



Istraživački rad za natjecanje iz biologije

17.ožujka 2014.

Treći razred

Učenice: Erika Dobrosravić

Ivna Vukić

Mentor: Maja Sambrailo Ivanković

Gimnazija Dubrovnik

Život u staklenoj kući



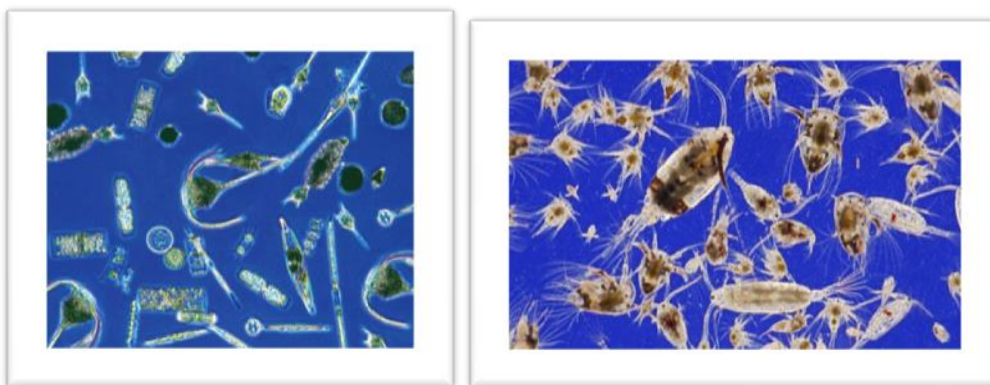
Agencija za odgoj i obrazovanje

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OBRAZLOŽENJE TEME	4
3. MATERIJAL I METODE RADA.....	5
4. REZULTATI.....	7
5. RASPRAVA	12
6. ZAKLJUČCI	14
7. SAŽETAK	15
8. POPIS LITERATURE.....	16

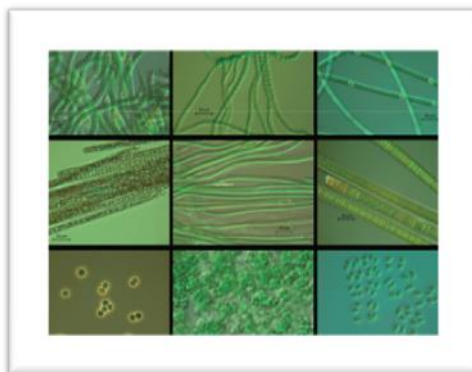
1. UVOD

Plankton je ime za organizme koji žive u stupcu vode, slabo su pokretni te njihovo gibanje ovisi o gibanju vode. Sastoji se od tri komponente: fitoplanktona, zooplanktona i bakterioplanktona (Slika 1.).



A) Fitoplankton
(preuzeto s: www.znanje.org)

B) Zooplankton
(preuzeto s: www.flickr.com)



C) Bakterioplankton
(preuzeto s: www.els.net)

Slika 1. Tri komponente planktona: A) Fitoplankton B) Zooplankton C) Bakterioplankton

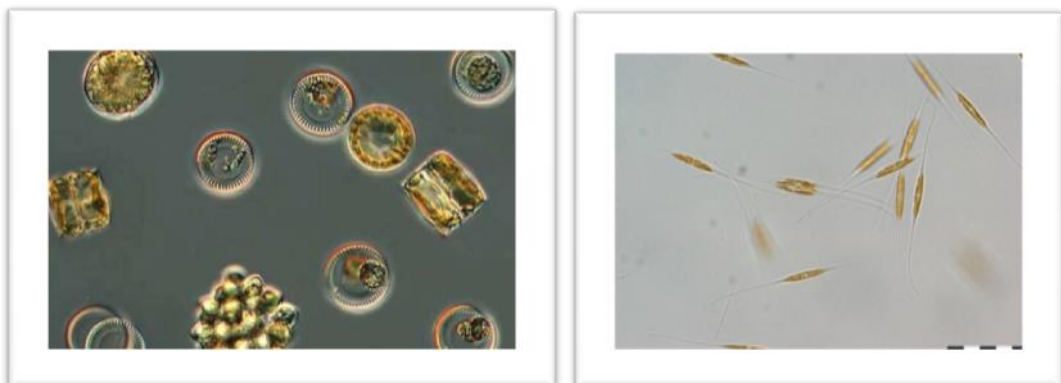
Fitoplankton, autotrofni plankton, razvija se u površinskom dijelu oceana (do dubine od oko 150 m) gdje ima dovoljno svjetlosti za njegov razvoj. Fitoplankton je odgovoran za 95% fotosinteze u oceanima i veže 40% ugljika u biosferi (Falkowski, 1994.). Sastoji se od jednostaničnih alga, čije su stanice povezane u kolonije te od jednostaničnih i višestaničnih cijanobakterija. Razvija se u moru, jezerima i u drugim kopnenim stajaćicama te u velikim rijekama, odakle može dospjeti u ušća.

S obzirom na veliki raspon veličine stanice, fitoplankton se dijeli na tri veličinske frakcije (Sieburth i sur., 1978.):

1. mikroplankton (stanice $> 20 \mu\text{m}$)
2. nanoplankton (stanice $2 - 20 \mu\text{m}$)
3. pikoplankton (stanice $0,2 - 2 \mu\text{m}$).

Razred Bacillariophyceae (sin. Diatomeae), skupina su poznata i pod nazivom alge kremenjašice. Pripadaju odjeljku Chrysophyta, tj. zlatnožutih algi. Najuspješnija su grupa eukariotskih fitoplanktona u oceanu i odgovorne su za 25 % globalne primarne produkcije (Round, F. E. i sur., 1990.).

Žive pojedinačno ili u kolonijama. Nalazimo ih na svim vlažnim mjestima, u moru, u bočatoj i slatkoj vodi. Smeđa boja ovih algi proizilazi od karotenoida fukoksantina prisutnog uz klorofil a i c. S obzirom na ravninu simetrije razlikujemo dvije glavne skupine algi kremenjašica: centrales (radijalna simetrija stanice) i penales (bilateralna simetrija stanice) (Slika 2.).



A) Centrales
(preuzeto s: www.biolib.cz)

B) Penales
(foto. S. Ljubimir)

Slika 2. Razlike u izgledu algi kremenjašica s obzirom na simetriju: A) centrales B) penales

Najprepoznatljivija karakteristika algi kremenjašica jest građa "kućice" građene od SiO_2 s dvjema ljušturicama koje se preklapaju poput kutije i poklopca (Viličić, 2002.). Gornja se naziva epiteka, a donja hipoteka.

Alge kremenjašice se razmnožavaju vegetativno uzastopnim diobama pri čemu se uvijek sintetizira manja ljušturica kućice, odnosno, hipoteka jedne alge postaje epiteka druge. U većini vrsta, jednom kada je postignuta kritična veličina (30% -

40% maks. veličine), ispod koje mitotska dioba više nije moguća, obnova veličine događa se putem spolnog razmnožavanja (Edlund i Stoermer, 1997.). Tada dolazi do pojave pokretnih haploidnih muških gameta i nepokretne haploidne jajne stanice. Spolno razmnožavanje algi kremenjašica često je inducirano izlaganjem nepovoljnim okolišnim uvjetima poput pada temperature ili koncentracije dušika te, u nekih vrsta, promjenom svjetlosnih uvjeta.

Za razvoj algi, kao i za razvoj ostalih organizama potrebna je prisutnost glavnih biogenih elemenata i elemenata u tragovima. Morski fitoplankton, pogotovo alge kremenjašice koje dominiraju u toj zajednici imaju važnu ulogu u globalnom biokemijskom kruženju ugljika, kisika, dušika, fosfora, silicija i drugih kemijskih elemenata (Willen, 1991.). Oni u velikoj mjeri modificiraju stanice fitoplanktona. Autotrofi trebaju dušik za sintezu aminokiselina i drugih dušikovih spojeva. Fosfor dolazi u fosfolipidima, nukleinskim kiselinama, ATP-u te NADP-u.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Fitoplankton ima veliko značenje u biogeokemijskim procesima u biosferi, govoreći prvenstveno o njihovoj sposobnosti obavljanja fotosintetskih procesa koji su važni za raspodjelu plinova u vodenim ekosustavima. Nadalje, važan je i za objašnjenje eutrofikacije, stvaranje sluzavih nakupina, nakupljanje toksina u životinjama filtratorima, a njegovo je rasprostranjenje rezultat međudjelovanja mnogih ekoloških čimbenika.

Željeli smo utvrditi što je sve potrebno za uzgoj fitoplanktona, koje svojste fitoplanktona bi se najlakše mogle uzgojiti te koji od dijelova medija za uzgoj će imati ključan utjecaj na razvoj organizama i veličinu populacije. Također, budući da je Dubrovnik turistički grad te su morski organizmi u doticaju s tvarima koje su posljedica turizma (npr. nafta), odlučili smo provjeriti koji je njihov utjecaj na razvoj fitoplanktona.

Naša pretpostavka je kako će se najlakše uzgojiti alge kremenjašice, jer su većinom kozmopolitske vrste koje nalazimo na svim vlažnim mjestima, u moru, u bočatoj i slatkoj vodi, a ujedno predstavljaju većinski dio makrofitoplanktona u Jadranskom moru.

Druga pretpostavka je kako će njihov razvoj biti smanjen ukoliko iz standardnog medija uklonimo jedan od važnih tvari te kako će najviše utjecati manjak silicija, zbog njegove uloge u izgradnji kućice algi. Također očekivamo i smanjenje rasta populacije u kontaktu s potencijalnim toksikantima zbog njihovog kemijskog sastava koji može utjecati direktno na razvoj organizama te mijenjanja ekoloških čimbenika oko populacije.

Alge kremenjašice su kao predstavnici fitoplanktona odgovorne za 25% globalne primarne produkcije. Zanimljive su, također, i zbog stvaranja kremene zemlje koja se upotrebljava u industriji eksploziva, stakla, izolacijskih materijala i u analitičkoj kemiji. Izdvojili bismo i njihovu važnost kao jednog od najdjelotvornijih prirodnih insekticida u obliku dijatomejske zemlje te veliki interes za proizvodnju biogoriva

upravo iz algi, kako bi se pokušala smanjiti emisija stakleničkih plinova nastalih korištenjem dosadašnjih goriva.

3. MATERIJAL I METODE RADA

Uzorkovanje je provedeno mrežicom promjera oka svile 20 μm , na postaji Porporela u Dubrovniku, 4,5 m od obale na dubini od 2,5 m.

Stanice su izolirane na dva načina:

1. Serijom decimalnog razrjeđenja, gdje se u jažice na pločici za uzgoj kultura stavi medij za uzgoj te se mikropipetom uzme uzorak i decimalnom serijom razrjeđuje do zadnje jažice.
2. Mikropipetom pod mikroskopom, gdje se mikropipetom uzme uzorak, na predmetno stakalce se stavi jedna kapljica te se pod mikroskopom traži stanica koja se izolira mikropipetom iz uzorka i prenese na novo predmetno stakalce s medijem. Taj se postupak ponavlja dok se ne izolira željena stanica.

Nasađene stanice stavljene su u komoru s kontroliranim uvjetima svjetlosti (dan-12 sati, noć-12 sati) i temperaturom (22°C).

Uzorci su kontrolirani svako 7 dana i po potrebi je razrjeđivan uzorak i dodavan medij.

Medij korišten u ovom pokusu je standardni f/2 medij za uzgoj fitoplanktona čiji su glavni sastojci silicij, dušik, fosfor, vitamini i metali u tragovima.

Nakon 21 dana izolirane su najbolje prilagođene vrste te su dobivene monokulture.

Detreminacija je izvršena uz pomoć priručnika Viličić (2002.) do roda, a determinacija vrste uz pomoć Witkowskog i sur. (2000.).

Monokulture su se nastavile uzgajati u staklenim bocama s dodatkom zraka pomoću pumpe za zrak, dobivajući njihove veće količine.

Tijekom 15 dana je određivana veličina populacije brojanjem.

Nakon toga, proveden je pokus utvrđivanja utjecaja nedostatka jedne od komponenti standardnog f/2 medija na daljnji razvoj populacije.

Uzorak je podijeljen u 15 zdjelica (po tri za svaki promatrani slučaj). U 3 slučaja je dodavan medij bez NaSiO_3 (jedan u staklenoj Petrijevoj zdjelici, dva u plastičnoj zdjelici), NaH_2PO_4 (u tri staklene Petrijeve zdjelice) odnosno NaNO_3 (u tri staklene Petrijeve zdjelice) te u četvrti uzorak toksikant u obliku nafte (u tri plastične posude). Peti slučaj služio je kao kontrolni uzorak sa standardnim f/2 medijem bez dodatka toksikanata (dva u staklenoj Petrijevoj zdjelici, jedan u plastičnoj zdjelici).

U staklene posude stavljeno je 10 ml profiltriranog mora s dodatkom 30 μl f/2 medija, a u plastične 5 ml mora s dodatkom 15 μl f/2 medija. U oba slučaja stavljen je jednak broj jedinki (125 500). U uzorku s naftom, u 5 ml mora s dodatkom 15 μl medija, stavljeno je 45 000 jedinki i dodano 1 ml nafte.

Tijekom 14 dana je određivana veličina populacije brojanjem.

Brojanje stanica provedeno je brojanjem u komorici za brojanje (Neubauer) na sljedeći način:

10 μl uzorka uzme se mikropipetom i stavi u komoricu prekrivenu pokrovnim stakalcem. Komorica se stavi pod mikroskop i izvrši se brojanje po kvadratima. Za računanje koncentracije u ovom slučaju, kod brojanja u velikim kvadratima, korištena je sljedeća formula:

$$\text{Koncentracija} = \text{Broj stanica} \times 10.000 / \text{Broj kvadrata}$$

Statistička analiza provedena je metodom linearne regresije, testiranjem F-omjerom te T-testom. Prva analiza izvedena na podacima je Kolmogorov-Smirnov normality test, koji pokazuje jesu li podaci u skupinama raspoređeni prema modelu Gauss-ove raspodijele. ANOVA ili analiza varijance ispituje razliku između skupina podataka uspoređujući varijancu svake pojedine skupine (unutarnje razlike između

mjerenja u skupini ili neobjašnjivu varijancu) i varijancu svih analiza objedinjenih u jednu skupinu (objašnjiva varijanca). Podaci su obrađeni u programu Statistica.

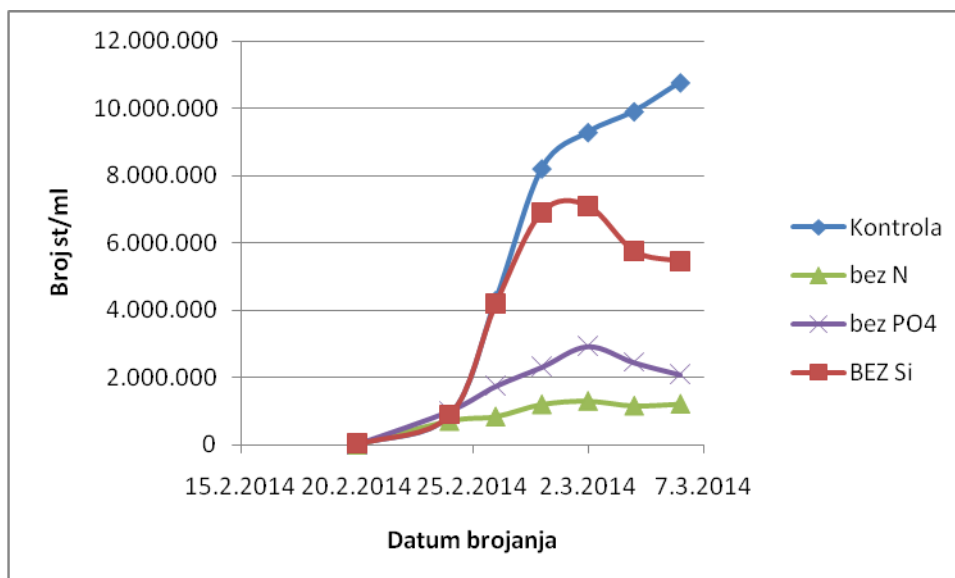
4. REZULTATI

Ovim istraživanjem uspješno je uzgojena alga iz razreda Bacillariophyceae u monokulturi. Riječ je o vrsti *Nitzschia closterium* W. Sm (Slika 3.).



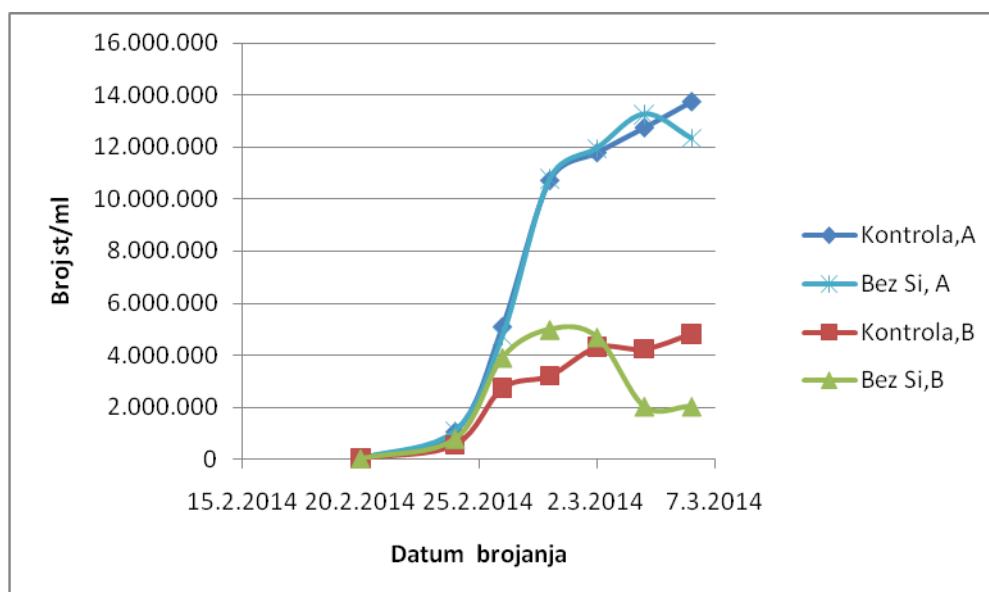
Slika3. Alga *Nitzschia closterium* W. Sm pod mikroskopom

Nadalje, nakon provedenog pokusa utvrđivanja utjecaja nedostatka jedne od komponenti medija na daljnji razvoj populacije dobiveni su sljedeći rezultati prikazani na slikama 5. i 6. Na slici 5. se vidi smanjenje populacije kod sva tri slučaja u usporedbi sa kontrolnim uzorkom. Najmanji rast zabilježen je pri nedostatku dušika.



Slika 5. Srednje vrijednosti rasta populacije u 4 različita slučaja

Na slici 6. vidljive su značajne razlike između rasta populacije u plastičnim i staklenim posudama te znatno veće smanjenje populacije u plastičnoj posudi s nedostatkom silicija.



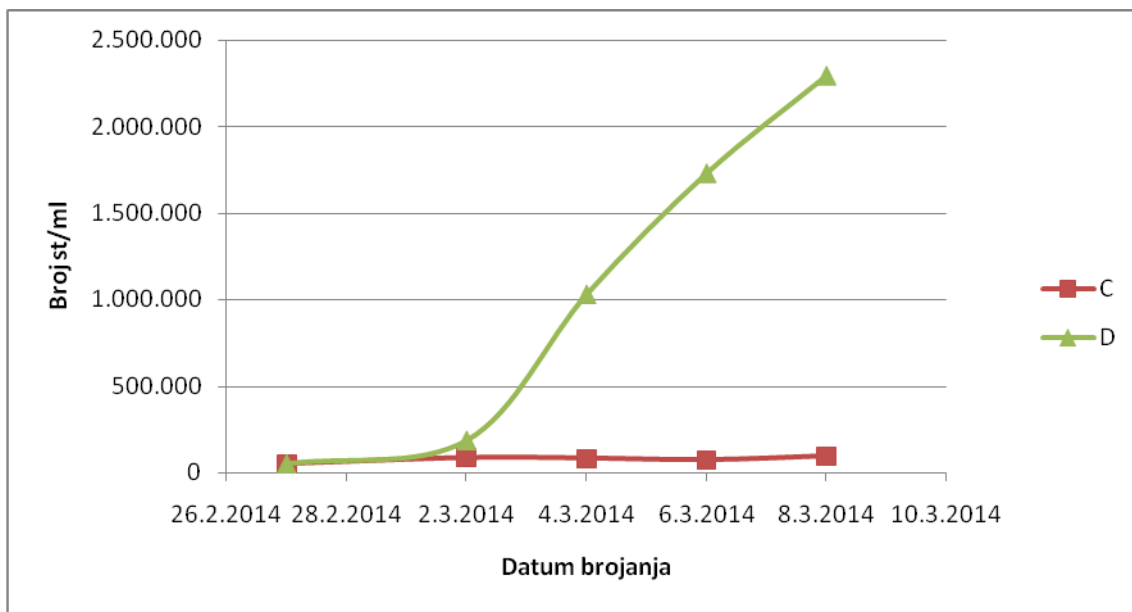
Slika 6. Usporedba rasta populacije u kontrolnom uzorku i u uzorku bez dodatka silicija u slučajevima A i B.

Legenda:

A- Uzorak u staklenoj Petrijevoj zdjelici

B- Uzorak u plastičnoj Petrijevoj zdjelici

Nakon provedenog pokusa o utjecaju toksikanta u obliku nafte na razvoj populacije dobiveni su sljedeći rezultati prikazani na slici 7. Zabilježen je neznatan rast populacije i stagnacija u uzorku s dodatkom nafte u odnosu na kontrolni uzorak.



Slika 7. Usporedba rasta populacije pod utjecajem toksikanta s kontrolnim uzorkom

Legenda:

C– Srednja vrijednost uzorka s dodatkom nafte

D- Kontrolni uzorak bez dodatka nafte

Prva analiza izvedena na podacima je Kolmogorov-Smirnov normality test, koji pokazuje jesu li podaci u skupinama raspoređeni (distribucija) prema modelu Gauss-ove raspodjele. Test je pokazao da je raspodjela podataka u okviru normalne raspodjele: $K-S-d(\text{staklo1})=0,31688$; $K-S-d(\text{staklo2})= 0,22284$; $K-S-d(\text{plastika})= 0,15963$. Ovo znači da se podaci mogu tretirati kao "normalni" i pristupiti daljnjoj statistici u parametrijskom načinu. Parametrijska analiza uzima u obzir više informacija o pojedinoj skupini podataka i pouzdanija je od neparametrijske za normalno distribuirane podatke.

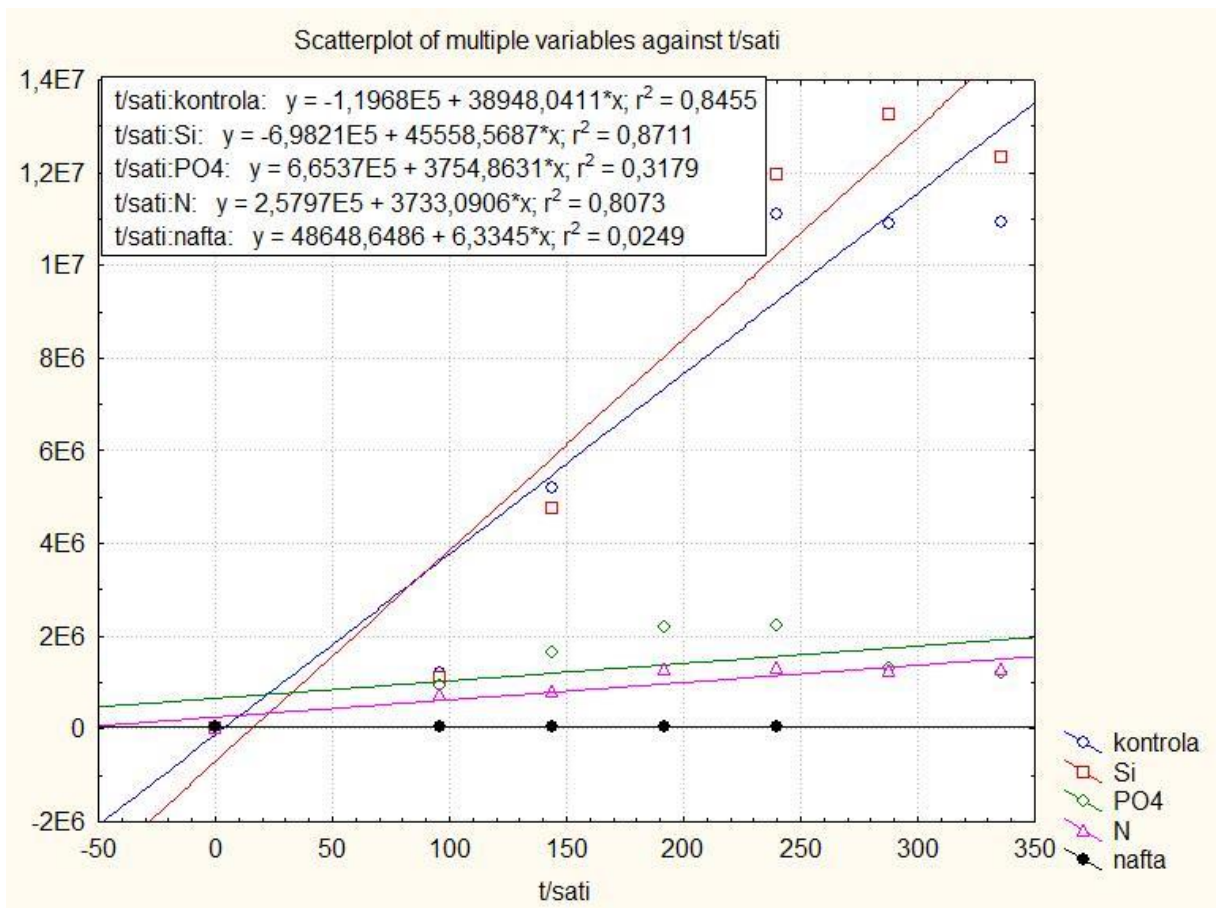
ANOVA ili analiza varijance ispituje razliku između skupina podataka uspoređujući varijancu svake pojedine skupine (unutarnje razlike između mjerenja u skupini ili neobjašnjivu varijancu) i varijancu svih skupina u analizi objedinjenih u jednu skupinu (objašnjiva varijanca). Neobjašnjiva var./ objašnjiva var.= F odnos ili F statistika ANOVA analize. Uz taj se rezultat još navodi i P ili stopa pouzdanosti (PR. $P < 0,05$ znači 99,5 % vjerojatnost da je nešto tako kako je ANOVA opisala).

ONE-way ANOVA usporedba uzgajanih populacija u staklu sa limitirajućim čimbenicima (SI, PO_4 i N) je pokazala, uz $F=31,49776$ i $p < 0,01$ ($P=0,000005$) izrazito značajnu razliku u rastu između kontrolne skupine i skupina sa limitirajućim čimbenicima. Sama ANOVA kazuje da razlika postoji, ali ne i njen položaj, odnosno koje se skupine najviše razlikuju od reference (kontrolna skupina). Daljnja analiza je Post-hoc i ona otkriva gdje je razlika najveća. Skupina kontrolnog uzorka i uzorka bez silicija se značajno razlikuju od skupina bez PO_4 , N i nafte, dok se uzorci bez PO_4 , N i nafte međusobno ne razlikuju.

Usporedba materijala spremnika također, uz pomoć ANOVA analize potvrdila je mogućnost iskorištavanja silicija iz stakla. ANOVA za utjecaj plastike na rast je pokazala, uz $F= 15,90619$ i $p < 0,01$ ($0,000275$) da plastika, značajno utječe na usporenje rasta algi.

Linearna regresijska analiza i scatterplot su pokazali stopu rasta (reg. koeficijent) koja se značajno razlikuje od skupine do skupine, ali je za kontrolu i uzorak bez silicija najbliža, još jedan dokaz korištenja silicija iz stakla.

Na slici 8. vidimo regresijski polinom oblika: $y=a+bx$, gdje je y broj stanica algi, a je intercept (točka na kojoj pravac rasta siječe y os za $x=0$), b je reg. koeficijent ili u ovom slučaju stopa rasta populacije i c je točka na x osi, odnosno interval vremena. r^2 je kvadrat korelacijskog koeficijenta i govori o jačini veze između rasta i utjecaja, što je on bliži broju 1 to je veza jača.



Slika 8. Regresijski polinom oblika: $y=a+bx$.

5. RASPRAVA

Od svih vrsta u prvobitnom uzorku najuspješnije se razvila zlatnožuta alga iz razreda Bacillariophyceae, vrsta *Nitzschia closterium* W. Sm., jer su joj najbolje odgovarali zadani uvjeti. Moguće je da, kada bismo pokus provodili u nekom drugom razdoblju u godini, bi se razvila neka druga vrsta algi zbog različitih uvjeta temperature, svjetlosti i količine nutrijenata. Temperatura ima statistički značajan učinak na sezonsku distribuciju algi kremenjašica u moru (Jasprica i Carić, 2001.).

Prema rezultatima na slici 5. vidljiva je važnost dušika kao sastavnice medija za uzgoj fitoplanktona. Naime, prema Redfieldu, (1934.), omjer potrebnog ugljika, dušika i fosfora za normalan metabolizam stanice je C:N:P=106:16:1, iz čega je vidljivo kako su potrebe za dušikom veće od potreba za fosforom te je razumljivo da je najmanje povećanje populacije zabilježeno upravo pri nedostatku dušika. Ovo potvrđuje i podatak kako je u istočnom Sredozemlju dušik najvažniji limitirajući element rasta fitoplanktona, što je utvrđeno pomoću biotesta (Ignatiades i Moschopoulou, 1988.). Također je Brzezinski, 1985. primijenio Redfieldov omjer na alge kremenjašice, uključujući silicij kao limitirajući čimbenik. Zaključio je da je stanici potrebno približno jednako silicija kao i dušika te upotpunio omjer C:Si:N:P=106:15:16:1. U sva tri slučaja, kod izostanka silicija, dušika i fosfora vidljivo je smanjenje populacije što se može objasniti narušavanjem Redfieldovog omjera.

Prema rezultatima na slici 6. vidljive su značajne razlike razvoja populacije u plastičnim posudama u odnosu na staklene Petrijeve zdjelice. Ovo se može objasniti razlikom u anatomiji posuda, jer plastične onemogućavaju veće količine dotoka zraka, odnosno CO₂, koji je važan za proces fotosinteze kojim alge proizvode hranu i omogućavaju rast i razvoj populacije.

Također, vidljivo je veće smanjenje populacije u uzorku s nedostatkom silicija u plastičnoj posudi u odnosu na smanjenje u uzorku u staklenoj Petrijevoj zdjelici. Naša pretpostavka je, kako bi razlog ovome mogao biti u tome što plastika u svom

sastavu ne sadrži silicij, a staklo sadrži te su alge mogle na neki način koristiti silicij iz stakla. Potvrda tome jest, prema rezultatima, da se populacija u kontrolnom uzorku u plastičnoj posudi nastavila razvijati, dok je u uzorku s nedostatkom silicija u takvoj posudi zabilježen nagli pad populacije. Nadalje, u plastičnoj posudi s nedostatkom silicija, zabilježen je porast populacije koji bi se mogao objasniti korištenjem zaliha silicija u organizmima u uzorku i eventualnom dostatnosti istog silicija dok se alge nesporno razmnožavaju.

Rezultati na slici 7. potvrđuju našu pretpostavku kako će dodatak nafte smanjiti rast populacije. Smatramo kako je razlog tome sprječavanje izmjene plinova između okoline i stanice. Daljnjim istraživanjima moglo bi se utvrditi leži li uzrok u nekom od sastojaka nafte koji bi mogli utjecati ili čak biti pogubni za same organizme.

6. ZAKLJUČCI

- Od uzetog uzorka morskog fitoplanktona najlakše se uzgojila zlatnožuta alga iz porodice Bacillariophyceae *Nitzschia closterium* W. Sm.
- Nedostatak dušika, fosfora ili silicija uzrokuje smanjenje rasta populacije *Nitzschia closterium* W. Sm.
- Dušik je najvažniji limitirajući čimbenik za razvoj populacije *Nitzschia closterium* W. Sm.
- Rast populacije *Nitzschia closterium* W. Sm. u staklenim posudama je veći nego u plastičnim.
- U uzorku s dodatkom nafte zaustavljen je rast populacije.

7. SAŽETAK

Fitoplankton, kao sastavnica planktona, je odgovoran za 95% fotosinteze u oceanima i veže 40% ugljika u biosferi. Najučestalija skupina eukariotskog fitoplanktona u oceanu je razred Bacillariopyceae (sin. Diatomeae), skupina poznata i pod nazivom alge kremenjašice. Stvaraju kremenu zemlju koja se upotrebljava u industriji eksploziva, stakla, izolacijskih materijala i u analitičkoj kemiji; upotrebljavaju se kao pesticidi, a posebni interes izazivaju među proizvođačima biogoriva.

Željeli smo utvrditi što je sve potrebno za uzgoj fitoplanktona, koje će se vrste najlakše uzgojiti, hoće li izuzimanje dijelova medija za uzgoj te dodatak toksikanta, djelovati na razvoj populacije. Pretpostavili smo da će se najprije razviti alge kremenjašice te da će izostanak ključnih dijelova medija za uzgoj - silicija, dušika i fosfora, kao i dodatak toksikanta utjecati na razvoj populacije.

Istraživanje mogućnosti uzgoja fitoplanktona i daljnjeg rasta populacije odvijalo se u tri faze. Prva faza je uključivala uzimanje uzorka na postaji Porporela, izolaciju i nasađivanje pojedinačnih stanica sa standardnim medijem za uzgoj algi f/2 te determinaciju. Vrsta koju se najlakše uspjelo uzgojiti je *Nitzschia closterium* W. Sm. U drugoj fazi istraživanja, koja je uključivala daljnji razvoj populacije uz nedostatak dušika, fosfora ili silicija, utvrdilo se kako odsutstvo bilo kojeg od ta tri elementa uzrokuje smanjenje rasta populacije. Najmanji rast je utvrđen pri nedostatku dušika. Također je utvrđeno kako je rast populacije veći u staklenim posudama nego u plastičnim. Treća faza istraživanja se sastojala od dodavanja nafte kulturi *Nitzschia closterium* W. Sm. Potvrđena je naša pretpostavka kako će se znatno smanjiti rast populacije, dapače, rast je bio zaustavljen.

8. POPIS LITERATURE

- Brzezinski, M. A. 1985. The Si:C:N ratio of marine diatoms: interspecific variability and the effect of some environmental variables. *Journal of Phycology*, Vo. 21, 347 – 357.
- Edlund, M. B., Stoermer, E. F. 1997. Ecological, evolutionary and systematic significance of diatom life histories. *Journal of Phycology*. Volume 33, Issue 6, 897 – 918.
- Falkowski, P. G. 1994. The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynth. Res.* 39, 235 – 258.
- Ignatiades, L., Moschopolou, N. 1988. Nitrogen as a factor affecting algal growth potential of an oligotrophic coastal environment of eastern Mediterranean Sea. *Int. Revue Ges. Hydrobiol.* 73, 457 – 464.
- Jasprica, N., Carić, M. 2001. Planktonic diatoms and their relation to environmental factors at three stations in the southern Adriatic, Mediterranean Sea. In: Jahn, R., Kociolek, J. P., Witkowski, A., Compere, P. (eds.), Lange – Bertalot Festschrift: Studies on diatoms, 513 – 536. Ganter Ruggell, Berlin.
- Redfield, A.C. 1934. On the proportions of organic derivations in sea water and their relation to the composition of plankton. In James Johnstone Memorial Volume. (ed. R. J. Daniel). University Press of Liverpool, 177 – 192.
- Round, F. E. i sur. 1990. The diatoms. Biology and morphology of the genera. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sieburth, J. M. i sur. 1978. Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size – fractions. *Limnol. Oceanogr.* 23, 1256 – 1263.
- Viličić, D. 2002. Fitoplankton Jadranskog mora, Školska knjiga, Zagreb.
- Willen, E. 1991. Planktonic diatoms – an ecological review. *Algol. Stud.* 62, 69 – 106.
- Witkowski, A. i sur. 2000. Diatom flora of marine coasts I. *Iconographia diatomologica*, vol. 7. (H. Lange-Bertalot, editor).