ ,  $1207$  and  $663\text{ cm}^{-1}$  prema  $3394$   $1628$ ,  $1307$  and  $647\text{ cm}^{-1}$  upućuju na međudjelovanja funkcionalnih skupina kao što je opaženo za smjesu *T. viride* i bakrovih iona (Vinceković i sur., 2016).

Karakteristike spektra natrijevog alginata su: široka apsorpcijska vrpca u rasponu od  $3000$  do  $3600\text{ cm}^{-1}$ , vibracije istezanja oko  $2920\text{ cm}^{-1}$ ,  $1595$  i  $1405\text{ cm}^{-1}$ , vibracija istezanja manjeg intenziteta oko  $1295\text{ cm}^{-1}$  te vrpce oko  $1026\text{ cm}^{-1}$  tipične za strukturu saharida.

Spektar smjese *T. viride* i alginata pokazuje šire i intenzivnije vibracije rastezanja oko  $3321\text{ cm}^{-1}$ . Nestajanje pikova *T. viride* (pri  $2921$  i  $2854\text{ cm}^{-1}$  te mali pikovi između  $1500$  i  $1200\text{ cm}^{-1}$ ) i vrpce pripisanih strukturi alginata (od  $1125$  do  $813\text{ cm}^{-1}$ ), kao i pomicanje i manji intenziteti alginatnih vrpce koje odgovaraju asimetričnim ( $1595$  do  $1630\text{ cm}^{-1}$ ) i simetričnim ( $1405$  do  $1415\text{ cm}^{-1}$ ) istezanjima karboksilnih skupina upućuju na međudjelovanja hidroksilnih, amino i karboksilatnih skupina *T. viride* i alginata.



**Slika 7.** FTIR spektri *T. viride* spora (*Tv* - crvena linija), kalcijevog klorida ( $\text{CaCl}_2$  - plava linija) i njihove smjese (*Tv* +  $\text{CaCl}_2$  - zelena linija), alginat (crta linija), i smjesa *T. viride* spora i alginata (*Tv* + ALG, crna isprekidana linija).



## 4.2. Fizikalno-kemijska karakterizacija mikrosfera

### 4.2.1. Učinkovitost i kapacitet inkapsulacije i stupanj bubrenja

Određivanje učinkovitosti i kapaciteta inkapsulacije provedeni su kako bi se dobili podaci o sadržaju kalcija i *T. viride* u mikrosferama. Rezultati učinkovitost inkapsulacije kalcija navedeni su u Tablici 1. Povećanje koncentracije kalcija smanjuje učinkovitost inkapsulacije za obje vrste mikrosfera, što je više izraženo za ALG/Ca mikrosfere. Rezultati su u skladu s konstantnim kapacitetom inkapsulacije mikrosfera (Tablica 2). Čini se da mikrosfere dostižu maksimalan kapacitet ispunje čak i pri najnižoj koncentraciji kalcija. Nešto manja učinkovitost kapaciteta ispunje kalcija u ALG/(Ca+Tv) mikrosferama je u skladu s vrijednostima kapaciteta inkapsulacije kalcija (Tablica 2). Nema spora *T. viride* prisutnih u filtratu nakon pripreme mikrosfera što pokazuje 100%-tnu učinkovitost inkapsulacije.

**Tablica 1.** Varijacije učinkovitosti inkapsulacije mikrosfera kalcijevim ionima ( $LE_{Ca}/\%$ ) u ALG/Ca i ALG/(Ca+Tv). Mikrosfere pripravljene pri različitim početnim koncentracijama kalcijevog klorida,  $c_i(\text{CaCl}_2)/\text{mol dm}^{-3}$ .

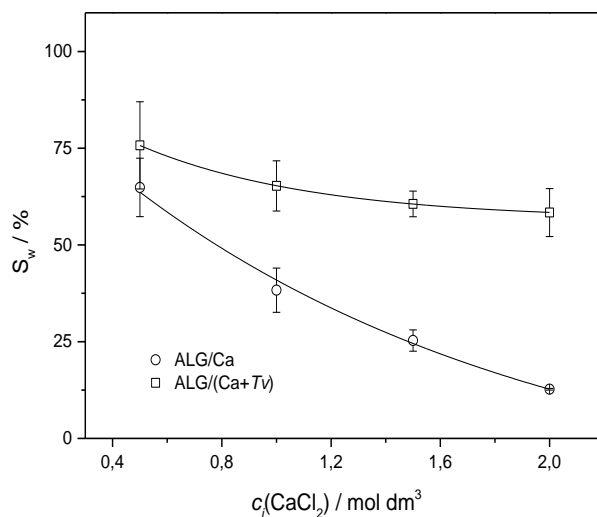
$c_i(\text{CaCl}_2)$	$LE_{Ca}$	Sd $LE_{Ca}\%$	$LE_{Ca}$	Sd $LE_{Ca}\%$
	ALG/Ca		ALG/(Ca+Tv)	
<b>0,5</b>	57,61	3,56	50,31	4,37
<b>1,0</b>	49,38	1,28	50,40	1,45
<b>1,5</b>	41,46	0,38	41,19	0,36
<b>2,0</b>	32,64	0,84	37,53	0,92

Gotovo konstantan sadržaj kalcija u ALG/Ca i spora *T. viride* u ALG/(Ca+Tv) mikrosferama pripremljenim pri različitim koncentracijama kalcija prikazuje Tablica 2. Mikrosfere s *T. viride* pokazale su nešto veći kapacitet inkapsulacije kalcijevim ionima u odnosu na mikrosfere ALG/Ca. To se može pripisati sposobnosti vezanja kalcija na *T. viride*.

**Tablica 2.** Varijacije kapaciteta inkapsulacije kalcijevim ionima ( $LC_{Ca}/\text{mol g}^{-1}$ ) u ALG/Ca, te ALG/(Ca+Tv) mikrosferama i kapaciteta ispunje *T. viride* sporama ( $LC_{Tv}/\text{NS g}^{-1}$ ) u ALG/(Ca+Tv). Mikrosfere su pripravljene pri različitim početnim koncentracijama kalcijevog klorida,  $c_i(\text{CaCl}_2)/\text{mol dm}^{-3}$ .

$c_i(\text{CaCl}_2)$	$LC_{Ca}$	Sd $LC_{Ca}\%$	$LC_{Ca}$	Sd $LC_{Ca}\%$	$LC_{Tv}$	Sd $LC_{Tv}\%$
	ALG/Ca		ALG/(Ca+Tv)		ALG/(Ca+Tv)	
<b>0,5</b>	4,12E-02	3,74E-03	5,00E-02	1,33E-03	4,150E+3	42
<b>1,0</b>	4,16E-02	3,31E-03	4,68E-02	1,58E-03	3,970E+3	40
<b>1,5</b>	4,11E-02	2,93E-03	5,12E-02	2,41E-03	3,890E+3	39
<b>2,0</b>	4,20E-02	2,39E-03	4,50E-02	2,90E-03	4,140E+3	41

Učinak povećanja koncentracije kalcija na stupanj bubrenja prikazan je na Slici 8. Vidljivo je kako povećanje koncentracije kalcija smanjuje stupanj bubrenja obje vrste mikrosfera, bez i sa sporama *T. viride*.



**Slika 8.** Varijacije u stupnju bubrenja,  $S_w$ , ALG/Ca (o) i ALG/(Ca+Tv) (□) mikrosfera pripremljenih pri različitim početnim koncentracijama kalcijevog klorida,  $c_i(\text{CaCl}_2)$ . Mikrosfere

su bubrile 3h u destiliranoj vodi do ravnotežne  $S_w$  vrijednosti. Na slici su označene i standardne devijacije.

Promjene  $S_w$  s koncentracijom kalcijevih iona mogu se prikazati pomoću jednadžbe  $S_w = ab^n$ , gdje su a i b parametri koji opisuju stupanj bubrenja u ovisnosti o koncentraciji.

**Tablica 3.** Parametari koji opisuju ovisnost stupnja bubrenja o početnoj koncentraciji kalcijevog klorida,  $c_i(\text{CaCl}_2)/\text{mol dm}^{-3}$ , za mikrosfere pripravljene bez i s *T. viride* spora.

Mikrosfere	a	n	R <sup>2</sup>
ALG/Ca	30,1	-0,97	0,98
ALG/(Ca+Tv)	65,7	-0,19	0,99

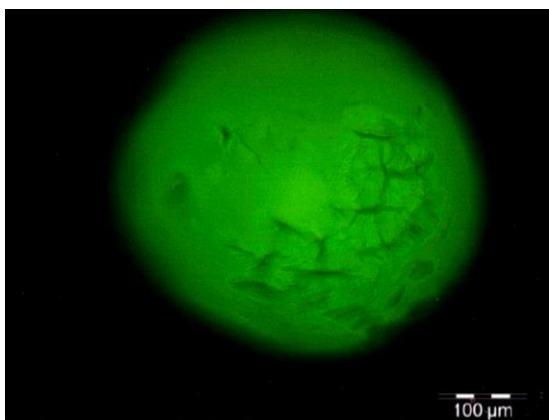
U Tablici 3 navedeni su empirijski parametri a i b. Različite vrijednosti niske vrijednosti n upućuju na to da dvije vrste mikrosfera ne dijele iste mehanizme koji kontroliraju bubrenje. Te se razlike mogu pripisati razlikama u strukturi mikrosfera. Dodavanje spora *T. viride* uzrokovalo je veći stupanj bubrenja zbog manje gustoće strukture uzrokovane elektrostatskim i mehaničkim učincima spora na strukturu mreže.

#### 4.2.2. Morfologija i veličina mikrosfera

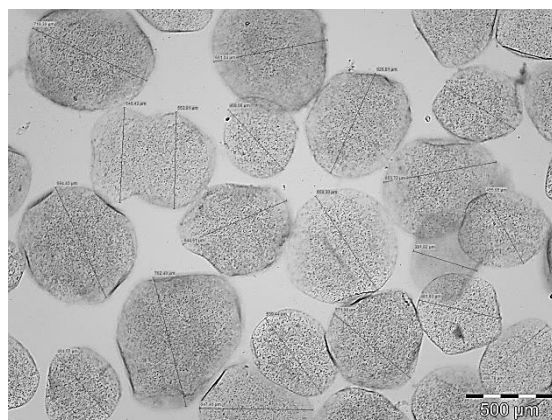
Pri našim eksperimentalnim uvjetima pripravljene mikrosfere bile su uglavnom sferične (Slika 9a), iako su prisutne anomalije u manjem broju (Slika 9b). Utjecaj koncentracije kalcijevih iona na prosječnu veličinu mokrih i suhih mikrosfera prikazan je na Slici 10. Najveće mokre mikrosfere nastale su pri najnižoj koncentraciji kalcijevog klorida. Povećanjem koncentracije kalcija došlo je do smanjenja veličine mikrosfera. Tijekom sušenja do konstantne mase (otprilike četiri tjedna na zraku pri sobnoj temperaturi) izgubila se sferičnost mikrosfera (Slika 9c) i njihova veličina bila je otprilike dva puta manja u usporedbi s mokrim kapsulama radi gubitka vode (Slika 10). Površina

#### 4. REZULTATI

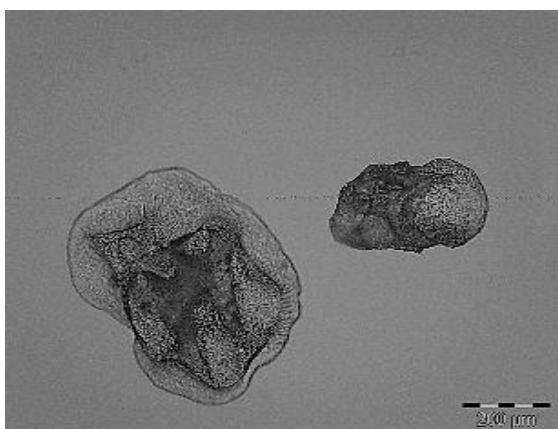
osušene mikrosfere postala je gruba s nepravilnim naborima (slika 9d) koji su se pojavili kao posljedica procesa gubitka vode. SEM mikrografija pokazuje da je površina vrlo porozna s prisutnim površinskim porama (jedna je označena strelicom) (Slika 9e). Slika 9f prikazuje površinu ALG/(Ca+Tv) mikrosfera s brojnim sfernim mjehurićima (jedan je označen strelicom) sličnim veličini pojedinačnih spora (Slika 2a). To su najvjerojatnije mjesta gdje klice prodiru iz mikrosfera.



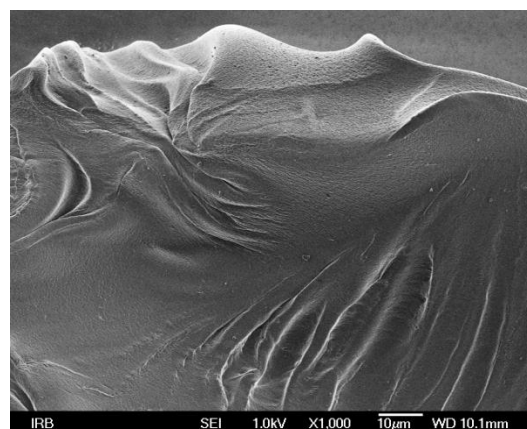
(a)



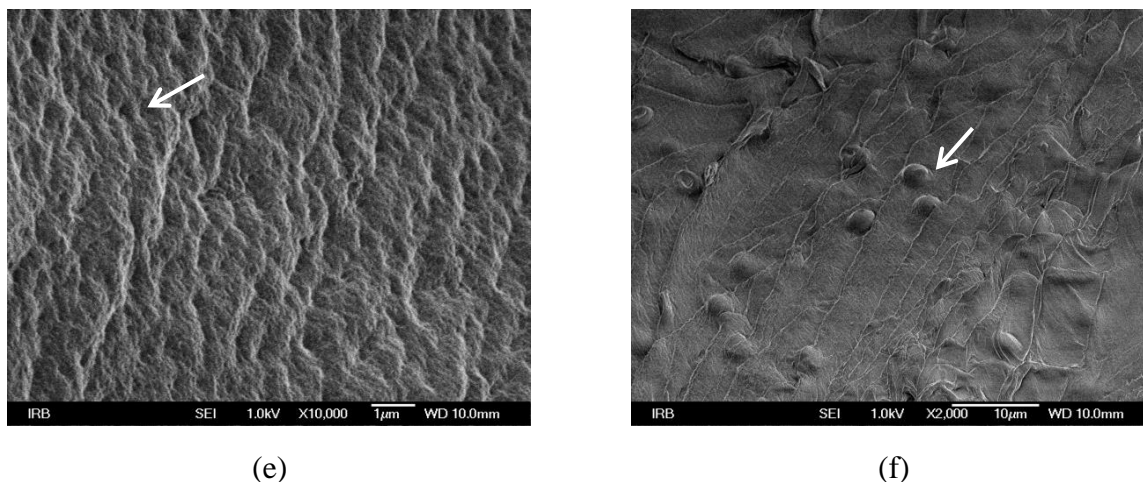
(b)



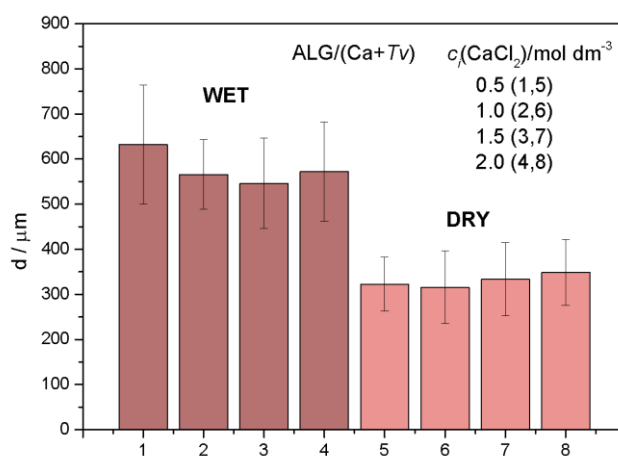
(c)



(d)



**Slika 9.** Mikrofotografije (a) mokre ALG/(Ca+Tv) mikrosfere dobivene fluorescentnim mikroskopom (obojene eozinom), (b) vlažne i (c) suhe ALG/(Ca+Tv) mikrosfere dobivene svjetlosnim mikroskopom, SEM mikrofotografije površine (d), pora (jedna je označena strelicom) na površini mikrosfera ALG/Ca (e) i mjehurića (jedan je označen strelicom) raspoređenih na površini ALG/(Ca+Tv) mikrosfera (f). Mikrosfere su priređene pri početnoj koncentraciji kalcijevog klorida,  $c_i(\text{CaCl}_2) = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ , te broju spora *T. viride*,  $\text{NS} = 1.8 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ . Na slikama je prikazano i odgovarajuće mjerilo.

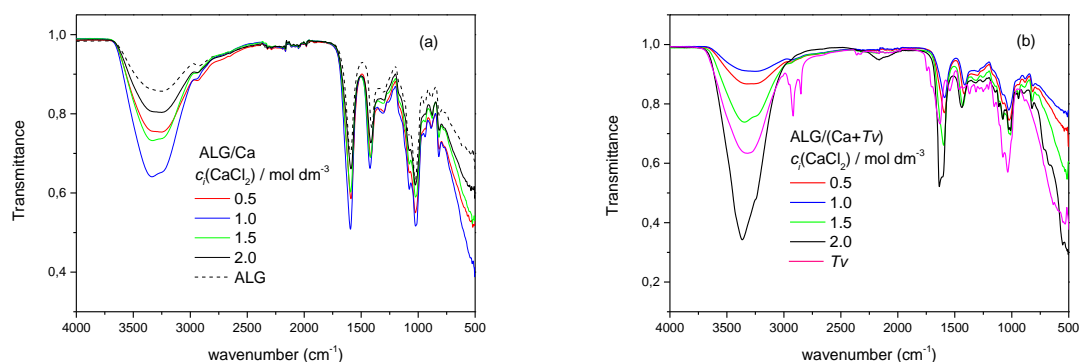


**Slika 10.** Promjena veličine (d) mokrih (WET) i suhih (DRY) ALG/(Ca+Tv) mikrosfera pripremljenih pri različitim početnim koncentracijama kalcijevog klorida,  $c_i(\text{CaCl}_2) / \text{mol dm}^{-3} = 0,5, 1,0, 1,5 \text{ i } 2,0$ . Na slici su označene i odgovarajuće standardne devijacije.

### 4.2.3. Identifikacija molekulskih međudjelovanja u mikrosferama

FTIR spektri ALG/Ca mikrosfera pripravljenih pri različitim koncentracijama kalcijevog klorida prikazani su na Slici 11a. Povećanjem koncentracije kalcijevih iona raste intenzitet apsorpcijske vrpce oko  $3300\text{ cm}^{-1}$  te se počinje smanjivati između 1 i  $1.5\text{ mol dm}^{-3}$  ukazujući na promjenu jačine vodikovih veza između atoma kisika G-ostataka i kalcija u strukturi gela. Najslabiji intenzitet apsorpcijske vrpce oko  $3300\text{ cm}^{-1}$  uočen pri najvišoj koncentraciji iona kalcija ukazuje na manju količinu vode u strukturi mikrosfera. Slično jačanje pa smanjenje intenziteta primijećeno je i za asimetrične i simetrične vibracije istezanja karboksilnih skupina. Karakteristični pikovi asimetričnih vibracija istezanja pomiču prema nižem valnom broju ( $1595$  do  $1589\text{ cm}^{-1}$ ), a simetričnih prema višim valnim brojevima ( $1405$  to  $1413\text{ cm}^{-1}$ )

Na Slici 11b prikazan je utjecaj povećanja koncentracije kalcijevog klorida na molekulska međudjelovanja u mikrosferama ispunjenih *T. viride* sporama. Vibracije rastezanja O–H veze alginata, kalcijevog klorida, mikrosfera alginata i *T. viride* pojavile su se u rasponu od  $3000$ - $3600\text{ cm}^{-1}$ . Suprotno od ALG/Ca mikrosfera, ALG/(Ca+Tv) mikrosfere pokazuju stalan porast intenziteta –OH i –NH širokih vrpce s koncentracijom kalcijevog klorida. Opažene su značajne promjene u spektru pri višim koncentracijama kalcija u područjima hidroksilnih i karboksilnih funkcionalnih skupina. Intenzitet širokih –OH i –NH vibracija rastezanja se povećao što ukazuje na veću količinu vode u strukturi mikrosfera. Postupno povećanje intenziteta i pomicanje asimetričnog (od  $1595$  do  $1589\text{ cm}^{-1}$  na najnižoj i povećanje do  $1637\text{ cm}^{-1}$  pri najvišoj koncentraciji kalcija) i simetričnog (od  $1405$  do  $1434\text{ cm}^{-1}$ ) vibracijskog pika karboksilnih skupina pokazuje razliku u elektrostatskim međudjelovanjima iona kalcija i karboksilnih skupina u usporedbi s mikrosferama pripravljenih bez *T. viride*. Mikrosfere pripravljene s  $2\text{ mol dm}^{-3}$  kalcijevog klorida pokazale su različite rezultate u usporedbi sa spektrima ostalih koncentracija: pomicanje i podjelu asimetričnih karboksilnih ( $3248$  i  $3369\text{ cm}^{-1}$ ) i hidroksilnih pikova ( $1604$  i  $1637\text{ cm}^{-1}$ ) u dva pika.

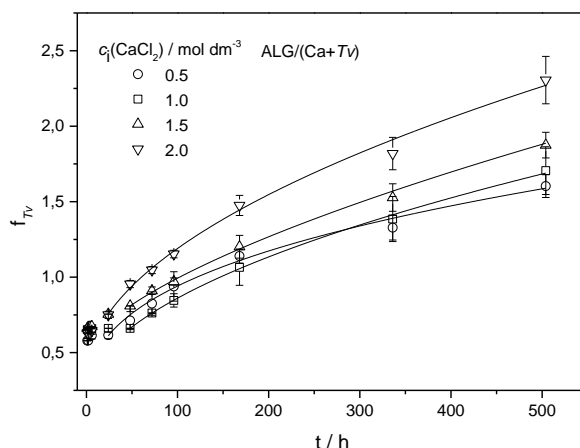


**Slika 11.** FTIR spektri (a) mikrosfera kalcijevog alginata bez, ALG/Ca i (b) s *T. viride*, ALG/(Ca+Tv), pripremljenih pri različitim početnim koncentracijama kalcijevog klorida,  $c_i(\text{CaCl}_2)$ . Spektri natrijevog alginata (a) i *T. viride* (b) dani su za usporedbu.

#### 4.2.4. *In vitro* otpuštanje *T. viride* spora i iona kalcija iz mikrosfera

Profili otpuštanja *T. viride* spora karakterizirani brzim početnim otpuštanjem prikazani su na Slici 12. Nakon jednog tjedna promatranja, frakcija ispuštenih *T. viride* spora povećala se iznad 1 što ukazuje na veću koncentraciju *T. viride* biomase u odnosu na početnu. To se može pripisati klijavosti unutar mikrosfera i u okolnom mediju što je u skladu s mikroskopskim opažanjima (Slike 5 c do f). Spore koje nisu proklijale mogu se osloboditi iz mikrosfere u okolni medij (i) perforacijama koje proizvode klice (veličina pora mikrosfera je znatno manja od veličine spora) i / ili (ii) djelomičnom degradacijom mikrosfera.

Frakcija ispuštenih spora *T. viride* ( $f_{Tv}$ ) može se opisati jednadžbom  $f = a + kt^n$ . Vrijednosti konstante otpuštanja  $k$ , eksponenti  $n$  i odsječci  $a$  prikazani su u Tablici 4. Prema modelu Korsmeyer-Peppasa (Korsmeyer i sur., 1983) konstanta otpuštanja,  $k$ , uključuje ukupan difuzijski koeficijent otapanja i geometrijske karakteristike mikrosfera, a eksponent  $n$  je karakterističan za mehanizam koji kontrolira brzinu otpuštanja. Iz Tablice 4 je vidljivo da se vrijednosti za konstantu  $k$  smanjuju povećanjem početne koncentracije iona kalcija. Vrijednost za  $n > 0,43$  upućuje da je kontrolni mehanizam otpuštanja anomalna transportna kinetika (kombinacija dvaju difuzijskih mehanizama i bubrenja i relaksacije polimernih lanaca).



**Slika 12.** Frakcija ispuštenih *T. viride* spora,  $f_{Tv}$ , u vremenu,  $t$ , iz ALG/(Ca+Tv) mikrosfera pripravljenih pri različitim početnim koncentracijama kalcijevog klorida,  $c_i(\text{CaCl}_2)$ . Na slici su prikazane i standardne devijacije.

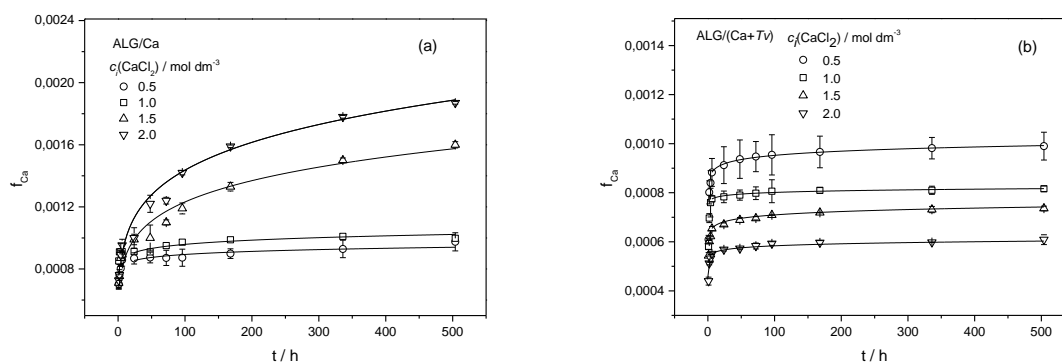
**Tablica 4.** Varijacija konstante oslobađanja ( $k$ ), eksponent ( $n$ ), presjek y-osi ( $a$ ) i koeficijent korelacije ( $R^2$ ) *T. viride* oslobođenog iz (ALG/Ca+Tv) mikrosfera pripravljenih pri različitim početnim koncentracije kalcijevog klorida,  $c_i(\text{CaCl}_2)/\text{mol dm}^{-3}$ .

$c_i(\text{CaCl}_2)$	$a$	$k/\text{h}$	$n$	$R^2$
<b>0,5</b>	0,124	0,105	0,46	0,98
<b>1,0</b>	0,227	0,059	0,52	0,99
<b>1,5</b>	0,507	0,025	0,64	0,99
<b>2,0</b>	0,550	0,025	0,70	0,99

Na Slici 13a i 13b prikazano je otpuštanje kationa kalcija iz mikrosfera pripravljenih bez i s *T. viride* s povećanjem koncentracije kationa kalcija. Obje vrste mikrosfera pokazuju veliku stabilnost oslobađanjem vrlo male frakcije kalcijevih iona. Sve profile otpuštanja karakteriziraju brzo početno oslobađanje nakon čega slijedi sporije otpuštanje koje se može opisati jednadžbom  $f = kt^n$ . Da bi se definirala kinetika i tip mehanizmi koji kontroliraju otpuštanje



aktivnih sastojaka, primijenjen je semiempirijski model Korsmeyer-Peppas (Korsmeyer i sur., 1983). Vrijednosti konstante oslobađanja  $k$  i eksponenti  $n$  prikazani su u Tablici 5. Niže  $n$  vrijednosti od 0,43 pokazuju da je proces otpuštanja kontroliran difuzijom kationa kalcija kroz mikrosfere, što znači da je to najsporiji proces, odnosno difuzija kalcija je znatno sporija od procesa bubrenja i relaksacije polimera.



**Slika 13.** Frakcija oslobođenih kationa kalcija,  $f_{Ca}$ , u vremenu,  $t$ , iz (a) ALG/Ca i (b) ALG/(Ca+Tv) mikrosfera pri različitim početnim koncentracijama kationa kalcija,  $c_i(CaCl_2)$ . Na slikama su označene i odgovarajuće standardne devijacije.

Povećanje koncentracije kalcijevih iona rezultiralo je smanjenjem brzine otpuštanja kalcijevih iona (Tablica 5) za obje vrste mikrosfera. Količina oslobođenih kationa kalcija u prisustvu *T. viride* spora bila je nešto manja, kao i brzina otpuštanja u usporedbi s ALG/Ca mikrosferama. To se može pripisati promjeni strukture mreže zbog elektrostatskih odbijanja između slobodnih dijelova alginatnih lanaca i spora *T. viride*, kao i mehaničkih međudjelovanja.

**Tablica 5.** Varijacije konstante otpuštanja ( $k$ ), eksponenta ( $n$ ) i koeficijenta korelacije ( $R^2$ ) kalcija oslobođenih iz (ALG/Ca) i (ALG/(Ca+Tv)) mikrosfera pripremljenih pri različitim početnim koncentracijama kalcijevog klorida,  $c_i(\text{CaCl}_2)/\text{mol dm}^{-3}$ .

$c_i(\text{CaCl}_2)$	$k/h$	$n$	$R^2$	$k/h$	$n$	$R^2$
	ALG/Ca			ALG/(Ca+Tv)		
<b>0,5</b>	$9,5 \times 10^{-4}$	0,03	0,98	$6,5 \times 10^{-4}$	0,07	0,99
<b>1,0</b>	$8,5 \times 10^{-4}$	0,04	0,99	$6,1 \times 10^{-4}$	0,04	0,98
<b>1,5</b>	$8,4 \times 10^{-4}$	0,10	0,98	$5,9 \times 10^{-4}$	0,03	0,99
<b>2,0</b>	$5,0 \times 10^{-4}$	0,20	0,99	$5,2 \times 10^{-4}$	0,02	0,99

## 5. RASPRAVA

Interdisciplinarna istraživanja simultane inkapsulacije biološkog i kemijskog sastojka u mikrosfere alginata provedena su na modelnim sustavima. Imajući u vidu da je *T. viride* živi mikroorganizam i da količina alginata i koncentracija gelirajućeg kation utječu na strukturu mikrosfera istražen je utjecaj koncentracije kalcijevih iona na preživljavanje *T. viride* te fizikalno kemijska svojstva mikrosfera. Stoga je rasprava kao i rezultati podijeljena u dva dijela. U prvom dijelu raspravljen je utjecaj kalcijevih iona i inkapsulacije na sposobnost preživljavanja i aktivnost *T. viride*, a u drugom fizikalno-kemijska svojstva i mehanizmi otpuštanja aktivnih sastojaka iz mikrosfera alginata.

### 5.1. Međudjelovanja spora *T. viride* i kalcijevih iona

Sporulacija i rast vrsta *Trichoderma* ovise o međusobnom djelovanju različitih čimbenika okoline (izloženost svjetlu, omjerima C:N, okolišnim kationima, okolnom pH mediju, endogenim ritmovima, fizičkoj ozljedi micelija i prisutnost gljivičnih hlapljivih organskih spojeva) među kojima kalcij igra važnu ulogu (Jayaswal i sur., 2003; Steyaert i sur., 2010). *Trichoderma* vrste bi mogle pružiti šire mogućnosti u korištenju u ishrani i zaštiti bilja radi visoke sposobnosti akumuliranja i kompatibilnosti s makro i mikronutrijentima. *Trichoderma* vrste pripadaju grupi mikroorganizama, koji mogu preživjeti u visokim koncentracijama različitih metala te imaju potencijal da ih vežu. Istraživanje vezanja kationa na *Trichoderma* vrste otkrilo je ulogu stanične stijenke gljiva jer se kalcijevi ioni vežu, uglavnom, na stanične stijenke čija se struktura sastoji od polisaharida i glikoproteina, kao i lipida te drugih komponenata (pigmenata i anorganskih soli) (Lopez Errasquin i Vazquez, 2003; Fogarty i Tobin, 1996). Pigment melanin, koji u drugim vrstama gljiva povezan s hitinom, je potpuno zamijenio hitin na staničnoj stijenci spora *Trichoderma* vrsta. Melanin sadrži karboksilne, fenolne, hidroksilne i aminske funkcionalne skupine koje služe kao potencijalna mjesta vezanja metalnih iona. Rast i sporulacija ispitivani su u suspenzijama, inokulirani na PDA supstratu, te ispunjeni u mikrosfere kako bi se testirala bioaktivnost spora *T. viride* u prisutnosti različitih koncentracija kalcijevog klorida.

### 5.1.1. Električni naboj i veličina spora *T. viride* suspendiranih u vodi

U ovom radu utvrđeno je kako se spore *T. viride* oblikom i veličinom od oko 3,6  $\mu\text{m}$  pojavljuju slične sporama *Penicillium* (Ye et al., 2002) i *Aspergillus* (Kwon-Chung i Sugui, 2013) (Slika 1a). Također, spore *T. viride* su pokazale inverzan odnos površinske hidrofobnosti i površinskog električnog naboja kao što su ustvrdili i Singh i sur. (2004) u svom istraživanju. Oni su ustanovili kako su manje hidrofobne površine stanica ujedno manje negativno nabijene, odnosno da postoji obrnut odnos električnog naboja na površini stanice (zeta potencijal u rasponu od -11 do 42 mV) i hidrofobnosti stanične površine (u rasponu od 12 do 52%). To je potvrđeno i u ovom radu jer se spore relativno lako suspendirale u vodi. Povećanjem koncentracije kationa kalcija spore *T. viride* postaju manje negativno nabijene zbog elektrostatskog vezanja kalcijevih iona. Promjena naboja oko 0,7 mol dm<sup>-3</sup> kalcijevih iona ukazuje da su osim elektrostatskih međudjelovanja za vezanje iona odgovorni i drugi mehanizmi kao što su ionska izmjena i/ili neke druge fizikalno-kemijska međudjelovanja kalcijevih iona i funkcionalnih skupina na staničnoj stijenci gljiva. Što se tiče veličina čestica, kalcijevi ioni pri nižoj koncentraciji značajno ne mijenjaju njihovu veličinu. Suprotno tome, pri višim koncentracijama elektrostatskim vezanjem kalcijevih iona smanjuje se negativan naboj spora *T. viride* i dolazi do njihove agregacije, tj. veličina čestica raste.

### 5.1.2. Utjecaj kalcijevih iona na rast i sporulaciju *T. viride*

Promatranjem sporulacije i razvoja micelija tijekom 10 dana, na uzorcima pripremljenim inokulacijom suspenzija spora na PDA supstratu, pokazalo se da micelij pokriva hranjivi supstrat, uključujući kontrolnu Petrijevu zdjelicu natopljenu destiliranom vodom. Između 1 i 1,5 mol dm<sup>-3</sup> koncentracije kalcijevog klorida opaženi su maksimalan rast micelija i sporulacija. Kod najviše koncentracije, micelij nije pokriva cijeli supstrat i sporulacija je izostala. Rezultati su u skladu s literaturnim da prisutnost kationa kalcija inducira sporulaciju *T. viride* u potopljenom (Šimković i sur., 2008) i krutom mediju (Kryštofova i sur., 1995, 1996), ovisno o koncentraciji i vremenu.

Rezultati su pokazali da mikrosfere pružaju okruženje koje podržava klijanje. Molekulska međudjelovanja kationa kalcija i negativno nabijenih *T. viride* spora omogućuju sporulaciju tijekom skladištenja. Klijavost u mikrosferi ovisi o koncentraciji kalcija i vremenu. Najveći prinos

biomase je opažen nakon 10 dana skladištenja i pri koncentraciji kalcijevih iona  $1 \text{ mol dm}^{-3}$ . Mehanizmi kojim kationi kalcija utječu na bioaktivnost *T. virida* nisu dobro poznati. Očito je da su molekulska međudjelovanja dvovalentnih kationa i negativno nabijenih spora *T. viride* primarno elektrostatske prirode, međutim, pri višim koncentracijama kalcija, treba uzeti u obzir i druga fizikalno-kemijska međudjelovanja kationa i stanične stijenke gljive.

### 5.1.3. Identifikacija međudjelovanja iona kalcija, spora *T. viride* i natrijevog alginata

Informacije o molekulskim međudjelovanjima kalcijevog klorida, *T. viride* i natrijevog alginata dobivene su usporedbom spektara pojedinačnih sastojaka i njihovih smjesa. Spektri kalcijevog klorida (Cho i sur., 2014), *T. viride* (Vinceković i sur., 2016) i natrijevog alginata (Sankalia i sur., 2007) u skladu su s literaturnim podacima.

Spektar *T. viride* i smjese kalcijevog klorida pokazuje nešto intenzivnije, ali uže -OH i -NH vibracije istezanja oko  $3385 \text{ cm}^{-1}$  i značajno smanjenje intenziteta *T. viride* vrpce oko  $2921$  i  $2854 \text{ cm}^{-1}$ . Nestanak malih pikova između  $1500$  i  $1200 \text{ cm}^{-1}$ , pojava pika na  $1311 \text{ cm}^{-1}$ , te pomicanje *T. viride* vrpce od  $3321$ ,  $1608$ ,  $1207$  i  $663 \text{ cm}^{-1}$  do  $3394$ ,  $1628$ ,  $1307$  i  $647 \text{ cm}^{-1}$  upućuje da su karboksilne i hidroksilne skupine uključene u međudjelovanja što je slično primijećeno za međudjelovanja *T. viride* i iona bakra (Vinceković i sur., 2016).

Spektar smjese *T. viride* i alginata pokazuje šire i intenzivnije vibracije istezanja oko  $3321 \text{ cm}^{-1}$  što upućuje na pojačane intermolekulske vodikove veze. Nestajanje karakterističnih pikova *T. viride* ( $2921$  i  $2854 \text{ cm}^{-1}$ , malih pikova između  $1500$  i  $1200 \text{ cm}^{-1}$ ) i vrpce karakterističnih za alginat ( $1125$  do  $813 \text{ cm}^{-1}$ ) te pomaci i smanjenje intenziteta vrpce istezanja karakterističnih za karboksilne skupine upućuju na međudjelovanja s hidroksilnim, amino i karboksilnim skupinama.

## 5.2. Fizikalno-kemijska karakterizacija mikrosfera

Agroformulacije s mikročesticama su u okolišu izložene brojnim destabilizirajućim faktorima, bubrenju i konačno dezintegraciji te je poznavanje fizikalno-kemijskih svojstava i mehanizama otpuštanja aktivnih sastojaka osobito važno za pripravu agroformulacija za određenu primjenu.

Esencijalna svojstva za sve mikrosfere su kapacitet inkapsulacije, mehanička i kemijska stabilnost, svojstva bubrenja, mogućnost kontrole otpuštanja aktivnih sastojaka, niska toksičnost, mali troškovi pripreme itd. Ne postoje mikrosfere koje mogu zadovoljiti sva ta svojstva, ali se prema ciljanoj primjeni prilagođuju procedure pripreme.

### 5.2.1. Kapacitet inkapsulacije i stupanj bubrenja

Rezultati su pokazali da povećanje koncentracije kalcija smanjuje učinkovitost inkapsulacije za obje vrste mikrosfera, što ukazuje da je čak i najniža koncentracija kationa kalcija bila dovoljna za geliranje količine dodanog alginata. Jednako su utvrdili Vinceković i sur. (2017), samo s bakrovim ionima ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Mikrosfere dostižu maksimalan kapacitet inkapsulacije čak i pri najnižoj koncentraciji kalcija. Veći kapacitet inkapsulacije ionima kalcija pokazale su mikrosfere ispunjene s obje aktivne tvari od onih ispunjenih samo s ionima kalcija kao i u istraživanju Vincekovića i sur. (2017) s ionima bakra.

Dispergiranjem u vodenoj otopini, mikrosfere bubre i mijenjaju mnoga svojstva kao što su mehanička čvrstoća, propusnost, oslobađanje aktivnih tvari, stabilnost i brzina dezintegracije. Proces bubrenja uključuje dva temeljna molekulska procesa: (i) prodiranje otopine u mikrosferu i (ii) relaksaciju polimernih lanaca (Siepmann i Siepmann, 2012). Povećanjem koncentracije kalcija smanjuje se stupanj bubrenja što je u skladu s literaturnim podacima (Liu i sur., 2004; Davidovich-Pinhas i Bianco-Peled, 2010). Pri višim koncentracijama  $\text{CaCl}_2$  povećava se stupanj umrežavanja i gustoća strukture gela koja uzrokuje manje bubrenje u otopini. Tijekom geliranja, karboksilne skupine guluronskih kiselina reagiraju s kalcijevim ionima i lanci alginata se umrežavaju. Povećanje koncentracije kalcija smanjuje dostupnost ovih skupina molekulama vode te smanjuje veličinu šupljina unutar alginatnih sfera, koje primaju vodu, što uzrokuje stvaranje guste mreže koja slabije bubri (Roy i sur., 2009; Bajpai i Sharma, 2004).

Veći stupanj bubrenja i manju promjenu  $S_w$  s povećanjem koncentracije kalcija pokazale su mikrosfere sa sporama *T. viride* od onih pripremljenih bez *T. viride* što ukazuje na različite strukture gela. Dobro je poznato da je stupanj bubrenja hidrogela ograničen umrežavanjem i da se stupanj bubrenja može koristiti kao mjera opsega umrežavanja (Roger i sur., 2006). Prema tome, prisutnost *T. viride* smanjila je stupanj umrežavanja mikrosfera kalcijevog alginata. Promjena strukture

mreže gela se može pripisati elektrostatskim odbijanjima spora *T. viride* i slobodnih dijelova alginatnih lanaca (zeta potencijal matrice kalcijevog alginata je oko -10 V) (Rokstadet i sur., 2014) kao i mehaničkim međudjelovanjima.

### 5.2.2. Morfologija i veličina mikrosfera

Općenito, veličina i ujednačenost veličina mikrosfera uglavnom je određena eksperimentalnim uvjetima pripreme (viskoznošću otopine alginata, promjerom vrha igle (mlaznice) kroz koju se otopina dodaje, koncentracijom kalcijevog klorida, brzine protoka otopine alginata i udaljenost od šprice (mlaznice) do kupelji s gelirajućim kationom) (Ouwerx i sur., 1998; Blandino i sur., 1999). Najveće mikrosfere nastale su pri najnižoj koncentraciji kalcijevog klorida jer niska koncentracija kalcija usporava geliranje te nastaju gelovi s većim postotkom zadržane vode (Rodrigues i Lagoa, 2006). Povećanjem koncentracije kalcija smanjuje se veličina mikrosfera što je u skladu s literaturnim podacima (Shi i sur., 2011; Daemi i Barikani, 2012).

Sušenjem na zraku mikrosfere se smanjuju, a površina postaje neravna uslijed gubitka vode. SEM mikrofotografije površine suhих mikrosfera pokazale su visoku poroznost s veličinom pora od 0,169  $\mu\text{m}$ . Na površini ALG/(Ca+ Tv) uočeni su i mjehurići odnosno mjesta na kojima klice *T. viride* prodiru iz mikrosfere. To je potvrđeno i CLSM mikrofografijama na kojim se vide miceliji unutar mikrosfere i prodiranje klica u okolinu.

### 5.2.3. Identifikacija molekulskih međudjelovanja u mikrosferama

Usporedbom spektara ALG/Ca i ALG/((Ca+Tv)) i utjecaj koncentracije kalcijevih iona jasno ukazuju na strukturne razlike mikrosfera. Povećanjem koncentracije kalcijevih iona, najznačajnije promjene se uočavaju kod hidroksilnih i karboksilnih skupina alginata. Veći utjecaj promjena koncentracije kalcija je uočen na ALG/Ca mikrosferama. Povećanje te smanjenje intenziteta vibracija hidroksilnih skupina pripisuje se promjeni sadržaja vode u mreži gela. Slično tome, Roy i sur. (2009) izvijestili su da povećanjem koncentracije kalcija od 0,2 do 1,5 mol dm<sup>-3</sup> rezultira manjim šupljinama koje imaju manju količinu vode. Pomaci pikova (asimetrične karboksilne

vibracije rastezanja se pomiču prema nižem valnom broju, a simetrične vibracije istežanja karboksilnih skupina pomiču se prema višem valnom broju) posljedica su zamjene iona natrija s ionima kalcija, odnosno zbog promjena gustoće naboja, povećanja radijusa i atomske težine kationa (Daemi i Barikani, 2012).

Utjecaj koncentracije kalcijevog klorida na ALG/((Ca+Tv) mikrosfere je manji i porast koncentracije kontinuirano povećava intenzitete karakterističnih funkcionalnih skupina alginata. Pri najvišoj koncentraciji kalcijevog klorida hidroksilni i asimetrični karboksilni vibracijski pikovi se dijele na dva slična ( $1604$  i  $1637\text{cm}^{-1}$  te  $3248$  and  $3369\text{cm}^{-1}$ ) što upućuje na porast umrežavanja (Cho i sur., 2014). Slično je zabilježeno u prethodnim istraživanjima koja su pokazala da se te vibracijske vrpce mogu koristiti za praćenje strukturnih promjena različitih alginatnih gelova (Daemi i Barikani, 2012).

#### 5.2.4. *In vitro* otpuštanje *T. viride* spora i iona kalcija iz mikrosfera

Mehanizmi kojim se aktivna tvar otpušta iz mikrosfera su složeni i uključuju različite procese: prodiranje okolne otopine u mikrosferu, bubrenje mikrosfera, difuziju aktivnog sastojka kroz mrežu gela, otapanje aktivnog sastojka u okolnom mediju i eroziju nabubrene mikrosfere (Maderuelo i sur., 2011). Pokazano je da su difuzija, bubrenje i erozija najvažniji mehanizmi koji kontroliraju brzinu otpuštanja aktivnih sastojaka iz hidrofilnih mikrosfera (Sankalia i sur., 2007). Korsmeyer i sur. (1983) su primijenili empirijski model za analizu otpuštanja aktivnih sastojaka iz hidrofilnih mikrosfera:

$$f = kt^n$$

gdje je  $f$  frakcija otpuštena u vremenu  $t$ ,  $k$  je kinetička konstanta karakteristična za određeni sustav i  $n$  je eksponent karakterističan za kontrolni mehanizam otpuštanja. U slučaju početnog naglog otpuštanja aktivnih tvari koristi se prilagođena jednadžba (Lindner i Lippold, 1995; Kim i Fassihi, 1997):

$$f = a + kt^n$$

gdje je  $a$  presjek  $y$ -osi koji karakterizira efekt početnog naglog otpuštanja.



Prema tom modelu, eksponent  $n$  karakterizira tri različita mehanizma (Fickova difuzija, anomalna (ne-Fickova difuzija) i transport tipa II). Vrijednosti  $n < 0,43$  ukazuju da otpuštanje kontrolira klasična Fickova difuzija,  $n > 0,85$  otpuštanje kontrolira transportom tipa II (bubrenje i relaksacija polimernih lanaca), dok vrijednosti  $n$  između 0,43 i 0,85 pokazuju anomalnu transportnu kinetiku kontroliranu kombinacijom dvaju difuzijskih mehanizama i transportom tipa II.

Poznavanje kinetike i mehanizama koji kontroliraju u otpuštanje aktivnih sastojaka je važno za pripremu optimalnih agroformulacija baziranih na biopolimernim materijalima. Dizajn kontroliranog sustava za isporuku uključuje optimizaciju mnogih parametara među kojima su najvažniji tip i koncentracija oba, biopolimera i gelirajućeg kationa (Sankalia i sur., 2007). U tom smjeru, kinetika i mehanizmi oslobađanja *T. viride* i kationa kalcija istraženi su na mikrosferama pripremljenima pri različitim koncentracijama kalcijevog klorida i uz konstantnu koncentraciju alginata.

Sve profile otpuštanja oba sastojka karakteriziraju brzo početno oslobađanje nakon čega slijedi sporije otpuštanje. Kontrolni mehanizam otpuštanja *T. viride* je kombinacija dvaju difuzijskih mehanizama te bubrenja i relaksacije polimernih lanaca (anomalna transportna kinetika). Veća količina *T. viride* u okolnom mediju od inkapsulirane, posljedica je kljivosti unutar mikrosfera i u okolnom mediju. Kontrolni mehanizam otpuštanja kalcija je Fickova difuzija. Opažene razlike u mehanizmima otpuštanja mogu se pripisati razlikama u strukturi mikrosfera, vrsti i veličini sastojaka koji je otpušten.

Povećanjem koncentracije kalcija smanjila se brzina otpuštanja oba sastojka što se može objasniti povećanjem gustoće umrežavanja (Aslani i Kennedy, 1996) i homogenosti (Al-Musa i sur., 1999). Brzina geliranja alginata važan je čimbenik u kontroli homogenosti i čvrstoće mikrokapsule. Usporeno geliranje daje homogene strukture s boljim mehaničkim svojstvima. Pri višim koncentracijama iona kalcija, mikrosfere nastaju brže i manje su homogene od onih nastalih pri nižim koncentracijama kalcijevih iona. Homogene mikrosfere dopuštaju veću brzinu difuzije zbog jednolike veličine pora, dok nehomogene usporavaju difuziju u mrežnoj strukturi.

## 6. ZAKLJUČCI

- Razlike u fizikalno-kemijskim svojstvima i mehanizmi otpuštanja bioaktivnih tvari iz mikrosfera alginata ovise o početnoj koncentraciji kalcija i prisutnosti *T. viride* spora.
- FTIR spektroskopijom utvrđena su složena međudjelovanja svih sastojaka u mikrosferama.
- Spore *T. viride* suspendirane u vodi nose negativan naboj i vežu kalcijeve ione elektrostatskim međudjelovanjima. Pri višim koncentracijama kalcijevih iona spore *T. viride* agregiraju.
- Mikrosfere kalcijevog alginata pružaju povoljno okruženje za klijanje *T. viride*. Učinak koncentracije kationa kalcija na broj spora u mikrosferama ovisi o vremenu i koncentraciji. Najbolji prinos spora je dobiven pri  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  kalcijevog klorida.
- Prisutnost spora i razvoj klica unutar mikrosfera mijenja strukturu mreže zbog elektrostatskih odbijanja između slobodnih dijelova alginatnih lanaca i spora *T. viride*, kao i mehaničkih međudjelovanja.
- Osnovan uvjet za inkapsulaciju živih mikroorganizama je da prežive inkapsulaciju i zadrže sposobnost rasta. Općenito, poseban problem u komercijalnoj uporabi živih organizama je odabir formulacije koja će osigurati preživljavanje tijekom skladištenja i primjene. U tom smislu inkapsulacija u mikrosfere alginata predstavlja dobar odabir jer štiti *T. viride* od okoliša, osigurava preživljavanje i sigurnu isporuku bilju.
- Kontrolni mehanizam otpuštanja *T. viride* je kombinacija dvaju difuzijskih mehanizama te bubrenja i relaksacije polimernih lanaca (anomalna transportna kinetika). Veća količina *T. viride* u okolnom mediju od inkapsulirane, posljedica je klijanja unutar mikrosfera i u okolnom mediju. Brzina otpuštanja spora *T. viride* smanjuje se porastom koncentracije kalcijevog klorida. Smanjenje brzine otpuštanja je u skladu s učinkom povećanja koncentracije kalcija na strukturu mreže alginata.
- Kontrolni mehanizam otpuštanja kalcijevih iona je Fickova difuzija kroz mikrosfere. Smanjenje brzine otpuštanja je u skladu s učinkom povećanja koncentracije kalcija na čvrstoću strukture mreže alginata.
- Prisutnost *T. viride* spora utječe na brzinu otpuštanja i količinu oslobođenog kalcija; obje vrijednosti su manje u usporedbi s ALG/Ca mikrosferama. Smanjenje brzine oslobađanja

može se pripisati stvaranju klica unutar mikrosfere i njihovom prodiranju kroz površinu u okolni medij.

- Rezultati su pokazali da se fizikalno-kemijska svojstva mikrosfera alginata mogu podesiti korištenjem odgovarajuće koncentracije gelirajućeg kationa boljim razumijevanjem molekulskih međudjelovanja bioaktivnih sastojaka i sustava za isporuku.
- Provedena istraživanja su od izravne praktične važnosti, jer je razumijevanje međudjelovanja biopolimera i bioaktivnih sastojaka na molekulskoj razini temelj za razvoj novih agroformulacija za zaštitu i prihranu bilja u smislu ekološke i održive poljoprivrede.

**7. ZAHVALE**

Zahvaljujem prije svega svom mentoru izv. prof. dr. sc. Marku Vincekoviću na ukazanoj prilici, usmjeravanju i stručnom vodstvu.

Posebno želim zahvaliti mag. nutr. Slavenu Juriću na strpljenju, razumijevanju, savjetima te pomoći u svim fazama istraživanja i pisanja rada.

Hvala i svim djelatnicima Zavoda za kemiju na velikoj pomoći i potpori pri provedbi pokusa.

Zahvaljujem Hrvatskoj zakladi za znanost na financiranju istraživanja u sklopu istraživačkog projekta "Nove biopolimerne mikrokapsule za kontrolirano otpuštanje tvari za zaštitu/ishranu bilja" (UIP-2014- 501 09-6462).

**8. POPIS LITERATURE**

- 1.) Ahirrao S. P., Gide P. S., Shrivastav B., Sharma P. (2013). Iontropic gelation: a promising cross linking technique for hydrogels. *Research and Reviews: Journal of Pharmaceutics and Nanotechnology*. 2(1): 1-6.
- 2.) Aslani P., Kennedy R. A. (1996). Studies on diffusion in alginate gels. I. Effect of crosslinking with calcium or zinc ions on diffusion of acetaminophen. *Journal of Controlled Release*. 42: 75-82.
- 3.) Al-Musa S., Abu Fara D., Badwan A. A. (1999). Evaluation of parameters involved in preparation and release of drug loaded in crosslinked matrices of alginate. *Journal of Controlled Release*. 57: 223-232.
- 4.) Bajpai S. K., Sharma S. I. (2004). Investigation of swelling/degradation behavior of alginate beads crosslinked with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$  ions. *Reactive and Functional Polymers*. 59: 129-140.
- 5.) Bashir O., Claverie J.P., Lemoyne P., Vincent, C. (2016). Controlled-release of *Bacillus thuringiensis* formulations encapsulated in light-resistant colloidosomal microcapsules for the management of lepidopteran pests of *Brassica* crops. *PeerJournal*. 4:2524. doi.org/10.7717/peerj.2524 [online] <<https://doi.org/10.7717/peerj.2524>>. Pristupljeno 15.01.2018.
- 6.) Benítez T., Rincón A.M., Limón M.C., Codón A.C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7: 249-260.
- 7.) Blandino A., Macias M., Cantero D. (1999). Formation of calcium alginate gel capsules: Influence of sodium alginate and  $\text{CaCl}_2$  concentration on gelation kinetics. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 88: 686-689.

- 8.) Blandino A., Macias M., Cantero D. (2000). Glucose oxidase release from calcium alginate gel capsules. *Enzyme and Microbial Technology*. 27: 319–324.
- 9.) Bolat İ., Kara Ö. (2017). Plant Nutrients: Sources, Functions, Deficiencies and Redundancy. *Journal of Bartın Faculty of Forestry*. 19(1): 218-228.
- 10.) Camargos Braga A.B.A. (2015). Study of constituents of milk and whey as wall material using process for microencapsulation of complex coacervation. Federal University of Uberlândia. 1-56.
- 11.) Cho A. R., Chun Y. G., Kim B. K., Park D. J. (2014). Preparation of alginate–CaCl<sub>2</sub> microspheres as resveratrol carriers. *Journal of materials science*. 49: 4612-4619.
- 12.) Combrink N.J.J. (2013). Calcium-related plant physiological disorders. *Acta horticulturae*. 1014(1014): 7-12.
- 13.) Conway W.S., Sams C.E., Kelman A. (1994). Enhancing the Natural Resistance of Plant Tissues to Postharvest Diseases through Calcium Applications. *Hortscience*. 29(7): 751-754.
- 14.) Daemi H., Barikani M. (2012). Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles. *Scientia Iranica*. 19: 2023-2028.
- 15.) Davidovich-Pinhas M., Bianco-Peled H. (2010). A quantitative analysis of alginate swelling. *Carbohydrate Polymers*. 79: 1020-1027.
- 16.) Fan W., Yanb W., Xu Z., Ni H. (2011). Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 90: 21-27.

- 17.) Ferrándiz M., Capablanca L., García D., Bonet M. Á. (2017). Application of Antimicrobial Microcapsules on Agrotextiles. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*. 6: 62-82.
- 18.) Fogarty R. F., Tobin J. M. (1996). Fungal melanins and their interaction with metals. *Enzyme and Microbial Technology*. 19: 311-317.
- 19.) Fujiwara G.M., Campos R., Klocker Costa C., Gaspari Dias J.F., Obdulio Gomes M., Marilis Dallarmi M., Assis Marques F., Warumby Zanin S.M. (2013). Production and characterization of alginate-starch-chitosan microparticles containing stigmasterol through the external ionic gelation technique. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*. doi.org/10.1590/S1984-82502013000300015 [online] <<http://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502013000300015>>. Pristupljeno 26.01.2018.
- 20.) Gallo M., Corbo M.R. (2010). Microencapsulation as a new approach to protect active compounds in food. U: *Application of alternative food-preservation technologies to enhance food safety and stability*. Bentham Science Publisher. 188-195.
- 21.) Gams W., Bissett J. (2002). Morphology and identification of Trichoderma. U: *Trichoderma and Gliocladium - Basic biology, taxonomy and genetics*. Taylor & Francis Ltd. 3-31.
- 22.) Hadi M.R., Karimi N. (2012). The Role of Calcium in Plants' Salt Tolerance. *Journal of Plant Nutrition*. 35: 2037-2054.
- 23.) Harman G. E. (2006). Overview of mechanisms and uses of Trichoderma spp. *Phytopathology*. 96: 190-194.

- 24.) Jayaswal R. K., Singh R., Lee Y. S. (2003). Influence of physiological and environmental factors on growth and sporulation of an antagonistic strain of *Trichoderma viride* RSR 7. *Mycobiology*. 31: 36-41.
- 25.) Kim H., Fassihi R. (1997). Application of a binary polymer system in drug release rate modulation. 2. Influence of formulation variables and hydrodynamic conditions on release kinetics. *Journal of Pharmaceutical Science*. 86: 323-328.
- 26.) Knowles A. (2008). Recent developments of safer formulations of agrochemicals. *The Environmentalist*. 28: 35–44.
- 27.) Korsmeyer R. W., Gurny R., Doelker E., Buri P., Peppas N. A. (1983). Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 15: 25-35.
- 28.) Kryštofova S., Varečka L., Betina V. (1995) The  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake by *Trichoderma viride* mycelium. Correlation with growth and conidiation. *General Physiology and Biophysics*. 14: 323-337.
- 29.) Kryštofova S., Varečka L., Betina V. (1996). Effects of agents affecting  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis on *Trichoderma viride* growth and conidiation. *Folia Microbiologica*. 41: 249-253.
- 30.) Kumar Das S., Nakka David S. R., Rajabalaya R., Mukhopadhyay Kumar H., Halder T., Palanisamy M., Khanam J., Nanda A. (2011). Microencapsulation techniques and its practice. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2: 1-23.
- 31.) Kwon-Chung K. J., Sugui J. A. (2013). *Aspergillus fumigatus* — what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen?. *Journal Plos Pathogens*. 9: 1-4.



- 32.) Lawrie G., Keen I., Drew B., Chandler-Temple A., Rintoul L., Fredericks P., Grøndahl L. (2007). Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS: *Biomacromolecules*: 8: 2533-2541.
- 33.) Lecourieux D., Ranjeva R., Pugin A. (2006). Calcium in plant defence-signalling pathways: Tansley review. *New Phytologist*. 171(2): 249-269.
- 34.) Lindner W. D., Lippold B. C. (1995). Drug release from hydrocolloid embeddings with high or low susceptibility to hydrodynamic stress. *Pharmaceutical Research*. 12: 1781-1785.
- 35.) Liu B., Wang Y., Yang F., Cui H., Wu D. (2017). Development of a chlorantraniliprole microcapsule formulation with a high loading content and controlled-release property. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. doi: 10.1021/acs.jafc.7b01295 [online] <<https://doi:10.1021/acs.jafc.7b01295>>. Pristupljeno 18.01.2017.
- 36.) Liu X., Xue W., Liu Q., Yu W., Fu Y., Xiong X., Ma X., Yuan Q. (2004). Swelling behaviour of alginate–chitosan microcapsules prepared by external gelation or internal gelation technology. *Carbohydrate Polymers*. 56: 459–464.
- 37.) Lopez Errasquin E., Vazquez C. (2003). Tolerance and uptake of heavy metals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge. *Chemosphere*. 50: 137-143.
- 38.) Maderuelo C., Zarzuelo A., Lanao J.,M. (2011). Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. *Journal of Controlled Release*. 154: 2-19.
- 39.) Milošević R., Kašiković N., Pavlović Ž., Stanković Elesini U., Kukuruzović D., Urbas R. (2017). Influence Of Microcapsules' Concentration On The Physical And Surface Characteristics Of The Prints. *International Printing Technologies Symposium*. [online] <<https://www.researchgate.net/publication/321532265>>. Pristupljeno 19.01.2018.

- 40.) Munin A., Edwards-Lévy F. (2011). Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics*. 3(4): 793-829.
- 41.) Ouwerx C., Velings N., Mestdagh M.,M., Axelos M. A. V. (1998). Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. *Polymer Gels and Networks*. 6: 393-408.
- 42.) Oxley J. (2015). *Microencapsulation: Guide to industrial applications*. U: Bioencapsulation innovations. Bioencapsulation Research Group. 16-17.
- 43.) Provencher S. W. (1982). CONTIN: A General Purpose Constrained Regularization Program for Inverting Noisy Linear Algebraic and Integral Equations. *Computer Physics Communications*. 27: 229-242.
- 44.) Racovită Ș., Vasiliu S., Popa M., Luca C. (2009). Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. *Revue Roumaine de Chimie*. 54(9): 709–718.
- 45.) Rodrigues J. R., Lagoa R. (2006). Copper cations ions binding in Cu-alginate gelation. *Journal of carbohydrate chemistry*. 25: 219-232.
- 46.) Roger S., Talbot D., Bee A. (2006). Preparation and effect of  $Ca^{2+}$  on water solubility, particle release and swelling properties of magnetic alginate films. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 305: 221-227.
- 47.) Roy A., Bajpai J., Bajpai A.K. (2009). Development of calcium alginate-gelatin based microspheres for controlled release of endosulfan as a model pesticide. *Indian Journal of Chemical Technology*. 16: 388-395.

- 48.) Rokstad A. M. A., Lacik I., de Vos P., Strand B. L. (2014). Advances in biocompatibility and physico-chemical characterization of microspheres for cell encapsulation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 67-68: 111-130.
- 49.) Sankalia M. G., Mashru R. C., Sankalia J. M., Sutariya V. B. (2007). Reversed chitosan-alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: optimization and physicochemical characterization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 65: 215-232.
- 50.) Sarrocco S., Raeta R., Vannacci G. (2004). Seeds encapsulation in calcium alginate pellets. *Seed Science and Technology*. 32: 649-661.
- 51.) Sartori C., Finch D. S., Ralph B. (1997). Determination of the cation content of alginate thin films by FT IR Spectroscopy. *Polymer*. 38: 43-51.
- 52.) Siepmann J., Siepmann F. (2012). Modeling of diffusion controlled drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 161: 351-362.
- 53.) Singh M.N., Hemant K.S.Y., Ram M., Shivakumar H.G. (2010). Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*. 5(2): 65–77.
- 54.) Singh T., Saikia R., Jana T., Arora D. K. (2004). Hydrophobicity and surface electrostatic charge of conidia of the mycoparasitic *Trichoderma* species. *Mycological Progress*. 3: 219-228.
- 55.) Shi P., He P., Teh T. K. H., Morsi Y. S., Goh J. C. H. (2011). Parametric analysis of shape changes of alginate beads. *Powder Technology*. 211: 60-66.
- 56.) Sonneveld C., Voogt W. (2009). Calcium nutrition and climatic conditions. U: Plant nutrition of greenhouse crops. Springer. 173-201.

- 57.) Steinbrenner U., Bratz M. (2015). Challenges for microencapsulated formulations in agriculture. U: Bioencapsulation innovations. Bioencapsulation Research Group. 14-15.
- 58.) Steyaert J. M., Weld R. J., Mendoza-Mendoza A., Stewart A. (2010). Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. *Microbiology*. 156: 2887-2900.
- 59.) Šimković M., Ditte P., Kurucova A., Lakatoš B., Varečka L. (2008) Ca<sup>2+</sup> dependent induction of conidiation in submerged cultures of *Trichoderma viride*. *Canadian Journal of Microbiology*. 54: 291-298.
- 60.) Teixeira da Silva P., Martins Fries L.L., Ragagnin de Menezes C., Tasch Holkem A., Schwan C.L., Wigmann É.F., De Oliveira Bastos J., De Bona da Silva C. (2014). Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural*. doi.org/10.1590/0103-8478cr20130971 [online] <<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20130971>>. Pristupljeno 20.01.2018.
- 61.) Topolovec-Pintarić S., Vinceković M., Jalšenjak N., Martinko K., Žutić I., Đermić E. (2017). Prototype of tomato biofertilizer: *trichoderma viride* and calcium based microcapsules. 52nd Croatian and 12th International symposium on agriculture. 100-104.
- 62.) Topolovec-Pintarić S., Žutić I., Đermić E. (2013). Enhanced growth of cabbage and red beet by *Trichoderma viride*. *Acta agriculturae Slovenica*. 101: 87-92.
- 63.) Trinci A. P. J. (1974). Culture turbidity as a measure of mould growth. *Transactions of the British Mycological Society*. 58: 467-474.
- 64.) Usmiati S., Richana N., Mangunwidjaja D., Noor E., Prangdimurti E. (2014). The Using of Ionic Gelation Method Based on Polysaccharides for Encapsulating the Macromolecules— A Review. *International Conference on Food Security and Nutrition*. 67: 79-84.

- 65.) Vinceković M., Jalšenjak N., Topolovec-Pintarić S., Đermić E., Bujan M., Jurić S. (2016). Encapsulation of biological and chemical agents for plant nutrition and protection: Chitosan/Alginate microcapsules loaded with copper cations and *Trichoderma viride*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64: 8073-8083.
- 66.) Vinceković M., Jurić S., Đermić E., Topolovec-Pintarić S. (2017). Kinetics and mechanisms of chemical and biological agents release from biopolymeric microcapsules. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65: 9608-9617.
- 67.) Viseau M. I., Edwards K., Campos C., Costa S. M. B. (2001). Spontaneous Vesicles Formed in Aqueous Mixtures of Two Cationic Amphiphiles. *Langmuir*. 16: 2105-2114.
- 68.) Vladislavljević G.T. (2012). Encapsulation application. U: *Encyclopedia of membranes*. Springer. ID: 313643. Heidelberg.
- 69.) Vreeker R., Li L., Fang Y., Appelqvist I., Mendes E. (2008). Drying and Rehydration of Calcium Alginate Gels. *Food Biophysics*. 3: 361–369.
- 70.) Vukadinović V., Lončarić Z. (1997). *Ishrana bilja – II dopunjeno izdanje*. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera. Osijek.
- 71.) Waghunde R. R., Priya J., Naik B. M., Solanky K. U., Sabalpara A. N. (2010). Optical density - A tool for the estimation of spore count of *Trichoderma Viride*. *Journal of Biopesticides*. 3: 624-626.
- 72.) White P.J., Broadley M.R. (2003). Calcium in Plants. *Annals of Botany*. 92(4): 487-511.
- 73.) Xue W. M., Yu W. T., Liu X. D., He X., Wang W. X., Ma J. (2004). Chemical method of breaking the cell-loaded sodium alginate/chitosan microcapsules. *Chemical Journal of Chinese Universities*. 25: 1342–1346.

## 8. POPIS LITERATURE

- 74.) Ye S-y., Song X-l., Liang J-l., Zheng S-h., Lin Y. (2002). Disinfection of airborne spores of *Penicillium expansum* in cold storage using continuous direct current corona discharge. *Biosystems Engineering*. 113: 112-119.
- 75.) Yoshizawa H. (2004). Trends in Microencapsulation Research. *Kona*. 22: 23–31.

## 9. SAŽETAK

Marta Bedek

### **Fizikalno-kemijska karakterizacija i mehanizmi otpuštanja *Trichoderma viride* spora i kalcijevih iona iz mikrosfera kalcijevog alginata**

Pripravljene su nove agroformulacije za simultanu isporuku kemijskog i biološki aktivnog sastojka biljkama inkapsulacijom spora *Trichoderme viride* u mikrosfere kalcijevog alginata. Utjecaj koncentracije kalcijevih iona na rast i sporulaciju *T. viride* kao i na esencijalna fizikalno-kemijska svojstva mikrosfera istražen je pri konstantnoj koncentraciji alginata. FTIR spektroskopska analiza je ukazala na složena međudjelovanja svih sastojaka u mikrosferi. Međudjelovanja kalcijevih iona i *Trichoderme viride* potiču germinaciju tijekom skladištenja u mikrosferi. Vidljivi micelij opažen oko mikrosfera nastao je germinacijom spora unutar mikrosfere i prodiranjem germ cijevi u okolinu.

Razlike u fizikalno-kemijskim svojstvima i karakteristike otpuštanja bioaktivnih sastojaka između mikrosfera pripremljenih s i bez *T. viride* pripisane su različitoj strukturi mreže gela. Kontrolni mehanizam otpuštanja *T. viride* je kombinacija difuzije, bubrenja i relaksacije polimernih lanaca (anomalna transportna kinetika). Količina spora *T. viride* u okolnom mediju je usko povezana s dva procesa; jedan je otpuštanje iz mikrosfere i drugi germinacija. Primjenom Korsmeyer–Peppasovog empirijskog modela ustanovljeno je da je Fickova difuzija kontrolni mehanizam otpuštanja kalcija. Rezultati su pokazali da se nova formulacija može koristiti kao sustav za isporuku *T. viride* i kalcija u poljoprivredi.

**Ključne riječi:** mikrosfere, *Trichoderma viride*, kalcijev ion, mehanizmi otpuštanja, agroformulacije

## 10. SUMMARY

Marta Bedek

### **Physico-chemical characterization and mechanisms of release of *Trichoderma viride* spores and calcium ions from calcium alginate microsphere**

Novel formulations for simultaneous delivery of chemical and biologically active agents to the plants were prepared by loading *Trichoderma viride* spores in calcium alginate microspheres. The impact of calcium ions concentration on the vegetative growth and sporulation of *T. viride* as well as on the essential microsphere parameters was investigated at an adjusted constant concentration of alginate. Investigation of intermolecular interactions in microspheres using FTIR spectroscopy revealed complex interactions between all components. The interactions between calcium cations and negatively charged *T. viride* spores stimulated germination during storage in microspheres. Visible mycelium observed around microspheres was generated by spore germination inside matrix and germ tubes protruding out of microspheres.

Differences in physicochemical properties and bioactive agents release characteristics between microspheres prepared without and with *T. viride* were ascribed to changes in the microsphere structure. The underlying mechanism controlling *T. viride* release from microspheres is combination of the diffusion, swelling and polymer chains relaxation (anomalous transport kinetics). The amount of *T. viride* spores in the surrounding medium is closely related to two processes, one is the release from microspheres and the other is germination. Fitting to simple Korsmeyer–Peppas empirical model revealed the rate controlling mechanism of calcium release is Fickian diffusion. The results indicated that new formulation can be used as *T. viride* and calcium delivery system in the agriculture.

**Keywords:** microspheres, *Trichoderma viride*, calcium cation, release mechanisms, agroformulation