



Hrvatsko biološko društvo
Societas biologorum croatica

BioZnalac

časopis ućenićkih istraživanja iz biologije

Broj 3

2017.



Pokrovitelj:



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Biološki odsjek

ISSN 1849-837X

BIOZNALAC



časopis učeničkih istraživanja iz biologije

Izdavač

Hrvatsko biološko društvo

Rooseveltov trg 6 , 10000 Zagreb

URL: <http://www.hbd-sbc.hr/>

E-mail: info@hbd-sbc.hr

SOCIETAS BIOLOGORUM CROATICA



Hrvatsko biološko društvo

ISSN 1849-837X

Uredništvo časopisa Bioznanalac

Glavni urednik

Ines Radanović, ines.radanovic@biol.pmf.hr

Operativni urednici

Mirela Sertić Perić, mirela.sertic.peric@biol.pmf.hr

Marina Ništ Marina.Nist@azoo.hr

Žaklin Lukša, zaklinluksa@gmail.com

Recenzenti

*Majana Engelbrecht, Sanja Fabac, Petra Korać, Irena Labak, Duje Lisičić, Andreja Lucić, Anita Mustać,
Zorana Sedlar, Mirela Sertić Perić*

Web urednik

Renata Horvat, renata.horvat@biol.pmf.hr

Bioznanalac je elektronički časopis na web stranici HBD-a
i izlazi najmanje jednom godišnje

SADRŽAJ

Članak	Autori	Naslov rada	Razred	Mentor	Naziv škole	Stranice
1	Hani Pačalat Nola Mikalević	ŠTO BILJKE SLUŠAJU?	7.	Maja Curić	OŠ Vladimira Nazora Pazin	1-10
2	Nika Klanfar Ela Šukurma	KLIJAVOST SJEMENJA PŠENICE (<i>Triticum aestivum</i> L.) I KUKURUZA (<i>Zea mays</i> L.) NAKON TRETIRANJA BILJNIM PRIPRAVCIMA	7.	Sandra Penco	Osnovna škola Augusta Šenoa, Zagreb	11-22
3	Emo Gajski	UTJECAJ IONA ŽELJEZA, MAGNEZIJA I KALCIJA NA RAST I RAZVOJ GRAŠKA (<i>Pisum sativum</i> L.)	7.	Đurđica Patafta	OŠ Kustošija, Zagreb	23-31
4	Nadja Novak Sara Trnovčanec	UTJECAJ KISELIH KIŠA NA BILJNI SVIJET TRAVNJAKA	7.	Nataša Pongrac	OŠ Strahoninec	32-41
5	Lucija Puharić	INVAZIVNE BILJNE VRSTE JUŽNOG I ŽUMBERAČKOG NASELJA GRADA SAMOBORA	7.	Diana Vlahović	OŠ Bogumila Tonija, Samobor	42-53
6	Lucija Tomić Ivana Bucić	UTJECAJ VRSTE MLIJEKA NA BROJNOST DOBRIH BAKTERIJA U KEFIRU	7.	Ana Katalinić Bach	OŠ Starigrad	54-60
7	Emo Volar Jakov Uzelac	STANIŠTA BREGUNICE (<i>Riparia riparia</i> L.) U OKOLICI ZAGREBA	8.	Nataša Kletečki	OŠ Bogumila Tonija Samobor	61-68
8	Julija Prevedan Lucija Vargović	ISPITIVANJE POJAVE POREMEĆAJA REFRAKCIJE OKA KOD UČENIKA U OSNOVNOJ ŠKOLI	8.	Jasna Razlog-Grlica	OŠ Ivane Brlić- Mažuranić, Virovitica	69-82
9	Nika Agostelli	FLORA I FAUNA LIŽNJANSKOG AKVATORIJA	8.	Natalija Zoričić	OŠ dr. Mate Demarina, Medulin	83-95
10	Lana Paulić Antonela Pandur	UTJECAJ PRIRODNIH TVARI NA SMANJENJE PLIJESNIVOST NA SVJEŽEM VOĆU I POVRĆU	8.	Slađana Cvitičanić	OŠ Grabrik, Karlovac	96-105
11	Tea Konosić Nika Jurković	ANTIBAKTERIJSKI ILI OBIČNI - PITANJE JE SAD	8.	Barbara Stepanić	OŠ Brezovica, Zagreb	106-115
12	Melita Dubravčić	PROPUH U ŽIVOTU BILJAKA I LJUDI	8.	Kristina Vujčić Teskera	Osnovna škola Retkovec, Zagreb	116-127
13	Natalija Frančin Sanja Skok	FITOTERAPIJOM PROTIV VIRUSA	1.	Dušica Dorčić	Gimnazija i strukovna škola Jurja Dobrile, Pazin	128-137
14	Nikola Pischiutta	UTJECAJ DOMAĆE I TVORNIČKE HRANE NA RAZVOJ I PONAŠANJE PILIČA (<i>Galus galus domesticus</i> L.)	2.	Romana Halapir Franković	V. gimnazija, Zagreb	138-148
15	Aurora Vareško	ISPITIVANJE MUTAGENOSTI ANTIPERSPIRANATA I DEZODORANSA NA KORJENČICIMA LUKA	2.	Ivana Burić	Gimnazija Pula	149-160
16	Maja Novosel Jelena Trbara	DOBRI ILI LOŠI SUSJEDI U VAŠEM VRTU	3.	Bojana Davda Sirovina	II. Gimnazija, Zagreb	161-183
17	Ivor Vice Bulaja Ante Cvitan	PREOBRAZBA TVRDOKRILCA <i>Zophorbas morio</i> U RAZLIČITIM UVJETIMA	3.	Željko Krstanac	Prirodoslovna škola Vladimira Preloga, Zagreb	184-191
18	Borna Branimir Vuković	NEKODIRAJUĆE RNA: MOLEKULE U POZADINI STANIČNOG RAZVOJA	3.	Petra Međeral Ozimec	V. gimnazija, Zagreb	192-201
19	Marin Biliškov Josip Ivica	USPOREDBA KEMOKINEZE U ORGANIZMIMA <i>Amoeba proteus</i> I <i>Arcella vulgaris</i>	3.	Ines Alujević	III. gimnazija, Split	202-212
20	Kijara Pauletić Valentina Puškadija	UTJECAJ FOLIJARNE GNOJIDBE DUŠIKOM NA PRINOS I KVALITETU BRGUJSKOG KUPUSA (<i>Brassica oleracea</i> L. var. capitata)	3.	Marija Žužić	Srednja škola Mate Balota, Poreč	213-218

Članak	Autori	Naslov rada	Razred	Mentor	Naziv škole	Stranice
21	Angela Jajčević	PLUTAJUĆI MIKROFITI KAO BIOINDIKATORI OTPADNIH VODA	3.	Sanja Penić	Medicinska škola, Karlovac	219-229
22	Edvard Bedoić	RAST I RAZVOJ IZDANKA I KVRŽICA GRAŠKA (<i>Pisum sativum</i> L.) OVISNO O PODRIJETLU SJEMENA I VRSTI TLA	4.	Vesna Burušić	V. gimnazija, Zagreb	230-241
23	Veronika Ilić Dina Cvitanović	UTJECAJ OTPADNE VODE IZ PRERADE MASLINA NA PROMJENE U MITOZI <i>Allium cepa</i> L. i <i>Vicia faba</i> L.	4.	Josipa Poduje	Srednja škola Antun Matijašević Karamaneo, Vis	242-256
24	Pamela Bubaš	UTJECAJ BILJNIH AKTIVNIH TVARI NA SPOSOBNOST OKSIDACIJE MELANINA VODIKOVIM PEROKSIDOM		Ines Tovarović	Gimnazija Petra Preradovića, Virovitica	257-266

ŠTO BILJKE SLUŠAJU?

Nola Mikalević, 7. razred

Hani Pačalat, 7. razred

Osnovna škola Vladimira Nazora, Pazin

Mentor: Maja Curić

SAŽETAK

Cilj ovog istraživačkog rada bio je istražiti utjecaj zračenja mobitela i različite vrste glazbe na klijavost, rast i biomasu graška. U svaku od 5 prozirnih plastičnih posuda stavile smo po dvije manje posudice u koje smo prethodno posijale jednak broj sjemenki graška i osigurale im jednake životne uvjete (temperatura, vlaga, intenzitet sunčeve svjetlosti, hranjiva podloga) te ih izložili redom: zračenju, heavy metal glazbi, klasičnoj i rock glazbi u jednakom trajanju i glasnoći glazbe dok je 5. posuda bila bez mobitela i služila nam je kao kontrola. U prvoj posudi se nalazio mobitel koji je tijekom primanja poziva emitirao zračenje kojem je bio izložen grašak. Zračenje mobitela štetno je djelovalo na klijavost, rast i biomasu graška te je u svim ovim parametrima uočen značajan pad u odnosu na kontrolu, a pogotovo u odnosu na klasičnu glazbu. U takvim uvjetima biljke koje su rasle u posudi izloženoj klasičnoj glazbi imale su najveći postotak klijavosti, kao i najveću biomasu. Budući da dosadašnja istraživanja daju oprečne rezultate kad je u pitanju utjecaj zračenja mobitela na biljke (vjerojatno zbog intenziteta zračenja), potrebna su dodatna istraživanja da se preciznije odrede uvjeti pri kojima zračenje djeluje korisno, a u kojima štetno. U prilog tome ide i činjenica da je maseni udio suhe tvari graška na koji je djelovalo zračenje mobitela dvostruko manji od masenog udjela suhe tvari graška u svim ostalim posudama. Što se tiče utjecaja glazbe heavy metal glazba povećava rast biljaka, klasična glazba povećava vlažnu i suhu biomasu biljaka, dok rock glazba nakon određenog vremena uzrokuje uvenuće biljaka. Iz tih činjenica proizlazi da vrsta glazbe ima pozitivan ili negativan utjecaj na razvoj biljaka čime smo dokazale našu početnu hipotezu.

Ključne riječi: zračenje mobitela, vlažna biomasa, suha biomasa, maseni udio suhe tvari, glazba, grašak

UVOD

Pozitivan utjecaj glazbe na ljude svima je već dobro poznat. Utječe li glazba jednako dobro i na biljke? Čuju li nas biljke? Kakvu bi glazbu slušale?

Ideju za ovaj rad dobile smo dok smo sjedile u školskom parku i slušale glazbu na mobitelu. Puštale smo vrlo glasnu glazbu, te se u jednom momentu zapitale: Smeta li ova glasna glazba biljkama? Smeta li zračenje mobitela biljkama? Stoga smo odlučile to i istražiti. Proučavanjem literature i dostupnih podataka na internetu saznale smo mnogo korisnih i zanimljivih informacija o biljkama i o tome kako mobiteli i glazba utječu na njih.

Sharma (2016.) iznosi niz istraživanja o utjecaju glazbe na biljke u kojima ističe niz razloga zašto glazba utječe na biljke. Jedan od njih je da glazba na određenoj frekvenciji aktivira gene koji potiču rast biljaka. Drugi da glazba utječe na povećanje otvora puči te da stimulira izmjenu kisika i ugljikovog dioksida. Treći je da potiče gibanje citoplazme što doprinosi bržem protoku tvari. Retallack (1973.) također uspoređuje utjecaj različitih vrsta glazbe na rast biljaka ističući pritom da učinak glazbe ovisi o biljnim vrstama, vrsti glazbe te vremenu izloženosti glazbi. Prema Sharmi (2016.) rock glazba oštećuje biljku, biljke se često nagnu od izvora glazbe, a ponekad i uvenu. Klasična glazba poboljšava rast biljaka i biljke su zelenije. Heavy metal glazba povećava biomasu i daje bolji okus.

Tijekom posljednjih desetljeća, došlo je do ekspanzije korištenja mobitela što rezultira povećanjem elektromagnetskog zračenja koje ima negativan utjecaj na živa bića. Dosadašnja istraživanja ukazuju



da zračenje može djelovati pozitivno i negativno na rast biljaka (ovisno o jačini zračenja). Zračenje mobitela najjače je u trenutku primanja signala, te različiti mobiteli imaju različitu jačinu zračenja.

Elektromagnetsko zračenje vodenoj leći (*Lemna minor*) izaziva oksidacijski stres (Tkalec i sur. 2007), dok jednoj vrsti graha (*Vigna radiata*) inhibira rast korijen (Sharma i sur. 2009), smanjuje rast korijena leće (*Lens culinaris*), ali ne utječe na klijavost (Akbal i sur. 2012)). S druge strane sjemenke luka (*Allium cepa*) izložene elektromagnetskom zračenju nisu pokazale znatne promjene u duljini korijena ni klijavosti, ali je zabilježeno znatno povećanje mitotičkog indeksa (Tkalec i sur. 2009) u usporedbi s odgovarajućim kontrolama, dok je postotak mitotičkih poremećaja povećan nakon svih tretmana izloženosti, što može biti posljedica oštećenja mitotičkog vretena.

Sharma i Parihar (2014.) proučavali su utjecaj zračenja mobitela na grašak (*Pisum sativum*). Svojim istraživanjem dokazali su da zračenje mobitela pospješuje rast graška, povećava se broj kvržica u korijenu, povećava se suha masa, uočava se veći rast korijena te enzimska aktivnost.

Biljke, životinje i ljudi trebaju dušik za svoj metabolizam. Biljke ne mogu uzimati atmosferski dušik iz zraka, već ga uzimaju u obliku nitrata. Bakterije iz roda *Rhizobium* (dušikove bakterije) imaju sposobnost fiksiranja dušika iz zraka i prevođenja u oblik nitrata, a žive na korijenu biljki mahunarki (formiraju kvržice na korijenu). One su odgovorne za obogaćivanje tla spojevima dušika koji potiču rast biljaka. Prema gore navedenim istraživačima, upravo je to razlog zašto zračenje mobitela pozitivno djeluje na rast graška.

Model ovog istraživanja je bilo grašak. Grašak (*Pisum sativum*) je jednogodišnja zeljasta biljka iz porodice mahunarki (Fabaceae). Jedna je od prvih kultiviranih biljaka. Arheološka istraživanja potvrđuju upotrebu graška 8 000 godina p.n.e. Pretpostavlja se da su se prvi kultivari graška pojavili u zapadnoj Aziji, odakle su se dalje proširili po Europi, Kini i Indiji. Danas je ova biljka široko rasprostranjena i uz to što se koristi u ljudskoj prehrani, jedna je od najznačajnijih leguminoza koja se koristi u poljoprivredi. Ova multifunkcionalna biljka se može koristiti kao stočna hrana, silaža, slama, u zelenoj gnojidbi. Često je korišten u istraživanjima, između ostalog koristio ga je i Gregor Mendel za pokuse genetičkih istraživanja.

Grašak raste na područjima gdje prevladava umjereno kontinentalna klima. Za rast i razvoj su najpovoljnije temperature između 4 i 24°C, dok je optimalna 13-21°C. Optimalna temperatura klijanja je 20°C, dok je minimalna 5°C. Za razvoj vegetativnog dijela biljke optimalna temperatura je između 13 i 17°C, minimalna temperatura je 4°C. Mlade biljke bez većih oštećenja mogu podnijeti temperature i do -8°C. S razvojem nadzemnog dijela biljke otpornost na niske temperature opada, tako već pri 0,5°C dolazi do ireverzibilnog oštećenja biljke. Tijekom faze cvatnje optimalna temperatura je između 16 i 20°C, a za razvoj ploda je potrebna temperatura između 20 i 22°C. Temperature iznad 25°C stresno djeluju na biljku i pri takvim temperaturama zaustavlja se rast i razvoj cvijeta i ploda. Ukoliko temperature prijeđu 35°C rast graška se u potpunosti zaustavlja.

Grašak je biljka dugog dana, iako su neki kultivari neutralni na dužinu dana. Raste na različitim tipovima tala, prozračnim, dobro dreniranim i s vrijednostima pH od 5.5 do 7.0. Optimalna količina padalina je između 800 i 1 000 mm godišnje. Stabljika je na poprečnom presjeku uglasta ili okrugla i šuplja, može



se granati, ali i biti nerazgranata. Svjetlozelene je boje i visine do 2 metra. Karakteristike stabljike se razlikuju među kultivarima. Korijen graška je dobro razvijen i ima veliku moć apsorpcije mineralnih tvari i vode iz tla. Glavni korijen može narasti i do 1,5 m u dubinu, dok se glavnina postranog korijenja nalazi do dubine od 30 cm. Kao što je slučaj i kod drugih vrsta iz porodice Fabaceae tako i na korijenu graška bakterije induciraju stvaranje sitnih kvržica (noduli). To su specijalizirani organi biljke-domaćina u kojima se nalaze bakterije rodova *Rhizobium* i *Bradyrhizobium*. Bakterije fiksiraju atmosferski dušik i prevode ga u oblik koji je kao takav dostupan biljkama (NO_3^-).

Cilj našeg istraživanja je utvrditi:

- ☞ utječe li zračenje mobitela na klijavost, rast i biomasu graška
- ☞ kako rock glazba, heavy metal glazba i klasična glazba utječu na klijavost, rast i biomasu graška.

Naša pretpostavka je da će klijavost sjemenki graška biti manja zbog zračenja mobitela, a različite vrste glazbe imat će različite utjecaje. Zbog najbolje istraženosti uspoređivat ćemo utjecaj rock glazbe, heavy metal glazbe i klasične glazbe na rast graška. Pretpostavljamo da će klasična glazba poboljšati rast i klijavost graška, a da će rock glazba imati negativan učinak.

Glazba koju smo koristile u našem istraživanju bila je:

- ☞ Beethoven „Moonlight sonata” (klasična glazba),
- ☞ Metallica „Whiskey in the Jar” (heavy metal glazba) i
- ☞ Aerosmith „Sweet Emotion” (rock glazba).

Za pomoć u analizi odabranih pjesama obratile smo se profesorici glazbene kulture kojoj smo objasnile problem i način na koji glazba djeluje na biljke. Uzevši sve u obzir profesorica nam je otkrila sljedeće:

Klasična glazba: Beethoven „Moonlight sonata”

- ☞ pretežno pomirljivog karaktera, s najzaokruženijom strukturom, te je vole i pijanisti i slušatelji
- ☞ kontinuirani bas koji daje ritam „disanja”, umirujuće
- ☞ jasno vođene harmonije koje rastu i razrješavaju se
- ☞ naglasak je na stalnom kretanju k naprijed
- ☞ nema iznenađenja ni oscilacija, kako melodijskih, tako ni ritmičkih
- ☞ izvodi je samo klavir, čisto i jasno.

Heavy metal glazba: Metallica „Whiskey in the Jar”

- ☞ također kontinuiran ritam
- ☞ harmonije isto jasne
- ☞ instrumenti tvrđi, isprepliću se
- ☞ muški vokal grub i hrapav.
- ☞ tvrd i oštar zvuk
- ☞ prestimulativan aranžman.

Rock glazba: Aerosmith „Sweet Emotion”

- ☞ kontinuiran ritam električnog basa koji se pojačava
- ☞ korištena marimba, govor (recitativ), ali sve u ritmu
- ☞ vokalno izvođenje višeglasno, kod solo dionice muški glas ujednačene jačine
- ☞ u refrenu se ponavlja rif gitare, u pozadini je prateća dionica uvoda.

METODE RADA

Istraživanje je započeto u rujnu 2016. godine.

Postupak

U svaku posudicu prethodno napunjenu s približno jednakom količinom tla supstrata (Terra BRILL) posijale smo po 10 zdravih (Slika 1), približno jednakih sjemenki graška (grašak Mali provansalac tvrtke Marcon). Nakon stavljanja na površinu tla, sjemenke smo prekrile istom količinom tla tako da sjemenke imaju iste uvjete klijanja. Po dvije posudice (2x10 sjemenki) smjestile smo u svaku od 5 prozirnih plastičnih kutija dimenzija 25cm x 37cm x 27cm (Slika 2). Posude smo smjestile u školski kabinet biologije uz prozor, pazeći pritom da sve posude budu jednako izložene suncu, te na jednakoj temperaturi od 20°C. Zalijevale smo ih svaka 3 dana s 25 mL vode.



Slika 1 Sijanje sjemenki graška korištenog u istraživanju



Slika 2 Posude s biljkama

Da bi utvrdile utječe li zračenje mobitela i vrsta reproducirane glazbe na klijavost i rast graška, koristile smo 4 potpuno ista mobitela marke NOKIA2220s. 3 mobitela reproducirala su 3 vrste glazbe (klasičnu, rock i heavy metal glazbu u posebnim posudama koje su bile zatvorene da se spriječi međusobno ometanje glazbe (u pojedinoj kutiji čula se isključivo jedna, zadana vrsta glazbe jednake glasnoće u svim posudama). U prvoj posudi nalazio se mobitel kojeg smo nazivale 5-6 puta dnevno u razmacima od 2 sata.

Budući da je zračenje mobitela najjače u trenutku primanja signala na taj način smo prouzročile emitiranje elektromagnetskog zračenja mobitela te u posudu stavile promatrani grašak. Zračenje mobitela nismo mogle direktno izmjeriti pa smo pronašle na internetu tvorničke podatke za korišteni mobitel NOKIA2220s prema kojima količina elektromagnetskog zračenja u trenutku uspostave poziva iznosi 0,73W/kg (BUG, 2016).

Da bi uvjeti u svim posudama bili jednaki morale smo koristiti potpuno iste mobitele, a navedena NOKIA2220s bila je jedina marka mobitela koju smo uspjele nabaviti u 4 potpuno ista mobitela (Slika 3.). Mobiteli su poprilično stari i svi su bili priključeni na punjače i uključeni u struju. Mobitele smo uključivale svako jutro prije početka nastave u 8.00 sati, a isključivale u 18.00 sati.

U drugoj posudi nalazio se mobitel koji je reproducirao heavy metal glazbu 10 sati dnevno. U trećoj posudi mobitel je u istom periodu reproducirao klasičnu glazbu, a u četvrtoj rock glazbu. Mobiteli su

bili smješteni u manjim kartonskim kutijicama koje smo zalijepile uz unutarnji rub sa suprotne strane od sunca (Slika 2). Peta posuda bila je kontrolna posuda, u njoj nije bio prisutan mobitel pa grašak u ovoj posudi nije bio izložen ni zračenju mobitela niti ikakvoj vrsti glazbe.

Klijavost sjemenki graška, prosječnu visinu te vlažnu i suhu biomasu graška iz ove posude usporedile smo s istim vrijednostima graška u posudama 1., 2., 3. i 4. Na taj način smo utvrdile utječe li zračenje mobitela i vrsta glazbe na grašak i kako.

U svim posudama, svi životni uvjeti bili su jednaki osim izloženosti mobitelima i vrsti glazbe. Posude smo poklopile plastičnim poklopcima da spriječimo međusobno ometanje, odnosno da se u pojedinim posudama čuje samo zadana vrsta glazbe.



Slika 3 Mobiteli NOKIA2220s korišteni u istraživanju

Istraživanje smo ponovile 3 puta da dobiveni rezultati budu vjerodostojni i računale srednje vrijednosti koje smo upisale u tablicu 1.

Tablica 1. Usporedba uvjeta u svim posudama

	1. posuda	2. posuda	3. posuda	4. posuda	5. posuda
U posudi se uz jednak broj sjemenki graška i jednake životne uvjete nalazio i:	Mobitel koji je prilikom uspostave poziva emitirao zračenje	Mobitel koji je 10 sati dnevno reproducirao heavy metal glazbu	Mobitel koji je 10 sati dnevno reproducirao klasičnu glazbu	Mobitel koji je 10 sati dnevno reproducirao rock glazbu	Kontrolna posuda (bez mobitela i glazbe)
Postotak klijavosti					
Prosječna srednja visina					
Biomasa (vlažna)					
Biomasa (suha)					
Maseni udio suhe tvari					

Postotak klijavosti smo izračunale tako da smo podijelile broj proklijalih sjemenki s ukupnim brojem sjemenki i pomnožile sa 100 %.

Prosječnu srednju visinu izračunale smo tako da smo zbrojile visine svih biljaka iz te posude i podijelile ih s ukupnim brojem biljaka iz te posude.

Nakon 45 dana biljke smo pažljivo izvadile iz zemlje, lagano odstranile zemlju i izvagale. Na taj način smo dobile vlažnu biomasu. Biljke smo zatim ostavile 48 - 60 sati da se posuše, te ih ponovno izvagale i dobile suhu biomasu.

Maseni udio suhe tvari izračunale smo tako da smo podijelile suhu biomasu s vlažnom biomasom i pomnožile sa 100 %.

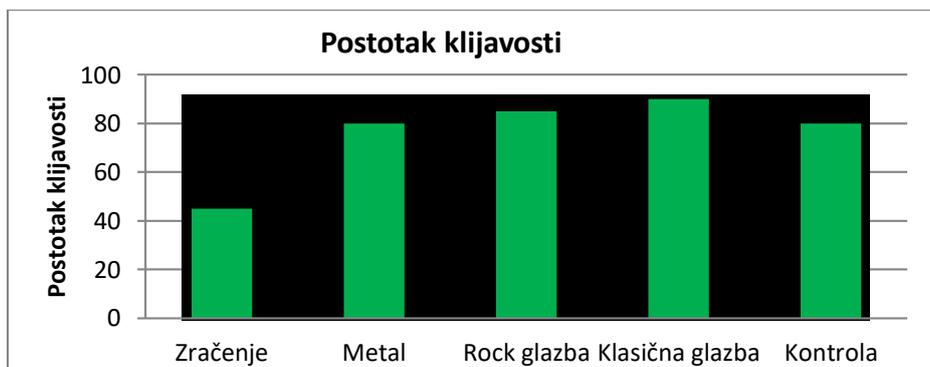
REZULTATI

Nakon praktičkog dijela istraživanja sve rezultate smo usporedile, analizirale, statistički obradile i grafički prikazale.



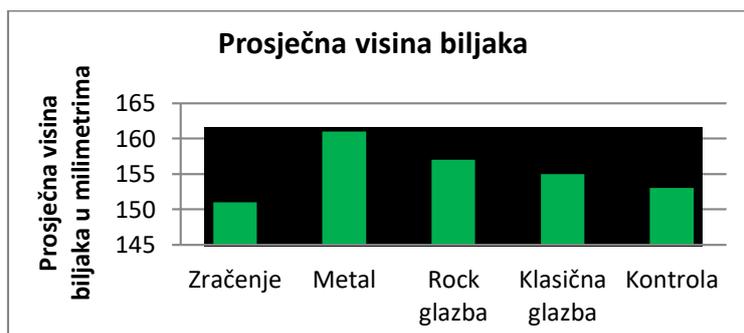
Slika 4 Grašak izložen različitoj vrsti glazbe i zračenju mobitela

Na slici 4 vidljiva je fotografija stabljika graška koji je klija i rastao uz zračenje mobitela, određenu vrstu glazbe (heavy metal, klasičnu glazbu i rock glazbu) ili bez ičeg navedenog pa je služio kao kontrola. U kontrolnoj skupini klijavost graška iznosila je 80 %, klijavost graška uz reproduciranje sve tri vrste glazbe je ostala ista ili se malo povećala. Jedino je grašak koji je bio izložen zračenju mobitela imao znatno manju klijavost (45 %) u odnosu na grašak u svim drugim skupinama (Slika 5).



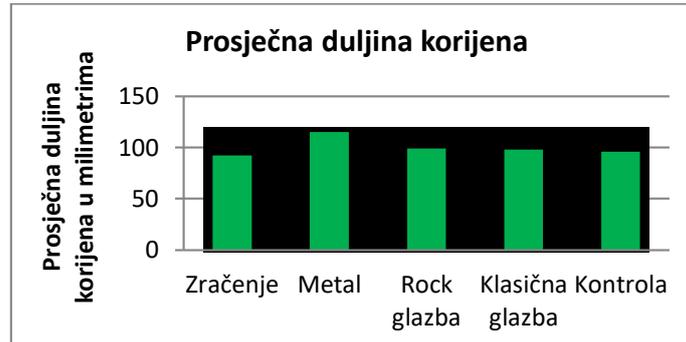
Slika 5 Grafički prikaz utjecaja glazbe i zračenja na postotak klijavosti

Grašak koji je rastao uz heavy metal glazbu imao je najveću prosječnu visinu (161 mm), a grašak koji se nalazio u posudi u kojoj je emitirano zračenje najmanju (151mm), što je još jedan pokazatelj štetnog utjecaja zračenja mobitela (Slika 6).



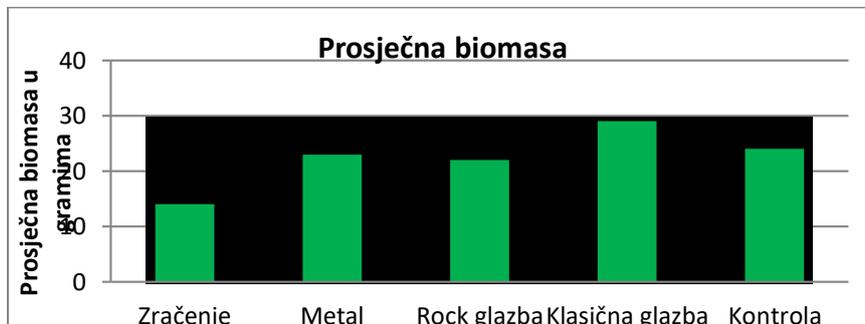
Slika 6 Grafički prikaz utjecaja glazbe i zračenja na prosječnu visine biljaka

Na grafičkom prikazu vidljivo je da je prosječna duljina korijena najveća kod graška u posudi s metal glazbom (118 mm), a najmanja kod graška u posudi sa zračenjem (Slika 7.).



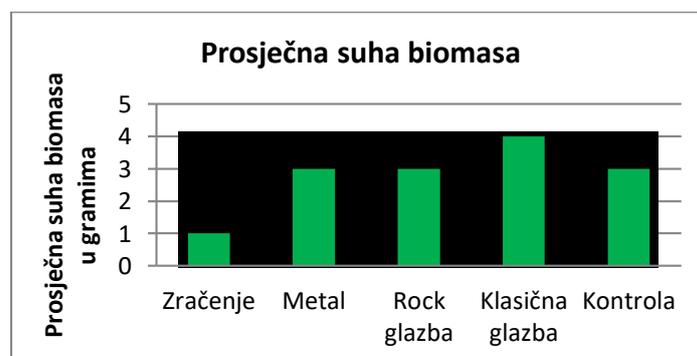
Slika 7 Grafički prikaz prosječne duljine korijena

Grašak koji je rastao uz klasičnu glazbu imao je najveću vlažnu biomasu (29 g) i suhu biomasu (4 g), grašak u kontrolnoj posudi, kao i onaj koji je rastao uz rock i heavy metal glazbu imaju približne vrijednosti vlažne i suhe biomase. Grašak koji je rastao uz zračenje mobitela imao je vlažnu biomasu svega (14 g) a suhu svega (1 g), što je također još jedan dokaz štetnog utjecaja zračenja mobitela (Slika 8).



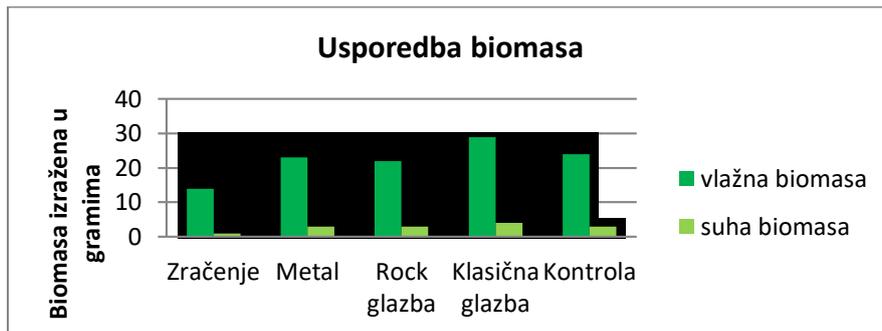
Slika 8 Grafički prikaz odnosa prosječnih biomasa

Nakon nekoliko dana izvagale smo suhu biomasu graška. Nakon što smo to grafički prikazale, uočile smo da najveću suhu biomasu ima grašak koji se nalazio u posudi s klasičnom glazbom, a najmanju suhu biomasu ima grašak koji je bio pod utjecajem zračenja (Slika 9).



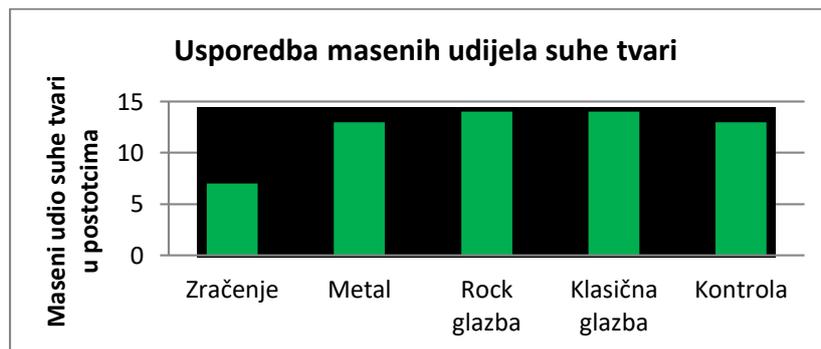
Slika 9 Grafički prikaz odnosa prosječnih suhih biomasa

Usporedile smo vlažnu biomasu i suhu biomasu biljaka. Iz grafa je vidljivo da je suha biomasa biljaka višestruko manja od vlažne biomase (Slika 10).



Slika 10 Grafički prikaz odnosa vlažne i suhe biomase

Da bi bolje usporedile količine suhe tvari u pojedinim vrstama graška, izračunale smo i maseni udio suhe tvari (Slika 11).



Slika 11 Grafički prikaz usporedbe masenih udijela suhe tvari

Najmanja vrijednost je opet zabilježena kod graška koji je rastao uz emisiju zračenja mobitela a iznosila je svega 7 %, dok je u svih ostalih ta vrijednost bila dvostruko veća (Slika 11).

RASPRAVA

Kao što je već navedeno u prethodnom poglavlju, 5 prozirnih zatvorenih plastičnih posuda sa manjim posudicama u kojima je bio posijan grašak, smješteno je u školski kabinet na svijetlo i toplo mjesto. Pri odabiru mjesta vodile smo računa da biljkama u svim posudama osiguramo najbolje ali prvenstveno jednake životne uvjete (izloženost sunčevom svjetlu, toplina, vlaga, plodno tlo, prozračnost, jačina zvuka). Na taj način smo osigurale da nam jedina zavisna varijabla koje utječe na klijavost, rast graška i njegovu biomasu bude vrsta glazbe u pojedinim posudama te elektromagnetsko zračenje kojeg emitira mobilni telefon prilikom uspostave poziva.

Zbog najbolje istraženosti uspoređivale smo utjecaj rock glazbe, heavy metal glazbe i klasične glazbe na rast graška. Naša pretpostavka je bila da će klasična glazba poboljšati rast i klijavost graška, te da će rock glazba imati negativan učinak na grašak.

Praktičnim radom smo dokazale da je klasična glazba dobro utjecala na rast graška te suhu i vlažnu biomasu graška. Heavy metal glazba povećala je rast graška i duljinu korijena, dobro je utjecala na biomasu graška. Rock glazba na biljke je u početku dobro djelovala ali nakon određenog vremena biljke su počele venuti, dok su u ostalim posudama i dalje izgledale dobro.



Dobiveni rezultati u skladu su s našom pretpostavkom kao i sa istraživanjima koje je proveo Sharma (2016.) koji opisuje da rock glazba oštećuje biljke, što ponekad dovodi i do toga da biljke uvenu a često se nagnu od izvora glazbe. Klasična glazba poboljšava rast biljaka a heavy metal glazba povećava biomasu. Prema Retallacku (1973.) na rast biljaka utječe vrsta glazbe kao i vrijeme izloženosti glazbi.

Potvrđena je pretpostavka da će klijavost sjemenki graška ovisiti o vrsti reproducirane glazbe. U odnosu na kontrolnu skupinu u kojoj je klijavost graška iznosila je 80 %, klijavost graška uz reproduciranje sve tri vrste glazbe je ostala ista ili se malo povećala. Tako klijavost graška u posudi u kojoj je reproducirana heavy metal glazba iznosila je također 80 %, uz rock glazbu je bila nešto veća (iznosila je 85 %) a najveća klijavost od čak 90 % pronađena je kod graška koji je bio izložen klasičnoj glazbi (Slika 5.).

Jedino je grašak koji je bio izložen zračenju mobitela imao znatno manju klijavost (45 %) u odnosu na grašak u svim drugim skupinama. Premda smo u uvodu navele i citirale istraživanje koje su proveli Sharma i Parihar (2014.) a prema kojem zračenje mobitela pospješuje rast graška, povećava se broj kvržica u korijenu i povećava suhu masu, od početka smo pretpostavljale da zračenje mobitela negativno djeluje na sva živa bića, pa tako i biljke. Vjerovatno manja količina zračenja povećava broj kvržica koje formiraju dušikove bakterije, čime se povećava broj dušikovih bakterija koje vežu dušik iz zraka te ga prevode u oblik nitrata kojeg biljke iskorištavaju za bolji rast i razvoj. Budući da mi nismo mogle izmjeriti jačinu zračenja naših NOKIA 2220s, uzele smo podatke o jačini zračenja sa Internet stranice Bugonline (BUG, 2016).

Naš mobitel nalazio se 10 – 20 cm od samih sjemenki graška, a jačina zračenja je daleko najjača u neposrednoj blizini mobitela, nisu nam poznati podatci na kojoj udaljenosti su oni držali mobitele te koje mobitele su koristili, jer jačina zračenja nije jednaka kod svih vrsta mobitela. Naši rezultati su u potpunoj suprotnosti sa njihovim rezultatima i potrebna su daljnja istraživanja da se sa sigurnošću utvrde stvarni razlozi ovako velikog odstupanja.

Grašak koji je rastao uz heavy metal glazbu imao je najveću prosječnu visinu (161 mm), a grašak koji se nalazio u posudi u kojoj je emitirano zračenje najmanju (151mm), što je još jedan pokazatelj štetnog utjecaja zračenja mobitela.

Najveća prosječna duljina korijena (118 mm) također je zabilježena kod graška koji je rastao uz heavy metal glazbu, a kod ostalih se ta vrijednost kretala od 90 – 100 mm. Ovdje nemamo toliko velike razlike kao kod visine graška, možemo reći da je duljina korijena gotovo podjednaka. Razlog tome je možda i činjenica da smo ponekad i pokidale neke korijene unatoč tome što smo ih nježno i polagano vadile biljke iz zemlje. Također, pretpostavljamo da bi i jačina zračenja trebala biti puno veća vani u posudi nego ispod zemlje, pa je možda korijen na neki način bio zaštićen od zračenja mobitela.

Grašak koji je rastao uz klasičnu glazbu imao je najveću vlažnu biomasu (29 g) i suhu biomasu (4 g), grašak u kontrolnoj posudi, kao i onaj koji je rastao uz rock i heavy metal glazbu imaju približne vrijednosti vlažne i suhe biomase. Grašak koji je rastao uz zračenje mobitela imao je vlažnu biomasu svega (14 g) a suhu svega (1 g), što je također još jedan dokaz štetnog utjecaja zračenja mobitela.



To je još bolje vidljivo ako usporedimo masene udjele suhe tvari kod graška u svim posudama. Najmanja vrijednost je opet zabilježena kod graška koji je rastao uz emisiju zračenja mobitela a iznosila je svega 7 %, dok je u svih ostalih ta vrijednost bila dvostruko veća.

ZAKLJUČCI

Na osnovu provedenog istraživanja doneseni su slijedeći zaključci:

- ✔ postotak klijavosti smanjio se samo u posudi u kojoj je na grašak djelovalo zračenje mobitela
- ✔ grašak na koji je djelovala metal glazba prosječno ima najveću visinu biljke, kao i duljinu korijena
- ✔ grašak na koji je djelovalo zračenje mobitela ima najmanju visinu biljke, kao i duljinu korijena
- ✔ najveću vlažnu biomasu ima grašak na koji je djelovala klasična glazba, kao i suhu biomasu
- ✔ grašak na koji je djelovalo zračenje mobitela ima najmanju vlažnu biomasu, kao i suhu biomasu
- ✔ zračenje mobitela negativno utječe na klijavost, rast i biomasu graška
- ✔ maseni udio suhe tvari graška na koji je djelovalo zračenje mobitela dvostruko je manji od masenog udjela suhe tvari graška u svim ostalim posudama.

LITERATURA

- Akbal i sur. 2012. Effect of electromagnetic waves emitted by cell phones on germination, root growth and root tip cell mitotic division of *Lens culinaris* Medik. Pol. J. Environ. 21 (1): 23-9
- BUG 2016. Nokia 2220 slide. <http://www.bug.hr/digitalije/mobiteli/nokia/2220-slide/641.aspx>. pristupljeno 15.12.2016.
- Retallack D.L. 1973. The Sound of Music and Plants, Santa Monica: DeVors, California.
- Sharma S. 2016., The Effect of Music on Plant Growth and Pests. <https://owlcation.com/stem/The-Effect-of-Music-on-Plant-Growth-and-Pests>, pristupljeno 15.12.2016.
- Sharma S., Parihar L. 2014., Effect of Mobile Phone Radiation on Nodule Formation In the Leguminous Plants. Current World Environment, Vol. 9(1), str. 145-155.
- Sharma i sur, 2009.. Cell phone radiation inhibits *Vigna radiata* (mung bean) root growth by inducing oxidative stress. Sci Total Environ 407(21): 5543-7.
- Tkalec i sur., 2007. Exposure to radiofrequency radiation induces oxidative stress in duckweed *Lemna minor* L., Sci. Total Environ; 388: 78-89.
- Tkalec i sur., 2009. Effects of radiofrequency electromagnetic fields on seed germination and root meristematic cells of *Allium cepa* L. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 672 (2): 76-81.

KLIJAVOST SJEMENJA PŠENICE (*Triticum aestivum* L.) I KUKURUZA (*Zea mays* L.) NAKON TRETIRANJA BILJNIM PRIPRAVCIMA

Nika Klanfar, 7. razred
Ela Šukurma, 7. razred

Osnovna škola Augusta Šenoae, Zagreb
Mentor: Sandra Penco

SAŽETAK

Kao što biljke imaju ljekovito djelovanje na ljudsko zdravlje, jednako tako mogu pozitivno utjecati i jedna na drugu. Cilj je istraživanja ispitati potpomažu li čajni pripravci namijenjeni čovjeku, razvoju i rastu kultiviranih biljaka iz sjemena te koliki je utjecaj različitog perioda stajanja pripravaka u vodi (fermentacije). S obzirom na bogatstvo nutrijenata u navedenim biljkama pretpostavka je da će navedeni pripravci pomoći klijancima u razvoju. S obzirom na pozitivnu stranu fermentacije pretpostavili smo da će duže otapanje suhe tvari u vodi pridonijeti boljoj klijavosti. Pšenica i kukuruz su značajne gospodarske biljke pa nas je zanimalo može li zalijevanje čajevima pridonijeti boljem prinosu navedenih vrsta. Od čajnih pripravaka maslačka, majčine dušice, stolisnika i koprive napravljene su tri različite otopine. Prva otopina nastaje nakon jednosatnog stajanja suhe tvari u prokuhanoj vodi. Druga otopina nastaje nakon jednodnevnog stajanja pripravka (suhe tvari) u vodi, a treća otopina nakon trodnevnog stajanja. Primjenom metode promatranja i mjerenja utvrđeno je da u našem slučaju čajni pripravci ne poboljšavaju rast pšenice i kukuruza. Koristeći poznata znanja ne možemo tvrditi da isti čajni pripravci ne bi pozitivno djelovali na klijanje i rast sjemenja nekih drugih vrsta.

Ključne riječi: prirodna zaštita, gnojiva, fermentacija

UVOD I OBRAZLOŽENJE TEME

U poplavi različitih lijekova koje nude brojne farmaceutske kompanije sve više ljudi se okreće alternativnom odnosno tradicionalnom načinu liječenja. Ono što posebno izdvaja tradicionalnu od moderne medicine je primjena biljaka u liječenju. One pomažu bolesnima, ali i onima koji žele održati vitalnost i zdravlje. Postoji izreka da za svaku bolest postoji lijek u prirodi. Ljudi su od davnina u prirodi pronalazili lijekove za ublažavanje zdravstvenih tegoba. Početkom 19. stoljeća znanstvenici su stekli mogućnost analize aktivnih sastojaka biljaka, a s vremenom su naučili stvarati kemijske verzije biljnih spojeva (Lesinger, 2006). Uskoro je krenula proizvodnja sredstava, koja iako bazirana na tajnama prirode, nisu zadržala vezu s biljkama. Odnosno, napretkom farmaceutske industrije liječenje biljem počelo je padati u drugi plan. Suvremeni stil života, nove bolesti, ali i ponovno otkrivene drevne metode prirodnog liječenja razlozi su zbog kojih se ljudi ponovo vraćaju izvornoj, biljnoj medicini. Biljke sadrže široke palete prirodnih spojeva koje koriste za obavljanje važnih bioloških funkcija, kao i za obranu od napada nametnika. Mnogi biljni spojevi imaju dugoročno blagotvoran utjecaj na zdravlje ljudi. Ljekovito bilje prodaje se u različitim oblicima pa se tako može nabaviti čaj, sirup, ulje, tinkture, tablete ili kapsule (Lesinger, 2006).

Kao što biljke imaju ljekovito djelovanje na ljudsko zdravlje, jednako tako mogu pozitivno utjecati i jedna na drugu. U organskom uzgoju ljekovite biljke proizvode se odavno. U ekološkoj proizvodnji biljke se hrane organskim gnojivom i kvalitetnim kompostom, korov se uklanja mehaničkim putem, biljke se prskaju biljnim pripravcima, a zaraženo bilje se redovito odstranjuju (Džapo i sur., 2014). Biljka postaje zdravija, otpornija i spremna dati zdrav plod. U borbi protiv štetočina može pomoći prirodni suživot između nekih biljaka – sadnjom jedne uz drugu povećava se njihova snaga i urod te se one bolje štite od nametnika (Hrvatska enciklopedija, 2012). To su komplementarne biljke.



Čaj

Naziv "čaj" u svakodnevno govoru odnosi se na napitak pripremljen od različitog bilja, voća, sjemenki, korijenja ili njihovih mješavina. Pod pojmom "čisti čaj" podrazumijeva se čaj dobiven iz biljke *Camellia sinensis*. Čajevi pomažu u prevenciji mnogih bolesti te pri ublažavanju i otklanjanju blažih, ali i težih zdravstvenih tegoba. Ako su pravilno pripremljeni, biljni čajevi mogu biti dragocjen izvor vitamina, minerala i drugih nutrijenata. Najpoznatiji po svom djelovanju zasigurno je čaj od koprive. Kemijskom analizom koprive uočeno je bogatstvo nutrijenata - od minerala (kalija, kalcija, željeza, fosfora, magnezija te natrija) do vitamina (C, K, karoten–provitamin A, B–kompleks). Svojim sastavom potiče rast te štiti biljke od raznih nametnika. Riječ je iznimno vitalnoj biljci koja svoju snagu može prenijeti i na kultivirane biljke koje su, nažalost, tijekom selekcije izgubile otpornost (Benyovsky Šoštarić, 2010.). Dokazana su ljekovita svojstva čaja od koprive u liječenju infekcije mokraćnog sustava, opadanju kose, kožnih bolesti, slabokrvnosti, reume i dr. Osim koprive u istraživačkom radu korišteni su i čajevi od maslačka, stolisnika i majčine dušice. Maslačak na druge biljke djeluje kao gnojivo i pesticid, a ljudima liječi bolesti jetre, žuči te urinarnog traka. Sadrži vitamine (A, B i C) i minerale (Fe, Mg, P, Si, Na, S, Mn). Majčina dušica je bogata eteričnim uljem, taninom, flavanoidima i mineralima (Fe i Ca). Biljkama pomaže tako da zaustavlja rast patogena, a ljude liječi od bronhitisa, upale grla i hripavca. Stolisnik također djeluje kao gnojivo i pesticid, a primjena kod ljudi utječe na rad jetre i slezene te zaustavlja unutarnje krvarenje (Lesinger, 2006).

Tekuće biljno gnojivo, biljni čaj, biljna juha i biljni ekstrakt nazivi su za preparate na biljnoj bazi koji su vrlo korisni u ekovrtu. Ovisno o sastavu, polijevaju se ili prskaju po biljkama ili tlu oko biljaka, a pridonose rastu, jačanju otpornosti i /ili zaštiti biljaka od raznih bolesti i štetnika. Odabrane svježe ili sušene biljke miješaju se s vodom, a dobivena smjesa ostavlja se da fermentira. Prema Lisjaku i sur. (2015.) mikroorganizmi u fermentiranom biljnom ekstraktu poticajno djeluju na klijavost. Moguće je da produkti metabolizma mikroorganizama, kao što su enzimi i ostale aktivne tvari, mogu poboljšati razgradnju organskih tvari u sjemenkama i time pridonijeti boljem i bržem iskorištavanju energije za vrijeme klijanja. Također, mikroorganizmi stvaraju različite spojeve koji djeluju kao antibiotici te time štite sjemenku od patogena (Lisjak i sur., 2015)

Cilj je istraživanja ispitati pomažu li čajni pripravci namijenjeni čovjeku, razvoju i rastu kultiviranih biljaka iz sjemena te koliki je utjecaj različitog razdoblja stajanja pripravaka (fermentacije). S obzirom na bogatstvo nutrijenata u navedenim biljkama pretpostavka je da će navedeni pripravci pomoć klijancima u razvoju. S obzirom na pozitivnu stranu fermentacije pretpostavljamo da će duže otapanje suhe tvari u vodi pridonijeti boljoj klijavosti. Pšenica i kukuruz su značajne gospodarske biljke pa nas je zanimalo može li zalijevanje čajevima pridonijeti boljem prinosu navednih vrsta.

METODE RADA

Istraživanje je trajalo osam tjedana, zapažanja su svakodnevno bilježena u laboratorijski dnevnik, a analiza rezultata provedena je na kraju svakog mjerenja.

Priprava čajnih pripravaka

Ljekovite biljke (maslačak, majčina dušica, stolisnika i koprive) kupljene su u prodavaonici u obliku sušenih pripravaka za izradu čajeva u svrhu održanja zdravlja i liječenja ljudi. Te biljke samoniklo rastu u prirodi. Čajevi su napravljeni od 3 grama suhe tvari i 1 dcl prokuhane vode. Prvih 25 minuta čajevi su

poklopljeni. Od svakog pripravka (maslačka, majčine dušice, stolisnika i koprive) izrađuju se tri različite otopine. Prva otopina nastaje nakon jedosatnog stajanja suhe tvari u prokuhaloj vodi. Druga otopina nastaje nakon jednodnevnog stajanja pripravka (suhe tvari) u vodi, a treća otopina nakon trodnevnog stajanja. Otopine stoje u plastičnim otvorenim čašama. Kontrolna skupina zalijeva se prokuhanom vodom napravljenom za izradu čajeva, ali bez dodatka suhe tvari. Mjeri se i izjednačava temperatura otopina kako bi se izbjegao utjecaj topline na klijavost. U prvom mjerenju temperatura je iznosila 23, 5° C, a u drugom 22°C.

Odabir sjemenki, uvjeti i test klijavosti

Za istraživanje su odabrane sjemenke pšenice iz domaćeg uzgoja i kukuruz kokičar. Sjemenke su jednake veličine, boje i bez ikakvog vanjskog oštećenja. Kako bi se moglo zaključiti utječu li čajni pripravci na klijanje sjemenja, pšenica i kukuruz tretirani su sa sve tri otopine svih čajeva. Kontrolna skupina zalijevana je prokuhanom vodom. Vrsta čajnog pripravka predstavlja nezavisnu varijablu, a mjerenje duljine klice (izdanka) i postotak klijavost predstavlja zavisnu varijablu. Svi uzorci izloženi su u istim uvjetima svjetlosti, topline i vlažnost koji vladaju u učionici. Svakodnevno se ispituje i mjeri: početak klijanja, broj proklijalih sjemenki i duljina izdanka (klice) u kontrolnoj i promatranim skupinama. Mjerenje je ponovljeno dva puta.

Postavljanje uzoraka

Na početku mjerenja sjemenje je namakano 1 h u otopinama kako bi nabubrilo. Nakon toga postavljeno je 8 sjemenki pšenice i kukuruza u zdjelice na čijoj se podlozi nalaze filter-papiri (Slika 1). Za svaki čaj i kontrolnu skupinu ispituje se ukupno 24 sjemenke pšenice i 24 sjemenke kukuruza (8 sjemenki po otopini x 3 otopine). Vlažnost podloge održava se svakodnevnim dodavanjem 2 ml otopine pšenici i 3 ml kukuruza. U isto vrijeme mijenjaju se i filter papiri, a zdjelice se čiste suhim papirnatim ručnikom.



Slika 1 Postavljeni uzorci

Mjerenje pH vrijednosti čajnog pripravka

Ph-vrijednost mjeri se u sve tri otopine i u kontrolnoj skupini. Za mjerenje pH-vrijednosti korišten je indikator-papir.

Materijali

Za istraživački rad odabrana je pšenica (*Triticum aestivum* L.) i kukuruz (*Zea Mays* L.). Jedna i druga biljka imaju izrazito značajnu gospodarsku vrijednost. Pripadaju u razred jednosupnica, a zbog vrlo lakog i brzog uzgoja vrlo se često koriste u istraživačkim radovima.

Mjerenje duljine klijanaca

Kod klijanca pšenice (Slika 2) mjerena je duljina izdanka ravnalom svaki dan za svaku otopinu (8 sjemenki po otopini x 3 otopine) te je izračunata prosječna duljina za taj dan. Postupak je ponovljen i za drugo mjerenje. Kod klijanaca kukuruza (Slika 3) mjerena je duljina izdanka i korjenčića, a ne samo izdanka kako bi vrijednosti bile točnije budući da je korjenčić u ovom periodu razvoja dulji od izdanka. Duljina klice kukuruza mjerena je ravnalom svaki dan (8 sjemenki x 3 otopine) te je izračunata prosječna duljina za taj dan. Postupak je ponovljen i za drugo mjerenje.



Slika 2 Klijanac pšenice



Slika 3 Klijanac kukuruza

REZULTATI

Klijavost sjemenki pšenice

U prvoj otopini sjemenke pšenice stavljene na podlogu od prokuhane vode najbrže su proklijale. Jedna sjemenka pšenice u čaju majčine dušice i dvije sjemenke pšenice u čaju koprive nisu proklijale u promatranom periodu. Većina sjemenki je proklijala do trećeg dana, a skoro sve treći i četvrti dan promatranja (Tablica 1).

Tablica 1 Postotak proklijalih sjemenki pšenice u prvoj otopini biljnih pripravaka po danima

	1. OTOPINA	1. dan (%)	2. dan (%)	3. dan (%)	4. dan (%)
VODA	1. mjerenje	62,5	100	100	100
	2. mjerenje	100	100	100	100
MAJČINA DUŠICA	1. mjerenje	0	87,5	100	100
	2. mjerenje	87,5	87,5	87,5	87,5
MASLAČAK	1. mjerenje	37,5	100	100	100
	2. mjerenje	37,5	87,5	100	100
STOLISNIK	1. mjerenje	62,5	100	100	100
	2. mjerenje	87,5	100	100	100
KOPRIVA	1. mjerenje	50	100	100	100
	2. mjerenje	37,5	75	75	75

U drugoj otopini sjemenke pšenice stavljene na podlogu od prokuhane vode su najbrže proklijale. Većina sjemenki proklijala je do trećeg dana, a sve treći i četvrti dan promatranja (Tablica 2).

U trećoj otopini sjemenke pšenice stavljene na podlogu od prokuhane vode najbrže su proklijale. Jedna sjemenka pšenice u čaju majčine dušice i jedna sjemenka pšenice u čaju koprive nisu proklijale u promatranom periodu. Većina sjemenki proklijala je do trećeg dana, a skoro sve treći i četvrti dan promatranja (Tablica 3).



Tablica 2 Postotak prokljalih sjemenki pšenice u drugoj otopini biljnih pripravaka po danima

2. OTOPINA		1. dan (%)	2. dan (%)	3. dan (%)	4. dan (%)
VODA	1. mjerenje	62,5	100	100	100
	2. mjerenje	100	100	100	100
MAJČINA DUŠICA	1. mjerenje	50	100	100	100
	2. mjerenje	37,5	87,5	100	100
MASLAČAK	1. mjerenje	12,5	75	100	100
	2. mjerenje	37,5	100	100	100
STOLISNIK	1. mjerenje	25	100	100	100
	2. mjerenje	87,5	100	100	100
KOPRIVA	1. mjerenje	75	100	100	100
	2. mjerenje	50	100	100	100

Tablica 3 Postotak prokljalih sjemenki pšenice u trećoj otopini biljnih pripravaka po danima

3. OTOPINA		1. dan (%)	2. dan (%)	3. dan (%)	4. dan (%)
VODA	1. mjerenje	75	100	100	100
	2. mjerenje	100	100	100	100
MAJČINA DUŠICA	1. mjerenje	62,5	100	100	100
	2. mjerenje	75	75	87,5	87,5
MASLAČAK	1. mjerenje	25	87,5	100	100
	2. mjerenje	25	75	87,5	100
STOLISNIK	1. mjerenje	87,5	87,5	100	100
	2. mjerenje	25	87,5	100	100
KOPRIVA	1. mjerenje	50	100	100	100
	2. mjerenje	50	75	87,5	87,5

Klijavost sjemenki pšenice za sve tri otopine izračunata je po formuli:

$klijavost\ sjemenki\ (K) = \frac{broj\ prokljalih\ sjemenki\ u\ kljajalištu}{ukupan\ broj\ sjemenki\ u\ kljajalištu} \times 100$

Duljina izdanka pšenice

Prosječna duljina izdanka izračunata prema sljedećoj formuli:

$$M = \frac{X_1 + X_2 + \dots + X_n}{n}$$

M = srednja vrijednost izdanka

$X_1 + X_2 + \dots + X_n$ = duljina izdanka prve sjemenke, druge, treće....

n = broj prokljalih sjemenki

Prosječna duljina izdanka pšenice približno je jednaka u svim mjerjenjima kojima je prokuhana voda podloga (razlike su do 14 %). Manje odstupanje pokazuje prvi pripravak u prvom mjerenju četvrtog dana i nešto veće treći pripravak u drugom mjerenju četvrtog dana. Izdanak pšenice sporije raste (do 44 %) s duljinom stajanja čaja majčine dušice i maslačka. Nešto se veće odstupanje uočava u drugoj otopini maslačka četvrtog dana prvog mjerenja i manje drugog dana drugog mjerenja. Prosječan rast izdanka pšenice približno je jednak u sve tri otopine stolisnika (odstupanje je do 17 %). Izdanak pšenice brže raste s duljinom stajanja čaja koprive. Razlike su do 57 % (Tablica 4).

Tablica 4 Prosječna duljina i tendencija rasta klijanaca pšenice u kontrolnoj i promatranim skupinama za prvo i drugo mjerenje

otopina	1. mjerenje (mm)				2. mjerenje (mm)				rast izdanka pšenice
	1. dan	2. dan	3. dan	4. dan	1. dan	2. dan	3. dan	4. dan	
VODA									
1.	0	2,575	9,06	21,14	0	3,11	13,85	29,1	približno jednak rast
2.	0	2,625	10,430	25,875	0	2,65	13,71	29,35	
3.	0	2,462	9,025	24,81	0	3,33	12,83	20,3	
MAJČINA DUŠICA									
1.	0	1,51	6,428	15,00	0	2,32	6,27	8,91	sporiji rast
2.	0	2,25	5,383	10,785	0	1,64	5,58	8,30	
3.	0	1,81	3,63	8,65	0	2,28	4,58	8,00	
MASLAČAK									
1.	0	1,87	4,78	7,85	0	1,37	5,625	10,65	sporiji rast
2.	0	1,68	4,33	10,00	0	1,65	5,625	8,71	
3.	0	1,31	3,53	5,75	0	1,16	3,016	4,25	
STOLISNIK									
1.	0	1,48	4,5	8,85	0	1,70	4,7	7,37	približno jednak rast
2.	0	1,43	4,43	8,025	0	1,50	5,05	7,81	
3.	0	1,25	4,5	9,71	0	1,51	4,52	6,45	
KOPRIVA									
1.	0	1,675	3,96	5,487	0	1,71	3,75	5,53	brži rast
2.	0	1,875	5,35	7,24	0	2,11	5,157	6,75	
3.	0	2,26	7,128	12,625	0	1,93	5,36	9,33	



Slika 4 Najveći izdanci pšenice mjereni 4. dana prvog mjerenja u sve tri otopine



Slika 5 Najveći izdanci pšenice mjereni 4. dana drugog mjerenja u sve tri otopine

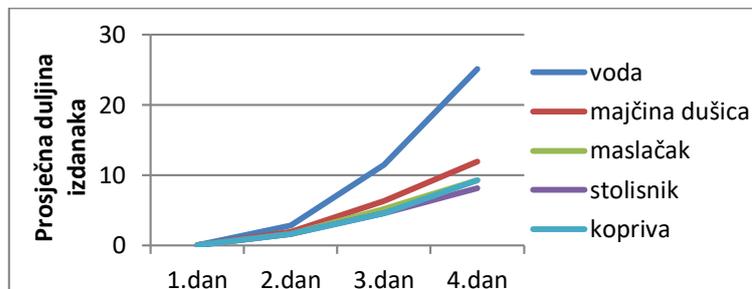
Na slikama 4 i 5 prikazani su klijanci koji su četvrtog dana u kontrolnoj i promatranj skupini dosegli najviši rast u različitim otopinama prvog i drugog mjerenja.

Prosječna duljina izdanka pšenice po otopinama

Prosječna duljina izdanaka izračunata je kao srednja vrijednost prvog i drugog mjerenja po danima za svaku otopinu. Za izračun je korištena je sljedeća formula:

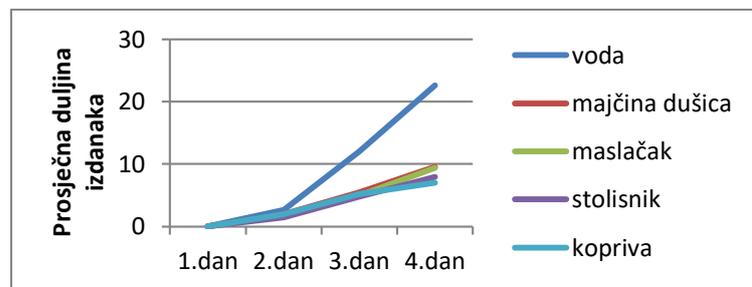
$$\text{srednja duljina izdanaka} = (\text{duljina izdanaka 1. mjerenja} + \text{duljina izdanaka 2. mjerenja})/2$$

U prvoj otopini najveći rast pokazuju sjemenke pšenice na podlozi od prokuhane vode i majčine dušice, a najmanji na podlozi od čaja stolisnika. Razlika je i do 68% četvrti dan (Slika 6).



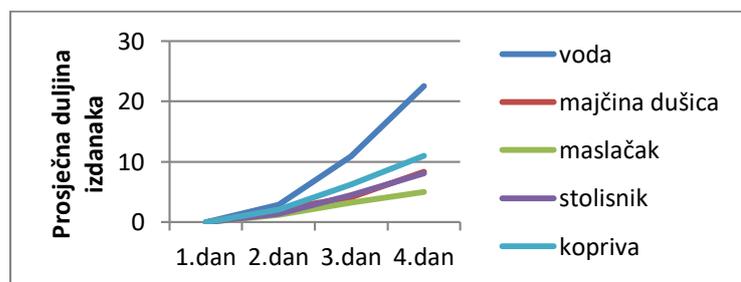
Slika 6 Prosječna duljina izdanaka pšenice u 1. otopini

U drugoj otopini najveći rast pokazuju sjemenke pšenice na podlozi od prokuhane vode i majčine dušice, a najmanji na podlozi od čaja koprive i stolisnika. Razlika je i do 70% (Slika 7).



Slika 7 Prosječna duljina izdanaka pšenice u 2. otopini

U trećoj otopini najveći rast pokazuju sjemenke pšenice na podlozi od prokuhane vode i koprive, a najmanji na podlozi od čaja maslačka. Razlika je i do 78% četvrti dan (Slika 8).



Slika 8 Prosječna duljina izdanaka pšenice u 3. otopini

Klijavost sjemenki kukuruza

U prvoj otopini većina sjemenaka kukuruza proklijala je trećeg i četvrtog dana. Najveće odstupanje pokazuje klijavost u čaju maslačka koja je u prvom mjerenju bila 100%, a u drugom samo 37,5% (Tablica 5).



Tablica 5 Postotak proklijalih sjemenki kukuruza u prvoj otopini biljnih pripravaka po danima

1. OTOPINA		1. dan (%)	2. dan (%)	3. dan (%)	4. dan (%)
VODA	1. mjerenje	0	0	87,5	87,5
	2. mjerenje	0	0	100	100
STOLISNIK	1. mjerenje	0	12,5	87,5	100
	2. mjerenje	0	25	62,5	87,5
MASLAČAK	1. mjerenje	0	12,5	100	100
	2. mjerenje	0	25	37,5	37,5
MAJČINA DUŠICA	1. mjerenje	0	0	75	100
	2. mjerenje	0	37,5	75	75

U drugoj otopini većina sjemenaka kukuruza proklijala je trećeg i četvrtog dana (Tablica 6).

Tablica 6 Postotak proklijalih sjemenki kukuruza u drugoj otopini biljnih pripravaka po danima

2. OTOPINA		1. dan (%)	2. dan (%)	3. dan (%)	4. dan (%)
VODA	1. mjerenje	0	25	100	100
	2. mjerenje	0	62,5	100	100
STOLISNIK	1. mjerenje	0	0	100	100
	2. mjerenje	0	25	62,5	75
MASLAČAK	1. mjerenje	0	12,5	62,5	62,5
	2. mjerenje	0	0	0	62,5
MAJČINA DUŠICA	1. mjerenje	0	12,5	75	100
	2. mjerenje	0	12,5	100	100

U trećoj otopini većina sjemenka kukuruza proklijala je trećeg i četvrtog dana. Treći pripravak pokazuje niži stupanj klijavosti sjemenaka kukuruza u odnosu na prve dvije otopine (Tablica 7).

Tablica 7 Postotak proklijalih sjemenki kukuruza u trećoj otopini biljnih pripravaka po danima

3. OTOPINA		1. dan (%)	2. dan (%)	3. dan (%)	4. dan (%)
VODA	1. mjerenje	0	0	87,5	100
	2. mjerenje	0	50	87,5	87,5
STOLISNIK	1. mjerenje	0	0	75	87,5
	2. mjerenje	0	12,5	50	50
MASLAČAK	1. mjerenje	0	0	87,5	87,5
	2. mjerenje	0	12,5	50	50
MAJČINA DUŠICA	1. mjerenje	0	0	100	100
	2. mjerenje	0	12,5	50	62,5

Duljina klice kukuruza

Prosječna duljina klice izračunata prema sljedećoj formuli:

$$M = X_1 + X_2 + \dots + X_n / n$$

Prosječna duljina klice kukuruza približno je jednaka u svim mjerenjima gdje je prokuhana voda podloga (do 17 %). Nešto veće odstupanje pokazuje treći pripravak u prvom mjerenju četvrtog dana i prvi pripravak u drugom mjerenju trećeg i četvrtog dana. Klice kukuruza pokazuje sporiji rast (do 73%) s duljinom stajanja čaja stolisnika. Klice kukuruza sporije rastu u drugom pripravku čaja maslačka. Klijanci najbolje uspijevaju u prvom pripravku. Klice kukuruza pokazuje brži rast (do 44%) s duljinom stajanja čaja majčine dušice (Tablica 8).

Tablica 8 Prosječna duljina i tendencija rasta klijanaca kukuruza u kontrolnoj i promatranim skupinama za prvo i drugo mjerenje

otopine	1. mjerenje (mm)				2. mjerenje (mm)				rast izdanka kukuruza
	1. dan	2. dan	3. dan	4. dan	1. dan	2. dan	3. dan	4. dan	
VODA									
1.	0	0	14,28	41,14	0	0	7,56	16,525	približno jednak rast
2.	0	0	15,46	43,12	0	0	15,83	29,35	
3.	0	0	12,8	27,56	0	0	15,66	31,36	
STOLISNIK									
1.	0	0	8,08	25	0	0	13,33	23,64	sporiji rast
2.	0	0	6,625	21,54	0	0	13,4	21,36	
3.	0	0	5,25	10,31	0	0	5,75	6,457	
MASLAČAK									
1.	0	0	10,95	32,00	0	0	7,30	18,1	sporiji rast
2.	0	0	7,5	13,43	0	0	0,00	6,00	
3.	0	0	10,35	21,25	0	0	6,7	14,1	
MAJČINA DUŠICA									
1.	0	0	8,33	17,43	0	0	7,91	16,36	brži rast
2.	0	0	14,28	17,785	0	0	9,21	19,21	
3.	0	0	12,5	31,00	0	0	12,75	23,6	

Na slikama 9 i 10 prikazani su klijanci kukuruza koji su četvrtog dana u kontrolnoj i promatranj skupini dosegli najviši rast u različitim otopinama prvog i drugog mjerenja.



Slika 9 Najveće klice kukuruza mjerene 4. dana prvog mjerenja u sve tri otopine

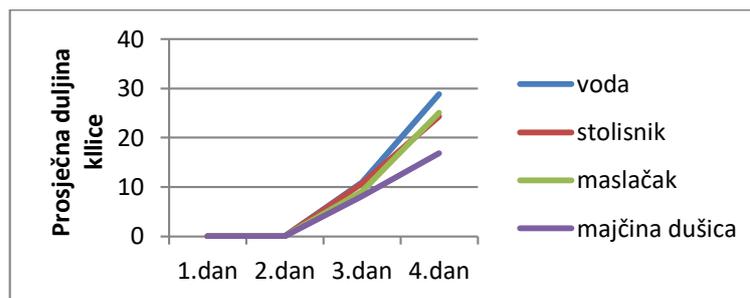


Slika 10 Najveće klice kukuruza mjerene 4. dana drugog mjerenja u sve tri otopine

Prosječna duljina klice kukuruza po otopinama

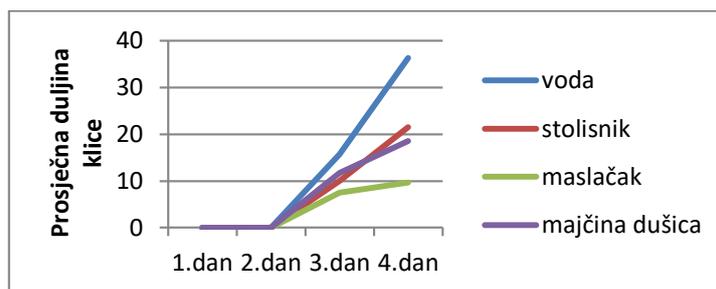
Prosječna veličina klice izračunata je kao srednja vrijednost prvog i drugog mjerenja po danima u svim otopinama.

Nakon jednosatnog stajanja suhe tvari u prokuhanoj vodi najveći rast pokazuju sjemenke kukuruza na podlozi od prokuhane vode i stolisnika, a najmanji sjemenke na podlozi od majčine dušice. Razlika je i do 40% četvrti dan (Slika 11).



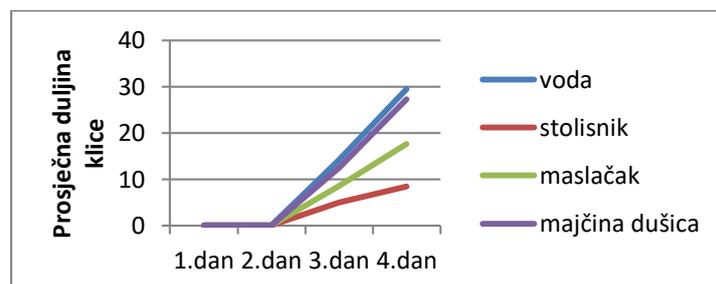
Slika 11 Prosječna duljina klice kukuruza u 1. otopini

Nakon jednodnevnog stajanja suhe tvari u prokuhanoj vodi najveći rast pokazuju sjemenke kukuruza na podlozi od prokuhane vode i stolisnika, a najmanji na podlozi od čaja maslačka. Razlika je i do 74% četvrti dan (Slika 12).



Slika 12 Prosječna duljina klice kukuruza u 2. otopini

Nakon trodnevnog stajanja suhe tvari u prokuhanoj vodi najveći rast pokazuju sjemenke kukuruza na podlozi od prokuhane vode i majčine dušice, a najmanji na podlozi od čaja stolisnika. Razlika je i do 72% četvrti dan (Slika 13).



Slika 13 Prosječna duljina klice kukuruza u 3. otopini

pH-vrijednost i svojstvo otopina

Svi pripravci te prokuhana voda (kontrolna skupina) imaju pH-vrijednost oko 7. Manje odstupanje pokazuje treća otopina koprive čija pH-vrijednost iznosi 8. Također, miris te otopine je neugodan zbog razvoja mikroorganizama (Tablica 9).

Tablica 9 pH vrijednost otopina

otopina	voda	majčina dušica	stolisnik	maslačak	kopriva
1. otopina	7	7	7	7	7
2. otopina	7	7	7	7	7
3. otopina	7	7	7	7	8



RASPRAVA

Nakon provedenog istraživanja i analize dobivenih rezultata utvrđeno je da pretpostavke iznesene na početku istraživanja nisu točne. Postotak klijavosti pšenice izrazito je visok za sve pripravke, ali velike su razlike u rastu klijanca. Prema istraživanju, klijanci pšenice najbolje uspjevaju na podlozi od prokuhane vode, a potom na podlozi od čaja majčine dušice dok stolisnik djeluje najmanje poticajno na razvoj. Kukuruz pokazuje nešto slabiju klijavost u odnosu na pšenicu. Vjerojatno je period namakanja (bubrenja) trebao biti dulji jer je sjemenka veća. Prema istraživanju, i klijanci kukuruza najbolji rast imaju na podlozi od prokuhane vode, a potom na podlozi od stolisnika što je suprotno onome u pšenice. Razlog tome može biti kompatibilnost biljnih vrsta. Kolar-Fodor (2017) navodi kako biljke u vrtu utječu jedna na drugu na način da luče aktivne tvari – fitoncide. „Fitoncidi su različite biološke aktivne tvari koje stvaraju biljke, a djeluju na životne procese susjednih biljaka i malih organizama poticajno ili sprečavajući. Oni mogu usmrtniti bakterije i gljivice, otrovati kukce i gliste, ali i potaknuti susjedne biljke na bujan rast ili totalno blokirati rast susjedne biljke. Oni su glavni “krivac” zašto postoje tabele dobrih i loših susjeda u vrtu“ (Kolar-Fodor, 2017).

Lisjak i sur. (2015) u istraživačkom radu navode fermentaciju kao pozitivan čimbenik za rast i razvoj kres salate međutim u radu ne navode od kojih biljnih vrsta je fermentirani biljni ekstrakt napravljen. U našem istraživanju duljina stajanja suhe tvari koprive u vodi (fermentacija) značajno je poboljšala rast klijanaca pšenice (do 57%). Za razliku od toga, fermentacija čaja majčine dušice i maslačka uzrokovala je sporiji rast. Rast klijanaca pšenice nije se značajno mijenjao s duljinom stajanja stolisnika u vodi. I kod kukuruza fermentacija čaja maslačka uzrokovala je sporiji rast klijanaca. Prema Vojnović (2017) maslačak se koristi kao insekticid i kao gnojivo, ali treba ga potopiti u vodi i ostaviti da fermentira i do tri tjedna. U našem istraživanju maslačak je fermentirao tri dana, što je mogući razlog slabijeg utjecaja na razvoj. Fermentacija čaja majčine dušice pozitivno je utjecala na razvoj klijanaca kukuruza (povećenje rasta do 44%). Zalijevanje sjemenja pšenice i kukuruza odstajalom prokuhanom vodom (kontrolnom skupinom) nije utjecalo na brži rast klijanaca.

Fermentacija nije značajno utjecala na pH-vrijednost pripravaka i kontrolne skupine u promatranom razdoblju. Ona je neutralna, a manje odstupanje pokazuje samo treća otopina koprive čija pH-vrijednost iznosi 8.

U našim uvjetima (s obzirom na koncentraciju i stajanje suhe tvari, temperaturu, pH) podloga od prokuhane vode pokazala je najbolje rezultate, ali to ne znači da bi u drugim uvjetima i za druge biljke vrijedilo isto.

ZAKLJUČCI

Na osnovi dobivenih rezultata zaključeno je sljedeće:

- ✔ prokuhana voda dovoljna je za normalnu klijavost i rani razvoj sjemenke pšenice i kukuruza u našim uvjetima istraživanja (temperatura, količina biljnih pripravaka otopljenih u vodi, duljina fermentacije)
- ✔ nakon prokuhane vode stolisnik djeluje najviše poticajno na razvoj sjemenke kukuruza, a najmanje poticajno na razvoj sjemenke pšenice – postoje manje i više kompatibilne biljke
- ✔ fermentacija čaja koprive pozitivno je utjecala na rast klijanaca pšenice (do 57%)
- ✔ fermentacija čaja majčine dušice pozitivno je utjecala na rast klijanaca kukuruza (do 44%)



- ☑ fermentirani čaj maslačka uzrokuje sporiji rast klijanca pšenice i kukuruza
- ☑ odstajala prokuhana voda (kontrolna skupina) nije utjecala na brži rast klijanaca
- ☑ period stajanja pripravaka u prokuhanoj vodi nije značajno mijenjao pH-vrijednost.

LITERATURA

- Džapo J., Tonšetec J., Zdražil L. 2014. Udžbenik 7: udžbenik biologije za sedmi razred osnovne škole. Profil, Zagreb
- Benyovski Šoštarić K. 2010. Zeleni kvadrat: zdravlje iz organskog vrta. Profil multimedija, Zagreb
- Lesinger I. 2006. Kućna biljna ljekarna. Adamić, Rijeka
- Lisjak M. i sur. 2015. Klijavost i vigor sjemenja kres salate nakon tretmana biljnim pripravcima. Poljoprivreda, 21: 41-46
- Eršegović A., Strmečki F. 2016. Utjecaj vode skupljanjem magle na klijavost pšenice (*Triticum aestivum* L.). Bioznalac, str.: 51-64
- Vojnović R. 2017. Maslačak – zaštitnik bilja, gnojivo i lijek. <https://www.agroklub.com/hortikultura/maslacak-zastitnik-bilja-gnojivo-i-lijek/31503/>, pristupljeno 10.4.2017.
- Hrvatska enciklopedija. 2012. Fitoncidi. Leksikografski zavod Miroslav Krleža. <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=19769>, pristupljeno 12.4. 2017.
- Kolar-Fodor S. 2017. Dobri i loši susjedi. Večernji hr. <http://blog.vecernji.hr/silvija-kolar-fodor/dobri-i-losi-susjedi-u-vrtu-4112>, pristupljeno: 12.4.2017.

UTJECAJ IONA ŽELJEZA, MAGNEZIJA I KALCIJA NA RAST I RAZVOJ GRAŠKA (*Pisum sativum* L.)

Emma Gajski, 7. razred

Osnovna škola Kustošija, Zagreb

Mentor: Đurđica Patafta

SAŽETAK

Praćen je rast i razvoj graška kako bi se utvrdio utjecaj mineralnih tvari iz šumećih tableta u vodi za zalijevanje na rast biljke. Biljke su zalijevane vodom obogaćenom magnezijevim, kalcijevim i željezovim ionima te običnom vodovodnom vodom kao kontrolnom skupinom. Tijekom rasta praćene su promjene na biljkama, visina izdanaka, težina korijena i listova. Magnezijevi ioni uzrokovali su veću masu listova i korijena, kalcijevi ioni šire lisne žile. Najbolji učinak imali su željezovi ioni koji su pospješili bolji rast biljaka, veću masu korijena i listova. Rezultati istraživanja pokazali su da šumeće tablete s dodacima magnezijevih, kalcijevih i željezovih iona pozitivno djeluju na rast i razvoj biljaka u prvih 30 dana, dok u suvišku njihovo djelovanje postaje štetno, ali bi se mogle koristiti prilikom zalijevanja biljaka u početku njihovog rasta.

Ključne riječi: šumeće tablete obogaćene ionima, vrste vode za zalijevanje, izdanak, korijen, list

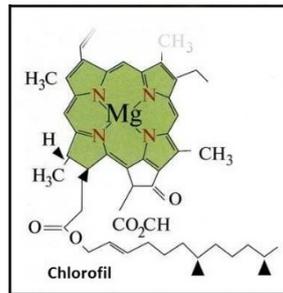
UVOD I OBRAZLOŽENJE TEME

Biljkama za rast i razvoj neophodni su različiti kemijski elementi. Zbog toga ih nazivamo esencijalni ili biogeni elementi i potrebni su tijekom cijelog životnog ciklusa biljke (Finck, 1982). Budući da biljke ne zahtijevaju jednake količine hranjivih elemenata, uobičajeno je da se dalje dijele na: makroelemente (C, O, H, N, P, K, S, Ca i Mg), mikroelemente (Fe, B, Mn, Zn, Cu, Mo, Cl i Ni), korisne elemente (npr. Na, Si, Al i dr.) i toksične elemente (npr. Hg, Pb i dr.). Nedostatak jednog ili više biogenih elemenata uzrokuje različite fiziološke poremećaje u metabolizmu biljke što se očituje različitim simptomima na biljnim organima, najčešće listu i plodovima (slika 1). Ako je tijekom rasta količina biogenih elemenata prevelika mogu nasuprot tome uzrokovati usporeni rast biljnih organa, pa čak i uginuće biljaka (Vavetić, 2016).



Slika 1 Kloroza na listovima limuna

Magnezij (Mg) je zemnoalkalijski metal, dvovalentni ion (Mg^{2+}), osmi najzastupljeniji mineral nađeni u Zemljinoj kori. On je makroelement, to znači da je potreban biljci u većim količinama (>0,1 %). Prijeko je potreban i za životinje. Uključen je u velik broj enzimskih reakcija koje utječu na gotovo sve životne pojave. Ima važnu ulogu u sintezi klorofila ili npr. za sintezu bjelančevina (Marschner, 1995). Kod biljaka se ion magnezija nalazi u središtu svake molekule klorofila, važne za proizvodnju energije od Sunčeve svjetlosti (slika 2). Biljke magnezij dobivaju na principu difuzije i slobodnim tokom vode. Suvišak magnezija dovodi do smanjenja koncentracije kalcija i kalija u biljci pa se lišće uvija, ne razvija potpuno i odumire i otpada (Vavetić, 2016).



Slika 2 Molekula klorofila

Kalcij (Ca) je zemnoalkalijski metal, dvovalentni ion (Ca^{2+}). Također je makroelement. Kalcij ima važnu ulogu u stabilizaciji i građi stanične membrane, u izgradnji staničnih stjenki i u njihovoj čvrstoći. Ima značajnu ulogu u djelovanju fitohormona te na taj način bitno utječe na rast biljaka i pravilnu diobu stanica. Uslijed nedostatka kalcija biljke poprimaju grmolik izgled i zaostaju u rastu. Suvišak kalcija zasad nije dovoljno istražen, ali smatra se kako može doći do slabijeg upijanja biogenih elemenata i zaostajanja biljaka u rastu (Vavetić, 2016.).

Željezo (Fe) je vrlo česti element u Zemljinoj kori, teški je metal koji se javlja u vrlo različitim oblicima. U Zemljinoj kori ima ga oko 5 %. On je mikroelement, to znači da je potreban biljci u manjim količinama (< 0,1 %). Količina topljivog (biljci pristupačnog) željeza (npr. Fe^{2+} i Fe^{3+}) u tlu je vrlo niska (Marschner, 1995). Željezo je važan dio mnogih enzima, ima važnu ulogu u sintezi klorofila, utječe na proces disanja i ugrađivanja dušika u biljci (Pevalek-Kozlina, 2002). Nedostatak željeza izaziva usporenje rasta lista i korijena. Suvišak željeza je rijedak, osim u vrlo kiselim i slabo prozračnim tlima, gdje suvišak željeza može štetno djelovati na biljke, npr. usporava rast, uzrokuje tamnu boju lišća i korijena (Vukadinović i Vukadinović 2011).

Kao izvor minerala magnezija, kalcija i željeza u svakodnevnoj prehrani uzimaju se šumeće tablete. U svom sastavu sadrže aktivnu tvar (sol), koja otapanjem u vodi oslobađa određeni ion, npr. magnezijev karbonat oslobađa Mg^{2+} , kalcijev karbonat uz kisele dodatke u tabletama Ca^{2+} , željezov (II) glukonat Fe^{2+} . U istraživanju su upotrebljene kao izvor iona kalcija, magnezija i željeza prilikom zalijevanja biljaka, jer su navedeni ioni potrebni i biljnim i ljudskim stanicama. Limunska kiselina je sastavni dio svake šumeće tablete, a sastavni je dio svake biljke i životinje, pogotovo u biljaka kao što su agrumi. pH otopine limunske kiseline je ispod 4,0, a biljkama za rast treba pH između 5,5 i 7,5, tako da bi duža primjena limunske kiseline u vodi za zalijevanje mogla biti štetna (DoHow, 2016). Natrijev hidrogenkarbonat ima lužnata svojstva pa bi dio limunske kiseline mogao neutralizirati u otopinama. Učinci ostalih sastojaka šumećih tableta su u vrlo malim količinama (manje od 0,01%). U literaturi nije pronađen njihov učinak na biljke.

Na odabir teme utjecala je široka zastupljenost šumećih tableta u svim dućanima s hranom, ljekarnama i sl. i mogućnost njihove primjene kao dopuna za uzgoj biljaka. Ciljevi istraživanja su bili:

- Pratiti rast i razvoj biljaka zalijevanih vodom obogaćenom magnezijevim, kalcijevim i željezovim ionima i uspoređivati s kontrolnom skupinom zalijevanom običnom vodovodnom vodom
- Pratiti različite promjene na biljnim organima (visina, masa lista i korijena, boja listova i korijena te širina lisnih žila) u odnosu na kontrolnu skupinu
- Usporediti nastale promjene na biljkama svih promatranih skupina

- zaključiti koja je uloga navedenih iona na rast i razvoj biljaka.

Pretpostavke istraživanja su bile:

- Biljke zalijevane vodom obogaćenom magnezijevim ionima mogle bi biti više rastom, prosječno težeg korijena i lista od kontrolne skupine biljaka, jer magnezij ima važnu ulogu u sintezi klorofila i utjecaj na rad enzima koji stvaraju bjelančevine u biljci. Tijekom daljnjeg rasta biljaka povećana količina magnezija mogla bi usporiti njihov rast.
- Biljke zalijevane vodom obogaćenom kalcijevim ionima mogle bi imati čvršće listove ili veće lisne žile od kontrolne skupine, jer kalcij ima važnu ulogu u građi stanične stjenke biljaka. Tijekom daljnjeg rasta povećana količina kalcija mogla bi usporiti rast biljaka.
- Biljke zalijevane vodom obogaćenom željezovim ionima mogle bi biti više rastom, prosječno težeg korijena i lista od kontrolne skupine biljaka, jer željezo ima važnu ulogu u sintezi klorofila i utjecaj na rad enzima koji stvaraju bjelančevine u biljci. Boja listova ili korijena mogla bi biti tamnija, a biljke više rastom od kontrolne skupine. Tijekom daljnjeg rasta povećana količina željeza mogla bi usporiti rast biljaka.
- Pomoćne tvari iz šumećih tableta neće previše negativno utjecati na rast biljaka jer su u malim količinama.

METODE RADA

Istraživanje je provedeno od 30.10.2016. do 20.12.2016., što čini ukupno 50 dana eksperimentalnog opažanja.

Za sisanje sjemenki bio je potreban sljedeći pribor: 4 posudice za sisanje sjemenki različitih boja (zeleno - magnezij, crvena - kalcij, bijela – kontrolna skupina i smeđa – željezo), zemlja za cvijeće (Gardol bio zemlja), sjemenke grašaka (sorte Piccolo Provenzale, proizvođač Miagra), posudice za zalijevanje (slika 6), vaga za mjerenje prosječnih masa korijena i listova.



Slika 3 Plastične posude s pripremljenom vodom za zalijevanje biljaka

Sve posude bile su jednake veličine i označavane odgovarajućim nazivima prema vrsti vode kojom će se biljke zalijevati (slika 3). U svaku posudu stavljana je jednaka količina zemlje. Sijano je po 11 sjemenki graška. Broj sjemenki u svakoj posudi je bio 11. Ukupno je promatrano 44 posijanih sjemenki graška. Voda za zalijevanje biljaka priređivana je u četiri plastične odmjerne posude od 1 L (slika 3):

- Kontrolna skupina zalijevana je običnom vodovodnom vodom. U plastičnu posudu ulije se vodovodna voda, koja malo odstoji.
- Voda s magnezijevim ionima – u 1L vodovodne vode stavi se 1 šumeća tableta. Nakon što tableta prestane s pjenjenjem te malo odstoji, koristi se za zalijevanje biljaka.
- Voda s kalcijevim ionima – u 1L vodovodne vode stavi se 1 šumeća tableta. Nakon što tableta prestane s pjenjenjem te malo odstoji, koristi se za zalijevanje biljaka.
- Voda sa željezovim ionima – u 1L vodovodne vode stavi se 1 šumeća tableta. Nakon što tableta prestane s pjenjenjem te malo odstoji, koristi se za zalijevanje biljaka.

Prilikom zalijevanja korištena je šprica volumena od 60 mL. Biljke su zalijevane u isto vrijeme i istim volumenom tekućine 120 mL. Posudama s biljkama omogućeni su jednaki uvjeti s obzirom na temperaturu i svjetlost.

U istraživanju korištene su sljedeće šumeće tablete (500 mg) (slika 4):

- magnezija (proizvođača Naturel):
Aktivna tvar: magnezijev karbonat
Pomoćne tvari: limunska kiselina, natrijev hidrogenkarbonat (soda bikarbona), šećer, prirodna aroma limuna, sladila natrijev ciklamat i natrijev saharinat, bojilo natrijev riboflavin-5-fosfat
- kacija (proizvođača Naturel):
Aktivna tvar: kalcijev karbonat
Pomoćne tvari su: limunska kiselina, natrijev hidrogenkarbonat, šećer, prirodna aroma naranče, sladila natrijev ciklamat i natrijev saharinat
- željeza (proizvođača Multivita):
Aktivna tvar: željezov glukonat
Pomoćne tvari: limunska kiselina, natrijev hidrogenkarbonat, šećer, arome borovnice i kupine, sladila (sorbitol, manitol, i aspartam), bojilo (betanin).



Slika 4 Posijane sjemenke graška i sortirane s obzirom na vrstu zalijevane vode

Nakon otapanja šumećih tableta u vodi izmjeren je pH otopine pomoću univerzalnog indikatora. U svakoj otopini pH je bio 6.

Visina biljaka mjerena je običnim ravnalom od 30 cm. Na temelju rezultata izračunata je prosječna visina biljaka određene skupine prema formuli:

$$\text{prosječna visina biljaka} = \frac{\text{zbroj svih visina određene skupine biljaka}}{\text{ukupan broj biljaka određene skupine}}$$

Na kraju promatranja (20.12.) korijenje i lišće je odvajano. Uspoređivan je izgled korijenja (glavni, bočni dio, veličina). Također su vagani korjenje i listovi pojedine skupine, te je određivana njihova prosječna masa (slika 5).

$$\text{prosječna masa listova} = \frac{\text{zbroj masa 11 listova određene skupine}}{\text{ukupan broj listova određene skupine}}$$

$$\text{prosječna masa korijena} = \frac{\text{zbroj masa 11 korijena određene skupine}}{\text{ukupan broj korijena određene skupine}}$$



Slika 5 Vaganje korijenja ispitivanih biljaka

Dobiveni rezultati upisivani su u tablice ili su grafički prikazivani.

REZULTATI

Biljke su prvi puta izmjerene nakon deset dana klijanja i rasta. Podaci su unijeti u tablicu 1. Zabilježen je negativan utjecaj na visinu stabljike kod biljaka zalijevanih s vodom pod utjecajem Mg^{2+} i pozitivan utjecaj uz Fe^{2+} (slika 6).

Tablica 1 Dobiveni rezultati nakon deset dana od sijanja sjemenki

Skupina biljaka	Datum promatranja	Prosječna visina	Uočene razlike u listu, korijenu, stabljici u odnosu na kontrolnu skupinu
Mg^{2+} skupina	9.11.2016	5.45	- prosječna visina biljaka je manja od kontrolne skupine
Ca^{2+} skupina	9.11.2016	6.54	- prosječna visina biljaka je podjednaka s kontrolnom skupinom
Fe^{2+} skupina	9.11.2016	8.61	- prosječna visina biljaka je veća od kontrolne skupine
Kontrola	9.11.2016	6.5	Počinju se razvijati prvi listovi. Biljke dobro napreduju.

Slika 6 Biljke promatranih skupina 9.11. (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} skupina i Kontrolna skupina)

Rezultati nakon dva tjedna klijanja i rasta prikazani su u tablici 2. Zabilježen je izraženiji negativan utjecaj na visinu stabljike kod biljaka zalijevanih s vodom pod utjecajem Ca^{2+} (slika 7).

Tablica 2. Dobiveni rezultati kod biljaka starih 14 dana

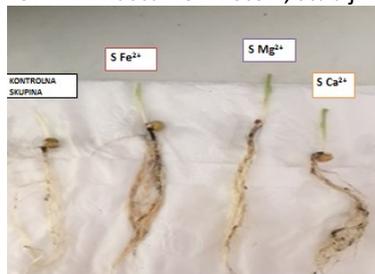
Skupina biljaka	Datum promatranja	Prosječna visina	Uočene razlike u listu, korijenu, stabljici u odnosu na kontrolnu skupinu
Mg^{2+} skupina	13.11.2016	10.13	- prosječna visina biljaka je manja od kontrolne skupine
Ca^{2+} skupina	13.11.2016	9.95	- prosječna visina biljaka je manja od kontrolne skupine, maje šire lisne žile u odnosu na kontrolnu skupinu
Fe^{2+} skupina	13.11.2016	13.49	- prosječna visina biljaka je veća od kontrolne skupine
Kontrola	13.11.2016	10.65	Rastu novi listovi, stabljike se granaju.

Slika 7 Biljke promatranih skupina 13.11. (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} skupina i Kontrolna skupina)

Nakon 23 zabilježena je promjena korijena (slika 8) kod biljaka pod utjecajem Ca^{2+} (tablica 3).

Tablica 3. Dobiveni rezultati kod biljaka starih 23 dana

Skupina biljaka	Datum promatranja	Prosječna visina	Uočene razlike u listu, korijenu, stabljici u odnosu na kontrolnu skupinu
Mg^{2+} skupina	22.11.2016	14.41	- prosječno su niže, ali imaju tamniji korijen
Ca^{2+} skupina	22.11.2016	15.78	- šire lisne žile
Fe^{2+} skupina	22.11.2016	18.4	- korijen razgranatiji i malo tamniji od kontrolne skupine i ostalih promatranih
Kontrola	22.11.2016	17.67	Rastu novi listovi, stabljike se granaju.



Slika 8 Boja i izgled korijena ispitivanih biljaka

Nakon 34 dana smanjuju se razlike između kontrole skupine i skupina biljaka zalijevanih vodom koja je sadržavala različite ione (tablica 4).

Tablica 4. Dobiveni rezultati kod biljaka starih 34 dana

Skupina biljaka	Datum promatranja	Prosječna visina	Uočene razlike u listu, korijenu, stabljici u odnosu na kontrolnu skupinu
Mg^{2+} skupina	3.12.2016	15.62	Biljke se po izgledu ne razlikuju od kontrolne skupine - prosječno su niže , ali imaju tamniji korijen
Ca^{2+} skupina	3.12.2016	17.46	Biljke se po izgledu ne razlikuju od kontrolne skupine - ne vidi se više razlika u širini lisnih žila
Fe^{2+} skupina	3.12.2016	21.85	Biljke se po izgledu ne razlikuju od kontrolne skupine. Jedna od biljaka raste znatno brže od ostalih. - visina izdanaka je viša od kontrolne skupine
Kontrola	3.12.2016	19.99	Biljke rastu i razvijaju se. Jedna od biljaka raste znatno brže od ostalih.

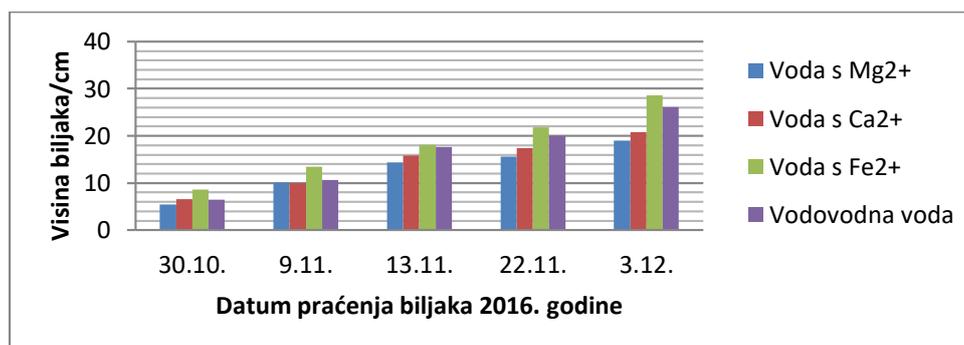
Nakon 50 dana većina biljaka je uvenula i u kontrolnoj i u ispitivanim skupinama (tablica 5, slika 9).

Tablica 5. Dobiveni rezultati kod biljaka starih 50 dana

Skupina biljaka	Datum promatranja	Prosječna visina	Uočene promjene na listu, korijenu, stabljici
Mg ²⁺ skupina	20.12.2016	19.03	Biljke venu, listovi počinju žutjeti, biljke su niže rastom
Ca ²⁺ skupina	20.12.2016	20.85	Biljke venu, listovi počinju žutjeti, biljke su niže rastom
Fe ²⁺ skupina	20.12.2016	28.6	Biljke venu, listovi počinju žutjeti, biljke su više rastom. Jedna biljka nije uvenula, nastavlja svoj rast.
Kontrola	20.12.2016	26.15	Biljke venu, ali su zelenije od ispitivanih. Jedna biljka nije uvenula, nastavlja svoj rast.

Slika 9 Biljke promatranih skupina biljaka 20.12. (Mg²⁺, Ca²⁺, Fe²⁺ skupina i Kontrolna skupina)

Biljke zalijevane vodom s Fe²⁺ ionima pri svakom mjerenju bile su više u odnosu na druge biljke (slika 10).



Slika 10 Visina biljaka s obzirom na vrstu vode kojom su zalijevane u promatranom razdoblju

Zabilježena je najveća prosječna masa korijena i listova kod biljaka zalijevanih vodom koja je sadržavala Fe²⁺ ione (tablica 6).

Tablica 6 Prosječne izmjerene mase listova i korijena

Skupina biljaka	Mg ²⁺ skupina	Ca ²⁺ skupina	Fe ²⁺ skupina	Kontrolna skupina
Prosječna masa korijena	4,2 g	2,4 g	4,5 g	2,2 g
Prosječna masa listova	1,3 g	0,5 g	1,4 g	0,3 g

RASPRAVA

Na temelju rezultata se vidi kako je najviše razlika između promatranih skupina biljaka bilo u prvih 30 dana rasta. Većina postavljenih pretpostavki je potvrđeno.



Biljke zalijevane vodom obogaćenom magnezijevim ionima nisu bile više rastom što nije u skladu s pretpostavkama, ali je potvrđeno da je prosječna težina korijena i listova veća od kontrolne skupine biljaka. Može se potvrditi da magnezij ima važnu ulogu za rast i razvoj biljaka. Pedeseti dan promatranja došlo je do uvenuća biljaka i usporenje rasta. Kao uzroci mogli bi biti povećana količina magnezija. To je u skladu s podacima u kojima suvišak magnezija dovodi do smanjenja koncentracije kalcija i kalija u biljci pa se lišće uvija, ne razvija potpuno i odumire i otpada (Vavetić, 2016). Za propadanje biljaka uzrok bi mogao biti i prisustvo ostalih tvari u tabletama za koje nema odgovarajuće literature.

Neke od biljaka zalijevane vodom obogaćenom kalcijevim ionima imale su šire lisne žile od kontrolne skupine. Time je potvrđeno da kalcij ima važnu ulogu u građi stanične stijenke biljaka ili njihovih organa (Bergmann, 1992).

Tijekom daljnjeg rasta povećana količina kalcija je usporila rast biljaka i uzrokovala uvenuće. To je u skladu s literaturom u kojoj se navodi da može doći do slabijeg upijanja biogenih elemenata i zaostajanja biljaka u rastu u slučaju suviška (Vavetić, 2016). Razlozi bi mogli biti isti kao i kod biljaka zalijevane magnezijevim ionima.

Pretpostavke o djelovanju željeza na rast biljaka su potvrđene. Biljke su cijelo praćeno vrijeme bile više rastom, prosječno im je bio teži korijen i listovi od kontrolne skupine biljaka i svih ostalih. Potvrđeno je da željezo ima važnu ulogu u rastu i razvoju biljnih organa. Boja korijena bila je tamnija, te je potvrđena pretpostavka da veća količina željeza uzrokuje tamniju boju korijena. Tijekom daljnjeg rasta povećana količina željeza je dovela do uvenuća gotovo svih biljaka, osim jedne. Vjerojatno su prisutne tvari u tabletama oslobađale veću količinu željezovih iona koji su štetno djelovali na biljke te je to bio uzrok tamnije boje korijena (Vukadinović i Vukadinović 2011). Jedina preživjela je vjerojatno uspjela stvoriti ravnotežu u količini svih prisutnih tvari te je vrlo uspješno nastavila rasti. Mogla bi biti daljnji predmet istraživanja.

Za djelovanje pomoćnih tvari ne može se utvrditi je li njihov utjecaj pozitivan ili negativan jer su nakon pedeset dana sve biljke, pa i kontrolne uvenule. Niski pH otopine mogao bi štetno utjecati na rast biljaka jer za rast treba pH između 5,5 i 7,5. Duža primjena limunske kiseline u vodi za zalijevanje mogla biti štetna. No, u šumećim tabletama nalazi se i soda bikarbona koja neutralizira limunsku kiselinu. Izmjereni pH u tabletama je bio 6.

Rezultati istraživanja pokazali su da ako je tijekom rasta količina biogenih elemenata prevelika mogu usporiti rast biljnih organa, pa čak i uvenuće biljaka (Vavetić, 2016).

No, također je vidljivo da u početku rasta i razvoja biljaka šumeće tablete pospješuju rast, šire lisne žile, ali ne smiju se koristiti duže vrijeme.

ZAKLJUČCI

Rezultati istraživanja pokazali su da šumeće tablete s dodacima magnezijevih, kalcijevih i željezovih iona pozitivno djeluju na rast i razvoj biljaka u prvih 30 dana. U odnosu na kontrolnu skupinu magnezijevi ioni u šumećim tabletama nisu pospješili viši rast biljaka, ali je potvrđeno da je prosječna težina korijena i lista veća. Povećana količina magnezija, ali i prisustvo ostalih tvari dužom primjenom



usporava rast biljaka te uzrokuje uvenuće. Kalcijevi ioni iz šumećih tableta potaknuli su razvoj širih lisnih žila u odnosu od kontrolnu skupinu. Daljnjim rastom povećana količina kalcija usporila je rast biljaka i uzrokovala uvenuće biljaka. Razlozi bi mogli biti isti kao i kod biljaka zalijevane magnezijevim ionima. Željezovi ioni pospješuju viši rast biljaka, prosječno veću težinu korijena i listova. Povećana količina željeza daljnjim rastom biljaka uzrokovala je uvenuća biljaka i tamniju boju lišća. Djelovanje pomoćnih tvari ne može se utvrditi jer su nakon pedeset dana sve biljke, pa i kontrolna, uvenule.

Šumeće tablete mogle bi se koristiti prilikom uzgoja biljaka te pospješiti bolji rast i razvoj, ali ne duže vrijeme ili prilikom svakog zalijevanja.

LITERATURA

- Bahat Z. I Stepinec D: Nedostatak željeza kod biljaka s različitim mehanizmima usvajanja željeza, „case study“: kukuruz i uljana repica, Zagreb, 2011.
- Gluhić D., Magnezij u ishrani bilja, Gnojidba.info, <http://www.gnojidba.info/makroelementi/magnezij-u-ishrani-bilja-i/> (pristupljeno 12. rujna 2016.)
- Škvorc Ž. I sur. ,2014: Ishrana bilja, interna skripta, Sveučilište u Zagrebu
- Marschner, H. (1995.): Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd Edition. Academic Press, London
- Vavetić L. ,2016: Makroelementi u tlu i biljci, Završni rad,Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera Šumarski fakultet, Poljoprivredni fakultet u Osijeku
- Vukadinović, V., V. Vukadinović, 2011: Ishrana bilja, Poljoprivredni fakultet Osijek, 442 str. Osijek.
- DoHow (2016.): Utjecaj limunske kiseline na biljke, <http://dohow.info/hr/pages/650745> (pristupljeno 21.10.2016.)

UTJECAJ KISELIH KIŠA NA BILJNI SVIJET TRAVNJAKA

Nadja Novak, 7. razred
Sara Trnovčanec, 7. razred

OŠ Strahoninec, Strahoninec
Mentor: Nataša Pongrac

SAŽETAK

Istraživački dio rada proveden je u razdoblju od tridesetak dana u školskom kabinetu (tijekom siječnja i veljače 2017.). Osnovni ciljevi istraživačkoga projekta su istražiti utjecaj organskih i anorganskih kiselina određene pH vrijednosti na klijanje sjemenki, rast i razvitak biljke te oštećenje biljnih organa pojedinih biljaka travnjaka. Također se želi odrediti utjecaj kiselina različitih pH vrijednosti na različite vrste tla, pjeskovito tlo i humusni supstrat, te ih povezati s klijanjem, rastom i razvitkom uzoraka. Uzorci korišteni u istraživanju su: trava (*Poa pratensis* L.), kamilica (*Matricaria chamomilla* L.) i djetelina (*Trifolium repens* L.). Istraživanje je provedeno na ukupno 64 uzorka posijana na spomenuta tla te su svaka tri dana zalijevana s 25 ml dušične, sumporne ili limunske kiseline. Korištenim kiselinama unaprijed su određene pH vrijednosti, pH 3,5, pH 4 i pH 5,5. Kontrolni uzorci sijani su na obje vrste tla i zalijevani su kišnicom. Svi su uzorci bili izloženi jednakim uvjetima svjetlosti, temperature i vlage. Istraživanjem je ustanovljeno da koncentracija i vrsta kiseline nemaju značajnijeg utjecaja na klijanje sjemenki, nego klijanje ovisi o vrsta tla, dok je mjerenjem visine izdanka i promatranjem stupnja oštećenja biljnih organa utvrđeno da kiseline različitih pH vrijednosti znatno utječu na rast biljke i njezino oštećenje te da znatno utječu na promjenu pH vrijednosti tla. Primijećeno je da su uzorci zalijevani limunskom kiselinom brže rasli i bili manje oštećeni od uzoraka zalijevanih anorganskim kiselinama istih pH vrijednosti. Neke naše pretpostavke nisu bile točne, a neke odgovaraju dobivenim rezultatima. Svakako, veći broj, raznolikost uzoraka te duže vrijeme promatranja, kao i ponovljeni pokus, dalo bi vjerodostojnije rezultate.

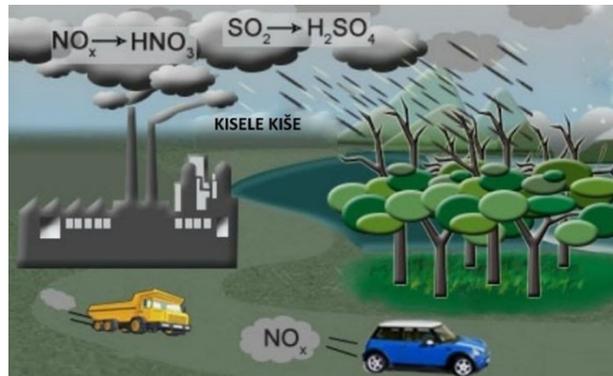
Ključne riječi: *klijanje, razvitak biljke, plodnost tla, kiseline*

UVOD

Travnjak je kopneni ekološki sustav u kojem prevladavaju trave i druge zeljaste biljke (Bendelja i sur., 2013.). Gledajući s aspekta zaštite prirode najvrjedniji su vlažni i mediteranski suhi travnjaci. Ti su tipovi staništa izrazito ugroženi. Glavni su razlozi ugroženosti vlažnih travnjaka hidromelioracijski zahvati, dok su svi tipovi travnjaka ugroženi zbog zanemarivanja livada i pašnjaka uslijed napuštanja seoskih područja i ekstenzivne poljoprivrede (Milanović i Memić, 2006).

Ubrzani razvitak industrije povlači za sobom pojačana onečišćenja u zraku, vodi i na tlu koja se stalno ili povremeno gomilaju kao različite otpadne tvari, mijenjajući na taj način normalni sastav zraka, vode i tla. Kisela kiša je padalina zagađena sumpornim i dušičnim oksidima i drugim kemijskim spojevima. Dok normalna pH vrijednost kiše iznosi otprilike oko 5,5, pH vrijednost kisele kiše iznosi u prosjeku od 4 do 4,5. To otprilike odgovara 40 puta većoj količini kiseline u odnosu na kišnicu. Glavnu odgovornost za opterećenja uzrokovana kiselim kišama nose termoelektrane, dim iz kućanstva i ispušni plinovi u prometu. Pri procesima sagorijevanja nastaju sumporov dioksid, dušikovi oksidi i drugi plinovi koji pospešuju nastajanje kiselina. Takvi slobodni nemetalni oksidi oksidiraju u vlažnoj atmosferi sa vodenom parom u sumpornu i dušičnu kiselinu. Te tvari se otopljene nalaze u zraku tako da onda na zemlju padaju sa padalinama. Pošto ti proizvodi sagorijevanja nastaju u povećanoj količini u gradovima i industrijskim zonama, tamo je i pH vrijednost većinom niža nego na selu (Filipan i sur., 1996). Pod pojmom dušik-oksidi (NO_x) objedinjuju se dva spoja: dušikov monoksid (NO) i dušikov dioksid (NO_2). Kod svakog procesa sagorijevanja se prije svega oslobađa dušikov monoksid koji kasnije u zraku oksidira u štetni dušikov dioksid. Iz dušikova dioksida se u reakciji s vlagom stvara dušična kiselina koja

je odgovorna za trećinu nastalih kiselih kiša. Sumporov dioksid je daleko najštetnija tvar u zraku. Radi se o plinu bez boje, ali jakog i neugodnog mirisa koji kod ljudi prije svega djeluje na dišne organe. U zimskim mjesecima visoka koncentracija sumporovog dioksida u zraku zajedno s prašinom koja se nalazi u zraku čini smog. Sagorijevanjem fosilnih goriva atmosfera se jako onečišćuje sumporovim dioksidom. On se pretvara u sumpornu kiselinu i u spoju s vodom čini kiselu kišu, koja je jedan od glavnih uzroka izumiranja šuma (slika 1).



Slika 1 Nastajanje kiselih kiša

(<http://www.ekokutak.zivotinje.rs/single.php?alias=evropa-nam-cuva-prirodu&id=10943>)

I u tlu kiseline započinju svoje štetno djelovanje. Kisela kiša prije svega štetno djeluje na oskudne brdske predjele, jer kiselina otapa mineralne tvari, kao npr. kalcij iz tankog sloja humusa, pa stabla ostaju bez kalcija koji im je prijeko potreban za izgradnju njihovih stanica (Kauzlarić, 2007). Kiseline izravno oštećuju i korijenje stabala ili vodom dospijevaju u lišće ili iglice drveća, te oštećuju njihova tkiva. Posljedica su mrlje smečkaste boje. Također otapaju teške metale i aluminij u tlu (Filipan i sur., 1996). Povećanjem kiselosti tla, to znači povećanjem količine H^+ iona, ispiru se iz tla važne mineralne tvari kao što su magnezij, kalij, kalcij itd. Tako dolazi do drastičnog smanjenja pH vrijednosti. Na temelju smanjivanja pH vrijednosti kao posljedica kemijskih procesa nastaju ioni koji imaju štetno djelovanje na korijenje biljaka kao i na tlo. Isto vrijedi i za ione željeza koji se oslobađaju pri pH vrijednosti manjoj od 3,8. Stupanj štetnosti konačno ovisi o vrsti o tipu tla (<http://ekokutak.pondi.hr/KiseleKise.htm>). Problem kiselih kiša u vezi je i s problemom pitke vode. Naime, radi se o zagađenju koje vrlo brzo dođe do podzemnih voda, rijeka, jezera i mora. Velike količine organske tvari koja otpadnim vodama dospijeva do rijeka, jezera i mora, izaziva proces eutrofikacije čija su posljedica mutnoća, povišena temperatura, smanjenje otopljenog kisika te pomor ribe i drugih organizama (KM, 2016).

Na odabir teme istraživanja utjecala je znatiželja koja se javila još u šestom razredu kad smo promatrali kako latice maćuhice mijenjaju boju pod utjecajem sumporovog dioksida te sadržaji vezani uz povezanost uvjeta života s razvojem živog svijeta tijekom biološke evolucije. Tema našega istraživačkog rada jest dokazati kako određene pH vrijednosti triju različitih vrsta kiselina, u obliku kiselih kiša, utječu na klijanje sjemenki, rast i razvitak biljaka travnjaka te utječu li iste i na kiselost i plodnost tla.

Osnovni ciljevi istraživačkoga rada su:



- ✓ Odrediti kako različite pH vrijednosti određenih kiselina utječu na klijanje sjemenki, rast i razvitak biljke te na oštećenje biljnih organa kod pojedinih biljnih vrsta travnjaka.
- ✓ Promatranjem želimo odrediti stupanj oštećenja pojedinih biljnih organa uzrokovanih raznim kiselinama određenih pH vrijednosti.
- ✓ Dokazati utječe li i vrsta kiseline (dušična, sumporna ili limunska) na klijanje sjemenki, rast i razvitak te oštećenje biljnih organa ili samo pH vrijednost određene kiseline.
- ✓ Ispitati mijenjaju li kisele kiše pH vrijednost tla, a time i plodnost tla, te taj čimbenik povezati s klijanjem i rastom biljke.

S obzirom na ranije stečena znanja, naša je pretpostavka da koncentracija kiseline znatno utječe na klijanje sjemenki, rast i razvitak biljaka te oštećenje biljnih organa. Pretpostavljamo da različite vrste anorganskih kiselina (dušična, sumporna) podjednako utječu na klijanje sjemenki, rast biljaka i oštećenje biljnih organa, a djeluju li organske kiseline, poput limunske koju smo koristile u istraživanju kao i anorganske, to ne možemo pretpostaviti, ali ćemo zato istraživanjem dokazati. Smatramo također da kiseline utječu i na plodnost tla tako da mijenjaju njegovu pH vrijednost jer kiseline otapaju minerale u tlu i time smanjuju njegovu plodnost. Stoga kisele kiše dovodimo u vezu i sa smanjenjem plodnosti određene vrste tla ovisno o njegovom sastavu, a samim time i s rastom i razvojem biljaka te oštećenjem biljnih organa.

METODE RADA

Uzorci biljaka korišteni u istraživanju su obična trava (*Poa pratensis* L.), kamilica (*Matricaria chamomilla* L.) i djetelina (*Trifolium repens* L.) izdvojene kao najčešće biljke travnjaka. Sjemenke koje su kupljene u trgovini, sijane su na dvije prethodno odabrane vrste tla, humusni supstrat i pjeskovito tlo. Ta tla dominiraju u našem zavičaju stoga su i prikupljena. Korištene kiseline u istraživanju su: limunska kiselina, dušična i sumporna kiselina razrijeđene u tri različita stupnja kiselosti koja se kreću između pH 3,5 i pH 5,5. Limunska kiselina je odabrana iz razloga što nas je zanimalo imaju li i kiseline (organskog podrijetla) koje nisu inače u sastavu kiselih kiša isto djelovanje na biljke kao i kiseline koje jesu sastavni dio kiselih kiša (anorganske kiseline). Određena je i pH vrijednost kišnice kojom su zalijevani kontrolni uzorci i ona je iznosila pH 6. Važno je istaknuti da su svi uzorci bili izloženi istim uvjetima temperature (sobna temperatura), svjetlosti (uz prozor) i vlage (zalijevani istim volumenom određene kiseline ili kontrolni uzorci kišnicom).

Priprema uzoraka, pribora i materijala za rad

U prvoj fazi rada prikuplja se sav potreban materijal i pribor te uzorci korišteni u istraživanju. Odabrane sjemenke trave, kamilice i djeteline (40 sjemenki od svakog uzorka) odvojeno su sijane na dvije vrste tla, pjeskovito tlo i humusni supstrat u posude za klijanje (slika 2).



Slika 2 Sijanje sjemenki na supstrat

Kontrolni uzorci (40 sjemenki svakog uzorka) sijani su duplo radi što veće vjerodostojnosti rezultata. Posude s uzorcima označene su na način:

PT – pjeskovito tlo, trava

HT – humusni supstrat, trava

PK – pjeskovito tlo, kamilica

HK – humusni supstrat, kamilica

PD – pjeskovito tlo, djetelina

HD – humusni supstrat, djetelina

KU – kontrolni uzorak.

Kiseline korištene u istraživanju su limunska kiselina (svježe ocijeđeni limun), sumporna (96%) i dušična (58%). Kiseline su razrjeđivane u tri stupnja kiselosti. Indikator papirom (pH-FIX 0-14) određivan je stupanj kiselosti koji je iznosio pH 3,5, pH 4 i pH 5,5 (slika 3).



Slika 3 Određivanje pH vrijednosti kiselina indikator papirom

Željena pH vrijednost dobivena je na način da se boca volumena 2 litre, napuni s 1,5 litara vodovodne vode i kapaljkom se dodaje kiselina (kapi dodavane u vodu se broje radi točnijeg ponovljenog slaganja otopine za zalijevanje kad se prethodna potroši), a potom se indikator papirom (nakon svake druge dodane kapi kiseline) određuje željena pH vrijednost.

Boce s kiselinama određene pH vrijednosti označene su na način:

L1 – limunska k., pH 3,5

L2 – limunska k., pH 4

L3 – limunska k., pH 5,5

S1 – sumporna., pH 3,5

S2 – sumporna., pH 4

S3 – sumporna., pH 5,5

D1 – dušična k., pH 3,5

D2 – dušična k., pH 4

D3 – dušična k., pH 5,5

K – kišnica., pH 6,0.

Supstrati s uzorcima (njih ukupno 68) zalijevani su svaka tri dana određenim volumenom (25 mililitara) kiseline određene koncentracije kada su vršena i promatranja. Kontrolni uzorci (dupli) zalijevani su kišnicom kojoj je također prethodno određena pH vrijednost (pH 6).

Određivanje vremena kada su sjemenke proklijale i u kojem postotku

Vrijeme kada su sjemenke proklijale određivan je metodom promatranja, a metodom prebrojavanja nakon osam dana određen je postotak svih sjemenki koje su proklijale u zadanim uvjetima. Rezultati su bilježeni u tablicu za sve uzorke. Uzorci su fotografirani digitalnim fotoaparatom Sony 240.

Mjerenje brzine rasta uzoraka

Ravnalom je izmjerena dužina izdanka deseti dan kod svih uzoraka. Izračunati su prosječni rezultati od svakog uzorka i zapisivani su u tablicu te fotografirani. U narednih deset dana, tri puta, ravnalom je mjerena visina izdanka biljke. Grafičkim prikazom iskazane su prosječne vrijednosti visine stabljike (izdanka) za sve uzorke.

Određivanje stupnja oštećenja uzoraka

Stupanj oštećenja uzoraka praćen je tijekom petnaestak dana. Promatrana je pokrivenost biljnih organa smeđim mrljama i njihova oštećenost. Uzete su prosječne vrijednosti uzoraka, a rezultati su prikazani tablično i fotografijama. U određivanju stupnja oštećenosti korištena je sljedeća skala procjene:

- 0 - uzorak je neoštećen
- 1 - 5% uzorka je oštećeno
- 2 - 10% uzorka je oštećeno i prekriveno smeđim mrljama
- 3 - 30% uzorka je oštećeno i prekriveno smeđim mrljama
- 4 - 50% uzorka je oštećeno i prekriveno smeđim mrljama.

ODREĐIVANJE pH VRIJEDNOSTI TLA

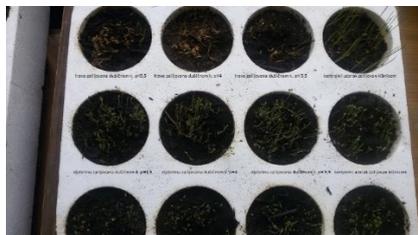
pH vrijednost uzoraka tla korištenih u istraživanju određivana je na početku i na kraju istraživanja za svaki uzorak. Određivana je tako da je 40 ml tla pomiješano s 40 ml vodovodne vode i indikator papirom određen stupanj kiselosti vodene suspenzije.

REZULTATI

Glavni rezultati istraživačkog dijela prikazani su prema provedenim analizama.

Određivanje vremena kada su sjemenke proklijale i u kojem postotku

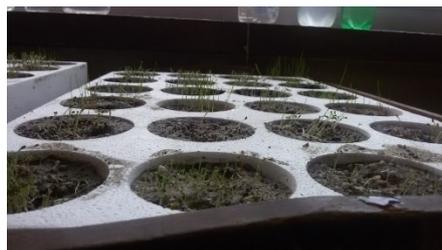
Petog dana od dana sijanja (28. 1. 2017.) promatranjem je utvrđeno da su uzorci koji su bili sijani na pjeskovitom tlu brže proklijali nego uzorci koji su bili posijani na humusnom tlu. Kamilica (K) je prva proklijala, zatim djetelina (D), a tek tri dana nakon njih trava (T). Na slikama se može uočiti da su uzorci koji su sijani na pjeskovitom tlu brže proklijali i da je pH vrijednost i vrsta kiseline kojima su uzorci zalijevani neznatno utjecala na brzinu klijanja, ali je zato znatno utjecala na daljnji rast izdanka (slika 4, slika 5 i slika 6).



Slika 4 Klijanci nakon 5 dana od dana sijanja (humusni supstrat, zalijevano dušičnom kiselinom pH 3,5, pH 4 i pH 5,5 te kontrolni uzorak)



Slika 5 Klijanci nakon 5 dana od dana sijanja (humusni supstrat, zalijevano limunskom kiselinom pH 3,5, pH 4 i pH 5,5 te kontrolni uzorak)



Slika 6 Klijanci nakon 5 dana od dana sijanja (pjeskovito tlo, zalijevano dušičnom kiselinom i sumpornom kiselinom pH 3,5, pH 4 i pH 5,5 te kontrolni uzorak)

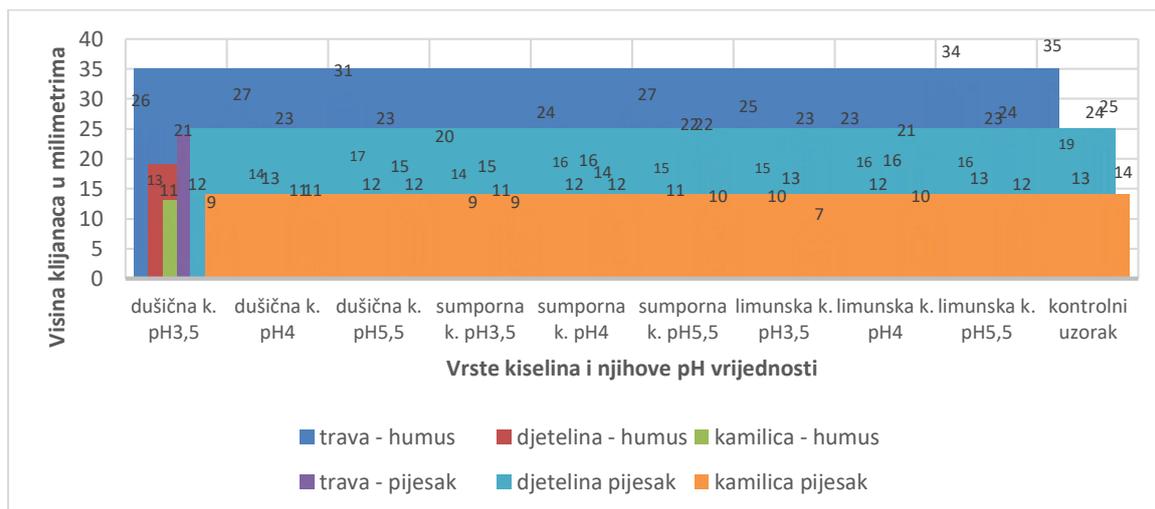
Osmi dan (1. 2. 2017.) izračunata je prosječna vrijednost prokljalih sjemenki svih uzoraka. Rezultati su prikazani u tablici 1. Iz rezultata je vidljivo da vrsta kiseline i njezina pH vrijednost nije imala većeg utjecaja na sam početak i postotak klijavosti uzoraka, ali je zato na klijavost utjecala vrsta tla.

Tablica 1 Prosječna vrijednost prokljalih sjemenki kamilice, djeteline i trave nakon osam dana u različitim uvjetima

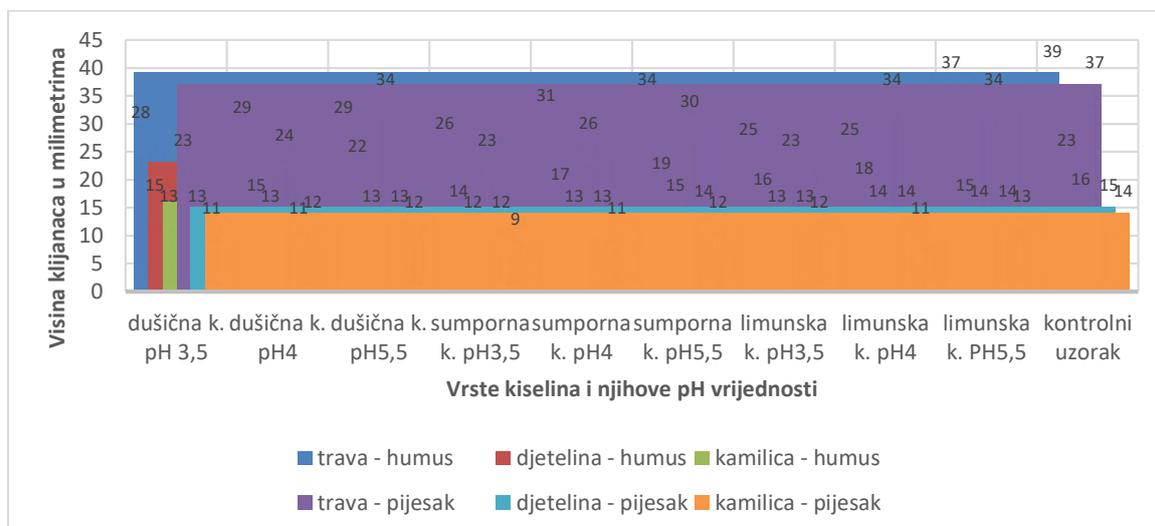
Vrsta kiseline	Pjeskovito tlo Postotak klijavosti uzoraka			Humusni supstrat Postotak klijavosti uzoraka			Kontrolni uzorak na pjeskovitom tlu Postotak klijavosti uzoraka			Kontrolni uzorak na humusnom supstratu Postotak klijavosti uzoraka		
	Kam.	Djet.	Trava	Kam.	Djet.	Trava	Kam.	Djet.	Trava	Kam.	Djet.	Trava
Dušična k. pH 3,5	81	73	63	76	60	59	-	-	-	-	-	-
Dušična k. pH 4	76	61	67	80	76	52	-	-	-	-	-	-
Dušična k. pH 5,5	84	71	62	72	63	51	-	-	-	-	-	-
Sumporna k. pH 3,5	85	73	63	68	74	62	-	-	-	-	-	-
Sumporna k. pH 4	80	82	64	68	62	51	-	-	-	-	-	-
Sumporna k. pH 5,5	76	73	64	75	77	67	-	-	-	-	-	-
Limunska k. pH 3,5	82	73	64	72	63	52	-	-	-	-	-	-
Limunska k. pH 4	75	68	65	68	70	58	-	-	-	-	-	-
Limunska k. pH 5,5	79	61	79	73	61	62	-	-	-	-	-	-
Kišnica							82	76	59	73	76	62

Mjerenje brzine rasta uzoraka

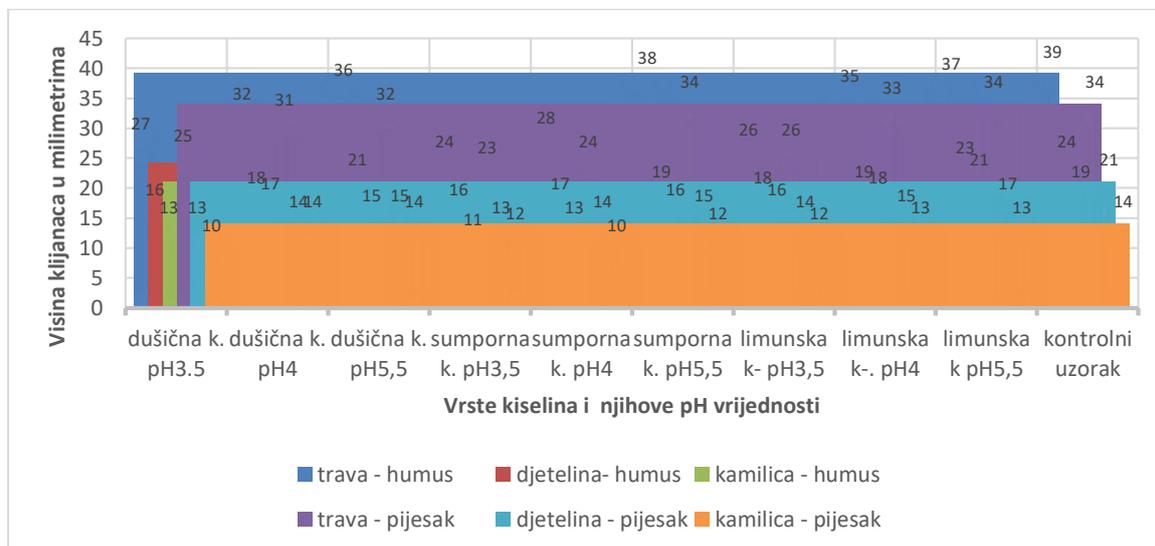
Deseti dan (3. 2. 2017.), dvanaesti dan (5. 2. 2017.) i petnaesti dan (8. 2. 2017.) od dana sijanja sjemenki, ravnalom je mjerena dužina izdanaka svih uzoraka. Na slici 7, slici 8 i slici 9 grafički su prikazane prosječne vrijednosti dužine izdanaka za ukupno 20 klijanaca od svakog uzorka. Vidljivo je da je većina uzoraka brže rasla na humusnom supstratu koji je bio zalijevan slabijim kiselinama nego na pjeskovitom tlu.



Slika 7 Visina izdanaka trave, djeteline i kamilice zalijevanih različitim kiselinama određenih pH vrijednosti (3.2.2017)



Slika 8 Visina izdanaka trave, djeteline i kamilice zalijevanih različitim kiselinama određenih pH vrijednosti (5.2.2017)



Slika 9 Visina izdanaka trave, djeteline i kamilice zalijevanih različitim kiselinama određenih pH vrijednosti (8.2.2017)

Određivanje stupnja oštećenja uzoraka

Stupanj oštećenja uzoraka određivan je 13. 2., 20. 2. i 27. 2. 2017. Iskazan je prosječnim vrijednostima dvadesetak uzoraka koji su rasli u svim praćenim uvjetima. Procjena stupnja oštećenja vršena je metodom promatranja prema skali procjene koja je navedena u metodama rada.

Rezultati su prikazani u tablici 2. Iz rezultata je vidljivo da su trava i kamilica osjetljivije na djelovanje kiselina pH vrijednosti 3,5 nego djetelina te da pH vrijednost 5,5 kod svih kiselina gotovo i nije imala nikakav utjecaj na oštećenje biljnih organa.

Tablica 2 Prosječne vrijednosti stupnja oštećenja biljnih dijelova trave, djeteline i kamilice

Vrsta kiseline	Trava			Djetelina			Kamilica		
	Datum promatranja			Datum promatranja			Datum promatranja		
	13.2.	20.2.	27.2.	13.2.	20.2.	27.2.	13.2.	20.2.	27.2.
Dušična k. pH 3,5	1	2	3	0	2	3	1	3	4
Dušična k. pH 4	1	3	3	0	1	1	1	2	4
Dušična k. pH 5,5	0	1	2	0	1	2	1	1	2
Sumporna k. pH 3,5	1	3	4	1	2	3	2	3	3
Sumporna k. pH 4	0	2	3	1	2	3	1	2	2
Sumporna k. pH 5,5	0	1	1	0	1	1	0	1	2
Limunska k. pH 3,5	1	1	1	0	1	2	1	2	2
Limunska k. pH 4	0	1	1	0	1	1	0	1	2
Limunska k. pH 5,5	0	0	0	0	0	1	0	0	2
Kišnica (kontrolni uzorak)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Određivanje pH vrijednosti tla

pH vrijednost tla određivana je prije sijanja uzoraka i nakon završenog istraživačkog dijela. Postupak određivanja pH vrijednosti prikazan je slikom 10.



Slika 10 Postupak određivanja pH vrijednosti uzoraka tla indikator papirom

pH vrijednost humusnog supstrata prije eksperimentalnog dijela iznosila je 7,6 dok je pH vrijednost pjeskovitog tla iznosila 6,5, dakle kretali su se oko neutralnih pH vrijednosti. Nakon završenog istraživanja utvrđeno je da se kiselost uzoraka pjeskovitog tla zalijevanog kiselinama pH 3,5 smanjila na 5,5, a kiselost humusnog supstrata zalijevanog kiselinama istih pH vrijednosti na pH 6, dakle bila je izražena blaga kiselost. Stupanj kiselosti i pjeskovitog tla i humusnog supstrata nakon zalijevanja kiselinama pH vrijednosti 4 i pH 5,5 bila je neznatno kisela. Stupanj kiselosti obje vrste tla na početku, prije sijanja sjemenki i zalijevanja kišnicom te nakon eksperimentalnog dijela ostao je nepromijenjen.



RASPRAVA

Nakon provedenog istraživanja i analize rezultata naša pretpostavka da pH vrijednost kiseline utječe na početak i brzinu klijanja sjemenki nije bila točna. Kao što je vidljivo u tablici 1, brzina i postotak prokljalih sjemenki nije povezana s pH vrijednošću kiseline kojima su uzorci bili zalijevani, nego s vrstom tla na koje su bili sijani. Jasno se uočava da su uzorci brže prokljali na pjeskovitom tlu nego na humusnom supstratu što povezujemo s time da je pjeskovito tlo bolje zadržavalo vodu koja je sjemenkama neophodna za proces bubrenja i klijanje. Međutim, brzina rasta i razvitak biljaka te oštećenje biljnih organa jest izravno povezano s pH vrijednošću kiseline kojom je biljka zalijevana što se može uočiti na slici 4 i slici 5. Ivana Nađ u svom članku iznosi kako kiselost utječe na to kako biljke rastu - neke biljke vole kisela tla, dok druge više vole neutralne uvjete i najbolje rastu kad je pH između 6 i 7,5. Vrlo kisela tla, ispod pH 4, nisu više pogodna za razvoj biljaka. Razlog potrebe za neutralnim pH je fosfor. Biljke trebaju topljivi fosfor da bi mogle rasti, razvijati cvjetove i plodove. pH vrijednost koja je viša ili niža od tog raspona će uzrokovati netopljivost fosfora, a element neće biti preuzet od strane korijenskog sustava. Sastav tla ovisi i o geografskoj lokaciji, primjerice tla formirana od granita i pješčenjaka će biti vrlo kisela, dok je tlo formirano od vapnenca i krede gotovo uvijek lužnato. U tome se članku ne navode vrste biljaka već samo općeniti podaci, a u našem je istraživačkom radu dokazano i potvrđeno da niža pH vrijednost kiseline jače ometa rast trave i kamilice te kod njih uzrokuje veća oštećenja dok je nešto brži rast i manja oštećenja pri istim pH vrijednostima imala djetelina. Konkretno dokazujemo da je pH 5,5 pogodan za rast trava i nekih usjeva, dok su djeteline manje osjetljive na kisele uvjete. Naši su rezultati podudarni i s rezultatima koji su već objavljeni i potvrđuju da su tla koja su pogodna za uzgoj trava neutralne reakcije i kreću se oko pH 7 (Milanović i Memić, 2006). Pretpostavka da različite vrste anorganskih kiselina (dušična, sumporna) podjednako utječu na klijanje sjemenki, rast biljaka i oštećenje biljnih organa jest i potvrđena. Limunska kiselina, kao uzorak organske kiseline, ipak je nešto manje utjecala na rast uzoraka i stupanj oštećenja što na početku rada nismo mogle sa sigurnošću pretpostaviti. Eksperimentalnim dijelom potvrđeno je da su uzorci zalijevani limunskom kiselinom brže rasli i bili manje oštećeni u usporedbi s uzorcima zalijevanim anorganskim kiselinama. Ti rezultati iskazani su na slici 7, 8. i 9. Potvrđena je i hipoteza da kiseline zaista mijenjaju kiselost tla, a time kasnije i na njegovu plodnost. Saznajemo da se povećanjem kiselosti tla, to znači povećanjem količine H^+ iona, ispiru iz tla važne mineralne tvari kao što su magnezij, kalij, kalcij itd. Tako dolazi do drastičnog smanjenja pH vrijednosti. Na temelju smanjivanja pH vrijednosti kao posljedica kemijskih procesa nastaju ioni koji imaju štetno djelovanje na korijenje biljaka kao i na tlo. Isto vrijedi i za ione željeza koji se oslobađaju pri pH vrijednosti manjoj od 3,8. Stupanj štetnosti konačno ovisi o vrsti o tipu tla (Kauzlarić, 2007). Važno je istaknuti da se znatnija promjena u kiselosti uzoraka tla uočila samo u uzorcima tla koji su bili zalijevani s otopinama kiselina nižih kiselosti odnosno vrijednosti pH 3,5, dok su promjene kiselosti tla zalijevanih slabijim kiselinama bile neznatne. To povezujemo s činjenicom da su procesi mijenjanja kiselosti tla u prirodnim uvjetima dugoročni, a istraživanje koje je izvedeno u školskom kabinetu trajalo je samo tridesetak dana pa reakcije kiselina na minerale u tlu još nisu bile završene. Isto tako uzorci biljaka razvili su samo korijen, stabljiku i listove koji su bili neznatno oštećeni tako da ne možemo argumentirati kako kisele kiše utječu na razvoj cvijeta i ploda. Kontrolni uzorci koji su bili zalijevani kišnicom na obje vrste tla rasli su i razvijali se brže od ostalih testnih uzoraka i nisu bili oštećeni.



ZAKLJUČCI

Nakon provedenog istraživanja zaključujemo:

- ✔ Vrsta tla utječe na početak klijanja sjemenki.
- ✔ Uzorci koji su bili sijani na pjeskovitom tlu brže su prokljali od uzoraka sijanih na humusnom supstratu.
- ✔ Prva je prokljala kamilica, zatim djetelina i na kraju trava što povezujemo s veličinom sjemenke i količinom rezervnih hranjivih tvari u sjemenki.
- ✔ Vrsta kiseline i njezina pH vrijednost nije imala većeg utjecaja na sam početak klijanja i postotak prokljanih sjemenki.
- ✔ Uočen je intenzivniji rast kod svih uzoraka na humusnom supstratu nego na pjeskovitom tlu.
- ✔ pH vrijednost kiselina znatno je utjecala na brzinu rasta i stupanj oštećenja biljke.
- ✔ Trava i kamilica osjetljivije su na djelovanje kiselina nižih pH vrijednosti nego djetelina
- ✔ Kod svih kiselina, pH vrijednosti 5,5, gotovo da nije bilo značajnijeg utjecaja na oštećenje biljnih organa.
- ✔ Nije primijećena veća razlika u djelovanju dušične i sumporne kiseline istih pH vrijednosti na rast i razvitak biljke, ali je uočeno da su uzorci zalijevani limunskom kiselinom bili manje oštećeni.
- ✔ pH vrijednost kiseline utječe na pH vrijednost tla pa samim time i na njegovu plodnost.
- ✔ Kontrolni uzorci rasli su brzinom kao uzorci tretirani kiselinama pH 5,5 i bili su neoštećeni.

LITERATURA

- Bendelja D., Gudić M., Budić I., Operta E., Pongrac N., Roščak R., Valečić H. 2013. Biljke i životinje kontinentalnih travnjaka. Priroda 6: udžbenik prirode u šestom razredu osnovne škole. Školska knjiga, Zagreb.130 str.
- Biološka raznolikost Hrvatske. Državni zavod za zaštitu prirode Ministarstvo kulture Republike Hrvatske Zagreb 2009., http://www.dzrp.hr/dokumenti_upload/20100611/dzrp201006111407550.pdf (pristupljeno 3.4.2017.)
- Filipan, T, Butorac, A., Cerjan-Stefanović, Š., Benc, Sanja, Kisić, I.1996. Primjena prirodnih mineralnih tvari u svrhu povećanja plodnosti kiselih tala područja Karlovačke županije. Elaborat. 23. str.
- Kauzlarić, K. 2007. Kisele kiše, <http://ekokutak.pondi.hr/KiseleKise.htm> (pristupljeno 9.12.2016.)
- KM 2016.Kisele kiše, padaline zagađene sumporovim dioksidom. Kreativna mreža d.o.o. <http://www.ekologija.com.hr/kisele-kise/> (pristupljeno 12.12.2016.)
- Milanović, P., Memić, S. 2006. Kiselost zemljišta. http://cms.optimus.ba/Avanti_ApplicationFiles/122/Documents/kiselost_zemljišta.pdf (pristupljeno 3.3.2017.)
- Nađ, I. Fizikalno- kemijske značajke tla, instant „Uradi sam“ analiza tla. <http://www.agroklub.com/agro-hobi/instant-uradi-sam-analiza-tla/12668/> (pristupljeno 12.2.2017.)

INVAZIVNE BILJNE VRSTE JUŽNOG I ŽUMBERAČKOG NASELJA GRADA SAMOBORA

Lucija Puharić, 7.razred

OŠ Bogumila Tonija, Samobor

Mentor: Diana Vlahović

SAŽETAK

Tijekom 2015./16. godine istražene su invazivne biljne vrste Južnog i Žumberačkog naselja grada Samobora, te je zabilježeno ukupno 20 invazivnih vrsta. Porijeklo im je uglavnom iz Amerike, 14 vrsta (70.0%), a kao najčešći način rasprostranjenja plodova i sjemenki koriste vjetar, 7 vrsta (35.0%). Na istraživanom području ustanovljeno je 7 različitih tipova staništa, od kojih je najrašireniji tip kuće sa stražnjim vrtovima, 57 nalaza (58,7%). Sve zabilježene vrste pokazuju neke oblike negativnog djelovanja na okoliš ili zdravlje ljudi, a za njih 12 (60.0%) gotovo ne postoji mogućnost uspješne kontrole na staništu.

Ključne riječi: invazivne biljke, rasprostranjenost, Samobor

UVOD I OBRAZLOŽENJE TEME

Grad Samobor, jedan od 9 gradova Zagrebačke županije (slika 1) smjestio se na istočnim obroncima Samoborskog gorja na kojeg se prema zapadu nastavlja Žumberačko gorje, a prema jugoistoku gorje Plešivica. Samobor je udaljen od grada Zagreba samo 25 kilometara, a od graničnog prijelaza sa Slovenijom u Bregani samo četiri kilometra. Jedno je od najomiljenijih i najstarijih izletničkih odredišta u Hrvatskoj. U Samoboru živi oko 36.000 stanovnika od kojih je 16.000 u samom Samoboru, a 20.000 živi u okolnim mjestima koja pripadaju pod lokalnu samoupravu Samobor. Prosječna gustoća naseljenosti iznosi 144 stanovnika po km². Prema broju stanovnika zauzima treće mjesto u Zagrebačkoj županiji, nakon Velike Gorice (33339 st) i Zaprešića (17538 st.). Ukupna površina općine Samobora je 250 km², a obuhvaća prostor između zemljopisne širine od sjeverno 45° 48' i 6" do zemljopisne dužine od 15° 42' i 49". Nadmorska visina središnje točke grada, na Trgu Kralja Tomislava iznosi 158,31 m. (WIKIPIEDIA).



Slika 1. Položaj grada Samobora u Zagrebačkoj županiji (<http://www.tzzz.hr/tz/karta-zupanije/>)

Prema Köppenovoj klasifikaciji područje Samobora, kao i Zagreba, pripada umjereno toploj vlažnoj klimi s toplim ljetom (Bertić i sur., 2005). Prosječna godišnja temperatura zraka za Samobor iznosi 11,3°C, a u Zagrebu 11,°C. Najtopliji mjeseci prema višegodišnjem prosjeku su srpanj i kolovoz. Prosječne godišnje temperature za srpanj iznose 21,6°C za Samobor (WIKIPIEDIA), odnosno 20,7°C za



Zagreb (Natek i Natek, 2005). Najhladniji mjeseci su prosinac i siječanj s prosječnom temperaturom siječnja od $-1,8^{\circ}\text{C}$ za Samobor do $-1,2^{\circ}\text{C}$ za Zagreb (Natek i Natek, 2005).

Iz ovih podataka proizlazi da postoje manje razlike u odstupanjima temperatura za Samobor i Zagreb, budući da je Samobor ljeti za prosječno 1°C topliji, ali i prosječno za 0.4 stupnja zimi hladniji, što se lako može objasniti njegovom okruženošću Samoborsko - plešivičkim gorjem.

Prosječna godišnja količina oborina iznosi za Samobor 1059,08 mm, a u Zagrebu iznosi 1238 mm (Štambak, 2004). Većina vjetrova u Samoboru puše iz smjera juga, jugozapada i zapada, dok je za Zagreb uglavnom sjevernog i sjeveroistočnog smjera (PP MEDVEDNICA)

Naše škola jedna je od dvije centralne škole u Samoboru. Smještena je u neposrednoj blizini dva naselja, starijeg Žumberačkog i nešto mlađeg Južnog naselja, oba građena polovicom prošlog stoljeća. Oba naselja okružuju zelene površine i parkovi, a prostore ispod stubišta između ulaza u zgrade stanari sami održavaju sadeći razne ukrasne biljke. Budući da stanujem u Južnom naselju uočila sam oko zgrada biljke koje su na internetu označene kao invazivne.

Pretraživanjem interneta i dostupne literature otkrila sam da je u našoj zemlji, uz veliko bogatstvo autohtonih, zavičajnih vrsta biljaka, sve veći udio stranih, alohtonih vrsta koje čovjek unaša namjerno - migracijom, robnom razmjenom, trgovinom, ukrasnim vrstama, kupovinom sjemena preko interneta, ali i nenamjerno, na odjeći, transportnim sredstvima.... Prema dostupnim podacima, za Europski kontinent je značajniji namjerni unos biljaka, koji je utvrđen za 63% svih naturaliziranih vrsta, dok je nenamjerni unos zabilježen za 37 % biljaka (Pyšek i sur., 2009).

Veliki dio tako unešenih stranih biljnih vrsta neće uspjeti preživjeti izvan kulture (vrta, poljoprivredne površine, staklenika...) no dio će ipak uspjeti prebjeći i nesmetano se nastaviti razmnožavati, pa i kolonizirati novu postojbinu u velikoj količini. Takve biljke zovemo invazivnim.

Vjerojatnost da će strana biljna vrsta postati invazivna raste s ljudskim (antropogenim) utjecajem na stanište, naime što je prvobitno stanište jače izmijenjeno pod utjecajem čovjeka, veća je vjerojatnost nalaza invazivnih vrsta. Dok na prirodnim i stabilnim tipovima staništa, kao što su npr. šumska staništa, strane biljne vrste gotovo u pravilu ne mogu prodrijeti, ulazne točke u neku zemlju su im staništa izmijenjena pod utjecajem čovjeka (industrijska staništa i poljoprivredna područja, luke, tranzitna područja, uz pruge, područja uz prometnice, parkovi, vrtovi.(Pyšek i sur., 2009).

Prema podrijetlu invazivnih vrsta u hrvatskoj flori, one u najvećoj mjeri potječu iz Sjeverne i Južne Amerike (gotovo 70 % svih vrsta), a slijede ih vrste prenesene iz Azije (19 %), Afrike (6 %) i drugih područja. Udio vrsta prenesenih u Hrvatsku iz cijelog euroazijskog kontinenta iznosi oko 25 % (Boršić i sur., 2008). Invazivne biljke danas su u interesu istraživanja mnogih znanstvenika budući da one izvan svojeg prirodnog okruženja mogu biti štetne - mogu negativno utjecati na zdravlje ljudi, na okoliš, biološku raznolikost, mogu prenositi štetnike, iscrpljivati vodne resurse, postati korov, smanjivati prinose biljaka u kulturi, remetiti sastav faune, ometati plovne puteve, razgrađivati građevine, mijenjati evolucijske tijekove i sl., stoga mogu posredno ili neposredno, jako ili slabo utjecati i na život ljudi (Nikolić i sur., 2014).

Istraživanja invazivne flore u našoj zemlji sustavnije su započela prije desetak godina, iako se pojedinačni nalazi invazivnih biljaka nalaze u radovima brojnih botaničara. Problem nepoznavanja i neistraženosti alohtonih (stranih) i invazivnih biljaka u Hrvatskoj prvi je put prezentiran 2005. godine (Mitić i Nikolić, 2006), a tijekom 2006. proveden je prvi nacionalni projekt "Invazivna flora Republike Hrvatske" (Mitić i sur., 2008, Dobrović i sur., 2006). Kao rezultat svega navedenog razvijena je informatička baza podataka "Flora Croatica Database" sa zasebnom bazom podataka - Alohtone biljke, namijenjena praćenju i informiranju o alohtonim vrstama u flori Hrvatske (Nikolić, 2017 a). Trenutačno je u Hrvatskoj flori utvrđena prisutnost 75 invazivnih vrsta (Nikolić, 2017 b).

Sve navedeno navelo me na pretpostavku da se na području grada Samobora već nalazi određeni broj invazivnih vrsta, te sam odlučila istražiti koje su to invazivne biljke već prisutne u naselju u kojem živim, u kojoj mjeri, te prijeti li nam od njih kakva stvarna opasnost.

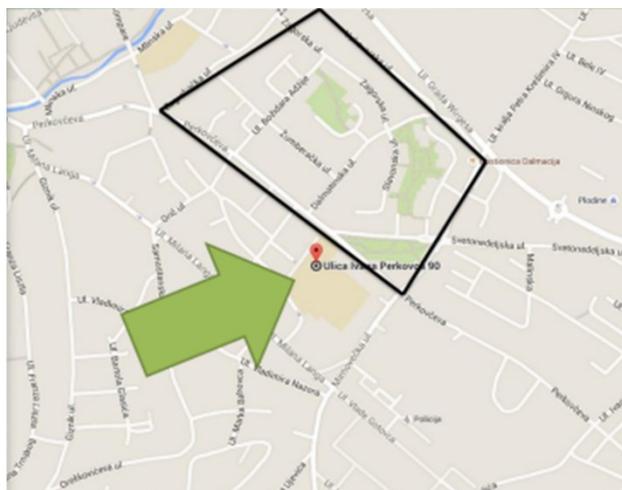
Postavljeni su slijedeći ciljevi istraživanja:

- Utvrditi prisutnost invazivnih biljnih vrsta Južnog i Žumberačkog naselja grada Samobora
- Provesti analizu geografskog porijekla invazivnih biljnih vrsta
- Provesti analizu rasprostranjenja plodova i sjemenki invazivnih biljnih vrsta
- Utvrditi tipove staništa na kojima nalazimo invazivne biljne vrste
- Utvrditi mogući negativan utjecaj invazivnih biljnih vrsta, te mogućnosti kontrole
- brojnosti vrsta.

METODE RADA

Područje istraživanja

Tijekom 2015./16. godine istraživanje je usmjereno na utvrđivanje prisutnosti invazivnih biljnih vrsta Južnog i Žumberačkog naselja grada Samobora (slika 2).



Slika 2. Karta istraživanog područja (<https://www.google.hr/maps/place/Perkovčeva>)

Tijekom vegetacijske sezone (proljeće - jesen) 2015./2016 godine u više navrata prikupljeni su podaci uz bilježenje GPS-lokacije, te je izrađen fotoherbarij invazivnih vrsta. Determinacija vrsta provedena je prema udžbeniku Flora hrvatske - invazivne biljke, Nikolić i sur. (2014). Svi dobiveni rezultati prikazani su preglednim tablicama (prilog).

Granice istraživanja postavljene su između ulica:

- istok - Mirnovečka ulica - Ulica kralja Petra Krešimira 4.,
- sjever - Vukovarska ulica,
- zapad - Zagrebačka ulica,
- jug - Perkovičeva ulica

Pozicije s kojih su snimane fotografije i uzimani uzorci invazivnih vrsta prikazane su pomoću Geographic Coordinate System: GCS_Bessel_1841, Projected Coordinate System: HR_GK_6. Fotografiranje staništa provedeno je digitalnim fotoaparatom "Olympus Camedia 5050". Nomenklatura invazivnih vrsta te analiza rasprostranjenja sjemenki usklađene su prema Nikolić i sur. (2014). Analiza geografskog porijekla usklađena je prema Boršić i sur. (2008). Staništa ispitivanog područja klasificirana su prema Nacionalnoj identifikaciji staništa Republike Hrvatske, Antonić i sur. (2005). Mogući negativan utjecaj invazivne biljne vrste, kao i mogućnosti kontrole brojnosti vrste

usklađene su prema Nikolić i sur. (2014). Primjeri fotografija pojedinih invazivnih vrsta istraživanog područja prikazani su na slijedećim slikama (slika 6 - slika 9).

Slika 6. *Duchesnea indica* (Andrews) Focke, indijska jagodaSlika 7. *Oenothera biennis* L. pupoljka, noćurak žutiSlika 8. *Phytolacca americana* L. američki kermes, vinobojkaSlika 9. *Helianthus tuberosus* L. čičoka, slatki krumpir

REZULTATI

Invazivne biljne vrste istraživanog područja navedene su u popisu flore abecednim redom porodica te vrsta. Popis invazivnih biljnih vrsta usklađen je prema Nikolić i sur. (2014). i naveden latinskim i narodnim nazivima svojti.

Popis invazivnih biljnih vrsta Južnog i Žumberačkog naselja grada Samobora

Porodica: Aceraceae - Javori

Acer negundo L. - negundovac, javor perasti, američki javor

Porodica: Asteraceae - Glavočike

Ambrosia artemisifolia L. - ambrozija, pelinolisni, limundžik, obični limundžik, partizanka

Conyza canadensis (L.) Cronquist - kanadska hudoljetnica

Erigeron annuus (L.) Pers. - jednogodišnja krasolika, krasolika

Galinsoga ciliata (Raf.) S. F. Blake - trepavičava konica

Helianthus tuberosus L. - čičoka, slatki krumpir, gomoljasti suncokret (slika 9)

Rudbeckia laciniata L. - dronjava pupavica

Solidago canadensis L. - gustocvjetna zlatnica, kudjelja

Porodica: Balsaminaceae - Nedirci

Impatiens balfourii Hooker f. - Balfourov nedarak, kašmirski nedarak

Porodica: Fabaceae - Mahunarke

Robinia pseudoacacia L. – bagrem

Porodica: Onagraceae - Pupoljkovke

Oenothera biennis L. - pupoljka, noćurak žuti (slika 7)

Porodica: Phytolaccaceae - Vinobojke

Phytolacca americana L. - američki kermes, vinobojka (slika 8)

Porodica: Poaceae - Trave

Eleusine indica (L.) Gaertn. - indijska eleuzina

Panicum capillare L. - vlasasto proso

Porodica: Polygonaceae - Dvornikovke

Reynoutria japonica Houtt. - japanski dvornik

Porodica: Rosaceae - Ruže

Duchesnea indica (Andrews) Focke - indijska jagoda, indijska jagodnjača (slika 6)

Porodica: Scrophulariaceae - Strupnikovice

Veronica persica Poir. - perzijska čestoslavica, veronika

Porodica: Simaroubaceae - Gorkuničevke

Ailanthus altissima (Mill.) - žljezdasti pajasen

Porodica: Solanaceae - Pomoćnice

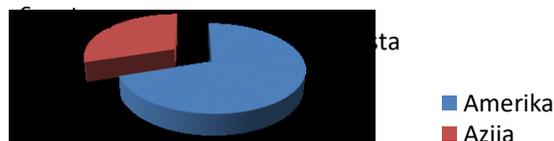
Datura innoxia Mill. - datura

Porodica: Vitaceae - Lozovke

Parthenocissus quinquefolia (L.) Planchon - lozika, petolisna lozika

Analiza geografskog porijekla

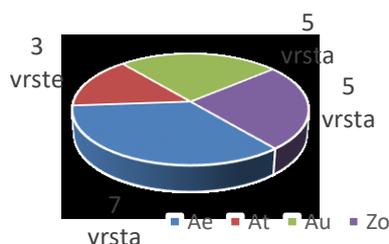
Iz tablice (prilog, tablica 2) i slike (slika 3) utvrđeno je da su invazivne biljke na istraživanom području u najvećem postotku porijeklom iz Amerike, 14 vrsta (70,0%), dok je šest vrsta (30,0%) na naše područje pristiglo iz Azije.



Slika 3. Podrijetlo invazivnih biljnih vrsta Južnog i Žumberačkog naselja grada Samobora

Analiza rasprostranjivanja plodova i sjemenki invazivnih vrsta istraživanog područja

Iz tablice (prilog, tablica 2) i slike (slika 4) utvrđeno je da se invazivne biljke na istraživanom području najčešće rasprostranjuju vjetrom (anemohorno) sa 7 vrsta (35,0%), u nešto manjem postotku koriste samostalno rasprostranjanje (autohorno) te rasprostranjanje životinjama (zoohorno) sa pet vrsta (25,0%). Najmanji broj vrsta za vlastito rasprostranjanje koriste se čovjekom (antropohorno), 3 vrste (15,0%).



Slika 4. Načini rasprostranjivanja plodova i sjemenki invazivnih vrsta Južnog i Žumberačkog naselja grada Samobora

legenda: Ae-anemohorno (rasprostranjanje vjetrom); Zo-zoohorno (rasprostranjanje životinjama); Au-autohorno (rasprostranjanje samostalno); At-antropohorno (rasprostranjanje čovjekom)

Analiza tipova staništa na kojima nalazimo invazivne biljne vrste istraživanog područja

Iz tablica (prilog, tablica 3 i tablica 1) utvrđeno je da su invazivne biljke na istraživanom području rasprostranjene na 7 različitih tipova staništa na kojima je zabilježeno ukupno 97 nalaza. Najrašireniji

tip staništa koje zauzimaju invazivne biljke su kuće sa stražnjim vrtovima, 57 nalaza (58,7%), a slijede ih stambeni blokovi rubnog, otvorenog tipa, 16 nalaza (16,5%). U nešto manjem postotku podjednako su zastupljena staništa dvorišta i kućni vrtovi te ekstenzivno njegovani parkovi u sklopu naselja sa po 7 nalaza (7,2%).

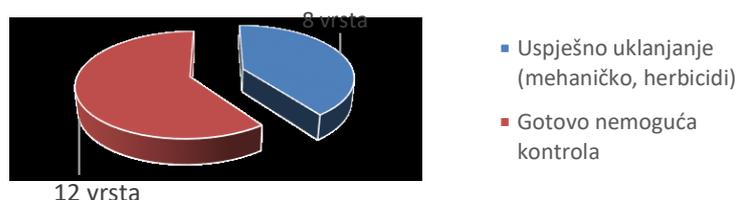
Tablica 1. Broj invazivnih biljnih vrsta na pojedinom tipu staništa Južnog i Žumberačkog naselja grada Samobora

Vrsta staništa	Šifra staništa	Broj invazivnih vrsta
Gradske jezgre	J.2.1.1.	3
Izgrađene površine za sport, rekreaciju i razonodu	J.3.1.	3
Ekstenzivno njegovani parkovi u sklopu naselja	1.8.1.2.	7
Zgrade javne namjene s pripadnim površinama	J.2.3.1.	4
Stambeni blokovi rubnog - otvorenog tipa	J.2.2.2.	16
Dvorišta i kućni vrtovi	1.8.2.	7
Stambene kuće u nizu sa stražnjim vrtovima, pojedinačne kuće	J.2.2.5.1.	57

Analiza mogućeg negativnog utjecaja invazivne biljne vrste, kao i mogućnosti kontrole na staništu

Iz tablice (prilog, tablica 2) i slika (slika 5) utvrđeno je da svih 20 invazivnih vrsta (100%) u okolici naše škole pokazuju neke od oblika negativnog utjecaja na staništu. 10 vrsta (50.0%) onemogućuje rast autohtonih biljaka, 9 vrsta (45.0%) su korovne, 7 vrsta (35.0 %) je otrovnih, a tri vrste (15.0%) su jaki alergeni, pa utječu na zdravlje ljudi. Gotovo sve vrste pokazuju negativni učinak u više od jedne kategorije.

Mogućnost kontrole njihove brojnosti na staništu je dosta uspješno za 8 vrsta (40.0%) i to mehaničkim uklanjanjem i herbicidima, dok je 12 vrsta (60.0 %) postalo otporno na brojne herbicide, te ih je gotovo nemoguće iskorijeniti.



Slika 5. Mogućnost kontrole invazivnih biljnih vrsta Južnog i Žumberačkog naselja grada Samobora

RASPRAVA

Istraživanjem invazivnih biljnih vrsta Južnog i Žumberačkog naselja zabilježeno je ukupno 20 biljnih svojti, što je nešto više od četvrtine (26.6%) od ukupnog broja invazivnih vrsta biljaka za cijelu Republiku Hrvatsku (Nikolić i sur. 2014). Smatram da je razlog tako velike brojnosti specifičan geografski položaj našeg grada, uz samu granicu sa Republikom Slovenijom, te neposredna blizina grada Zagreba, važnog raskrižja europskih prometnih putova i značajnog tranzitnog područja.

Upravo zbog svog tranzitnog položaja, te sve izrazitijeg urbanog karaktera, postajemo kao grad sve izloženiji unosu invazivnih stranih vrsta. U europskom kontekstu pokazano je da su staništa koja je stvorio čovjek (industrijska područja, parkovi, vrtovi) ili ona na koja čovjek snažno utječe zapravo staništa koja imaju najveći udio stranih i invazivnih svojti (Pyšek i sur., 2009).

Prema porijeklu, najveći dio invazivnih vrsta Južnog i Žumberačkog naselja potječe iz Amerike (70%), a manji iz Azije (30%) što je u skladu s porijeklom invazivnih vrsta u RH (Boršić i sur. 2008). Iako sve invazivne vrste posjeduju široku ekološku amplitudu, koja je i preduvjet njihove uspješne kolonizacije novih prostora (Nikolić i sur. 2014), vrstama iz Amerike, za razliku od azijskih vrsta, dodatnu prednost daje činjenica da jugoistočni dio Sjeverne Amerike i Europa, prema Köppenovoj klasifikaciji klime, pripadaju istom klimatskom razredu.



Prema načinu rasprostranjenja invazivne vrste Južnog i Žumberačkog naselja najčešće se rasprostranjuju vjetrom - anemohorno (35,0%), što im i omogućava savladavanje velikih udaljenosti, npr. sitna peludna zrnca ambrozije, *Ambrosia artemisiifolia*, zračnim strujama mogu putovati i više od 300 km (Nikolić i sur. 2014), što uvelike doprinosi uspješnosti u koloniziranju novih prostora.

Najrašireniji tip staništa koje zauzimaju invazivne biljke Južnog i Žumberačkog naselja su stambene kuće u nizu sa stražnjim vrtovima, 57 nalaza (58,7%), a slijede ih stambeni blokovi rubnog, otvorenog tipa, 16 nalaza (16,5%). Tijekom terenskog rada primijetila sam da je nalaz pojedinih invazivnih vrsta učestao, npr. *Impatiens balfourii* Hooker f. u Južnom naselju (5 nalaza – prilog, tablica 3), a puno je manji u Žumberačkom naselju, naselju nižih starijih zgrada sa klasičnim spremišnim prostorima, okruženim privatnim kućama s vrtovima (2 nalaza).

Pretpostavljam da izgled lijepo ukrasne biljke uvelike doprinosi neuklanjanju vrste iz zelenih površina okolo stubišta, dok ga oko stambenih kuća zbog vrtova koji se tradicionalno obrađuju ima manje. Literaturni podaci pokazuju da je za Europu značajniji namjerni unos biljaka (63%) nasuprot nenamjernom (37%) i to uglavnom zbog unosa ukrasnih, hortikulurnih vrsta koje potom prijeđu na okolna staništa (Pyšek i sur., 2009).

Budući da svih 20 invazivnih vrsta (100%) Južnog i Žumberačkog naselja pokazuju kombinirane oblike negativnog utjecaja na staništu (onemogućuju rast autohtonih biljaka, korovne su, otrovne...), a tri vrste (*Ambrosia artemisiifolia* L., *Conyza canadensis* (L.) Cronquist, te *Acer negundo* L.) su alergene, te sve otpornije na brojne herbicide utvrdila sam kako je već sad istraživani dio pod velikim opterećenjem invazivnih vrsta, što u bliskoj budućnosti nesumnjivo može rezultirati samo još izrazitijim stanišnim promjenama i većim opasnostima po zdravlje ljudi u našoj okolini.

ZAKLJUČCI

Tijekom provedenog istraživanja doneseni su slijedeći zaključci:

- ✔ Istraživanjem invazivnih biljaka Južnog i Žumberačkog naselja grada Samobora zabilježeno je ukupno 20 invazivnih vrsta, što je 26.6 % od ukupnog broja invazivnih vrsta zabilježenih u Republici Hrvatskoj.
- ✔ Analizom geografskog porijekla utvrđeno je da su invazivne biljke na istraživanom području u najvećem postotku porijeklom iz Amerike, a u nešto manjem postotku na naše su područje pristigle iz Azije.
- ✔ Analizom rasprostranjivanja sjemenki utvrđeno je da se invazivne biljke na istraživanom području najčešće rasprostranjuju vjetrom (anemohorno), dok nešto manje koriste samostalno rasprostranjanje (autohorno), te rasprostranjanje životinjama (zoohorno). Najmanji broj vrsta za vlastito rasprostranjanje koristi se čovjekom (antropohorno).
- ✔ Analizom tipova staništa utvrđeno je da su invazivne biljke na istraživanom području rasprostranjene na 7 različitih tipova staništa na kojima je zabilježeno ukupno 97 nalaza. Najrašireniji tip staništa koje zauzimaju invazivne biljke su kuće sa stražnjim vrtovima, slijede ih stambeni blokovi rubnog, otvorenog tipa.
- ✔ Analizom mogućeg negativnog utjecaja invazivnih biljnih vrsta, kao i mogućnosti kontrole na staništu ustanovljeno je da sve zabilježene vrste pokazuju jedan ili više oblika negativnog djelovanja - mijenjaju staništa, korovne su, otrovne ili alergene, a za više od polovine vrsta praktički nema mogućnosti kontrole na staništu.

LITERATURA

- Antonić O., Kušan V., Bakran-Petricioli T., Alegro A., Gottstein-Matočec S., Peternel H., Tkalčec Z. 2005. Classification of habitats of the Republic of Croatia. Drypis 1/1,2: 1-111 (In Croatian)
- Bertić I., Šehić D., Šehić, D. 2005. Geografski atlas Hrvatske – za školu i dom. Europapress holding, Zagreb.
- Boršić I., Milović M., Dujmović I., Bogdanović S., Cigić P., Rešetnik I., Nikolić T., Mitić B. 2008. Preliminary check-list of invasive alien plant species (Ias) In Croatia. Nat. Croat. 17(2): 55-71.



- Domac R. 1994. Mala flora Hrvatske i susjednih područja. Školska Knjiga, Zagreb.
- Dobrović I., Boršić I., Milović M., Bogdanović S., Cigić P., Rešetnik I., Nikolić T., Mitić B. 2006. Invazivne vrste u Hrvatskoj - Preliminarni izvještaj. U Besendorfer V, Klobučar G I V, (Ur.): 9., Hrvatski Biološki Kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Rovinj, Zbornik Sažetaka, 146-147.
- Mitić B., Boršić I., Dujmović I., Bogdanović S., Milović M., Cigić P., Rešetnik I & Nikolić T. 2008. Alohtona Flora Hrvatske: Prijedlozi terminoloških standarda, kriteriji, te baza podataka. Natura Croatica. Vol.17, No. 2, 73-90
- Mitić B., Nikolić T. 2006. : Invasive alien plants in Croatia – Situation and vision. In: Brunel, S. (Ed.), Invasive plants in Mediterranean type regions of the world. Mèze (France), 25–27 May 2005. Council of Europe Publishing, 325.
- Natek K., Natek M. 2005. Države svijeta. Mozaik, Zagreb
- Nikolić T., Mitić B., Boršić I. 2014. Flora Hrvatske-Invazivne biljke. Alfa d. d, Zagreb
- Nikolić T., Kovačić S. 2008. Flora Medvednice, Školska Knjiga, Zagreb
- Nikolić T. (Ur) 2008. Flora Croatica Baza podataka / Flora Croatica Database. On - Line Url: <http://Hirc.Botanic.Hr/Fcd>. Botanički Zavod, Prirodoslovno - Matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- Nikolić T. 2017 a: Flora Croatica Database. Faculty Of Science, University Of Zagreb, Zagreb (Hirc.Botanic.Hr/Fcd/).
- Nikolić T. 2017 b: Alohtone biljke on-line. Flora Croatica Database. Faculty of Science, University of Zagreb, Zagreb (<http://Hirc.Botanic.Hr/Fcd/Invazivnevrste/>)
- Pyšek P., Lambdon P. W., Arianoutsou M., Kühn I., Pino J., Winter M. 2009.: Alien vascular plants of Europe. Chapter 4. U: Daisy - Handbook of Alien species in Europe. Invading Nature - Springer Series In Invasion Ecology, Volume 3, Springer Science + Business Media B.V, 43-61.
- Rothmaler W., 1995. Eskursionsflora von Deutschland 3. Gustav Fisher Verlag Jena, Stuttgart
- Šegota T., Filipčić A. 2006. Klimatologija za geografe. Školska Knjiga, Zagreb
- Štambak N., 2004. Zagreb. Masmedia, Zagreb
- WIKIPEDIA. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Samobor>, pristupljeno 19.11.2016.
- PP MEDVEDNICA. <http://www.medvednica.hr>, pristupljeno 9.10.2016.
- TZZŽ. <http://www.tzzz.hr/tz/karta-zupanije/>, pristupljeno 1.11.2016.

PRILOZI

Prilog 1. Abecedni pregled invazivnih biljaka Južnog i Žumberačkog naselja grada Samobora sa geografskim porijeklom, načinom rasprostranjanja plodova i sjemenki, mogućim negativnim utjecajem te mogućnošću kontrole na staništu

	vrsta	porodica	podrijetlo	način rasprostranjanja	moguć negativan utjecaj	mogućnost kontrole na staništu
1.	<i>Acer negundo</i> L.	Aceraceae	Am	Au, Ae	Onemogućuje rast drugih vrsta, alergena	Mehaničko uklanjanje, herbicidi
2.	<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.	Aceraceae	Am	At	Izrazito alergena vrsta	Mehaničko uklanjanje, herbicidi, biološko tvrdokrilcem <i>Ophraella Communis</i> , neuspješno
3.	<i>Conyza canadensis</i> (L.) Cronquist	Aceraceae	Am	Ae	Alergena vrsta, korovna - smanjuje prinose, otrovna biljka	Gotovo nemoguće iskorijeniti, otporna na herbicide
4.	<i>Erigeron annuus</i> (L.) Pers.	Aceraceae	Am	Ae	Onemogućuje rast drugih vrsta, korovna vrsta	Mehaničko uklanjanje, gotovo nemoguće iskorijeniti
5.	<i>Galinsoga ciliata</i> (Raf.) S. F. Blake	Aceraceae	Am	Ae	Korovna vrsta, domaćin mnogim štetnicima u poljoprivredi - virusima, oblicima i kukcima	Mehaničko uklanjanje, plastične folije, otporna na mnoge herbicide
6.	<i>Helianthus tuberosus</i> L.	Aceraceae	Am	AuHy	Onemogućuje rast drugih vrsta, potiče eroziju riječnih obala, korovna vrsta. Gomolji jestivi za ljude i životinje proizvodnja alkohola	Mehaničko uklanjanje, no i fragmentima gomolja se sama obnavlja, pa je malo uspješnih primjera
7.	<i>Rudbeckia laciniata</i> L.	Aceraceae	Am	Zo	Onemogućuje rast drugih vrsta, otrovna za ispašu stoke	Mehaničko uklanjanje, pomaže sadnja vrba koje ju zasjenjuju pa nestaje
8.	<i>Solidago canadensis</i> L.	Aceraceae	Am	Ae At, AuZo	Onemogućuje rast drugih vrsta	Nema podataka o uspješnom suzbijanju niti na svjetskoj razini
9.	<i>Impatiens balfourii</i> Hooker f.	Balsaminaceae	As	Au	Onemogućuje rast drugih vrsta	Mehaničko uklanjanje, no sjeme se još uvijek može kupiti



10.	<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	Fabaceae	Am	Au	Onemogućuje rast drugih vrsta. Dijelovi biljke otrovni. Korijenovi izdanci oštećuju	Mehaničko uklanjanje, herbicidi
11.	<i>Oenothera biennis</i> L.	Onagraceae	Am	Zo, Au	Korovna vrsta	Mehaničko uklanjanje
12.	<i>Phytolacca americana</i> L.	Phytolaccaceae	Am	Zo	Onemogućuje rast drugih vrsta. Otrovnost u svim dijelovima za sisavce	Mehaničko uklanjanje, herbicidi
13.	<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.	Poaceae	As	AeZo, Hy	Jedna od najgorih korovnih vrsta smanjuje prinose pamuka, kukuruza, riže. Domaćin štetnicima usjeva, starije biljke otrovne za stoku	Mehaničko uklanjanje, na herbicide postaje otporna
14.	<i>Panicum capillare</i> L.	Poaceae	Am	At, Au, Zo	Korovna vrsta, može uzrokovati trovanje stoke	Mehaničko uklanjanje, herbicidi
15.	<i>Reynoutria japonica</i> Houtt.	Polygonaceae	As	At, Au	Onemogućuje rast drugih vrsta, korijenovi izdanci oštećuju građevine, mijenjaju tlo	Mehaničko uklanjanje, herbicidi, no i malim fragmentima podanka se sama obnavlja
16.	<i>Duchesnea indica</i> (Andrews) Focke	Rosaceae	As	Zo	Istiskuje na šumskim staništima autohtone šumske jagode	Nisu zabilježene učinkovite mjere
17.	<i>Veronica persica</i> Poir.	Scrophulariaceae	As	Au, Zo	Korovna vrsta	Mehaničko uklanjanje, otporna na herbicide
18.	<i>Ailanthus altissima</i> (Mill.)	Simaroubaceae	As	Ae	Onemogućuje rast drugih vrsta, alelopatski učinak na druge biljke, korijenom oštećuje građevine	Mehaničko uklanjanje, herbicidi, biološko patogenim gljivama – kratkotrajni, neizvjesni rezultati
19.	<i>Datura innoxia</i> Mill.	Solanaceae	Am	Ae, Zo	Otrovna u svim dijelovima, korovna - smanjuje prinose pamuka, soje, graha	Mehaničko uklanjanje
20.	<i>Parthenocissus quinquefolia</i> (L.) Planchon	Vitaceae	Am	Zo	Uništava fasade, zagušuje samonikle šume /liječenje dijareje	Mehaničko uklanjanje

Legenda: Ae-anemohorno (rasprostranjivanje vjetrom); Am-porijeklom iz Amerike; Zo-zooorno (rasprostranjivanje životinjama); As-porijeklo iz Azije; Au-autohorno (rasprostranjivanje samostalno); At-antropohorno (rasprostranjivanje čovjekom); Hy-hidroorno (rasprostranjivanje vodom)



Prilog 2. Popis invazivnih vrsta Južnog i Žumberačkog naselja grada Samobora sa koordinatama i šiframa staništa

Vrsta	Lokalitet						
	Ulica M. Korvina 5	Ulica 9. svibnja S.banka	Ulica 9. svibnja 8	Ulica 9. svibnja 10	Zagorska ulica, Mimar	Žumberačka 5	Žumberačka 47
Adresa							
Šifra staništa	J.2.2.2.	J.2.2.2.	J.2.2.2.	J.2.2.2.	J.2.2.5.1.	J.2.2.5.1.	J.2.2.5.1.
GPS koordinate (X,Y)	5556505 5053039	5556580 5053039	5556524 5073123	5556583 5073208	5556444 5073217	5556175 5073302	5556079 5073251
<i>Acer negundo</i> L.							
<i>Ailanthus altissima</i> (Mill.)							
<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.					+		
<i>Coryza canadensis</i> (L.) Cronquist				+			
<i>Datura innoxia</i> Mill.			+				
<i>Duchesnea indica</i> (Andrews) Focke					+	+	
<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.					+		
<i>Erigeron annuus</i> (L.) Pers.						+	
<i>Galinsoga ciliata</i> (Raf.) S. F. Blake			+				
<i>Helianthus tuberosus</i> L.							
<i>Impatiens balfourii</i> Hooker f.		+			+	+	
<i>Oenothera biennis</i> L.							
<i>Panicum capillare</i> L.							+
<i>Parthenocissus quinquefolia</i> (L.) Planchon	+					+	
<i>Phytolacca americana</i> L.							
<i>Reynoutria japonica</i> Houtt.							
<i>Robinia pseudoacacia</i> L.							
<i>Rudbeckia laciniata</i> L.							
<i>Solidago canadensis</i> L.					+	+	+
<i>Veronica persica</i> Poir.		+		+	+		

Legenda:

- J.2.1.1. - Gradske jezgre
- J.2.2.2. - Stambeni blokovi rubnog - otvorenog tipa
- J.2.2.5.1. - Stambene kuće u nizu sa stražnjim vrtovima, pojedinačne kuće
- J.2.3.1. - Zgrade javne namjene s pripadnim površinama
- J.3.1. - Izgrađene površine za sport, rekreaciju i razonodu
- 1.8.1.2. - Ekstenzivno njegovani parkovi u sklopu naselja
- 1.8.2. - Dvorišta i kućni vrtovi



Prilog 2. Popis invazivnih vrsta Južnog i Žumberačkog naselja grada Samobora sa koordinatama i šiframa staništa - nastavak

Vrsta	Lokalitet						
	Ul.9.svibnja kbr 5.	Ul.9.svibnja, toplana	Ul.9.svibnja, kbr. 15	Ul.9.svibnja, kbr. 13	Ul.9.svibnja, park	Perkovčeva 20	Josipa Vanjeka 1,
Adresa	J.2.2.2.	J.2.2.2.	J.2.2.2.	J.2.2.2.	1.8.1.2.	J.2.2.5.1.	J.2.2.5.1.
Šifra staništa	5556372	5556361	5556861	5556498	5556538	5556250	5556250
GPS koordinate (X,Y)	5073230	5073143	5073141	5073151	5073172	5073076	5073076
<i>Acer negundo</i> L.							
<i>Ailanthus altissima</i> (Mill.)		+					
<i>Conyza canadensis</i> (L.) Cronquist							
<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.							
<i>Datura innoxia</i> Mill.							+
<i>Duchesnea indica</i> (Andrews) Focke			+		+	+	
<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.		+			+		
<i>Erigeron annuus</i> (L.) Pers.						+	
<i>Galinsoga ciliata</i> (Raf.) S. F. Blake			+				
<i>Helianthus tuberosus</i> L.							+
<i>Impatiens balfourii</i> Hooker f.		+			+		
<i>Oenothera biennis</i> L.							
<i>Panicum capillare</i> L.				+	+	+	
<i>Parthenocissus quinquefolia</i> (L.) Planchon							
<i>Phytolacca americana</i> L.							+
<i>Reynoutria japonica</i> Houtt.							+
<i>Robinia pseudoacacia</i> L.							+
<i>Rudbeckia laciniata</i> L.							+
<i>Solidago canadensis</i> L.							
<i>Veronica persica</i> Poir.	+						+

Prilog 2. Popis invazivnih vrsta Južnog i Žumberačkog naselja grada Samobora sa koordinatama i šiframa staništa - nastavak

Vrsta	Lokalitet						
	Žumberačka 6	Zagrebačka 10	Zagrebačka 1	Zagrebačka 16	Zagrebačka 37	Vukovarska 4	Vukovarska 24
Adresa	J.2.2.5.1.	J.2.2.5.1.	J.2.1.1.	J.2.2.5.1.	J.2.2.5.1.	J.2.2.5.1.	J.2.2.5.1.
Šifra staništa	5556091	5556040	5555594	5556124	5556268	5556295	5556441
GPS koordinate (X,Y)	5073365	5073372	5073340	5073412	5073546	5073505	5073422
<i>Acer negundo</i> L.							
<i>Ailanthus altissima</i> (Mill.)					+		
<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.			+				
<i>Conyza canadensis</i> (L.) Cronq.							
<i>Datura innoxia</i> Mill.							
<i>Duchesnea indica</i> (Andrews) Focke				+		+	
<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.						+	
<i>Erigeron annuus</i> (L.) Pers.	+	+	+				+
<i>Galinsoga ciliate</i> (Raf.) S.F.Bl.					+		+
<i>Helianthus tuberosus</i> L.							
<i>Impatiens balfourii</i> Hooker f.	+						
<i>Oenothera biennis</i> L.							+
<i>Panicum capillare</i> L.		+					
<i>Parthenocissus quinquefolia</i> (L.) Planchon							+
<i>Phytolacca americana</i> L.							
<i>Reynoutria japonica</i> Houtt.							
<i>Robinia pseudoacacia</i> L.							
<i>Rudbeckia laciniata</i> L.							
<i>Solidago canadensis</i> L.							
<i>Veronica persica</i> Poir.	+		+			+	+



Prilog 2. Popis invazivnih vrsta Južnog i Žumberačkog naselja grada Samobora sa koordinatama i šiframa staništa - nastavak

Vrsta	Lokalitet						
	Zagorska 22	Baranjska 5	Hercegovačka 1	Zagorska 35	Perkovčeva 30	B.Tonija, šk. dvorana	I. Perkovca 108, pekara
Šifra staništa	J.2.2.5.1.	1.8.2.	1.8.2.	J.2.2.5.1.	J.2.2.5.1.	J.3.1.	J.2.3.1.
GPS koordinate (X,Y)	5556357 5073379	5556256 5073371	5556197 5073349	5556235 5073531	5555896 5073306	5556265 5072820	5556512 5072884
<i>Acer negundo</i> L.							
<i>Ailanthus altissima</i> (Mill.)				+			
<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.			+		+	+	+
<i>Conyza canadensis</i> (L.) Cronquist	+			+			
<i>Datura innoxia</i> Mill.							
<i>Duchesnea indica</i> (Andrews) Focke	+			+			
<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.	+	+	+	+		+	
<i>Erigeron annuus</i> (L.) Pers.				+	+	+	+
<i>Galinsoga ciliata</i> (Raf.) S. F. Blake		+					
<i>Helianthus tuberosus</i> L.							
<i>Impatiens balfourii</i> Hooker f.							
<i>Oenothera biennis</i> L.							
<i>Panicum capillare</i> L.							+
<i>Parthenocissus quinquefolia</i> (L.) Planchon	+		+		+		
<i>Phytolacca americana</i> L.							
<i>Reynoutria japonica</i> Houtt.							
<i>Robinia pseudoacacia</i> L.							
<i>Rudbeckia laciniata</i> L.							
<i>Solidago canadensis</i> L.							
<i>Veronica persica</i> Poir.	+	+		+	+		+

Prilog 2. Popis invazivnih vrsta Južnog i Žumberačkog naselja grada Samobora sa koordinatama i šiframa staništa - nastavak

Vrsta	Lokalitet					
	Perkovčeva 9	Perkovčeva, parkić kod vlakića	Trg Antuna Mihanovića	Ulica Grigora Viteza, uz ulaz u školu	Bogumila Tonija 22	I. Perkovca 112, iza pekare
Šifra staništa	J.2.2.2.	1.8.1.2.	1.8.1.2.	J.2.2.5.1.	J.2.2.5.1.	1.8.2.
GPS koordinate (X,Y)	5555400 5073044	5556486 5073027	5556333 5073338	5555837 5073501	5858833 5073447	5556574 5072798
<i>Acer negundo</i> L.						
<i>Ailanthus altissima</i> (Mill.)						
<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.						
<i>Conyza canadensis</i> (L.) Cronquist						
<i>Datura innoxia</i> Mill.	+					
<i>Duchesnea indica</i> (Andrews) Focke				+		
<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.	+	+	+			
<i>Erigeron annuus</i> (L.) Pers.						+
<i>Galinsoga ciliata</i> (Raf.) S. F. Blake						
<i>Helianthus tuberosus</i> L.				+		
<i>Impatiens balfourii</i> Hooker f.		+				
<i>Oenothera biennis</i> L.						
<i>Panicum capillare</i> L.						
<i>Parthenocissus quinquefolia</i> (L.) Planchon						
<i>Phytolacca americana</i> L.				+	+	
<i>Reynoutria japonica</i> Houtt.						
<i>Robinia pseudoacacia</i> L.						
<i>Rudbeckia laciniata</i> L.					+	
<i>Solidago canadensis</i> L.						
<i>Veronica persica</i> Poir.					+	

UTJECAJ VRSTE MLIJEKA NA BROJNOST DOBRIH BAKTERIJA U KEFIRU

Lucija Tomić, 7. razred
Ivana Bucić, 7. razred

Osnovno škola Starigrad, Starigrad Paklenica
Mentor: Ana Katalinić Bach

SAŽETAK

Fermentirani mliječni proizvodi, kao što su jogurt, kiselo mlijeko i kefir, bogati su probioticima, za ljudski organizam korisnim bakterijama koje sudjeluju u probavi. U ovom radu istraživali smo kako da upravo te bakterije umnožimo u kefiru, te kako dobiti kefir najbogatiji dobrim bakterijama, pretpostavljajući da domaća mlijeka ili mlijeka koja nisu jako pasterizirana daju bogatiji kefir. Za proizvodnju kefira koristili smo kefirna zrnca, koja predstavljaju simbiozu između velikog broja dobrih, mliječno-kiselih bakterija, octenih bakterija i sojeva kvasaca. Kefirna zrnca uzgajali smo u različitim vrstama mlijeka, te smo dobiveni kefir nasadili na hranjivu podlogu i nakon 72 h izbrojali narasle kolonije probiotičkih bakterija. Rezultati koje smo dobili su potvrdili našu pretpostavku jer smo najveći broj kolonija izbrojali na podlozi na koju smo nasadili kefir od domaćeg mlijeka. Također smo utvrdili da trajno kozje mlijeko daje bogatiji kefir od trajnog kravljeg mlijeka. Proučavali smo i učinak Coca-cola na rast i razvoj probiotičkih bakterija, tako da smo uzorak kefira nasadili na hranjivu podlogu u koju smo prethodno dodali Coca-Colu. Dokazali smo da Coca-Cola negativno utječe na razvoj korisnih probiotičkih bakterija, te zbog toga ima loš utjecaj na ljudski organizam. Ovim istraživanjem dokazali smo da su fermentirani mliječni proizvodi bogatiji probiotičkim bakterijama od mlijeka, te da se kefir najbogatiji korisnim bakterijama dobiva od domaćeg mlijeka. Zbog toga je domaće mlijeko puno zdravije za ljudski organizam od industrijski prerađenih mlijeka.

Ključne riječi: probiotičke bakterije, kefir, kvaliteta mlijeka

UVOD

Bakterije nisu samo uzročnici bolesti, već mogu biti jako korisne za čovjeka. U čovjekovom probavnom sustavu nalazimo više kilograma bakterija te one u nekim slučajevima sačinjavaju i do 80% našega imuniteta (Šupe, 2014). Pa zašto ih onda ne bismo umnožili? Probiotici su dobre bakterije u našem organizmu koje nam najviše pomažu u probavi. U tijelo ih možemo unijeti putem prehrane bogate fermentiranim mliječnim namirnicama, kao što su jogurt, kiselo mlijeko i kefir. Ove namirnice se dobivaju iz mlijeka procesom mliječnog vrenja. U ovom istraživanju bi voljeli otkriti kako da upravo te bakterije umnožimo u kefiru, te kako dobiti kefir najbogatiji dobrim bakterijama. Za početak morali smo istražiti što je uopće kefir i kakva se svojstva vežu za njega. Saznali smo da je kefir mliječni proizvod, po legendi nastao na Kavkazu (Čolić, 2016). Ljudi su tamo, još prije 1000 godina slučajno stvorili kefir i prenosili ga iz generacije u generaciju. Počeli su ga konzumirati kao svakidašnji proizvod. Specifično za te ljude jest da su iznimno zdravi i da su umirali u dubokoj starosti. Sada se postavlja pitanje: je li razlog njihovog dugog života upravo kefir? Kako legenda kaže, oni su vjerovali da jest.

Danas se zna da kefir popravljiva ravnotežu dobrih i loših bakterija u našim crijevima, koje nazivamo zajedničkim nazivom „crijevna flora“. Neuravnotežena crijevna flora može biti krivac za brojne bolesti, ne samo lošu probavu već i alergije, neke kronične bolesti, pa čak i poremećaje živčanog sustava (depresija, ADHD, autizam) (Šupe, 2014). Za lošu crijevnju floru odgovorna je loša prehrana, u kojoj je često korišten proizvod i Coca-Cola, koju pogotovo vole djeca. U današnje vrijeme, zbog pojave raznih kroničnih bolesti i alergija, postalo je i u Hrvatskoj popularno piti kefir domaće izrade, po uzoru na dugovječne ljude s Kavkaza. Takav kefir se dobiva vrenjem mlijeka uz pomoć takozvanih „kefirnih zrnaca“ ili „tibetanske gljive“. Kefirna zrnca zapravo predstavljaju simbiozu (suživot organizama koji od



toga imaju obostranu korist) između velikog broja dobrih, mliječno-kiselih bakterija, octenih bakterija i sojeva kvasaca. Kefirna zrnca obavljaju proces mliječnog vrenja kojim se dobiva domaći kefir.

Cilj našeg rada bio je istražiti da li upotrebom različitih vrsta mlijeka u procesu izrade kefira možemo dobiti kefir sa različitom brojnošću bakterija, te ispitati koja vrsta mlijeka će nam dati kefir najbogatiji dobrim bakterijama. Zanimala nas je razlika između kravljeg i nešto hranjivijeg kozjeg mlijeka, domaćeg i kupovnog, te nepasteriziranog (domaćeg), slabije pasteriziranog (svježeg kupovnog ili prokuhanog domaćeg) i pasteriziranog (trajnog) mlijeka. Također ćemo provjeriti djelovanje Coca-Cole na razvoj dobrih bakterija u kefiru.

Nakon proučavanja rezultata prijašnjih istraživanja vezanih uz ovu temu (Šokota i Orlović, 2015) pretpostavljali smo da će se najveći broj dobrih bakterija umnožiti u kefiru proizvedenom od masnijih vrsta mlijeka, a literatura (Šupe, 2014) ukazuje na to da će domaće mlijeko dati kefir bogatiji bakterijama nego kupovno mlijeko zbog pasterizacije, odnosno zbog prerade u mljekarskoj industriji. Pasterizacija je proces kojim se mlijeko zagrijava na visokim temperaturama da bi se uništile bakterije u mlijeku, kako bi ono duže trajalo i bilo sigurnije za upotrebu. Međutim pasterizacijom se ubijaju i dobre bakterije u mlijeku, te tako pretpostavljamo da nam neće smetati loše bakterije ako unutar našeg kefira imamo mnogo dobrih. Korisne bakterije iz sirovog mlijeka, naravno svježeg, drže pod kontrolom one loše. Da smo radili samo s kupovnim mlijekom, zasigurno bi ono bilo s manje loših bakterija, ali izgubilo bi i svoja pozitivna svojstva i bilo bi vrlo teško probavljivo (Šupe, 2014) Rješenje može biti korištenje domaćeg mlijeka koje je tek nakratko prokuhano, da bi znali da je sigurno za upotrebu, a opet da zadrži većinu svojih dobrih svojstava.

Pošto se kuhanjem i pasterizacijom uništavaju enzimi u mlijeku koji pomažu vrenju, očekivali smo kefir bogatiji bakterijama kod upotrebe nepasteriziranog (koje nije prokuhano) ili slabije pasteriziranog (kratko prokuhanog domaćeg ili svježeg kupovnog) mlijeka nego kod upotrebe trajnog mlijeka. Što se tiče djelovanja Coca-Cole, pretpostavljali smo da će Coca-Cola onemogućiti razvoj dobrih bakterija.

Ovu temu smo odabrali jer je povezana sa ljudskim zdravljem, te nam pokazuje kako je čovjek povezan sa prirodom i kako iz prirode može dobiti sve što mu je potrebno za zdrav život. Također nam se sviđalo što ćemo naučiti proizvoditi domaći kefir, te ćemo moći koristiti blagodati kefira i nakon završetka našeg istraživanja.

METODE RADA

Istraživanje je provedeno u dvije faze, tijekom mjeseca veljače 2017. godine, u školskim prostorijama ili u kuhinji autorica. Istraživanje se sastojalo od tri faze:

1. uzgoj kefira vrenjem različitih vrsta mlijeka
2. uzgoj probiotičkih bakterija iz različitih vrsta kefira
3. istraživanje učinka Coca-Cole na rast probiotičkih bakterija.

Za proizvodnju kefira korištena su kefirna zrnca iz vlastitog uzgoja. U 300 ml mlijeka dodano je 5 grama kefirnih zrnaca. Korišteno je trajno kupovno punomasno kravlje mlijeko (2,8 %), svježe kupovno „light“ mlijeko (1,5 % masti), svježe kupovno punomasno mlijeko (3,2 % masti), domaće prokuhano (na temperaturi vrenja 5 minuta) kravlje mlijeko, domaće neprokuhano kravlje mlijeko, te trajno kupovno kozje mlijeko (2,8 % masti). Planirana je i proizvodnja kefira od domaćeg kozjeg mlijeka, ali nije ga bilo

moгуće nabaviti. Mlijeka su kupljena u trgovini, osim domaćeg mlijeka koje je nabavljeno od lokalnog obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva. Nakon 24 sata gotovi kefir je razrijeđen 100 puta metodom decimalnih razrjeđenja (Šokota i Orlović, 2015): iz gotovog kefira odvojen je jedan mililitar i pomiješan s devet mililitara ohlađene prokuhane vode. Tim postupkom dobiven je kefir razrijeđen deset puta. Da bi se dobio kefir razrijeđen sto puta potrebno je odvojiti jedan mililitar iz kefira razrijeđenog deset puta i to pomiješati s 9 mililitara ohlađene prokuhane vode. Ovim je dobiven kefir razrijeđen sto puta. Isti postupak ponovljen je i s mlijekom kako bismo imali s čim usporediti prebrojane bakterije u uzorcima kefira.

Nakon što su kefir i mlijeka bili razrijeđeni, pripremljena je podloga za bakterije (agar). U 250 mililitara vruće prokuhane vode dodano je šest grama praha agara, čime je napravljeno dovoljno hranjive podloge za 10 Petrijevih posudica. Odmah nakon što je promiješano i kada su grudice nestale, podloga je izlivena u Petrijeve posude. Kada se podloga ohladila, pomoću sterilizirane eze nasađeni su uzorci razrijeđenih kefira i mlijeka u obliku "cik-cak" crte. Kefir i mlijeko na podlozi stajali su 72 sata, na sobnoj temperaturi, kako bi se stigle razviti kolonije (slika 1). Bakterije su premale za brojanje golim okom, pa su brojane kolonije bakterija, to jest "CFU" = "colony forming units" (slika 3). Broj kolonija odgovara broju bakterijskih stanica u uzorku jer se svaka kolonija razvila od jedne bakterijske stanice (Palijan, 2013).



Slika 1. Inkubacija bakterijskih kolonija u Petrijevim posudama na sobnoj temperaturi

Nakon 72 sata prebrojane su kolonije bakterija. Mliječne bakterije raspoznavane su po krem-bijeloj boji, okruglom obliku i mjestu rasta. U bilješkama su bilježeni brojevi kolonija i odmah su bile uspoređene jedna s drugom. Svi ovi postupci ponovljeni su dva puta kako rezultat ne bi ovisio o slučajnoj pogrešci, te je iz dva brojanja izračunata srednja vrijednost.

Potreban materijal i pribor:

MLIJEKO	OSTALO	PRIBOR
trajno kupovno punomasno kravlje mlijeko (2.8 % masti)	kefirna zrnca	posude za kefir
svježe kupovno „light“ mlijeko (1.5 % masti)	Agar (LB)	cjedilo za kefir
svježe kupovno punomasno mlijeko (3.2 % masti)	Coca-Cola	menzure za razrjeđenja
domaće prokuhano kravlje mlijeko		kapaljka
domaće neprokuhano kravlje mlijeko		eza
trajno kupovno kozje mlijeko (2.8 % masti)		Petrieve posude

Na kraju su izabrana dva mlijeka koja su pokazala dobre rezultate (svježe punomasno i trajno kozje) i na isti način pripremljeni su i nasađeni uzorci mlijeka i kefira, koji si nasađeni na podloge sa Coca-Colom

(agar je kuhan u 125 ml vode i 125 ml Coca-cola). Podloge su također stajale 72 sata, nakon čega su prebrojane bakterije.

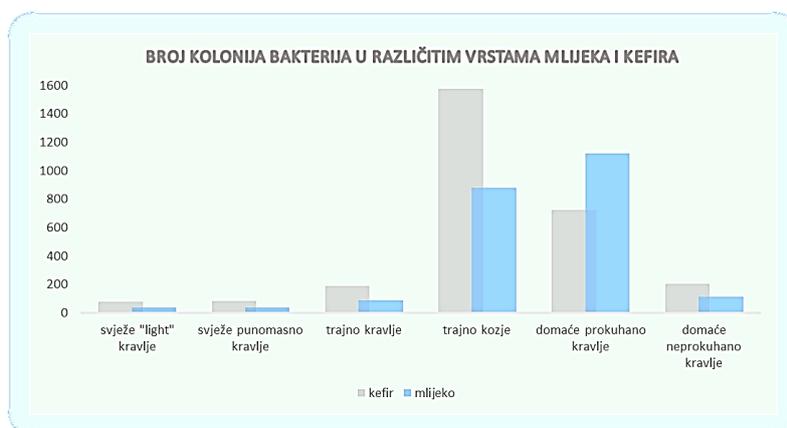
REZULTATI

Naši rezultati (tablica 1) prikazuju broj bakterijskih kolonija izbrojanih na podlogama u oba ponovljena pokusa, te srednju vrijednost izračunatu iz rezultata oba pokusa. Na grafovima (slika 2 i 4) su prikazane samo srednje vrijednosti.

Tablica 1. Broj bakterijskih kolonija u uzorcima različitih vrsta mlijeka i kefira

VRSTA MLIJEKA	KEFIR			MLIJEKO		
	1. uzorak	2. uzorak	srednja vrijednost	1. uzorak	2. uzorak	srednja vrijednost
svježe „light“ kravlje	77	92	85	33	41	37
svježe punomasno kravlje	179	201	190	78	95	87
trajno kravlje	72	88	80	36	42	39
trajno kozje	179	225	202	110	120	115
domaće prokuhano kravlje	1750	1400	1575	1040	720	880
domaće neprokuhano kravlje	800	650	725	1090	1150	1120
svježe punomasno kravlje na podlozi s Coca-colum	160	145	153	25	34	30
trajno kozje na podlozi s Coca-colum	170	160	165	50	60	55

Kada gledamo uzorke mlijeka (slika 2) vidimo da je najsiromašnije kolonijama bakterija bilo svježe „light“ mlijeko u kojem smo izbrojali samo 37 kolonija bakterija. Slijedeće po brojnosti je bilo trajno kravlje mlijeko koje sadrži 39 kolonija bakterija. Nakon njih, odmah imamo svježe punomasno kravlje mlijeko u kojemu smo ipak izbrojali malo više kolonija, tj. 87. Uzorci domaćeg mlijeka rezultirali su puno većim brojem bakterija od uzoraka kupovnih vrsta mlijeka. U domaćem prokuhanom mlijeku izbrojali smo 880 kolonija, a u neprokuhanom 1120.



Slika 2. Broj kolonija bakterija u različitim vrstama mlijeka i kefira

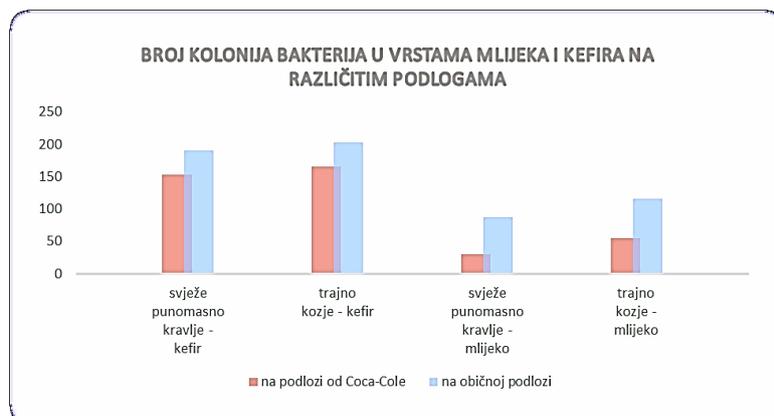
Naravno, u uzorcima kefira smo izbrojali više bakterijskih kolonija nego u odgovarajućim vrstama mlijeka, jedina je iznimka neprokuhano mlijeko koje je uzgojem na podlozi rezultiralo većim brojem kolonija bakterija u mliječnom nego u kefirnom obliku. Kefir od neprokuhanog mlijeka sadržavao je 725 kolonija bakterija. Na podlozi nasađenoj uzorkom kefira od kravljeg domaćeg prokuhanog mlijeka smo izbrojali 1575 kolonija bakterija. Od kupovnih mlijeka kefir od trajnog kozjeg mlijeka rezultirao je

rastom 225 kolonija, a kefir od svježeg punomasnog mlijeka 190 kolonija (slika 3). U uzorku kefira dobivenog od kupovnog trajnog kravljeg mlijeka izbrojali smo 80 kolonija bakterija. Neznatno bogatiji kefir sadržavao je 85 kolonija, a načinjen je od svježeg "light" kravljeg mlijeka. Kefiri od trajnog kozjeg mlijeka i kravljeg svježeg punomasnog nalaze se pri sredini s 202 i 190 izbrojanih kolonija.



Slika 3. Bakterijske kolonije u uzorku kozjeg mlijeka (po rubovima Petrijeve posude vidljiva aerokontaminacija)

Na podlozi s Coca-Colom (slika 4) naraslo je 30 bakterijskih kolonija u uzorku svježeg punomasnog mlijeka, a 55 u uzorku kozjeg trajnog mlijeka, što je otprilike $\frac{1}{3}$ broja kolonija izbrojanih u istim vrstama mlijeka na podlozi bez Coca-Cole. Kod uzoraka kefira broj je nešto veći (153 za svježe, 165 za kozje), tj. oko $\frac{2}{3}$ broja kolonija izbrojanih u istim vrstama kefira na običnoj podlozi. Na podlogama s Coca-Colom primijećeno je i dosta plijesni (slika 5).



Slika 4. Broj kolonija bakterija u vrstama mlijeka i kefira na različitim podlogama



Slika 5. Plijesni u uzorku kefira od kozjeg mlijeka na podlozi s Coca-Colom



RASPRAVA

Na osnovu analize odnosa između kefira i mlijeka različitih vrsta može se uočiti da su domaća mlijeka najbogatija dobrim bakterijama. Domaće neprokuhanu kravlje mlijeko pokazalo se kao najbogatije dobrim bakterijama. Međutim, kada gledamo kefir od neprokuhanog mlijeka, on nije najbogatiji probioticima. Vjerujemo da je to zato što su se kefirna zrnca, koja smo između provođenja pokusa uglavnom držali u svježem kupovnom mlijeku, navikla na to mlijeko. Da bi kefir potpuno uspio u neprokuhanom mlijeku mora proći prilagodbu od barem tjedan dana, tijekom kojih se postupno uvodi dio kupovnog, a dio domaćeg neprokuhanog mlijeka. Tek nakon toga kefir od neprokuhanog mlijeka bi pokazao svoje pune karakteristike. Ovo je zbog toga što je neprokuhanu mlijeko bogato vlastitim mikroorganizmima koje se natječu za hranu s mikroorganizmima iz kefirnih zrnaca (Cultures for Health 2017). Kako u našem istraživanju nije bio planiran period za prilagodbu, zaključujemo da kefir od neprokuhanog mlijeka treba još jednom testirati, uz postepenu prilagodbu. To ostavljamo za neko drugo istraživanje.

Kada gledamo grafikon s kupovnim vrstama mlijeka vidimo da je najviše kolonija bakterija izbrojano u trajnom kozjem mlijeku, što nas je iznenadilo jer su trajna mlijeka više pasterizirana od svježih, te smo očekivali da će najveća brojnost bakterija među kupovnim vrstama mlijeka biti u svježem punomasnom mlijeku. Veliku brojnost kolonija bakterija u ovom mlijeku objašnjavamo time da je kozje mlijeko hranjivije od kravljeg, a čestice masti su manje i brojnije, što ga čini probavljivijim za ljudski organizam (Šupe 2014), a očigledno i pogodnijim za razvoj dobrih bakterija. Makar je trajno mlijeko više pasterizirano, ipak je bilo pogodno za rast bakterijskih kolonija. Nažalost nismo imali priliku istražiti domaću kozju mlijeko, za koje pretpostavljamo da bi bilo daleko najbogatije dobrim bakterijama. Ovo također ostavljamo za neko slijedeće istraživanje. Svježe punomasno kravlje mlijeko ispunilo je naša očekivanja. Taj kefir i mlijeko imali su, nakon trajnog kozjeg mlijeka, najviše izbrojanih kolonija bakterija među kupovnim vrstama mlijeka. Također, pretpostavili smo da će najsiromašnije dobrim bakterijama biti svježje „light“ kravlje mlijeko i trajno kravlje mlijeko i nismo pogriješili. Zbog premalo masnoće u „light“ mlijeku i preduge pasterizacije u trajnom kravljem mlijeku nije bio moguć razvoj većeg broja probiotičkih bakterija.

Nakon pokusa izvedenih na običnim hranjivim podlogama za bakterije, nasadili smo uzorak mlijeka i kefira od svježeg punomasnog kravljeg mlijeka i trajnog kozjeg mlijeka na podloge od Coca-Cole (Slika 4). Rezultati tog pokusa nisu nas previše iznenadili jer se smanjila brojnost kolonija bakterija na podlozi od Coca-Cole, ali pretpostavljali smo da će se smanjiti još više. Opstanak bakterija na podlozi od Coca-Cole objašnjavamo time da bakterijama očito odgovara šećer iz pića.

Važno je napomenuti da se u svim Petrijevim posudama s podlogom od Coca-Cole pojavila plijesan (Slika 6), koja ukazuje da je Coca-Cola pogodna i za rast loših mikroorganizama, a iz toga zaključujemo da loše utječe na ravnotežu dobrih i loših mikroorganizama i u našim crijevima, tj. na našu crijevnu floru.

ZAKLJUČCI

Na osnovu provedenog istraživanja doneseni su slijedeći zaključci:

- ☑ Domaća mlijeka su puno pogodnija za izradu kefira i imaju puno više probiotičkih bakterija od kupovnih, industrijski prerađenih mlijeka.



- ✔ Domaće prokuhano mlijeko najpogodnije je za izradu kefira, ako se koriste metode opisane u ovom radu. Kefir od neprokuhanog domaćeg mlijeka, dobiven metodama opisanim u radu, pokazao je manju brojnost bakterija od kefira dobivenog od domaćeg prokuhanog mlijeka.
- ✔ Među ispitanim kupovnim vrstama mlijeka, a i kefira napravljenog od kupovnih vrsta mlijeka, najveću brojnost bakterija imalo je trajno kozje mlijeko i kefir, pa zaključujemo da je kozje mlijeko pogodnije od kravljeg mlijeka za razvoj probiotičkih bakterija.
- ✔ Slabije pasterizirano kravlje mlijeko (svježe mlijeko) pokazalo je bolje rezultate u odnosu na jako pasterizirano kravlje mlijeko (trajno mlijeko).
- ✔ U punomasnim vrstama mlijeka izbrojali smo više kolonija bakterija nego u "light" vrsti mlijeka.
- ✔ Kao najlošije po brojnosti probiotičkih bakterija pokazalo se svježe light kravlje mlijeko i trajno kravlje mlijeko, te kefir napravljeni od ovih vrsta mlijeka. Zaključujemo da pasterizacija i oduzimanje masnoća mlijeku negativno utječu na kvalitetu mlijeka.
- ✔ Coca-Cola je smanjila, ali ne i onemogućila razvoj dobrih bakterija, no pokazalo se da negativno utječe na ravnotežu dobrih i loših mikroorganizama, što znači i na ljudsku crijevnu floru i ljudsko zdravlje.

ZAHVALA

Zahvaljujemo gđi. Marijani Tomić na pomoći pri digitalizaciji i tiskanju plakata i drugih materijala.

LITERATURA

Cultures for Health 2017. <https://www.culturesforhealth.com/learn/milk-kefir/introducing-milk-kefir-grains-raw-milk/>, pristupljeno 04.03.2017.

Čolić S. 2016. Kefir – ljekovita gljiva s Kavkaza. <http://alternativa-za-vas.com/index.php/clanak/article/kefir>, pristupljeno 20.11.2016.

Palijan G. 2013. Praktikum iz mikrobiologije: bakteriologija. Radni materijal. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju, Zavod za kvantitativnu ekologiju.

Šokota D., Orlović L. 2015. Kako masti u siru i vrhnju utječu na razvoj plijesni i bakterija. Bioznanac 1: 52-64.

Šupe A. 2014. Istine i laži o hrani: Hrana kao lijek. Tragom, Šibenik.

STANIŠTA BREGUNICA (*Riparia riparia* L.) U OKOLICI ZAGREBA

Jakov Uzelac, 8. razred

Emma Volar, 8. razred

OŠ Bogumila Tonija, Samobor

Mentor: Nataša Kletečki

SAŽETAK

Tijekom 2016. g. proveli smo istraživanje bregunica (*Riparia riparia* L.) u okolici Zagreba. Istraživanje je obuhvatilo prstenovanje bregunica na koloniji kod sela Otok nedaleko od Samobora i prebrojavanje kolonija bregunica na Savi. Prstenovanje se obavljalo tijekom lipnja i srpnja 2016. g., a prebrojavanje kolonija na Savi tijekom srpnja 2016. g. na području od sela Otok do Ivanje Reke. Rezultati naših istraživanja pokazali su kako se veći broj kolonija bregunica nalazi nizvodno nego uzvodno od Zagreba. Najveći broj bregunica gnijezdi na koloniji pored sela Otok. Bregunica se gnijezdi u rupama koje kopa najčešće u novo odronjenim strmim riječnim obalama kakvih je više na Savi nizvodno od Zagreba jer je uzvodni tok Save reguliran i obložen kamenom.

Ključne riječi: kolonije bregunica, Sava, Zagreb, Samobor

UVOD

Svoje smo istraživanje proveli na širem području rijeke Save uzvodno i nizvodno od Zagreba. Rijeka Sava pritoka je rijeke Dunav i jedna je od tri najdulje rijeke u Hrvatskoj, dugačka je 940 km. Nastaje spajanjem Save Dolinke (koja izvire u dolini između Triglava i slovensko - austrijske granice) i Save Bohinjke (nastaje izlivanjem iz Bohinjskog jezera) u blizini Lancova u Sloveniji, a utječe u rijeku Dunav u Beogradu. Jednim dijelom čini riječnu granicu između Republike Hrvatske i Republike Bosne i Hercegovine te potom između Republike Bosne i Hercegovine i Republike Srbije. Širina riječnog korita u Zagrebu je 100 metara, a najveća širina joj je do 700 metara. Na ušću u Dunav širina Save je 290 metara. Rijeka Sava u Zagrebu nije plovna, a nije niti pitka, ponajviše zbog razvijene industrije i otpadnih voda koje se rijetko pročišćavaju (Zg portal, 2016).

Bregunica (*Riparia riparia* L.) najmanja je ptica iz porodice lastavica (*Hirundinidae*) u nas. Prema *Pravilniku o proglašavanju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim* (NN 144/13) strogo je zaštićena zavičajna divlja svojta i nalazi se na *Crvenom popisu* ugroženih ptica Hrvatske. Selica je i kao takva zaštićena i temeljem međunarodnih konvencija. Gnijezdi se u rupama koje najčešće kopa u novo odronjenim, strmim, pjeskovitim, riječnim i jezerskim obalama, a rjeđe u iskopima i strmim morskim obalama. Gnijezdo joj je iskopani tunel dug 35 - 120 cm, koji završava s komorom promjera do 15 cm u kojoj svija gnijezdo od perja i grančica. Polaže 2 - 7 jaja čija inkubacija traje 14 - 15 dana (Grlica, 2016). Mlade othranjuje oko 22 dana nakon čega napuštaju gnijezda. Najčešće gnijezdi jednom do dva puta godišnje, u kolonijama koje broje dvanaestak do nekoliko stotina parova, i to u periodu od kraja travnja do sredine srpnja (Andrić, 2016). Naseljava području čitave Europe, sve do krajnjeg sjevera. U Hrvatskoj je 2014. godini procijenjeno da gnijezdi od 6579 do 8007 parova bregunica (Grlica, 2016). Promotrimo li njezin vanjski izgled vidjet ćemo da je odozgo je smeđe, a s trbušne strane bijele boje. Na prsima ima smeđu poprečnu prugu. Hrani se u letu, uglavnom sitnim letećim kukcima. Obično se drži u jatima od nekoliko stotina do nekoliko tisuća jedinki. Tijekom migracije i zimovanja često se udružuje u jata s drugim lastavicama (slika 1).



Slika 1 Bregunice (Croatia panda, 2016)

Bregunice su u nas ugrožene zbog uništavanja staništa uzrokovanih ilegalnim iskapanja pijeska i šljunka na obalama rijeka i jezera, a često i zbog uređivanja riječnih obala. Stoga je važno pratiti njihovu brojnost i lokacije kolonija u Hrvatskoj (Andrić, 2016).

Tijekom prošle školske godine u našoj je školi gospodin Ivan Darko Grlica iz Prirodoslovnog društva *Drava*, Virovitica, održao predavanje na temu "*Monitoring bregunica na području Save i Drave*". Tada smo se upoznali s bregunicom, najmanjim članom porodice lastavica. Saznali smo da je WWF zajedno s nevladinim udrugama koje se bave proučavanjem ptica proglasio bregunicu za hrvatsku pticu 2016. Zašto bregunica? Njezina staništa djelovanjem čovjeka kontinuirano nestaju i treba ih intenzivno štiti.

Postavili smo ciljeve istraživanja:

1. odrediti lokalitete kolonija bregunica na Savi uzvodno i nizvodno od Zagreba i odrediti broj bregunica na svakoj zabilježenoj koloniji.
2. odrediti broj bregunica na koloniji nedaleko od sela Otok.
3. odrediti postotak zastupljenosti kolonija bregunica uzvodno i nizvodno od Zagreba.

Pretpostavke:

1. najveći broj bregunica gnijezdi na koloniji nedaleko sela Otok.
2. veći broj kolonija bregunicama nalazi se nizvodno od Zagreba .
3. veličina kolonije bregunica ovisi o tipu staništa. Uzvodni tok Save reguliran i obložen kamenom, te na takvim staništima bregunice rjeđe gnijezde.

Rezultate svojih istraživanja prezentirati ćemo u Dječjoj knjižnici grada Samobora, uz prigodnu izložbu fotografija, zainteresiranim učenicima tijekom obilježavanja *Dana voda*. Projekt smo prezentirali i u Javnoj ustanovi Zeleni prsten Zagrebačke županije. Na taj smo način dali svoj prilog zaštiti bregunica (prilog 1-3) na području Zagrebačke županije. Naša su istraživanja dio istraživanja koja su tijekom obilježavanja godine bregunica provodili ornitolozi Darko Grlica, Tomica Rubinić i Tomislav Blažev, a provodena su uz njihovu pomoć i dozvolu roditelja.

METODE RADA

Područje istraživanja

Područje našeg istraživanja obuhvaćalo je koloniju bregunica kod sela Otok smještenog uz Savu nedaleko od Samobora i tok od slovenske granice nedaleko sela Otok do Otoka Svibovskog kod Ivanje Reke. Istraživano područje toka Save iznosi oko 50 km. Kao razmeđu između gornjeg i donjeg toka Save, u daljnjem tekstu uzvodno i nizvodno od Zagreba, uzeli smo toplanu u Zagrebu jer se ondje nalazi kaskada koja uvjetno dijeli tok Save na dva dijela. Uzvodno od Zagreba korito Save je većim dijelom

regulirano, odnosno obale su obložene kamenom, a nizvodno od Zagreba do Ivanje Reke korito nije regulirano.

Vrijeme istraživanja:

Prstenovanja/prebrojavanja bregunica na koloniji kod sela Otok provedena su tijekom lipnja i srpnja 2016.g (slika 2 i slika 3), a prebrojavanje bregunica na rijeci Savi početkom srpnja 2016. g. (slika 4). Naknadno prebrojavanje aktivnih gnijezda uz Savu obavljano je tijekom srpnja i kolovoza 2016. g., a ponovljeno je i u travnju 2017. godine. Istraživanje je obavljeno u navedenom periodu jer bregunica tada gnijezdi i boravi u Hrvatskoj.

Materijal i pribor:

U postupku prstenovanja korišten je slijedeći pribor: vaga, vrećice za ptice, prstenje, mreža. Tijekom terenskih istraživanja na Savi korištena je slijedeća oprema: dalekozor Swarovski SLC 8x56 B i durbin Swarovski AT 80 HD s okularom 20-60, fotoaparat Lumix, te priručnici za determinaciju ptica (Peterson et all., 1983; Brunn et Singer, 1986, Heinzl et. all.,1999, Mullarney et.all.,1999).

Rad na terenu

Rad na terenu sastojao se od :

- 1) sudjelovanja u prstenovanja bregunica u koloniji kod sela Otok (slika 2 i slika 3);
- 2) evidentiranja kolonija i prebrojavanja bregunica na rijeci Savi.

Promatranje je vršeno iz čamca ili uz obalu tijekom dnevne vidljivosti, a broj aktivnih gnijezda utvrđivan je prebrojavanjem aktivnih rupa u koloniji metodom grupiranja 1, 2, 3,..do 10, zatim grupirano 10, 20, 30,.. do 100, zatim grupirano 100, 200, 300 do konačnog broja u koloniji.



Slika 2 Kolonija bregunica kod sela Otok (foto: T.R.)



Slika 3. Bregunica ulovljena u mrežu tijekom prstenovanja

Sve su kolonije fotografirane te je kasnije provjeravan broj aktivnih gnijezda svake kolonije detaljno na fotografijama (slika 5) i ponovnim pregledom evidentiranih kolonija, kako bi pogreška bila smanjena na najmanju moguću mjeru (Kralj, 2013).

Metoda obrade podataka

Tijekom obrade podataka:

- 1) unijeli smo položaja kolonija bregunica na geografsku kartu.
- 2) analizirali broj bregunica i njihovih kolonija na istraživanom području.
- 3) odredili postotak zastupljenosti kolonija bregunica uzvodno i nizvodno od Zagreba.



Slika 4 Kolonija bregunica na Savi uzvodno od Zagreba

REZULTATI

Rezultati naših istraživanja prikazani su u tablicama (tablica 1 i tablica 2).

Prstenovanje bregunica na koloniji kod sela Otok

U tablici 1 prikazani su rezultati prstenovanja bregunica na koloniji kod sela Otok. Na navedenom je lokalitetu u dva termina prstenovano ukupno 168 bregunica. Tijekom prvog prstenovanja prstenovano je 111 bregunica, a tijekom drugog prstenovanja 75 bregunica (tablica 1). Iz tablice (tablica 1) vidljivo je kako je 18 bregunica dva puta ulovljeno.

Tablica 1. Rezultati prstenovanja na koloniji bregunica

Datum prstenovanja	Broj prstenovanih bregunica
19.6.2016.	111
3.7.2016.	75 ¹ (57)

¹Od navedenog je broja 18 bregunica ponovno ulovljeno. Crvenom je bojom označen broj novo prstenovanih jedinki.



Slika 5 Smještaj kolonije bregunica kod sela Otok na karti (kartu izradio: T.R.)

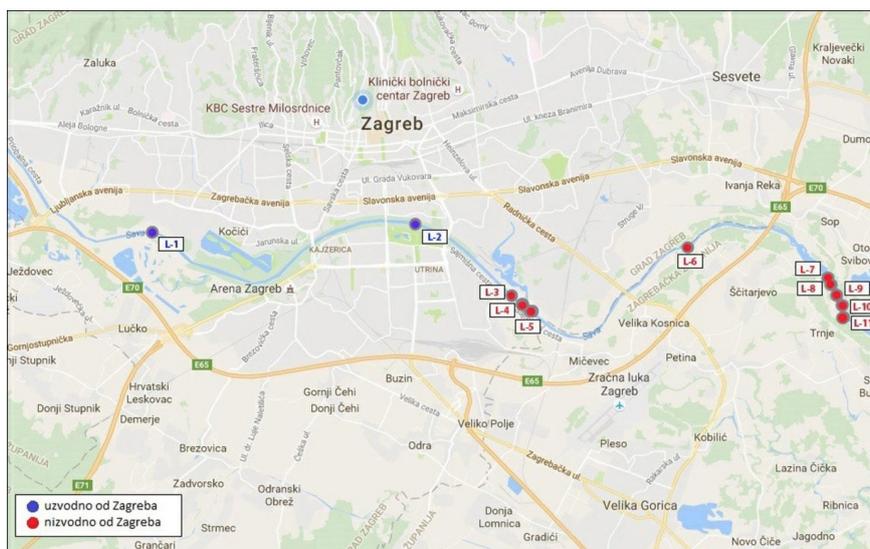
Određivanje kolonija bregunica uzvodno i nizvodno od Zagreba

Rezultati prebrojavanja bregunica na Savi uzvodno i nizvodno od Zagreba

Na Savi uzvodno i nizvodno od Zagreba u dužini od 50 km bregunice su zabilježene na 11 lokaliteta (slika 6), od čega ih je samo dva uzvodno, a 9 nizvodno od Zagreba (tablica 2). Na lokalitetima uzvodno od Zagreba zabilježeno je 17 bregunica, od čega 13 na lokalitetu 1, a četiri na lokalitetu 2.

Tablica 2. Rezultati prebrojavanja bregunica na Savi (plavom smo bojom označili lokalitete uzvodno, a crvenom nizvodno od Zagreba)

Stanište bregunica	Broj prebrojanih bregunica
lokalitet 1	13
lokalitet 2	4
lokalitet 3	90
lokalitet 4	3
lokalitet 5	45
lokalitet 6	80
lokalitet 7	20
lokalitet 8	7
lokalitet 9	22
lokalitet 10	80
lokalitet 11	8

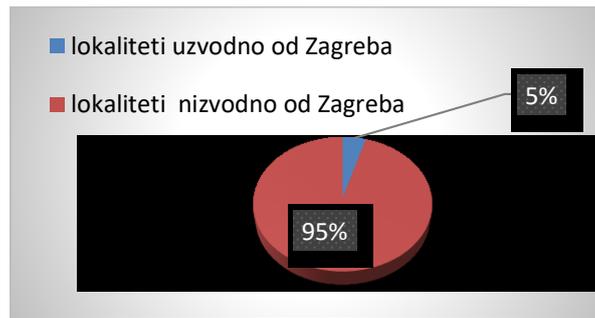


Slika 6 Smještaj kolonija bregunicama na Savi (kartu izradila: R.V.)

Najveći je broj bregunica zabilježen na lokalitetu 3 koji se nalazi nizvodno od Zagreba i to 90 bregunica. Po broju bregunica slijede lokaliteti 6 i 10 s 80 bregunica. Najmanji broj bregunica na staništima uzvodno i nizvodno od Zagreba, samo 3, zabilježen je na lokalitetu 4 (tablica 2). Iz karte koja prikazuje smještaj kolonija bregunica na Savi (slika 6) vidljivo je kako su kolonije nizvodno od Zagreba grupirane što nije slučaj s kolonijama uzvodno od Zagreba.

Zastupljenost kolonija bregunica na Savi uzvodno i nizvodno od Zagreba

Rezultate smo prikazali i grafički (slika 7). Iz slike 7 vidljivo je kako je samo 5% kolonija bregunica smješteno uzvodno od Zagreba, dok je 95% smješteno nizvodno od Zagreba.



Slika 7 Brojnost kolonija bregunica uzvodno i nizvodno od Zagreba

RASPRAVA

Svojim smo istraživanjem željeli upoznati biologiju bregunice, upoznati njezina staništa na području našeg širem zavičaja, educirati javnost o potrebi zaštiti njezinih staništa i time dati svoj prilog obilježavanju godine bregunica. Rezultati naših istraživanja pokazali su kako veći broj bregunica gnijezdi na kolonijama izvan riječnih obala. Analizom broja kolonija nizvodno i uzvodno od Zagreba uočili smo kako je 95 % kolonija smješteno nizvodno od Zagreba od kojih su neke vrlo brojne. Obale rijeke Save uzvodno od Zagreba uređene su, obložene kamenom, a kolonije su rijetke i malobrojne. Nizvodno od Zagreba veći je broj kolonija, brojnije su, a obale nisu uređene (slika 9). Dosadašnja ornitološka istraživanja na području rijeke Save (Mikuška i Grlica, 2013) pokazala su izuzetnu vrijednost rijeke Save od Zagreba do Siska za ugrožene svojte ptica, osobito one koje ukazuju na neometano odvijanje hidromorfoloških procesa meandriranja i sedimentacije. Sa stanovišta zaštite ugroženih i rijetkih ptica jedna od najvrjednijih dionica rijeke Save je i dionica od Zagreba do Rugvice. Ove dionice istovremeno ukazuju na odvijanje hidromorfoloških procesa koji su neophodni za opstanak rijetkih i ugroženih staništa (strmci, otoci i sprudovi) i za njih vezanih vrsta. Istraživanja Mikuške i Grlice(2013) govore o 5.075 parova bregunica i ukazuju da je u ovom trenutku rijeka Sava postala značajnije gnjezdilište za ovu vrstu od rijeke Drave na kojoj je još 2005. g. gnijezdilo više od 12.000, a 2010. g. 3000 parova. U cilju poboljšanja ukupnog stanja na ovim dionicama, kako ekološkog tako i hidromorfološkog, potrebno je osmisliti projekte revitalizacije kojima je prvenstveno potrebno ponovno vratiti i omogućiti neophodne hidromorfološke procese, a time povratiti i izgubljenu biološku raznolikost.

Uzrok promjene u brojnosti bregunica ili njihovih staništa je uglavnom djelovanje čovjeka. Osim uređenja obala to može biti i izgradnja hidroelektrane, obaloutvrda ili ekstenzivna poljoprivreda, tj. upotreba pesticida (Croatia panda, 2017).

Istraživanjem smo potvrdili pretpostavke postavljene na početku istraživanja. Veći smo broj kolonija zabilježili nizvodno od Zagreba i on je povezan s tipom staništa. Najveći broj bregunica gnijezdi na koloniji nedaleko sela Otok.

Ostvarili smo ciljeve istraživanja. Prstenovali smo bregunice na koloniji pored sela Otok, odredili lokalitete kolonija bregunica uzvodno i nizvodno od Zagreba, te odredili postotak zastupljenosti kolonija bregunica uzvodno i nizvodno od Zagreba.



Sve evidentirane kolonije obišli smo ponovno u travnju 2017. g. kako bi utvrdili broj aktivnih kolonija. Posebno nam je zanimljiva kolonija kod sela Otok jer ona služi i kao divlje otpada i postoji mogućnost njezinog zatrpavanja.

Prezentacijama projekta i prigodnim izložbama u Dječjoj knjižnici Samobor i Javnoj ustanovi Zeleni prsten Zagrebačke županije, upoznali smo javnost s biologijom bregunice, razlozima njezina nestanka i potrebom za zaštitom njezinih staništa.

ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata došli smo do sljedećih zaključaka:

- ✔ veći broj bregunica gnijezdi na kolonijama nedaleko riječnih obala nego na samim obalama,
- ✔ veći broj kolonija bregunica nalazi se nizvodno nego uzvodno od Zagreba,
- ✔ bregunica gnijezdi u rupama koje kopa najčešće u novo odronjenim strmim riječnim obalama, kakvih je više na Savi nizvodno od Zagreba jer je uzvodni tok Save reguliran i obložen kamenom,
- ✔ kolonija kod sela Otok i kolonije nizvodno od Zagreba slične su po tipu staništa i na njima gnijezdi veći broj bregunica.

ZAHVALA

Iskrenu zahvalnost za provođenje ovog istraživanja zahvaljujemo ornitolozima: Ivanu Darku Grlici s kojim smo provodili istraživanja na Savi; Tomislavu Rubiniću i Tomislavu Blaževu za sudjelovanje u akciji prstenovanja bregunica kod sela Otok; Martini Glasnović prof., ravnateljici Javne ustanove Zeleni prsten Zagrebačke županije, za pomoći pri predstavljanju projekta; Mirjani Dimnjaković, prof. ravnateljici Dječje knjižnice Samobor, za pomoći pri predstavljanju projekta.

LITERATURA

- Brunn, B., Singer, A. 1986. Birds of Britain and Europe, Hamlyn, London.
- Heinzel, H., Fitter, R. and Parslow, J. 1999. Ptice Hrvatske i Europe sa Sjevernom Afrikom i Srednjim Istokom. HOD, Zagreb.
- Mullarney, K., Svensson, L., Zetterstrom, D., Grant, P. J. 1999. Bird Guide. Collins, London.
- Andrić V. 2016. Bregunice. *Natura Slavonica*. <https://natura-slavonica.hr/hr/>, pristupljeno 10.12.2016.
- anonymus. 2016. Vijesti. Croatia panda. <http://croatia.panda.org/vijesti/?uNewsID=279985>, pristupljeno 25.2.2017.
- anonymus. 1999. Pravilnik o proglašavanju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim. Narodne novine. <http://www.propisi.hr/print.php?id=9564>, pristupljeno 25.2.2017.
- anonymus. 2016. ZGPORTAL. <http://www.zgportal.com/o-zagrebu/simboli-grada-zagreba/rijeka-sava>, pristupljeno 10.12.2016.
- Kralj J. 2013. STANDARDNA MEDODA PREBROJAVANJA PTICA U TOČKI. http://ipag.petagimnazija.hr/wpcontent/uploads/2013/10/IRUP_1_ornitologija.pdf, pristupljeno 25.2.2017.
- Mikuška T., Grlica D. 2014. Istraživanje bregunica i kulika sljepčica na rijeci Savi od Siska do Zagreba. PP LONJSKO POLJE. http://www.pp-lonjsko-polje.hr/new/media/2014_danubeparks_results/wp_5_riparia_sisak_zagreb_final.pdf, pristupljeno 25.2.2017.
- Grlica D. I. 2016. Bregunice. PRIRODOSLOVNO DRUŠTVO DRAVA. <http://www.pd-drava.hr/index.php/monitoring-bregunica-na-rijeci-dravi>, pristupljeno 25.12.2016.

PRILOZI

Prilog 1 Najava za predavanje i izložbu u knjigomatu Gradske knjižnice, pozivnica za prezentaciju projekta i otvaranje izložbe (na pozivnici se nalazi likovni rad učenika 4 b razreda naše škole), prezentacija projekta u suradnji s Javnom ustanovom za upravljanje zaštićenim dijelovima prirode Zagrebačke županije uz izložbu učeničkih radova i fotografija u Dječjoj knjižnici, Samobor

ISTRAŽI!
Kako smo istraživali Bregunice (*Riparia riparia* L.)?

Jakov Uzelac, 8d / Ema Volar, 8e
Mentor: mr. sc. Nataša Kletečki
OŠ Bogumila Tonija, Samobor

Tijekom prošle školske godine u OŠ Bogumila Tonija, gospodin Grlica iz Prirodoslovnog društva *Drava*, Virovitica, održao predavanje na temu "Monitoring bregunica na području Save i Drave" i to je bio naš prvi susret s bregunicom, najmanjim članom porodice lastavica. Također smo saznali da je bregunica proglašena za hrvatsku pticu 2016.

ZAŠTO BREGUNICA?
Njezina staništa djelovanjem čovjeka kontinuirano nestaju i treba ih intenzivno štiti. Željeli smo saznati gdje žive i se bregunica na području Samobora i Zagrebačke županije, te krenuli u istraživanje.

CILJEVI SU NAM BILI:

1. Odrediti brojnost i lokacije gniježđenja bregunica na Savi uzvodno i nizvodno od Zagreba
2. Usporediti brojnost gniježđenja bregunica uz tok Save uzvodno i nizvodno od Zagreba

Tijekom istraživanja surađivali smo s ornitolozima Grlicom, Rubinićem i Blaževom.
Rezultate istraživanja, izložbu fotografija i crteža učenika naše škole želimo pokazati učenicima osnovnih škola s područja Samobora.

NAUČNO MJEŠTO O BREGUNICI
Bregunica (*Riparia riparia* L.), najmanja je ptica iz porodice lastavica (Hirundinidae) u Hrvatskoj. Odozgo je smeđa, a s trbušne strane bijela. Na prsima ima smeđu horizontalnu prugu. Hrane se u letu, uglavnom sitnim letećim kukcima. Obično je u velikim jatima. Gnijezdi se u rupama, koje najčešće kopa u novoodronjenim, sitnim pjeskovitim, riječnim i jezerskim obalama, od kraja travnja do sredine srpnja, jednom do dva puta godišnje. Stogor je zaštićena zavičajna divlja svojta u Republici Hrvatskoj i uvrštena je na Crveni popis ugroženih ptica Hrvatske. U Hrvatskoj ih ugrožava uništavanje staništa zbog ilegalnog iskopa pješkova i šljunka na obalama rijeka i jezera, a često i uređivanja riječnih obala.

03 KNJIGOMAT



Pozivamo Vas na prezentaciju rezultata projekta

„Staništa bregunica u Zagrebačkoj županiji“ i izložbu likovnih radova na temu „Bregunice“ učenika OŠ Bogumil Tonij

u srijedu 26. travnja 2017. godine s početkom u 11:00 sati

u prostorjama JU Zelena prsten Zagrebačke županije, Ulica 151. Samoborske brigade 11V 1, Samobor

Veselim se Vašem dolasku!

Ravnateljica:
Martina Glasnović



Prilog 2 Listić za učenike 3. razreda uz prezentaciju projekta

Ime i prezime _____

1. Kako se naziva ptica koju si upoznao na današnjem predavanju? _____
2. Je li selica ili stancarica? _____
3. Koje još ptice iz te skupine poznaješ? _____
4. Navedena ptica u RH gnijezdi tijekom: a) svibnja b) kolovoza c) rujna



5. Opiši što vidiš na fotografiji.
6. Zašto nestaju njezina staništa?
7. Gdje se nalaze njezina staništa o kojima si čuo/čula u prezentaciji?

ISPITIVANJE POJAVE POREMEĆAJA REFRAKCIJE OKA KOD UČENIKA U OSNOVNOJ ŠKOLI

Julija Prevedan, 8. razred

Lucija Vargović, 8. razred

Osnovna škola Ivane Brlić-Mažuranić Virovitica, Virovitica

Mentor: Jasna Razlog-Grlica

SAŽETAK

Potaknute sve većim brojem vršnjaka koji imaju probleme s vidom željele smo ispitati pojavu poremećaja refrakcije oka kod učenika petih i osmih razreda naše škole i usporediti dobivene podatke s podacima sa sistematskih pregleda. Ispitano je 215 učenika naše škole, 109 učenika petih razreda i 96 učenika osmih razreda. Istraživanje je provedeno kao dio aktivnosti učenika škole u provedbi građanskog i zdravstvenog odgoja s ciljem edukacije o zaštiti vida i promicanja pozitivnog stava prema osobama koje su različite. U učionicama je za vrijeme nastave provedeno testiranje, tzv. screening vidne oštine na daljinu, blizinu i test za pojavu astigmatizma. Učenici su ispunjavali upitnik o životnim navikama i stavu prema osobama koje nose naočale. Većina se učenika u školi zdravo hrani i pokazuje pozitivan stav prema osobama koje nose naočale i slabo vide. Smatraju da suvremeni način života šteti zdravlju očiju, no ipak aktivno ne pridonose zaštiti jer većina koriste mobitele i gledaju TV više od tri sata dnevno. Slabovidnih je učenika oko 2 % u svakoj generaciji. Nema većih razlika ove školske godine u pojavi poremećaja refrakcije oka kod mlađih i starijih učenika, njihov udio kreće se od 10 do 14 %. Najviše je zastupljena, kako danas tako i prije četiri godine, pojava kratkovidnosti s astigmatizmom ili bez njega. Pojave astigmatizma i dalekovidnosti danas se otkrivaju ranije nego prije četiri godine zahvaljujući preventivnim pregledima za vrijeme školovanja. Rezultati naših ispitivanja vidne oštine u školi uglavnom se podudaraju s rezultatima provjere vida na sistematskim pregledima u školskoj ambulanti u Virovitici. Redoviti preventivni pregledi i češća edukacije u školi pomažu učenicima da ranije uoče pojave poremećaja refrakcije oka i tako što duže očuvaju vid.

Ključne riječi: kratkovidnost, dalekovidnost, astigmatizam, slabovidnost, zaštita vida

UVOD

Vid je jedno od osjetila kojima doživljavamo vanjski svijet, zapažamo oblike, doživljavamo prostor, uočavamo kretanje i boje. Zato, čuvajmo oči (Bastić i sur., 2014). Kvaliteta vida ovisi o fiziološkoj veličini očne jabučice, prozirnosti očnih medija, fiziološkom stanju mrežnice, očnog živca, vidnog puta te centra za vid u mozgu i optičkom sklopu oka, refrakciji (Behetić i Duh, 2013). Refrakcija označava odnos između moći prelamanja jednog oka i njegove dužine i to bez upotrebe akomodacije. Ako je refrakcija normalna oko je emetropno tj slika se stvara na mrežnici i vidna oština je normalna. Kod pojave kratkovidnosti, dalekovidnosti i astigmatizma dolazi do stanja ametropije i smanjenja vidne oštine (Repac i suradnici, 2012). Vidna oština je sposobnost raspoznavanja predmeta po obliku iz slike koja se stvara na mrežnici i temeljni je pokazatelj funkcije oka. To je sposobnost oka da jasno vidi dvije odvojene točke (Behetić i Duh, 2013). Svaki pregled oka započinje ispitivanjem vidne oštine. Sva ispitivanja oka uvijek se vrše najprije na desnom, potom na lijevom oku pomoću vidne table za testiranje vidne oštine sa slikovnim optotipovima tzv. screening vidne oštine (Bilić Vision, 2012).

Što su sitniji predmeti koje oko može u određenoj udaljenosti zapaziti, to je veća oština vida. Kod djece prvi pregled potrebno je napraviti nakon treće godine života. Važno je preventivno djelovati, pa se screening vidne oštine i test na boje provodi kod djece na upisu u prvi razred osnovne škole, u trećem razredu i na sistematskim pregledima u petom i osmom razredu. Stručnjaci kažu da razvoj



vida kod djece traje otprilike do 7 godine, a dijelom i do 10. godine (Glavota, 2016). Uslijed intenzivnog naprezanja oka npr. tijekom školovanja može doći do smanjenja oštine vida koje oftalmolozi (stručnjaci za oči) prepoznaju najčešće kao refrakcijske anomalije (mane) oka koje ćemo u daljnjem tekstu opisivati kao poremećaju refrakcije oka. One se mogu očitovati kao kratkovidnost (miopia) gdje se paralelne zrake svjetlosti sijeku u točki ispred mrežnice, dalekovidnost (hipermetropija) gdje se zrake svjetlosti sijeku u točki iza mrežnice i astigmatizam (oko izoštrava okomite, a ne vodoravne linije). Ako se otkriju i korigiraju na vrijeme, mogu se ispraviti u školskoj dobi.

Dalekovidnost se ispravlja nošenjem naočala ili kontaktnih leća koje nose predznak (+), a kratkovidnost naočalama ili kontaktnim lećama s predznakom (-). Astigmatizam je iskrivljeni vid što ga uzrokuje nejednaka zakrivljenost rožnice i obično prati kratkovidnost ili dalekovidnost. Najčešće je prirođen te se ne pogoršava s godinama (Banović i sur., 2007). Dalekovidna osoba mutno i nejasno vidi predmete u blizini, uočava se nesposobnost čitanja sitnog tiska, umor očiju i zamagljen vid pri dužem čitanju. Ranim otkrivanjem mogu se potpuno ili barem djelomično ukloniti štetne posljedice. Razvija se prirodnim tijekom starenja, ali je određen i genetski te se može razviti prilikom rođenja ili u kasnim godinama. Kratkovidne osobe bliske predmete vide jasno dok su im udaljeni predmeti mutni i nejasni (Banović i sur., 2007). Liječnika treba posjetiti ukoliko roditelj primijeti kako dijete neprirodno drži glavu, ima glavobolje, često zatvara jedno oko, sjedi blizu televizora, često mu oko „bježi“ te često trlja oči (Dorn, 2014). Kratkovidnost može biti urođena ili se pojaviti s vremenom. Ako se problem otkrije prije 14.g. dok su oči još u razvoju, velike su šanse za ozdravljenje (Bilić Vision, 2012).

Nakon 40. godine očne se bolesti i poremećaji vida povećavaju tri puta svakih 10 godina (Glavota, 2016). Zato je preporuka provjeriti vid barem jednom svake dvije godine. Na vid čovjeka utječe nasljeđe, ali i vanjski čimbenici, kao što su: duljina rada na računalu, boravak na svježem zraku, zračenje TV ekrana prilikom gledanja televizije, prehrana i drugo (Optometrija, 2011).

Primijetile smo da provodimo sve više vremena pred kompjuterima i mobitelima što umara oči. Da bismo skrenule pozornost naših vršnjaka na to da već sada trebaju razmišljati o tome kako zaštititi vid, osmislile smo istraživački projekt i uključile se u školski projekt o prevenciji i zaštiti zdravlja očiju koji se provodi u našoj školi u suradnji s Zavodom za javno zdravstvo "Sv. Rok" u Viroviticima.

Cilj je istraživanja ispitati pojavu poremećaja refrakcije oka kod učenika petih i osmih razreda naše škole provjerom vidne oštine i usporediti dobivene podatke s podacima sa sistematskih pregleda te prenijeti vršnjacima i roditeljima naše spoznaje i znanja o važnosti i zaštiti vida, izvršiti usporedbu broja učenika u osmim razredima koji imaju poremećaje refrakcije oka sa brojem istih učenika prije četiri godine te prikupiti podatke među svim ispitanicima o životnim navikama i ispitati njihov stav prema osobama koje nose naočale.

Postavile smo istraživačka pitanja. Kolika je zastupljenosti učenika u petom i osmom razredu koji već nose naočale ili leće, imaju već registriran poremećaj refrakcije oka ove školske godine? Koliko je među njima kratkovidnih, dalekovidnih učenika i učenika s astigmatizmom, te slabovidnih osoba? Ima li u njihovim obiteljima ima sličnih teškoća s vidom? Koliko je učenika osmih razreda popravilo vid tijekom zadnje četiri godine i nose li redovito naočale?



Kakve stavove učenici imaju prema osobama koje nose optička pomagala? Kako vrijeme provedeno gledajući u razne ekrane i prehrana siromašna voćem i povrćem utječu na pojavu poremećaja refrakcije oka i smanjenje vidne oštine?

Pretpostavile smo da je više učenika s poremećajem vidne oštine u osmom razredu nego u petom razredu jer su manje puta bili na pregledu očiju tijekom školovanja. Ukoliko redovito nose naočale ili leće duže vrijeme, broj kratkovidnih učenika biti će manji u osmom razredu u odnosu njihov broj prije četiri godine, u petom razredu. Zastupljenost dalekovidnih učenika ne ovisi o dobi i vremenu nošenja optičkih pomagala. Stav prema nošenju leća i naočala je kod većine pozitivan, s obzirom da se trendovi mijenjaju i naočale postaju modni dodatak, a leće se i ne vide. Veća je zastupljenost pojave poremećaja refrakcije oka i smanjene oštine vida kod učenika koji dnevno provedu najmanje tri do pet sati ispred monitora i rijetko konzumiraju voće i povrće nego kod učenika koji manje vremena provedu ispred monitora i redovito uzimaju voće i povrće.

METODE RADA

Istraživanje je provedeno od rujna 2016. godine do prosinca 2016. godine. Nakon što je odabrana tema, proučena je dostupna literatura o poremećajima oštine vida i pojavi poremećaja refrakcije oka (Bastić i sur., 2014; Behetić i Duh, 2013; Bilić Vision 2012) i načinjen je plan istraživanja. Odabrani su učenici ispitanici, zatim je načinjen upitnik od 14 pitanja pod nazivom "Naše navike i zdravlje očiju" (vidi prilog 1) i letak sa savjetima kako štititi zdravlje očiju (vidi prilog 2). Učenici su ispunili upitnik i provedeno je testiranje oštine vida.

Uzorak

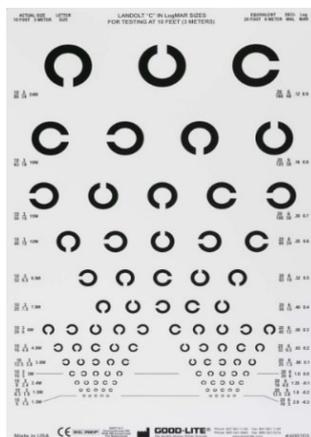
Istraživanjem je obuhvaćeno 109 učenika petih razreda rođenih 2005. i 2006. godine te 96 učenika osmih razreda rođenih 2002. i 2003. godine naše škole. Svi su učenici najprije bili obaviješteni o temi i sadržaju istraživanja te su dobrovoljno pristupili istraživanju. Prilikom obrade podataka njihova imena su naznačena inicijalima. Istraživanje je provedeno kao dio aktivnosti učenika u građanskom i zdravstvenom odgoju gdje se promovira zaštita vida i potiče pozitivan odnos prema osobama koje su različite.

Testiranje vidne oštine učenika

Na temelju proučenih literaturnih podataka i razgovora sa školskom liječnicom dr. Slavicom Ramljak Letica te školskom psihologinjom prof. Sanjom Milković Šipek sastavljen je upitnik pod nazivom "Naše navike i zdravlje očiju". Na početku upitnika učenici ispunjavaju pitanja otvorenog tipa (godina rođenja, spol i razred, nose li naočale ili leće) te kasnije odgovaraju na pitanja zatvorenog tipa gdje se odlučuju i zaokružuju samo jedan izbor u ponuđenim odgovorima (vrijeme provedeno u gledanju u ekrane, navike u prehrani i stav o nošenju naočala). Upitnik je proveden tijekom satova prirode i biologije ili SRZ- a, uvijek na isti način s istim uputama.

Prema podacima iz upitnika ispitanici su svrstani u četiri skupine: AMETROPI u petom i osmom razredu, tj. učenici koji koriste optička pomagala (naočale i leće) kod učenja (označeni kao A5 i A8 skupina) i EMETROPI u petom i osmom razredu, tj. učenici koji ne koriste optička pomagala kod učenja (označeni kao E5 i E8 skupina).

Testiranje vidne oštine (visusa) na daljinu, blizinu i astigmatizam provedeno je najprije kod učenika skupine E5 i E8 (učenika petog i osmog razreda koji ne nose naočale i leće). Nakon toga ispitani su i učenici osmog razreda koji nose naočale ili leće od petog razreda. Prvo je ispitan vid na daljinu posebno za svako oko i za oba oka pomoću optotipa. Ispitanici su stajali na udaljenosti od 6 metara i raspoznavali razliku u oznaci na tzv. Landoltovu prstenu (slika 1) koji je na različitim mjestima prekinut i okrenut lijevo, desno, gore ili dolje.



Slika 1 Optotip s Landoltovim prstenu (izvor: Medvedov, 2013)

Kako je to subjektivno određivanja refrakcije, ispitnici su najmanje tri puta ponovili čitanje znakova. U tablicu je upisana vrijednost visusa izražena decimalnim brojem koji se nalazi na optotipu i označava liniju s najmanjim oznakama koje ispitanik može pročitati. Uzimana je vrijednost testa koja je bila češće iskazana. Vidna oština (visus) izračunava se po formuli:

$$V=d/D$$

gdje je V =vidna oština, d =udaljenost s koje se vrši ispitivanje i D =udaljenost s koje normalno oko još raspoznaje slovo zadane veličine.

Primjer: ako ispitanik može pročitati slova u retku s oznakom 12 na udaljenosti od 6 m, znači da normalno oko ta ista slova može pročitati s 12 m, pa je njegova vidna oština $V=6/12=0,5$.

Za provjeru oštine vida na blizinu ispitnici su čitali tekst različite veličine slova i pri tome su određivali udaljenost s koje vide određeni tekst. Pri tom su pokrili rukom prvo jedno pa drugo oko. Upisivani su podaci o udaljenosti i vrijednosti vidne oštine izražene decimalnim brojem za svakog ispitanika. Ispitanici su testirani imaju li astigmatizam tako što su gledali slike na posteru s crnim i bijelim različito položenim linijama te su trebali odrediti jesu li sve linije crne i bijele jednake i ravne ma kako ih pomicali i gledali. Ako su se pojavila zadebljanja ili je boja bila drugačija, to je moglo značiti da imaju astigmatizam. Takav rezultat testa u tablici je označen oznakom + za astigmatizam. Učenici kod kojih je uočen problem s oštrinom vida grupirani su prema određenoj vrijednosti vidne oštine visusa. Onima koji su imali veći postotak smanjenja oštine vida savjetovano je da odu na pregled kod očnog liječnika. Svim učenicima koji su sudjelovali u ispitivanju podijeljen je letak sa savjetima kako zaštititi osjetilo vida (prilog 2).

Analiza podataka

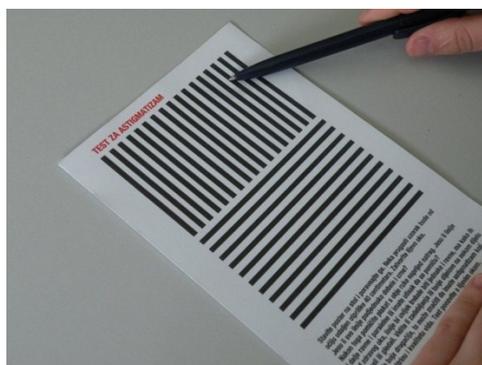
Podaci su statistički obrađeni. Pri radu su korišteni računalno i program za statističku obradu Excel 2010. Prikupljeni su podaci o poremećajima refrakcije oka za učenike naše škole i drugih škola sa sistematskih pregleda u školskoj ambulanti u Virovitici. Uspoređeni su dobiveni podaci za učenike petih i osmih razreda za ovu školsku godinu, zatim podaci o učenicima iz osmog razreda sada i kad su bili u petom razredu. Podaci iz upitnika o suvremenim životnim navikama i prehrani analizirani su kod učenika kod kojih je uočen problem s oštrinom vida i kod učenika s optičkim pomagala. Sređivanjem su podaci svrstani u odgovarajuće kategorije (npr. učenici koji nose i ne nose naočale) i potkategorije (npr. vide dobro ili ne vide dobro na jedno ili na oba oka). Izračunati su udjeli tih učenika u postotcima i prikazani u tablicama i grafički zbog preglednosti i iščitavanja rezultata. Nakon toga su izvedeni zaključci.

REZULTATI

Rezultati rada prikazani su opisno, fotografijama, tablicama i grafički. Istraživanju pojave poremećaja refrakcije oka u školi pristupilo je 215 učenika (109 učenika petih razreda i 96 učenika osmih razreda), od toga je 90 djevojčica. Provedeno je u učionicama naše škole tijekom satova razredne zajednice, prirode i biologije (slika 2 i slika 3).



Slika 2 Provjera oštine vida u 8.c



Slika 3 Prikaz testa za astigmatizam

Većina učenika petih i osmih razreda su emetropi i nemaju registrirani poremećaj refrakcije oka (190 učenika, 88,38 %) i ne nose pomagala ili leće, dok manji broj učenika (25 učenika, 11,62%) nose naočale ili leće, znači oni su registrirani ametropi. Nešto je manja zastupljenost takvih poremećaja kod učenika petih razreda, starosti od 10 do 11 godina (10,09%), nego kod učenika osmih razreda, starosti 14 i 15 godina (14,58 %).

Tablica 1 Zastupljenost učenika koji nose optička pomagala u školi u šk.2016./2017.god.

Učenici šk. 2016./2017.god.	nose pomagala (ametropi)		ne nose pomagala (emetropi)	
	broj	%	broj	%
peti razred	11	10,09	98	89,91
osmi razred	14	14,58	82	85,42

Većina ametropnih učenika petih razreda počinje nositi optička pomagala nakon pregleda očiju i odlaska oftalmologu prilikom upisa u prvi razred osnovne škole. Ti učenici su bili na ispitivanju vidne oštine (screening vida) u trećem razredu, no nisu imali prvi pregled do četvrte godine života. Od njih samo jedna učenica već od pete godine nosi naočale. Bar jedan član njihovih obitelji (roditelj, brat ili

sestra, djed) nosi naočale. Dvojica dječaka koji redovito nose naočale su slabovidni (1,83% u odnosu na ukupnu broj ispitanika, a 7% od ukupnog broja registriranih ametropa).

Većina ametropnih učenika osmih razreda počinje nositi optička pomagala nakon pregleda vidne oštine i odlaska oftalmologu u petom razredu osnovne škole, vjerojatno jer prije nisu imali izražene teškoće. Članovi njihovih obitelji uglavnom ne nose naočale. Slabovidan na jedno oko jedan je dječak i redovito nosi naočale. Kao uzrok tome navodi da je s time rođen zbog oštećenja vidnog živca. Ostalih dvoje učenika, dječak i djevojčica, uz slabovidnost na jednom oku imaju i dalekovidnost, odnosno kratkovidnost na drugom oku. Redovito nose naočale. Slabovidnost im je otkrivena u prvom razredu osnovne škole. Sada s naočalama bolje vide.

Analizirani su podaci za sadašnje učenike osmih razreda kad su bili u petom razredu, prije četiri godine (dobiveni od školske liječnice za ametropne učenike) za školsku godinu 2013./2014. (tablica 2). To je generacija učenika koji nisu bili na ispitivanju vidne oštine (screening vida) u trećem razredu, niti na pregledima nakon četvrte godine života.

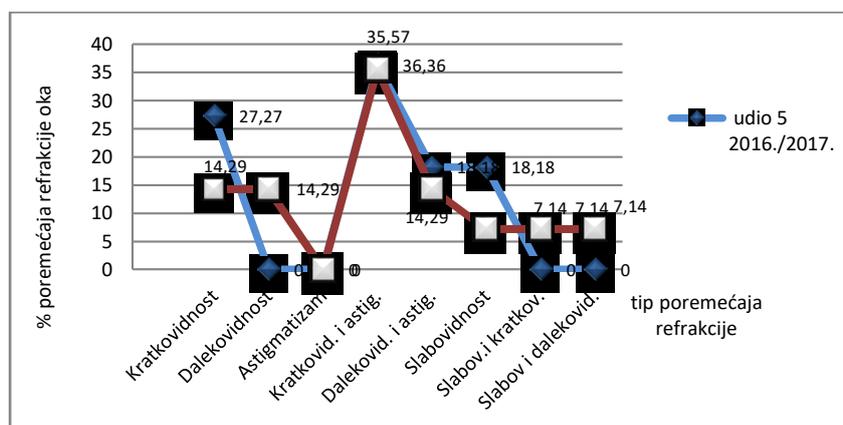
Tablica 2 Usporedba podataka za učenike osmih razreda sada i prije četiri godine

Učenici osmih razreda generacija 2005. i 2006. god.	nose optička pomagala		ne nose optička pomagala	
	broj učenika	%	broj učenika	%
stanje šk.2012./2013.god.	16	16,67	80	83,33
stanje šk.2016./2017.god.	14	14,58	82	85,42

Možemo zapaziti da dva učenika osmih razreda (2,09%) koja su bila kratkovidna danas ne nose optička pomagala, a nosila su ih prije četiri godine.

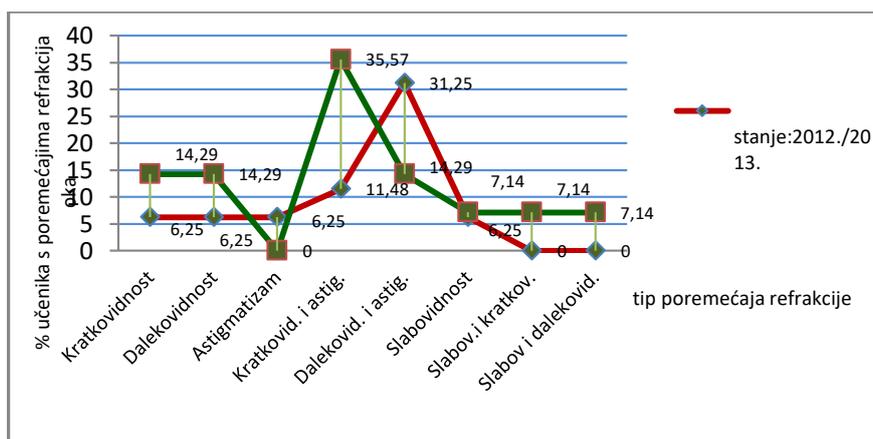
Rezultati procjene poremećaja refrakcije oka kod registriranih ametropa

Učenici petih i osmih razreda koji nose optička pomagala (naočale ili leće) i imaju poremećaj refrakcije oka ispunjavali su u upitniku (prilog 2) podatke o vrsti (tipu) poremećaja refrakcije oka. Dobiveni podaci iz upitnika obrađeni su i uspoređeni s podacima sa sistematskih pregleda tih učenika kod liječnice školske medicine (slika 4).



Slika 4 Usporedba pojave poremećaja refrakcije oka kod učenika petih i osmih razreda ove školske godine

Kod svih ispitanika najviše je zastupljena kratkovidnost koju prati i astigmatizam. Kod učenika petih razreda kratkovidnih osoba je 27,27%, a kratkovidnih s astigmatizmom 36,36% dok je kod učenika osmih razreda kratkovidnih osoba nešto manje (14,29%), a skoro isti broj kratkovidnih učenika s astigmatizmom (35,57%). Slabovidnost, ponekad uz pojavu kratkovidnosti i dalekovidnosti, javlja se kod učenika u obje generacije (do 2 %). Zastupljenija je dalekovidnost s astigmatizmom ili bez njega kod učenika osmih razreda (28%) nego kod učenika petih razreda (18,18%). Podaci za učenike osmih razreda sa sistematskog pregleda u petom razredu uspoređeni su s ovogodišnjim podacima i analizirani (slika 5).



Slika 5. Usporedba pojave poremećaja refrakcije oka kod učenika osmih razreda (u periodu od 2012. do 2016. godine)

Možemo zapaziti da se u odnosu na period od četiri godine smanjio udio učenika s astigmatizmom i udio kratkovidnih učenika (6,25%), a povećao udio dalekovidnih učenika s astigmatizmom (31,25%). Kod dvoje učenika osmih razreda ove školske godine zabilježena je uz slabovidnost i kratkovidnost i dalekovidnost koja prije nije uočena.

Sadašnji učenici petih razreda ranije su krenuli i bili više puta na testiranju vida (screening vida) nego sadašnji učenici osmih razreda. Oni su bolje informirani o potrebi zaštite vida i zdravije se hrane, no ipak je kod njih već sada pojava kratkovidnosti veća nego kod učenika osmih razreda sada i kad su oni bili u petom razredu. Dobiveni podaci osmih razreda naše škole uspoređeni su s podacima za učenike osmih razreda u OŠ Gradina prema podacima sa sistematskih pregleda kod dr. Slavice Ramljak Letica, školske liječnice (tablica 3).

Tablica 3 Usporedba podataka o tipu poremećaja refrakcije oka za osme razrede naše škole i OŠ Gradina (izvor: podaci iz šk. ambulante)

Tip poremećaja refrakcije oka	OŠ IBM VT (%)	OŠ Gradina (%)
Kratkovidnost	14	0
Dalekovidnost	14	50
Astigmatizam	0	0
Kratkovidnost i astigmatizam	35	50
Dalekovidnost i astigmatizam	14	0
Slabovidnost	7	0
Slabovidnost i kratkovidnost	7	0
Slabovidnost i dalekovidnost	7	0

Vidljive su razlike u zastupljenosti tipa poremećaja refrakcije oka. U OŠ Gradina samo 4 učenika od 34 učenika osmih razreda nosi naočale te su kratkovidni i dalekovidni s astigmatizmom. Kod 14 učenika naše škole s registriranim poremećajem refrakcije oka koji nose naočale zastupljeni su gotovo svi tipovi poremećaja refrakcije oka. Prevladavaju kratkovidni učenici, tzv. miopi.

Rezultati procjene vidne oštine ispitivanih učenika

Nakon što su svi učenici pristupili ispitivanju oštine vida prema testu na daljinu i blizinu i testu za astigmatizam analizirana je vidna oština učenika prema tome nose li ili ne optička pomagala (tablica 4). Izdvojeni su učenici s dobrom vidnom oštrinom (V do 1.0) i oni s problemima kod čitanja, sa smanjenom vidnom oštrinom (za V do 0,8 i za V ispod 0,8). Dobiveni podaci ispitivanjem vidne oštine na daljinu i blizinu u školi ukazuju na manje odstupanje od podataka dobivenih na sistematskim pregledima kod ispitanika (tablica 4). Postoje razlike kod obje grupe učenika. Registrirani ametropi vide dobro (osim jednog učenika) kad nose naočale ili leće. Veći je udio učenika s poremećajima kod učenika obje generacije koji ne vide jasno na jedno ili oba oka na daljinu ili na blizinu (tablica 4). Nema razlike u odgovorima na pitanja u upitniku kod ametropnih i emetropnih ispitanika.

Tablica 4 Podaci dobiveni ispitivanjem vidne oštine na daljinu i blizinu kod učenika petih i osmih razreda u šk. 2016./2017. god.

Učenici-test vidne oštine		Učenici peti razredi		Učenici osmi razredi	
		na daljinu	na blizinu	na daljinu	na blizinu
učenici nose pomagala	vide dobro na oba oka	8,25%	10,09%	14,58%	14,58%
	ne vide dobro na oba oka	0%	0%	0%	0%
	ne vide dobro na jedno oko	1,84%	0%	0%	0%
učenici ne nose pomagala	vide dobro na oba oka	84,41%	87,15%	82,30%	81,26%
	ne vide dobro na oba oka do 0.8	0%	0%	0%	0%
	ne vide dobro na oba oka ispod 0.8	1,84%	0%	0%	1,04%
	ne vide dobro na jedno oko do 0.8	0%	1,84%	2,08%	1,04%
	ne vide dobro na jedno oko ispod 0.8	3,66%	0,92%	1,04%	2,08%

Oni koji nose naočale ili leće sebe doživljavaju pozitivno. Isti podaci su analizirani za test na astigmatizam (tablica 5). Taj test je prilično subjektivan i kad je bio pozitivan učenicima je rečeno da bi trebali otići na provjeru vida kod oftalmologa bez obzira što dobro vide.

Tablica 5. Podaci dobiveni ispitivanja moguće pojave astigmatizma učenika petih i osmih razreda u šk.2016./2017. god.

Učenici test na pojavu astigmatizma		učenici peti razredi	učenici osmi razredi
nose pomagala	vide dobro na oba oka	8,26%	13,54%
	ne vide dobro na jedno oko	1,83%	1,04%
	ne vide dobro na oba oka	0%	0%
ne nose pomagala	vide dobro na oba oka	76,16%	68,76%
	ne vide dobro na jedno oko	3,66%	10,41%
	ne vide dobro na oba	10,09%	6,25%

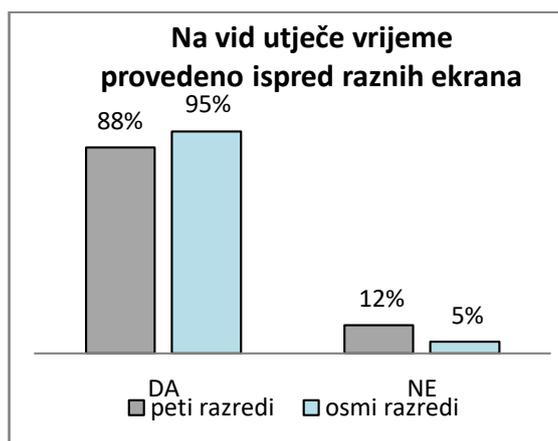
Udio učenika s pojavom astigmatizma veći je među učenicima koji ne nose naočale ili leće. Kreće se od 3,66% do 10,41%. U odnosu na podatke dobivene anketom i od školske liječnice nešto je veći udio ametropa jer nisu registrirani i ne nose naočale, budući da nisu bili kod oftalmologa, iako lošije vide.

Rezultati obrade podataka za pitanja iz upitnika o životnim navikama

Odgovori učenika na pitanja iz upitnika o životnim navikama o tome koliko vremena provode gledajući u različite ekrane i kako se hrane te njihov stav o osobama koje nose naočale uspoređeni su i detaljnije prikazani u tablicama u prilogu 3. Da bismo dobili dojam koje životne navike učenici imaju i kako se prema njima odnose, prikazani su analizirani odgovori za obje generacije, učenike petih i učenike osmih razreda ove školske godine.

Analiza odgovora za korištenje monitora

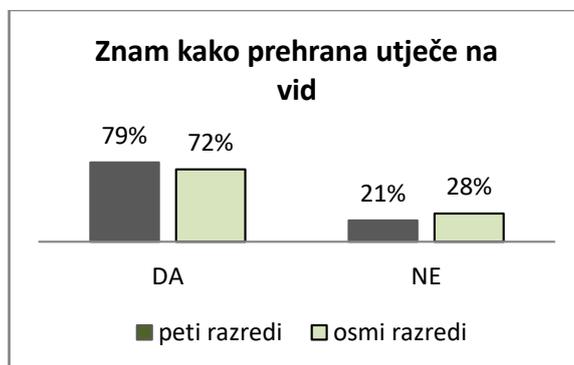
Učenici obje generacije (slika 6) smatraju da na vid utječe vrijeme provedeno ispred monitora. Učenici petih razreda provode manje od sat vremena na mobitelu (40%), dok učenici osmih razreda provode tri do pet sati dnevno (42%) na mobitelu (vidi tablicu u prilogu 3). Jedni i drugi većinom ne koriste tablete (peti, 54%, osmi, 66%), a TV gledaju 1 do 3 sata dnevno (do 73%).



Slika 6 Stav učenika o znanju utjecaja upotrebe monitora na vid

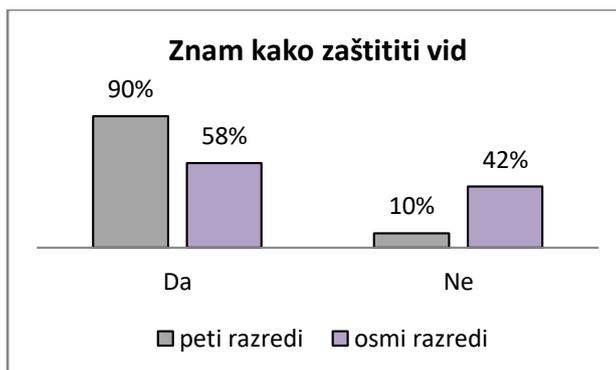
Analiza odgovora za prehrambene navike učenika

Učenici obje generacije smatraju da znaju kako prehrana utječe na vid (slika 7).



Slika 7 Stav učenika o znanju kako prehrana utječe na vid

Učenici obje generacije jedu voće bar jednom tjedno (vidi tablicu u prilogu 3), a svaki dan više učenici petih razreda (46%) nego učenici osmih razreda (27%). Učenici petih razreda češće jedu povrće (zeleno lisnato i mrkvu) nego učenici osmih razreda, a ribu u prehrani uzimaju učenici obje generacije bar jednom tjedno (46% učenici petih i 67% učenici osmih razreda).



Slika 8 Stav učenika o znanju kako zaštititi vid

Vidljive su razlike u odgovorima na pitanje znaju li kako zaštititi vid (slika 8). Učenici petih razreda smatraju da više znaju o tome kako zaštititi svoj vid od starijih učenika u osmom razredu.

Analiza odgovora o stavu prema osobama koje nose naočale ili leće

Učenici petih razreda smatraju da su im osobe koje nose naočale ili leće najviše pouzdane i maštovite, a osmih razreda nemaju izražen stav o tome, iako nešto više smatraju da su takve osobe pametnije i maštovitije. Oko 30 % učenika obje generacije smatra da su manje točne tvrdnje da su osobe koje nose naočale ili leće pametnije, pouzdanije, sramežljivije, fizički privlačnije, maštovitije i popularnije od drugih.

RASPRAVA

Naši podaci dobiveni ispitivanjem pojave poremećaja refrakcije oka prvi su obrađeni podaci u našoj školi i županiji. Za potrebe prevencije u županiji se prikazuju samo zbirni podaci. Planiramo proširiti naše istraživanje i uključiti i druge učenike u školi te se tada nadamo da ćemo i to moći provesti i dobiti što točnije podatke o odnosima koje istražujemo. Ukupan broj učenika koji nose naočale i imaju poremećaj refrakcije uglavnom se podudara s podacima dobivenim na sistematskim pregledima u školskoj ambulanti u Virovitici. No, kod učenika koji ne nose naočale zabilježeno je nekoliko učenika u osmim razredima koji jako slabo vide, a nisu evidentirani u registru. Iz razgovora s njima saznali smo da ne žele nositi naočale jer im to kvari imidž i nisu išli kod oftalmologa. Zato oni nisu evidentirani, tj. registrirani kao emetropi.

Naše podatke u školi usporedili smo s podacima za učenike osmih razreda OŠ Gradina gdje je kolegica Danijela Palatinuš, prof. kemije i biologije, provela test vidne oštine, a podatke su obradili nakon što smo ih dobili kod školske liječnice. Vidljive su razlike u zastupljenosti tipa poremećaja refrakcije u obje škole. Nemaju uopće slabovidnih učenika, no kratkovidnost i dalekovidnost pojavljuju se kod upola manjeg broja učenika (8,82%).

Kratkovidnost se kod djece pogoršava dok ne prestanu rasti, može biti nasljedna, ali se i razviti zbog pogrešnih navika i tijekom školovanja (Optometrija, 2012). Može se izliječiti ako se na vrijeme otkrije i do kraja puberteta većina učenika ima manju dioptriju ili uopće ne nosi naočale (Bilić Vision, 2012). Dvoje naših kratkovidnih učenika osmog razreda počeli su nositi naočale u petom i sada ih ne trebaju nositi. No, većina kratkovidnih učenika ne nosi redovito naočale i previše vremena provodi koristeći mobitele iako znaju da to nije dobro za oči. Slabovidnost ili ambliopiju važno je registrirati što ranije



(Bušić, 2013), do 4 godine života i tada se uspješno liječi jer se još nije do kraja razvilo vidni korteks u velikom mozgu. U Švedskoj su oko 90% slabovidnih osoba registriranih od 1970. godine uspjeli izliječiti do njihove 24. godine (Bušić, 2013). Kod nas se tek nedavno uvodi screenig vida u vrtiće, ali samo uz pristanak roditelja. Naši slabovidni učenici redovito nose naočale od prvog osnovne kada su bili na sistematskom pregledu i zdravo se hrane i ne pretjeruju u gledanju u razne ekrane. Smatra se da je slabovidno oko 5% građana od ukupnog stanovništva Republike Hrvatske (Bušić, 2013). U našoj se školi ona javlja kod 2% učenika, što odgovara tom prosjeku. O astigmatizmu naši učenici malo znaju. I mi smo radeći ovaj rad više naučile. Naši podaci dobiveni testom oštrinom vida ukazuju da je mnogo više učenika koji ga imaju nego što je na pregledima zabilježeno. No, kako smo taj test provodile samo u ove godine, ne možemo sa sigurnošću zaključiti da ti učenici i imaju stvarno problema s tim poremećajem, tim više što se uglavnom nasljeđuje i ne može popraviti nošenjem naočala (Bilić Vision, 2012, Optometrija, 2012), stoga bi ti učenici trebali otići na pregled kod očnog liječnika. Naši učenici i roditelji ne vole ići na preglede vida jer se dugo čeka i naočale su skupe, a djecu je teško uvjeriti da ih redovito nose. Smatramo da ćemo našim istraživanjem i nakon toga edukacijom u razredima gdje smo provele istraživanje potaknuti učenike da se zamisle i pokušaju promijeniti svoje navike i redovito odlaze na preglede ako uoče poteškoće s vidom. Osim toga smo na internetskim stranicama pronašle brojne savjete i upute za provjere oštrine vida (Bilić Vision, 2012; Medvedov, 2014; Optometrija, 2011). Propisano je Zakonom o zdravstvenoj zaštiti i Planom i programom mjera zdravstvene zaštite iz obveznog zdravstvenog osiguranja još od 2006. godine da se djeca trebaju ciljano pregledati kod očnog liječnika (Narodne novine, 2006). U Zakonu o zdravstvenoj zaštiti (Narodne novine, 2016) vid se pregledava u prvom, petom i osmom razredu, a screenig na raspoznavanje boja i vidne oštrine u trećem razredu osnovne škole. Naši učenici osmog razreda nisu u to vrijeme bili pregledani u trećem razredu dok mlađi učenici petog razreda jesu. Zbog toga je kod njih ustanovljeno više tipova poremećaja refrakcije nego kod prethodnih učenika. Važno je prepoznati što ranije kod djece slabovidnost i dalekovidnost još u predškolskoj dobi (Bilić Vision, 2012), jer ako se dalekovidnost ne liječi dovodi do gledanja u križ i slabovidnosti.

Učenici kod učenja koriste računala i to im pomaže, no s druge strane im to šteti vidu (Otopometrija, 2011). Zato trebaju znati stati i odmoriti oči. Naši savjeti im u tome pomažu. Učenici su se tijekom našeg rada u razredu aktivno uključili i pomagali nam u obradi podataka za svoj razred, no pojedini su roditelji postavljali dodatna pitanja razrednicima i nisu baš bili za to da im djeca sudjeluju. No, kad su vidjeli da to nije ništa "opasno", reagirali su pozitivno.

ZAKLJUČCI

Tijekom svojih istraživanja došli smo do slijedećih zaključaka:

- ✔ Naši podaci uglavnom se podudaraju s podacima sa sistematskih pregleda.
- ✔ Preventivni pregledi vida i redovito nošenje naočala pridonose smanjenju pojave poremećaja refrakcije oka kod učenika naše škole. Pojava astigmatizma i dalekovidnosti se otkrivaju ranije nego prije četiri godine.
- ✔ Nema velike razlike danas u broju učenika obje generacije koji nose optička pomagala. Više je takvih učenika osmog razreda bilo prije četiri godine.
- ✔ Kratkovidnost s ili bez astigmatizma više je zastupljena kod učenika obje generacije od dalekovidnosti. U svakoj generaciji ima slabovidnih učenika.



- Većina učenika zdravo se hrani i oko sat vremena dnevno provedu koristeći mobitele. Imaju pozitivan stav prema osobama koje nose naočale.

Ovim istraživanjem potaknule smo učenike naše škole na zaštitu vida, pogotovo učenike osmih razreda.

ZAHVALA

Zahvaljujemo dr. Slavici Ramljak Letici, liječnici u ambulanti školske medicine na korisnim savjetima tijekom rada na našem projektu, psihologinji Sanji Milković Šipek, prof. za pomoć kod provođenja testiranja u školi i profesorici hrvatskog jezika Sanji Pavelko, prof., na pomoći kod lekture teksta.

LITERATURA

- Banovic A., Buljan I., Petrač T. 2007. Biologija čovjeka - udžbenik za osmi razred osnovne škole. Profil international d.d., Zagreb, str. 74-76.
- Bastić M., Begić V., Novoselić D., Popović M. 2014. Biologija 8 udžbenik iz biologije za osmi razred osnovne škole. Alfa, Zagreb, str. 83-87.
- Behetić Đ., Duh Đ. 2013. Refraktivne greške (greške loma) U Rakočević M.(ur.) Pristup i zbrinjavanje bolesnika s poremećajima vida i bolestima oka, Grafički Zavod Hrvatska, Zagreb, str.97-114.
- Bilić Vision, 2012. Greške oka. Poliklinika za oftamologiju i ortopediju, http://www.roditelji.hr/greške_oka, pristupljeno 15. prosinca 2016. godine
- Bušić N. 2013. Zdravlje očiju. Moje zdravlje, broj 14, Zagreb, str.20.-23.
- Dorn LJ., 2004. Vidna oštrina u male djece. Paediatr Croat; 48 (Supl 1): 247-254.
- Glavota V. 2016. Čuvajmo svoje oči. [http://www.vasezdravlje.com/printable/izdranje\(2079/1\)](http://www.vasezdravlje.com/printable/izdranje(2079/1)), pristupljeno 2. prosinca 2016. godine
- Medvedov, V. 2012. Kako popraviti vid prirodnim metodama uz posebne vježbe za oči, <http://www.pogledbeznaocala/blog/vidna-tabla-za-testiranje-vida/>, pristupljeno 2. prosinca 2016. godin.
- Medvedov, V. 2013. Optotip: Vidne table za testiranje vida, <http://www.pogledbeznaocala/blog/vidna-tabla-za-testiranje-vida/>, pristupljeno 14.rujna 2016.godine
- Narodne novine, 2006: Plan i program mjera zdravstvene zaštite iz obveznog zdravstvenog osiguranja http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2006_11_126_2779.html, pristupljeno 15. prosinca 2016. godine
- Narodne novine, 2016. Zakon o zdravstvenoj zaštiti (NN 150/08, 71/10, 139/10, 22/11, 84/11, 154/11, 12/12, 35/12, 70/12, 144/12, 82/13, 159/13, 22/14, 154/14, 70/16), <https://www.zakon.hr/z/190/Zakon-o-zdravstvenoj-zaštiti/>, pristupljeno 15. prosinca 2016. godine
- Optika Monokl, 2013. Dalekovidnost kod djece. Optika Monokl, <http://www.monokl.hr>, pristupljeno 2.prosinca 2016. godine
- Optometrija, 2011. Djeca, računala i vid. Optika Monokl,<http://www.optometrija.net>, pristupljeno 12.prosinca 2016. godine
- Optometrija, 2012. Očne pogreške kod djece. Optometrija net,, <http://www.optometrija.net>, pristupljeno 2.prosinca 2016. godine
- Repac V., Vlatković Z., Stanimirov B., Antić I. 2012.Refrakcione mane kao uzrok glavobolja dece školskog uzrasta. Timočki medicinski glasnik, 37: 4.

PRILOZI

Prilog 1 Letak Živi zdravo - čuvaj zdravlje očiju

Živi zdravo – čuvaj zdravlje očiju!



Znate li:

- da je 13.10. Svjetski dan vida
- da 80% informacija dobivamo osjetilom vida
- da na zdravlje očiju trebate misliti svaki dan

Savjetujemo vam da:

- svaku godinu provjerite vidnu oštrinu, testom koji smo vam pokazali ili kod stručnjaka
- osim mrkve jedite ribu i više lisnatog zelenog povrća (salatu, špinati i dr.)
- voće kao što su borovnice, trešnje, agrumi jedite svaki dan
- redovito vježbajte i omogućite očima dobru cirkulaciju i dotok kisika

ODMORITE OČI! 

Svakih 20 minuta usmjerite pogled prema predmetu udaljenom oko 6 metara i zadržite ga bar 20 sekundi.

NOSITE REDOVITO NAOČALE ILI LEĆE.

 **Kontrolirajte vid!**

**Prilog 1 Upitnik: Naše navike i zdravlje očiju**

Dragi učenici!

U našoj školi provodimo kampanju zaštite zdravlja očiju kao dio građanskog i zdravstvenog odgoja. Željele bismo da nam pomognete u našem istraživanju. Rezultate istraživanja prezentirat ćemo vam nakon što obradimo podatke na Svjetski dan zdravlja, 7. travnja. Hvala na suradnji!

Upiši podatke:

1. Ime i prezime: _____ razred: _____

2. Datum rođenja: _____

3. Trebao bih nositi naočale, ali ih nosim samo ponekad ili ih uopće ne nosim.

DA NE

Ako nosiš naočale ili leće upiši podatke, a ako ne prijeđi na pitanja broj 8.

4. Nosim: (zaokruži samo jedan odgovor)

a) Naočale

b) Leće

c) Oboje, ali izvan kuće češće leće

d) Oboje, ali izvan kuće češće naočale

5. Koliko godina si imao kada si počeo nositi naočale?

6. Naočale ili leće nosim jer: (možeš zaokružiti više odgovora)

a) Kratkovidan sam

b) Dalekovidan sam

c) Imam astigmatizam

d) Nešto drugo _____

7. U mojoj obitelji naočale nose:

a) samo jedan roditelj

b) oba roditelja

c) drugi članovi obitelji _____ (upiši koji)

d) nitko ne nose naočale osim mene

8. U slijedećim pitanjima stavi oznaku x kod odgovora koji najbolje opisuje koliko na dan koristiš neki od navedenih uređaja:

Provodim dnevno	0 sati, ne koristim	manje od 1 sat	1-3 sata	3-5 sati	više od 5 sati
Za računalom provodim					
Na tabletu ili play stationu provodim					
Mobitel koristim					
TV gledam					

9. U slijedećim pitanjima stavi oznaku x kod odgovora koji najbolje opisuje koliko često jedeš koju vrstu hrane:

Konzumacija	Ne jedem	Jedem bar jednom tjedno	Jedem 2-3 puta tjedno	Jedem 3-5 puta tjedno	Jedem svaki dan
Zeleno lisnato povrće (kelj, špinat,					
Ribu (skuša, tuna, srdela)					
Mrkvu					
Voće (agrumi, marelice, bobičasto					

10. Zaokruži odgovor s kojim se najviše slažeš. Mislim da su osobe koje nose naočale ili leće:

Stav	Uopće nije točno	Uglavnom netočno	Nisam siguran	Uglavnom	Da, točno je
Pametne	1	2	3	4	5
Pouzdana	1	2	3	4	5
Sramežljive	1	2	3	4	5
Fizički privlačne	1	2	3	4	5
Maštovite	1	2	3	4	5
Popularne	1	2	3	4	5

11. Misliš li da na kvalitetu tvog vida može utjecati hrana koju jedeš? DA NE

12. Misliš li da na tvoj vid može utjecati vrijeme provedeno ispred nekog ekrana? DA NE

13. Znaš li na koje načine možeš zaštititi svoj vid? DA NE

14. Ako si odgovorio DA, navedi neke načine na koje možeš zaštititi svoj vid.

HVALA NA SUDJELOVANJU!



Prilog 3 Podaci iz upitnika

Usporedba odgovora učenika petih i osmih razreda na pitanje: Koliko na dan koristiš navedene uređaje?										
Provodim dnevno	0 sati, ne koristim (%)		manje od 1 sat (%)		1-3 sata (%)		3-5 sati (%)		više od 5 sati (%)	
	peti	osmi	peti	osmi	peti	osmi	peti	osmi	peti	osmi
Za računalom	22	22	38	29	32	25	7	17	1	7
Na tabletu ili play stationu	54	66	31	18	12	11	2	5	3	0
Mobitel	6	2	40	7	39	31	6	42	9	18
TV gledam	6	2	35	36	46	33	12	9	1	20

Usporedba načina prehrane učenika petih i osmih razreda na pitanje: Koliko često jedeš koju vrstu hrane?										
Konzumacija	Ne jedem (%)		Bar jednom tjedno (%)		2-3 puta tjedno (%)		3-5 puta tjedno (%)		svaki dan (%)	
	peti	osmi	peti	osmi	peti	osmi	peti	osmi	peti	osmi
Zeleno lisnato povrće	10	16	42	35	29	31	14	13	6	5
Ribu (skuša, tuna, srdela)	23	20	46	67	29	9	2	4	0	0
Mrkvu	13	13	23	33	22	18	19	23	23	13
Voće (agrumi, grožđe i dr.)	4	0	6	13	16	35	28	25	32	27

Usporedba stavova učenika petih i osmih razreda na pitanje: Mislim da su osobe koje nose naočale ili leće.										
Stav	Uopće nije točno 1 (%)		Uglavnom netočno 2 (%)		Nisam siguran 3 (%)		Uglavnom točno 4 (%)		Da, potpuno je točno 5 (%)	
	peti	osmi	peti	osmi	peti	osmi	peti	osmi	peti	osmi
Pametne	4	18	7	7	46	46	26	24	17	5
Pouzdana	7	11	4	13	39	49	23	18	27	9
Sramežljive	20	26	24	15	30	46	16	13	10	0
Fizički privlačne	15	14	14	11	45	40	23	28	3	7
Maštovite	5	11	9	7	28	44	34	27	25	11
Popularne	17	11	11	14	25	53	2	18	15	4

FLORA I FAUNA LIŽNJANSKOG AKVATORIJA

Nika Agostelli, 8. razred

Osnova škola dr. Mare Demarina, Medulin

Mentor: Natalija Zoričić

SAŽETAK

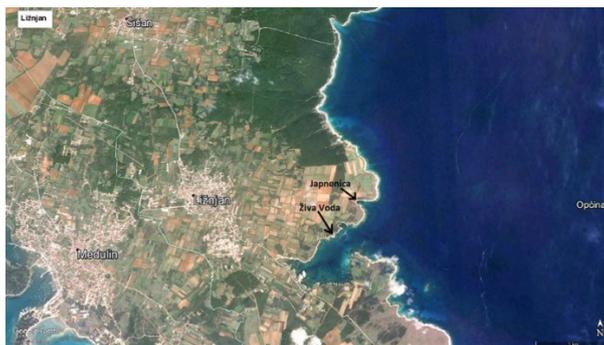
Ližnjan je malo mjesto na jugoistočnoj obali istarskog poluotoka. Stanovnici se tradicionalno bave ribarstvom i poljoprivredom, a u posljednje vrijeme sve više i turizmom. Od 2007. do 2016. godine broj se turista povećao 111,55 puta što je potencijalno velika opasnost za okoliš. Istraživanje flore i faune u ližnjanskom akvatoriju provedeno je od početka srpnja do kraja rujna 2016. godine na dvije odabrane lokacije: na Japnenici i Živoj Vodi, u zoni mediolitorala i infralitorala, ronjenjem na dah do dubine od oko 4 m. Teren je izrazito krških karakteristika, s velikim bogatstvom podzemnih voda. Živa Voda je mikrolokacija specifična po vruljama. Ovim istraživanjem željelo se identificirati biljne i životinjske vrste i usporediti sličnosti dviju lokacija po pronađenim vrstama. Također, željelo se utvrditi eventualno postojanje alohtonih invazivnih, strogo zaštićenih i ugroženih vrsta s Crvenih popisa i knjiga Hrvatske. Zabilježeno je ukupno 97 svojti životinja, 25 algi i jedna morska cvjetnica. Utvrđena je prisutnost dviju alohtonih invazivnih algi, tri strogo zaštićene te četiri ugrožene životinjske vrste. Invazivne životinjske vrste nisu zabilježene. Najbrojnije životinjsko koljeno su mekušci s 38 predstavnika, a među njima je dominantan red puževa sa 64,86 %. Od algi su na obje lokacije najbrojnije zelene alge. Na Japnenici je pronađena jedna morska cvjetnica. Rezultati ovog istraživanja prezentirat će se učenicima naše škole i lokalnoj turističkoj zajednici kako bi se domaće stanovništvo i njihovi gosti upoznali s bogatstvom našeg podmorja i shvatili nužnost očuvanja bioraznolikosti.

Ključne riječi: *Ližnjan, turizam, vrulje, bioraznolikost, zaštićene i invazivne vrste*

UVOD

Ližnjan je naselje na jugoistoku istarskog poluotoka, najveće je mjesto i središte istoimene općine. Obalna linija općine Ližnjan iznosi 27,6 kilometara, a cijelom svojom dužinom omeđuje plodne površine i mediteransku makiju. Dobro je razvedena, s velikim brojem uvala, draga i dvije prirodno oblikovane luke Kuje i Budava (Janjanin, 2004). Južni dio obale proteže se od granice s općinom Medulin u Kaželi do rta Marlera, a istočni od rta Marlera do luke Budava na sjeveru. Na slici 1 vidi se geografski položaj naselja Ližnjan.

Klima je blaga primorska, karakteriziraju je duga i topla ljeta te blage i kišovite zime. Veliki utjecaj na klimu ima blizina Kvarnerskog zaljeva i Velebita te su na ovom području česti vjetrovi bura i jugo. Bura je tipičan vjetar sjevernog Jadrana koji puše češće u hladnijem dijelu godine iz smjera sjeveroistoka, poznata je po svojoj mahovitosti, velikim brzinama i trajanju. Jugo je snažan i postojan vjetar koji puše s jugoistoka ravnomjernom brzinom (DHMZ 2016).



Slika 1 Geografski položaj mjesta Ližnjan (Google Earth Pro, 2007)



Teren je izrazito krških karakteristika, s velikim bogatstvom podzemnih voda. Krš je poseban tip reljefa karakterističan za topljive stijene – vapnenac i dolomit. Krški prostor karakterizira pomanjkanje voda na površini, a više vode u podzemlju. Postoje nadzemni i podzemni krški oblici. U nadzemne spadaju polja u kršu, ponikve, kamenice, škrape, a u podzemne spadaju jame i špilje. Na području općine postoje brojni izvori i bunari koji su se koristili za potrebe lokalnog stanovništva još u vremenu prije Krista. Najpoznatiji su izvor Funtana u blizini obale kod mjesta Ližnjan te rimski bunari na području Valturskog polja (Janjanin, 2004). Slijedom toga, pod morem se nalaze brojne vrulje.

Vrulje su krški fenomen, a nastaju uz kršku obalu na mjestima gdje se razina mora uzdigla ili se obala spustila pa su karbonatne stijene kroz koje protječe voda ostale pod morem. Predstavljaju stalno ili povremeno izbijanje slatke vode iz morskoga dna. Organizmi koji naseljavaju vrulje izloženi su salinitetnim šokovima zbog prisustva slatke vode. Zbog tih posebnih ekoloških uvjeta, živi svijet u vruljama je osebujan i s malo prisutnih vrsta (Bakran – Petricioli, 2007).

Prije dvije godine naš razred je sudjelovao na Biotekinom natječaju s projektom Ekološki suveniri gdje smo od gline izrađivali zaštićene i ugrožene morske organizme. Po završetku, projekt smo prezentirali učenicima naše škole i Turističkoj zajednici općine Medulin kako bismo educirali djecu i turiste da ne uzimaju žive organizme iz mora kao suvenire. Ovo je istraživanje potaknuto upravo time.

Prema podacima Turističke zajednice, u općini Ližnjan svake se godine znatno povećava broj turista. Tijekom 2007. godine Ližnjan je posjetilo tek 2 065, a u 2016. godini ukupno 230 347 turista. To znači da se broj posjetitelja povećao 111,55 puta. Imajući u vidu da u cijeloj općini živi tek 3 965 stanovnika, očito je da ovako veliko povećanje broja turista može znatno utjecati na okoliš.

Zbog toga se željelo istražiti živi svijet ližnjanskog akvatorija te utvrditi postojanje ugroženih, zaštićenih i alohtonih vrsta u području mediolitorala i infralitorala. Mediolitoral je zona plime i oseke gdje žive organizmi koji mogu podnijeti ekstremnije ekološke uvijete (povremeno isušivanje, veće razlike u temperaturi, utjecaj valova). Prema Bakran – Petricioli (2007), u Jadranskom moru ima više mediolitorala čvrste podloge (stijene), nego pomične podloge (muljevi, pijesci i šljunci). Najčešći organizmi u ovoj zoni su crvena moruzgva, priljepci, ugrc, rak šuš. Infralitoral je pojas fotofilnih algi (na kamenitom dnu) i morskih cvjetnica na sedimentnom dnu koji je trajno preplavljen morem (Bakran – Petricioli, 2007). U ovom je području bioraznolikost znatno veća jer su životni uvijeti stalniji, a zbog prozirnosti Jadranskog mora, prostire se sve do 40 metara dubine. Predstavnici autotrofnih organizama na čvrstoj podlozi su alge iz rodova *Cystoseira* i *Padina*, a na pomičnoj podlozi cvjetnica *Cymodocea nodosa*. Tipični predstavnici životinjskog svijeta su smeđa vlasulja, bodljikaši, školjkaši, rakovi, ribe iz porodica glavoča, slingurki i ljuskavki.

Predviđeno je da rezultati ovog istraživanja budu prezentirani učenicima naše matične škole u Medulinu te područne škole u Ližnjanu, kao i Turističkoj zajednici općine Ližnjan koja bi o tome mogla informirati svoje goste. Pregledom postojeće literature, utvrđeno je da do sada nije obavljeno istraživanje živog svijeta na području istočne obale Ližnjana.

Za ovo istraživanje odabrane su lokacije Japnenica i Živa Voda koje se međusobno razlikuju po postojanju vrulja, konfiguraciji terena i vrsti morskog dna pa su zbog toga odabrane. Obje lokacije kupaći podjednako posjećuju tijekom turističke sezone.

Postavljeni ciljevi ovog istraživanja su:

- Proširiti znanje o morskim organizmima Jadrana
- Odrediti vrste i usporediti sličnost lokacija prema prisutnim biljnim i životinjskim vrstama
- Odrediti najbrojnije svojte
- Utvrditi postojanje alohtonih, autohtonih te strogo zaštićenih i vrsta koje se nalaze na Crvenim popisima odnosno u Crvenim knjigama Hrvatske.

Pretpostavlja se da će se na obje lokacije pronaći:

- veliki broj vrsta
- barem jedna alohtona vrsta,
- barem jedna vrsta s Crvenog popisa odnosno iz Crvene knjige Hrvatske
- na Živoj Vodi će zbog postojanja vrulja broj identificiranih vrsta biti manji od onih na Japnenici.

METODE RADA

Planiranje istraživanja

Istraživanje na terenu obavljeno je od početka srpnja do kraja rujna 2016. Prethodno je tijekom lipnja 2016. godine proučena dostupna literatura. Od listopada do prosinca obrađivani su sakupljeni podaci.

Područje istraživanja

Ovo istraživanje obavljeno je na dvije lokacije na istočnoj obali općine Ližnjan i to u uvali Japnenica i području koje se naziva Živa Voda, u zoni mediolitorala i infralitorala ronjenjem na dah do dubine od oko 4 m. Geografski položaj istraživanih lokacija prikazan je na slici 2.

Japnenica (slika 3) je uvala smještena na istočnoj strani općine. Sa sjeverne i južne strane je stjenovita, a sa zapadne strane šljunkovita. U središnjem dijelu uvale prevladava mulj i pijesak dok je dno na nekim mjestima prema istoku, ispresijecano ostrim hridima. Istraživanjem je obuhvaćeno područje paralelno s obalom površine približno 2000 m².

Živa Voda (slika 4) je područje koje se nalazi oko 600 m jugozapadno od Japnenice. Naziv dolazi od samog izgleda morske vode koja je nemirna, izgleda kao da vrije, kao da je živa. Naime, ovo je područje bogato vruljama. Slatka voda izlazi iz brojnih usjeka u stijenama koje su glavna karakteristika ovog dijela. U ovom području je obuhvaćena površina od približno 1800 m², također paralelno s obalom.



Slika 2 Geografski položaj istraženih lokacija (Google Earth Pro, 2007)



Slika 3 Lokacija Japnenica



Slika 4 Lokacija Živa Voda

Metode rada

U istraživanju su se koristile metode:

- promatranja: ronjenje na dah s maskom do 4 m dubine
- fotografiranje
- identifikacije vrsta
- metoda statističke analize

Rad na terenu

Istraživanje na terenu obavljeno je od početka srpnja do kraja rujna 2016. godine. Dvije navedene lokacije geokodirane su GPS uređajem i za svaku je izrađen poseban popis flore i faune. Većina biljnog i životinjskog materijala identificirana je odmah na terenu. Biljne vrste koje nije bilo moguće odmah odrediti fotografirane su aparatom: SJCAM SJ4000 FULL HD, mobitelom Samsung Galaxy J5, ili su prikupljene te promatrane u laboratoriju pomoću lupe (10x). Fotografiralo se životinje za koje je to bilo moguće, dio ih je identificiran odmah na terenu, a dio na temelju fotografije i uz pomoć literature u laboratoriju.

Rad u laboratoriju

Nakon obavljenog terenskog rada, pristupilo se radu u kabinetu gdje je:

- Izvršena identifikacija prikupljenog i fotografiranog biljnog i životinjskog materijala pomoću literature: Riedl (1983), Milišić (1991; 1994; 2006; 2008), Prvan i Jakl (2016) te mrežnih stranica WoRMS (2016) te Guiry i Guiry (2016).
- Izvršena analiza zastupljenosti vrsta na pojedinoj lokaciji te usporedba sličnosti lokacija po prisutnim vrstama
- Izvršena identifikacija alohtonih i strogo zaštićenih vrsta te vrsta koje se nalaze na Crvenim popisima odnosno u Crvenoj knjizi Hrvatske pomoću literature: Antolić i sur., (2011); Kružić (2007); Otero i sur., (2016); Jardas i sur., (2008); Pećarević i sur. (2013).

Metode obrade podataka

Identificirane biljne i životinjske vrste podvrgnute su sljedećim analizama:

- Taksonomskoj analizi
- Analizi pripadnosti alohtonim i autohtonim biljnim odnosno životinjskim vrstama
- Analizi pripadnosti strogo zaštićenim vrstama te vrstama koje se nalaze na Crvenim popisima odnosno u Crvenim knjigama Hrvatske
- Statističkoj analizi zastupljenosti pojedinog koljena, porodice ili vrste na svakoj od lokacija.

- Analizi sličnosti lokacija prema broju prisutnih biljnih i životinjskih vrsta – Sørensenov koeficijent sličnosti, po sljedećoj formuli:

$$IS = \frac{2c}{A + B} * 100$$

gdje je IS = Sørensenov koeficijent;

c = broj zajedničkih vrsta;

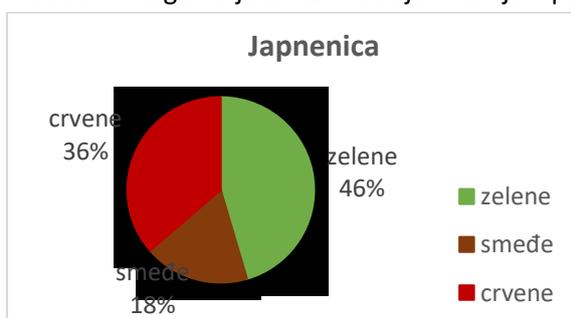
A = broj vrsta prisutnih na prvoj lokaciji;

B = broj vrsta prisutnih na drugoj lokaciji (Halambuk, 2013).

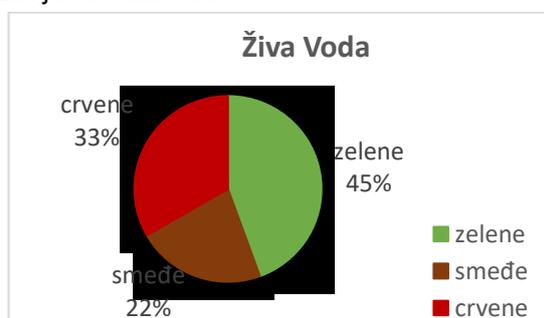
REZULTATI

Analiza flore

Istraživanjem flore na obje lokacije zabilježeno je ukupno 25 svojti algi i jedna morska cvjetnica koje su prikazane u prilogu 1. Tri su svojte određene do razine roda, a 23 do razine vrste. U uvali Japnenica pronađene su 22 svojte algi, od čega 10 zelenih, 4 smeđe i 8 crvenih. Na lokaciji Živa Voda od ukupno pronađenih 18 svojti, 8 je zelenih, 4 smeđe i 6 crvenih algi. Udio pojedinih razreda algi u ukupno pronađenim algama je sličan na obje lokacije i prikazan je na slikama 5 i 6.

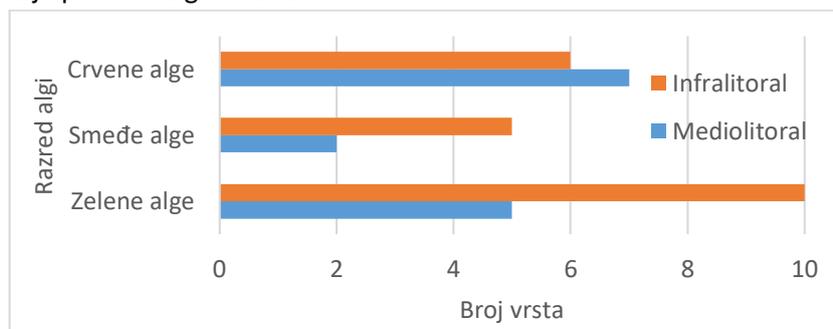


Slika 5 Odnos razreda algi na Japnenici



Slika 6 Odnos razreda algi na Živoj Vodi

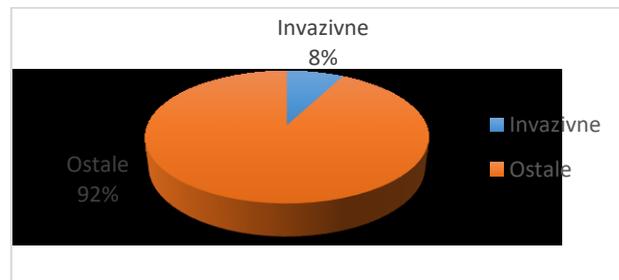
Jedna vrsta morske cvjetnice *Cymodocea nodosa* (čvorasta morska resa), pronađena je samo na Japnenici. Na području mediolitorala je na obje lokacije zabilježeno 14 svojti, a na području infralitorala 21 svojta algi, što je prikazano grafikonom na slici 7.



Slika 7 Brojnost vrsta po razredima algi na obje lokacije u zoni mediolitorala i infralitorala

U mediolitoralu su najbrojnije crvene alge, na drugom su mjestu zelene, a najmanje su zastupljene smeđe. U infralitoralu su najbrojnije zelene, na drugom su mjestu crvene, a na trećem smeđe alge.

Na obje postaje identificirane su dvije alohtone invazivne vrste algi i to *Caulerpa cylindracea* i *Asparagopsis armata*. Slika 8 pokazuje udio alohtonih invazivnih i ostalih vrsta algi u ukupno identificiranim algama na obje postaje.



Slika 8 Odnos invazivnih i ostalih algi na obje postaje

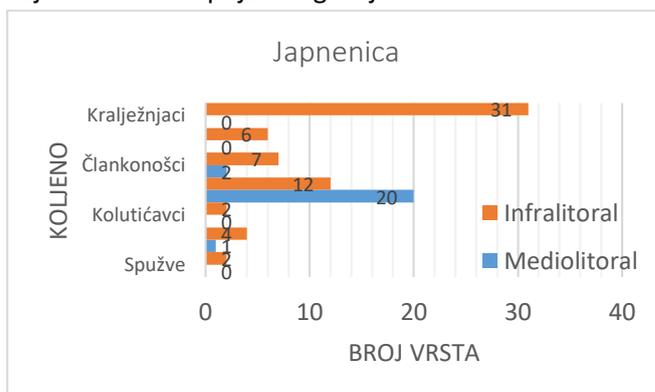
Analizom prisutnih svojiti na obje postaje odnosno uspoređivanjem pronađenih algi i morskih cvjetnica s onima s Crvenog popisa, nije utvrđena prisutnost ugroženih svojiti. Tri se nalaze na Crvenom popisu, ali ulaze u kategoriju najmanje zabrinjavajućih te široko rasprostranjenih i brojnih svojiti. To su dvije alge (*Cystoseira spp.* i *Corallina officinalis*) te jedna morska cvjetnica *Cymodocea nodosa*.

Sličnost dviju navedenih lokacija prema prisutnim vrstama algi i morskih cvjetnica izračunata je pomoću Sørensenovog koeficijenta sličnosti i iznosi 84,21%.

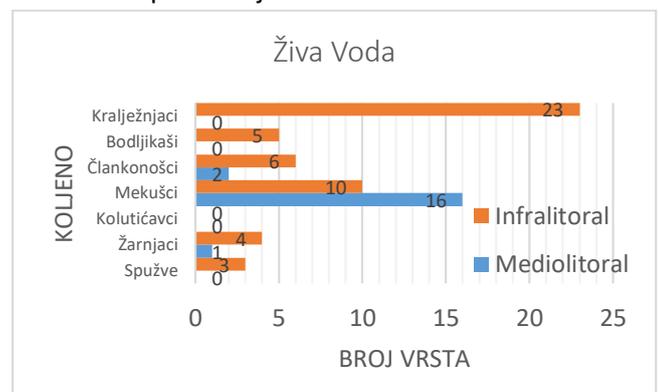
$$IS = \frac{2 * 16}{20 + 18} * 100 = \frac{32}{38} * 100 = 0,8421 * 100 = 84,21\%$$

Analiza faune

Istraživanjem faune na obje postaje zabilježeno je ukupno 97 vrsta i to 83 u uvali Japnenica te 66 na postaji Živa Voda (prilog 2). Prema tome, Japnenica je za 25,76% bogatija životinjskim vrstama od Žive Vode. Najbrojnije koljeno su mekušci koji sa 38 predstavnika čine 39,18% od ukupno identificiranih životinjskih vrsta, a druge po brojnosti su ribe koštunjače sa 34 evidentirane vrste. Najmanje zastupljeno koljeno su kolutičavci sa svega dvije pronađene vrste. Na slikama 9 i 10 grafički je prikazan broj vrsta unutar pojedinog koljena u zoni mediolitorala i infralitorala po lokacijama.



Slika 9 Brojnost vrsta unutar pojedinog koljena na Japnenici



Slika 10 Brojnost vrsta unutar pojedinog koljena na Živoj Vodi

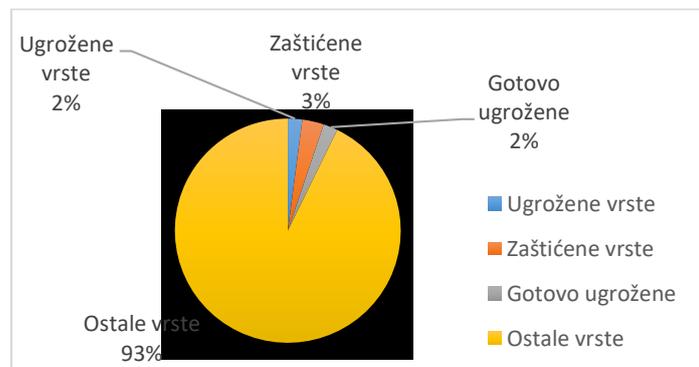
U zoni mediolitorala najzastupljenije koljeno su mekušci s pronađenih 20 vrsta na Japnenici i 16 na Živoj Vodi, a unutar njih većinu čine puževi. Drugo koljeno po brojnosti u mediolitoralnom pojasu su

člankonošci, treće žarnjaci, a predstavnici ostalih koljena nisu pronađeni. U zoni infralitorala dominiraju na obje lokacije kralježnjaci odnosno ribe koštunjače i to sa zabilježenom 31 vrstom na Japnenici i 23 na Živoj Vodi. Na drugom mjestu po brojnosti u infralitoralu su mekušci s 12 predstavnika na Japnenici i 10 na Živoj Vodi. Na obje lokacije su najmanje zastupljene spužve i kolutičavci od kojih su u infralitoralnom pojasu na Japnenici pronađene po dvije vrste. U istom pojasu na Živoj vodi zabilježene su 3 vrste spužvi dok kolutičavci nisu pronađeni.

Sličnost dviju navedenih lokacija prema prisutnim životinjskim vrstama izračunata je pomoću Sørensenovog koeficijenta i iznosi 69,80%.

$$IS = \frac{2 * 52}{83 + 66} * 100 = \frac{104}{149} * 100 = 0,7027 * 100 = 69,80\%$$

Slika 11 pokazuje zastupljenost strogo zaštićenih, ugroženih i gotovo ugroženih životinjskih vrsta u ukupnom broju vrsta na obje postaje. Identificirane su 3 strogo zaštićene vrste i to *Pinna nobilis*, *Pinna rudis* i *Litophaga litophaga*. Istovremeno su zabilježene dvije ugrožene vrste kojima prema kategorijama IUCN-a prijete visoki rizik od izumiranja u prirodi, a to su *Aiptasia mutabilis* i *Cladocora caespitosa*. Dvije vrste nalaze se u kategoriji gotovo ugroženih, a to su *Actinia equina* i *Diplodus puntazzo*.



Slika 11 Zastupljenost ugroženih i zaštićenih životinjskih vrsta na obje postaje

Na ni jednom lokalitetu nisu pronađene alohtone invazivne životinjske vrste.

RASPRAVA

Istraživanje živog svijeta u području mediolitorala i infralitorala na istočnoj obali ližnjanskog akvatorija, provedeno je na dvije lokacije: Japnenica i Živa Voda. Pronađeno je ukupno 119 svojti i to 97 životinja, 25 algi te jedna morska cvjetnica. Tri svojte identificirane su do razine roda, a 116 do razine vrste. Na Japnenici je zabilježena veća bioraznolikost, a jedan od razloga tome moguć je utjecaj vrulja na Živoj Vodi. Na takvim mjestima, zbog povremenog ili stalnog prisustva slatke vode, vladaju posebni ekološki uvjeti pa je prema Bakran – Petricioli (2007), živi svijet u vruljama osebujan i s malo prisutnih vrsta.

Taksonomskom analizom utvrđeno je da se sve zabilježene životinjske svojte nalaze unutar 7 koljena i 57 porodica. Najbrojnije koljeno su mekušci s 38 predstavnika, a među njima razred puževi koji čine 64,86% ukupno pronađenih vrsta mekušaca. Analizom flore zabilježeno je 25 svojti algi i jedna morska cvjetnica. Od algi su na obje lokacije najbrojnije zelene alge, a među njima je najzastupljenija porodica



Codiaceae. Kod crvenih algi najbrojnije su *Corallinaceae*, a kod smeđih *Dyctiotaceae*. U mediolitoralalu je pronađeno ukupno 2,26 puta manje svojti nego u infralitoralalu zbog ekstremnijih ekoloških uvjeta: povremeno isušivanje, veće razlike u temperaturi, jak utjecaj valova (Bakran-Petricioli, 2007).

Prema Pravilniku o strogo zaštićenim vrstama (NN 2013), na obje lokacije pronađene su ukupno 3 strogo zaštićene vrste i to dvije na Živoj Vodi (*Pinna rudis* i *Litophaga litophaga*) i jedna na Japnenici (*Pinna nobilis*). Posebno je zanimljiv nalaz plemenitih periski u središnjem dijelu uvale Japnenica gde je na pjeskovitom dnu obraslom morskom cvjetnicom *Cymodocea nodosa* zabilježeno približno 4 – 5 jedinki po jednom metru kvadratnom površine. Zbog prevelikog izlova je od 1994. godine zakonom zaštićena te su skupljanje, izlov i trgovina ovom vrstom strogo zabranjeni (Šafarek, 2014). Ovim istraživanjem, zabilježeno je ukupno jedanaest životinjskih vrsta i tri vrste algi koje se nalaze na Crvenim popisima Republike Hrvatske (Jardas i sur., 2008; Antolić i sur., 2011; Kružić, 2007). To su organizmi za koje je procjenjivan stupanj ugroženosti. Prema tim popisima, na promatranim postajama pronađene su dvije gotovo ugrožene vrste koje bi u bliskoj budućnosti mogle postati ugrožene, a to su *Diplodus puntazzo* (pic) i *Actinia equina* (crvena moruzgva). Također, zabilježene su i dvije ugrožene vrste kojima prijete vrlo visoki rizik od izumiranja u prirodi: *Aiptasia mutabilis* (staklena moruzgva) i *Cladocora caespitosa* (busenasti koralj). Ostalih 7 vrsta spada u kategoriju široko rasprostranjenih i brojnih svojti. Na Živoj Vodi zabilježene su dvije vrste iz porodice oštriga: *Ostrea edulis* i *Ostrea stentina* koje, kako navodi Milišić (2006), žive na čvrstoj podlozi u blizini dotoka slatke vode. Na jugoistočnim dijelovima Japnenice pronađene su velike zajednice morskih ježinaca na stjenovitoj podlozi, na potpuno ogoljenom dnu. Ta se pojava prema ZADRON (2012) naziva golobrst, a do nje dolazi kada se na kamenitoj podlozi na kojoj se obično razvijaju zajednice infralitoralnih algi, namnože morski ježinci. Tako dolazi do devastacije zajednica algi koje su važno stanište i izvor hrane brojnim morskim organizmima. Pretpostavlja se da je do naglog porasta brojnosti populacija ježinaca došlo zbog pretjeranog izlova njihovih predatora - riba iz porodice ljuskavki (orada, šaraga i fratara) i morskih zvjezdača koje se sakupljaju zbog suvenira (Žuljević, 2009). Na obje istražene postaje, evidentirane su ukupno 34 vrste riba koštunjača. Među njima 28,41% čine predstavnici porodice ljuskavki, a na drugom su mjestu glavoči i slingurke, svaki s po 14,71%. Zabilježena je i prisutnost glavočića bjelčića *Gobius bucchichii* koji je, prema Iveša i sur. (2015) jedina riba u Jadranu otporna na otrov smeđe vlasulje i često se od neprijatelja skriva među njenim lovkama.

Tijekom istraživanja, posebna pažnja posvećena je alohtonim invazivnim organizmima koji svojim dolaskom čine štetu autohtonim vrstama. Prema popisu invazivnih alohtonih vrsta u Sredozemlju (Otero i sur. 2013) te onih u Jadranu (Pećarević i sur., 2013), u ližnjanskom akvatoriju identificirane su dvije invazivne alge: *Caulerpa cylindracea* i *Asparagopsis armata*. Invazivne životinjske vrste nisu pronađene.

Caulerpa cylindracea je invazivna zelena alga porijeklom iz umjereno toplog mora jugozapadne Australije. Pretpostavlja se da se većim dijelom proširila putem brodova (balastne vode) te putem internet trgovina opremom za akvarije (Otero i sur., 2013). Prema Iveša i sur. (2015), u Jadranu se prvi puta pojavila 2000. godine, a uz obalu Istre 2004. Iznimno je otporna na različite uvjete u okolišu pa podnosi temperaturu od 8° do 28° C, raste na dubini od 0 do 70 m na različitim tipovima mekih i čvrstih dna, čak i u uvjetima visoke razine onečišćenja. Na morskome dnu tvori razgranatu mrežu svojih naselja



te prerasta autohtone organizme pričvršćene za dno i postepeno ih istiskuje (DZZP, 2013). Na postaji Japnenica uočena je na sjevernom dijelu uvale, na stjenovitom dnu do 2 m dubine, u neposrednoj blizini ugrožene staklene moruzgve *Aiptasie mutabilis* te svega dvadesetak metara udaljena od naselja strogo zaštićene plemenite periske *Pinna nobilis* i ugroženog busenastog koralja *Cladocora caespitosa*. *Asparagopsis armata* je invazivna crvena alga koja raste do 5 m dubine i formira guste kuglice roze boje nalik na vatu promjera do 2 cm (Mačić i sur., 2014). Porijeklom je iz mora zapadne Australije i visoko je invazivna. S autohtonim vrstama natječe se za prostor i svjetlo. Raste na čvrstom stjenovitom dnu, često i na drugim algama, posebno roda *Corallinae* (Otero i sur., 2013). Pronađena je na obje istražene lokacije, na tvrdoj podlozi, nešto brojnija na zapadnim stijenama na Živoj Vodi, u neposrednoj blizini bogatih nasada *Coralline officinalis*.

Prilikom analize prikupljenih podataka, uspoređena je sličnost dviju postaja prema prisutnim biljnim i životinjskim vrstama pomoću Sørensenovog koeficijenta. On se zasniva na pretpostavci da svaka vrsta teoretski može biti na dva područja. Izražava odnos između stvarnog broja zajedničkih vrsta i teoretski mogućih zajedničkih vrsta. Vrijednost mu se kreće u rasponu od 0 do 1 gdje 0 označava da nema zajedničkih vrsta, a 1 da su potpuno iste vrste prisutne na obje lokacije (Halambuk, 2013). Izračunati koeficijent iznosi 69,80% za životinje te 84,21% za alge i morske cvjetnice. To znači da su navedene postaje vrlo slične prema prisutnim svojstava. Razlog je činjenica da se istraženi lokaliteti nalaze relativno blizu (na oko 600 m udaljenosti) te da su pronađene vrste koje su inače široko rasprostranjene. Razlike koje su uočene postoje zbog lokalnog utjecaja slatke vode na Živoj Vodi te zbog razlika u geološkim obilježjima obale, nagibu te izloženosti sunčevoj svjetlosti.

Ovim istraživanjem željelo se identificirati žive organizme na dva lokaliteta na istočnoj obali općine Ližnjan. Međutim, kako bi se postigao što bolji uvid u stanje na terenu, istraživanje bi trebalo provesti tijekom duljeg vremenskog perioda, a ne samo u 3 ljetna mjeseca. To se posebno odnosi na istraživanje algi koje maksimum svoje vegetacije imaju u proljetnim mjesecima. Nažalost, zbog niske temperature morske vode i zbog nedostatka opreme, ronjenje tada nije bilo moguće. Također, terenski rad obavljen je tijekom dana pa nije bilo moguće zabilježiti organizme koji su aktivni noću. Posebno se to odnosi na ribe jer su, kako navode Iveša i sur. (2015), uvale Ližnjana poznate kao mjesta gdje ribe dolaze prenočiti te bi noćnim izlascima na teren sigurno bio zabilježen veći broj vrsta. Spomenuti nedostaci ovog istraživanja mogli bi biti poticaj za novo. Također, zanimljivo bi bilo kartirati područja na kojima su pronađene invazivne alge i pratiti brzinu njihovog širenja.

Dobiveni rezultati ovog istraživanja bit će prezentirani učenicima naše matične i područne škole, te lokalnoj turističkoj zajednici koja bi onda trebala educirati svoje goste o bogatstvu našega podmorja i potrebi očuvanja bioraznolikosti.

ZAKLJUČCI

Tijekom ovog istraživanja izvedeni su sljedeći zaključci:

- ✔ Analizom flore i faune na lokalitetima Japnenica i Živa Voda pronađeno je ukupno 26 biljnih i 97 životinjskih svojti čime je znatno prošireno znanje o morskim organizmima Jadrana
- ✔ Utvrđena je veća sličnost dvaju lokaliteta prema prisutnim biljnim nego prema životinjskim vrstama



- ☑ Identificirane su dvije alohtone invazivne vrste i to *Caulerpa cylindracea* (Sonder) i *Asparagopsis armata* Harvey, W. H.
- ☑ Invazivne životinjske vrste nisu pronađene
- ☑ Pronađene su 3 strogo zaštićene životinjske vrste
- ☑ Utvrđena je prisutnost ugroženih vrsta sa crvenih popisa odnosno crvenih knjiga Hrvatske
- ☑ Na Japnenici je utvrđena veća bioraznolikost nego na Živoj Vodi.

LITERATURA

- Antolić, B., Nikolić, V. I. Žuljević, A. 2011. Crveni popis morskih alga i cvjetnica Hrvatske. Državni zavod za zaštitu prirode. http://www.dzpz.hr/dokumenti_upload/20140613/dzpz201406131540210.pdf pristupljeno 15.11.2016.
- Bakran – Petricioli, T. 2007. Morska staništa – Priručnik za inventarizaciju i praćenje stanja, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.
- DHMZ 2016. Primorska klima, Državni hidrometeorološki zavod. <http://www.klima.hr/klima.php?id=k1#pog3> pristupljeno 03.12.2016.
- DZZP 2013. Invazivne strane vrste, Državni zavod za zaštitu prirode <http://www.dzpz.hr/novosti/k/strane-invazivne-vrste-u-hrvatskoj-vrsta-mjeseca-grozdasta-kaulerpa-caulerpa-racemosa-1112.html> pristupljeno 15.01.2017.
- Guiry, M.D., Guiry, G. M. 2016. Algaebase. World – wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org> pristupljeno 13.10.2016.
- Halambuk, T. 2013. Zoogeografska analiza rasprostranjenosti gujavica na području Hrvatske, Diplomski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.
- Iveša, Lj., Djakovac, T., Devescovi, M. 2015. Spreading patterns of the invasive *Caulerpa cylindracea* (Sonder) along the west Istrian coast (northern Adriatic sea, Croatia), Marine Environmental Research 107 (2015) 1-7.
- Iveša, N., Vojnić, N., I Komšo, D. 2015. Istarska podvodna priča. Klub za podvodne aktivnosti, Medulin.
- Janjanin, L. 2004. Zelena agenda općine Ližnjan. Zelena Istra, Pula.
- Jardas, I., Pallaoro, A., Vrgoč, N., Jukić – Peladić, S., Dadić, V. 2008. Crvena knjiga morskih riba Hrvatske. Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Republika Hrvatska, Zagreb.
- Kružić, P. 2007. Crveni popis koralja Hrvatske, Zoologijski zavod PMF-a, Zagreb, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb. http://www.dzpz.hr/dokumenti_upload/20100414/dzpz201004141259030.pdf ; pristupljeno 29.11.2016.
- Mačić, V., Lučić, D., Gangai Zovko, B., Mandić, M., Dulčić, J., Žuljević, A., Petović, S., Drakulović, D., Miloslavić, M., Onofri, I., Marković, O., Joksimović, A., Onofri, V., Pestorić, B. 2014. Alohtone vrste istočne obale južnog Jadrana. Institut za biologiju mora Univerziteta Crne Gore i Institut za more i priobalje Sveučilišta u Dubrovniku, Kotor, Crna Gora.
- Milišić, N. 2008. Enciklopedija jadranskih koralja. Marjan tisak, Split.
- Milišić, N. 2006. Ribe, rakovi, školjke i ostali živi svijet jadranskog podmorja. Marjan tisak, Split.
- Milišić, N. 1994. Sva riba Jadranskog mora. Niva, Split.
- Milišić, N. 1991. Školjke i puževi Jadrana. Logis, Split.
- NN 2013. Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama. http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_12_144_3086.html; pristupljeno 25.11.2016.
- Otero, M., Cebrian, E., Francour, P., Galil, B., Savini, D. 2013. Monitoring Marine Invasive Species in Mediterranean Marine Protected Areas (MPAs) – A strategy and practical guide for managers. International Union for Conservation of Nature (IUCN), Malaga, Spain.
- Pećarević, M., Mikuš, J., Bratoš Cetinić, A., Dulčić, J., Čalić, M. 2013. Introduced marine species in Croatian waters (Eastern Adriatic Sea), Mediterranean Marine Science, 14(1): 224-237.
- Prvan, M., Jakl, Z. 2016. Priručnik za zaštitu mora i prepoznavanje živog svijeta Jadrana. Udruga za prirodu, okoliš i održivi razvoj Sunce, Split.
- Riedl, R. 1983. Fauna und Flora des Mittelmeeres. Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin.
- Šafarek, G. 2014. Životinje Hrvatske. Mozaik knjiga, Zagreb.
- ZADRON 2012. Sveučilišni ronilački klub Sveučilišta u Zadru. <http://zadron.unizd.hr/?p=391> pristupljeno 15.02.2017.
- Žuljević, A., Despalatović, M., Antolić, B., Cvitković, I., Nikolić, V., Dadić, V., Vidjak, O., Skejić, S., Muslim, S. I Holcer, D. 2009. Morska bioraznolikost otoka Biševa i jugoistočne strane otoka Visa – Stručna podloga za održivo upravljanje. Project COAST, UNDP.
- WoRMS, 2016. World Registrar of Marine Species. <http://marinespecies.org> pristupljeno 20.10.2016.



PRILOZI

Prilog 1 Prisutnost vrsta makroalgi i cvjetnica po postajama u mediolitoral i infralitoral

ALGHAЕ		ALGE		Japnenica	Živa Voda	Medio-litoral	Infra-litoral	Invazivne vrste
Red. br.	Znanstveni naziv	Hrvatski naziv	Porodica					
Chlorophyta		Zelene alge						
1.	<i>Acetabularia acetabulum</i> (Linnaeus) P. C. Silva	Klobučić	Polyphysaceae	-	+	-	+	
2.	<i>Anadyomene stellata</i> (Wulfen) C. Agardh		Anadyomenaceae	+	+	-	+	
3.	<i>Caulerpa racemosa</i> var. <i>cylindracea</i> (Sonder) Verlaque, Huisman & Boudouresque	Morsko grožđe	Caulerpaceae	+	+	-	+	+
4.	<i>Cladophora</i> spp.		Cladophoraceae	+	+	+	+	
5.	<i>Codium adhaerens</i> C. Agardh		Codiaceae	+	-	+	-	
6.	<i>Codium bursa</i> (Olivi) C. Agardh		Codiaceae	+	+	-	+	
7.	<i>Codium effusum</i> (Rafinesque) Delle Chiaje		Codiaceae	+	+	-	+	
8.	<i>Codium vermilara</i> (Olivi) Delle Chiaje		Codiaceae	+	-	+	+	
9.	<i>Flabellia petiolata</i> (Turra) Nizamuddin		Udoteaceae	+	+	-	+	
10.	<i>Halimeda tuna</i> (J. Ellis & Solander) J. V. Lamouroux	Halimeda	Halimedaceae	+	+	+	+	
11.	<i>Ulva lactuca</i> Linnaeus, C.	Morska salata	Ulvaceae	+	-	+	+	
Phaeophyta		Smeđe alge						
12.	<i>Cystoseira</i> spp.		Cystoseiraceae	+	+	+	+	
13.	<i>Dictyota dichotoma</i> (Hudson) J. V. Lamouroux	Diktiota	Dictyotaceae	+	+	+	+	
14.	<i>Ectocarpus</i> spp.		Ectocarpaceae	-	+	-	+	
15.	<i>Padina pavonica</i> (Linnaeus) Thivy	Paunov rep	Dictyotaceae	+	+	-	+	
16.	<i>Sphacelaria cirrosa</i> (Roth) C. Agardh		Sphacelariaceae	+	-	-	+	
Rhodophyta		Crvene alge						
17.	<i>Amphiroa rigida</i> J. V. Lamouroux		Lythophyllaceae	+	+	+	+	
18.	<i>Asparagopsis armata</i> Harvey, W. H.		Bonnemaisoniaceae	+	+	-	+	+
19.	<i>Ceramium rubrum</i> C. Agardh		Ceramiaceae	+	-	+	-	
20.	<i>Corallina officinalis</i> Linnaeus	Koralina	Corallinaceae	+	+	+	+	
21.	<i>Jania rubens</i> (Linnaeus) J. V. Lamouroux		Corallinaceae	+	+	+	+	
22.	<i>Laurencia obtusa</i> (Hudson) J. V. Lamouroux		Rhodomelaceae	+	-	+	+	
23.	<i>Nemalion helminthoides</i> (Vellay) Batters		Nemaliaceae	+	-	+	-	
24.	<i>Nithophyllum punctatum</i> (Stackhouse) Greville		Delesseriaceae	-	+	+	-	
25.	<i>Peyssonnelia rubra</i> (Greville) J. Agardh		Peyssonneliaceae	+	+	-	+	
ANGIOSPERMAE		MORSKE CVJETNICE						
1.	<i>Cymodocea nodosa</i> (Ucria) Ascherson	Čvorasta morska resa	Cymodoceaceae	+	-	-	+	

Prilog 2 Prisutnost životinjskih vrsta po postajama u mediolitoral i infralitoral

R.br.	Znanstveni naziv	Hrvatski naziv	Porodica	Japnenica	Živa Voda	Medio-litoral	Infra-litoral
PORIFERA		SPUŽVE					
1.	<i>Aplysina aerophoba</i> Nardo, 1833	Žuta sumporača	Aplysinidae	+	+	-	+
2.	<i>Chondrosia reniformis</i> Nardo, 1847	Bubrežasta spužva	Chondrosiidae	+	+	-	+
3.	<i>Sarcotragus foetidus</i> Schmidt, 1862	Crna spužva	Irciniidae	-	+	-	+
CNIDARIA		ŽARNJACI					
4.	<i>Actinia equina</i> Linnaeus, 1758	Crvena moruzgva	Actiniidae	+	+	+	-
5.	<i>Aiptasia mutabilis</i> Gravenhorst, 1831	Staklena moruzgva	Aiptasiidae	+	+	-	+
6.	<i>Anemonia viridis</i> Forskal, 1775	Smeđa vlasulja	Actiniidae	+	+	-	+
7.	<i>Cladocora caespitosa</i> Linnaeus, 1767	Busenasti koralj	Faviidae	+	-	-	+
8.	<i>Cotylorhiza tuberculata</i> Macri, 1778	Smeđa meduza	Cepheidae	+	+	-	+
9.	<i>Rhizostoma pulmo</i> Macri, 1778	Morska pluća	Rhizostomatidae	-	+	-	+
ANNELIDA		KOLUTIČAVCI					
10.	<i>Eunice gigantea</i> Cuvier, 1830	Veliki morski crv	Eunicidae	+	-	-	+
11.	<i>Protula tubularia</i> Montagu, 1803	Bijeli cjevaš perjaničar	Serpulidae	+	-	-	+
MOLUSCA		MEKUŠCI					
Gastropoda		Puževi					
12.	<i>Amyclina corniculum</i> Olivi, 1792	Metiljasta vrša	Nassariidae	+	-	+	-
13.	<i>Aplysia depilans</i> Gmelin, 1791	Morski zekan	Aplysiidae	-	+	-	+
14.	<i>Bittium reticulatum</i> da Costa, 1778	Mrežasta vretenjača	Cerithiidae (Vretenjače)	+	-	+	-
15.	<i>Bolinus brandaris</i> Linnaeus, 1758	Bodljikavi volac	Murucidae (Bodljikavi volci)	+	+	-	+
16.	<i>Cerithium vulgatum</i> Bruguiere, 1792	Obična vretenjača	Cerithiidae (Vretenjače)	+	-	+	-
17.	<i>Colubella rustica</i> Linnaeus, 1758	Kokica	Pirenidae (Stožasti puževi)	+	-	+	-
18.	<i>Conus mediterraneus</i> Hwass in Bruguiere, 1792	Stožac	Conidae (Puževi stošci)	+	-	+	-
19.	<i>Diodora gibberula</i> Lamarck, 1822	Rebrasta rasporke	Fissurellidae (Rasporke)	-	+	+	-
20.	<i>Diodora graeca</i> Linnaeus, 1758	Grčka rasporke	Fissurellidae (Rasporke)	-	+	+	-



R.br.	Znanstveni naziv	Hrvatski naziv	Porodica	Japnenica	Živa Voda	Medio-litoral	Infralitoral
	MOLUSCA	MEKUŠCI					
	Gastropoda	Puževi					
21.	<i>Fissurella nubecula</i> Linnaeus, 1758	Rasporka mali oblačić	Fissurellidae (Rasporke)	-	+	+	-
22.	<i>Gibbula albida</i> Gmelin, 1791	Bjelkasti zvrk	Trochidae (Zvrkovi)	+	-	+	-
23.	<i>Gibbula divaricata</i> Linnaeus, 1758	Račvasti zvrk	Trochidae (Zvrkovi)	+	-	+	-
24.	<i>Haliotis tuberculata lamellosa</i> Lamarck, 1822	Kraljevo uho, puzlatka	Haliotidae (Puzlatke)	+	+	+	+
25.	<i>Hinia incassata</i> Strom, 1768	Odebljala vrša	Nassariidae	-	+	+	-
26.	<i>Littorina neritoides</i> Linnaeus, 1758	Litorina	Littorinidae (Obalni pužići)	+	+	+	-
27.	<i>Monodonta articulata</i> Lamarck, 1822	Člankoviti ugrc	Trochidae (Zvrkovi)	+	+	+	-
28.	<i>Monodonta turbinata</i> Born, 1780	Ugrc	Trochidae (Zvrkovi)	+	+	+	-
29.	<i>Ocenebrina edwardsii</i> Payraudeau, 1826	Edwardsov volak	Muricidae (Bodljikavi volci)	+	-	+	-
30.	<i>Patella caerulea</i> Linnaeus, 1758	Plavi priljepak	Patellidae (Priljepci)	+	+	+	-
31.	<i>Patella caerulea</i> i. var. <i>subplana</i> Potiez & Michaud, 1838	Nepravilan plavi priljepak	Patellidae (Priljepci)	+	+	+	-
32.	<i>Patella rustica</i> Linnaeus, 1758	Luzitanski priljepak	Patellidae (Priljepci)	+	+	+	-
33.	<i>Patella ulysipoensis</i> Gmelin, 1791	Oštri priljepak	Patellidae (Priljepci)	+	+	+	-
34.	<i>Phyllonotus trunculus</i> Linnaeus, 1758	Kvrgavi volak	Muricidae (Bodljikavi volci)	+	+	-	+
35.	<i>Pisania striata</i> Gmelin, 1791	Pjegavi rogač	Buccinidae (Valoviti rogaši)	+	-	+	-
	Bivalvia	Školjkaši					
36.	<i>Arca noae</i> Linnaeus, 1758	Kunjka	Arcidae (Lađice)	+	-	-	+
37.	<i>Cerastoderma glaucum</i> Bruguiere, 1789	Kapica srčanka	Cardiidae (Srčanke)	+	-	-	+
38.	<i>Chlamys multistriata</i> Poli, 1795	Mala zaljevka Jakovljeva kapica	Pectinidae (Češljače)	+	-	-	+
39.	<i>Lithophaga lithophaga</i> Linnaeus, 1758	Prstac	Mytilidae	-	+	-	+
40.	<i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819	Dagnja	Mytilidae	-	+	+	-
41.	<i>Ostrea edulis</i> Linnaeus, 1758	Kamenica, oštriga	Ostreidae (Oštrige)	+	+	+	+
42.	<i>Ostrea stentina</i> Payraudeau, 1826	Nepravilna kamenica	Ostreidae (Oštrige)	+	+	+	+
43.	<i>Pecten jacobaeus</i> Linnaeus, 1758	Jakovljeva kapica	Pectinidae (Češljače)	-	+	-	+
44.	<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758	Plemenita periska	Pinnidae (Periske)	+	-	-	+
45.	<i>Pinna rudis</i> Linnaeus, 1758		Pinnidae (Periske)	-	+	-	+
46.	<i>Ruditapes decussatus</i> Linnaeus, 1758	Kučica	Veneridae (Ladinke)	+	-	-	+
47.	<i>Venerupis aureus</i> Gmelin, 1791	Zlatna kućica	Veneridae (Ladinke)	+	-	-	+
	Cephalopoda	Glavonošci					
48.	<i>Sepia officinalis</i> Linnaeus, 1758	Sipa	Sepiidae (Sipe)	+	+	-	+
	Polyplacophora	Mnogoljušturaši					
49.	<i>Chiton olivaceus</i> Spengler, 1797	Babuška	Chitonidae	+	+	+	-
	ARTHROPODA	ČLANKONOŠCI					
	Crustacea	Rakovi					
50.	<i>Chthamalus stellatus</i> Poli, 1791	Rak vitičar	Chthamalidae	+	+	+	-
51.	<i>Clibanarius erythropus</i> Latreille, 1818	Samac kućar	Diogenidae (Rakovi samci)	+	+	-	+
52.	<i>Dromia personata</i> Linnaeus, 1758	Kosmač	Dromiidae	+	-	-	+
53.	<i>Eriphia verrucosa</i> Forskal, 1775	Grancipor, žbirac	Eriphiidae	+	+	-	+
54.	<i>Maja crispata</i> Risso, 1827	Bradavičasta rakovica, štracared	Majidae	+	+	-	+
55.	<i>Pachygrapsus marmoratus</i> Fabricius, 1787	Gomnar, šuša	Graspsidae (Šuše)	+	+	+	+
56.	<i>Pagurus anachoretus</i> Risso, 1827	Pustinjak čekinjasti	Paguridae (Rakovi samotnjaci)	+	+	-	+
57.	<i>Palaemon elegans</i> Rathke, 1837	Kamena kozica	Palaemonidae (Kozice)	+	+	-	+
	ECHINODERMATA	BODLIKAŠI					
	Echinoidea	Ježinci					
58.	<i>Arbacia lixula</i> Linnaeus, 1758	Hridinski ježinac	Arbaciidae	+	+	-	+
59.	<i>Paracentrotus lividus</i> Lamarck, 1816	Ježinac kamenjar	Echinidae	+	+	-	+
60.	<i>Sphaerechinus granularis</i> Lamarck, 1816	Ljubičasti ježinac	Toxopneustidae	+	+	-	+
	Holothuroidea	Trpovi					
61.	<i>Holothuria forskali</i> Delle Chiaje, 1823	Trp	Holothuridae (trpovi)	+	+	-	+
62.	<i>Holothuria tubulosa</i> Gmelin, 1791	Trp	Holothuridae (trpovi)	+	+	-	+
	Ophiuroidea	Zmijače					
63.	<i>Ophiotrix fragilis</i> Abildgaard in O. F. Müller, 1789	Dlakava zmijača	Ophiotricidae	+	-	-	+
	VERTEBRATA	KRALJEŽNJACI					
	Osteichthyes	Ribe koštunjače					
64.	<i>Atherina hepsetus</i> Linnaeus, 1758	Girica, gavun	Atherinidae (Zeliniši)	+	-	-	+
65.	<i>Boops boops</i> Linnaeus, 1758	Boba, bukva	Sparidae (Ljuskavke)	+	-	-	+
66.	<i>Chromis chromis</i> Linnaeus, 1758	Crnelj	Pomacentridae (Češljoustke)	+	+	-	+
67.	<i>Coris julis</i> Linnaeus, 1758	Knez	Labridae (Usnjače)	+	-	-	+
68.	<i>Diplodus annularis</i> Linnaeus, 1758	Špar	Sparidae (Ljuskavke)	+	+	-	+
69.	<i>Diplodus puntazzo</i> Walbaum, 1792	Pic	Sparidae (Ljuskavke)	+	+	-	+
70.	<i>Diplodus sargus</i> Linnaeus, 1758	Šarag	Sparidae (Ljuskavke)	+	-	-	+
71.	<i>Diplodus vulgaris</i> Geoffroy Saint-Hilaire, 1817	Baraj, Fratar	Sparidae (Ljuskavke)	+	+	-	+
72.	<i>Gobius bucchichii</i> Steindachner, 1870	Glavočić bijelčić	Gobiidae (Glavoči)	+	+	-	+
73.	<i>Gobius cobitis</i> Pallas, 1814	Glavoč pločar	Gobiidae (Glavoči)	+	-	-	+
74.	<i>Gobius geniporus</i> Valenciennes, 1837	Glavoč bjelaš	Gobiidae (Glavoči)	+	-	-	+
75.	<i>Gobius paganellus</i> Linnaeus, 1758	Glavoč mrkulj	Gobiidae (Glavoči)	+	-	-	+
76.	<i>Lipophrys adriaticus</i> Steindachner & Kolombatovic, 1883	Slingurica jadranska	Blenniidae (Slingurke)	-	+	-	+
77.	<i>Lipophrys pholis</i> Linnaeus, 1758	Babica	Blenniidae (Slingurke)	+	+	-	+



R.br.	Znanstveni naziv	Hrvatski naziv	Porodica	Japnenica	Živa Voda	Medio-litoral	Infra-litoral
	VERTEBRATA	KRALJEŽNJACI					
	<i>Osteichthyes</i>	<i>Ribe koštunjače</i>					
78.	<i>Lipophrys trigloides</i> Valenciennes, 1836	Slingurica buljooka	Blenniidae (Slingurke)	+	+	-	+
79.	<i>Lithognathus mormyrus</i> Linnaeus, 1758	Ovčica	Sparidae (Ljuskavke)	-	+	-	+
80.	<i>Liza aurata</i> Risso, 1810	Cipal zlatar	Mugilidae (Skočci)	+	+	-	+
91.	<i>Mullus barbatus</i> Linnaeus, 1758	Trlja blatarica	Mullidae (Brkavice)	+	-	-	+
82.	<i>Mullus surmuletus</i> Linnaeus 1758	Trlja kamenjarka	Mullidae (Brkavice)	+	-	-	+
83.	<i>Oblada melanura</i> Linnaeus, 1758	Očada	Sparidae (Ljuskavke)	+	+	-	+
84.	<i>Oedalechilus labeo</i> Cuvier, 1829	Cipal plutaš	Mugilidae (Skočci)	+	+	-	+
85.	<i>Pagellus erythrinus</i> Linnaeus, 1758	Arbun, ribon	Sparidae (Ljuskavke)	+	+	-	+
86.	<i>Parablennius gattorugine</i> Linnaeus, 1758	Slingurica mrkulja	Blenniidae (Slingurke)	+	+	-	+
87.	<i>Parablennius sanguinolentus</i> Pallas, 1814	Balava slingurica	Blenniidae (Slingurke)	+	+	-	+
88.	<i>Sarpa salpa</i> Linnaeus, 1758	Salpa	Sparidae (Ljuskavke)	+	+	-	+
89.	<i>Serranus hepatus</i> Linnaeus, 1758	Vučić	Serranidae (Vučice)	+	+	-	+
90.	<i>Serranus scriba</i> Linnaeus, 1758	Pirka	Serranidae (Vučice)	+	-	-	+
91.	<i>Solea solea</i> Linnaeus, 1758	List	Soleidae (Listovi)	+	+	-	+
92.	<i>Sparus aurata</i> Linnaeus, 1758	Orada	Sparidae (Ljuskavke)	+	+	-	+
93.	<i>Symphodus tinca</i> Linnaeus, 1758	Lepa, lumbrak	Labridae (Usnjače)	+	-	-	+
94.	<i>Trachinus draco</i> Linnaeus, 1758	Pauk bijelac	Trachinidae (Paukovke)	+	+	-	+
95.	<i>Tripterygion tripteronotus</i> Risso, 1810	Pjevčić oštronosić	Tripterygidae (Pjetlići)	+	+	-	+
96.	<i>Uranoscopus scaber</i> Linnaeus, 1758	Bežmek, čača	Uranoscopidae (Bežmeci)	+	+	-	+
97.	<i>Zebrus zebrus</i> Risso, 1827	Glavočić zebrašti	Gobiidae (Glavoči)	-	+	-	+

UTJECAJ PRIRODNIH TVARI NA RAZVOJ PLIJESNI NA SVJEŽEM VOĆU I POVRĆU

Antonela Pandur, VIII. razred

Lana Paulić, VIII. razred

OŠ Grabrik, Karlovac

Mentor: Slađana Cvitičanin

SAŽETAK

Pljesnivost je pojava kolonija plijesni na površini voća i povrća. Pretpostavke rada su da prirodne tvari propolis, vitamin C, koloidno srebro te prirodna ulja iz sjemenki grejpa, echinacee i češnjaka utječu na smanjenu pojavu plijesni na svježem voću i povrću. Ciljevi su usporediti brzinu razvoja i površinsku zastupljenost plijesni na svježem voću i povrću, bez i s prirodnim tvarima, utvrditi utjecaj promjene pH na pljesnivost svježeg voća i povrća te utvrditi važnost i primjenjivost prirodnih sredstava umjesto kemijskih sredstava u borbi protiv plijesni. Namirnice korištene u radu su mandarina, grejp, banana, jabuka, kruška, češnjak, mrkva, krumpir, luk, patlidžan. Površinska zastupljenost plijesni bilježena je na milimetarskom papiru. Dobiveni rezultati pokazuju da prirodne tvari utječu na smanjenu površinsku zastupljenost plijesni na svježem voću i povrću prosječno za oko 50 %. Ulje češnjaka najviše, a ulje echinacee najmanje odgađa pojavu plijesni na svježem voću i povrću. pH vrijednost nije ograničavajući faktor za smanjenu pojavu plijesni. S obzirom da se gljivice mogu pojaviti na različitim mjestima, ne samo na hrani, ova prirodna sredstva mogu se preporučiti umjesto štetnih kemijskih sredstava, koji se svakodnevno koriste u građevinarstvu (plijesan na zidovima) i medicini (gljivična oboljenja kože).

Ključne riječi: propolis, vitamin C, koloidno srebro, ulje sjemenki grejpa, ulje echinacee, ulje češnjaka

UVOD

Gljive su velika i raznolika skupina heterotrofnih organizama. Prema broju stanica mogu biti jednostanične i mnogostanične. Stanice gljiva ne sadrže klorofil pa ne mogu proizvoditi hranu procesom fotosinteze. Hranjive tvari upijaju iz okoliša. Tako se na ostacima hrane mogu razviti jednostavne gljivice-plijesni (Džapo i sur., 2013). Prema Duraković i Duraković (2000) plijesni su velika skupina mikroskopskih gljivica, tijelo kojih je građeno od gustog sustava cjevastih stanica bez klorofila, obično bezbojnih. Nitaste su građe, a niti (hife) isprepliću se i tvore micelij, koji se kao prašnjava ili paučinasta prevlaka rasprostire po podlozi. Mogu se klasificirati kao plijesni s polja, plijesni u skladištima i plijesni uznapredovalog kvarenja (Duraković i sur, 2002). Pljesnivost je pojava kolonija plijesni na površini voća i povrća. Rast plijesni se manifestira u vidu stvaranja bijelog, sivog, zelenog i blijedo do tamno narančastog sloja na površini, a rjeđe i ispod površine. Mnoge plijesni pa time i njima kontaminirane namirnice, odlikuju se specifičnim mirisom koji se ne može eliminirati. Najčešći izazivači pljesnivosti spadaju u rod *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* i *Mucor* (Duraković i Duraković, 2000). Prema Šumić (2009) većina namirnica je jako podložna kvarenju, zato što sadrže tvari, koje su neophodne za rast mikroorganizama. Kako bi se smanjio proces kvarenja hrane i smanjile bolesti koje se prenose putem hrane, mora se kontrolirati razmnožavanje mikroorganizama. Propadanje hrane bi trebalo minimalizirati kako bi se produžilo vrijeme tijekom kojeg se može održati prihvatljiva razina okusa i zdravstvene ispravnosti hrane. Gljive su vrlo rasprostranjene. Otporne su na različite tvari, pa se mogu izolirati iz različitih životnih okruženja, npr. iz životnih namirnica sa izrazito kiselim sredinom (voćni sokovi na bazi citrusa), niskim sadržajem slobodne vode (čajevi, začini, žitarice, brašno i sl.), kao i sušenih, smrznutih i pasteriziranih prehrambenih proizvoda. Plijesni mogu izdržati veće promijene u pH vrijednosti sredine, nego što je to slučaj sa bakterijama i kvascima, i često mogu tolerirati i veće temperaturne razlike. Iako plijesni napreduju najbolje kada je pH oko 7,0, mogu se razvijati i u opsegu pH od 2,0 do 8,0, iako je za njih najpovoljnije ako je pH blago kisela ili neutralna. Broj i vrsta mikroorganizama na voću i povrću su različiti. Ukupan broj mikroorganizama ovisi o mnogim čimbenicima. Voće i povrće sadrži mikroorganizme samo na površini, iako se i u unutrašnjosti može naći određen, mali broj mikroorganizama. Ako je voće ili



povrće skladišteno na gomili, uslijed procesa koji se odvijaju (npr. disanje) dolazi do porasta temperature i oslobađanja vode. Na taj način nastaju gotovo idealni uvjeti za razmnožavanje mikroorganizama, a uslijed čije aktivnosti dolazi do kvarenja već poslije nekoliko sati. Plodovi voća su na površini zaštićeni pokožicom, presvučenom prevlakom, što pored mehaničke zaštite ima i antimikrobnu ulogu. U pokožici plodova u većem udjelu su prisutni spojevi koji sprječavaju razvoj mikroorganizama. U raznošenju plijesni značajnu ulogu ima vinska mušica *Drosophila melanogaster*, koja na svom tijelu nosi spore plijesni, a sakuplja ih uglavnom na pokvarenom povrću (Jašić, 2010.). Pojedine grupe mikroorganizama mogu putem hrane izazvati različita oboljenja ljudi, od aktivnog trovanja do bolesti epidemijskih razmjera. Štetni utjecaji hrane s plijesnima otkriveni su još u Kini, prije najmanje 5000 godina. Toksini gljivica, koji nastaju kao produkti metabolizma, počeli su se ozbiljno proučavati tek prije pedesetak godina, nakon što je 1960. godine u Engleskoj zabilježena smrt velikog broja peradi. Mikotoksini mogu imati kancerogena i mutagena svojstva, a ljudi su najviše izloženi putem zaražene biljne hrane (Pšeničnik, 2013). S obzirom da živimo u svijetu koji preporučuje sve više svježeg voća i povrća na jelovniku, pogotovo u razdoblju razvoja djece, ovaj rad je nastao kao promišljanje pomoću kojih tvari zaštititi voće i povrće od pojave plijesni. U proučavanju literature pronađeni su neki alternativni pristupi u zaštiti zdravlja konzumacijom (prehranom) nekih namirnica, koji se smatraju prirodnim antioksidansima, ali nisu pronađeni znanstveni radovi koji pokazuju izravan utjecaj pojedinih namirnica na smanjenu pljesnivost svježeg voća i povrća. Prvo koloidno srebro proizvedeno je 1924., i u to vrijeme naveliko se koristilo kao moćno sredstvo u borbi protiv virusnih i bakterijskih infekcija. Kasnije je u istraživanjima potvrđeno da je srebro najjači poznati antiseptik koji ujedno posjeduje i svojstva antibiotika. Propolis je smolasta izlučevina tkiva pupoljaka i kore drveća kojom se brane od štetnih mikroorganizama. Pčele ga skupljaju i miješaju sa sekretom čeljusnih žlijezda, enzimski ga modificiraju tako da najvažnije sastavnice, flavonoidi, postaju farmakološki djelatne tvari. Propolis se naziva i prirodnim antibiotikom te zahvaljujući novim znanstvenim spoznajama naziva ga se „lijekom 21. stoljeća“. Vitamin C ili askorbinska kiselina je vitamin topljiv u vodi, a prisutan je u svježem voću i povrću. On je jedan od najispitanijih i najviše opisanih vitamina i prvi sintetski dobiveni vitamin. Sudjeluje u brojnim biološkim procesima. Najjači je antioksidans među vitaminima topljivim u vodi. Grejp je poznat kao antioksidans te po svom snažnom antibakterijskom djelovanju. Bogat je vitaminom C, sadrži vitamine A, B, D, E i K te mnoge minerale. Iz sjemenke i pulpe grejpa dobiva se citrofit, koji djeluje na jačanje imuniteta. *Echinacea purpurea* (rudbekija, slamnjak) je jedna od najpopularnijih biljaka u Americi danas. Arheolozi su pronašli dokaze o korištenju ehinaceae kod Indijanaca, kroz više od 400 godina, za liječenje infekcija i rana te kao "lijek za sve". Nekoliko provedenih istraživanja ukazuju da echinacea povećava aktivnost imunološkog sustava, smanjuje bolove i upalu te posjeduje hormonalno, antivirusno i antioksidativno djelovanje. Češnjak je vrlo hranjiv i ima protuupalna i antibakterijska svojstva. Ustanovljen je problem brzog kvarenja svježeg voća i povrća i istraživanja govore o tome da ljudi mogu oboljeti od različitih bolesti uzrokovanih međuproduktima metabolizma mikroorganizama, koji uzrokuju kvarenje hrane. Često se primjenjuju različite kemijske supstance, kojima se nastoji spriječiti razvoj plijesni na voću i povrću. Predmet ovog istraživanja je utvrditi kako primjena prirodnih tvari propolisa, vitamina C, koloidnog srebra te prirodnih ulja sjemenki grejpa, echinacee i češnjaka, utječe na pojavu pljesnivosti na svježem voću i povrću, s obzirom da se smatra da te prirodne tvari imaju antioksidativna djelovanja u ljudskom organizmu i mogu li se ta sredstva koristiti za tretiranje svježeg voća i povrća protiv plijesni. Pretpostavke rada su da propolis, vitamin C, koloidno srebro te prirodna ulja iz sjemenki grejpa, echinacee i češnjaka utječu na smanjenu pojavu plijesni na svježem voću i povrću. S obzirom da vitamin C i propolis najviše snižavaju pH vrijednost, a literatura pokazuje kako je rast plijesni povećan kod nižih pH vrijednosti, tj. kada je kiseliije, pretpostavlja se da će vitamin C i propolis najmanje djelovati na razvoj plijesni i da će uzorci svježeg voća i povrća tretirani vitaminom C i propolisom imati najveću površinsku zastupljenost plijesni. Kod



koloidnog srebra je izmjerena pH=7 i pretpostavka je da će koloidno sredstvo, kao jako protuupalno sredstvo, a pri tom i neutralno najviše djelovati na smanjenu pojavu plijesni.

Ciljevi rada su:

- Utvrditi utjecaj prirodnih tvari propolisa, vitamina C, koloidnog srebra te prirodnih ulja sjemenki grejpa, echinacee i češnjaka na pojavu pljesnivosti svježeg voća i povrća
- Usporediti brzinu razvoja i površinsku zastupljenost plijesni na svježem voću i povrću, bez i s prirodnim tvarima propolisom, vitaminom C, koloidnim srebrom te prirodnim uljima sjemenki grejpa, echinacee i češnjaka
- Usporediti djelotvornost prirodnih tvari propolisa, vitamina C, koloidnog srebra te prirodnih ulja sjemenki grejpa, echinacee i češnjaka na smanjenu pljesnivost od najveće do najmanje
- Utvrditi utjecaj promjene pH vrijednosti na pljesnivost svježeg voća i povrća
- Utvrditi važnost i primjenjivost prirodnih sredstava umjesto kemijskih sredstava u borbi protiv plijesni.

METODE RADA

Materijal za istraživanje čine uzorci voća i povrća, koji se koriste u pripremi učeničkih obroka, uzeti iz školske kuhinje. Namirnice korištene u radu su:

- Voće: mandarina, grejp, banana, jabuka, kruška
- Povrće: češnjak, mrkva, krumpir, luk, patlidžan.

Tretiranje uzoraka voća i povrća se izvodi pomoću;

- propolisa,
- vitamina C,
- koloidnog srebra
- prirodnog ulja sjemenki grejpa
- prirodnog ulja echinacee
- prirodnog ulja češnjaka.

Sve navedene tvari su u tekućem obliku osim vitamina C, koji se nalazi u čvrstom agregatnom stanju. Propolis, koloidno srebro, prirodna ulja grejpa, echinacee i češnjaka su nerazrijeđeni u bočicama od 30 ml, na koje je stavljen raspršivač. Prvotna ideja je obuhvaćala i tretiranje svježeg voća i povrća uljem origana, ali zbog visoke nabavne cijene taj dio je izostavljen. Otopina vitamina C se pripravlja tako da se 2 šumeće tablete vitamina C otope u 400 ml vode, kako bi se dobio dostatan volumen za tretiranje uzoraka voća i povrća. Dobivena otopina se prelijeva u plastičnu posudicu zapremnine 30 ml sa raspršivačem.

Tablica 1 Određene pH vrijednosti otopina prirodnih tvari

PRIRODNE TVARI	pH
PROPOLIS	5
VITAMIN C	3
KOLOIDNOSREBRO	7
ULJE SJEMENKI GREJPA	6
ULJE ECHINACEAE	5
ULJE ČEŠNJAKA	6

Uzorci voća i povrća su prije uzorkovanja narezani na ploške, kojima je izračunata površina. Površina dobivenih oblika ploški je određivana približnim načinom računanja površine pomoću milimetarskog papira. Milimetarski papir je fotokopiran na prozirnu foliju za fotokopiranje A4 formata. Ploška voća ili povrća se prekrije providnim milimetarskim papirom, ocrta se flomasterom i prebrojavaju se cijeli kvadratni centimetri ili milimetri, zbrajaju se i bilježe u tablicu, koristeći oznake $P_{poč}$ (npr. $P_{poč}M_1$ za prvu plošku mandarinke, koja nije tretirana; $P_{poč}MP_2$ za drugu plošku mandarinke tretiranu propolisom itd.). Narezane ploške voća i povrća se stavljaju u PVC vrećice (zapremnine od 1l).

Kako bi se spriječio moguć utjecaj djelovanja spora na rast plijesni među pojedinim uzorcima, bilo zrakom ili uz prijenos vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) svaka ploška se stavlja u zasebnu vrećicu. Kako bi dobili što bolje rezultate, od svakog voća i povrća, pakiraju se 24 ploške u 24 vrećice. Po tri ploške voća ili povrća se ne tretiraju, a po tri se tretiraju sa svakom prirodnom tvari (slika 1).

Vrećice se označe oznakama. Uzorci koji nisu tretirani označavaju se početnim slovima naziva voća ili povrća i brojem (npr. mandarina- M1, M2, M3). Uzorci koji se tretiraju označavaju se početnim slovima naziva voća ili povrća, tvari i brojem (npr. mandarina/propolis MP1, MP2, MP3). Svaka ploška voća ili povrća se špricne jednim potiskom raspršivača od svake tvari prije zatvaranja.



Slika 1 Rezanje, bilježenje, tretiranje prirodnim tvarima i pakiranje svježeg voća i povrća

Svakoj otopini se odredi pH vrijednost pomoću univerzalnog lakmus papira (slika 2).



Slika 2 Određivanje pH vrijednosti univerzalnim lakmus papirom

Svi uzorci se izlažu istim uvjetima na sobnoj temperaturi u školskom kabinetu za nastavu biologije (slika 3). Trajanje pokusa je 30 dana, jer istraživanja pokazuju da se plijesan na svježem voću i povrću

bez tretiranja pojavljuje unutar tog vremena (Slika 4). Svakodnevnim promatranjem u trajanju od 30 dana, osim subotama i nedjeljama, prikupljaju se podaci o prvoj pojavnosti plijesni i bilježe se u tablicu.



Slika 3 Tretirane ploške plodova

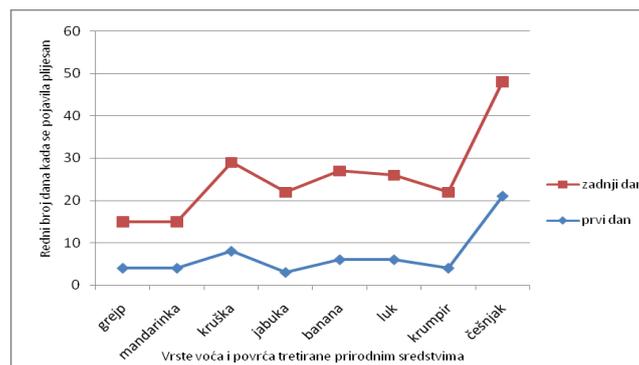


Slika 4 Ploške grejpa tretiranog propolisom i netretiranog na isti datum

Kod onih uzoraka kod kojih se pojavila plijesan u milimetarski papir se precrtava površinska pokrivenost plijesnima i izračunava površina pokrivenosti plijesni za svaki uzorak (svaku plošku zasebno) sljedeći dan do kraja trajanja mjerenja (P_{plijesan}). Izračunavamo postotak udjela plijesni na svježem voću i povrću i pratimo promjenljivost udjela plijesni po danima od 1. do 14. dana, prema formuli: $X_{1MP} = (P_{\text{plijesan1MP}} / P_{\text{poč1MP}}) 100\%$. S obzirom na uzimanje po tri ploške svakog voća i povrća, u izvođenju zaključaka u rezultatima se uzima srednja vrijednost udjela plijesni za sve tri ploške. Rezultati rada obrađeni su uz pomoć računalnih programa Microsoft® Office Excel 2007 za Windows.

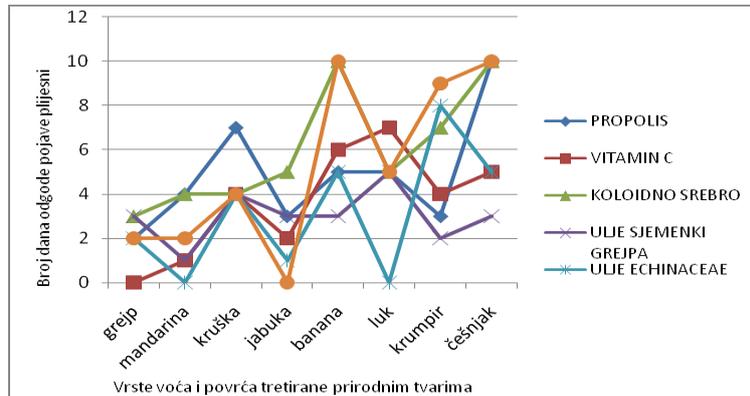
REZULTATI

Kako bi se što bolje protumačile dobivene vrijednosti, računale su se srednje vrijednosti površinske zastupljenosti plijesni sva tri uzorka svježeg voća i povrća. Na svim uzorcima se pojavila plijesan unutar 10 dana osim kod češnjaka (slika 5). Prvo je po pljesnivila jabuka, dok je češnjak bio najdulje bez plijesni. Najbrže su u potpunosti po pljesnivili agrumi, grejp i mandarinika. Mrkva i patlidžan su se cijelo vrijeme sušili pa je bilo nespretno za odrediti površinsku zastupljenost plijesni. Iz tog razloga rezultati nisu prikazivani.



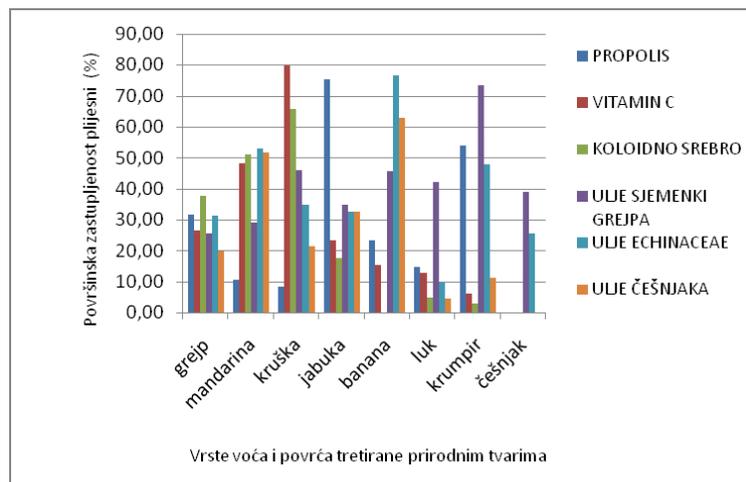
Slika 5 Početna pojava i 100%-tno zastupljena pljesnivost na svježem voću i povrću

Na slici 6 je vidljivo da sve prirodne tvari odgađaju pojavu plijesni. Vrijednosti su dobivene kao razlika u broju dana od prve pojave plijesni na kontrolnoj skupini. Ovisno o vrsti svježeg voća i povrća prirodne tvari različito utječu na odgađanje pojave plijesni. Ulje češnjaka najviše odgađa pojavu plijesni na svim uzorcima, osim na jabuci. Najmanje odgađa pojavu plijesni na svježem voću i povrću ulje echinacee. Na uzorcima češnjaka se najkasnije pojavljuje plijesan, a kada je češnjak pošprican uljem češnjaka pojava plijesni se odgodi za deset dana. Isto takvo je djelovanje koloidnog srebra na češnjak.



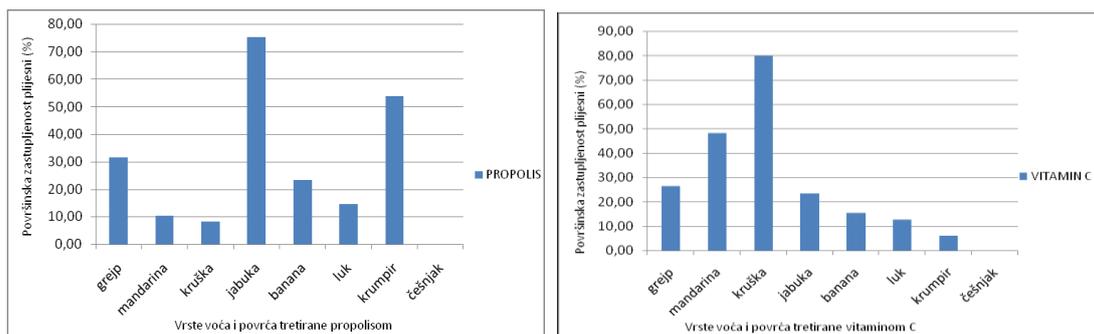
Slika 6 Utjecaj prirodnih tvari na odgađanje pojave plijesni u odnosu na pojavu plijesni na kontrolnoj skupini

Sva korištena prirodna sredstva su se pokazala kao učinkovito sredstvo za suzbijanje pojave plijesni kod svih korištenih plodova. U trenutku kada je 100% površine voća i povrća kontrolne skupine po pljesnivilo, tretirani plodovi su po pljesnivili manje od 50%, što pokazuje djelotvornost prirodnih tvari na smanjenu pojavu pljesnivosti na svježem voću i povrću (slika 7).



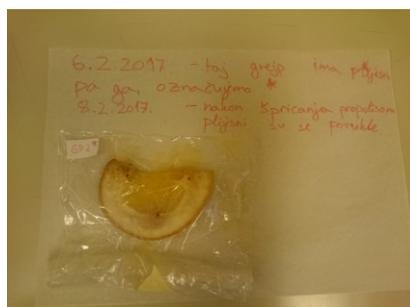
Slika 7 Udio plijesni na ploškama tretirano prirodnim tvarima u trenutku kada su uzorci kontrolne skupine u potpunosti pljesnivi

Korištenjem propolisa, površinska zastupljenost plijesni je ispod 50%, osim kod jabuke. Propolisom tretirani češnjak nije popljesnivio. Od ostalih plodova najviše djeluje na smanjenu pljesnivost kod kruške i mandarine, gdje je zastupljenost plijesni 8,32% i 10,44% od ukupne površine ploški plodova (slika 8). Vitamin C se najdjelotvorniji pokazao na češnjaku na kojem se plijesan nije niti pojavila, dok na kruške djelovanje vitamina C ima najmanje djelovanje na smanjenu pojavu pljesnivost (slika 8).



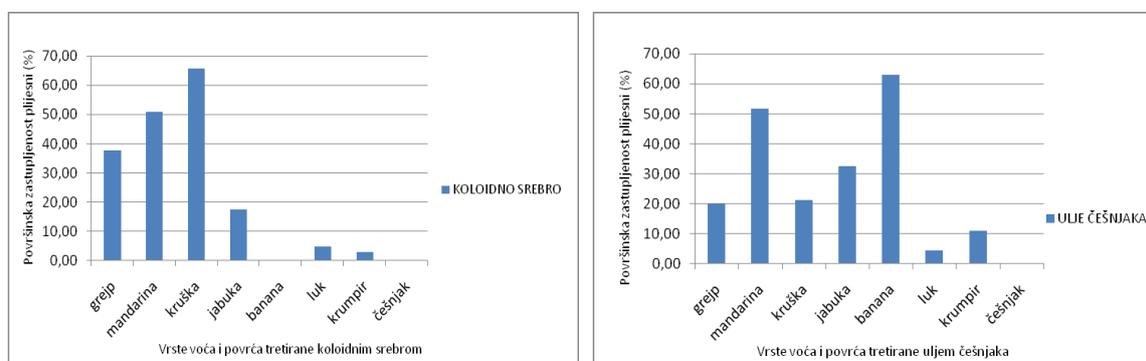
Slika 8 Utjecaj propolisa i vitamina C na pojavu plijesnivosti svježeg voća i povrća

Djelotvornost propolisa na smanjenu pojavu plijesnivosti na svježem voću i povrću vidljiva je i na slučajnom primjeru ploške grejpa na kojoj je zabilježena plijesan. Ploška je nakon zabilježene plijesnivosti pošpricano propolisom i nakon samo dva dana plijesan se povukla (slika 9).



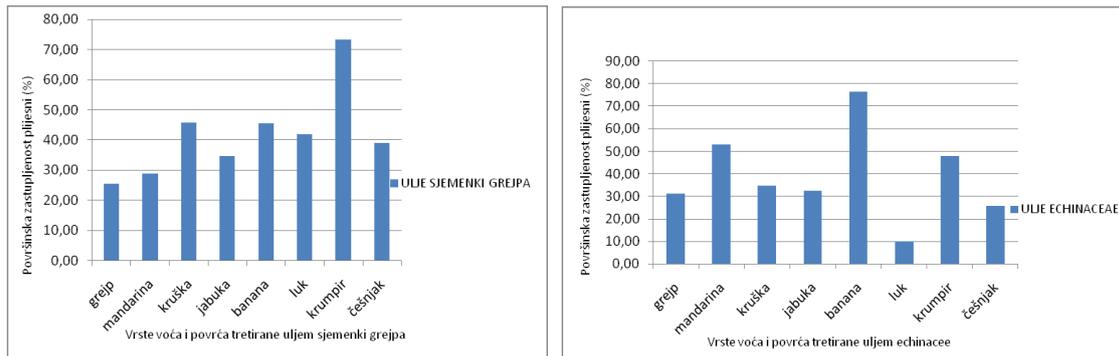
Slika 9 Ploška grejpa naknadno tretiranog propolisom

Koloidno srebro učinkovito odgađa pojavu plijesni na svim plodovima, ali najviše na krumpiru i luku, na plodovima banane je bila jako mala, dok se na češnjaku tretiranom koloidnim srebrom plijesan nije niti pojavila. Ulje češnjaka najviše sprječava pojavu plijesni na tretiranim ploškama češnjaka, a od ostalih plodova na ploške luka. Kod banane je vidljiv najveći razvoj plijesni nakon tretiranja uljem češnjaka (slika 10).



Slika 10 Utjecaj koloidnog srebra i ulja češnjaka na pojavu plijesnivosti svježeg voća i povrća

Ulje sjemenki grejpa i ulje echinacee podjednako djeluju na odgađanje plijesnivosti kod svih plodova. Povećana plijesnivost zabilježena je kod plodova krumpira tretiranim otopinom ulja sjemenki grejpa, a ulje echinacee najviše djeluje na smanjenu površinsku zastupljenost plijesni kod luka (slika 11).



Slika 11 Utjecaj ulja sjemenki grejpa i echinacee na pojavu pljesnivosti svježeg voća i povrća

Djelovanjem propolisa, vitamina C, koloidnog srebra i ulja češnjaka na češnjak nije zabilježena pojava pljesnivosti. Nije bilo jednostavno pratiti površinsku rasprostranjenost plijesni, jer plodovi češnjaka imaju malu površinu i ucrtavanje na milimetarski papir jako malih površina plijesni je bilo nespretnije nego kod ostalog voća i povrća. Univerzalnim indikatorom izmjerene su pH vrijednosti prirodnih tvari (tablica 1). Nakon djelovanja prirodnih tvari, pH vrijednost svježeg voća i povrća je niža od početne vrijednosti. Najviše snižava pH vrijednost vitamin C i propolis. Sve pH vrijednosti prije tretiranja su bile više (tablica 2).

Tablica 2 Utjecaj prirodnih tvari na promjenu pH vrijednosti svježeg voća i povrća

pH	PRIJE TRETIRANJA	PROPOLIS	KOLOIDNO SREBRO	VITAMIN C	ULJE SJEMENKI GREJPA	ULJE ECHINACEAE	ULJE ČEŠNJAKA
GREJP	5	3	3	3	4	4	4
MANDARINA	6	4	5	3	5	4	5
KRUŠKA	6	3	6	3	5	6	5
JABUKA	6	4	6	3	5	6	5
BANANA	6	5	5	4	5	6	5
LUK	6	6	4	5	6	6	5
KRUMPIR	7	5	6	5	6	6	6
ČEŠNJAK	7	5	5	5	6	6	6
MRKVA	7	4	5	4	6	5	6

RASPRAVA

Ovim istraživanjem potvrđena je početna pretpostavka i dokazan je velik utjecaj prirodnih tvari propolisa, vitamina C, koloidnog srebra te prirodnih ulja grejpa, echinacee i češnjaka na smanjenu pojavu plijesni na svježem voću i povrću. Djelovanjem tih tvari smanjuje se površinska zastupljenost plijesni. Iako različiti izvori govore o djelovanju tih tvari na pojavu različitih mikroorganizama, nisu pronađena istraživanja, koja izravno govore o djelovanju propolisa, vitamina C, koloidnog srebra te prirodnih ulja grejpa, echinacee i češnjaka na površinsku zastupljenost plijesni na svježem voću i povrću. Iz tih razloga je teško, dobivene rezultate ovim istraživanjem, usporediti sa nekim drugim rezultatima. Već odavno je primijećeno da nešto u grejpu djeluje na bakterije. BioChemResearch (Kalifornija) provela je brojna istraživanja, koja su potvrdila da upravo ekstrakt sjemenke grejpa djeluje na bakterije, viruse, gljivice i parazite (Pasarić, 2011). U skladu sa tim zaključcima, ovim radom je utvrđen utjecaj ulja sjemenki grejpa na smanjenu pojavu plijesni na svim uzorcima voća i povrća. Iako se ovim istraživanjem nije proučavao utjecaj koloidnog srebra na različite uzročnike bolesti, potiče se ideja na uporabu koloidnog srebra i u medicinske svrhe, o čemu govore rezultati



nekim drugih istraživanja, s obzirom na to da utječe na smanjivanje plijesni na svježem voću i povrću. Naime, prije 1934. godine, kada je otkriven penicilin, srebro je bilo jedini lijek za mnoge bolesti. Godine 1983. Ministarstvo zdravlja SAD-a je priznalo koloidno srebro kao neškodljiv lijek, koji se može dobiti bez recepta. Međutim, brzim razvojem industrije antibiotika, srebro je palo u zaborav (Pasarić, 2011). Možda će rezultati ovog rada potaknuti na daljnja razmišljanja o korištenju koloidnog srebra. Djelovanje vitamina C se pokazalo značajno na smanjenu pojavu plijesni na voću i povrću, a istraživanja Dr. Freda Klennera iz Sjeverne Karoline su potvrdila djelovanje vitamina C i na viruse, bakterije i toksine (Pasarić, 2011). Nisu pronađena istraživanja koja bi se mogla usporediti sa dobivenim rezultatima da ulje echinacee smanjuje pojavu plijesni na svježem voću i povrću, osim članaka koji govore o tome da su listove i korijenje te biljke oduvijek upotrebljavali Indijanci kao lijek za iscjeljenje bilo koje vrste rana (Pixelizam, 2017). U 19. stoljeću Louis Pasteur je potvrdio da češnjak ubija bakterije, a moderna istraživanja potvrđuju da je češnjak efikasan protiv mnogih vrsta bakterija, virusa i gljivica (Pasarić, 2011), što se slaže sa rezultatima ovog istraživanja na svježem voću i povrću, kada gledamo na utjecaj na plijesni. Utjecaj na gljivice potvrđuje i Ebers Papirus, egipatski medicinski dokument koji datira negdje oko 1.500 godina prije nove ere, koji govori o alicinu u češnjaku, koji pokazuje antibakterijska i anti-gljivična svojstva (Pixelizam, 2017). To je u skladu s dobivenim rezultatima da se plijesan najkasnije pojavila na češnjaku, a dodatnim utjecajem ulja češnjaka i odgodila pojava plijesni za deset dana u odnosu na netretirani češnjak. Iako ovim istraživanjem nismo pratili razliku pojave plijesni na cijelom i rezanom povrću, različiti izvori literatura govore kako se pojava pljesnivosti povećava na rezanom povrću. Splittstoesser (1990) je dokazao da rezanje i sjeckanje zelenih mahuna i špinata dovode do povećanja populacije mikroorganizama. Razlog što nije praćen utjecaj prirodnih tvari na pojavu plijesni na cijelom svježem voću i povrću bio je zbog financijskih sredstava škole pa se takvo istraživanje može u budućnosti izvesti kako bi se usporedio utjecaj prirodnih tvari na rezano i cijelo voće i povrće. Dobivene pH vrijednosti voća i povrća u ovom istraživanju podudaraju se sa tabličnim vrijednostima pH vrijednosti voća i povrća drugih autora, ali ne i dobiveni zaključci. Prema S. Duraković i sur. (2002) niska pH-vrijednost dovodi do kvarenja pri kojem prevladavaju mikroskopske gljivice, kvasci i plijesni, što je u suprotnosti s rezultatima u ovom istraživanju. U ovom istraživanju djelovanjem prirodnih tvari na svježe voće i povrće, smanjuje se pH vrijednost u odnosu na ploške plodova prije tretiranja, što upućuje da bez obzira na još nižu pH vrijednost odgođen je razvoj plijesni zbog djelovanja prirodnih tvari propolis, vitamina C, koloidnog srebra te prirodnih ulja grejpa, echinacee i češnjaka. Niže vrijednosti pH nisu bile presudne za pojavu plijesni, već se bez obzira na sniženu pH vrijednost pojava plijesni odgodila i smanjila. Ispitivanjem nije potvrđena početna pretpostavka da zbog snižavanja pH vrijednosti, vitamin C i propolis najmanje djeluju na smanjenu zastupljenost plijesni. Pokazano je baš suprotno da propolis, ali i vitamin C jako smanjuju pojavu plijesni na svježem voću i povrću. Na početku je pretpostavljeno da će koloidno srebro (pH=7) najviše djelovati na smanjenu pojavu plijesni. Pokazalo se točnim da koloidno srebro odgađa pojavu plijesni, ali učinkovitiji se pokazao propolis, bez obzira na pH vrijednost, što još jednom pokazuje da pH vrijednost ne djeluje na razvoj plijesni na svježem voću i povrću tretiranom prirodnim tvarima. Plijesni su prirodni dio naše životne sredine i obično bezopasne. Međutim, kada koncentracija plijesni prelazi određenu razinu, to može izazvati ozbiljne zdravstvene probleme kod ljudi. O utjecaju gljivica na ljudsko zdravlje se toliko raspravlja, ali na žalost to je potpuno podcijenjena tema u javnosti. Mikoze su bolesti izazvane direktnim kontaktom s gljivicama.



Dugoročno udisanje spora plijesni je vrlo opasno. Uporabu fungicida treba izbjegavati zbog toksičnosti tih sredstava (Zotico, 2012). S obzirom da se gljivice mogu pojaviti na različitim mjestima, ne samo na hrani, ova prirodna sredstva propolis, vitamin C, koloidno srebro te prirodna ulja grejpa, echinacee i češnjaka mogu se preporučiti na temelju ovog istraživanja umjesto štetnih kemijskih sredstava i lijekova, koji se svakodnevno koriste u građevinarstvu (plijesan na zidovima) i medicini (kožna gljivična oboljenja).

ZAKLJUČCI

Na osnovu provedenog istraživanja doneseni su slijedeći zaključci:

- ✔ Bez obzira na tretiranje svježeg voća i povrća prirodnim tvarima propolisom, vitaminom C, koloidnim srebrom te prirodnim uljima grejpa, echinacee i češnjaka plijesan se pojavila, ali mnogo kasnije
- ✔ Prirodne tvari propolis, vitamin C, koloidno srebro te prirodna ulja grejpa, echinacee i češnjaka utječu na smanjenu površinsku zastupljenost plijesni na svježem voću i povrću prosječno za oko 50 %
- ✔ Ulje češnjaka najviše odgađa pojavu plijesni na svježem voću i povrću.
- ✔ Ulje echinacee najmanje djeluje na odgađanje pljesnivosti na svježem voću i povrću.
- ✔ Pod utjecajem propolisa, vitamina C, koloidnog srebra i ulja češnjaka razvoj plijesni je smanjena kod svih plodova, osobito češnjaka, gdje se plijesan uopće nije pojavila
- ✔ Ulje sjemenki grejpa i ulje echinacee podjednako djeluju na odgađanje pljesnivosti kod svih plodova
- ✔ pH vrijednost nije ograničavajući faktor za smanjenu pojavu plijesni
- ✔ Najviše snižava pH vrijednost vitamin C i propolis
- ✔ S obzirom da se gljivice mogu pojaviti na različitim mjestima, ne samo na hrani, ova prirodna sredstva propolis, vitamin C, koloidno srebro te prirodna ulja grejpa, echinacee i češnjaka mogu se preporučiti na temelju ovog istraživanja umjesto štetnih kemijskih sredstava, koji se svakodnevno koriste u građevinarstvu (plijesan na zidovima) i medicini (gljivična oboljenja kože).

ZAHVALA

Zahvaljujemo našim obiteljima na razumijevanju.

LITERATURA

- Duraković S., Duraković L. 2000. Specijalna mikrobiologija, Kugler, Zagreb, str 12-14
- Duraković S. i sur 2002. Moderna mikrobiologija namirnica, Kugler; Zagreb, str 170-198
- Džapo J., Tonšetić J., Zdražil L. 2013. Biologija 7, Profil, Zagreb, str 52-55
- Heard G.M. 2001. Fresh-cut Fruits and Vegetables, Science, Technology and Market
- Jašić M. 2010. Biološki aktivne komponente bobičastog i jagodastog voća, Zbornik radova Međunarodne konferencije Prirodom do zdravlja, Ljubuški. 1:17-25
- Pšeničnik A.M. 2013. Mikotoksini-opasnost koja vrebava iz plijesni. <http://alternativa-za-vas.com/index.php/clanak/article/mikotoksini>, pristupljeno 15.12.2016.
- Splitstoeser W.E. 1990. Vegetable Growing Handbook
- Pasarić, S. 2011. 9 prirodnih antibiotika koji će vam pomoći u borbi protiv infekcija. Alternativa za vas <http://alternativa-za-vas.com/index.php/clanak/article/9-prirodnih-antibiotika>, pristupljeno 12.2.2017.
- Pixelizam 2017. 5 snažnih prirodnih antibiotika (koje vjerovatno imate u kuhinji). Pixelizam <http://pixelizam.com/5-snaznih-prirodnih-antibiotika-koje-vjerovatno-imate-u-kuhinji/>, pristupljeno 12.2.2017.
- Zotico 2012. Gljivice i plijesni. <http://www.zotico.hr/hr/gljivice-i-plijesni.htm>, pristupljeno 12.2.2017.

ANTIBAKTERIJSKI ILI OBIČNI - PITANJE JE SAD

Nika Jurković, 8. razred

Tea Konosić, 8. razred

OŠ Brezovica, Brezovica

Mentor: Barbara Stepanić

SAŽETAK

Ima li razlike u uspješnosti antibakterijskih i običnih sapuna za ruke, vrijedi li skuplji sapun zaista više, je li istina da na ženskim rukama pronalazimo više bakterija nego na muškim? Na sva ova pitanja pokušali smo dobiti odgovor otiskujući dlanove neopranih ruku i ruku opranih različitim vrstama sapuna na hranjive podloge i prebrojavajući broj razvijenih bakterijskih kolonija. Rezultati su pokazali da uspjeh uklanjanja bakterija nije povezan s antibakterijskim svojstvima sapuna, da cijena sapuna ne garantira njegovu uspješnost i da djevojke zaista imaju više bakterija na rukama nego dječaci.

Ključne riječi: antibakterijski sapun, obični sapun, brojnost bakterija

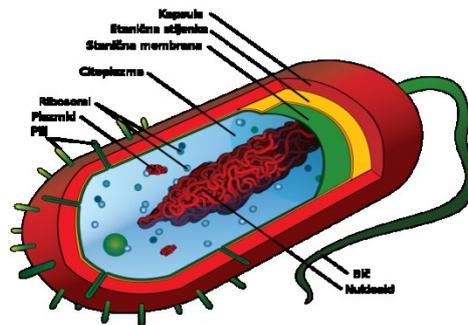
UVOD

Svakodnevno smo izloženi medijskom propagiranju raznih proizvoda za čišćenje koji ubijaju i do 99.9 % bakterija. Među ovim proizvodima nalaze se i antibakterijski sapuni za ruke. Razlikuju se od običnih po tome što sadrže neke tvari čije djelovanje uništava bakterije, dok u običnom sapunu takva tvar izostaje. Trend „zdravog“ života, dezinficiranja okoline i tijela vrlo je popularan u Hrvatskoj i u svijetu. Novija istraživanja, međutim, ukazuju na nedjelotvornost antibakterijskih sapuna, točnije, na djelotvornost u okviru običnih sapuna za ruke.

Bakterije su najbrojnija skupina organizama na Zemlji. Do sada ih je otkriveno 35 498 vrsta (Vos, 2014), a pretpostavlja se da će se razvitkom tehnologije i sekvenciranjem bakterijskog genoma otkriti i 10^7 do 10^9 vrsta (Schloss i Handelsman, 2004). Neke bakterije imaju sposobnost pretvaranja u spore kako bi mogle preživjeti u nepovoljnim uvjetima. Duljina im se kreće od 0.3 do 20 μm , a promjer od 0.5 do 2.0 μm .

Građa bakterije (Habrún, 2014) prikazana je na slici 1 (Turina, 2014):

1. Citoplazma - polutekuća tvar koja čini najveći dio bakterijske stanice. Sadrži organske i anorganske tvari te organele.
2. Nukleoid ili jezgrina tvar - ekvivalent jezgre, slobodno je rasprostranjena u središnjem dijelu citoplazme i pretežno sadrži DNK te RNK.
3. Ribosomi - kuglastoga oblika, većim dijelom sastavljeni od RNA. U njima se zbiva sinteza bjelančevina.
4. Stanična membrana - debela od 5 do 10 nm i vidljiva je elektronskim mikroskopom.
5. Stanična stijenka - čvrsta i elastična tvorevina koja okružuje stanice nekih vrsta bakterija.
6. Kapsula i glikokaliks – sluzava tvorevina na površini stanica nekih vrsta bakterija (kapsulogene bakterije).
7. Bičevi ili flagele (lat. *flagellum* – bič) – omogućavaju pokretanje nekim bakterijama (najčešće bacilima- štapićastim bakterijama).
8. Fimbrije (lat. *fimbria* – vlakno) i pili (lat. *pilius* – dlaka) uglavnom su ravne i čvrste tvorbe koje se nalaze na površini stanica gram-negativnih bakterija. Fimbrije povezuju dvije bakterije omogućujući konjugaciju - prijenos gena iz jedne u drugu.



Slika 1 Građa bakterije (Turina, 2014)

Razmnožavaju se najčešće dvojom diobom za koju im je u prosjeku potrebno 20 minuta.

U prošlosti je na ljudskoj koži bilo identificirano samo osam vrsta bakterija. Američki znanstvenici otkrili su, pak, da se danas dnevno na njoj nastani više od 182 vrste bakterija (vjeruje se da ih je oko 250 vrsta), od koji su neke samo „prolaznici“, a druge su stalni stanovnici. Većina ih za nas nije štetna, a neke su i vrlo korisne.

Bakterije koje stalno nastanjuju kožu su one iz roda *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Propionibacterium* i *Corynebacterium*. Dokazano je i da se na ženskim dlanovima nalazi više bakterija nego na muškim. To se vjerojatno događa zbog toga što su žene kao kućanice u češćem dodiru s bakterijama, kao i zbog više pH vrijednosti ženske kože u odnosu na mušku, što pogoduje razvoju bakterija (Cervantes i Chapter, 2017).

Bakterije koje nalazimo na koži imaju posebnu ulogu jer je štite od vanjskih utjecaja. Učestalo pranje ruku, posebno antibakterijskim sapunima, isušuje kožu jer uklanja korisne bakterije koje mogu spriječiti brojne kožne bolesti poput dermatitisa. Tvar antiseptičnog svojstva u sapunima je nekad uglavnom bila triklosan, dok ju danas u sve više proizvoda zamjenjuje triklokarban (Feroze i sur., 2014). Triklosan ima bolje djelovanje u tekućim, a triklokarban u čvrstim sapunima (Unilever, 2017). Obje tvari djeluju na bakterije tako što utječu na enzimske procese u citoplazmi, ili razaranje stanične membrane (Aiello i sur., 2015). Za obje tvari postoje dokazi da prodiru u kožu i na taj način mijenjaju enzimske procese ljudskih stanica i posljedično uzrokuju oboljenja ljudi u slučaju učestalog korištenja. Američka Agencija za hranu i lijekove (FDA) 2016. godine donijela je odluku o zabrani korištenja triklosana i triklokarbana u svim produktima korištenim u svakodnevnim higijenskim potrepštinama. Također, liječnici smatraju da je povećan broj alergija danas u direktnoj vezi s dezinficiranjem okoline od dojenačke dobi. Naime, zbog nedostatka tvari protiv kojih bi se imunološki sustav borio (bakterija, gljivica, plijesni i drugih organizama s kojima se svakodnevno susrećemo), tijelo „izmišlja“ tvari na koje će reagirati i stvara imunološku reakciju na tvar koja u svojoj biti nije opasna za tijelo - dlaku, pelud, prašinu i dr.

Ovim radom pokušat ćemo dokazati ima li antibakterijski sapun uistinu bolje rezultate u smanjenju broja bakterija na rukama od običnog, kao što nam reklame tvrde. Pretpostavke koje ćemo ovim radom pokušati potvrditi su da će broj kolonija razvijenih bakterija biti manji nakon pranja ruku antibakterijskim sapunom u odnosu na broj kolonija razvijenih nakon pranja običnim sapunom za ruke. Broj bakterija na rukama ženskih ispitanika trebao bi u prosjeku biti veći nego kod dječaka.

Usporedit ćemo cijenu sapuna s njegovom uspješnosti - pretpostavka je da skuplji sapun daje bolje rezultate. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem mogli bi doprinijeti širem shvaćanju dobrih i loših strana, ali i razumnom korištenju antibakterijskih sapuna u školi i u kućanstvima.

METODE RADA

Tryptic soy agar (TSA) hranjiva podloga pripravljena je u Hrvatskom veterinarskom institutu u Zagrebu uz pomoć djelatnice Instituta. Podloge se pripremaju prema standardiziranim uputama proizvođača. 20 g gotovog agara otopljeno je u 500 ml destilirane vode i nakon toga zagrijavano do vrenja nad plamenikom. Tijekom zagrijavanja Erlenmeyerova tikvica povremeno je protresena da bi se sadržaj promiješao (slika 2). Kad je dostigao točku vrenja, agar je prekriven aluminijskom folijom, odložen u mokri sterilizator na temperaturu od 121 °C tijekom 15 minuta (slika 3) i nakon toga ostavljen u sterilnoj sobi na hlađenju u vodenoj kupki temperature 45 - 50 °C. Nakon hlađenja sterilne Petrijeve zdjelice ručno se pune agarom, na debljinu 3 - 4 mm (slika 4). Disperzija i hlađenje odvija se u posebnoj prostoriji u aseptičnim uvjetima, korištenjem maske, rukavica i uz Bunsenov plamenik. Prostorija je sterilizirana UV lampom. Nakon punjenja, otisnut je rok trajanja hranjivih podloga te je zalijepljen na svaku podlogu. U projektu su korištene sterilne podloge izrađene na Veterinarskom institutu zbog nemogućnosti osiguravanja sterilnih uvjeta izrade u školi.



Slika 2 Zagrijavanje agara



Slika 3 Sterilizacija agara



Slika 4 Lijevanje agara u Petrijeve zdjelice

Uzorci su otisci dlanova osmero učenika (četiri dječaka i četiri djevojčice) trećeg i petog razreda i prikupljeni su za vrijeme nastave u školi tijekom pet dana. Prvotno je u istraživanje uključeno četvero ispitanika, a naknadno je uključeno još četvero. Nulti dan istraživanja mjereno je prosječno vrijeme pranja ruku učenika kako bismo imali vrijednost za daljnje istraživanje. Željeli smo ispitati učinkovitost sapuna u standardnoj, svakodnevnoj primjeni, a ne u posebnim, propisanim uvjetima koji za antibakterijski sapun iznose minimalno 2 minute pranja. Svaki dan, od ponedjeljka do petka, prvi su sat nastave ruke oprane običnim sapunom i dodatno prebrisane alkoholom (slika 5) kako bi se postigao što bolji efekt dezinfekcije i maksimalno smanjio broj zaostalih bakterija na rukama. Tim postupkom se trebala postići baza po kojoj se dobiva jednakost broja bakterija na početku određenog dana kod svih učenika. Na taj način dobiveni rezultati neće ovisiti o bakterijama koje su učenici na rukama donijeli u školu. Sudionicima smo dali uputu da bez ustezanja obavljaju svoje svakodnevne aktivnosti, ali da tijekom tri školska sata i odmora između njih ruke ne peru. Nakon trećeg školskog sata neoprana ruka svakog sudionika otisnuta je na zasebnu podlogu. Podloge su lijevane u Petrijeve zdjelice promjera 12 cm kako bi u njih stao cijeli dlan. Svaka podloga označena je brojem dana, imenom sudionika i na njoj je navedeno je li to podloga neoprane ili oprane ruke. Nakon otiskivanja

neopranih ruku na podlogu, ruke se peru sapunom čija se učinkovitost taj dan ispituje. U jednom danu svi sudionici peru ruke istom vrstom sapuna.

Ruke se obrišu sterilnim kompresama (slika 6) zbog sprječavanja prijenosa bakterija s nesterilnih brisača za ruke i otisnu na podloge. Kako bismo imali relevantne rezultate, svi sudionici ruke peru 20 sekundi (prosječno vrijeme pranja ruku u ispitivanju nulti dan), a držanje ruke na podlozi traje 5 sekundi. Važno je napomenuti da prva četiri sudionika prilikom pranja ruku sapunom 4 nisu ispirala sapun nakon upotrebe, nego su ruke prali jedan za drugim. Budući da smo nakon razvitka bakterija primijetili neočekivane rezultate, zadnji dan je peti - čvrsti antibakterijski sapun ispiran između korištenja i dobiveni su očekivani rezultati. Za naknadno dodane sudionike, čvrsti sapuni ispirani su nakon svakog korištenja. Uzorci na hranjivim podlogama pohranjuju se 24 sata na ručnicima na školskim radijatorima kako bi se bakterijama omogućilo razmnožavanje. Nakon 24 sata razvijene bakterijske kolonije prebrojavaju se tako da se markerom „točkaju“ kolonije s donje strane Petrijeve zdjelice (slika 7), a rezultati se upisuju u tablicu prikazanu u rezultatima (tablica 1 i 2). U istraživanju smo koristili 5 različitih sapuna. Prvi sapun bio je običan, drugi i treći antibakterijski tekući, a četvrti i peti antibakterijski čvrsti sapuni. Odlučili smo se za kombinaciju zato što smo u istraživanje htjeli uključiti i triklosan i triklokarban.



Slika 5 Brisanje ruku alkoholom



Slika 6 Brisanje sterilnim kompresama nakon pranja

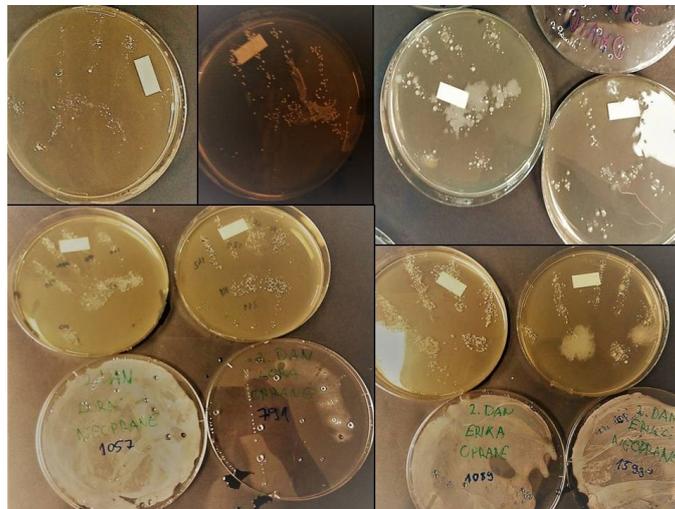


Slika 7 Podloga s prebrojanim kolonijama

Po završetku istraživanja odredit će se učinkovitost svakog od testiranih sapuna metodama razlika postotne vrijednosti razvijene bakterije, usporedbe brojnosti kolonija, kao i povezanost postotka antiseptične tvari u sapunu i broja razvijene kolonije. Usporedit će se broj bakterijskih kolonija razvijene na ženskim i na muškim dlanovima kao provjera pretpostavke da će na ženskim dlanovima biti više bakterija. Metodom direktne usporedbe pokušat će se dobiti odgovor na pitanje utječe li cijena sapuna na njegovu učinkovitost.

REZULTATI

Nakon razvitka bakterijskih kolonija u Petrijevim zdjelicama na radijatoru kroz 24 sata, dobivene su kolonije (slika 8) bile jasno vidljive golim okom i mogle su se prebrojiti.



Slika 8 Podloge s razvijenim bakterijskim kolonijama

U tablicama 1 i 2 prikazani su rezultati broja razvijenih kolonija za sve sudionike. Broj kolonija na neopranim rukama veći je, osim kod ispitanika Davida, Danijela i Lore četvrti dan.

Tablica 1 Broj bakterijskih kolonija razvijenih na podlogama s uzorcima neopranih dlanova

Neoprane ruke								
	DAVID	DANIEL	FRANKO	LUKA	LORA	ERIKA	MARIJA	NIKA
Sapun 1	259	83	713	923	741	447	657	662
Sapun 2	288	88	1.593	1.323	1.057	1.593	989	1.047
Sapun 3	359	508	609	1.035	623	394	769	670
Sapun 4	192	303	923	1.089	813	1.438	938	807
Sapun 5	1.592	178	1.059	1.047	1.182	1.602	1.838	957

Tablica 2 Broj bakterijskih kolonija razvijenih na podlogama s uzorcima opranih dlanova

Oprane ruke								
	DAVID	DANIEL	FRANKO	LUKA	LORA	ERIKA	MARIJA	NIKA
Sapun 1	83	37	317	73	465	412	76	579
Sapun 2	249	96	658	78	791	1.089	62	182
Sapun 3	153	299	289	112	210	40	494	273
Sapun 4	888	318	295	363	1.417	697	647	706
Sapun 5	243	123	798	152	413	475	1.009	441

Računali smo prosjek broja bakterijskih kolonija na podlogama s uzorcima neopranih i s uzorcima opranih ruku za svaki sapun posebno. Prosjek je dobiven tako da je zbroj razvijenih kolonija opranih ruku svih sudionika u jednom danu podijeljen s brojem sudionika (8). Isto je učinjeno i s brojem kolonija na podlogama s otiscima neopranih ruku i tako svih 5 dana ispitivanja. Dobiveni rezultati prikazani su u tablicama 3, 4 i 5. Red u kojem se nalazi sapun koji se pokazao najučinkovitijim obojan je zelenom, a red u kojem se nalazi sapun s najmanjom učinkovitošću obojan je crvenom bojom. Tablica 3 prikazuje prosjek bakterijskih kolonija na rukama svih osam sudionika. Prema dobivenim rezultatima najučinkovitiji je treći sapun (antibakterijski tekući) koji je u prosjeku uklonio 62,35 %



bakterija, a najmanje učinkovit četvrti (antibakterijski čvrsti) koji je u prosjeku uklonio tek 18,02 % bakterija.

Tablica 3 Prosjek i postotak smanjenja broja bakterijskih kolonija za sve ispitanike

Svi ispitanici			
sapun	neoprane	oprane	%
Sapun 1	560,63	255,25	-54,47
Sapun 2	997,25	400,63	-59,83
Sapun 3	620,88	233,75	-62,35
Sapun 4	812,88	666,38	-18,02
Sapun 5	1.181,88	456,75	-61,35

S obzirom na to da smo u ciljevima rada odlučili ispitati i podatak o većem broju bakterija na ženskim dlanovima, izradili smo tablice prosjeka i postotka smanjenja broja bakterijskih kolonija posebno za djevojke i dječake (tablica 4 i 5). Postotak smanjenja dobiven je tako da je broj kolonija na podlogama s otiscima opranih ruku podijeljen s brojem kolonija na podlogama s otiscima neopranih ruku i dobivena vrijednost pomnožena je sa 100 kako bismo ju prikazali u obliku postotka. Prema dobivenim rezultatima najučinkovitiji sapun kod djevojaka je treći - antibakterijski tekući (u prosjeku 58,59 % manje bakterija), kod dječaka prvi - običan (u prosjeku 74,22 % manje bakterija), a najmanju učinkovitost kod obaju spolova pokazao je četvrti sapun - antibakterijski čvrsti (kod djevojčica je u prosjeku uklonjeno 13,24 % bakterija, a kod dječaka 25,65 % bakterija). Također, broj kolonija kod djevojčica u svim je mjerenjima veći od broja kolonija razvijenih na rukama dječaka.

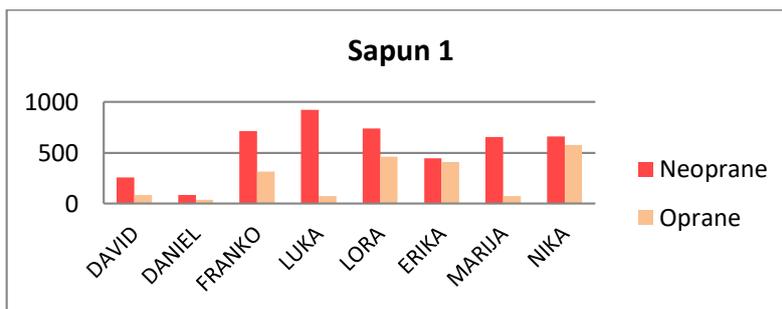
Tablica 4 Prosjek i postotak smanjenja broja bakterijskih kolonija kod djevojčica

Djevojke			
sapun	neoprane	oprane	%
Sapun 1	626,75	383,00	-38,89
Sapun 2	1.171,50	531,00	-54,67
Sapun 3	614,00	254,25	-58,59
Sapun 4	999,00	866,75	-13,24
Sapun 5	1.394,75	584,50	-58,09

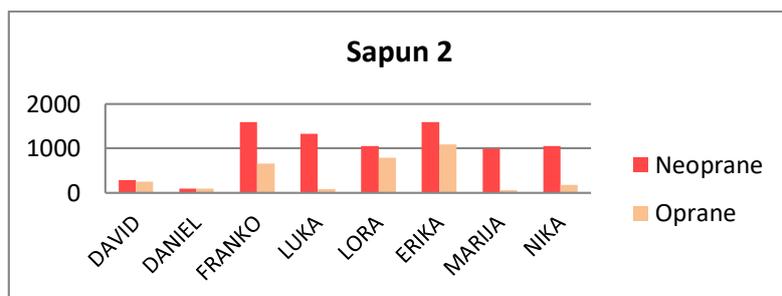
Tablica 5 Prosjek i postotak smanjenja broja bakterijskih kolonija kod dječaka

Dječaci			
sapun	neoprane	oprane	%
Sapun 1	494,50	127,50	-74,22
Sapun 2	823,00	270,25	-67,16
Sapun 3	627,75	213,25	-66,03
Sapun 4	626,75	466,00	-25,65
Sapun 5	969,00	329,00	-66,05

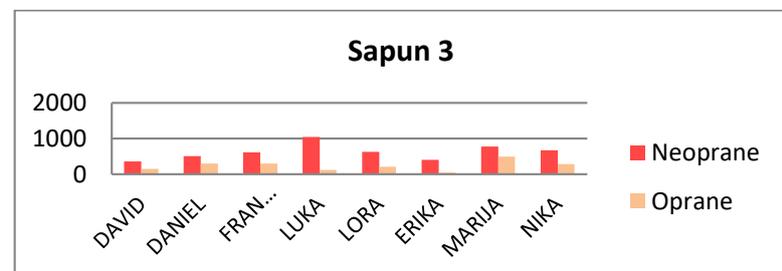
Grafičkim prikazima (slike 9 - 13) prikazali smo broj bakterijskih kolonija za svaki sapun posebno. Iz prikaza je vidljivo da sapuni 1, 2, 3 i 5 kod svih sudionika pokazuju uspješnost u vidu smanjenja broja bakterijskih kolonija nakon pranja. Sapun 4 (slika 12) kod triju je sudionika pokazao suprotne rezultate, odnosno broj kolonija razvijenih nakon pranja bio je viši nego broj kolonija razvijenih na podlogama s neopranim rukama.



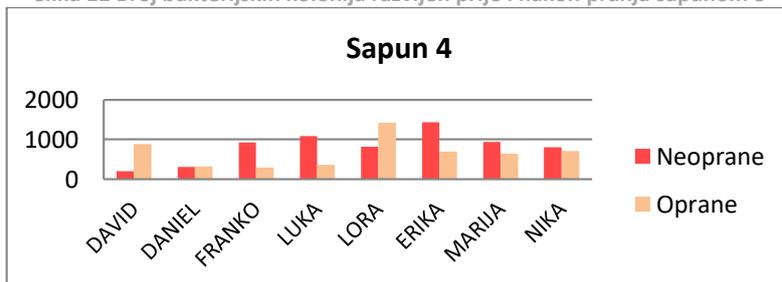
Slika 9 Broj bakterijskih kolonija razvijen prije i nakon pranja sapunom 1



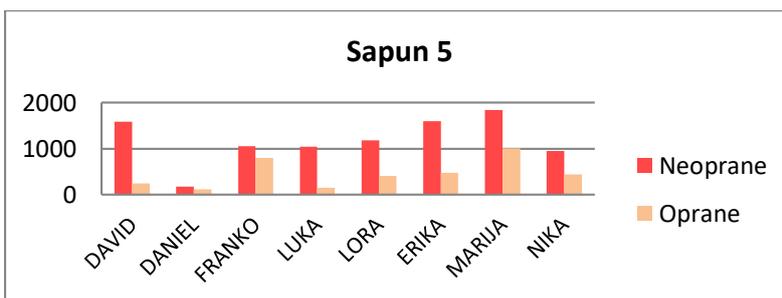
Slika 10 Broj bakterijskih kolonija razvijen prije i nakon pranja sapunom 2



Slika 11 Broj bakterijskih kolonija razvijen prije i nakon pranja sapunom 3



Slika 12 Broj bakterijskih kolonija razvijen prije i nakon pranja sapunom 4



Slika 13 Broj bakterijskih kolonija razvijen prije i nakon pranja sapunom 5



Uspoređujući rezultate svakog sapuna, vidljivo je da jedni pokazuju bolju, a drugi lošiju učinkovitost. Jedna od pretpostavki u radu bila je da će najskuplji sapun imati najbolje djelovanje, a najjeftiniji najlošije. U tablici su prikazane trenutno važeće nominalne cijene svakog od korištenih sapuna za pakiranje u kojem se nalaze u prodavaonici, kao i cijena istog sapuna za 100 g odnosno 100 ml. Ako uzmemo u obzir prosjek smanjenja broja bakterijskih kolonija kod svih sudionika, najuspješniji je sapun 3, a najlošiji sapun 4 (tablica 3). U tablici 6 vidi se da sapun 3 (označen zelenom bojom) cijenom ne odskoče (skuplji je 1,42 kn od najjeftinijeg sapuna), dok sapun 4 (označen crvenom bojom) ima puno višu cijenu u odnosu na ostale sapune (8,01 kn skuplji od najjeftinijeg). Obični je sapun najjeftiniji od svih testiranih sapuna, a u tablici 5 vidljivo je da je upravo on pokazao najveću uspješnost u uklanjanju bakterija s dlanova dječaka.

Tablica 6 Cijene sapuna

SAPUN	PAKIRANJE	CIJENA	CIJENA ZA 100g/ml
Sapun 1	500 ml	9,90 kn	1,98 kn
Sapun 2	300 ml	9,99 kn	3,33 kn
Sapun 3	500 ml	16,99 kn	3,40 kn
Sapun 4	100 g	9,99 kn	9,99 kn
Sapun 5	100 g	2,99 kn	2,99 kn

Povezanost koncentracije triklosana i triklokarbana s postotkom smanjenja broja kolonija nismo bili u mogućnosti izračunati zbog toga što samo sapun 4 ima dostupan podatak o postotku triklosana (0,75 %) u sapunu. Ostali proizvođači koje smo zamolili da nam ustupe taj podatak za potrebe istraživanja nisu odgovorili na upit.

RASPRAVA

Svakodnevno u školi ruke peremo antibakterijskim sapunom. Budući da o njima i njihovom djelovanju nismo imali puno znanja, odlučili smo ovim radom proširiti svoje spoznaje, ali i upoznati druge s potrebom korištenja antibakterijskih sapuna. Jedan od prvih ciljeva koje smo postavili u radu bio je ustanoviti koliko su zapravo antibakterijski sapuni bolji od običnih. Da bismo na to pitanje dobili odgovor, koristili smo metode objašnjene ranije, a koje su u skladu s mogućnostima rada unutar škole. Iako je očekivano i logično da antibakterijski sapun daje bolje rezultate u uklanjanju bakterija s ruku, rezultati koje smo prikupili ovim istraživanjem pokazuju da to često nije istina. Iščitavajući mnoga istraživanja (Kim i sur., 2015; Kruszewski i Krowka, 2011; Shallcross, 2015) i novinske članke (HSW, 2017) na tu ili sličnu temu, dolazimo do spoznaje da prilikom pranja ruku antibakterijskim sapunom kraće od 2 minute, učinkovitost istoga nije statistički značajno veća nego prilikom pranja običnim sapunima. Sva dosad provedena istraživanja kojima smo se služili, a govore o učinku triklosana i triklokarbana, pokazuju kako triklosan i ostala antibakterijska sredstva u antibakterijskim sapunima ne mogu donijeti bolje rezultate od običnih sapuna u kratkom vremenu primjene (ispod 2 minute). Rezultat je to djelovanja tih tvari - one razaraju stanične membrane i dijelove citoplazme bakterijskih stanica (Levy i sur., 1999; Feroze i sur., 2014) pa je vjerojatno potrebno duže vrijeme primjene da probiju zaštitnu ovojnicu i staničnu stijenkku bakterije.

Gledajući rezultate statističke obrade po sapunima za sve sudionike - srednja vrijednost broja bakterijskih kolonija neopranih i opranih ruku za svaki sapun i postotak smanjenja broja bakterijskih kolonija - dolazimo do činjenice da neki antibakterijski sapuni pokazuju značajno slabiji uspjeh od



običnog sapuna (sapun 4 u odnosu na prvi - obični sapun), dok većina (sapuni 2, 3 i 5) postiže bolji uspjeh u uklanjanju bakterija (5 - 7 % bolji rezultat). Iako se čini da tri od četiriju antibakterijskih sapuna ipak obavljaju svoju zadaću uspješnije od običnog sapuna, postavlja se pitanje je li poboljšanje 5 - 7 % u rezultatu zaista važno za svakodnevnu upotrebu. Ukoliko u taj rezultat uključimo i činjenicu da u antibakterijskim sapunima postoji i značajan broj supstanci koje isušuju kožu i čine ju podložnijom zarazama, mišljenja smo da je ta postotna razlika ipak premala da bi bila „bod u korist“ antibakterijskih sapuna u svakodnevnoj upotrebi. Pretpostavka o tome da na ženskim dlanovima ima više bakterija pokazala se točnom. Pretpostavku potvrđuje i istraživanje Fierera i sur. (2008) Dobiveni prosjek broja kolonija na podlogama s uzorcima neopranih dlanova kod djevojčica (961.2) bio je veći nego dobiveni prosjek broja kolonija na podlogama s uzorcima neopranih dlanova kod dječaka (708.2).

Prema rezultatima za svaki sapun zasebno, željeli bismo se osvrnuti na neke koji su kontradiktorni i pokušati objasniti moguće uzroke. Četvrti sapun u istraživanju bio je antibakterijski sapun u čvrstom obliku. Kod 3 od 4 prvotna sudionika uočio se znatan rast broja kolonija nakon pranja ruku sapunom. Razlog tome vjerojatno je prijenos bakterija s ruku na sapun, a zatim na iduće ruke, s obzirom na to da sapun nije ispiran između ispitanika. Zbog toga je broj bakterijskih kolonija veći na opranim nego na neopranim dlanovima kod Davida, Danijela i Lore, 2., 3. i 4. sudionika. Kod ostalih sudionika koji su naknadno uključeni u istraživanje, a kojima smo sapun ispirali nakon svakog pranja, broj bakterijskih kolonija opada nakon korištenja. Taj podatak potvrđuje i našu pretpostavku uzroka kontradiktornih rezultata. Također, daje vrijedan uvid u način korištenja čvrstih sapuna za pranje, odnosno potrebu da se on ispere prije svakog korištenja. Broj kolonija na neopranim rukama očekivano varira od sudionika do sudionika i od dana do dana s obzirom na različite predmete u kojima sudjeluju, primjerice tjelesni, na kojem dolaze u dodir s loptom ili ljestvama koje dodiruje puno ruku pa je na njima vjerojatno prisutno puno bakterija, ili pak odlaskom izvan škole gdje su bili u dodiru s travom, zemljom ili nekom drugom često korištenom površinom.

Posljednje pitanje koje smo željeli istražiti bila je ovisnost cijene sapuna s njegovom uspješnosti. Pretpostavka od koje smo krenuli bila je da će sapun s višom cijenom bolje djelovati, odnosno uspješnije uklanjati bakterije s ruku. Sudeći po rezultatima uspješnosti sapuna (tablice 3, 4 i 5) i cijene sapuna (tablica 6), vidljivo je da viša cijena proizvoda ne garantira i njegovu uspješnost. Na kraju, uzevši u obzir sve dobivene rezultate, možemo zaključiti da za malo novca možemo postići gotovo isti učinak pranja ruku kakav bismo dobili i korištenjem puno skupljih sapuna. Osim toga, koristeći obične umjesto antibakterijskih sapuna, smanjujemo mogućnost kožnih bolesti, opasnost od stvaranja rezistentnih sojeva bakterija, kao i, šire gledajući, bolju zaštitu okoliša.

ZAKLJUČCI

Na osnovu provedenog istraživanja doneseni su slijedeći zaključci:

- ✔ Antibakterijski sapuni ne pokazuju značajno bolje rezultate od običnih sapuna.
- ✔ Kod čvrstih sapuna dolazi do prijenosa bakterija na sapun pa na iduću osobu.
- ✔ Broj bakterija može biti veći na opranim dlanovima nego na neopranim.
- ✔ U slučaju korištenja čvrstih sapuna nakon nekoga, iste je potrebno isprati prije upotrebe.
- ✔ Najskuplji sapun ne pokazuje bolje rezultate od jeftinijih.



- ✔ Na ženskim se dlanovima nalazi više bakterija.
- ✔ Broj bakterija na neopranim rukama ovisan je o radnjama tijekom dana jer su svaki dan ruke izložene različitim predmetima s različitim brojem bakterija.
- ✔ Za točnije i pouzdanije rezultate potreban je veći broj ispitanika.

ZAHVALA

Zahvaljujemo učenicima naše škole koji su nam pomogli u provedbi našeg istraživanja te djelatnicima Veterinarskog instituta u Zagrebu, posebno izv. prof. dr. sc. Borisu Habrunu i dr. vet. med. Maji Stepanić zbog njihove dobre volje i pomoći u izradi hranjivih podloga.

LITERATURA

- Aiello A. E., Larson E. L., Levy S. B. 2007. Consumer Antibacterial Soaps: Effective or Just Risky? Clin Infect Dis 45 (Supplement_2): S137-S147
- Cervantes A., Chapter D. 2017. Učinkovitost različitih antibakterijskih sredstava na bakterije, National Council for Science and the Environment, <http://ncseonline.org/sites/default/files/The%20Effectiveness%20of%20Different%20Antibacterials%20on%20Killing%20Bacteria%20Angelica%20Cervantes.pdf> Pristup stranici 27.11.2016.
- Feroze K., Elsayed A., Tarek T. A. 2014. Antimicrobial activity of commercial "antibacterial" handwashes and soaps, Indian Dermatol Online J. 2014 Jul-Sep; 5(3): 344–346.
- Fierer N., Hamady M., Lauber C. L., Knight R. 2008. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria., Proc Natl Acad Sci U S A. 105(46): 17994–17999
- FDA 2016. Safety and Effectiveness of Consumer Antiseptics; Topical Antimicrobial Drug Products for Over-the-Counter Human Use, Food and Drug Administration, <https://s3.amazonaws.com/public-inspection.federalregister.gov/2016-21337.pdf> Pristup stranici 04.12.2016.
- Habrun B. 2014. Klinička veterinarska bakteriologija, Medicinska naklada Zagreb, Hrvatski veterinarski institut Zagreb, Zagreb
- HSW 2017. Is antibacterial soap any better than regular soap? HowStuffWorks <http://health.howstuffworks.com/skin-care/cleansing/myths/question692.htm>, Pristup stranici 04.12.2016.
- Kim S. A. Moon H. Lee K. Rhee M. S. 2015. Bactericidal effects of triclosan in soap both *in vivo* and *in vitro*. Antimicrob Chemother 70 (12): 3345-3352
- Kruszewski F.H., Krowka J. F. 2011. Najbolji način za određivanje učinkovitosti antibakterijskih sapuna. Fight germs now, <http://www.fightgermsnow.com/sciencefacts/fact-antibacterial-hand-soaps-provide-greater-germ-fighting-protection-than-regular-soap-and-water> Pristup stranici 2.12.2016.
- Levy C. W., Roujeinikova A., Sedelnikova S., Baker P. J., Stuitje A. R., Slabas A. R., Rice D. W., Rafferty J. B. 1999. Molecular basis of triclosan activity. Nature **398**, 383-384
- Shallcross L. 2015. Da li stvarno trebaš antibakterijska sredstva u sapunu. National public radio, <http://www.npr.org/sections/health-shots/2015/09/17/441112286/do-you-really-need-antimicrobials-in-your-soap> Pristup stranici 02.12.2016.
- Turina M. 2014. Građa stanice, <https://www.turina.org/mihael/stanica/>, Pristup stranici 28.11.2016.
- Unilever, Triclosan and triclocarban, Unilever, <https://www.unilever.com/about/innovation/Our-products-and-ingredients/Your-ingredient-questions-answered/Triclosan-and-triclocarban.html> Pristup stranici 04.12.2016.
- Vos M. 2014. Koliko je vrsta bakterija na našem planetu (How many species of bacteria are there) Coastalpathogens, <https://coastalpathogens.wordpress.com/2014/05/16/how-many-species-of-bacteria-are-there/> Pristup stranici 27.11.2016.

PROPUH U ŽIVOTU BILJAKA I LJUDI

Melita Dubravčić, 8.razred

OŠ Retkovec, Zagreb

Mentor: Kristina Vujić Teskera

SAŽETAK

U našoj se zemlji često raspravlja o mogućoj štetnosti propuha kako na ljude, tako i na biljke, ali teško je pronaći dokaze o njegovom štetnom učinku. Cilj je istraživanja ispitati utjecaj strujanja zraka prilikom propuha na biljke i ljude te, ukoliko je njegov utjecaj negativan, savjetovati konkretne mjere za sprječavanje štetnog utjecaja. Istraživanje se sastoji od eksperimentalnog i anketnog dijela. Eksperimentalni dio proveden je na biljci graha (*Phaseolus vulgaris* L.). Posađene su tri skupine biljaka od kojih su dvije izlagane propuhu sat vremena sredinom dana - jedna od sadnje, a druga nakon pojave prvih listova. Kontrolna skupina rasla je u uvjetima bez izlaganja propuhu. Izvedena su tri ponavljanja eksperimenta. Anketiranjem su obuhvaćeni ljudi iz različitih dijelova Hrvatske podijeljeni po NUTS statističkim regijama, različitih dobnih skupina i spola. Dobiveni rezultati djelomično su potvrdili postavljene hipoteze. Pokazali su da propuh destimulativno djeluje na rast *Phaseolus vulgaris* samo ako se biljka na njega nije uspjela aklimatizirati, dok kod aklimatiziranih biljaka ima pozitivan učinak na rast. Analiza rezultata po NUTS regijama pokazala je da nema razlike u osjetljivosti na propuh između stanovnika jadranske i kontinentalne Hrvatske te da većina ispitanika osjeća neugodu i ima zdravstvene probleme prilikom izloženosti propuhu. Najčešće zdravstvene tegobe su glavobolja, ukočenost vrata i leđa te suho oko, a obrada rezultata po spolu i dobnim skupinama pokazala je da se zdravstvene tegobe češće javljaju u osoba starijih dobnih skupina i žena. Propuh je važan u životu biljaka i ljudi jer je najjednostavniji način prirodne ventilacije zatvorenih prostorija i neophodan je za održavanje higijenskih i zdravstvenih uvjeta potrebnih za sva živa bića. Zbog dokazanog negativnog učinka propuha na osjetljivije organizme, preporuča se prozračivanje zatvorenih prostora dok u njima ne borave isti.

Ključne riječi: strujanje zraka, rast biljaka, zdravstvene tegobe

UVOD

Utjecaj strujanja zraka na živa bića

Usmjereno strujanje zraka u atmosferi naziva se vjetar i važan je okolišni čimbenik za sva živa bića. Glavno djelovanje strujanja zraka na žive organizme jest odvođenje topline, što se naziva gubljenje topline strujanjem. Kada je tijelo izloženo strujanju zraka, sloj zraka koji se nalazi u neposrednoj blizini kože nadomješta se novim zrakom mnogo brže nego inače. Tada se gubitak topline povećava (Guyton, 2012).

Vjetar je važan čimbenik u oprašivanju i rasprostranjanju nekih biljaka, a o strujanju zraka ovisi i difuzija ugljikovog dioksida tijekom fotosinteze te transpiracija. Sloj zraka uz list biljke nazivamo granični sloj, a njegova debljina ovisi o strujanju zraka. U uvjetima bez strujanja zraka može doseći debljinu i do nekoliko milimetara, dok za jačeg strujanja može potpuno nestati (Denffer i Ziegler, 1988). Otpor graničnog sloja treba savladati i ugljikov dioksid na svom putu do fotosintetizirajućih kloroplasta. Ako je otpor visok, ugljikov dioksid će brže stići do unutrašnjosti lista pa je granični sloj siromašniji ugljikovim dioksidom od okolnog zraka koji ga okružuje (Denffer i Ziegler 1988). Lukša i Mikulić (2012) pišu da strujanje zraka utječe na intenzitet transpiracije te da se transpiracijom regulira i temperatura. Transpiracija je proporcionalna padu vodnog potencijala (razlika u količini čestica vode u tlu, unutrašnjosti organa i atmosferi), a obrnuto proporcionalna otporima graničnog sloja prema transportu vodene pare. Vjetar smanjuje debljinu graničnog sloja s relativno velikom količinom vodene pare te time čini pad potencijala strmijim, smanjuje otpor graničnog sloja prema transportu vode što rezultira većom transpiracijom. (Denffer i Ziegler, 1988). Kao posljedicu pojačane transpiracije biljke u prirodi mogu zbog nadoknađivanja gubitka vode imati ograničeni rast (Denffer i Ziegler, 1988).



Izlaganje jačem vjetru može otežati kretanje nekih organizama te izazvati mehanička oštećenja biljaka. Djelovanje bilo kojeg nepovoljnog (biotičkog ili abiotičkog) čimbenika na rast i razvitak organizama izaziva biološko stanje stresa. Nepovoljni uvjeti mogu trajati vrlo kratko (nekoliko minuta) ili dulje razdoblje. Jedan od mogućih faktora stresa je i vjetar. Kako bi izbjegle stanje stresa, biljke imaju mogućnost aklimatizacije uvjetima na razini stanice i cjelokupnog organizma kroz morfološke ili fiziološke promjene (Vukadinović i sur., 2014).

Mjerenje i određivanje brzine strujanja zraka

Brzina vjetra mjeri se pomoću anemometra. Izražava se u metrima u sekundi (m/s). Brzina vjetra se može odrediti i bez upotrebe instrumenata, prema učinku što ga izaziva na okolinu. Takva brzina izražava se u boforima, prema britanskom admiralu Beaufortu. Beaufortova ljestvica (WSN, 2003) ima 13 stupnjeva (ljestvica ide od 0 do 12 stupnjeva), skalirano po učincima koje vjetar ima na valove, dim, drveće i sl. U ljestvici je za svaki stupanj brzine vjetra pridružen kratki opis učinka koji vjetar izaziva kao i pripadajući raspon brzina, što je prikazano tablicom 1.

Tablica 1 Beaufortova ljestvica brzine vjetra

STUPNJEVI BOFORA	NAZIV	m/s	km/h	UČINAK
0	Tišina	0 - 0,2	0 < 1	dim se diže vertikalno u vis, zastave i lišće su nepomični, površina vode poput ogledala
1	Lahor	0,3 – 1,5	1 - 5	vjetrulja se ne pokreće, može mu se razaznati smjer prema dimu koji se podiže
2	Povjetarac	1,6 – 3,3	6 - 11	vjetrulja se pokreće, lišće treperi, svilena zastava leprša, vjetar se osjeća na licu
3	Slab vjetar	3,4 – 5,4	12 - 19	lišće zajedno s grančicama se neprekidno njiše i šušti, zastava leprša
4	Umjeren vjetar	5,5 – 7,9	20 - 28	diže prašinu, suho lišće i papir s tla; zastavu drži ispruženu, njiše manje grane
5	Umjeren jak vjetar	8 – 10,7	29 - 38	njiše veće lisnate grane a i čitava mala stabla
6	Jak vjetar	10,8 – 13,8	39 - 49	svijaju se velike grane, teško je nositi otvoren kišobran, telefonske žice zvižde
7	Žestok vjetar	13,9 – 17,1	50 - 61	njiše se neprekidno veće lisnato drveće, hodanje protiv vjetra je otežano
8	Olujni vjetar	17,2 – 20,7	62 - 74	njiše čitava stabla i lomi velike grane; sprečava svako hodanje protiv vjetra
9	Jak olujni vjetar	20,8 – 24,4	75 - 88	pomiče manje predmete i baca crijep, čini manje štete na kućama i drugim objektima
10	Orkanski vjetar	24,5 – 28,4	89 - 102	obara drveće i čupa ga s korijenjem; čini znatne štete na zgradama
11	Jak orkanski vjetar	28,5 – 32,6	103 - 117	čini teške štete, na većem području djeluje razorno
12	Orkan	32,7 - 36,9	>118	opustoši čitav jedan kraj

Efekt propuha

Ljudi se suvremenim načinom života sve više zadržavaju u zatvorenim prostorijama u kojima zajedno s njima borave i biljke. Svaka prostorija ima svoju klimu, tzv. klimu prostorije, koja je određena temperaturom, vlažnosti zraka, brzinom strujanja zraka, razinom buke, rasvjetom te izmjenom svježeg zraka. Izmjena zraka u prostoriji naziva se ventilacija. Prijeko je potrebna jer se na taj način odvodi zrak onečišćen neugodnim mirisima, vodenom parom od disanja i znojenja, bakterijama, virusima i



prašinom iz prostorija, a u prostoriju se dovodi zrak iz atmosfere. Time se ujedno sprječava i stvaranje plijesni i gljivica u zatvorenim prostorijama te se održavaju higijenski i zdravstveni uvjeti pogodni za sva živa bića. Najjednostavniji način ventilacije prostorije je prirodna ventilacija povremenim otvaranjem prozora ili vrata. Prirodnom ventilacijom prostorije postiže se efekt propuha (Zagorec i Donjerković, 2006). Brzine strujanja zraka do 0,25m/s ne utječu značajno na toplinsku ugodnost (Radanović, 2016). Za potrebe ovog istraživanja propuhom sam smatrala strujanje zraka unutar prostora, usmjereno između dva suprotno pozicionirana otvora i postignute brzine iznad 0,2 m/s. To je po Beaufortu najmanje vjeter stupnja 1 (lahor).

Tijekom pohađanja osnovne škole primijetila sam da mnogi učenici izjavljuju da im smeta izloženost propuhu ili se jednostavno sklanjaju s područja strujanja zraka. Također, uočila sam da su školskoj sobnoj biljci fikus benjamin (*Ficus benjamina* L.), koja se nalazila u školskom hodniku s pojačanim strujanjem zraka (propuhom), počeli otpadati listovi. Nakon što je biljka premještena na područje koje nije izloženo propuhu, otpadanje listova je prestalo i biljka se počela oporavljati. Proučavanjem dostupne literature nisam naišla na znanstveno potkrijepljene dokaze o direktnoj povezanosti utjecaja propuha i točno definiranih uzročno-posljedičnih promjena u ljudi i biljaka. Ipak, dostupne preporuke za uzgoj sobnih biljaka preporučuju da se određene biljke ne izlažu propuhu, a o promjenama koje duže izlaganje propuhu (preko sat vremena), pri razlici unutarnje i vanjske temperature od desetak stupnjeva, izaziva u ljudi piše Šitić (2008) te navodi da propuh izaziva ukočenost mišića. Uvidjevši utjecaj strujanja zraka na ljude i biljke, opažene stavove učenika, morfološke promjene kod školske sobne biljke i objave pojedinih autora, pretpostavila sam da će se i druge biljke izložene propuhu morfološki razlikovati od onih koje nisu izložene propuhu te da će posljedica izlaganja propuhu u ljudi izazvati uočljive zdravstvene tegobe.

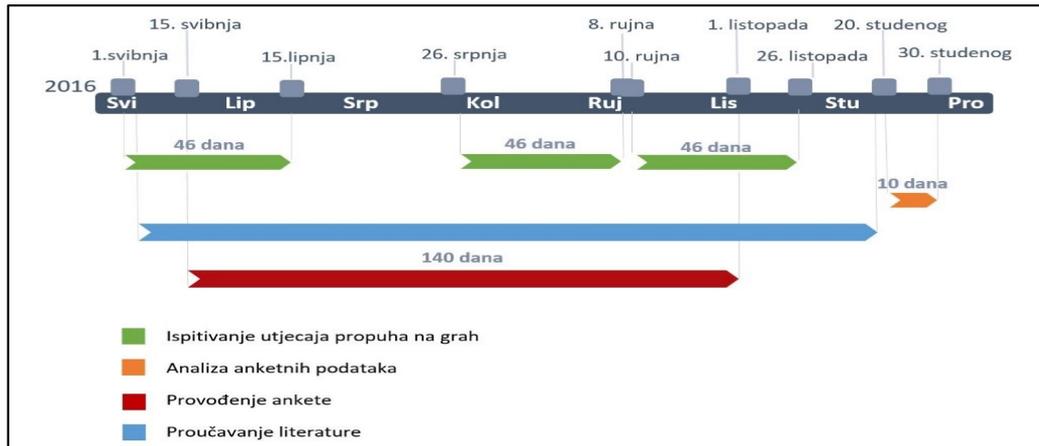
Istraživanje je temeljeno na pitanju: „Utječe li propuh na biljke i ljude?“ Eksperimentalnim radom istražiti će se utjecaj propuha na rast stabljike i površinu listova mladica graha (*Phaseolus vulgaris*). Anketiranjem ispitanika iz različitih dijelova Republike Hrvatske istražiti će se osjećaj neugode i pojava zdravstvenih tegoba u ljudi. Cilj je istražiti utjecaj propuha na biljke i ljude te ukoliko propuh na negativan način utječe na zdravlje ljudi i razvoj biljaka, temeljem dobivenih rezultata, savjetovati konkretne mjere za izbjegavanje negativnog učinka.

U radu su postavljene sljedeće hipoteze:

- Izlaganje biljaka propuhu ograničavajuće djeluje na njihov rast.
- Biljke izložene propuhu razvit će manju površinu listova.
- Posljedica izloženosti propuhu u ljudi su zdravstvene tegobe koje su prisutne u svim dobnim skupinama.
- Osjetljivost organizma na propuh češća je u starijoj dobnj skupini i češća je u žena.
- Nema značajne razlike u osjetljivosti na propuh između stanovnika jadranske i kontinentalne Hrvatske.

METODE RADA

Istraživanje je temeljeno na eksperimentalnom i anketnom dijelu te analizi dobivenih podataka. Plan i vremenski okvir istraživanja prikazan je slikom 1.



Slika 1 Prikaz provedenog istraživanja

Eksperimentalni dio istraživanja

Korištene su sjemenke šarenog graha (*Phaseolus vulgaris* L.) jer je biljka jednostavna za održavanje i u kratkom se vremenu razvije u odraslu biljku koja procvjeta i daje plod. Posađene su u jednake plastične posudice te jednaku količinu i vrstu zemlje. Univerzalnim indikatorskim papirom određen je pH zemlje. Zalijevane su istom količinom vode. Tijekom istraživanja sve su biljke postavljene na istu prozorsku dasku i primale jednaku količinu svjetlosti te bile u prostoriji jednake temperature i vlažnosti. Eksperiment je ponavljan tri puta. Korišteno je 27 sjemenki podijeljenih u 3 skupine:

- Prva skupina svakodnevno je izlagana propuhu od dana kada su sjemenke posađene.
- Druga skupina nije nikada izlagana propuhu (kontrolna skupina).
- Treća skupina počela se svakodnevno izlagati propuhu tek nakon što su se pojavili prvi listovi.

Promatrane su morfološke promjene na biljkama koje su bile izlagane propuhu svaki dan sat vremena i razlike u odnosu na kontrolnu skupinu koja nije bila izlagana propuhu.

Efekt propuha postignut je otvaranjem dvaju suprotno pozicioniranih prozora. Kontrolna skupina je zaklonjena od strujanja zraka na paralelni prozor u istoj prostoriji kako bi sve biljke cijelo vrijeme primale jednaku količinu svjetlosti. Zatvaranjem prozora i prestankom propuha, sve su skupine vraćene na polaznu prozorsku dasku. Tijekom provedbe istraživanja za mjerenje brzine strujanja zraka korišten je generički anemometar i klasifikacija po Beaufortovoj skali. Temperatura i vlažnost zraka, za vrijeme propuha kao i u sobnim uvjetima, mjerena je digitalnim higrometrom/termometrom „Avidsen“. Centimetarskom skalom mjerene su visine izdanaka biljaka. Na kraju istraživanja, pomoću iste centimetarske skale, izmjerene su konačne visine/dužine izdanaka svih biljaka. Uz pomoć milimetarskog papira na koji je preslikan svaki list, izračunate su površine svih listova. Tijekom cijelog rada vođen je dnevnik opažanja s tablicama mjerenih vrijednosti.

Dobiveni podatci o površinama listova statistički su obrađeni uz pomoć programa Minitab. Primijenjena je metoda deskriptivne statistike za organizaciju, prikaz i obradu prikupljenih podataka. Konačni su rezultati o visinama stabljike i površinama listova prikazani grafički. Grafički su prikazane i mjerene vrijednosti brzine strujanja zraka i temperatura.

Anketni dio istraživanja

Anketirane su osobe različite životne dobi, u rasponu od 7 do 80 godina starosti i iz različitih dijelova Republike Hrvatske. Ukupno je anketirano 203 ispitanika. Anketni upitnik sastojao se od 10 pitanja koja

su bila lako razumljiva i jasno postavljena, kako bi se prikupili što točniji podatci. Prikupljani su podatci o iskustvu ispitanika tijekom i nakon izlaganja propuhu, navikama vezanim za propuh u obitelji ispitanika te opaženom utjecaju propuha na osobno zdravlje. Anketiranje je u najvećoj mjeri provedeno osobnim kontaktom s ispitanikom te u manjoj mjeri elektroničkim putem (e-mailom). Tijekom obrade podataka ankete ispitanika razvrstavane su prema NUTS statističkim regijama, spolu i dobnoj skupini.

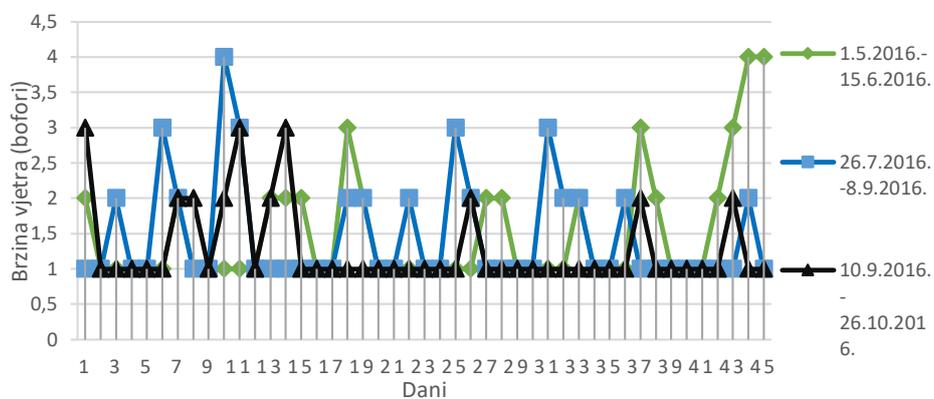
Dobiveni odgovori o upozoravanjima tijekom djetinjstva na štetnost ili korisnost od propuha, osjećaju ugodnosti ili neugodnosti na propuhu te zdravstvenim problemima za koje misle da je uzrokovao propuh tablično su zapisivani i konačno grafički prikazani.

REZULTATI

Eksperimentalni dio istraživanja

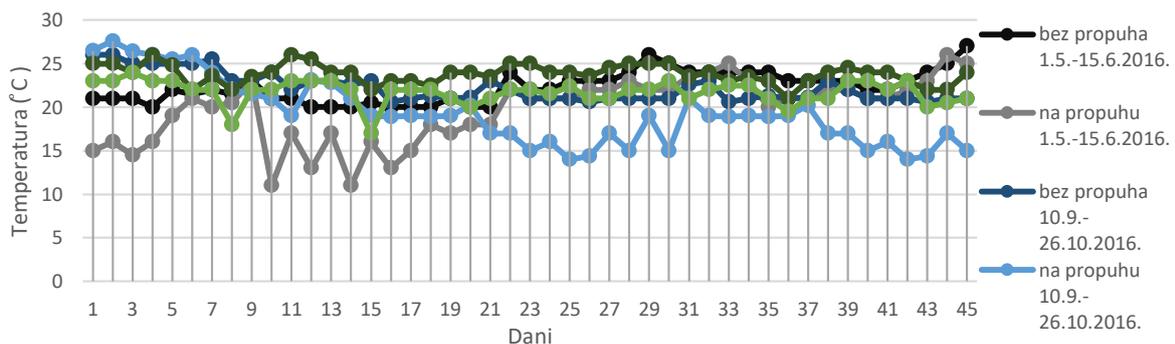
Sve tri skupine *Phaseolus vulgaris*, u sva tri ponavljanja, razvile su vegetativne i rasplodne organe.

Izmjerene brzine vjetra, tijekom propuha kojem su izlagane biljke graha, iskazane su prema Beaufortovoj skali i prikazane su slikom 2.



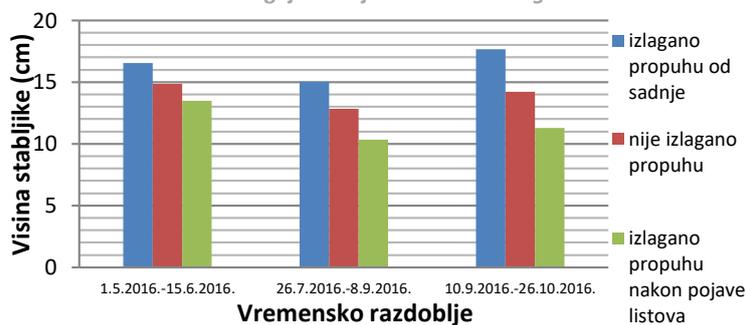
Slika 2 Brzina strujanja zraka u uvjetima na propuhu

Količina svjetlosti koje su biljke primale i količina zemlje u kojoj su bile posađene jednaka je za sve tri skupine biljaka, kao i količina vode kojom su zalijevane. Vrsta zemlje u koje su posađene blago je kisele reakcije, s izmjerenom pH vrijednosti 6,0. Brzina strujanja zraka utjecala je na temperaturu i relativnu vlagu zraka. Postotak vlage kretao su unutar raspona 42% - 49% u uvjetima bez propuha te 36% - 45% prilikom izloženosti propuhu. Izmjerene temperature zraka u sva tri ponavljanja prikazane su slikom 3.

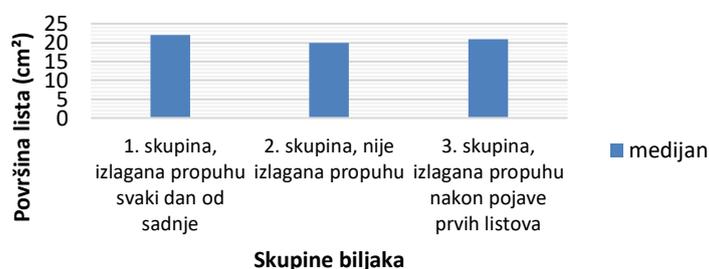


Slika 3 Raspon temperatura

U sva tri ponavljanja uočeno je da skupina biljaka koja je od sadnje bila izlagana propuhu (1. skupina) ima najviši rast stabljike, a skupina koja je izlagana propuhu tek nakon pojave prvih listova (3. skupina) ima najniži rast stabljike u odnosu na kontrolnu skupinu (2. skupina). Rezultate u visinama biljaka prikazuje slika 4, ali odnos treba shvatiti relativno jer biljke koje su bile izlagane propuhu imaju lagano savinute stabljike. Izmjerene visine stabljika prikazuje graf (slika 5).

Slika 4 Uzgajane biljke *Phaseolus vulgaris*Slika 5 Visine stabljike *Phaseolus vulgaris*

Slikom 6 prikazane su površine listova u međusobnim odnosima skupina biljaka. Kao srednju vrijednost korišten je medijan iz razloga što distribucija nije Gausova pa on pruža realniju sliku srednje vrijednosti u odnosu na aritmetičku sredinu. Statistička analiza pokazala je kako u površinama listova među skupinama nema statistički značajne razlike.

Slika 6 Površine listova *Phaseolus vulgaris* (medijan)

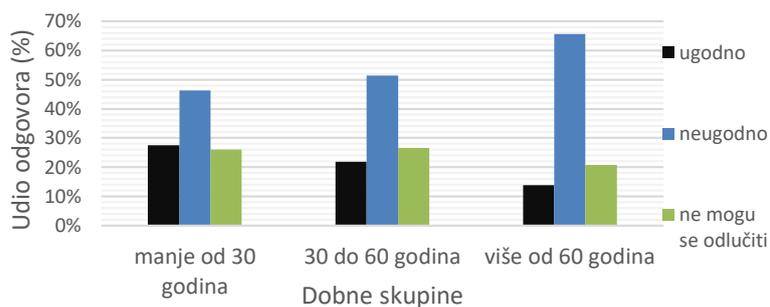
Anketni dio istraživanja

Rezultati anketa (prilog 1) pokazali su kako je čak 77% ispitanika tijekom djetinjstva bilo vrlo često upozoravano na štetnost propuha, dok je bilo vrlo malo onih koji su smatrali da je djelovanje propuha korisno, a ne štetno (slika 7).



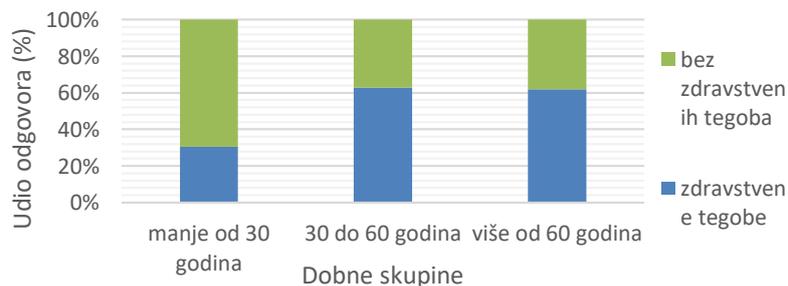
Slika 7 Prenesena iskustva tijekom djetinjstva

Na slici 8 vidljivo je da se osjetljivost na propuh razlikuje između dobnih skupina te da je osjećaj neugode najučestaliji u starijih ljudima.



Slika 8 Osjećaj prilikom izloženosti propuhu s obzirom na dob

Zdravstvene tegobe javljaju se u svim dobnim skupinama, ali je učestalost značajno veća u skupini 30 do 60 godina i preko 60 godina u odnosu na učestalost u skupini mlađoj od 30 godina (slika 9). Distribucija zdravstvenih tegoba s obzirom na spol pokazuje veću učestalost u žena (slika 10).



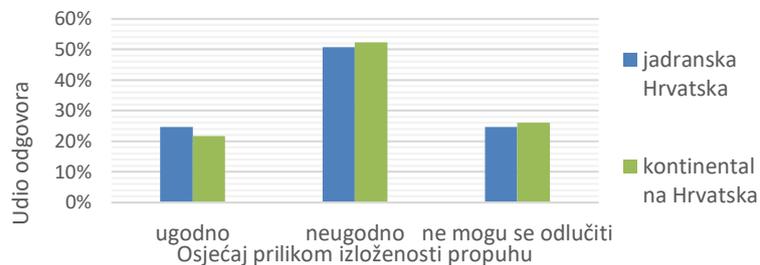
Slika 9 Učestalost zdravstvenih tegoba kao posljedica propuha s obzirom na dob



Slika 10 Učestalost zdravstvenih tegoba kao posljedica propuha s obzirom na spol

Od zdravstvenih tegoba najčešće se javlja glavobolja (50%), bolovi u vratu (29%) i bolovi u leđima (21%) te problemi s očima (8%) i sinusima (7%).

Analiza anketnih podataka pokazala je kako, u skladu s našim pretpostavkama, između ljudi kontinentalne i jadranske hrvatske nema značajne razlike u osjetljivosti na propuh (slika 11).



Slika 11 Osjećaj na propuhu prema NUTS regijama

RASPRAVA

Utjecaj propuha na biljke

Analizom rezultata triju skupina biljaka *Phaseolus vulgaris* s različitim izloženostu propuhu ustanovljeno je da su sve biljke razvile vegetativne i rasplodne organe. Hodges i sur. (2004) navode kako biljke *Phaseolus vulgaris* zaštićene od vjetra imaju veću ukupnu površinu listova i viši rast od vjetru izloženih biljaka (do 4 m/s). Dobiveni rezultati u ovome radu pokazuju da u ukupnim površinama listova nema statistički značajne razlike, što je suprotno pretpostavkama, ali razlika među skupinama vidljiva je u visinama stabljike.

Nisu pronađeni istraživački radovi koji ciljano ispituju povezanost propuha i razvoja biljaka. Pronađeni radovi istraživali su utjecaj vjetra na rast biljaka na otvorenom, gdje su pojedine biljke konstantno izložene različitim brzinama vjetra. Reese (1980) u svom istraživanju zaključuje da vjetar nepovoljno utječe na rast mladih stabla *Pinus contorta*. Bang i sur. (2010) istražuju rast *Encelia farinosa* u zaštićenoj urbanoj sredini te otvorenoj sredini zaštićenoj vjetrobranima gdje brzina vjetra ne prelazi 1,5 m/s (lahor po Beaufortu) i uspoređuju ih s uvjetima izloženosti prirodnom vjetru. U objavljenom radu zaključuju da smanjena brzina vjetra poboljšava rast biljke. Škvorc i sur. (2012) zaključuju kako je uspješan vegetativni rast šumskoga drveća usko povezan s visokim intenzitetom fotosinteze. U ovom je istraživanju skupina biljaka, koja je od sadnje svaki dan izlagana propuhu, najviše narasla u visinu, dok je skupina biljaka koja je tek nakon pojave prvih pravih listova izlagana propuhu najniža. S obzirom na činjenicu da su, osim izloženosti propuhu, ostali mikroklimatski uvjeti bili jednaki u svim ispitivanim skupinama (pH i vrsta tla, količina vode kojom su zalijevani, veličina posudice, količina svjetlosti), razlike u visinskom rastu mogu se pripisati utjecaju propuha, kojem su izlagane jedan sat tijekom sredine svakog dana (brzine strujanja zraka do max 4 m/s). Prozračivanje je prilikom uzgoja biljaka u zaštićenim prostorima od velike važnosti jer u suprotnom kod biljke može doći do toplotnog stresa (Teklić, 2006). Biljke *Phaseolus vulgaris* u zatvorenim prostorima zbog slabe cirkulacije zraka su okružene debljim graničnim slojem zraka. Prozračivanjem je omogućeno odstranjivanje graničnog sloja zasićenog vodenom parom te se time u vrijeme izloženosti propuhu povećava transpiracija i difuzija ugljikovog dioksida (Denffer i Ziegler, 1988). U uvjetima jednake vlažnosti tla i jednake količine svjetlosti, povećana difuzija ugljikova dioksida u uvjetima propuha može poboljšati fotosintezu i stvaranje



ugljikohidrata potrebnih za rast biljke (Škvorc i sur., 2012). Izmjerena vlažnost od 42% - 49% u uvjetima bez propuha te 36% - 45% prilikom izloženosti propuhu kretala se unutar optimalnih (40% - 60%) do prihvatljivih (20% - 70%) uvjeta za zatvorene prostorije (PL, 2016). Propuh kojem su izlagane biljke utjecao je na temperaturu, koja je važan čimbenik u uzgoju graha. Izmjerene temperature kretale su se unutar ekološke valencije za *Phaseolus vulgaris*, koja iznosi 12°C do 35°C (Teklić, 2006). Biljke koje su od početka izlagane propuhu uspjele su se prilagoditi ovim promjenama temperature, a strujanje zraka kojem su bile izložene imalo je pozitivan učinak na fiziološke procese pa su kao posljedica toga izrasle više od kontrolnih skupina i razvile jednaku površinu listova. Teklić (2006) piše kako nagla izmjena visokih i niskih temperatura djeluje stimulacijski na protoplazmu, što se očituje u stimulaciji rasta i razvoja. Svakodnevne oscilacije u temperaturi te moguća povećana transpiracija i fotosinteza mogle su stimulirati rast *Phaseolus vulgaris*.

Vjetar može biti stresni faktor za biljku kojemu se biljka može aklimatizirati na razini stanica ili fiziološkom promjenom biljke (Vukadinović i sur., 2014). Škvorc i sur. (2012) navode da utjecaj raznih tipova okolišnog stresa na šumsko drveće dovodi do smanjene produkcije ugljikohidrata potrebnih za normalan vegetativni razvoj. Skupina biljaka koja je u početku bila bez propuha te je propuhu izlagana tek nakon izrasta prvih pravih listova, pretrpjela je fizikalni stres prema kojem se nije uspjela aklimatizirati. To se očitivalo kao smanjeni rast te skupine biljaka u odnosu na kontrolnu skupinu, kao i onu koja je od početka izlagana propuhu. Dobiveni rezultati djelomično potvrđuju postavljenu hipotezu o ograničavajućem utjecaju propuha na rast biljke, odnosno utjecaj je ograničavajući samo u biljaka koje se na propuh nisu uspjele aklimatizirati. Istraživanjem na većem broju *Phaseolus vulgaris* i različitim vrstama biljaka rezultati se mogu dodatno provjeriti.

Utjecaj propuha na ljude

Ispitanici iz različitih dijelova Hrvatske zbog obrade rezultata razvrstani su u dvije skupine, po Nacionalnoj klasifikaciji prostornih jedinica za statistiku (NUTS regije): kontinentalna Hrvatska i jadranska Hrvatska. U skladu s našim pretpostavkama, distribucija osjećaja i zdravstvenih problema prilikom izlaganja propuhu po NUTS regijama nije pokazala statistički značajne razlike.

Većina ispitanika (77%) kroz djetinjstvo je vrlo često bilo upozoravano na moguću štetnost propuha. Nije pronađeno objavljenih članaka koji bi objasnili ovaj rezultat. Ipak, budući da je učestalost zdravstvenih tegoba češća u osoba starijih od 30 godina i činjenica da oni kao roditelji prenose svoja vlastita iskustva na djecu, potvrđuje ovaj rezultat. Analiza anketnih podataka pokazala je kako se većina ispitanika osjeća neugodno prilikom izloženosti propuhu te ima zdravstvene probleme nakon izlaganja propuhu. Propuh je kao neželjeno lokalno hlađenje tijela uzrokovano pojačanim strujanjem zraka najutjecajniji faktor lokalne neugode i najviše je osoba nezadovoljno zbog toga (Radanović, 2016). Osjećaj neugode najizraženiji je u skupini ispitanika starijoj od 60 godina, gdje se preko 65% ispitanika izjasnilo za neugodu, što je u skladu s pretpostavkama rada. Neugoda je prisutna i u ostalim dobnim skupinama, ali u manjoj mjeri. Učestalost u skupini do 30 godina je najmanja (46%) a u skupini 30-60 godina ona iznosi 51%. Strujanje zraka zbog propuha pojačano odvodi toplinu s izloženog dijela tijela i snižava mu temperaturu. Snižavanje tjelesne temperature pokreće mehanizme regulacije (Guyton, 1989) pa se javlja lokalna vazokonstrikcija (sužavanje žila da se spriječi gubitak topline), koja pojačava osjećaj hladnoće te pojačan rad mišića (drhtanje). Sve to rezultira osjećajem neugode, posebice u starijih ljudi kod kojih temperatura može lakše pasti ispod normalne granice. Normalna se



tjelesna temperatura čovjeka snižava s dobi (Gunes i Zaybak, 2008) i imunološki odgovor slabi (Castle i sur., 1991) a među rizične čimbenike nastanka bolesti u starijoj dobi Tomek – Roksandić i sur. (2003) navode i propuh.

Distribucija zdravstvenih tegoba po spolu u ovom istraživanju pokazuje da su tegobe češće prisutne u žena (64%) što je u skladu s postavljenom hipotezom. Za objašnjenje ovih rezultata anketni upitnik nije dovoljan pa bi to trebalo dodatno istražiti.

Nakon izloženosti propuhu ukupno 52% ispitanika navodi zdravstvene tegobe (nekad i više od jedne). Učestalost zdravstvenih problema izraženija je u ljudi starijih od 30 godina što je djelomično u skladu s postavljenom hipotezom. Od zdravstvenih tegoba najčešće se javlja glavobolja (50%), bolovi u vratu (29%) i bolovi u leđima (21%) te problemi s očima (8%) i sinusima (7%). Glava i vrat su dijelovi tijela koji su najmanje pokriveni odjećom pa strujanje zraka zbog propuha pojačava izdavanje topline (Guyton, 1989). Hladnoća lokalno dovodi do vazokonstrikcije i boli (Gamulin i sur., 1988) te grča zatiljnih mišića i glavobolje (Gamulin i sur., 1988). Šitić (2008) piše da dugotrajniji boravak na propuhu može izazvati ukočenost i bol zbog pothlađivanja mišića, pri čemu je grč najbolja obrana, ali i tegobe sa sinusima i glavobolje. O povezanosti problema očiju i propuha piše Mesnić (2012) te navodi da je suho oko uobičajen očni problem i među najčešće dijagnosticiranim u oftalmološkoj praksi. Učestalost njegove pojave u dobnoj skupini od 30 do 60 godina je oko 11%, s tim da se češće javlja u žena i starijih osoba (75% populacije starije je od 60 godina). Savjetuje da se za otklanjanje ovog problema izbjegavaju štetni utjecaji iz okoline; prašnjavi i zadimljeni prostori, propuh, klimatizirani prostori te ovlaživanje zraka.

Zdravstveni problemi uzrokovani propuhom dokazano postoje, posebno u osjetljivije populacije. S druge strane postoji i potreba za prozračivanjem prostorija u kojima ljudi sve dugotrajnije borave (na poslu, u školi, u trgovačkim centrima ili svojim domovima). Te su prostorije zagađene neugodnim mirisima, imaju smanjenu količinu kisika i pojačanu količinu ugljikovog dioksida, kontaminirane su bakterijama i virusima. Postoji mehanička i prirodna ventilacija čija je uloga izmjena zraka iz prostorije s onim iz atmosfere. (Zagorec i Donjerković, 2006). Capak i sur. (2015) dolaze do podataka da u osnovnim školama Republike Hrvatske učionice u 97,98% slučajeva provjetravaju prirodnim putem, otvaranjem i zatvaranjem prozora. Time se postiže najintenzivnija izmjena zraka u učionicama, a često i efekt propuha. Štetni zdravstveni učinci nedovoljne ventilacije učionica su: slabljenje kognitivnih funkcija, problemi s pamćenjem te češće glavobolje i respiratorne infekcije (Capak i sur., 2015). Infekcije koje najčešće zahvaćaju dišni sustav šire se zrakom. Infektivni agensi izbacuju se govorom, kihanjem i kašljanjem zaražene osobe (Gamulin i sur., 1988). Cilj ovog istraživanja bio je istražiti utjecaj propuha na biljke i ljude te, ukoliko je riječ o negativnom učinku, savjetovati konkretne mjere za izbjegavanje istog. S obzirom na navedene činjenice i dobivene rezultate, preporučam redovito prozračivanje učionica i prostorija u kojima ljudi učestalo borave, ali uz uvjet da se osobe ne izlažu direktnom djelovanju propuha. Time bi se pomoglo našim kolegama i prijateljima te doprinijelo smanjenju zdravstvenih tegoba koje prate učenike, a povezane su s izloženošću propuhu.

ZAKLJUČCI

Na osnovu provedenog istraživanja doneseni su slijedeći zaključci:

- ☑ Propuh koji djeluje kao prirodna ventilacija koristan je za *Phaseolus vulgaris* u zatvorenom prostoru i može stimulativno djelovati na rast.



- ☑ Izlaganje biljke propuhu, koja nije imala prilike aklimatizirati se na njega, izazvat će biljni stres što uzrokuje smanjeni rast biljke.
- ☑ Biljke *Phaseolus vulgaris* izložene propuhu u bilo kojem vegetativnom razdoblju razvit će jednaku površinu listova kao i one koje nisu izložene propuhu.
- ☑ Zdravstveni se problemi uzrokovani propuhom javljaju u svim dobnim skupinama.
- ☑ Zdravstveni su problemi uzrokovani propuhom češći u zreloj i staroj dobnj skupini i u žena.
- ☑ Osjetljivost na propuh podjednaka je u osoba iz različitih dijelova Hrvatske.
- ☑ Prostorije u kojima ljudi borave duže vrijeme potrebno je provjetravati mehaničkom ventilacijom ili prirodnim putem, pazeci da pritom nisu izravno izloženi propuhu.
- ☑ Ukoliko smo ipak izloženi strujanju zraka prilikom propuha, potrebno je izložene dijelove tijela dodatno zaštititi kako bismo spriječili njihovo hlađenje te pojavu neugode, grčeva i boli.

LITERATURA

- Bang C., Sabo J. L., Stanley H. F. 2010. Reduced Wind Speed Improves Plant Growth in a Desert City. *Journals Plos.* <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0011061>, pristupljeno 30.11.2016.
- Capak i sur. 2015. Zdravstveno-ekološki čimbenici u osnovnim školama u Republici Hrvatskoj, U Stevanović R., Pavić Šimetin I. (ur.), Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, str. 29, 76-77.
- Castle SC i sur., 1991. Fever response in elderly nursing home residents: are the older truly colder?. *Journal of the American Geriatric Society* 39 (9):853-7
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1885858?itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum&ordinalpos=1, pristupljeno 12.10.2016.
- Denffer D., Ziegler H. 1988. Fiziologija, U Sambolik-Hrbić E. (ur.), Morfologija i Fiziologija: Udžbenik botanike za visoke škole. Školska knjiga, Zagreb, str. 289, 350 - 353, 447.
- Andreis I. i sur. 1988. Patofiziološka podjela boli, U Gamulin S. Marušić M. Krvavica S. (ur.), Patofiziologija. Jumena, Zagreb, str. 441- 452.
- Andreis I. i sur. 1988. Biološki etiološki čimbenici, U Gamulin S. Marušić M. Krvavica S. (ur.), Patofiziologija. Jumena, Zagreb, str. 694.
- Guyton A. C., Hall J. E. 2012. Temperatura tijela, regulacija temperature i vrućica, U Kukulja Taradi S., Andreis I. (ur.), Medicinska fiziologija. Medicinska naklada, Zagreb, str. 867 - 872.
- Guyton A. C., Hall J. E. 1989. Tjelesna temperatura, regulacija temperature i vrućica, U Fišter V., Čulo F. (ur.), Medicinska fiziologija. Medicinska naklada, Zagreb, str. 1208 - 1215.
- Güneş, Ü. Y. and Zaybak, A. (2008). Does the body temperature change in older people?. *Journal of Clinical Nursing*, 17: 2284–2287. doi:10.1111/j.1365-2702.2007.02272.x <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2702.2007.02272.x/full>, pristupljeno 12.10.2016.
- Hodges i sur. 2004. Growth nad Yield of Snap Beans as Affected by Wind Protection and Microclimate Change due to Shelterbelts and Planting Dates. *HortScience* 39(5):966-1004.
- Lukša Ž., Mikulić S. 2012. Promet vode u biljkama, U Čorić S. (ur.), Život 3: udžbenik biologije u trećem razredu gimnazije. Školska knjiga, Zagreb, str. 142-153.
- Mesnić M. 2012. Iglicama prožet pogled. *Vaše zdravlje* br. 87 (12/12). <http://www.vasezdravlje.com/izdanje/clanak/2646/>, pristupljeno 26.11.2016.
- PL 2016. Optimalna temperatura i vlažnost za ugodan boravak. Pro Luft. <https://proluft.hr/korisni-savjeti/vlaqa/optimalna-temperatura-i-vlaznost-za-ugodan-boravak>, pristupljeno 28.2.2017.
- Radanović H. 2016. Pregled tipova i karakteristika termostata. diplomski rad. Fakultet strojarstva i brodogradnje. Sveučilište u Zagrebu, str. 6-8. http://repositorij.fsb.hr/5244/1/Radanovic_2015_Diplomski.pdf, pristupljeno 8.11.2016.
- D.J. REES, J. GRACE; The Effects of Wind on the Extension Growth of *Pinus contorta* Douglas. *Forestry (Lond)* 1980; 53 (2): 145-153. doi: 10.1093/forestry/53.2.145 <http://forestry.oxfordjournals.org/content/53/2/145.short>, pristupljeno 26.11.2016.
- Šitić T. 2008. Fizikalna terapija. Puntalo me u škinu. *Vaše zdravlje* br. 59 (04/08). <http://www.vasezdravlje.com/izdanje/clanak/1372>, pristupljeno 15. 5. 2016.
- Škvorc Ž. i sur. 2012. Intenzitet fotosinteze i vegetativni rast hrasta lužnjaka (*Quercus robur L.*) u pokusnom nasadu. *Šumarski list* br. 1-2: 7-17.
- Teklić T. 2006. Poljoprivredna ekologija. Poljoprivredna ekologija i ekonomika okoliša. Interna skripta predavanja. Poljoprivredni fakultet Osijek. Visoko gospodarsko učilište u Križevcima. str. 23. – 24.
- Tomek-Roksandić s. i sur. 2003. Rizici bolesnog starenja. *Vaše zdravlje* br. 28 (2/03) <http://www.vasezdravlje.com/printable/izdanje/clanak/252/>, pristupljeno 26.11.2016.



- Vidak M. 2016. Proizvodnja graha u Hrvatskoj. Poljoprivredni glasnik 5: 14 – 23.
- Vukadinović V., Jug I., Đurđević B. 2014. Značenje i djelovanje ekoloških čimbenika, U Miklavčić D. (ur.), Ekofiziologija bilja. Gradska tiskara, Osijek, str. 27-31.
- WSN 2003., Beaufortova ljestvica vjetra, Wind Surf.net, <http://www.wsurf.net/vrijeme-beaufort.php>, pristupljeno 28.2.2017.
- Zagorec, M., Donjerković, P. (2006). Analiza prirodne ventilacije u zgradama, GRAĐEVINAR, 58 (5). <http://www.casopis-gradjevinar.hr/arhiva/article/462>, pristupljeno 4.8.2016.

PRILOZI

Prilog 1 Anketni listić

ANKETNI LISTIĆ

1. Označite spol: muški ženski

2. Označite svoju dob:

7-11 12-15 16-20 21-30 31-40 41-50 51-60 61-80 81+

3. Napišite mjesto stanovanja (naziv grada ili sela):

4. Imenujte mjesto u kojem ste proveli djetinjstvo _____
(naziv grada ili sela)

5. Jesu li Vam odrasli tijekom Vašeg odrastanja govorili o djelovanju propuha?
(zaokružite slovo ispred odgovarajuće tvrdnje)

a) Rijetko su obraćali pažnju na propuh.
b) Vrlo često su me upozoravali na štetnost propuha.
c) Smatrali su da je propuh koristan, a ne štetan.

6. Žali li se netko od Vaših ukućana da mu smeta propuh?

a) da b) ne

Ako ste zaokružili da, molimo Vas da napišete o kome se najčešće radi: _____
(otac, majka, dijete, baka, djed, strina i sl.)

7. U slučaju izloženosti propuhu najčešće se osjećam: (odaberite odgovor i objasnite zašto)

a) ugodno jer _____
b) neugodno jer _____
c) ne mogu se odlučiti jer _____

8. Jeste li imali neke zdravstvene smetnje nakon izlaganja propuhu?

a) da b) ne

Ako jeste, koje? _____

Hvala na sudjelovanju u ovoj anketi.

FITOTERAPIJOM PROTIV VIRUSA

Sanja Skok, 1. razred
Natalija Frančin, 1. razred

Gimnazija i Strukovna Škola Jurja Dobrile, Pazin

Mentor: Dušica Dorčić

SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja je dokazati da se pojavu simptoma virusnih bolesti kože može spriječiti ili odgoditi prirodnim preparatima. Kako bi se to ostvarilo trebalo je prvo istražiti učestalost pojavljivanja *Herpes simplex* virusa (HSV), u odnosu na godišnja doba, a potom odrediti postotak uspješnosti uklanjanja bradavica, koje uzrokuje humani papiloma virus (HPV), prirodnim putem. *Herpes simplex* infekcija i bradavice ubrajaju se u virusne infekcije uzrokovane HSV-om, odnosno HPV-om. Provedena je anketa među učenicima srednje škole na uzorku od 316 ispitanika. Za daljnji rad odabrane su dvije skupine po 20 ispitanika sa simptomima herpes-infekcije. Prvoj skupini podijeljene su bočice koje su sadržavale hidrolat matičnjaka izdvojenog uz pomoć priručnog aparata kojeg smo same kreirale. Ispitanici su štrcaljkom aplicirali preparat dva puta na dan u razdoblju od tri mjeseca. Za drugi dio istraživanja bilo je potrebno utvrditi broj učenika s HPV bradavicama. Izdvojene su dvije skupine po pet ispitanika. Prva skupina je koristila svježi sok rosopasa ubranog u okolici Škole, a druga skupina nije tretirana rosopasom i služila je kao negativna kontrola. Prema anketama se kod većine učenika herpes najčešće pojavljuje svaki mjesec što nam je omogućilo daljnje istraživanje. Većina autora, u nama dostupnoj literaturi, navodi da se simptomi herpesa najčešće pojavljuje ljeti, a anketama je utvrđeno da se češće pojavljuju tijekom zime. Uzrok tome je, po nama, stres i nesanica zbog povećanog napora izazvanog učenjem tijekom zimskih mjeseci. Postotak uspješnosti prevencije HSV-a korištenjem hidrolata matičnjaka je 85%, dok je postotak uspješnosti uklanjanja HPV bradavica sokom rosopasa 20%. Smatra se da je neuspješnost uklanjanja HPV bradavica rezultat malog uzorka ispitanika kao i zbog hladnoće koja je smanjila efikasnost djelovanja soka rosopasa.

Ključne riječi: matičnjak, sok od rosopasa, hidrolat, herpes, bradavice

UVOD

Ova je tema odabrana s ciljem da pomognemo ublažavanju simptoma herpes-infekcije i uklanjanju virusnih bradavica kod prijatelja i osoba iz naših obitelji, koji danima i/ili mjesecima znaju imati „prnju“ na usnama i bradavice na rukama. Željeli bismo educirati učenike škola u našem gradu (osnovna i dvije srednje škole), njihove roditelje te djelatnike škola o korisnom i ekonomičnom načinu primjene fitoterapije. Uz prevenciju herpesa važno je i sprječavanje njegovog brzog širenja.

Putem interneta pronašle smo bitne podatke o herpesu. Tijekom anketiranja učenika Škole, uočeno je da nekolicina njih ima bradavice na rukama. Istražujući o uzročniku herpes-infekcije, saznale smo da su i bradavice uzrokovane virusom.

Postavile smo si pitanje hoće li matičnjak prevenirati simptome herpesa, a rosopas ukloniti bradavice?

Herpes simplex virus (HSV) je uzročnik bolesti koja je karakterizirana lokaliziranim izbijanjem malih, bolnih mjehurića ispunjenih bistrom tekućinom. Postoje dva osnovna tipa ovog virusa: HSV tip 1 i HSV tip 2. HSV tip 1 najčešće ima primarnu i sekundarnu fazu. U primarnoj fazi dolazi do prve infekcije, koja može proći nezamijećeno, ali i uzrokovati bolne čireve u ustima, osjetljivost vratnih žlijezda te vrućicu. Nakon infekcije virus se smješta u živčane ganglije, gdje može ostati pritajen više mjeseci ili čak više godina. Sekundarna faza uključuje pojavu ponovnog izbijanja simptoma, pri čemu uslijed širenja virusa bolest može izbiti i na više mjesta (Dedić, 2016).



Matičnjak (*Melissa officinalis*), pripada među biljke usnače, porodica Lamiaceae, naraste 30 do 100 cm u visinu. Listovi su jajasti, dugački 2 do 6 cm i široki od 1,5 do 5 cm. Mali bijeli usnati cvjetovi skupljeni su pršljenasto u pazušcima gornjih listova. Ima osvježavajući okus i miris koji podsjeća na limun, s notom punine svojstvene biljnim čajevima. Antivirusno djelovanje matičnjaka je takvo da kao vodeni ekstrakt, odnosno kao jaki čaj, djeluje na smanjenje razvoja simptoma herpes-infekcije. Raste na Kavkazu, rasprostranjen je u Iranu i dalje do sjeverozapadnog Sibira (Gelenčir i Gelenčir, 1991).

Pri pojavi herpesa na usnici, preporuča se stavljanje obloga od jakog čaja matičnjaka, time se razvoj simptoma uspori, a rana puno brže zaraste. Osim toga matičnjak djeluje umirujuće i pomaže u regeneriranju kože (Bogdanić, 2014). Kako hidrolat matičnjaka brzo ishlapi, a kod ranice treba duže djelovanje, preporuča se korištenje kreme od matičnjaka. Za kremu se također saznaje da smanjuje vrijeme iscjeljivanja i oralnog herpesa (Ehrlich, 2015).

Bradavice su zarazne izrasline, a sastoje se od mrtvih stanica kože. Zahvaćaju samo gornji sloj kože. Najčešće zahvaćaju ruke, iako se mogu javiti na bilo kojem dijelu tijela. Bradavice se mogu prenijeti s jednog na drugi dio tijela. Uzrokovane su humanim papiloma virusom (HPV). Do danas je otkriveno više od 150 različitih tipova HPV-a u odnosu na dva tipa HSV-a (Bzhalava i sur., 2013). Bradavice su jedna od najčešćih promjena na koži u djetinjstvu pa im podliježe gotovo svako peto dijete, ali se mogu pojaviti u svakoj životnoj dobi, najčešće kod djece, a vrlo rijetko kod starijih ljudi. Izgled i veličina bradavice ovisi o vrsti virusa koji ju je izazvao kao i o mjestu na kojem se nalazi na tijelu (Bočina, 2013). Proučavanjem literature saznale smo da fitoterapija uvelike doprinosi sprječavanju spomenutih viroza i ublažavanju simptoma i došli na ideju da koristimo prirodne načine liječenja i prevencije viroza. Danas postoji samo nekoliko službenih lijekova protiv virusa (aciklovir protiv herpesa, AZT protiv side i interferon, protein koji stvara i sam organizam), ali svi izazivaju nuspojave koje narušavaju zdravlje. Zato se u borbi protiv ovih „opasnika“ često okrećemo prirodi, odnosno liječenju biljem i odgovarajućim namirnicama (Stanimirović, 2014). U okolišu Škole smo pronašle matičnjak i rosopas koje smo koristile u daljnjem istraživanju.

Rosopas (*Chelidonium maius L.*) je zeljasta biljka, plavozelena, razgranata i visoka 30 do 80 cm. Svi dijelovi biljke sadrže žuti mliječni sok. Listovi su izmjenični, donji su perasti, a gornji perasto izrezani. Cvjetovi su zlatnožuti s četiri latice i brojnim prašnicima, združeni u cvatove na vrhovima ogranaka. Plod je duga višesjemena komuška. Od svježe biljke koristimo sok za uklanjanje bradavica. Nije poznat točan mehanizam djelovanja, ali u soku ove biljke se nalaze enzimi koji mogu razgraditi proteine (Turčić, 2016).

Glavni ciljevi ovog rada jesu:

- 1) Anketom istražiti učestalost pojavljivanja HSV-a u odnosu na razdoblja godine,
- 2) Utvrditi postotak uspješnosti prevencije HSV-a hidrolatom matičnjaka brojanjem učenika kojima se viroza nije pojavila,
- 3) Odrediti postotak uspješnosti uklanjanja bradavica sokom rosopasa evidentiranjem učenika čije su bradavice nestale.

Društveno korisni ciljevi su:

- 1) Kremom ublažiti simptome herpesa i smanjiti ranicu,



- 2) Presentacijom upoznati učenike kako napraviti jednostavnu aparaturu za dobivanje hidrolata, a time i s ljekovitim svojstvima korištenih biljaka.

Hipoteze koje će se provjeriti jesu:

- Korištenjem matičnjaka učestalost oboljelih od herpesa opada,
- Korištenjem kreme (macerata matičnjaka u maslinovom ulju i voska), ublažavaju se simptomi HSV-a i ranica se smanjuju,
- Biljni pripravci u uvjetima pojačanog stresa učenika (zimsko razdoblje), mogu prevenirati herpes,
- Korištenjem svježeg soka rosopasa bradavice na rukama nestaju.

METODE RADA

Istraživanje je radi lakšeg praćenja podijeljeno na nekoliko faza (tablica 1).

Tablica 1. Faze istraživanja

FAZE ISTRAŽIVANJA	
1.	Anketiranje učenika
2.	Prikupljanje bilja
3.	Izrada aparata za pripremu hidrolata i postupak njegova dobivanja
4.	Podjela hidrolata matičnjaka i placeba te rosopasa
5.	Izrada i podjela kreme matičnjaka
6.	Praćenje i samoprocjena ispitanika
7.	Prezentacija rada

1. Faza istraživanja - anketiranje učenika.

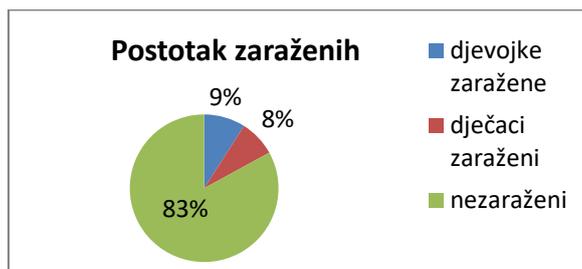
Istraživanje je započelo polovinom rujna 2016. anketiranjem učenika. Anketa je sadržavala šest pitanja na uzorku od 316 učenika Škole. Pitanja su bila sljedeća:

1. Koliko je učenika škole zaraženo HSV-om?
2. Kada im se prvi put pojavio herpes?
3. Koliko traje?
4. Čime ga tretiraju?
5. Koji su simptomi?
6. Koliko se često pojavljuje?

Provedenom anketom prikupljeni su podaci o broju oboljelih i o dužini trajanja bolesti (tablica 2), a postotak zaraženih učenika HSV-om u odnosu na spol prikazuje slika 1.

Tablica 2. Broj oboljelih i dužina trajanja bolesti u danima

Dužina trajanja bolesti u danima	Broj oboljelih
od 7 do 10	74%
od 11 do 15	22%
od 16 do 20	4%



Slika 1. Postotak zaraženih HSV-om u odnosu na spol

2. Faza istraživanja - prikupljanje bilja

Bilje (matičnjak i rosopas) je sakupljeno u okolici Škole (slike 2 i 3).



Slika 2. Bilje matičnjaka

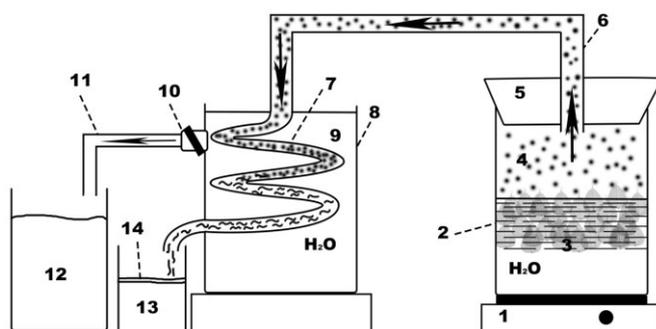


Slika 3. Bilje rosopasa

3. Faza istraživanja - izrada aparata za pripremu hidrolata i postupak njegovog dobivanja.

Idejna skica

U našoj je idejnoj skici cijev za prijenos vodene pare iz jedne u drugu posudu (zagrijavane smjese kišnice i matičnjaka) planirana da bude prozirna i plastična (slike 4 i 5), ali je zamijenjena bakrenom, jer je prolaskom vruće pare plastična pocrnila.



Slika 4. Shema aparata za izradu hidrolata

LEGENDA

- 1-Električni grijač
- 2-Posuda sa smjesom
- 3- Smjesa kišnice i biljnog materijala (matičnjaka)
- 4-Para smjese
- 5-Poklopac prve posude
- 6-Prozirna plastična cijev
- 7-Nastavak plastične cijevi u obliku spirale
- 8-Posuda s hladnom vodom
- 9-Hladna voda
- 10-Ventil za otjecanje vode
- 11-Cijev za otjecanje vode
- 12-Otečena voda
- 13-Hidrolat matičnjaka
- 14-Sloj eteričnog ulja

Slika 5. Legenda sheme

Ostvarenje idejne skice

Umjesto prve posude zamišljene u idejnoj skici za izradu aparata korišten je ekspres lonac, na koji je školski majstor pričvrstio bakrenu cijev koja je spiralno postavljena u drugom loncu. Na drugom loncu napravljena je rupa za ispuštanje hidrolata (slika 6).



Slika 6 Aparat za izdvajanje hidrolata

Postupak dobivanja hidrolata matičnjaka

Hidrolat je kondenzirana vodena para koja u svakoj svojoj kapljici sadrži otopljene biljne komponente i molekule eteričnog ulja.

U ekspres lonac uliveno je dvije litre kišnice i dodano oko 2 kg matičnjaka (slika 7). Proces destilacije trajao je oko dva sata otkad je smjesa proključala. Smjesa je isparavala te se para prolazeći kroz spiralnu bakrenu cijev, koja je u hladnoj vodi kondenzirala. Kad se tijekom destilacije voda u drugom loncu zagrijala, bilo ju je potrebno zamijeniti. Hidrolat je izlazio u obliku kapljica i na vrhu je imao sloj eteričnog ulja zbog kojeg je bio kvalitetniji. Konačni je rezultat bila 1.5 L hidrolata. Omjer hidrolata i matičnjaka je 1: 0.75. Za naše istraživanje korišteno je samo 400 mL hidrolata (20 mL po 20 bočica). S ukupno dobivenom dozom može se napuniti 75 bočica (vidljiva ekonomska isplativost).



Slika 7. Izradba hidrolata

4. Faza istraživanja - Podjela hidrolata matičnjaka i placebo te rosopasa

Za prvi dio istraživanja od ukupnog broja anketiranih učenika odabrano je 40 pouzdanih ispitanika, koji su podijeljeni u dvije skupine.

Prva skupina od 20 učenika preventivno koristi hidrolat matičnjaka (2 puta na dan u razdoblju od 3 mjeseca), u lokalnoj primjeni (slika 8). Podijeljene su im bočice hidrolata (slika 9), uz preporuku da ih trebaju uvijek imati pri ruci u slučaju znakova pojavljivanja herpesa poput svrbeža, peckanja, trnjenja i povišene temperature kako bi ga više puta na dan mogli aplicirati.



Slika 8. Nanošenje hidrolata



Slika 9. Bočice hidrolata matičnjaka

Druga skupina učenika služi kao kontrola (placebo efekt), odnosno oni dobivaju bočice destilirane vode s mirisom limuna (slika 10), također u razdoblju od tri mjeseca u lokalnoj primjeni.



Slika 10. Bočice sa destiliranom vodom mirisa limuna

Ispitanicima je rečeno da će dobiti ili placebo ili hidrolat matičnjaka tako da svi ispitanici uključeni u eksperiment nisu sigurni što su primili jer uvijek mogu postojati očekivanja djelotvornosti pripravka.

Za drugi dio istraživanja cilj je utvrditi broj učenika s HPV bradavicama. Odabrano je deset ispitanika koji su podijeljeni u dvije skupine po pet ispitanika. Prva skupina koristi svježi sok rosopasa (dva puta dnevno do nestanka bradavica) u lokalnoj primjeni (slike 11 i 12). Druga skupina nije tretirana rosopasom, ona je negativna kontrola.



Slika 11. Nanošenje soka rosopasa na bradavice



Slika 12. Sok rosopasa

Hidrolat je štrcaljkama nanesen na mjesto nastanka herpesa odabranih ispitanika, kako ga ne bi ispitanici stavljali izravno prstima.

5. Faza istraživanja - Izrada i podjela kreme matičnjaka.

U slučaju pojave simptoma herpesa, uz hidrolat, ispitanici koriste i kremu. Krema je izrađena na sljedeći način: Na vodenoj kupelji zagrijavalo se (ne do vrenja) 20 grama voska i 120 mL macerata matičnjaka (macerat je otopina maslinovog ulja i listova matičnjaka). Topla smjesa se ulijevala u 5 kutijica po 20 mL te se nakon nekog vremena skrutila. Krema je tada bila spremna za uporabu i nanosila se kod pojave simptoma herpesa (slika 13).



Slika 13. Nanošenje kreme na herpes

6. Faza istraživanja - Praćenje i samoprocjena ispitanika

Sastavljena je anketa kako bi se pratili rezultati fitoterapije prvog dijela istraživanja. Pitanja su bila sljedeća:

1. Jesu li vam se pojavili simptomi herpesa tijekom nanošenja hidrolata?
2. Ako da, koliko su trajali?
3. Koji su se simptomi pojavili?
4. Jeste li uočili razliku korištenjem hidrolata matičnjaka?
5. Jesu li vam simptomi bili ublaženi korištenjem kreme?

7. Faza istraživanja - Presentacija rada

Nakon provedenog istraživanja, u svrhu educiranja učenika i djelatnika Škola, prezentiran je naš rad (slike 14 i 15).



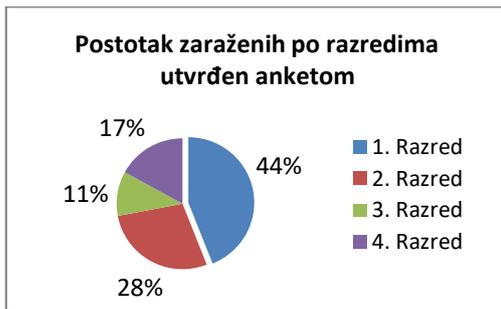
Slika 14. Presentacija rada



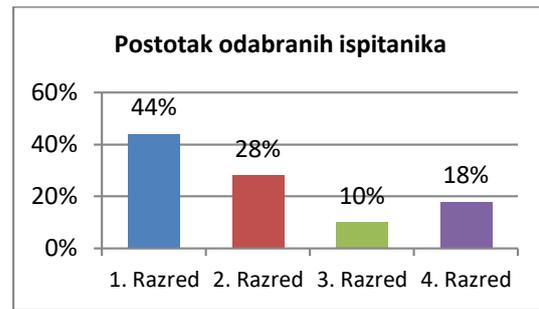
Slika 15. Presentacija rada

REZULTATI

Iz grafikona (slika 16 i 17) je vidljivo da je najveći postotak zaraženih u prvim razredima, a najmanji u trećim razredima. Postotak zaraženih u prvim razredima iznosi približno polovinu zaraženih herpesom.

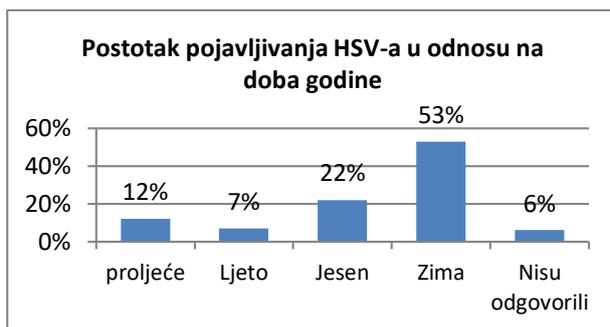


Slika 16. Postotak zaraženih po razredima utvrđen anketom

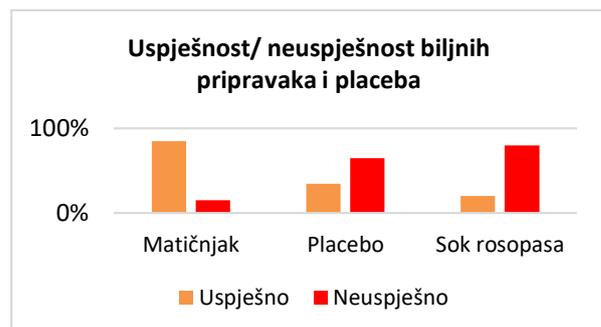


Slika 17. Struktura odabranih ispitanika

Grafikon (slika 18) prikazuje da su ispitanici odabrani proporcionalno s postotkom zaraženih koji su utvrđeni anketom. Uočavamo da je pojava herpesa kod naših učenika najčešća zimi, a najrjeđa ljeti.



Slika 18. Postotak pojavljivanja HSV-a u odnosu na doba godine



Slika 19. Uspješnost/neuspješnost biljnih pripravaka i placebo

Iz slike 19 uočavamo kako je hidrolat matičnjaka bio uspješan u prevenciji herpesa, dok je placebo, premda znatno neuspješniji, također pokazao pozitivne rezultate. Uz to uočavamo kako je sok rosopasa bio neuspješan u uklanjanju bradavica.

RASPRAVA

Glavni cilj ovog istraživanja je educirati učenike škola u našem gradu, njihove roditelje kao i djelatnike škola o korisnom i ekonomičnom načinu primjene fitoterapije, kojom smo se koristile u prevenciji HSV-a i za uklanjanje HPV bradavica. Nastojale smo to ostvariti uz što manja financijska sredstva i uz jednostavnije pronalaženje te korištenje prirodnih preparata. Prirodna medicina nudi trajno dobro zdravstveno stanje zato što vodi računa o pojedinčevu načinu života i bavi se cijelom osobom, a ne samo simptomima lošeg zdravlja (Dohranović i sur, 2012). Kako bismo to ostvarile morale smo istražiti učestalost pojavljivanja HSV-a u odnosu na razdoblja godine.

Pretpostavile smo da će se učestalost oboljelih od herpesa korištenjem hidrolata matičnjaka smanjiti, a u slučaju pojave herpesa tijekom tretiranja korištenjem izrađene kreme će se ubrzati vrijeme zarastanja ranice. Provele smo anketu na uzorku od 316 učenika Škole. Anketom smo utvrdile broj zaraženih i njihove simptome te vrijeme trajanja i učestalost pojavljivanja tih simptoma. Proučavanjem literature uočile smo da se herpes najčešće pojavljuje ljeti dok smo anketom primijetile da se učenicima herpes obično pojavljuje zimi. Uzrok tome je stres od ispita i nesanica koje mogu utjecati na razvoj viroze. Kada je imunitet slab zbog stresa, manjka sna, predugog izlaganja suncu ili ostalih razloga, može doći do infekcije (Bone 2009). Uočile smo da je neznatno veći postotak djevojaka zaraženih herpesom



u odnosu na dječake, što pripisujemo i predmenstrualnom sindromu. Od svježih listova i stabljika matičnjaka pripravile smo hidrolat uz pomoć izrađenog aparata. U izradbi aparata pomogao nam je školski majstor. Od ukupno 54 zaražena ispitanika odabrale smo 40, koje smo podijelile u dvije skupine po 20 učenika. Prvoj skupini su podijeljene bočice s hidrolatom matičnjaka kojeg apliciraju indirektno pomoću štrcaljke. Neki ispitanici su pri apliciranju hidrolata matičnjaka osjećali neugodne mirise te su odbili sudjelovanje u istraživanju. Drugima se miris svidio i rekli su da je opuštajući. Kod nekih učenika su se pojavili simptomi peckanja, trnjenja, nelagodnosti i svrbeža kao i temperature, što bi ukazivalo na moguće ponovno izbijanje herpesa, međutim apliciranjem hidrolata nije došlo do pojave simptoma viroze. Druga skupina je služila za kontrolu jer su primali samo destiliranu vodu s mirisom limuna kao placebo efekt.

Rezultate smo dobile provedbom još jedne ankete u kojoj smo tražile samoprocjenu ispitanika te uočavanjem je li došlo do prikaza simptoma herpesa. Izračunale smo da je postotak uspješnosti prevencije herpesa korištenjem hidrolata matičnjaka 85%. U istraživačkom radu Kerryja Bonea (2009), koji je proveden na 115 ispitanika utvrđena je slična uspješnost kao i u našem radu (od 87%) kao i da se razmak između pojavljivanja produžio na 2.3 mjeseca u odnosu na 1.3 sa ostalim tretmanima dok je kod nas produžen s 1 na 3 mjeseca (prosječno) što je znatno uspješnije. Uspješnost prevencije herpesa placebo efektom iznosi 35%. Što bi se dogodilo da nisu koristili placebo? Price i sur. (2008) navode kako u kliničkim istraživanjima, gdje je placebo obično kontrolna situacija, u prosjeku 30-50% ljudi reagira na placebo tretman. Većini ispitanika kojima su se prikazali simptomi tijekom korištenja hidrolata matičnjaka, infekcija je prosječno trajala 3-4 dana što dovodi do zaključka da se vrijeme zarastanja ranice smanjilo za 32% pošto je prosječno trajanje herpesa prema prvoj anketi 12 dana. Uspjeh pripisujemo izrađenoj kremi od macerata matičnjaka i pčelinjeg voska koju su ispitanici aplicirali četiri puta na dan uz hidrolat jer on brzo ishlapi, a za ranicu je potrebno duže djelovanje. I u drugim istraživanjima uočena je velika razlika u veličini zaraženog područja i mjehurića u usporedbi s placeboom već nakon dva dana terapije kremom matičnjaka, te je krema skratila vrijeme zarastanja ranice (Hope, 1999). U skladu s našim rezultatima, Gaby (2006) je zabilježila u svom istraživačkom radu da je zarastanje ocijenjeno kao vrlo dobro kod 41% pacijenata koji su zapravo tretirani kremom matičnjaka i kod 19% tretiranih placeboom. U jednom istraživanju sa 116 ispitanika zaraženih HSV-om, kod onih koji su aplicirali kremu od matičnjaka na usnu smanjilo im se crvenilo i natečenost samo nakon dva dana. I ljudi i njihovi liječnici izvijestili su da je mast od matičnjaka vrlo učinkovita (Ehrlich, 2015). Rezultati istraživanja koje su proveli Astani i sur. (2014) upućuju na to da najvećim dijelom ružmarinska kiselina doprinosi antivirusnom djelovanju ekstrakta matičnjaka. Pokazalo se da hidrolat, također, dobro djeluje protiv akni, prema svjedočenjima učenika.

Cilj drugog dijela istraživanja je određivanje postotka uspješnosti uklanjanja bradavica uzrokovanih HPV-om prirodnim putem. Naša hipoteza je da će korištenjem svježeg soka rosopasa bradavice na rukama nestati. Potrebne uzorke bilja prikupile smo u okolici škole. Za ovaj dio istraživanja izabrane su dvije skupine po pet učenika. Prva skupina je na bradavice nanosila svježi žuti sok rosopasa dva puta na dan do nestanka bradavica. Druga skupina nije tretirana rosopasom već služi kao negativna kontrola. Važno je napomenuti da se ovaj pripravak nanosi samo na bradavice koje se nalaze na tvrdim dijelovima poput tabana ili šaka budući da rosopas nadražuje kožu (Barešić, 2016). Postotak uspješnosti uklanjanja HPV bradavica svježim sokom rosopasa je 20% čime nismo potvrdile našu hipotezu.



Smatramo da je to zbog malog uzorka ispitanika te smo kontaktiranjem dermatologinje saznale da je jedan od mogućih razloga hladnoća koja je smanjila efikasnost djelovanja soka rosopasa. Proučavanjem literature primijetile smo da je cilj jednog rada vezanog uz tretiranje bradavica rosopasom bio pružiti nove uvide u biologiju i ljekovitu uporabu mliječnog soka rosopasa u razdoblju cvatnje i zrenja plodova biljke uspoređujući sadržaj proteina prikupljenih na pojedinim razvojinama stadijima (Nawrot i sur, 2017). Preporučujemo da se za nova istraživanja vezana uz uklanjanje HPV bradavica sokom rosopasa koristi veći uzorak ispitanika i da se provode u toplijem dijelu godine jer njegov sok ima najveću efikasnost u razdoblju cvatnje.

Kako nam je glavni cilj bio educirati učenike škola u našem gradu, njihove roditelje kao i djelatnike škola, prezentirale smo im naš rad.

ZAKLJUČCI

Na osnovu provedenog istraživanja doneseni su slijedeći zaključci:

- ✔ Simptomi herpesa se kod učenika naše škole najčešće pojavljuju zimi,
- ✔ Potvrđeno je da korištenjem matičnjaka učestalost oboljelih od herpesa opada,
- ✔ Korištenjem kreme (macerata matičnjaka u maslinovom ulju i voska), ublažuju se simptomi HSV-a i ranica se smanjuje te je vrijeme zarastanja ubrzano za 32%,
- ✔ Postotak uspješnosti uklanjanja bradavica korištenjem svježeg soka rosopasa nije zadovoljavajući,
- ✔ Biljni pripravci u uvjetima pojačanog stresa učenika (zimsko razdoblje) mogu prevenirati herpes, ali ne i ukloniti bradavice.

LITERATURA

- Bočina I. Bolest modernog doba. Narodni zdravstveni list. <http://www.zzjzpgz.hr/nzl/43/bolest.htm> (pristupljeno 12.12.2016.)
- Bzhalava D., Guan P., Franceschi S., Dillner J., Clifford G. 2013. A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papilloma virus types. *Virology* 445: 224-231.
- Gelenčir J., Gelenčir J. 1991. Atlas ljekovitog bilja. Prosvjeta, Zagreb.
- Turčić P. 2016. Bradavice-uloga ljekarnika u samoliječenju. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, str. 6-7.
- Dohranović S., Bosnić T., Osmanović S. 2012. Značaj i uloga alternativne medicine u liječenju. *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetiku* 1: 39-47.
- Bone K., Using phytotherapy against the herpes virus. http://www.nutritionalwellness.com/archives/2009/auugust/08_phytotherapy.php (pristupljeno 18. siječnja 2017.)
- Barešić V. 2016. Virusne bolesti kože
- Hope J. 1999. Melissa: Lemon balm as a topical treatment for herpes simplex virus. http://medherb.com/Materia_Medica/Melissa_Topical_Treatment_for_Herpes_Simplex_Virus.htm (pristupljeno 28. veljače 2017.)
- Dedić A. 2016. Herpes simplex- tipovi, simptomi i liječenje. <http://www.krenizdravo.rtl.hr/zdravlje/herpes-simplex-tipovi-simptomi-i-lijecenje> (pristupljeno 13.prosinca 2016.)
- Gaby A. R. 2006. Natural remedies for Herpes simplex. *Altern Med Rev.* 11: 93-101.
- Price D. D., Finniss D. G., Benedetti F. 2008. A comprehensive review of the placebo effect: recent advances and current thoughts. *Annual Review of Psychology* 59: 565-590.
- Bogdanić M. 2014. Matičnjak – djeluje antivirusno, jača živce i imunitet. <https://burza.com.hr/portal/maticnjak-djeluje-antivirusno-jaca-zivce-i-imunitet/9513> (pristupljeno 7.10.2016.)
- Ehrlich D. S. 2015. Lemon balm. <http://www.umm.edu/health/medical/altmed/herb/lemon-balm> (pristupljeno 7.10.2016.)
- Stanimirović V. 2014. 12 biljaka u borbi protiv virusa. <http://www.lepaisrecna.rs/zdravlje/4646-12-biljaka-u-borbi-protiv-virusa.html> (pristupljeno 5.4.2017.)
- Nawrot R. i sur. 2017. Proteomic comparison of Chelidonium majus L. latex in different phases of plant development. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942817300189> (pristupljeno 6.4.2017.)
- Astani A. i sur. 2014. Attachment and penetration of acyclovir-resistant herpes simplex virus are inhibited by Melissa officinalis extract. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24817544> (pristupljeno 6.4.2017.)

UTJECAJ DOMAĆE I TVORNIČKE HRANE NA RAZVOJ I PONAŠANJE PILIĆA (*Gallus gallus domesticus*, L.)

Nikola Pischiutta, 2. razred

V. gimnazija, Zagreb

Mentor: Romana Halapir Franković

SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja bio je provjeriti na koji način vrsta hrane utječe na razvoj i ponašanje pilića, ustanoviti koji je način uzgoja ekonomičniji te utvrditi kvalitetu mesa s obzirom na vrstu hrane. Istraživanje je provedeno na 20 pilića koji su podijeljeni u dvije skupine po 10 članova. Svaki tjedan pilići su vagani i bilježeni su podatci o njihovoj tjelesnoj masi, izgledu, ponašanju te količini potrošene hrane u tom tjednu. Na kraju istraživanja napravljena je organoleptička procjena kvalitete mesa u kojoj je sudjelovalo 10 ocjenjivača koji su davali ocjene od 1 do 5 za pojedino meso. Nakon provedena istraživanja, zaključeno je da su pilići hranjeni tvorničkom smjesom imali veću masu, bili su tromi i teško su se kretali. Pilići hranjeni domaćom hranom, odnosno mljevenim kukuruzom, imali su manju masu, bili su aktivniji i živahniji te su se mogli normalno kretati. Načinjena je analiza ukupnog iznosa novca potrošenog za domaću i tvorničku hranu te je ustanovljeno da je za isti efekt za tvorničku hranu potrošeno dvostruko više novca nego za domaću hranu. Nakon organoleptičke procjene zaključeno je da je meso pilića hranjenih domaćom hranom ukusnije i manje žilavo jer su ocjenjivači govorili da je meso pilića hranjenih tvorničkom smjesom žilavije.

Ključne riječi: organski uzgoj, isplativost uzgoja, organoleptička svojstva

UVOD

Pileće meso nije „luksuz na tanjuru“ kao u vrijeme careva, niti je manje cijenjena kategorija kao u vrijeme socijalizma. To je, jednostavno rečeno, zdrava namirnica koja je postala sastavni dio svakodnevnog obroka. Po cijeni i nutritivnoj vrijednosti zauzela je prvo mjesto u ishrani ljudi na našim prostorima. Proizvodnja pilećeg mesa u svijetu, ali i kod nas, neprestano raste (Latinović i Toljaga, 2015).

Poznato je da velike mesne industrije mogu uzgojiti jako velik broj pilića u vrlo kratkom vremenu uz najmanji utrošak hrane što je i cilj. Postavlja se pitanje na kakav način se oni uzgajaju i u kakvim uvjetima te kako takav uzgoj utječe na njihovo ponašanje i kvalitetu mesa. Kako navode Dransfield i Sosnicki (1999), već dugi niz godina uzgoj peradi koncentriran je na brzinu rasta, koji uzrokuje posljedice na muskulaturi, metabolizmu i kvaliteti mesa. Ubrzani rast može izazvati morfološke abnormalnosti i veći udio glikolitičkih vlakana. Važno je spomenuti kako kod masovnog uzgoja ponekad dolazi i do pojave nekih bolesti kao što su zaraza salmonelom ili kokcidioza, koje mogu biti prikrivene, a mogu biti vrlo opasne, ne samo za piliće nego i za ljude.

O utjecaju načina uzgoja na razvoj pilića i kvalitetu mesa provedeno je više istraživanja. U istraživanju Grashorna i Serini (2006) dobiveni su rezultati da je meso pilića iz organskog uzgoja boljeg okusa i mekanije. Istraživanja su također pokazala da pilići iz organskog uzgoja sporije rastu i troše više hrane po kilogramu prirasta te također imaju i manji udio masti, a veći udio bjelančevina (Kalić, 2012).

Tov pilića odvija se uglavnom u velikim skupinama (nekoliko tisuća), no danas svako domaćinstvo s manjom okućnicom ili samo s pogodnim smještajnim prostorom može za osobne potrebe toviti 100 – 200 pilića i više. Pileće meso je za 45% do 50% jeftinije od goveđeg i svinjskog, a sadrži manje kalorija



i više proteina; zdravije je od drugih vrsta mesa i prihvatljivo je za sve ekonomske kategorije stanovništva jer je relativno jeftino. Također je vrlo pogodno za prehranu male djece, dijabetičara i starih ljudi (Vučemilo, 1993).

Postoji više pasmina kokoši, no za tov najčešće se koriste teške mesnate pasmine koje se odlikuju brzim rastom i razvojem, zdravljem, dobrim iskorištavanjem stočne hrane i sposobnošću za intenzivno držanje; imaju razvijenije meso na grudima i batcima i brže operjaju, što sve utječe na ekonomičnost tova (Volčević, 2005).

Već dugi niz godina moja obitelj uzgaja piliće za vlastitu upotrebu, prvenstveno radi mesa. S vremenom me sve više počeo zanimati taj posao. Kako također imamo kokoši nesilice, koje slobodno hodaju dijelom dvorišta, počeo sam uočavati mnoge razlike između njih i tovnih pilića i pitao se zašto je to tako i što bi sve moglo utjecati na to. Na izgled i na ponašanje životinja mogli bi utjecati različiti čimbenici, primjerice vrsta kokoši, veličina prostora, vrsta hrane i slično.

Odlučio sam napraviti vlastito istraživanje i ispitati kako različite vrste hrane utječu na izgled, razvoj te ponašanje pilića jer sam pretpostavio da ću u relativno kratkom vremenu uočiti jasno vidljive rezultate.

Cilj ovog istraživanja je utvrditi ima li razlike u razvoju i ponašanju pilića hranjenih tvorničkom i domaćom hranom. Također se želi provjeriti koji je način hranjenja pilića bolji što se tiče isplativosti uzgoja, načina života pilića i kvalitete mesa.

U skladu s postavljenim ciljevima istraživanja, hipoteze su sljedeće:

- ☞ pretpostavlja se da će pilići koji dobivaju domaću hranu u istom periodu postići manju masu od pilića koji dobivaju tvorničku hranu i da će biti aktivniji
- ☞ pretpostavlja se da tvornička hrana dovodi do promjena u ponašanju pilića te da takav način uzgoja remeti njihov pravilan rast
- ☞ pretpostavlja se da će meso pilića hranjenih domaćom hranom biti ukusnije
- ☞ pretpostavlja se, također, da je hranjenje domaćom hranom isplativije.

METODE RADA

Istraživanje je provedeno u dva vremenski odvojena ciklusa, jedan u jesen 2015. a drugi u periodu jesen/zima 2016. godine. Prvi dio, 2015. godine, proveden je na 10, a drugi, 2016. godine, na 20 pilića tovnog tipa vrste *Gallus gallus domesticus* L., pasmine Cobb. Pilići su nabavljeni u tvrtki Zeleni Krug d.o.o. iz Velike Gorice i bili su stari 5 dana.

Priprema prostora za istraživanje

Istraživanje je provedeno u staji, u jednom odvojenom dijelu površine 6m x 3m. Staja ima 4 manja prozora, od kojih su 2 otvorena radi stalnog protoka zraka u prostoriji.

Pilići su smješteni u dvije velike kartonske kutije veličine 1.6m x 0.9m x 0.8m (slika 1) . U jednu kutiju smještena je skupina K koja se hrani domaćom hranom, a u drugu skupina T koja se hrani tvorničkom hranom. Hrana se nalazila u hranilicama, a voda u pojilicama.

Kutije su dodatno izolirane stiroporom debelim 3cm radi bolje toplinske izolacije, s obzirom na to da se istraživanje provodi pri hladnijim temperaturama. Na kutijama su položeni veliki kartonski poklopci koji nisu prekrivali cijeli otvor kutije radi cirkulacije zraka, ali su ipak sprječavali gubitak topline. Ispod kutija stavljene su drvene palete da pilići ne gube toplinu preko poda jer je to ploha preko koje se gubi najviše topline. Kao stelja služila je piljevina i stare novine. Stelja je mijenjana po potrebi.

Pilići su grijani običnim žaruljama snage 100W te su preko njih dobivali i potrebnu količinu svjetla.



Slika 1 Pribor potreban za izvođenje pokusa a) kutije za držanje pilića (lijevo) b) kuhinjska vaga korištena u istraživanju (desno)

Vrste korištene hrane

Skupina K hranjena je mljevenim kukuruzom u cijelosti proizvedenim i pripremljenim na obiteljskom gospodarstvu. Za tu hranu u radu smo koristili izraz domaća hrana. Na tržištu cijena kukuruza može varirati te ovisi o tome koju će cijenu prodavač ponuditi, no najčešća cijena je 15 kuna za 10 kilograma hrane, pa su izračuni rađeni s tom cijenom.

Skupina T hranjena je prvo tvorničkom hranom BROSTARTER 21% (kompletna krmna smjesa za tov pilića do 4 tjedna starosti, cijena: 43 kune za 10 kilograma) proizvođača TSH d.d. Čakovec. Od 4 tjedna starosti, pilići dobivaju drugu smjesu BROGROVER 18% (potpuna krmna smjesa za tov pilića od 4 tjedna starosti, cijena: 39 kuna za 10 kilograma) proizvođača TSH d.d. Čakovec. Sastavi ovih smjesa mogu se vidjeti u tablici 1. Osim ovih sastojaka, u obje smjese nalazi se i kokcidiostatik, odnosno antibiotik koji sprječava razvoj bolesti kokcidioze, a može biti štetan za ljude.

Tablica 1 Sastav smjesa hrane za piliće.

BROGROVER 21%	BROSTARTER 18%
Kukuruz, pšenica, sojina sačma od oljuštenih zrna soje (potječe od genetski modificiranih organizama), tostirana soja u zrnu, ječam, osušeni destilacijski trop kukuruza, sačma od sjemenki uljane repice, životinjska mast, kalcijev karbonat, kukuruzni gluten, monokalcij fosfat, natrijev klorid.	Kukuruz, pšenica, sojina sačma od oljuštenih zrna soje (potječe od genetski modificiranih organizama), tostirana soja u zrnu, sačma od sjemenki uljane repice, životinjska mast, kalcijev karbonat, kukuruzni gluten, monokalcij fosfat, natrijev klorid.

Količina (masa) hrane i vode mijenjana je po potrebi, hrana i voda dodavane su u posude kada su pilići potrošili prethodno dobivenu.



Metode

Praćenje promjene mase pilića

Ovo istraživanje provodilo se 2 godine. Prvi dio istraživanja napravljen je na manjem broju pilića (5+5) i trajao je 38 dana (od rujna do studenog 2015. godine). Drugi dio istraživanja napravljen je po uzoru na prvi, ali s nekim bitnim poboljšanjima: pilići su držani u većim kutijama pogodnijima za uzgoj pilića, bilo ih je više (10+10), a mjerila se i količina potrošene hrane. Drugi dio trajao je 45 dana (od listopada do prosinca 2016. godine).

Nakon nabave svi pilići prvo su držani u zajedničkoj, manjoj kutiji i svi su dobivali tvorničku smjesu te vitamine na koje su navikli u početnom uzgoju nakon izlijeganja. U tome razdoblju nije praćeno povećanje mase niti bilježena količina utrošene hrane. Nakon 10 dana, kad su malo ojačali, pilići su izvagani i raspoređeni u 2 skupine otprilike jednakih zajedničkih masa. Pilići nisu podijeljeni tako da je u svakoj skupini jednak broj mužjaka i ženki jer je u toj dobi pilića teško odrediti spol.

Skupina K u prvom tjednu nakon odvajanja dobivala je mješavinu domaće i tvorničke hrane: prva 2 dana u omjeru domaća: tvornička= 1:3, sljedeća 3 dana u omjeru 1:1, a zadnja 2 dana u omjeru 3:1 radi lakšeg privikavanja na domaću hranu. Ovaj korak nužno je napraviti jer kad bi pilići odmah dobili domaću hranu, koja nije toliko bogata hranjivim tvarima kao tvornička, mogli bi doživjeti šok i postojala bi vjerojatnost da neki uginu. U drugom tjednu pa do kraja istraživanja dobivala je samo mljeveni kukuruz.

Svakih sedam dana, točnije u nedjelju, pilići su vagani i bilježeni su podatci o masi. Bilježila se i količina hrane (u kg) koju su pilići pojeli tijekom tog tjedna. Za vaganje pilića koristila se obična kuhinjska vaga (slika 1).

Praćenje ponašanja i karakteristika u izgledu

Tijekom cijelog istraživanja pratilo se i bilježilo ponašanje i izgled životinja u pojedinoj skupini.

Organoleptička procjena kvalitete mesa

Po završetku istraživanja, nakon obrade mesa, izvršena je organoleptička procjena kvalitete mesa. Pod organoleptičkom procjenom smatra se provjera osjetilima (vid, sluh, njuh i okus) kojima se provjerava izgled, boja, miris, tekstura i okus.

Za procjenu kvalitete mesa ovih različito hranjenih uzoraka korišten je isti dio pilećeg mesa - pileća prsa. Uzorci su ispečeni na isti način, na tavi s malom količinom ulja i stavljeni na dva tanjura. Deset ocjenjivača različite dobi (od 30 do 60 godina) testiralo je okus mesa najprije iz jednog, a zatim i iz drugog tanjura. Nakon svakog uzorka popili su gutljaj obične vode kako bi isprali okus prvog uzorka. Meso su ocjenjivali skalom od jedan do pet, a svaka ocjena imala je određeno značenje. Postupak je ponovljen još jednom. U prvom testiranju prvo im je ponuđeno meso pilića hranjenih domaćom hranom, a zatim meso pilića hranjenih tvorničkom smjesom. U drugom testiranju redosljed je obrnut. Ocjenjivačima nije rečeno o kakvim se uzorcima radi, osim da je riječ o pilećem mesu.

Obrada rezultata

U statističkoj analizi Mann-Whitneyjevim neparametrijskim testom obrađeni su podaci o promjeni mase pilića po tjednima i količini hrane.

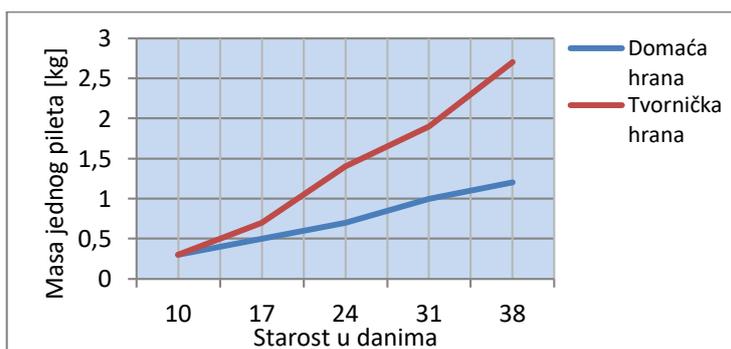
Po završetku istraživanja obrađeni su podaci o ekonomičnosti pojedine vrste hrane tako što je izračunato koliko hrane je potrebno za promjenu mase od jednog kilograma. Izračunata je ukupna masa pilića pojedine skupine te cijena potrošene hrane za tu skupinu.

Statistička analiza kvalitete mesa provedena je pomoću statističkog programa Stata 13.1 (Stata Corp. USA). Razlike između domaćih i tvorničkih proizvoda provjerene su Mann-Whitneyjevim neparametrijskim testom. Razlike između vrijednosti ocjena ponovljenih ocjenjivanja istog proizvoda provjerene su sparenim Mann-Whitneyjevim testom. Neparametrijski testovi primjenjuju se kada nije važno je li populacija normalno distribuirana, a katkada čak rezultati uopće nisu izraženi u mjernim jedinicama, nego u frekvencijama nekih kvaliteta.

REZULTATI

Rezultati iz 2015. godine

Na kraju istraživanja pilići koji su dobivali tvorničku hranu bili su više nego duplo teži od pilića koji su dobivali domaću hranu, mnogo su se teže kretali, brzo su se umarali, više su i češće jeli, proizvodili veće količine izmeta i bili neurednog perja. Primijetili smo i da tvornička smjesa stvari stvara neku vrstu ovisnosti jer pilići koji su dobivali domaću hranu nisu jeli toliko često i u tolikim količinama. Na slici 2 prikazan je graf ovisnosti mase pilića o vremenu.



Slika 2 Grafikon ovisnosti mase pilića o vremenu (za godinu 2015.).



Slika 3 Usporedba pilića iz obje skupine (2015.). Pilić hranjen domaćom hranom (lijevo). Pilić hranjen tvorničkom hranom (desno).



Praćenje i opis razvoja pilića 2016.

Praćenje promjene mase

Kao što je navedeno, promjena mase pilića praćena je kod obje skupine u periodu od 45 dana. Pilići su vagani svakih sedam dana, a rezultati mjerenja prikazani su u tablici 2. Prvo mjerenje prilikom odvajanja označeno je kao nulto mjerenje.

Tablica 2 Sažetak rezultata. U tablici su sažeto prikazani podatci o masi pilića i hrane te o cijeni hrane poredani po tjednima.

Mjerenje	Skupina	Masa cijele skupine /g	Prosječna masa jednog pilića /g	Masa potrošene hrane /kg	Cijena potrošene hrane /kn	Masa najlakšeg pilića /g	Masa najtežeg pilića /g	Razlika među masama skupina /g
0.	T	3415	341,5	6,3	27,09	250	390	0
	K	3415	341,5	6	9	300	380	
1.	T	7365	736,5	9,4	40,42	550	900	1065
	K	6300	630	7	5,7	500	770	
2.	T	13240	1324	10	43	1150	1580	5100
	K	8140	814	7,2	10,8	670	950	
3.	T	19035	1903,5	13	50,7	1660	2340	8215
	K	10820	1082	8	12	840	1250	
4.	T	26190	2619	10	39	2230	3150	11935
	K	14255	1425,5	8	12	1100	1780	
5.	T	31790	3179	8	31,2	2770	3960	13440
	K	18350	1835	8	12	1450	2330	

Dobivene rezultate prikazane u tablici 2 obradili smo Mann-Whitneyjevim testom. Dobiveni rezultati pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u nultoj i prvoj točki mjerenja između skupine hranjene domaćom i skupine hranjene tvorničkom hranom na razini značajnosti od 1%. Međutim, u drugoj, trećoj, četvrtoj i petoj točki mjerenja postoji statistički značajna razlika u masi pilića između dvije navedene skupine na razini značajnosti od 1%, odnosno pilići hranjeni tvorničkom hranom imaju veću masu od onih hranjenih domaćom hranom (tablica 3).

Tablica 3 Rezultati testiranja razlike u masi između skupine pilića hranjene domaćom hranom i skupine pilića hranjene tvorničkom hranom.

	0.	1.	2.	3.	4.	5.
Mann-Whitney	49,000	22,500	,000	,000	,000	,000
	104,000	77,500	55,000	55,000	55,000	55,000
(p)	,939	,037	,000	,000	,000	,000

Isplativost uzgoja

Tablica 4 prikazuje usporedbu troškova uzgoja za skupine T i K. Za skupinu K izračunato je kolika bi bila ukupna cijena hrane kad bi pilići iz K skupine dostigli masu pilića iz T skupine. Taj podatak izračunat je kako bi podatci o isplativosti bili točniji.

Tablica 4 Isplativost uzgoja pilića primjenom različitih tipova hrane.

Skupina	Ukupna masa potrošene hrane /kg	Ukupna cijena potrošene hrane /kn	Vrijeme uzgoja	Masa potrošene hrane po kilogramu pilića /kg	Masa skupine /kg
T	56,7	231,4	2 mjeseca	1,78	31,79
K	44,2	66,3	2 mjeseca	2,4	18,35



	76,4	114,5	3,5 mjeseca	2,4	31,79
--	------	-------	-------------	-----	-------

Rezultati procjene kvalitete mesa

Značenje i opis ocjena opisani su u tablici 5. Kao što se može vidjeti u tablici 6, ocjene za meso pilića koji su hranjeni domaćom hranom bolje su nego ocjene za meso pilića hranjenih smjesom. Svi kandidati govorili su da im je meso skupine T žilavije i neukusnije. Tablica 7 prikazuje statističku analizu ovog ocjenjivanja.

Tablica 5 Opis na temelju kojeg su kandidati davali pojedine ocjene.

Ocjena	Opis
1	Suho i žilavo, nije ukusno
2	Suho, no manje žilavo
3	Srednje sočno, žilavo
4	Sočno, manje žilavo
5	Sočno, mekano i ukusno

Tablica 6 Rezultati ocjenjivanja mesa.

Ocjenivač	Ponavljanje			
	1. uzorkovanje		2. uzorkovanje	
	Ocjena		Ocjena	
	K - Domaća	T - Tvornička	K - Domaća	T - Tvornička
1.	5	4	4	4
2.	5	4	5	3
3.	5	3	4	4
4.	5	4	5	4
5.	4	3	5	3
6.	5	3	4	3
7.	5	1	5	2
8.	5	3	5	3
9.	4	3	5	3
10.	5	3	5	4
Prosječna ocjena	4,8	3,1	4,7	3,3

Tablica 7 Ocjena domaćih i tvorničkih proizvoda.

Redni broj ocjenjivanja	Domaći (SV±SD)*	Tvornički (SV±SD)*	p
1	4.8 ± 0.42	3.1 ± 0.87	0.0002
2	4.7 ± 0.48	3.3 ± 0.67	0.0005
p	0.6547	0.3173	

*SV±SD-srednja vrijednost ±standardna devijacija

Mann-Whitneyjev neparametrijski test pokazao je da su razlike ocjena između tvorničkih i domaćih proizvoda statistički značajne u oba ocjenjivanja ($p=0.0002$, $p=0.0005$).

Spareni Mann-Whitneyjev neparametrijski test pokazao je da razlike ocjena između prvog i drugog ocjenjivanja nisu statistički značajne kod domaćih ($p=0.6547$) niti kod tvorničkih proizvoda ($p=0.3173$).

Izgled pilića

Na početku promatranja, mase pojedinih skupina približno su jednake, svaka skupina ima masu 3415 g, a u izgledu još nema nikakvih razlika.

Prvi tjedan

Nakon tjedan dana već se vide razlike u masi, a pomalo i u izgledu pilića. Primijećeno je da pilići iz skupine T troše više vode, što bi moglo značiti da smjesa sadrži više soli. Pilići skupine T proizvode više izmeta; brže se umaraju i ne mogu dugo stajati na nogama na vagi te brzo sjedaju. Pilići iz skupine T su i neuredniji. Za razliku od njih, pilići skupine K su uredniji te ne proizvode tolike količine izmeta. Skupina K je od tog tjedna dobivala samo mljeveni kukuruz.

Drugi tjedan

U drugom tjednu već se uočavaju veće razlike u izgledu pilića iz pojedinih skupina. Pilići iz skupine T teško stoje na nogama te, kad su vraćeni u kutiju nakon vaganja, odmah kreću jesti, kao što se vidi na slici 4.



Slika 4 T skupina. Mnogo pilića je okupljeno oko hranilice.

Treći tjedan



Slika 5 Izgled skupina. T skupina (lijevo), može se vidjeti da je stelja tamnija, a pilići su opet okupljeni oko hranilice. K skupina (desno), može se vidjeti da je stelja razbacana i novine rastrgane.

Skupina T počinje dobivati drugu smjesu. Kao što se vidi na slici 5, T skupina proizvodi više izmeta, što se može uočiti ako se gleda izgled stelje, a skupina K ima dosta razbacanu stelju, pa se može zaključiti da su pilići te skupine aktivniji.

Četvrti tjedan

Pilići iz skupine T mirniji su i izgledaju napuhano, dok pilići iz skupine K izgledaju više kao normalne kokoši i mnogo su živahniji, što se može zaključiti po tome što su do sada razbili već 3 žarulje tako što su skakali do njih.

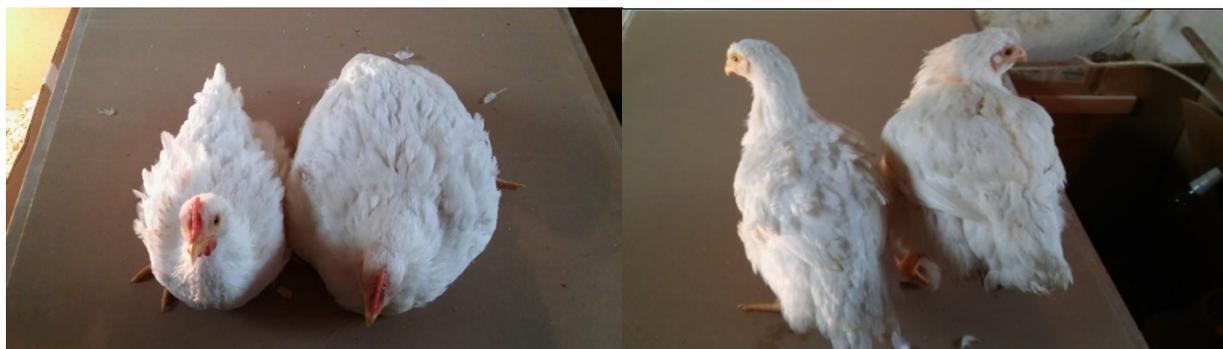
Peti tjedan (posljednji)

Uočeno je da pilići iz skupine T cijelo vrijeme sjede i rijetko hodaju (slika 6), a kad hodaju, hodaju vrlo teško te mogu napraviti samo nekoliko koraka. Pilići skupine K mogu normalno hodati te čak i trčati, normalnije su građeni i mnogo su pokretljiviji.



Slika 6 Izgled skupina. Skupina T (lijevo), pilići većinom sjede, veliki su pa nemaju više puno mjesta u kutiji. Skupina K (desno), pilići uglavnom stoje na nogama i imaju dosta mjesta.

Na kraju istraživanja, uspoređeni su po jedan pilić iz T i iz K skupine. Na slici 7 mogu se vidjeti očite razlike u izgledu i građi pojedinih pilića. Pilići iz skupine K imaju izrazito nakostriješeno perje što je također uočljivo.



Slika 7 Usporedba pilića. Muški pilići (slika lijevo), vidi se velika razlika u veličini pilića, pilić skupine K(lijevo), pilić skupine T (desno). Ženski pilići (slika desno), vidi se razlika u veličini, no ne toliko koliko na muškim pilićima, pilić skupine K (lijevo), pilić skupine T (desno).

RASPRAVA

Naše istraživanje i u 2015. i u 2016. godini potvrdilo je hipotezu da pilići hranjeni tvorničkom hranom brže dobivaju na težini od pilića hranjenih domaćom hranom. Dobiveni rezultati slični su kao u istraživanju Kalića (2012) u kojem su pilići iz organskog uzgoja rasli sporije i postigli značajno manju masu. Mann-Whitneyjevim testom dokazali smo da je razlika u masi pilića između dvije navedene skupine statistički značajna na razini značajnosti od 1%.

Promatranje ponašanja pilića u našem istraživanju potvrdilo je hipotezu o utjecaju vrste hrane na njihovo ponašanje. Pilići hranjeni domaćom hranom bili su puno aktivniji te su se brže i češće kretali po nastambi, dok su pilići hranjeni tvorničkom hranom bili tromiji i većinu vremena provodili sjedeći i



hraneći se. Slično ovakvo ponašanje vezano uz vrstu hrane uočili su u svojem istraživanju i Dransfield i Sosnicki (1999). Pilići skupine T bili su mnogo mirniji i nisu reagirali na neke podražaje iz okoline. Primjerice, kada je otklopljena kutija, pilići nisu reagirali, nego su se samo okrenuli i pogledali. Kada je otklopljena kutija kod pilića skupine K, oni su se malo preplašili i uskomešali te je reakcija bila itekako vidljiva. Primijećeno je i da tvornička smjesa stvara neku vrstu ovisnosti kod pilića jer bi nakon vraćanja u kutiju odmah krenuli jesti hranu; pilići su jeli češće i veće količine hrane.

Dransfield i Sosnicki (1999) navode da uzgoj peradi koncentriran na brzinu rasta uzrokuje posljedice na miškulaturu i da ubrzani rast može izazvati morfološke abnormalnosti. Moguće je da je prebrz rast i kod naših pilića jako utjecao na njihov razvoj što se moglo vidjeti po tome što su imali iskrivljene noge i nisu mogli dugo stajati na nogama.

Nisu uočene velike razlike u urednosti perja, pilići iz skupine K imali su dosta nakostriješeno perje, no pilići iz obje skupine imali su čisto perje.

U istraživanju je izračunata cijena ukupno potrošene hrane za određenu masu pilića te su dobiveni rezultati da je uzgoj pilića hranjenim domaćom hranom financijski isplativiji, a time i pogodniji za manje uzgajivače kojima nije cilj u što kraćem vremenu postići određenu masu pilića, nego postići određenu masu uz što manji financijski trošak (pilići hranjeni domaćom hranom bolje su i ocijenjeni). Uz to, prema Mitak (2015), potrebna hrana za tovne piliće iznosi u prosjeku 2,02 kilograma po kilogramu pilića što je mnogo više hrane u odnosu na ovaj pokus, a time i neisplativije.

Nakon provedene organoleptičke procjene mesa, ocjenjivači su govorili da je meso pilića hranjenih smjesom mnogo žilavije na što bi utjecaj mogao imati prebrzi rast i razvoj mišićnih tkiva. Razlika u izgledu mesa mogla se vidjeti prije pečenja. Meso pilića skupine T bilo je masnije i moglo se vidjeti više masnog tkiva, a pileća prsa bila su veća. Nakon pečenja nije bilo uočljivih razlika u izgledu. Mann-Whitneyjev neparametrijski test pokazao je da su razlike ocjena između tvorničkih i domaćih proizvoda statistički značajne u oba ocjenjivanja. Dobiveni rezultati vrlo su slični onima u istraživanju Grashorna i Serini (2006) u kojem su dobili rezultate da je meso iz organskog uzgoja sočnije i boljeg okusa.

Bilo bi dobro provjeriti udio masti i bjelančevina u mesu ovih dviju istraživanih skupina i usporediti s podacima Kalića (2012) koji navodi da pilići iz organskog uzgoja imaju manji udio masti, a veći udio bjelančevina. No u ovom istraživanju to nije bilo izvedivo.

Ovaj pokus može se povezati i s velikim mesnim industrijama koje proizvode ogromne količine mesa, te ponekad piliće drže u mnogo lošijim uvjetima od onih u ovom pokusu, a ponekad ne obraćaju pozornost na posebno upozorenje na vreći pileće smjese: **KORIŠTENJE OVE KRMNE SMJESE ZABRANJENO NAJMANJE 5 DANA PRIJE KLANJA**. Što znači da može sadržavati tvari štetne za ljudsko zdravlje koje preko mesa mogu doći u ljudski organizam, stoga se mora dobro paziti kada se kupuje piletina.

Istraživanje je provedeno na 20 pilića, no rezultati bi bili precizniji da je istraživanje provedeno na većem broju, primjerice na uzorku od 100 pilića, ali u tom bi se slučaju pojavili problemi s



održavanjem. Zbog manjka potrebnog pribora i prostora za uzgoj, povećala bi se i vjerojatnost da neki pilići uginu što bi se moglo loše odraziti na konačne rezultate.

ZAKLJUČCI

Istraživanje je pokazalo da pilići koji jedu tvorničku smjesu znatno brže rastu od pilića koji jedu mljeveni kukuruz te da je razlika u masi između te dvije skupine statistički značajna. Za uzgoj pilića mljevenim kukuruzom do ciljane mase za prehranu potrebno je oko 75% više vremena za uzgoj. Pilići koji jedu mljeveni kukuruz aktivni su, živahni i pravilnije se razvijaju. Ukupna količina mljevena kukuruza je za 49,4% jeftinija od tvorničke smjese za istu masu pilića, iako je mljevena kukuruza potrebno više ako se želi postići ista masa pilića. Meso pilića hranjenih mljevenim kukuruzom je ukusnije, dok je meso pilića hranjenih smjesom mnogo žilavije. Istraživanje je pokazalo da vrsta hrane značajno utječe na brzinu rasta pilića, a također i na ukusnost pilećeg mesa.

ZAHVALA

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Miroslavu Beniću iz Laboratorija za mastitise i kakvoću sirovog mlijeka, Odjela za bakteriologiju i parazitologiju, Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu za statističku analizu i interpretaciju rezultata istraživanja kvalitete pilećeg mesa. Zahvaljujem se Josipu Novaku za pomoć u statističkoj analizi mase skupina i interpretaciji rezultata.

LITERATURA

- Dransfield E., Sosnicki A.A. 1999. Relationship between muscle growth and poultry meat quality. Poultry Science <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.320.8174&rep=rep1&type=pdf> pristupljeno 7. 11.2016.
- Grashorn M.A., Serini C. 2006. Quality of chicken meat from conventional and organic production. <http://www.cabi.org/Uploads/animal-science/worlds-poultry-science-association/WPSA-italy-2006/10237.pdf> pristupljeno 10.2.2017.
- Kalić G. 2012. Tovna i klaonička obilježja pilića iz konvencionalnog i ekološkog uzgoja. <http://zpio.unios.hr/wp-content/uploads/radovi/spec.rad/goran.kalic.pdf> pristupljeno 7.2.2017.
- Latinović R., Toljaga M. 2015. Tehnološki vodič za tov pilića. <http://superpremix.com/wp-content/uploads/2016/03/Tehnoloski-vodic-za-tov-pilica.pdf> pristupljeno 2.11.2016.
- Mitak M. 2015. Patologija hranidbe domaćih životinja. Medicinska naklada, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb.
- Volčević B. 2005. Peradarstvo. NERON d.o.o, Bjelovar.
- Vučemilo M. 1993. Tov pilića. Papir – Velika Gorica, Vukovina.

ISPITIVANJE MUTAGENOSTI ANTIPERSPIRANTA I DEZODORANSA NA KORJENČIĆIMA LUKA

Aurora Vareško, 2. razred

Gimnazija, Pula

Mentor: Ivana Burić

SAŽETAK

Antiperspiranti i dezodoransi su često korišteni proizvodi u osobnoj higijeni, a o njihovom mutagenom djelovanju nema dovoljno istraženih podataka. U medijima se često javljaju tekstovi koji upozoravaju da antiperspiranti i dezodoransi sadrže komponente koje mogu uzrokovati rak dojke. Zbog nedostatnih podataka o djelovanju tih proizvoda provedeno je istraživanje kojemu je cilj bio usporediti količinu mutacija (c-mitoza, ljepljivi kromosomi, interfazne vakuole, lomovi kromosoma) koje uzrokuju antiperspirant s aluminijevim solima (potencijalno kancerogeni sastojak) i dezodorans koji se reklamira kao prirodni na korjenčićima luka (*Allium cepa* test) u ovisnosti o njihovoj koncentraciji. Osim toga ispitivana je i duljina korjenčića, mitotski indeks te morfološke promjene. Rezultati su pokazali da i antiperspirant i dezodorans imaju citotoksični i genotoksični učinak na stanice korjenčića luka koji se može uočiti kroz inhibiciju rasta korjenčića i zaustavljanje dioba, pojavu mutacija u obliku interfaznih vakuola te promijenjenu morfologiju. Razlike između različitih koncentracija nisu uočene. Ovo ispitivanje pokazalo je da dezodorans bez aluminija i njegovih soli ima štetnije djelovanje od antiperspiranta s aluminijem i njegovim solima, barem u pogledu mutacija koje su bile detektirane ovim eksperimentom.

Ključne riječi: Allium cepa test, kancerogenost, kozmetika

UVOD

Jedni od najšire korištenih proizvoda u osobnoj higijeni zasigurno su antiperspiranti i dezodoransi koji se nanose na područje pazušne jame i služe za smanjivanje tjelesnih mirisa koji su posljedica bakterijske razgradnje znoja. Iako se rijetko naglašava razlika između ta dva proizvoda, ona postoji. Dezodoransi smanjuju i maskiraju neugodne mirise, pritom ne utječući na znojenje. Sastoje se od antiseptičkog sredstva koje uništava bakterije pa će se otpušteni znoj u manjoj mjeri razgrađivati na tvari koje pridonose neugodnom mirisu. Zatim, tu su i komponente koje neutraliziraju neugodne mirise te parfem koji daje ugodan miris. Točne komponente ovise o proizvođaču određenog proizvoda. Za razliku od dezodoransa, antiperspiranti utječu na znojenje, sprječavajući ga, tako što stvaraju čep u odvodnim kanalima žlijezda znojnice kroz koje bi znoj trebao izaći na površinu kože. Uz određene tvari koje nalazimo i u dezodoransima, antiperspiranti sadrže kao glavnu aktivnu komponentu različite aluminijeve soli, najčešće aluminij klorhidrat (Darbre, 2009).

U današnjem društvu ti se proizvodi koriste sve više i češće te se počinju koristiti u sve ranijoj životnoj dobi, ali o posljedicama dugog i količinski malog izlaganja tim smjesama nema još dovoljno podataka, a oni koji postoje daju oprečne rezultate. U medijima se često objavljuju tekstovi koji upozoravaju da antiperspiranti i dezodoransi sadržavaju tvari koje mogu dovesti do nastanka raka dojke. Ovo je samo jedan od pronađenih naslova: „Dezodoransi protiv znojenja najvjerojatnije doprinose raku dojke“ (Znanost, 2012). Tvari koje se najčešće spominju kao potencijalna opasnost jesu aluminijeve soli koje nalazimo u antiperspirantima te parabeni koji mogu doći u obje vrste proizvoda u ulozi konzervansa. Pregledom sastava antiperspiranta i dezodoransa različitih proizvođača nisam naišla na paraben i njegove spojeve, ali su zato aluminijeve soli redovito prisutne u različitim antiperspirantima. Stoga ću se više osvrnuti na istraživanja vezana uz aluminijeve spojeve.



Uzrok raka dojke može se tražiti među nasljednim faktorima, ali je vjerojatno često i posljedica mnogih okolišnih čimbenika i načina života kao što su prehrana, pušenje i pijenje alkohola, zračenje, primjena hormonalnih kontracepcijskih sredstava, a možda i antiperspiranta. Istraživanja pokazuju da u oko 60% slučajeva raka dojke kod žena, mjesto pojave raka na dojci korelira s mjestom nanošenja antiperspiranta i dezodoransa, ispod pazuha u gornjem vanjskom kvadrantu dojke. Osim toga u tkivu dojke tog područja pronađene su i povećane količine aluminija (Exley i sur, 2007). Izdvojena istraživanja na aluminiju pokazala su da utječe na mutacije u DNA te da se veže na estrogenske receptore oponašajući djelovanje estrogena za koji je dokazano da ima utjecaja na nastanak i razvoj raka dojke (Darbre, 2009).

Više biljke, kao što je luk, odnosno *Allium cepa* L., koriste se za otkrivanje mutagenih tvari u okolišu. Levan je 1938. godine uveo *Allium cepa* test za praćenje mutacija u mitozu i učestalosti kromosomskih aberacija pod utjecajem kolhicina. Kasnije je test korišten za ispitivanje mutagenosti otpadnih voda, pesticida i herbicida, onečišćenih tla, prehrambenih konzervansa, biljnih ekstrakata i dr. (Khanna i Sharma, 2013). Unatoč mnogobrojnim prednostima ovog testa, nisam pronašla radove u kojima se istražuje mutagenost kozmetičkih proizvoda na luku, osim jednog s Aloe vera gelom (İlbaş i sur, 2011). *Allium cepa* test lako je izvediv, osjetljiv, brz i jeftin. Iako se radi o testnom organizmu koji je biljka, dobiveni rezultati mogu upozoravati na toksičnost ispitivanog spoja i kod životinja, obzirom da je oštećeni materijal DNA zajednički svim živim bićima (Tedesco i Laughinghouse, 2012). Istraživanja su pokazala da ovaj test jako dobro korelira s testovima koji se izvode na drugim živim organizmima, pa tako i sisavcima. U istraživanju koje je proveo Grant (1982) 76% kemikalija koje su ispitane *Allium cepa* testom bile su u korelaciji s onima na sisavcima. Fiskesjö (1985) je u svom istraživanju pokazao da je osjetljivost *A. cepa* testa gotovo jednaka kao ona promatrana na testovima na ljudskim limfocitima. Nakon toga su Rank i Nielsen (1994) pokazali 82%-tnu korelaciju *A. cepa* testa u odnosu na test kancerogenosti na glodavcima. U istraživanju citogenetskog učinka insekticida Chauhan i sur. (1999) izvijestili su o dobroj korelaciji *A. cepa* testa s testovima na koštanoj srži glodavaca i ljudskim limfocitima. Prednost pred drugim biljnim organizmima je što luk ima malen broj ($2n=16$) velikih i lako uočljivih kromosoma. Ovaj test omogućuje i direktno ispitivanje utjecaja kompleksnih smjesa (Rank i Nielsen, 1993).

Mutagenost neke tvari podrazumijeva da ta tvar izaziva promjene u DNA, a da bi se to ispitalo potrebno je stanice izlagati toj tvari za vrijeme diobe. Dokaz mutagenosti neke tvari može upućivati i na mogući kancerogeni učinak. Mutagenost nekog spoja može se na luku utvrditi praćenjem porasta korjenčića i njihove morfologije, učestalosti dioba (mitotskog indeksa) te kromosomskih aberacija u različitim fazama diobe. Kromosomske aberacije su anomalije u broju i/ili građi kromosoma. Korjenčići luka dijele se mitozom, diobom koja se sastoji od četiri faze. Prije same diobe stanice su u interfazi i pripremaju se za diobu, a nasljedni materijal još je u formi kromatina. Prva faza diobe, profaza, obilježena je kondenzacijom kromatina u kromosome. Sljedeća faza, metafaza prepoznaje se po kromosomima koji su maksimalno kondenzirani i poredani u ekvatorijalnu ravninu. U anafazi se razdvajaju sestrinske kromatide svakog kromosoma i putuju na suprotne polove stanice, a u telofazi dolazi do ponovne dekondenzacije kromatina i formiranja jezgri na polovima stanice te započinje citokineza (Tedesco i Laughinghouse, 2012).



U radu su kroz različite faze mitoze, praćene kromosomske aberacije kao što su: anafazni mostovi, lomovi kromosoma, c-mitotza, ljepljivi kromosomi. Anafazni mostovi pojavljuju se kao jedna ili dvije kromosomske strukture koje povezuje dvije grupe kromosoma prilikom razdvajanja u anafazi, dok se kod lomova kromosoma dio kromosoma odvojio od ostatka kromosoma. C-mitotza očituje se kao maksimalno kondenzirani kromosomi porazbacani po stanici, a ljepljivi kromosomi se prepoznaju u metafazi kao nepravilno smotane strukture koje su i međusobno povezane (Cabaravdic, 2010).

S obzirom na brojne novinske natpise koji upozoravaju na štetnost antiperspiranata i dezodoransa na ljudsko zdravlje, a u nedostatku podataka koji potvrđuju suprotno, odlučila sam u ovome istraživanju koristiti *Allium cepa* test za ispitivanje mutagenosti antiperspiranta i dezodoransa.

Cilj ovog rada je usporediti količinu promjena koje izaziva jedan odabrani antiperspirant s aluminijevim klorhidratom (koristi ga učenica koja provodi istraživanje) i jedan dezodorans koji se reklamira kao prirodni preparat bez aluminijevih spojeva, za vrijeme mitoze korjenčića luka u ovisnosti o njihovoj koncentraciji.

Na osnovu proučene literature pretpostavila sam da će količina mutacija luka kod antiperspiranta biti veća, a duljina korjenčića kraća u odnosu na dezodorans koji se reklamira kao prirodni. Također, pretpostavila sam da će količina mutacija i duljina korjenčića ovisiti o koncentraciji antiperspiranta i dezodoransa tako da će one lukovice koje su izložene višim koncentracijama tih preparata imati veći broj mutacija i kraće korjenčiće. Pretpostavka je i da će antiperspirant i dezodorans smanjiti mitotski indeks u odnosu na negativnu kontrolu te utjecati na morfologiju korjenčića u skladu s porastom koncentracija.

Nadam se da će se ovaj test pokazati kao dobar polazni test za ispitivanje toksičnosti različitih kozmetičkih proizvoda te tako pridonijeti njihovom sigurnijem korištenju i spriječiti eventualni štetan utjecaj na ljudsko zdravlje. Šira primjena ovog testa može smanjiti korištenje životinjskih testnih organizama u kozmetičkoj industriji.

METODE RADA

Materijali

Luk – testni organizam

Luk, *Allium cepa* L., zeljasta je dvogodišnja biljaka iz porodice sunovrata (*Amaryllidaceae*) porijeklom iz Azije. Sastoji se od podzemnog i nadzemnog dijela. Nadzemni dio biljke sastavljen je od reducirane stabljike, listova koji su dugi i plosnati te zelenkasto-bijelih cvjetova koji su združeni u kuglasti cvat. U podzemnom dijelu ima zaobljenu lukovicu (podzemnu stabljiku) obavijenu ljuskama te plitko i čupavo korijenje. Svaki korjenčić luka ima na samom vrhu korjenovu kapu koja je sastavljena od obamrlih stanica, a uloga im je da štite nježnije meristemske stanice prilikom prodiranja korijena kroz tlo. Iznad korjenove kape su meristemske stanice koje se dijele mitozom i omogućuju rast korijena i one su potrebne za analizu. Iznad stanica u mitozu nalazi se zona elongacije gdje se nalaze duguljaste stanice koje ne podliježu mitozu. Diploidne stanice luka sadrže 16 kromosoma, a stanični ciklus traje oko 23 sata.

U istraživanju su korištene lukovice s oznakom organskog uzgoja (Bio-luk žuti, zemlja podrijetla Mađarska), iz čega se može pretpostaviti da lukovice nisu bile pretretirane kemijskim tvarima poput umjetnih gnojiva ili pesticida.

Antiperspirant (A) (Garnier mineral ActionControl, proizvođač Kosmepol sp z.o.o. Poljska) - s aluminijevim klorhidratom, bez parabena, u roll-onu, u koncentracijama 5%, 25%, 50% i 100%.

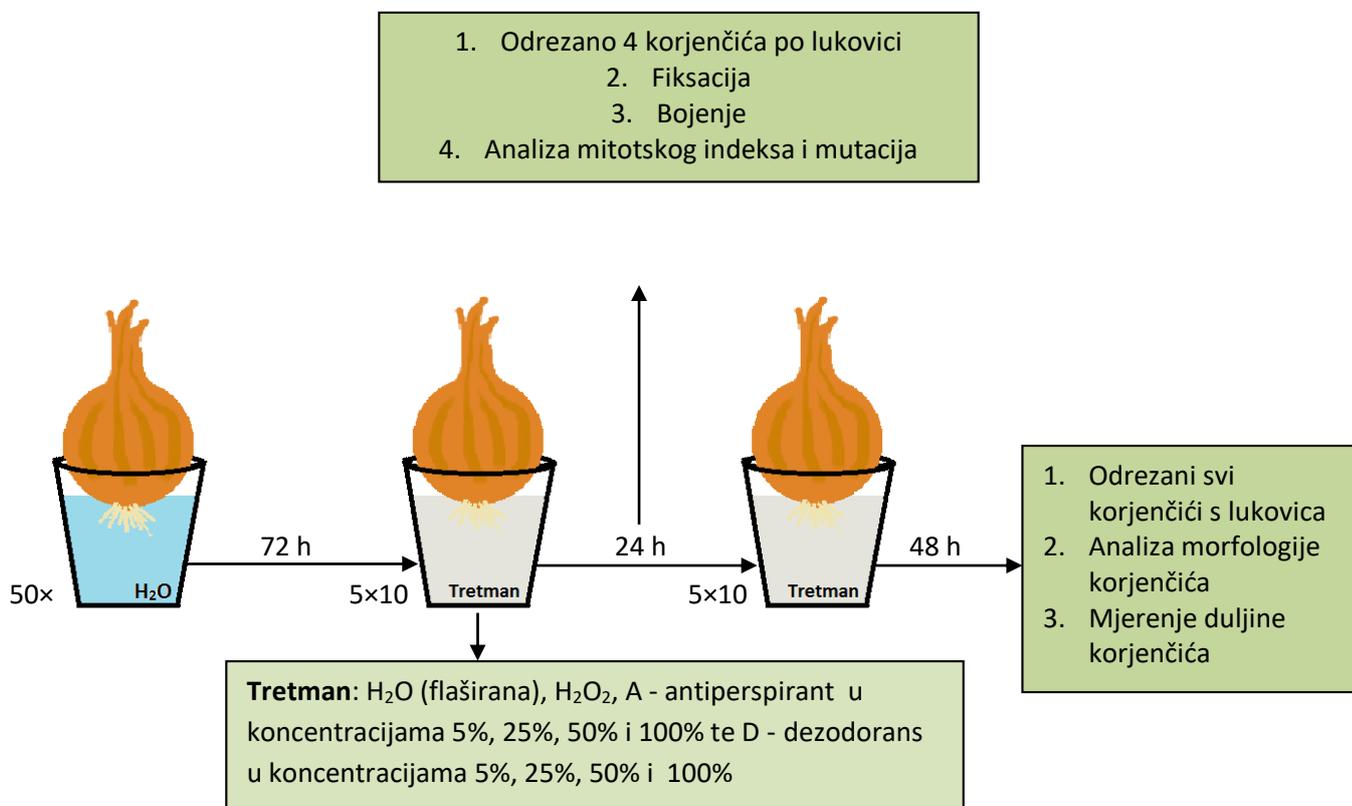
Dezodorans (D) (CL med deo balzam, proizvođač Cos-LineCosmetics, Njemačka) - bez aluminija i parabena, u roll-onu, u koncentracijama 5%, 25%, 50% i 100%.

Voda (Jana, proizvođač Jamnica, Hrvatska) - flaširana prirodna mineralna voda, negativna kontrola. Korištena je flaširana prirodna izvorska voda jer je prethodnim pokusima utvrđeno da voda iz slavine u školi izaziva značajan postotak mutacija na luku (3,5%), pa nije smatrana pogodnom za korištenje kao negativna kontrola.

Vodikov-peroksid (VP) (H_2O_2) u koncentraciji 300 mM, pozitivna kontrola

METODE

Sažeti prikaz plana istraživanja prikazan je na slici 1.



Slika 1. Prikaz plana istraživanja

Primijenjena metodologija prilagođena je prema Tedesco i Laughinghouse (2012). Lukovice podjednake veličine i starosti, s oznakom organskog uzgoja, kupljene su u lokalnom supermarketu. Lukovicama su uklonjeni stari i suhi korjenčići da se omogući rast mladih korjenčića, pri čemu se



pazilo da se ne oštete zameci korijena. Pedeset (50) lukovica je zatim stavljeno u prozirne plastične čašice od 50 mL punjene flaširanom prirodnim izvorskom vodom Janom kako bi korijeni lukovice izrasli. Držane su u vodi 72 h na sobnoj temperaturi, zaštićeno od direktne sunčeve svjetlosti, dok korjenčići luka nisu izrasli do otprilike 1 - 2 cm. Pretpostavljeno je da je potrebno dopustiti korjenčićima početni rast pa ih zatim tretirati jer je postojala sumnja, što se kasnije i pokazalo pokusom kao točno, da će tretmani znatno inhibirati rast korjenčića što bi u potpunosti onemogućilo praćenje mutacija.

Nakon toga je 20 lukovica prebačeno u plastične čašice punjene antiperspirantom, po 5 lukovica u svaku od 4 različite koncentracije (5%, 25%, 50% i 100%), 20 lukovica u čašice punjene dezodoransom, po 5 u svaku od 4 različite koncentracije (5%, 25%, 50% i 100%) i 5 lukovica u čašice s flaširanom prirodnim izvorskom vodom Janom kao negativnom kontrolom te 5 u čašice s vodikovim peroksidom (300 mM) kao pozitivnom kontrolom. Vodikov peroksid korišten je kao pozitivna kontrola zbog njegove dostupnosti te su se njime koristili i drugi znanstvenici kao Radić i sur. (2010), Čelik i Aslantürk (2006) i drugi jer je pokazano da vodikov peroksid uzrokuje u stanicama oksidativni stres, što znači da uzrokuje povećanje koncentracije kisikovih radikala koji dovode do oštećenja DNA te staničnih proteina poput proteina citoskeleta (Sreeranjini i Siril, 2011). Korišteni su dezodorans i antiperspirant u roll-on punjenju. Roll on bočice su otvorene vađenjem kuglice aplikatora te je tekući sadržaj dezodoransa odnosno antiperspiranta prelijevan u menzure. Zatim je miješan s određenom količinom flaširane vode Jana koja je korištena i kao negativna kontrola. Radi dobivanja ispitivanih koncentracija, dezodorans odnosno antiperspirant su s vodom miješani u omjeru 1:20 (za 5% koncentraciju), 1:4 (za 25% koncentraciju), 1:2 (za 50% koncentraciju), dok se za 100% koncentraciju koristio nerazrijeđeni dezodorans odnosno antiperspirant. Ukupni volumen svih pripređenih koncentracija bio je 50 mL, koliko su velike i plastične čašice u kojima su tretirane lukovice.

Lukovice su u tretmanu ostale točno 24 h. Nakon 24 h korjenčići su isprani pod vodom i sa svake je glavice odrezano 4 korjenčića srednje duljine za bojenje. Lukovice su vraćene natrag u tretman i puštene dodatnih 48 h kako bi se kasnije izmjerila duljina korjenčića i provjerile morfološke promjene. Prije no što su korjenčići bili obojeni, stavljeni su u fiksativ na 24 h kako bi se stabilizirala i očuvala njihova stanična struktura. Fiksativ koji je korišten sastoji se od 96%-tnog alkohola etanola i ledene octene kiseline u omjeru 3:1.

Nakon 24 h fiksacije, korjenčići su izvađeni iz fiksativa i prebačeni u 70%-tni etanol u kojem su čuvani na 4°C do korištenja.

Prije mikroskopiranja stanice, odnosno njihovi kromosomi, obojane su 2%-tnom otopinom acetokarmina (2 g karmina otopljeno u 100 mL 45%-tne octene kiseline) kako bi bili vidljivi pod mikroskopom.

Nakon bojenja korjenčićima su skalpelom odrezani vršni dijelovi duljine oko 1-2 mm te su tehnikom gnječenja pripremljeni za mikroskopiranje. Korjenčići su stavljeni na predmetno stakalce u kap boje te su razbijeni u manje fragmente lupkanjem sa tupim drškom preparacijske iglice preko pokrovnog stakalca. Zatim su prekriveni s 2 sloja filter papira pa jednolično pritisnuti jagodicom palca da se stanice rasporede u jednom sloju i da se upije višak boje.



Tako pripremljeni preparati analizirani su na školskom svjetlosnom mikroskopu (Bresser, Njemačka) pod povećanjem od 1000 puta. Stanice su fotografirane uz pomoć mikroskopske digitalne kamere (AmScope MU300, SAD) i fotografije su obrađene u programu Adobe Photoshop Lightroom 5. Sve analize radila je sama učenica, u školi, bez pomoći vanjskih znanstvenih institucija. Po dva vrška korjenčića sa svake lukovice korišteni su za izradu jednog mikroskopskog preparata, a na svakom mikroskopskom preparatu prebrojano je 250 stanica, tj. 500 stanica po lukovici odnosno 2500 po tretmanu za kromosomske aberacije i mitotski indeks.

Mitotski indeks je mjera kojom se utvrđuje postotak stanica u mitozu. Izražava se kao omjer između broja stanica u mitozu i ukupnog broja stanica. Moguće ga je izračunati prema izrazu:

$$\text{Mitotski indeks} = \frac{(P + M + A + T)}{N} \cdot 100\%$$

u kojem je (P+M+A+T) suma svih stanica u profazi, metafazi, anafazi i telofazi, a N je ukupan broj stanica. Po svakom tretmanu prebrojano je ukupno 2500 stanica i zabilježeno je koliko je stanica u mitozu. Stanice se broje pregledom cijelog vidnog polja mikroskopa na povećanju 1000 puta, pomicanjem preparata s lijeva na desno, pazeći pritom da ne dolazi do dvostrukog brojanja.

Mutacije koje su praćene uključuju kromosomske aberacije te promjene u interfaznim jezgrama. Kromosomske aberacije su anomalije u broju i/ili građi kromosoma. U radu su kroz različite faze mitoze, bile praćene kromosomske aberacije kao što su: anafazni mostovi, lomovi kromosoma, c-mitotza, ljepljivi kromosomi. Kromosomske aberacije određivale su se mikroskopskom analizom tj. vizualnom usporedbom obojanih jezgri tretiranih stanica sa poznatim prikazima stanica u različitim fazama mitoze. Rezultat je izražen kao udio kromosomskih aberacija u ukupnom broju izbrojanih stanica po tretmanu (2500). Praćene su i moguće promjene (vakuole) u interfaznim jezgrama.

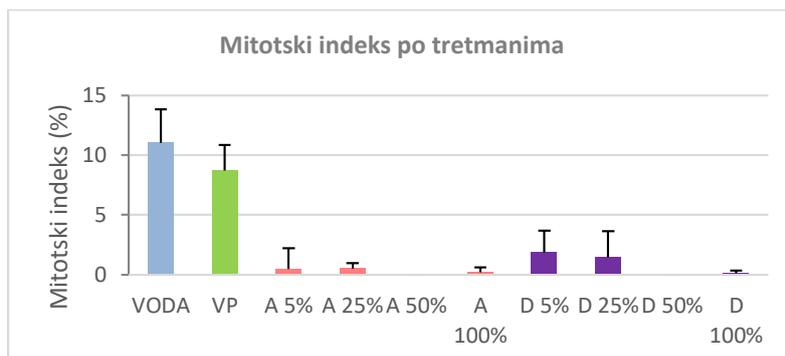
Duljina korjenčića je izmjerena tako što je luk nakon 72 h izvađen iz tretmana i svi korjenčići su bili odrezani skalpelom na bazi te je izmjerena njihova duljina i izražena kao prosječna vrijednost duljine korjenčića po tretmanu.

Dobiveni rezultati o mitotskom indeksu, duljini korjenčića, kromosomskim aberacijama i drugim mutacijama statistički su obrađeni i prikazani grafikonima u programu Excel (MS Office 2010, Microsoft, SAD). U statističkoj analizi korištene su standardne devijacije za procjenu odstupanja od srednje vrijednosti, a statistička značajnost utvrđivana je ANOVA testom. Ukoliko je P vrijednost (engl. probability – vjerojatnost) manja od 0,05 (što je postavljeno kao granica značajnosti), rezultat se smatra statistički značajnim. To znači da je vjerojatnost da je rezultat slučajan manja od 5 %. Ukoliko je P vrijednost veća od 0,05 rezultat se smatra statistički neznačajnim. Osim mitotskog indeksa, kromosomskih aberacija i duljine korjenčića, promatrana su i morfološka obilježja korjenčića kao što su: čvrstoća, boja i debljina korjenčića.

REZULTATI

Mitotski indeks

Prebrojavanjem stanica na mikroskopskim preparatima utvrđen je udio stanica u mitozu u odnosu na ukupan broj stanica za različite tretmane te je izračunat mitotski indeks. Dobiveni rezultati prikazani su Slikom 2.

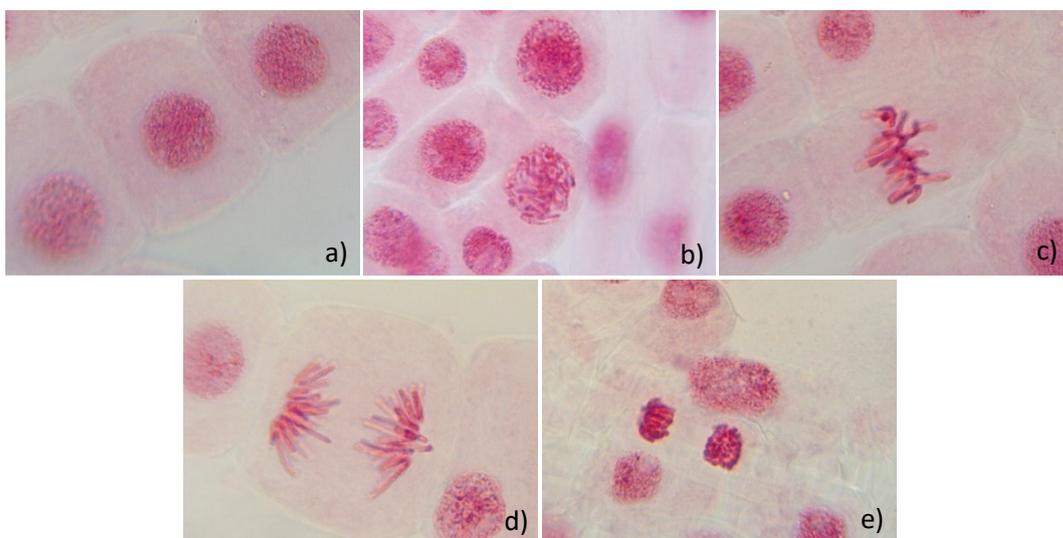


Slika 2. Prikaz mitotskog indeksa (%) u meristemskim stanicama korijena luka, nakon 24h tretmana (Voda-negativna kontrola, VP-vodikov peroksid-pozitivna kontrola, A- antiperspirant, D-dezodorans). Standardne devijacije su prikazane trakama pogreške.

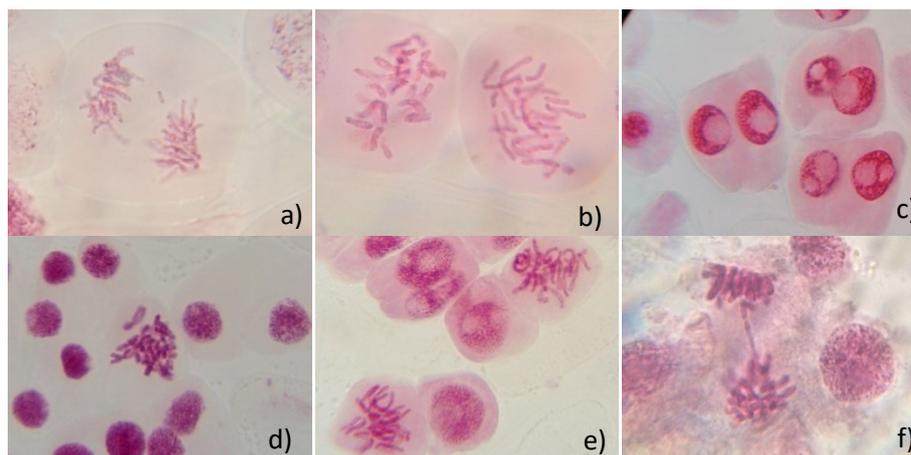
Iz prikaza je vidljivo da su antiperspirant i dezodorans u svim korištenim koncentracijama značajno smanjili mitotski indeks u odnosu na negativnu kontrolu ($P < 0,01$). Također se može uočiti da su razlike u djelovanju antiperspiranta različitih koncentracija neznačajne ($P = 0,81$) kao i razlike u djelovanju dezodoransa različitih koncentracija ($P = 0,10$). Nije uočljiva niti značajna razlika između djelovanja antiperspiranta i dezodoransa u različitim korištenim koncentracijama ($P > 0,05$).

Mutacije

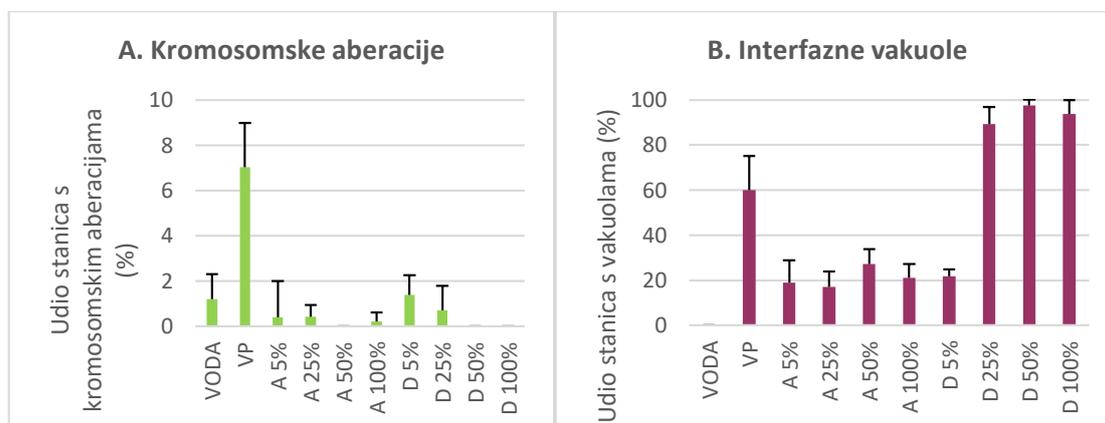
Mikroskopskom analizom stanica praćene su mutacije koje uključuju različite kromosomske aberacije i interfazne vakuole u jezgri. Slikom 3 prikazane su stanice u normalnim fazama diobe, a Slikom 4 stanice s mutacijama. Rezultat je izražen kao udio stanica s mutacijama u odnosu na ukupan broj prebrojanih stanica. Dobiveni rezultati prikazani su Slikom 5, za kromosomske aberacije (A) i interfazne vakuole (B).



Slika 3. Normalne mitotske diobe u meristemskim stanicama *Allium cepa* L. ($2n=16$)
(a) interfaza, (b) profaza, (c) metafaza, (d) anafaza, (e) telofaza

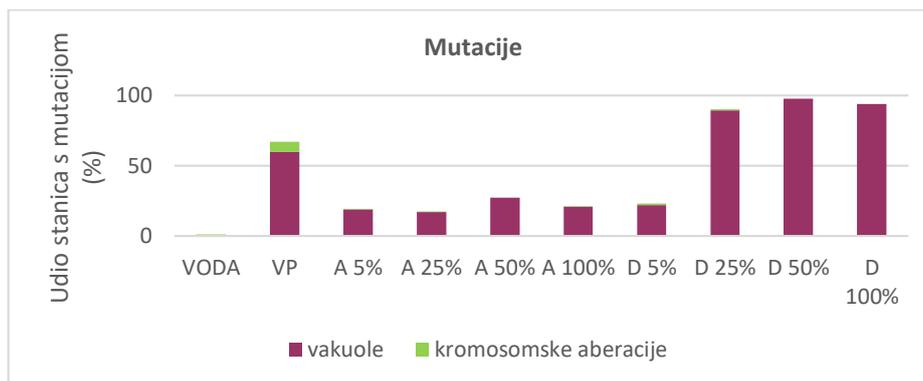


Slika 4. Abnormalne mitotske diobe uočene u tretiranim meristemskim stanicama *Allium cepa* L. ($2n=16$) (a) odlomljeni kromosomi (b) c-mitoza (c) interfazne jezgre (d) ljepljivi kromosomi (e) ljepljivi kromosomi i interfazne vakuole (f) anafazni most



Slika 5. Prikaz udjela stanica s kromosomskim aberacijama (%) (A) te udjela stanica s interfaznim vakuolama (%) (B) u meristemu korijena luka, nakon 24h tretmana (Voda- negativna kontrola, VP- vodikov peroksid pozitivna kontrola, A- antiperspirant, D- dezodorans). Standardne devijacije su prikazane trakama pogreške.

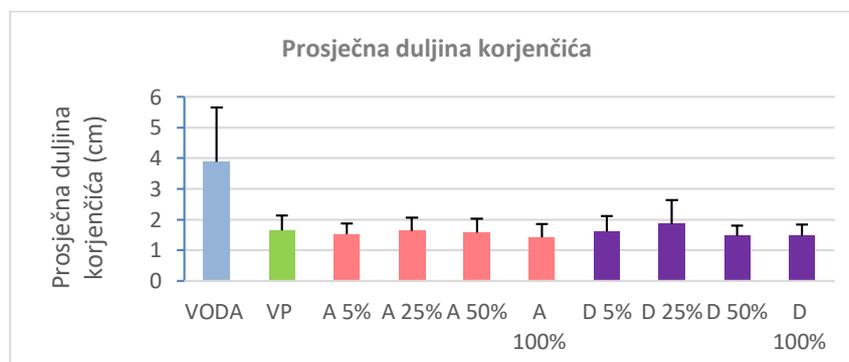
Slikom 6 prikazan je udio ukupnih mutacija (kromosomskih aberacija i interfaznih vakuola) u ukupnom broju izbrojanih stanica. Iz prikaza je vidljivo da su antiperspirant i dezodorans u svim koncentracijama uzrokovali mutacije, među kojima prevladavaju interfazne vakuole. Između antiperspiranta različitih koncentracija razlike u mutacijama nisu značajne ($P=0,84$). Kod dezodoransa različitih koncentracija, uočava se statistički značajna razlika samo između D 5% i ostalih koncentracija ($P=0,01$). Uspoređujući antiperspirant i dezodorans pri najnižoj koncentraciji (5%) nema značajnih razlika ($P=1,16$), dok je pri višim koncentracijama vidljiv značajno veći negativni učinak dezodoransa ($P>0,54$) i to uglavnom u obliku interfaznih vakuola, čiji je udio veći i od pozitivne kontrole.



Slika 6. Prikaz udjela stanica s mutacijama (kromosomske aberacije i interfazne vakuole) u meristemu korijena luka, nakon 24h tretmana (Voda-negativna kontrola, VP-vodikov peroksid pozitivna kontrola, A-antiperspirant, D-dezodorans).

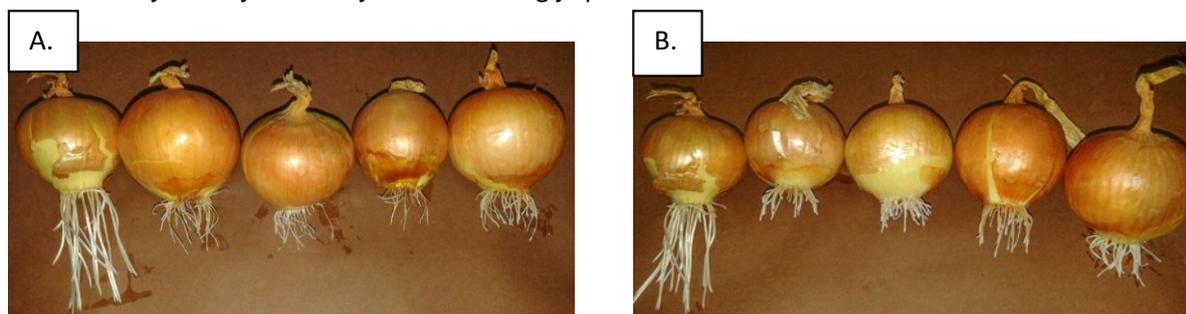
Prosječna duljina korjenčića

Slikom 7 prikazane su prosječne duljine korjenčića lukovica u centimetrima nakon 72 h tretmana. Uočeno je da su antiperspirant i dezodorans u svim koncentracijama značajno usporili rast korjenčića u odnosu na vodu ($P < 0,01$). Gotovo su podjednake duljine međusobno te u odnosu na pozitivnu kontrolu.



Slika 7. Prikaz prosječne duljine korjenčića (cm), nakon 72h tretmana (Voda-negativna kontrola, VP- vodikov peroksid-pozitivna kontrola, A-antiperspirant, D- dezodorans). Standardne devijacije su prikazane trakama pogreške.

Različite duljine korjenčića i njihove morfologije prikazane su na slici 8.



Slika 8. Usporedba duljine korjenčića i morfologije kod lukovica A) redom H₂O, A 100%, A 50%, A 25% i A 5% te B) redom H₂O, D 100%, D 50%, D 25% i D 5%

Morfologija korjenčića promijenjena je u svim koncentracijama većim od 5% i kod antiperspiranta i dezodoransa. Korjenčići su tanji, mekši i često su nešto tamnije boje, a oni koji su rasli u 5% otopini su



bili normalni, odnosno slični onima koji su rasli u vodi, osim po svojoj duljini. Korjenčići rasli u vodikovom peroksidu bili su morfološki poput onih iz vode, ali su bili kraći (nije prikazano slikom).

RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je usporediti količinu promjena koje izaziva jedan odabrani antiperspirant s aluminijevim klorhidratom i jedan dezodorans koji se reklamira kao prirodni preparat bez aluminijevih spojeva, za vrijeme mitoze korjenčića luka u ovisnosti o njihovoj koncentraciji.

Istražen je utjecaj antiperspiranta i dezodoransa na korjenčiće luka u različitim koncentracijama (5%, 25%, 50% i 100%). Za svaki tretman određen je mitotski indeks, udio mutacija u ukupnom broju stanica, izmjerena je duljina korjenčića svake lukovice te je promatrana njihova morfologija.

Hipoteza koju sam postavila bila je da će antiperspirant i dezodorans u odnosu na negativnu kontrolu uzrokovati smanjenje rasta i mitotskog indeksa, promijenjenu morfologiju te povećan broj mutacija, te da će sve promjene biti izraženije kod antiperspiranta u odnosu na dezodorans. Pretpostavka je također bila i da će se u svim navedenim parametrima uočiti razlika ovisno o primijenjenoj koncentraciji antiperspiranta i dezodoransa.

Antiperspirant i dezodorans uzrokovali su znatno smanjenje rasta (oko 40,5%) i mitotskog indeksa (oko 94,8%) u odnosu na negativnu kontrolu (H_2O) u svim korištenim koncentracijama, što je samo djelomično potvrdilo našu hipotezu, budući da nisu uočena odstupanja ovisno o različitim koncentracijama. Mitotski indeks na vodi kao negativnoj kontroli je u ovome radu bio 11%, dok se u radovima drugih istraživača nalaze mitotski indeks od 13% (Sutan 2014) pa sve do 35% (Sreeranjini i Siril 2011). U odnosu na pozitivnu kontrolu (H_2O_2) duljina korjenčića bila je podjednaka, a mitotski indeks znatno manji kao i u istraživanju koje su proveli Radić i sur. (2010). Jednaka duljina korjenčića u antiperspirantu, dezodoransu i vodikovom peroksidu kao pozitivnoj kontroli pokazuje da luk u tim tretmanima nije dodatno porastao od početne duljine (1-2 cm) kada su lukovice prebačene iz vode u tretman. Slabi porast korjenčića je u pozitivnoj korelaciji s malim brojem dioba odnosno niskim mitotskim indeksom i velikim brojem jezgara u interfazi. Smanjenje mitotskog indeksa upućuje na genotoksični učinak tretmana vjerojatno zbog interferencije s regulacijom staničnog ciklusa ili zbog oštećenja DNA što dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa (Sutan i sur, 2014).

U skladu s ovim rezultatima je i promijenjena morfologija korjenčića pri svim koncentracijama antiperspiranta i dezodoransa. Uočena je jedino veća razlika pri koncentraciji 5% u odnosu na više koncentracije.

Dobiveni rezultati su vjerojatno posljedica velikog toksičnog učinka antiperspiranta i dezodoransa na korjenčiće luka već pri manjim koncentracijama, pa povećanje koncentracije nije dovodilo do dodatnih promjena.

Pregledom mutacija utvrđen je veoma malen broj kromosomskih aberacija (0,2-0,5%) kod svih koncentracija antiperspiranta i dezodoransa u odnosu na pozitivnu (6,5%) i negativnu kontrolu (0,5%). U vodikovom peroksidu uočene su različite kromosomske aberacije u stanicama u diobi, od kojih su najbrojnije bile ljepljivi kromosomi te c-mitoze što odgovara rezultatima koji su dobiveni kod



Radić i sur. (2010). C-mitoza očituje se kao maksimalno kondenzirani kromosomi porazbacani po stanici i nastaje kao posljedica štetnog djelovanja na diobeno vreteno. Ljepljivi kromosomi se prepoznaju u metafazi kao nepravilno smotane strukture koje su i međusobno povezane, a znak su toksičnog djelovanja na organizaciju kromatina zbog utjecaja na histonske bjelančevine (Radić i sur, 2010). Rjeđe su uočeni anafazni mostovi i lomovi kromosoma. Anafazni mostovi pojavljuju se kao jedna ili dvije kromosomske strukture koje povezuju dvije grupe kromosoma prilikom razdvajanja u anafazi kao rezultat nepotpunog odvajanja kromatida nekog kromosoma. Lomovi kromosoma prepoznaju se kao fragmenti kromosoma odvojeni od ostatka kromosoma, a nastaju kao posljedica prekida DNA molekule (Cabaravdic, 2010).

Kromosomske aberacije moguće je uočiti ukoliko se stanice nalaze u diobi, a u stanicama luka tretiranim antiperspirantom i dezodoransom gotovo da i nije bilo dioba. U tim su stanicama međutim uočene promjene u interfaznim jezgrama, velike bijele vakuole, što također upućuje na ozbiljne citotoksične učinke ispitivanih tvari. U znatnoj mjeri uočene su i prilikom ispitivanja utjecaja otpadnih voda (Abu i Ezeugwu, 2008) i fungicida (Sutan i sur, 2014) uz *Allium cepa* test, ali nije objašnjen mogući mehanizam njihova nastanka.

Rezultati pokazuju da je udio interfaznih vakuola značajno veći u dezodoransu, u odnosu na antiperspirant, u svim koncentracijama većim od 5% što ne potvrđuje moju hipotezu o manjem mutagenom učinku dezodoransa. Interfazne vakuole uočene su i u pozitivnoj kontroli (60%), ali u manjoj mjeri nego u dezodoransu (89-97%). O pojavi interfaznih vakuola na korjenčićima luka pod utjecajem vodikovog peroksida izvijestili su u svom radu i Sreeranjini i Siril (2011), no u radovima drugih istraživača koji su za pozitivnu kontrolu uzimali vodikov peroksid se ne spominju. Razlog značajanom udjelu interfaznih vakuola u korjenčićima koji su bili izloženi vodikovom peroksidu ne može se sa sigurnošću utvrditi. Prilikom utvrđivanja tipova mutacija postoji određena mogućnost pogreške obzirom da je analiza rađena bez pomoći stručnjaka iz tog područja, međutim kao krajnji rezultat nije bio cilj utvrditi udio pojedinog tipa mutacija već udio mutacija uopće, što se dosta pouzdano može ustvrditi usporedbom s normalnim fazama mitoze.

Ovi rezultati pokazuju da antiperspirant i dezodorans imaju citotoksični i genotoksični učinak na korjenčićima luka koji se očituje kroz inhibiciju rasta korjenčića i zaustavljanje dioba, te pojavu mutacija koje su vidljive u obliku interfaznih vakuola. Ovo ispitivanje nije pokazalo da dezodorans bez aluminija ima blaže djelovanje od antiperspiranta s aluminijem, barem u pogledu mutacija koje su mogle biti detektirane ovim eksperimentom. Također, ne može se ustvrditi što je iz kompleksne smjese spojeva koji čine jedan dezodorans ili antiperspirant imalo štetan utjecaj na stanice luka, već samo da oni kao kompleksna smjesa imaju negativan učinak. Ipak, obzirom da se ovi preparati upravo kao takve kompleksne smjese i nanose na kožu čovjeka, smatram da ovi rezultati mogu biti korisni.

O mogućem štetnom utjecaju ovih kozmetičkih preparata na čovjeka može se samo nagađati, jer njihov utjecaj svakako ovisi i o apsorpciji kroz kožu i dubini prodora u tkiva. Na to sigurno mogu utjecati i oštećenja kože na mjestu primjene npr. zbog korištenja britvica. Nadam se da je ovim radom podignuta svijest o mogućoj štetnosti kozmetičkih proizvoda te da će ljude potaknuti na razmišljanje o proizvodima koje nanose na svoju kožu.



Istraživanje bi trebalo proširiti na ispitivanje utjecaja antiperspiranata i dezodoransa u puno nižim koncentracijama, koje moguće ne bi izazvale potpuni zastoj dioba i rasta te omogućile lakše praćenje mutacija.

ZAKLJUČCI

Prema rezultatima provedenog istraživanja ustanovljeno je da:

- ✔ korišteni antiperspirant i dezodorans u svim koncentracijama djeluju genotoksično i citotoksično na meristemske stanice korjenčića luka
- ✔ antiperspirant i dezodorans uzrokovali su inhibiciju rasta korjenčića, smanjenje mitotskog indeksa, promjenu morfologije te pojavu mutacija
- ✔ dezodorans je uzrokovao veći broj mutacija od antiperspiranta, vidljivih u obliku interfaznih vakuola u jezgri
- ✔ veće razlike između djelovanja antiperspiranta i dezodoransa različitih koncentracija nisu uočene
- ✔ istraživanje bi trebalo proširiti koristeći manje koncentracije navedenih kozmetičkih preparata.

LITERATURA

- Abu N., Ezeugwu S.C. 2008. Risk of evaluation of industrial wastewater on plants using onion (*Allium cepa* L.) chromosome aberration assay/ Journal of Tropical Agriculture, Food, Environment and Extension Volume 7 Number 3 September 2008 pp. 242-248
- Cabaravdic M. 2010. Induction of Chromosome Aberrations in the *Allium Cepa* Test System Caused by the Exposure of Cells to Benzo(a)pyrene - MED ARH 2010; 64(4)
- Chauhan L.K.S., Saxena P.N. i Gupta S.K. 1999. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*, Environ. Exp. Bot. 42 (1999) 181–189.
- Darbre P.D. 2009. Antiperspirants/deodorants and breast cancer. Breast cancer research. 11 (Suppl 3):S5
- Exley C., Charles L.M., Barr L., Martin C., Polwart A., Darbre P.D. 2007. Aluminium in human breast tissue, Journal of Inorganic Biochemistry 101 (2007) 1344–1346
- Fiskesjo G. 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. - Hereditas 102: 99-112.
- Grant W.F. 1982. Chromosome aberration assays in *Allium*, Mutat. Res. 99 (1982) 273–291.
- İlbaş A.I., Gönen U., Yılmaz S., Dadandı M.Y., 2011. Cytotoxicity of Aloe vera gel extracts on *Allium cepa* root tip cells - Turk J Bot 36 (2012): 263-268
- Khanna N., Sharma S. 2013 *Allium Cepa* Root Chromosomal Aberration Assay: A Review, Indian J. Pharm. Biol. Res Vol. 1 (3), Sep., 2013
- Leme D., Marin-Morales M. A. 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. Mutation Research 682: 71–81
- Radić S., Stipaničev D., Vujčić V., Marijanović Rajčić M., Širac S., Pavalek-Kozlina B. 2010. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test / Science of the Total Environment 408 (2010) 1228-1233
- Rank J. i Nielsen M.H. 1993. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. - Hereditas 118: 49-53
- Rank J. i Nielsen M.H. 1994. Evaluation of the *Allium* anaphase–telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater, Mutat. Res. 312 (1994) 17–24.
- Sreeranjini S. i Siril E.A. 2011. Evaluation of anti-genotoxicity of the leaf extracts - Plant Soil Environ., 57, 2011 (5): 222–227
- Șuțan A.N., Popescu A., Mihăescu C., Soare L.C., Marinescu M.V. 2014. Evaluation of Cytotoxic and Genotoxic Potential of the Fungicide Ridomil in *Allium cepa* L/ Analele Stiint. Univ. Al. I. Cuza Iasi, Sect. II a. Biol. veget., 60, 1: 5-12
- Tedesco S.B., Laughinghouse IV H. D. 2012. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. Srivastava J. K. (ur), Environmental contamination. InTech DOI: 10.5772/31371. Dostupno na: <http://www.intechopen.com/books/environmental-contamination/bioindicator-of-genotoxicity-the-allium-cepa-test>, pristupljeno 23.11.2016.
- Znanost 2012. Dezodoransi protiv znojenja najvjerojatnije doprinose raku dojke. Znanost Hrvatski popularno-znanstveni Portal. <https://geek.hr/znanost/>, pristupljeno: 22.3.2017.

DOBRI ILI LOŠI SUSJEDI U VAŠEM VRTU

Jelena Trbara, 3. razred

Maja Novosel, 3. razred

II. gimnazija, Zagreb

Mentor: Bojana Davda Sirovina

SAŽETAK

Istraživanje je provedeno s ciljem utvrđivanja alelopatskih utjecaja vodenih ekstrakata vrsta *Narcissus* spp., *Aloe vera* i *Stevia rebaudiana* na klijavost, rast i masu sjemena zelene salate (*Lactuca sativa*). Alelopatija je pozitivan i negativan utjecaj biljke, kroz ispuštanje alelokemikalija, na drugu biljku. Istraživanje je provedeno u Petrijevim zdjelicama s vodenim ekstraktima ispitivanih alelopatskih biljaka koncentracija 2%, 4%, 6%, 8%. Svi ekstrakti imali su statistički značajan negativan utjecaj na klijavost sjemena salate. Kod ekstrakata vrsti *Narcissus* spp. i *Stevia rebaudiana* duljina korijena bila je pod pozitivnim alelopatskim utjecajem kod nižih koncentracija, dok su više koncentracije imale negativan utjecaj. Duljina korijena kod tretmana ekstraktom aloe vere bila je pod pozitivnim utjecajem i povećavala se usporedno s povećanjem koncentracija. Duljina izdanka bila je inhibirana kod ekstrakta sunovrata, a većina koncentracija ekstrakata aloe vere i stevije imali su pozitivan utjecaj na duljinu izdanaka zelene salate. Nijedan vodeni ekstrakt nije imao statistički značajan utjecaj na svježiu i suhu masu klijanaca zelene salate.

Ključne riječi: alelopatija, Narcissus spp. Aloe vera, Stevia rebaudiana, Lactuca sativa, ekstrakti

UVOD

Jedna od važnih stvari naših života današnjeg doba jest zdravlje i upravo zato ljudi se okreću zdravijem načinu života, što znači i zdravijoj, organski i ekološki uzgojenoj hrani. Mnogi odlučuju uzgajati vlastitu hranu, začine i biljke u svojim vrtovima, no to nije uvijek jednostavno posebice u urbanim središtima gdje je sve manje zelenih površina pa vrtovi nastaju na malim površinama i raznim lokacijama: terasama, krovovima nebodera i garaža i slično. Kod takvih manjih vrtova osobito je važno planiranje i organizacija, kao i odabir biljaka za uzgoj, odnosno valja paziti na razmještaj biljaka jer uspješni rast biljke ovisi o mnogim čimbenicima, vrsti tla, količini svjetlosti pa tako i o utjecaju jedne biljke na drugu odnosno njihovim alelopatskim svojstvima. Postoji izreka „prava biljka za pravo mjesto“ i upravo iz zanimanja o „dobrim i lošim susjedima“ u vrtu rodila se ideja za ovaj rad.

Alelopatija je direktan ili indirektan utjecaj jedne biljke, uključujući mikroorganizme i gljive, kroz ispuštanje kemijskih spojeva, alelokemikalija, u okoliš, na rast i razvoj druge biljke (Rice, 1984). Alelopatski utjecaj biljke može imati pozitivne rezultate, ali generalno smatra se da ima negativne rezultate na drugu biljku (Elijarrat i Barcelo, 2001). Riječ alelopatija grčkog je porijekla i dolazi od riječi *allelon* što znači uzajaman, i riječi *pathos* što znači stradanje. Pojam je prvi upotrijebio austrijski biljni fiziolog Hans Molisch, no alelopatija je bila poznata još u antičkom dobu. Najranija zabilježena opažanja o alelopatiji usjeva i korova imali su Teofrast i Plinije II. koji su uočili da biljke kao što su slanutak (*Cicer arietinum*), ječam (*Hordeum vulgare*), piskavica (*Trigonella foenum-graecum*) i gorka grahorica (*Vicia ervilia*) uništavaju poljoprivredna zemljišta. Alelopatija je jedan od načina interakcije između receptora i donatorskih biljaka, a može vršiti bilo pozitivne učinke (npr. za poljoprivredno upravljanje, kao što je suzbijanje korova, zaštita bilja ili ponovna uspostava biljne proizvodnje) ili negativne učinke (npr. autotoksemija, bolesti tla ili biološka invazija).

Alelopatija ima važnu ulogu u istraživanjima o odgovarajućim poljoprivrednim sustavima, kao i u kontroli korova, bolesti kukaca, za ublažavanje kontinuiranih usjevnih prepreka i uzgoj sorti. Nadalje,



alelokemikalije mogu djelovati kao ekološki herbicidi, fungicidi, insekticidi i regulatori rasta biljaka, te također mogu imati veliku vrijednost u održivoj poljoprivredi. Današnja saznanja o alelopatiji mnogo su veća zahvaljujući tehnološkim napredcima i razvoju odgovarajućih tehnika za ekstrakciju, biološko određivanje kemijske izolacije i identifikacije.

Kemikalije s alelopatskim potencijalom prisutne su gotovo u svim biljkama i njihovim tkivima, uključujući lišće, stabljike, korijene, cvjetove, sjeme, koru i pupoljke. U odgovarajućim ekološkim uvjetima, ti fitotoksini mogu biti pušteni u okoliš u dovoljnim količinama da utječu na rast susjednih biljaka. Standardni načini otpuštanja alelokemikalija su isparavanje, propadanje ostataka, ispiranje ili iscjedak korijena. Tolerancija ili osjetljivost na alelokemikalije razlikuje se od biljke do biljke i neke vrste osjetljivije su od drugih, kao što su rajčica (*Solanum lycopersicum*) i zelena salata (*Lactuca sativa*) koja se koristi u biološkim testovima kao alelopatski bioindikator (Ferreira i Aquila, 2000).

Zelena salata (*Lactuca sativa*) jednogodišnja je ili dvogodišnja biljka iz porodice glavočika (Asteraceae) i najčešće se uzgaja kao lisnato povrće. Poznata je još iz doba starih Grka i Rimljana koji su prepoznali njezina dragocjena svojstva, a danas je rasprostranjena i uzgaja se gotovo u cijelom svijetu. Koristi se u rasadnicima kao test na herbicide, te također u biološkim istraživanjima kao alelopatski bioindikator. Zbog navedenih karakteristika i dostupnosti izabrali smo zelenu salatu kao alelopatski bioindikator u našem istraživanju.

Za zdravi i raznoliki vrt neophodno je začinsko bilje i cvijeće te smo mi za naše istraživanje izabrale, umjesto začinskog bilja, ljekovitu biljku aloe veru (*Aloe vera*), sunovrat (*Narcissus* spp.) i sve popularniju steviju (*Stevia rebaudiana*).

Stevija (*Stevia rebaudiana*), poznata još kao „slatka biljka Paragvaja“, biljna je vrsta iz roda *Stevia* iz porodice glavočika (Asteraceae) porijeklom iz Južne Amerike, točnije Paragvaja. Sve se više koristi kao sladilo i zamjena za šećer zbog spojeva steviol glikozida koji listovima daju slatkoću 30-320 puta veću nego saharoza. Stevija, kao prirodni zaslađivač s nula kalorija, a dokazano netoksičnih učinaka na zdravlje ljudi, nedavno je našla široku primjenu u prehrambenoj industriji (Žlabur i sur, 2013). Povećanje interesa potrošača za prirodne sastojke hrane znači da će proizvodi poput stevija sladila biti izloženi sve većoj potražnji. Nasir i sur. (2005) dokazali su alelopatske utjecaje te izolirali alelokemikalije biljke stevija (*Stevia rebaudiana*) koje su poboljšale rast biljaka.

Aloe vera (*Aloe vera*) biljka je iz roda sukulenata koja dolazi iz područja Afrike, Madagaskara i Arabije. Poznata je i u starim kulturama gdje su stari korisnici Aloe vere otkrili da, kada se gel iz njezinih listova nanese na ranu, ona će brže zacijeliti. Aloe veru su među prvima koristili Egipćani, a njena svojstva bila su dobro prihvaćena od Kineza i Indijaca, a danas se uzgaja u cijelom svijetu. Listovi biljke sadržavaju brojne vitamine, minerale, enzime, aminokiseline, prirodne šećere i ostale bioaktivne spojeve s ublažavajućim, antimikrobnim, protuupalnim, antifungalnim i drugim djelovanjima na zdravlje (Sahu, 2013). Aloe vera ima potencijal za liječenje opekline, manjih posjekotina, u kozmetici se koristi kao iscjelitelj kože, a djeluje i kao snažan laksativ, te je poznata za liječenje raznih bolesti kao što su psorijaza, osteoartritis, astma, epilepsija i dr. Aloe vera (*Aloe vera*) inhibirala je klijanje i rast raži, salate, šćira i maslačka, dok je pospješila klijanje i rast pšenice (Alipour i sur, 2012).



Sunovrat (*Narcissus* spp.), poznatiji kao narcis, biljni je rod porodice Amaryllidaceae kojemu pripada 116 priznatih vrsta. Ime "Narcissus" dobio je od grčke riječi *narkao* (opiti, omamiti), jer cvijet ima alkaloid s narkotičkim djelovanjem. Porijeklo mu je iz sredozemnih krajeva Europe. Otkriven je alkaloid Narciclasine u više vrsta narcisa koji smanjuje rast drugih biljaka (Ceriotti, 1967).

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Proširenje saznanja o alelopatiji budući da u Hrvatskoj nema mnogo radova o toj temi.
2. Utvrđivanje alelopatskog utjecaja različitih koncentracija vodenih ekstrakata listova vrsta stevija (*Stevia rebaudiana*), aloe vera (*Aloe vera*) i sunovrat (*Narcissus* spp.) na klijavost i početni rast zelene salate (*Lactuca sativa*).
3. Uspoređivanje intenziteta alelopatskih utjecaja biljaka ovisno o različitim koncentracijama vodenih ekstrakata.

Pretpostavke postavljene prije samog istraživanja su:

1. Vodeni ekstrakti vrste stevija (*Stevia rebaudiana*) i aloe vera (*Aloe vera*) imat će pozitivan alelopatski utjecaj na klijanje i početni rast zelene salate (*Lactuca sativa*).
2. Vodeni ekstrakt vrste sunovrat (*Narcissus* spp.) imat će negativan alelopatski utjecaj na klijanje i početni rast zelene salate (*Lactuca sativa*).
3. Intenzitet alelopatskih utjecaja biljaka na zelenu salatu povećava se proporcionalno s koncentracijama vodenih ekstrakata.

Očekivani doprinos ovog istraživanja nove su spoznaje o alelopatskim utjecajima biljaka stevije, aloe vere i sunovrata na zelenu salatu, kao i o alelopatiji općenito jer iako se s povećanjem naglaska na ekološkoj poljoprivredi i zaštiti okoliša sve veća pažnja posvećuje upravo alelopatiji, u Hrvatskoj joj se još uvijek ne pridaje toliki značaj, pa bi naša saznanja mogla pridonijeti boljoj organizaciji vrtova te poljoprivrednoj proizvodnji.

METODE RADA

Materijal i metode

Istraživanje je provedeno u prostorima škole u cilju utvrđivanja alelopatskog utjecaja vodenih ekstrakata biljaka stevije (*Stevia rebaudiana*), aloe vere (*Aloe vera*) i sunovrata (*Narcissus* spp.) na klijavost i početni rast zelene salate (*Lactuca sativa*).

Sjeme zelene salate (*Lactuca sativa*), kao i potrebne biljke prikupljene su u vrtnom centru Zrinjevac.

Priprema vodenih ekstrakata

Od navedenih biljaka, stevije, aloe vere i sunovrata, pripremljeni su vodeni ekstrakti prema izmijenjenoj metodi Hanafy i sur. (2012). Suhi listovi biljke stevija (*Stevia rebaudiana*) mase 100g usitnjeni su na komadiće i zatim samljeveni u električnoj miješalici kako bi se dobio prah. Dobiveni prah mase 100g pomiješan je s 1000mL destilirane vode i ostavljen 24 sata na sobnoj temperaturi (22 ± 2°C). Mješavina je procijeđena kroz muslin tkaninu kako bi se uklonili ostatci i zatim kroz filter papir. Dobiveni ekstrakt razrijeđen je destiliranom vodom kako bi se dobili ekstrakti koncentracije 8%, 6%, 4% i 2%.

Isti postupak i metoda primijenjeni su na svježe listove biljaka aloe vera (*Aloe vera*) i sunovrat (*Narcissus spp.*).



Slika 1 Dobivanje ekstrakata od vrsti *Narcissus spp.*, *Aloe vera* i *Stevia rebaudiana*

Test vrsta

Sjeme zelene salate (*Lactuca sativa*) koje je prikupljeno u vrtnom centru Zrinjevac površinski je sterilizirano 20 minuta s 1% NaOCl (4% komercijalni izbjeljivač razrijeđen vodom) i zatim isprano tri puta destiliranom vodom (Siddiqui i sur, 2009).

Pokus

Pokus je postavljen u dva ponavljanja. Ispitivanje utjecaja vodenih ekstrakata pripremljenih otopina na sjeme zelene salate (*Lactuca sativa*) provedeno je u Petrijevim zdjelicama. U Petrijeve zdjelice na filter papir navlažen s 4mL vodenog ekstrakta koncentracija 8%, 6%, 4% i 2% stavljeno je 30 sjemenki zelene salate. Kontrolni uzorak bila je Petrijeva zdjelica s filter papirom navlaženim s 4mL destilirane vode.

Petrieve zdjelice držane su na sobnoj temperaturi ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) kroz 14 dana. Petrijeve zdjelice bile su zatvorene parafilmom kako bi se maksimalno smanjilo isparavanje ekstrakata i sušenje sjemena zelene salate. Destilirana voda dodana je tijekom pokusa po potrebi u slučaju sušenja sadnica. Na svakoj Petrijevoj zdjelici zapisano je početno slovo biljke od koje je dobiven ekstrakt te postotak ekstrakta kojim je tretirana zelena salata.

Prikupljanje i statistička analiza podataka

Za svako ponavljanje izračunat je postotak klijavosti sjemena zelene salate po sljedećoj formuli:

$$K \text{ (klijavost \%)} = \frac{\text{broj prokljalih sjemenki}}{\text{ukupan broj sjemenki}} \times 100$$

Prokljalom se smatra sjemenka koja ima korijen $\geq 0,2\text{cm}$. Također je izmjerena duljina korijena prokljalih sjemenki (cm) i duljina izdanka prokljalih sjemenki (cm). Duljine korijena i izdanka izmjerene su pomičnim mjerilom. Osim toga, analitičkom vagom mjerene su svježa masa prokljalih

sjemenki (mg) i suha masa prokljalih sjemenki (mg) nakon sušenja u sušioniku na 70°C tijekom 48 sati.



Slika 2 Pokus u Petrijevim zdjelicama, vaganje klijanaca salate, sušenje klijanaca salate

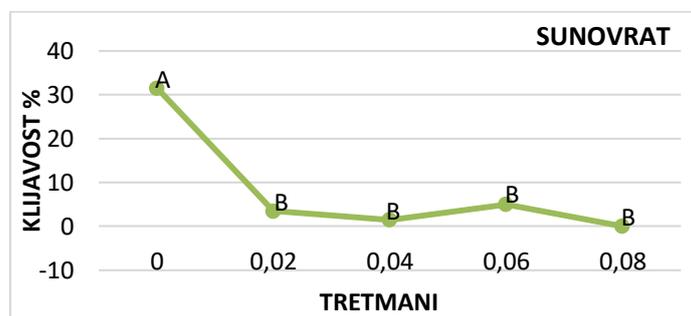
Prikupljeni podaci statistički su analizirani analizom varijance (ANOVA), dok su razlike između tretmana uspoređene pomoću LSD testa na razini 0.05. Dobiveni rezultati su, osim tekstualno, zbog preglednosti, prikazani i grafički.

REZULTATI

Alelopatski utjecaj vodenih ekstrakata vrste *Narcissus* spp. na zelenu salatu (*Lactuca sativa*)

Klijavost

Vodeni ekstrakt vrste *Narcissus* spp. imao je statistički značajan utjecaj na klijavost sjemena zelene salate (*Lactuca sativa*). Smanjenje klijavosti kod 2% ekstrakta iznosilo je 28%, kod 4% ekstrakta iznosilo je 30% te kod ekstrakta koncentracije 6% klijavost je bila smanjena za 26,5% u odnosu na kontrolu. Kao što je vidljivo na Slici 3 povećanjem koncentracije ekstrakata smanjivala se klijavost, uz izuzetak odstupanja kod 6% ekstrakta.

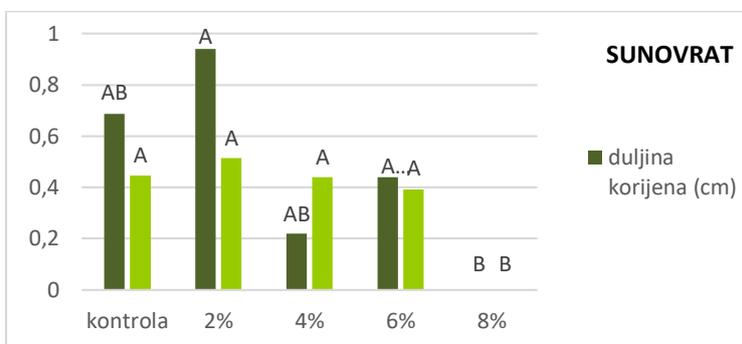


Slika 3 Utjecaj vodenih ekstrakata vrste *Narcissus* spp. na klijavost (%) sjemena zelene salate (*Lactuca sativa*); A, B – statistički značajna razlika A u odnosu na B ($p < 0,05$; Fisher (LSD) test)

Duljina korijena i izdanka

Vodeni ekstrakti listova sunovrata nisu pokazali statistički značajan utjecaj na duljinu korijena salate, osim ekstrakta koncentracije 8% koji je u odnosu na ekstrakt koncentracije 2% imao smanjenje duljine korijena za 94%. Sve ostale koncentracije ekstrakta smanjile su duljinu korijena od 36% do 68% u odnosu na kontrolu kao što je vidljivo na slici 4.

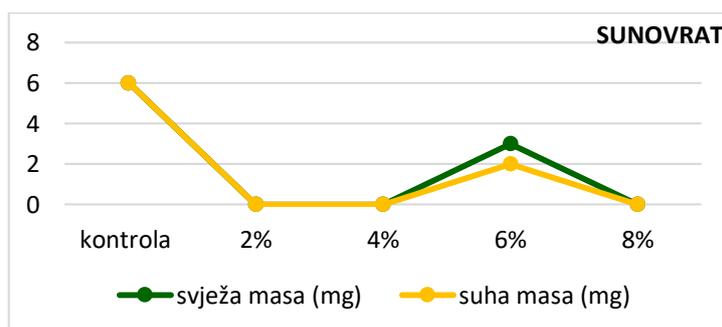
Vodeni ekstrakti listova sunovrata imali su statistički značajan utjecaj na duljinu izdanka. Slika 4 pokazuje kako je jedino povećanje duljine izdanka bilo za 13,6% kod ekstrakta koncentracije 2%, dok su svi ostali ekstrakti smanjili duljinu izdanka u odnosu na kontrolu. Ekstrakt koncentracije 4% smanjio je duljinu izdanka za 1,1%, 6% ekstrakt za 11,7%, dok je kod 8% ekstrakta smanjenje iznosilo čak 44,5%.



Slika 4 Utjecaj vodenih ekstrakata vrste *Narcissus spp.* na duljinu korijena (cm) i izdanka (cm) klijanaca zelene salate (*Lactuca sativa*); A, B – statistički značajna razlika A u odnosu na B ($p < 0,05$; Fisher (LSD) test)

Svježa i suha masa

Svježa i suha masa također nisu bile pod statistički značajnim utjecajem vodenih ekstrakata listova sunovrata. Na slici 5 vidljivo je kako su svježa i suha masa bile prilično jednake. Najmanje smanjenje svježe i suhe mase klijanaca zelene salate zabilježeno je kod ekstrakta koncentracije 6%; svježa masa smanjila se za 50%, a suha masa za 66,7%.

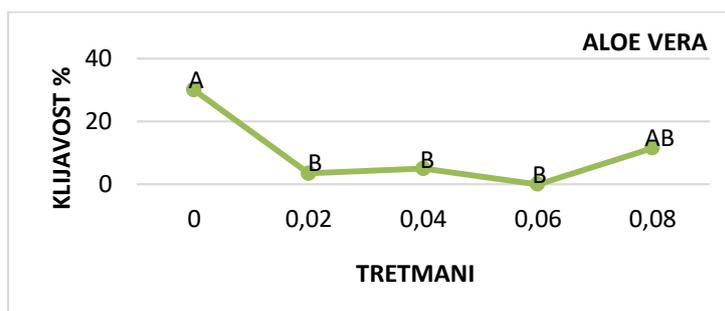


Slika 5 Utjecaj vodenih ekstrakata vrste *Narcissus spp.* na svježu (mg) i suhu masu (mg) klijanaca zelene salate (*Lactuca sativa*)

Alelopatski utjecaj vodenih ekstrakata vrste *Aloe vera* na zelenu salatu (*Lactuca sativa*)

Klijavost

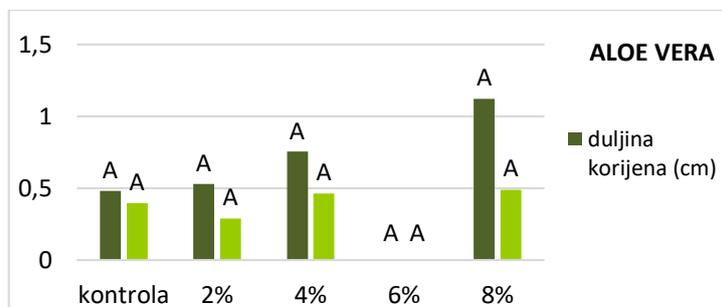
Vodeni ekstrakti vrste *Aloe vera* imali su statistički značajan utjecaj na klijavost sjemena zelene salate (*Lactuca sativa*). Slika 6 pokazuje da je smanjenje klijavosti kod 2% ekstrakta iznosilo 26,5%, dok je 4% ekstrakt smanjio klijavost 25%, a kod 6% ekstrakta nije bilo proklijalog sjemena salate. Dakle povećanjem koncentracije, smanjivala se klijavost, izuzevši 8% ekstrakt.



Slika 6 Utjecaj vodenih ekstrakata vrste *Aloe vera* na klijavost (%) sjemena zelene salate (*Lactuca sativa*)
A, B – statistički značajna razlika A u odnosu na B ($p < 0,05$; Fisher (LSD) test)

Duljina korijena i izdanka

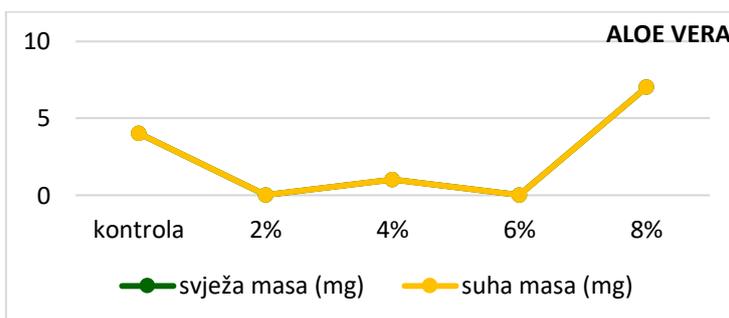
Vodeni ekstrakti listova aloe vere nisu pokazali statistički značajan utjecaj na duljinu korijena izdanaka salate. Ekstrakt koncentracije 8% imao je najveći utjecaj, što je vidljivo na Slici 7, te je povećao duljinu korijena za 57,2%, zatim 4% ekstrakt povećao je duljinu korijena za 36,5%, a kod 2% ekstrakta povećanje je iznosilo 9,2% u odnosu na kontrolu. Statistički značajan utjecaj vodeni ekstrakti aloe vere nisu imali ni na duljinu izdanka. Ekstrakt koncentracije 8% najviše je povećao duljinu izdanka, za 18,8%, a 4% ekstrakt povećao je duljinu izdanka za 14%, dok je 2% ekstrakt smanjio duljinu izdanka za 27,1%, što je prikazano na slici 7.



Slika 7 Utjecaj vodenih ekstrakata vrste *Aloe vera* na duljinu korijena (cm) i izdanka (cm) klijanaca zelene salate (*Lactuca sativa*); A, B – statistički značajna razlika A u odnosu na B ($p < 0,05$; Fisher (LSD) test)

Svježa i suha masa

Svježa i suha masa također nisu bili pod statistički značajnim utjecajem vodenih ekstrakata listova aloe vere. Na slici 8 vidljivo je kako su svježa i suha masa bile jednake. Najveće povećanje svježe i suhe mase klijanaca zelene salate zabilježeno je kod ekstrakta koncentracije 8%, a masa se povećala za 42,9%.

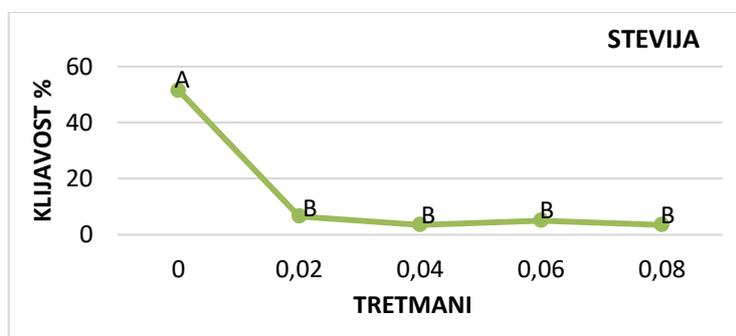


Slika 8 Utjecaj vodenih ekstrakata vrste *Aloe vera* na svježu (mg) i suhu masu (mg) klijanaca zelene salate (*Lactuca sativa*)

Alelopatski utjecaj vodenih ekstrakata vrste *Stevia rebaudiana* na zelenu salatu (*Lactuca sativa*)

Klijavost

Utjecaj vodenih ekstrakata stevije na klijavost sjemena zelene salate bio je statistički značajan. S povećanjem koncentracije smanjivala se i klijavost. Slika 9 pokazuje najmanje smanjenje klijavosti od 45% zabilježeno kod ekstrakta koncentracije 2%, dok su ekstrakti koncentracije 4% i 8% smanjili klijavost sjemena zelene salate za 48% u odnosu na kontrolu.

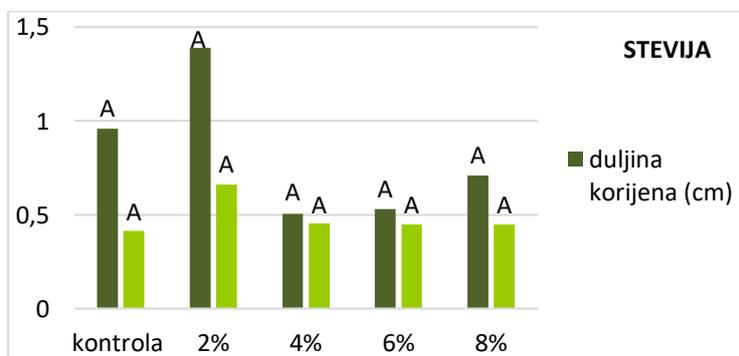


Slika 9 Utjecaj vodenih ekstrakata vrste *Stevia rebaudiana* na klijavost (%) sjemena zelene salate (*Lactuca sativa*); A, B – statistički značajna razlika A u odnosu na B ($p < 0,05$; Fisher (LSD) test)

Duljina korijena i izdanka

Vodeni ekstrakti listova stevije nisu imali statistički značajan utjecaj na duljinu korijena zelene salate. Jedino povećanje duljine korijena bilo je kod ekstrakta koncentracije 2% i duljina se povećala za 30,9%, dok su sve ostale koncentracije ekstrakata smanjile duljinu korijena od 26% do 47,4% kao što je prikazano na Slici 10.

Vodeni ekstrakti listova stevije također nisu imali statistički značajan utjecaj na duljinu izdanka zelene salate. Također vidljivo na Slici 10 je najveće povećanje duljine izdanka koje je bilo za 37% kod ekstrakta koncentracije 2%. Ekstrakt koncentracije 4% povećao je duljinu izdanka za 8,6%, dok su ekstrakti koncentracije 6% i 8% povećali duljinu izdanka zelene salate za 7,6%.



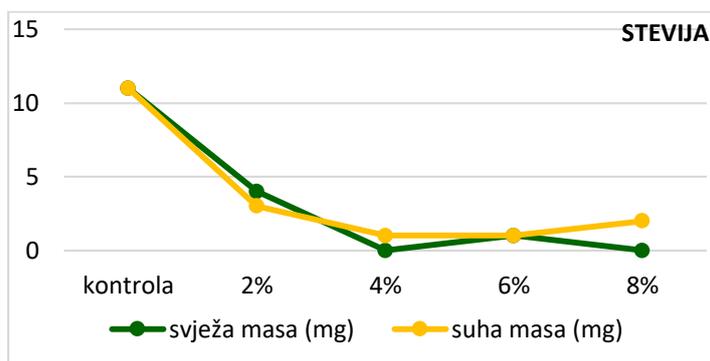
Slika 10 Utjecaj vodenih ekstrakata vrste *Stevia rebaudiana* na duljinu korijena (cm) i izdanka (cm) klijanaca zelene salate (*Lactuca sativa*)

A, B – statistički značajna razlika A u odnosu na B ($p < 0,05$; Fisher (LSD) test)

Svježa i suha masa

Na slici 11 prikazane su svježa i suha masa koje su se smanjivale povećanjem koncentracija ekstrakata osim suhe mase klijanaca tretiranih ekstraktom koncentracije 2% gdje je zabilježeno povećanje mase

u odnosu na manje koncentracije ekstrakta, međutim ekstrakti nisu imali statistički značajan utjecaj na masu klijanaca zelene salate.



Slika 11 Utjecaj vodenih ekstrakata vrste *Stevia rebaudiana* na svježu (mg) i suhu masu (mg) klijanaca zelene salate (*Lactuca sativa*)

RASPRAVA

Istraživanjem smo pokušale utvrditi prisutnost alelokemikalija kod biljaka aloe vere, sunovrata i stevije. Naime, alelokemikalije mogu služiti kao prirodni herbicidi i moguće je njihovo korištenje u poljoprivrednoj proizvodnji. Dobiveni rezultati istraživanja pokazali su da vodeni ekstrakti listova sunovrata (*Narcissus* spp.) imaju i pozitivan i negativan alelopatski utjecaj na klijanje, rast i masu zelene salate (*Lactuca sativa*). Budući da je zelena salata alelopatski bioindikator u biološkim istraživanjima, njome se potvrđuje prisutnost alelokemikalija. Klijavost sjemena zelene salate bila je inhibirana u svim tretmanima vodenim ekstraktima listova sunovrata (*Narcissus* spp.), a najviše kod ekstrakta najveće koncentracije 8% gdje nije bilo proklijalih sjemenki. Ekstrakt koncentracije 2% imao je pozitivan alelopatski utjecaj na duljinu korijena klijanaca zelene salate, dok su sve veće koncentracije imale negativan utjecaj na duljinu korijena. Slično, više koncentracije negativno su djelovale na duljinu izdanka klijanaca zelene salate dok je ekstrakt koncentracije 2% imao pozitivan alelopatski utjecaj. Svježa i suha masa bile su inhibirane u svim tretmanima, no odnos izmjerenih masa kod različitih koncentracija biljaka nije bio statistički značajan, dakle u našem istraživanju alelokemikalije sunovrata nisu značajno utjecale na svježu i suhu masu klijanaca salate. Ceriotti (1967) je dokazao da sunovrat sadrži alkaloid *narciclasine* u više vrsta sunovrata koji inhibira rast drugih biljaka. Rezultati našeg rada u skladu su s prethodno postavljenom hipotezom kako će vodeni ekstrakti sunovrata imati negativan alelopatski utjecaj na sjeme zelene salate. U ostalim istraživanjima sunovrat je također, u većini slučajeva, imao negativan alelopatski utjecaj. Lallemand (2010) je istraživala koje se biljke mogu uzgajati na tlu na kojemu je prethodno uzgajan sunovrat i zaključila kako sunovrat nema negativne učinke na jagodu i peršin, dok nije moguće uzgajati bosiljak nakon sunovrata budući da je rast bosiljka inhibiran. Negativan alelopatski utjecaj vrste *Narcissus* spp. može koristiti u uzgoju poljoprivrednih kultura kao i u uzgoju cvijeća gdje je jedan od glavnih problema suzbijanje korova, koji bi se, osim sintetičkim herbicidima koji se uglavnom koriste, ali ujedno uzrokuju niz problema, mogao suzbijati prirodnim herbicidima, odnosno alelokemikalijama iz raznih biljaka pa tako i sunovrata, zbog toga, na primjer, ostatak biomase nakon proljetnog cvjetanja lukovica sunovrata predstavlja zanimljiv potencijalni izvor alelokemikalija koje bi se mogle koristiti u svrhu suzbijanja korova. Prema Willisu (2007) biljke koje su „dobri susjedi“, odnosno, mogu se uzgajati sa sunovratom jesu menta, pepermint i đurđica.



Istraživanjem smo također dokazali da ekstrakti svježih listova vrste *Aloe vera* imaju i pozitivan i negativan alelopatski utjecaj na klijanje, rast i masu sjemena zelene salate, čime je dokazana prisutnost alelokemikalija. Sve koncentracije vodenih ekstrakata aloe vere imale su negativan utjecaj na klijavost sjemena zelene salate (*Lactuca sativa*). Negativan utjecaj nije uvijek nužno loš, kao što i u ovom slučaju kod aloe vere, taj negativni utjecaj možemo iskoristiti kako bi se smanjila klijavost i rast korovnih vrsta. Duljina korijena klijanaca zelene salate bila je pod pozitivnim alelopatskim utjecajem i duljina se povećavala usporedno s povećanjem koncentracija, uz izuzetak 6% ekstrakta gdje nije bilo prokljalih sjemenki. Najmanja koncentracija ekstrakta inhibirala je duljinu izdanaka klijanaca zelene salate, dok su vodeni ekstrakti koncentracija 4% i 8% imali pozitivan alelopatski utjecaj na duljinu izdanaka klijanaca. Svježa i suha masa nisu bile pod statistički značajnim utjecajem vodenog ekstrakta aloe vere, odnosno naše istraživanje pokazalo je da alelokemikalije aloe vere nisu imale utjecaja na svježiu i suhu masu klijanaca zelene salate. Rogić (2016) je istraživala alelopatske utjecaje vrste *Aloe vera* na zelenu salatu, rukolu i radič, a s obzirom da su doneseni zaključci o negativnim alelopatskim utjecajima aloe vere na klijavost zelene salate dobiveni rezultati podudaraju se s rezultatima našeg rada, osim rezultata za svježiu i suhu masu koja je bila pod statistički značajnim pozitivnim utjecajem aloe vere, dok to nije bio slučaj u našem istraživanju budući da su sve mase bile inhibirane te nije bilo statistički značajnih razlika. Pretpostavljamo da je razlog tomu mjerenje masa dan nakon završetka pokusa zbog toga što nismo bile u mogućnosti odmah izvagati uzorke na analitičkoj vagi. Pripremljeni ekstrakti svježih listova vrste *Aloe vera* pokazali su alelopatski utjecaj i u istraživanjima drugih autora. Negativan alelopatski utjecaj aloe vere na klijavost i rast maslačka i šćira navode Alipour i sur. (2012), utjecaj aloe vera ekstrakata na šefleru navode Hanafy i sur. (2012) Osim na korove, gore navedenih, ekstrakti aloe vere također pokazuju utjecaj na rast i razvoj fitopatogenih gljiva (Sitara i sur, 2011, Barišić, 2014). Postavljena hipoteza da će vrsta *Aloe vera* imati pozitivan alelopatski utjecaj na klijavost i početni rast zelene salate nije u potpunosti potvrđena, već samo za početni rast zelene salate kod većih koncentracija vodenih ekstrakata, dok je klijavost bila pod negativnim utjecajem ekstrakata. Iako aloe vera na većinu biljaka ima negativan alelopatski utjecaj, pokazalo se kako ekstrakti aloe vere pozitivno djeluju na duljinu korijena, te smanjuju period latencije razvoja korijena kod duhana, k tome dokazano je kako kemijski spojevi zaslužni za pozitivne utjecaje na korijen duhana su isti spojevi odgovorni za protuupalno djelovanje u bolesnika s dijabetesom (Lopez i sur, 2010).

Rezultati istraživanja pokazali su da su vodeni ekstrakti biljke stevija (*Stevia rebaudiana*) imali pozitivne i negativne učinke na klijanje, rast i masu sjemena zelene salate (*Lactuca sativa*). Tretmani ekstraktima imali su negativan utjecaj na klijavost sjemena zelene salate kod svih koncentracija. No, duljina korijena bila je pod pozitivnim alelopatskim utjecajem vodenih ekstrakata stevije, posebice kod manjih koncentracija. Slično, duljina izdanaka klijanaca zelene salate bila je pod pozitivnim alelopatskim utjecajima, također najveći utjecaj imale su manje koncentracije, a zatim se utjecaj smanjivao povećanjem koncentracija. Svježa i suha masa nisu bile pod značajnim utjecajem vodenih ekstrakata stevije. Druga istraživanja pokazala su da stevija također ima značajne pozitivne alelopatske utjecaje na zelenu salatu, krastavce i ostale poljoprivredne kulture (Nasir i sur, 2005, Cheema, 2012) te su rezultati u skladu s rezultatima našeg istraživanja. Hipoteza postavljena prije pokusa kako će vodeni ekstrakti vrste *Stevia rebaudiana* imati pozitivan alelopatski utjecaj na klijavost i početni rast zelene salate djelomično je potvrđena budući da je početni rast bio pod



pozitivnim utjecajem vodenih ekstrakata, ali klijavost zelene salate bila je inhibirana. Osim navedenih biljaka, Singh i sur. (2010) istraživali su utjecaj stevije na poljoprivredne kulture karakteristične za područje Himalaje i utvrdili su kako utjecaj ovisi o koncentraciji jer je veća koncentracija imala veći inhibitorski utjecaj na rast poljoprivrednih kultura.

S obzirom na ideju za ovo istraživanje o „dobrim i lošim susjedima“ u vrtu te dobivene rezultate možemo zaključiti kako bi „dobri susjedi“ sa zelenom salatom bili aloe vera i stevija što znači da bi biljke pozitivno utjecale na rast zelene salate ukoliko bi se zasadile u neposrednoj blizini, dok bi zelena salata i sunovrat bili „loši susjedi“ odnosno nije preporučljivo saditi zelenu salatu u blizini sunovrata jer bi klijavost i rast salate bili inhibirani.

Budući da su se u istraživanju javila ograničenja kako u provedbi samog istraživanja tako i u analizi podataka, za daljnja istraživanja u budućnosti mogla bi se, umjesto Petrijevih zdjelica, koristiti zemlja za sadnju i alelokemikalije valjalo bi promatrati na molekularnoj razini s ciljem da se pronađu potencijalni spojevi koji bi se koristili za sintetiziranje prirodnih herbicida, što bi pomoglo razvoju poljoprivrede.

ZAKLJUČCI

Zaključci istraživanja alelopatskih utjecaja vodenih ekstrakata vrsti *Narcissus* spp., *Aloe vera* i *Stevia rebaudiana* na klijavost i početni rast zelene salate (*Lactuca sativa*) su:

- ✔ Ekstrakti vrste *Narcissus* spp., *Aloe vera* i *Stevia rebaudiana* imaju negativan utjecaj na klijavost zelene salate (*Lactuca sativa*)
- ✔ *Narcissus* spp. inhibira duljinu korijena i izdanka zelene salate (*Lactuca sativa*)
- ✔ *Aloe vera* pozitivno utječe na duljinu korijena i izdanka zelene salate (*Lactuca sativa*)
- ✔ *Stevia rebaudiana* pozitivno utječe na duljinu korijena i izdanka zelene salate (*Lactuca sativa*)
- ✔ Sunovrat i zelena salata loši su susjedi u vrtu
- ✔ Aloe vera i stevija dobri su susjedi sa zelenom salatom.

LITERATURA

- Alipour M. 2012. Alleopathic potential of *Aloe vera*, Department of Biology, Collage of Sciences, Shiraz University, Shiraz 71454, Iran.
- Singh B., Bhatt S., Uniyal P., Pal V. i Chauhan D. S. 2010. *In vitro* bioassay to study phytotoxicity effects of *Stevia rebaudiana* on food crops. Journal of Tropical Forest Science, volumen: nepoznat: 364-369.
- Barišić M. 2014. Utjecaj *Aloe vera* ekstrakata na porast fitopatogenih gljiva. Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
- Cerioti G. 1967. Narciclasine: an antimetabolic substance from *Narcissus* bulbs. Nature 213: 595-596.
- Lopez D. G., Izquierdo A., Jo M., Lopez G. G., Hernandez B., Batlle D. M. 2010. Coresta, *Aloe vera* aqueous extracts: Potential explanation at molecular level of its allelopathic effect of over *Nicotiana tabacum* plants. <https://www.coresta.org/abstracts/aloe-vera-aqueous-extracts-potential-explanation-molecular-level-its-allelopathic-effect>, pristupljeno: 15.11.2016.
- Elijarrat E., Barcello, D. 2001. Sample handling and analysis of allelochemical compounds in plants. Trends Anal.Chem. 20: 584-590.
- Ferreira A. G., Aquila M. E. A., Jacobi U. S., Rizvi V. 1992. Allelopathy in Brazil, U Rizvi S. J. H., Rizvi V. (ur.), Allelopathy: basic and applied aspects. Chapman & Hall, London, str. 243-250.
- Nasir H. 2005. Plant growth promoting activity of *Stevia rebaudiana* Hemsl. Department of Biological Safety Science, National Institute for Agro-Environmental Sciences, Tokyo, Japan.
- Hanafy M. S., Saadawy F. M., Milla S. M. N., Ali R. M. 2012. Effect of some natural extracts on growth and chemical constituents of *Schefflera arboricola* plants. Journal of Horticultural Science and Ornamental Plants 4: 26-33.
- Šić Žlabur J. 2013. *Stevia rebaudiana* Bertoni - A review of nutritional and biochemical properties of natural sweetener. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski Fakultet.



- Sahu P. K. 2013. Therapeutic and medicinal uses of *Aloe vera*. Pharmacology & Pharmacy, India.
- Rice E. L. 1984. Allelopathy. Academic Press Inc., Orlando, Florida.
- Willis R. J. 2007. The history of allelopathy. Springer Science & Business Media.
- Rogić M. 2016. Procjena alelopatskog učinka vrste *Aloe Vera* (L.) burm. f. na salatu, rukolu i radič. Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
- Cheema S. A. 2015. Application of allelopathy in crop production. Allelopathy Laboratory, Department of Agronomy, University of Agriculture, Pakistan.
- Siddiqui S., Bhardwaj S., Khan S. S., Meghvanshi M. K. 2009. Allelopathic effect of different concentration of water extract of *Prosopis juliflora* leaf on seed germination and radicle length of wheat (*Triticum aestivum* Var-Lok-1). American-Euroasian Journal of Scientific Research 4: 81-84.
- Sitara U., Hassan N., Naseem J. 2011. Antifungal activity of *Aloe vera* gel against plant pathogenic fungi. Pakistan Journal of Botany 43: 2231-2233.
- Lallemand S. 2010. Applied allelopathy: effects of daffodils in the home landscape and in sustainable agriculture. Missouri State University.

PREOBRAZBA TVRDOKRILCA *Zophobas morio* U RAZLIČITIM UVJETIMA

Ivor Bulaja, 3. razred
Ante Cvitan, 3. razred

Prirodoslovna škola Vladimira Preloga, Zagreb
Mentor: Željko Krstanac

SAŽETAK

Zophobas morio ili fobas vrsta je tvrdokrilca iz porodice Tenebrionidae čije ličinke izgledom podsjećaju na brašnjare (*Tenebrio molitor*). Preobrazba (metamorfoza) im je potpuna, što znači da imaju tri stadija života – ličinka, pupa i odrasli kukac. Na preobrazbu ličinki vrste *Zophobas morio* utjecaj ima izolacija jedinki. Naime, kada se nalaze zajedno, ličinke ne prelaze u stadij pupe zbog hormona koje izlučuju. Ova vrsta često se koristi u teraristici kao hrana za gmazove radi jednostavnosti njihovoga uzgoja. Kako i sami posjedujemo kućne ljubimce gmazove, ciljevi našega istraživanja bili su detaljnije proučiti i opisati stadije preobrazbe vrste *Z. morio*, utvrditi najpovoljnije uvjete za njihov uzgoj i odrediti vrijeme potrebno za preobrazbu u različitim uvjetima. Na taj način željeli smo doći do saznanja kako olakšati uzgajanje što kvalitetnijih fobasa za hranjenje insektivornih ljubimaca. U istraživanju je promatrana brzina preobrazbe i ukupan broj preobraženih jedinki u različitim uvjetima. Pretpostavili smo da će više jedinki doseći stadij odraslog kukca i da će preobrazba biti brža u uvjetima kakve imaju i u svome prirodnom staništu s višom temperaturom i većom vlagom, nego u uvjetima niže temperature i manje vlage zraka. Također, smatrali smo da će izolacija jedinki biti ključan faktor koji potiče preobrazbu. Rezultati su potvrdili naše pretpostavke da izolacija potiče preobrazbu, bez obzira na uvjete u kojima se ličinke nalaze. Ustanovili smo i da povoljni uvjeti ubrzavaju proces preobrazbe. Jedinke koje nisu izolirane jedne od drugih pokazuju rast ličinke, ali kod njih jako rijetko dolazi do preobrazbe.

Ključne riječi: *metamorfoza, ličinka, pupa, kukci*

UVOD

Zophobas morio ili fobas vrsta je tvrdokrilca iz porodice Tenebrionidae. Ličinke ovoga kukca tijela dužine oko 4-5 cm izgledom podsjećaju na brašnjare (*Tenebrio molitor*). Prirodno su im stanište tropska područja Centralne i Južne Amerike unutar truloga drva ili lišća. Hrane se trulim drvom, lišćem, žitaricama te svježim ili trulim voćem i povrćem. U ličinačkom ih je stadiju nemoguće razlikovati prema spolu jer su istoga vanjskoga izgleda. Preobrazba (metamorfoza) im je potpuna, što znači da imaju tri stadija života – ličinka, pupa i odrasli kukac. Iz oplodjenih jaja razvijaju se svijetlo smeđe ličinke s crnim mrljama na prednjem dijelu tijela, dok su u odraslom stadiju potpuno crne boje. Odrasle jedinke narastu oko 2 cm dužine (Bruins, 2001).

U preobrazbu kukaca uključene su dvije vrste steroidnih hormona: juvenilni hormon i ekdison, koji se još naziva i hormon presvlačenja. Ova dva hormona imaju suprotno djelovanje. Prisutnost juvenilnoga hormona sprječava prelazak iz ličinke u pupu. Ličinke se tada presvlače u novu, veću ličinku. U nedostatku juvenilnoga hormona, započet će proces preobrazbe te će se pod utjecajem hormona ekdisona ličinka zakukuljiti (Dubrovsky, 2005).

Od vanjskih čimbenika, na preobrazbu kukaca utjecaj imaju temperatura, vlaga, dužina dana i količina hrane i vode. Na preobrazbu ličinki vrste *Z. morio* utjecaj ima i izolacija jedinki. Naime, kada se nalaze zajedno, ličinke ne prelaze u stadij pupe zbog hormona koje izlučuju (Buszczak i Segraves, 2000).

Vrsta *Z. morio* često se koristi u teraristici kao hrana za insektivorne kućne ljubimce. Svoje kućne ljubimce, bradatu agamu (*Pogona vitticeps*), leopard gekona (*Eublepharis macularius*), varana



(*Varanus timorensis*) i jemenskog kameleona (*Chameleo calypttratus*) također hranimo fobasima pa smo kao temu istraživanja odabrali uzgoj tih kukaca u različitim uvjetima. Ciljevi su istraživanja detaljnije proučiti i opisati stadije preobrazbe vrste *Z. morio*, utvrditi najpovoljnije uvjete za njihov uzgoj i odrediti vrijeme potrebno za preobrazbu u različitim uvjetima te time olakšati uzgajanje što kvalitetnijih fobasa za hranjenje insektivornih ljubimaca. Promatrat će se brzina preobrazbe i ukupan broj preobraženih jedinki u različitim uvjetima. Pretpostavljamo da će izolacija potaknuti preobrazbu i da će stoga u skupinama gdje su ličinke međusobno izolirane biti više jedinki koje će dosegnuti stadij pupe i odraslog kukca, nego u skupinama gdje su ličinke zajedno u terariju. Također pretpostavljamo da će preobrazba biti brža u uvjetima kakve ovi organizmi imaju u svom prirodnom staništu s višom temperaturom i većom vlagom, nego u uvjetima niže temperature i manje vlage zraka.

METODE RADA

Za potrebe istraživanja korišteno je 80 ličinki vrste *Zophobas morio* koje su podijeljene u četiri skupine po 20 jedinki. Točno podrijetlo ličinki nije nam poznato, a nabavljene su u trgovini Egzotika shop u Zagrebu. Sve ličinke bile su iste starosti i jednake dužine (oko 5 cm). Skupine ličinki nalazile su se u plastičnim kutijama dimenzija 30x30x15 cm. Podloga u kutijama bila je mješavina piljevine i zobi u omjeru 3:1. Temperatura je održavana električnom grijaćom podlogom za terarije snage 15W i mjerena digitalnim termometrom. Vlažnost zraka održavana je prskanjem vode.

Prve dvije skupine ličinaka izložene su povoljnim uvjetima temperature, vlage i količine hrane za preobrazbu. Hranjene su jednom tjedno visokoproteinskom hranom za mačke i mrkvom. Vлага u terariju održavana je prskanjem vode tri puta tjedno, a temperatura je iznosila oko 30°C. Razlika između prve i druge skupine bila je u tome što su ličinke prve skupine bile zajedno, dok su ličinke druge skupine bile izolirane tako da se svaka unutar terarija nalazila u zasebnoj plastičnoj čaši.

Druge dvije skupine ličinaka izložene su nepovoljnim uvjetima za preobrazbu. Ličinke tih dviju skupina kao hranu su mogle koristiti samo zob iz podloge jer im nije dodavana hrana za mačke i mrkva. Prskane su vodom jednom tjedno, a temperatura je održavana na oko 20°C. Ličinke treće skupine nisu bile izolirane jedne od drugih, a ličinke četvrte skupine su se unutar terarija nalazile svaka u zasebnoj plastičnoj čaši.

Tijekom istraživanja koje je trajalo 60 dana, jednom dnevno je provjeravano ima li jedinki koje su započele s preobrazbom. Bilježeno je vrijeme potrebno jedinkama unutar svake skupine da uđu u stadij pupe i vrijeme potrebno da se iz pupe razvije odrasli kukac. Svaki put kada bi neka jedinka prešla u stadij pupe, označena je odgovarajućim rednim brojem kako bi se mogao pratiti njezin daljnji razvoj. Također, ta nam je informacija bila važna da bismo znali točan broj dana potreban za metamorfozu pojedine jedinke. Kada bi neka ličinka iz skupina koje nisu bile izolirane dosegla stadij pupe, označena je odgovarajućim rednim brojem i premještena u zasebnu čašu unutar svoga terarija.

Statistička obrada podataka uključivala je određivanje broja preobraženih jedinki te izračun srednje vrijednosti i standardne devijacije dana potrebnih za preobrazbu do stadija pupe, odnosno odraslog kukca. Rezultati su uspoređeni među skupinama i prikazani grafički i u tablicama. Statistička značajnost rezultata provjerena je Gehan-Breslow-Wilcoxon testom u programu GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, SAD). Ovim testom može se odrediti statistička značajnost



rezultata kada nisu sve jedinke iz skupine dosegle određenu promjenu (u našem slučaju nisu započele s preobrazbom) pa im se stoga ne može pridružiti neka brojčana vrijednost (u našem slučaju broj dana potrebnih za preobrazbu). Razlike između skupina smatrane su statistički značajne za $p < 0.05$.

REZULTATI

Zbog jednostavnijeg prikaza rezultata, skupine ličinki koje su držane u različitim uvjetima označene su sljedećim oznakama:

- A1– izolirane ličinke u povoljnim uvjetima (srednja vrijednost temperature 29.2°C)
- A2 – neizolirane ličinke u povoljnim uvjetima (srednja vrijednost temperature 28.7°C)
- B1 – izolirane ličinke u nepovoljnim uvjetima (srednja vrijednost temperature 20.4°C)
- B2 – neizolirane ličinke u nepovoljnim uvjetima (srednja vrijednost temperature 20.7°C).

U svakoj skupini na početku istraživanja bilo je 20 ličinki vrste *Zophobas morio*. U tablici 1 prikazano je vrijeme koje je bilo potrebno svakoj ličinki iz svake skupine da pređe u stadij pupe, odnosno odraslog kukca.

Tablica 1 Dani potrebni za preobrazbu u pupu odnosno odraslu jedinku. Jedinke koje su se i nakon završetka istraživanja nalazile u stadiju ličinke označene su slovom X.

VRIJEME POTREBNO ZA PREOBRAZBU (DANI)								
BROJ JEDINKE	PUPE				ODRASLE JEDINKE			
	A1	B1	A2	B2	A1	B1	A2	B2
1	5	32	27	57	27	52	42	X
2	8	32	39	X	32	54	56	X
3	18	35	X	X	35	55	X	X
4	20	36	X	X	36	57	X	X
5	22	40	X	X	39	57	X	X
6	22	46	X	X	39	X	X	X
7	25	48	X	X	40	X	X	X
8	27	50	X	X	42	X	X	X
9	34	X	X	X	49	X	X	X
10	35	X	X	X	X	X	X	X
11	55	X	X	X	X	X	X	X
12	60	X	X	X	X	X	X	X
13	X	X	X	X	X	X	X	X
14	X	X	X	X	X	X	X	X
15	X	X	X	X	X	X	X	X
16	X	X	X	X	X	X	X	X
17	X	X	X	X	X	X	X	X
18	X	X	X	X	X	X	X	X
19	X	X	X	X	X	X	X	X
20	X	X	X	X	X	X	X	X

Preobrazba izoliranih ličinki u povoljnim uvjetima (A1)

Tijekom istraživanja u skupini jedinki koje su bile izolirane i izložene povoljnim uvjetima, od 12 ličinki koje su prešle u stadij pupe, 9 je završilo svoju preobrazbu u odraslu jedinku (slika 4). Preostalih 8 ličinki za cijelo vrijeme istraživanja je ostalo u ličinačkom stadiju. Prva ličinka preobrazila se u pupu peti dan istraživanja, a zadnja 60 (tablica 1). Srednja vrijednost dana potrebnih za preobrazbu u pupu za ličinke koje su dosegle taj stadij iznosila je 27,58 dana (SD=16.54 dana) (slika 7).

Trećeg dana istraživanja zabilježena je prva *c-poza* – položaj koji ličinka zauzme neposredno prije preobrazbe u pupu (slika 1). Nakon 25 dana, kod prve pupe počele su se formirati oči i noge te je poprimila lagano smeđe obojenje (slika 2). Isti proces zamijećen je i kod ostalih pupa u svim skupinama neposredno prije metamorfoze u odraslu jedinku.

Slika 1 Ličinka u *c-pozici*

Slika 2 Usporedba mlade i stare pupe

Prva odrasla jedinka u ovoj skupini pojavila se 27. dan istraživanja, a zadnja 49. dan (tablica 1). Srednja vrijednost dana potrebnih za preobrazbu u odraslu jedinku onih ličinki koje su dosegle taj stadij iznosila je 37.67 dana (SD=6.24 dana) (slika 7).

Odrasle jedinke neposredno nakon metamorfoze imale su svijetli egzoskelet koji im se u narednih nekoliko dana potpuno stvrdnuo te pocrnio (slika 3). To je promjena kroz koju su prolazile sve jedinke iz svih skupina koje su dovršile svoju preobrazbu u odraslog kukca.



Slika 3 Promjene u izgledu odraslog kukca starog nekoliko sati, dva dana i tjedan dana

Preobrazba izoliranih ličinki u nepovoljnim uvjetima (B1)

U ovoj skupini razvilo se 8 pupa od kojih se 5 preobrazilo u odraslu jedinku (slika 4). Prva pupa preobrazila se 32. dan istraživanja, a zadnja 50. dan (tablica 1). Srednja vrijednost dana potrebnih za preobrazbu u pupu ličinki koje su ostvarile stadij pupe iznosila je 39.88 dana (SD=7.26 dana) (slika 7).

Nakon 22 dana istraživanja zabilježene su prve *c-poze*. Oko 46. dana pupe, koje su se prve pojavile krenule su formirati oči i noge te su dobivale lagano smeđe obojenje.

Prva odrasla jedinka pojavila se 52. dan istraživanja, a zadnja 57. dan (tablica 1). Srednja vrijednost dana potrebnih za preobrazbu u odraslu jedinku ličinki koje su ostvarile stadij odrasle jedinice iznosila je 55 dana (SD=2.12 dana) (slika 7).

Preobrazba neizoliranih ličinki u povoljnim uvjetima (A2)

U skupini ličinki koje su se nalazile u povoljnim uvjetima i nisu bile međusobno izolirane pojavile su se samo dvije pupe koje su se obje preobrazile u odraslu jedinku (slika 4). Prva pupa preobrazila se 27. dan istraživanja, a druga 39. dan (tablica 1) pa je srednja vrijednost dana potrebnih za preobrazbu u pupu iznosila 33 dana ($SD=8.49$ dana) (slika 7). Ostalih 18 ličinki nije ostvarilo stadij pupe tijekom istraživanja od 60 dana.

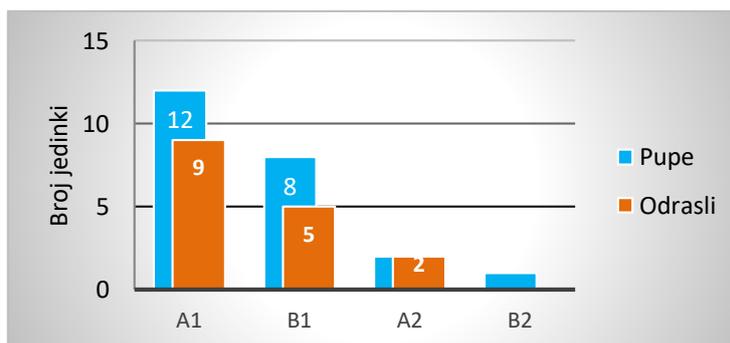
Prva pupa preobrazila se u odraslu jedinku 42. dan istraživanja, a druga 56. dan (tablica 1) te je srednja vrijednost preobrazbe u odraslu jedinku za ovu skupinu iznosila 49 dana ($SD=9.9$ dana) (slika 7).

Za razliku od pupa koje su se razvile iz ličinaka izoliranih u zasebnim čašama, ličinke su se ove skupine nakon formiranja u pupu uvijek nalazile na vrhu piljevinskog supstrata. Kao i ličinke ostalih skupina, prvo su zauzele *c-pozu*, a neposredno prije metamorfoze u odraslu jedinku formirale su im se oči i noge te su dobivale lagano smeđe obojenje.

U ovoj skupini pronađen je velik broj odbačenih svlakova. Na kraju istraživanja, ličinke su bile vidljivo krupnije i duže od ličinki unutar izoliranih skupina.

Preobrazba neizoliranih ličinki u nepovoljnim uvjetima (B2)

U ovoj skupini samo jedna ličinka se preobrazila u pupu koja, međutim, nije prešla u stadij odrasloga kukca (slika 4). Pupa se pojavila 57. dan istraživanja (tablica 1). Kao i u skupini neizoliranih ličinki koje su se nalazile u povoljnim uvjetima, i u ovoj skupini pronađeno je dosta svlakova, a ličinke su bile vidljivo veće od nepreobraženih ličinki koje su se nalazile u izolaciji.

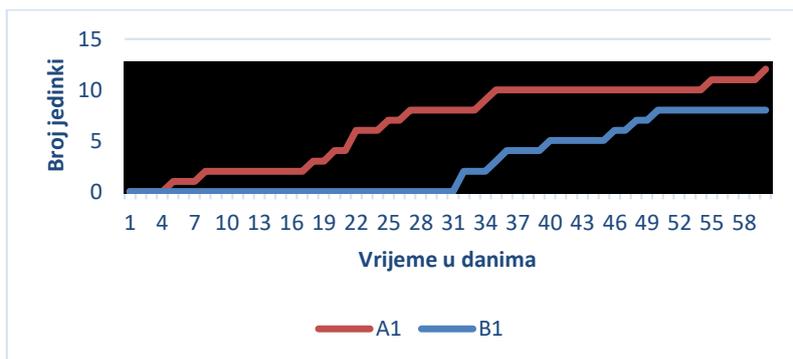


Slika 4 Ukupan broj pupa/odraslih jedinki, u različitim skupinama, preobraženih tokom istraživanja

Usporedba brzine preobrazbe unutar skupina čije su jedinke bile u izolaciji (A1 i B1)

Uspoređeno je vrijeme potrebno za preobrazbu između skupina A1 i B1 te je zamijećeno da je skupini A1 bilo potrebno prosječno manje vremena za preobrazbu nego skupini B1 (slika 7).

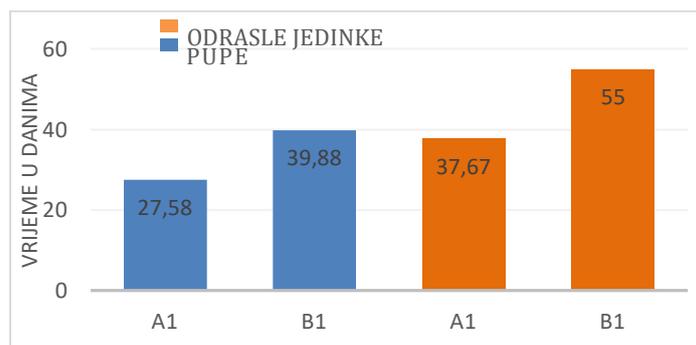
Prva pupa u skupini A1 pojavila se peti dan istraživanja, a u skupini B1 27 dana kasnije (slika 5). Srednja vrijednost dana potrebnih za preobrazbu u pupu za skupinu A1 iznosi 27.58, a za skupinu B1 39.88 (slika 7). Prva odrasla jedinka u skupini A1 pojavila se 27. dan istraživanja, a u skupini B1 25 dana kasnije, što je vidljivo na slici 6. Prosječno vrijeme potrebno za preobrazbu u odraslu jedinku izraženo u danima za skupinu A1 iznosilo je 37.67, a za skupinu B1 55 dana (slika 7).



Slika 5 Brzina preobrazbe u pupu za skupine A1 i B1



Slika 6 Brzina preobrazbe u odraslu jedinku za skupine A1 i B1



Slika 7 Srednja vrijednost dana potrebnih za preobrazbu jedinki skupina A1 i B1

Statistička značajnost rezultata provjerena je Gehan-Breslow-Wilcoxon testom te je utvrđeno sljedeće:

- razlika u brzini preobrazbe u pupu između izoliranih skupina statistički je značajna ($p=0.0485$)
- razlika u brzini preobrazbe u odraslu jedinku između izoliranih skupina statistički je značajna ($p=0.0445$).

RASPRAVA

Zophobas morio vrsta je tvrdokrilca čije se ličinke od pedesetih godina prošloga stoljeća uzgajaju u komercijalne svrhe. U početku su se ličinke uzgajale za potrebe ribolovaca koji su ih koristili kao mamce, no s vremenom je rasla potražnja jer su se počeli koristiti kao hrana za kućne ljubimce i gmazove u zoološkim vrtovima. Kina je danas jedan od najznačajnijih uzgajivača ovih ličinki, gdje ih se



godišnje uzgoji nekoliko tisuća tona (Ortiz i sur, 2016). U ovom istraživanju promatrana je njihova preobrazba u različitim uvjetima kako bi se produbile spoznaje o tome procesu u svrhe što uspješnijeg uzgoja za potrebe prehrane kućnih ljubimaca gmazova. Promotri smo i opisali različite stadije u životu *Z. morio*. Kao što su opisali Quennedey i sur. (1994), i u ovom istraživanju primijećeno je da jedinke prije nego započnu proces preobrazbe zauzimaju položaj u obliku slova C (slika 1). Nakon toga, ličinka prelazi u stadij pupe u kojem provede nekoliko dana te naposljetku nastaju odrasle jedinke. Neposredno prije preobrazbe u odraslu jedinku, pupe dobiju lagano smeđe obojenje (slika 2). Za odrasle jedinke primijetili smo da su neposredno nakon metamorfoze u svim skupinama imale bijelo do svijetlosmeđe obojenje te da im je potrebno nekoliko dana da im se egzoskelet potpuno stvrdne i postane crne boje (slika 3).

Na preobrazbu kukaca utječu temperatura, vlaga i količina hrane. Osim tih čimbenika, na preobrazbu vrste *Z. morio* ključan utjecaj ima i međusobna izolacija ličinki. Odvajanjem svake jedinke u zasebnu čašu, primijetili smo da izolacija pogodno utječe na preobrazbu, bez obzira jesu li jedinke izložene povoljnim ili nepovoljnim uvjetima temperature, vlage i količine hrane. U skupinama A1 i B1 (izolirane), zabilježili smo devet, odnosno pet odraslih jedinki, dok se u neizoliranoj skupini A2 u odraslu jedinku preobrazila samo jedna, a u skupini B2 (neizolirane; nepovoljni uvjeti) niti jedna odrasla jedinka od ukupno 20 ličinki svake skupine (slika 4). Ovakvi rezultati potvrđuju našu pretpostavku da je izolacija ključni faktor koji potiče preobrazbu ove vrste. Utjecaj izolacije na preobrazbu jedinki uočen u ovom istraživanju u skladu je s rezultatima ostalih istraživanja koja su nam bila dostupna (Quennedey i sur, 1994, Tschinkel i Willson, 1971). Tschinkel i Willson (1971) utjecaj izolacije za početak preobrazbe objašnjavaju djelovanjem hormona koji sprječavaju preobrazbu, a izlučuju ih jedinke potaknute dodiranjem drugih jedinki. Kao mogući faktor koji je utjecao na razvoj ove pojave, navedeni autori smatraju kanibalizam koji ličinke iskazuju prema pupama.

Osim izolacije, nezavisne varijable kojima smo izložili jedinke bile su temperatura, vlaga i hrana. U skupinama A1 i B1 (izolirane) zamijećena je statistički značajna razlika u brzini preobrazbe. Prosječan broj dana za preobrazbu u pupu za skupinu A1 iznosio je 27.58 (SD=16.54) dana, a za skupinu B1 39.88 (SD=7.26) dana (slika 7). Vidljivo je da je skupini A1 u prosjeku bilo potrebno 12.3 dana više nego skupini B1. Pretpostavljamo da je na taj rezultat utjecaj imala razlika u temperaturi od 10°C, veća vlažnost te proteinska hrana koja je bila dostupna skupini A1. Ovi su rezultati potvrdili našu pretpostavku da će ličinke brže prolaziti kroz proces preobrazbe ukoliko se nalaze u povoljnim uvjetima temperature, vlage i hrane koji odgovaraju i uvjetima u njihovom prirodnom staništu. Iako je srednja vrijednost vremena potrebnog za preobrazbu potvrdila našu pretpostavku, iznenadilo nas je to što velik broj ličinki u ovim skupinama nije započeo preobrazbu. U skupini A1 ostalo je 8 jedinki koje nisu započele preobrazbu, a u skupini B1 na kraju istraživanja bilo je 12 takvih jedinki. Međutim, bez obzira na velik broj nepreobraženih jedinki, vidljiva je razlika i trend u brzini preobrazbe između ovih dviju skupina (slike 5 i 6). Pretpostavljamo da bi, kada bismo imali više vremena za istraživanje, i ostale jedinke unutar tih skupina pratile primijećen trend u brzini preobrazbe. Statistička značajnost brzine preobrazbe između ovih dviju skupina stoga je provjerena Gehan-Breslow-Wilcoxon testom koji je pogodan za rezultate istraživanja kada nisu sve jedinke iz skupine dosegle određenu promjenu (u našem slučaju nisu započele s preobrazbom) te u biti uspoređuje trend koji je zamijećen kod jedinki koje jesu ostvarile tu promjenu. Jedno od opažanja koje nismo očekivali bila je i velika razlika u



brzini preobrazbe jedinki unutar skupine A1. Naime, raspon vremena potrebnog prvog i zadnjoj ličinki koja je u toj skupini prešla u stadij pupe, kretao se od 5 do 60 dana (tablica 1). Zbog toga je u toj skupini velika i standardna devijacija (odstupanje od srednje vrijednosti) koja je iznosila više od 16 dana. Razlika u brzini preobrazbi jedinki u neizoliranim skupinama A2 i B2 također je bila u korist povoljnih uvjeta. Međutim, u ovim skupinama bio je premali broj jedinki koje su dosegnule stadij pupe ili odraslog kukca da bi se mogla provesti statistička analiza. Mali broj preobraženih jedinki u tim skupinama bio je očekivan zbog nedostatka izolacije, kao što je već objašnjeno. Kod brzine preobrazbe u odraslu jedinku između skupina A1 i B1 također je zabilježena statistički značajna razlika. U skupini A1 prosječan broj dana za preobrazbu iznosio je 37.67 (SD=6.24) dana, a u skupini B1 55 (SD=2.12) dana. Vidljiva je prosječna razlika od 17.33 dana (slika 7). Kod skupina A2 i B2 nije bilo moguće usporediti razlike u brzini metamorfoze do odrasle jedinke s obzirom na to da skupina B2 nije ostvarila ni jednu odraslu jedinku tijekom istraživanja.

Osim razlika u brzini preobrazbe, primijećeno je da su ličinke u skupinama A2 i B2 bile vidljivo krupnije u usporedbi s ličinkama koje se nisu preobrazile, a bile su iz skupina A1 i B1. Pretpostavljamo da su jedinke radi zajedničkoga života i izloženosti hormonima bile onemogućene da započnu proces preobrazbe te su se radi toga presvlačile u svrhu rasta. To potvrđuje i velik broj pronađenih svlakova u tim skupinama. Iako promjene u veličini jedinki nisu bile jedan od parametara koje smo namjeravali promatrati u istraživanju, ovo zapažanje može biti korisno za privatni uzgoj što većih fobasa kao hrane za naše insektivorne kućne ljubimce.

U narednim istraživanjima htjeli bismo usporediti preobrazbu fobasa i brašnara (*Tenebrio molitor*) u različitim uvjetima jer se brašnari također često uzgajaju kao hrana za gmazove.

ZAKLJUČCI

Istražujući preobrazbu tvrdokrilca *Z. morio*, zaključili smo sljedeće:

- ✔ izolacija jedinki ključan je faktor koji potiče preobrazbu ličinki ove vrste bez obzira nalaze li se one u povoljnim ili nepovoljnim uvjetima;
- ✔ izolirane ličinke brže će se preobraziti ako su izložene povoljnim uvjetima temperature (oko 30°C), vode i količine hrane;
- ✔ grupiranje ličinki u zajednički terarij sprječava preobrazbu, ali potiče presvlačenje i rast ličinki;
- ✔ povoljni uvjeti temperature (oko 30°C), vlage i količine hrane ubrzavaju rast neizoliranih ličinki.

Navedeni zaključci mogu se iskoristiti za što uspješniji uzgoj ličinaka *Z. morio* kao hrane za insektivorne kućne ljubimce.

LITERATURA

- Bruins E., 2001. The Complete Encyclopedia of Terrarium, Feeding. Challacombe S. (ur.), Grange Books, Rochester.
- Dubrovsky E., 2005. Juvenile hormone molecular actions and interactions during development of *Drosophila melanogaster*. Trends in Endocrinology & Metabolism.
- Buszczak M., Segreaves W., 2000. Insect metamorphosis: „Out with the Old, in with the New". Current Biology 103: 830-833.
- Ortiz J. A., Ruiz A. T., Morales-Ramos J. A., Thomas M., Rojas M. G., Tomberlin J.K., Yi L., Han R., Giroud L., Jullien R. L., 2016. Insects as sustainable food ingredients, Elsevier Inc.
- Quenedey A., Aribi N., Everaerts C., Delbecque J. P., 1995. Postembryonic development of *Zophobas atratus* Fab. (Coleoptera: Tenebrionidae) under crowded or isolated conditions and effects of juvenile hormone analogue applications. J. Insect Physiol 41: 143-152.
- Tschinkel W. R., Willson C. W., 1971. Inhibition of pupation due to crowding in some Tenebrionid beetles. Journal of Experimental Zoology 176: 137-45.

NEKODIRAJUĆE RNA: MOLEKULE U POZADINI STANIČNOG RAZVOJA

Borna Branimir Vuković, 3. razred

V. gimnazija, Zagreb

Mentor: Petra Međeral Ozimec

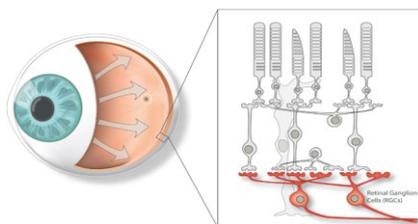
SAŽETAK

U ovom su istraživanju uspoređivane ekspresije nekodirajućih RNA u dva stadija razvoja ganglijskih stanica mrežnice – embrionalnom i odraslom. Cilj je istraživanja odrediti diferencijalnu ekspresiju nekodirajućih RNA između dvaju stadija koristeći podatke iz već provedenog eksperimenta. Kako bi se istraživanje provelo, potrebno je preuzeti podatke sekvenciranja RNA (po tri ponavljanja za dva stadija) i popis nekodirajućih RNA. Zatim je potrebno pridružiti sekvencirane fragmente RNA na odgovarajuće mjesto na genomu čovjeka, to jest, mapirati fragmente na genom, zbrojiti mapirane fragmente unutar pojedinog lokusa i provesti postupak normalizacije zbrojenih vrijednosti na ukupni broj fragmenata za svako pojedino ponavljanje. Uspoređujući podatke dobivene normalizacijom dobiva se diferencijalna ekspresija gena između dva stadija stanica. Uz korištenje tablice genomskih položaja nekodirajućih RNA dobivena je njihova diferencijalna ekspresija, što je u fokusu ovog istraživanja. Obrada i grafički prikaz podataka izvedeni su u programskom paketu R. Grafički prikaz diferencijalne ekspresije dobiven je putem toplinske mape, u kojoj je na temelju različite svjetline neke boje prikazana razlika između istraživanih uzoraka s obzirom na razinu ekspresije nekodirajućih RNA. Toplinska mapa dobivena u ovom istraživanju prikazala je jasnu razliku u ekspresiji istih nekodirajućih RNA između dvaju stadija i sličnost u ekspresiji među ponavljanjima unutar jednog razvojnog stadija. Dvodimenzionalnim prikazom razlika u ekspresiji (PCA plot) dobiven je podatak da jedno ponavljanje unutar svakog stadija više odstupa od druga dva. Od 16 nekodirajućih RNA za koje je obrada pokazala statistički značajnu diferencijalnu ekspresiju, za njih 13 ne postoje podaci o ekspresiji u mrežnici. Ovim istraživanjem pronađeno je 13 nekodirajućih RNA koje pokazuju razliku u ekspresiji tijekom razvoja ganglijskih stanica mrežnice, a do sada u bazama podataka nije opisana njihova ekspresija u mrežnici.

Ključne riječi: diferencijalna ekspresija, embrionalni i odrasli stadij, toplinska mapa

UVOD

Ovo istraživanje bavi se neurorazvojem na molekularnoj razini, a kao model koristit će se diferencijacija embrionalnih matičnih stanica čovjeka H9. Jedan od razvojnih putova stanica H9 je i diferencijacija u ganglijske stanice mrežnice. Te su stanice važne jer njihovi aksoni tvore vidni živac te bez njih mozak ne bi mogao procesuirati svjetlosne podražaje koji dolaze do oka (Mader, 2006). Sloj ganglijskih stanica predstavlja zadnji od tri sloja stanica koji tvore mrežnicu (slika 1).

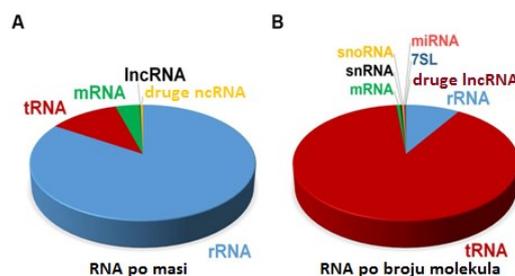


Slika 1 Pozicija ganglijskih stanica mrežnice (označene crveno) u oku čovjeka (izvor: http://www.nature.com/qt/journal/v19/n2/fig_tab/qt2011142f1.html)

Ideju za istraživanje dobio sam proučavajući rad Gill i sur. (2016), koji su proveli proces razvoja embrionalnih matičnih stanica u ganglijske stanice u laboratorijskim uvjetima (*in vitro*). Pri tome su pratili ekspresiju gena u početnom i krajnjem stadiju diferencijacije, koristeći metode sekvenciranja RNA nove generacije (eng. next generation RNA sequencing). To znači da su izvukli fragmente RNA (manje dijelove na koje je cjelovita molekula bila razlomljena) iz tih stanica i pročitali njihov sadržaj u

obliku dušičnih baza (Gerstein i sur, 2009). Cilj rada Gill i sur. (2016) bio je pronalaženje postupka za učinkovito sazrijevanje ganglijskih stanica mrežnice, a pokus sekvenciranja proveli su kako bi usporedili prirodno diferencirane stanice mrežnice s onima uzgojenima njihovom metodom. Međutim, podaci koji su prikupljeni tijekom njihovog istraživanja mogu biti dodatno iskorišteni kako bismo saznali mnoge nove informacije o procesu stanične diferencijacije, u ovom slučaju tijekom razvoja živčanih stanica. Prilikom diferencijacije u stanicama se mijenja aktivnost specifičnih gena, koji na molekularnoj razini upravljaju putem razvoja iz matične u diferenciranu stanicu. Ekspresiju gena odnosno njihovu aktivnost možemo pratiti mjerenjem količine RNA koja se prepisuje u tim stanicama tijekom diferencijacije.

U cijelom procesu posebice je zanimljiva uloga nekodirajućih RNA molekula, za koje se u posljednje vrijeme pretpostavlja da imaju velik značaj zbog velike zastupljenosti u stanicama, kao što je prikazano na slici 2 (Lee i Pallazo, 2015). Upravo je uloga nekodirajućih RNA u procesu diferencijacije glavni fokus ovog rada.



Slika 2 Zastupljenost različitih vrsta molekula RNA u tjelesnim stanicama sisavaca po masi (lijevi graf) i broju molekula (desni graf). Zeleno je označena jedina kodirajuća vrsta RNA – mRNA, ostalo su nekodirajuće RNA (izvor: Lee & Pallazo, 2015)

Nekodirajuće RNA su vrsta molekula RNA koje se ne transliraju. Genetička informacija koja je u njima zapisana stoga se neće prevesti u niz aminokiselina koji će činiti bjelančevinu. Nekodirajuće RNA uglavnom imaju ulogu u genskoj regulaciji i služe kao molekule koje mijenjaju gensku ekspresiju kodirajućih RNA (Rinn i Chang, 2012).

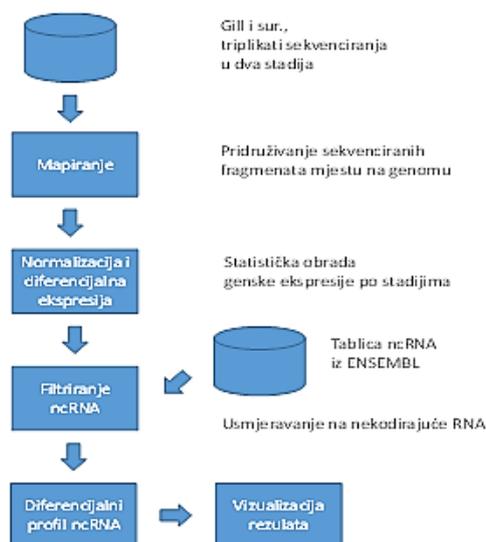
Cilj usporedbe bio je vidjeti koliko su nekodirajuće molekule RNA eksprimirane u dvama stadijima razvoja stanica mrežnice (embrionalnom i odraslom). Iz razlika u njihovoj ekspresiji bit će direktno vidljivo koje molekule imaju značajniju ulogu u kojem stadiju, a koje možda nemaju nikakvu ulogu ili imaju ulogu u samo jednom od stadija. Podaci iz gore navedenog istraživanja uzeti su zbog toga što je sekvenciranje obavljeno u dovoljno velikom broju ponavljanja za svaki od stadija, što jamči veću pouzdanost rezultata. Također, podaci prikupljeni u radu Gilla i sur. (2016) koriste najviše raširenu platformu za sekvenciranje – Illumina, koja nam omogućuje da koristimo standardizirane metode obrade i analize podataka (Reuter i sur, 2015).

Moja je hipoteza da će ekspresija nekodirajućih RNA biti vidljiva u embrionalnom kao i odraslom stadiju razvoja stanica, ali da ekspresija istih molekula neće biti u jednakoj mjeri izražena u oba stadija. Različita ekspresija nekodirajućih molekula RNA, ako je bude, najvjerojatnije će biti rezultat razlika među dvama razvojnim stadijima tih stanica. Također pretpostavljam da neke nekodirajuće molekule RNA neće uopće biti eksprimirane ni u jednom stadiju. Razlog tomu je što popis

nekodirajućih RNA sadrži sve takve molekule vezane za sve procese u svim vrstama stanica u kojima one sudjeluju. Pošto se u ovom radu istražuje jedan specifičan proces vezan uz stanice mrežnice ljudskog oka, može se pretpostaviti da neće sve nekodirajuće RNA sudjelovati u tom procesu.

METODE RADA

U ovom su radu je iz preuzetih podataka istraživanja Gill i sur. (2016) (po tri ponavljanja sekvenciranja za dva stadija stanica – embrionalni matični i diferencirani gangliji mrežnice) uspoređena ekspresija gena s posebnim fokusom na nekodirajuće RNA.



Slika 3 Prikaz tijeka istraživanja (ncRNA-eng. noncoding RNA, nekodirajuće RNA, ENSEMBL-baza podataka)

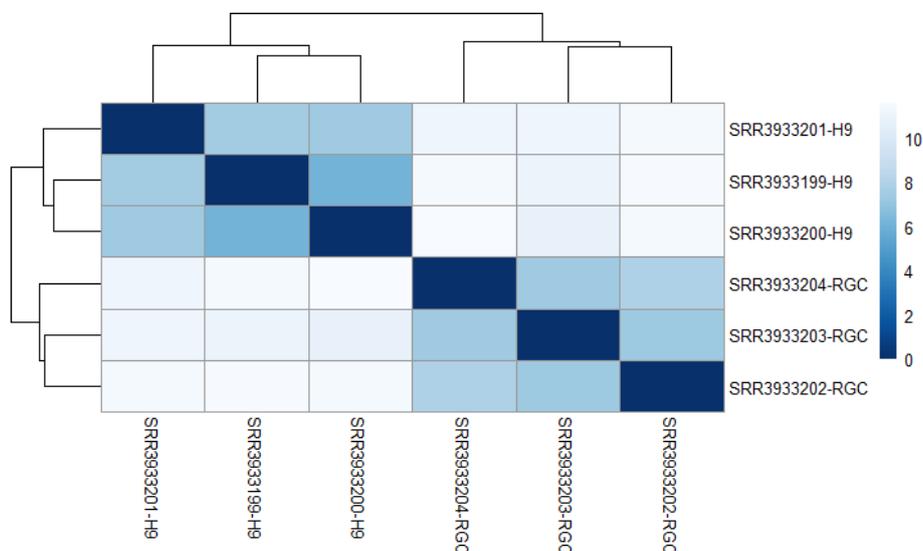
Postupak istraživanja sastoji se od nekoliko koraka (slika 3). Prvo su preuzeti svi podaci iz rada Gill i sur. (2016), koji su pohranjeni u okviru NCBI-ja (National Centre for Biotechnology Information) u bazi podataka GEO (Gene Expression Omnibus) pod pristupnim brojem GSE84639. Web lokacija tih podataka nije posebno navedena u literaturi jer je navedena u radu iz kojeg su ti podaci dobiveni (Gill i sur, 2016). Podaci sadrže triplikate ukupne količine RNA molekula sekvenciranih za svaki od dva istraživana stadija stanica. Popis (tablica) u kojoj su navedene samo nekodirajuće molekule RNA (eng. noncoding RNAs – ncRNAs) preuzeta je iz baze podataka Ensembl putem servisa BioMart. Obrada podataka sastoji se od postupka mapiranja, odnosno pridruživanja svakog od sekvenciranih fragmenata RNA na pripadajuće mjesto (lokus) na genomu čovjeka za svaki sekvencirani uzorak posebno. Nakon mapiranja, za svaki položaj gena zbraja se broj mapiranih fragmenata po pojedinom lokusu. Zatim se, u postupku tzv. normalizacije rezultata, vrijednosti mapiranih fragmenata dijele s ukupnim brojem sekvenciranih fragmenata u svakom od ponavljanja. Slijedi računanje aritmetičke sredine dobivenih vrijednosti za skupine triplikata kako bi se postigla što pouzdanija procjena razine pronađenih molekula RNA. Međusobnom usporedbom dobivenih vrijednosti za svaki gen između dva stadija dobiva se diferencijalna ekspresija svakog od gena, to jest omjer ekspresija gena između dva stanična stadija. Vrijednosti diferencijalne ekspresije pridružuje se i statistička mjera pouzdanosti, koja ovisi o tome koliko se stadiji međusobno razlikuju i kolika je standardna devijacija vrijednosti ekspresije unutar ponavljanja u pojedinom stadiju. Nakon što je izrađena diferencijalna ekspresija svih gena, upotrebom tablice nekodirajućih RNA usporedba je ograničena samo na skupinu koja je u

fokusu ovog istraživanja. Tako pripremljeni podaci pogodni su za finalnu obradu i prikaz. Podaci su prikazani putem toplinske mape (eng. heatmap) koja je pogodna za paralelni prikaz genskih ekspresija velikog broja gena. Cjelokupni postupak obrade podataka i grafičkog prikaza rezultata obavljen je unutar programskog paketa R (Prilozi), korištenjem biblioteka Bioconductor za obradu bioloških podataka (Love i sur, 2016). Svi grafički prikazi ekspresije generirani su unutar programskog paketa R.

REZULTATI

Nakon obavljenih postupaka mapiranja, normalizacije i dobivanja diferencijalne ekspresije gena dobiveni su sljedeći podaci: ukupan broj svih genskih lokusa u pokusu Gill i sur. (2016) je 24183. Ukupan broj nekodirajućih RNA preuzetih iz Ensembl baze podataka je 13901. Ukupan broj nekodirajućih RNA iz pokusa Gill i suradnika je 5398. Broj nekodirajućih RNA iz Ensembl baze podataka prepoznatih u podacima iz eksperimenta Gill i sur. (2016) je 1520. Nakon dobivenog podatka od 1520 prepoznatih nekodirajućih RNA uveo sam dodatni kriterij po kojem je eliminirano još 857 nekodirajućih RNA. Taj je kriterij da određena nekodirajuća RNA u eksperimentu Gill i sur. (2016) u barem jednom ponavljanju ima više od jednog fragmenta u postupku sekvenciranja. Dodatni je kriterij uveden jer pojava nekodirajućih RNA s jednim fragmentom u nekom ponavljanju može biti rezultat greške u postupku sekvenciranja. Nakon eliminacije po opisanom kriteriju dobiveno je 663 nekodirajućih RNA. Od njih 663, ukupno 476 eksprimirano je u odraslom stadiju razvoja stanica, a 553 u embrionalnom. Iz toga je vidljivo da je velik broj nekodirajućih RNA eksprimiran u oba stadija (jer da tome nije tako, zbroj molekula RNA eksprimiranih u dva stadija bio bi jednak ukupnom, a vidljivo je da 476 zbrojeno sa 553 daje puno više od 663). Među 663 dobivenih nekodirajućih RNA njih 16 je pokazalo statistički značajnu diferencijalnu ekspresiju među stadijima.

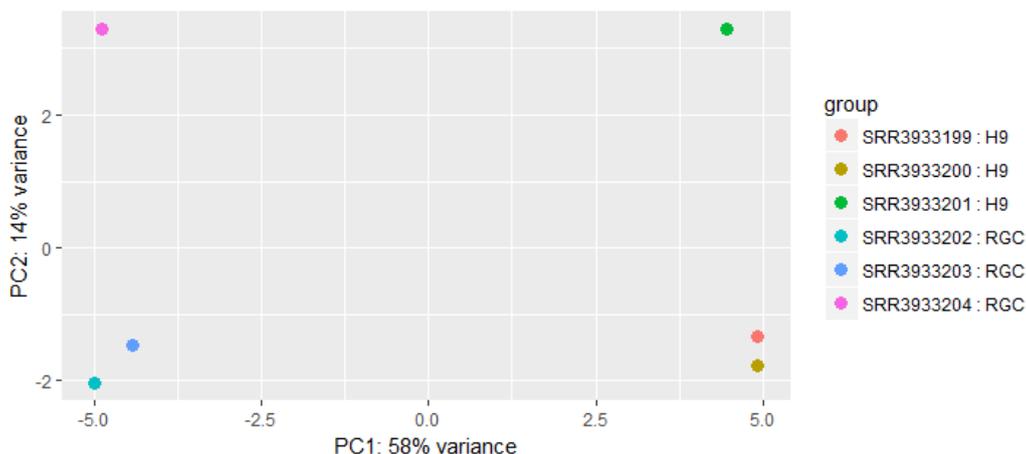
Konačnom obradom dobivena je toplinska mapa koja prikazuje međusobnu sličnost ili razliku pojedinih uzoraka (ponavljanja).



Slika 4 Toplinska mapa, prikaz sličnosti i razlike u ukupnoj genskoj ekspresiji nekodirajućih RNA među stadijima i ponavljanjima (H9 – embrionalni stadij, RGC – odrasli stadij) – što je boja tamnija, to su sličnosti u ekspresiji veće

Kao što je vidljivo na slici 4, gdje su u svakom retku i stupcu toplinske mape prikazana tri ponavljanja sekvenciranja za dva stadija stanica (H9 – embrionalni stadij i RGC – odrasli stadij, eng. retinal ganglion cells), najveća sličnost je među identičnim uzorcima (njihova je međusobna euklidska udaljenost 0, što je u toplinskoj mapi prikazano tamno plavom bojom). Najveće razlike prisutne su između uzoraka dvaju stadija (H9 i RGC), što je u toplinskoj mapi prikazano blijedo plavom ili bijelom bojom). Srednje svijetla plava boja prikazuje sličnosti među trima ponavljanjima za isti stadij razvoja stanica. Među njima je prisutna veća sličnost nego među dvama stadijima, ali postoje razlike uzrokovane različitim uvjetima i mogućim greškama pri provođenju sekvenciranja. Iz ovako dobivene toplinske mape vidljivo je da su pokusi provedeni kvalitetno, uz veće varijacije između stadija i manje varijacije unutar ponavljanja u pojedinim stadijima, što znači da će dalja statistička obrada imati smisla.

Slika 5 prikazuje tzv. PCA plot (eng. principal component analysis), graf na kojem su vidljive međusobne razlike genske ekspresije između stadija te među ponavljanjima sekvenciranja za svaki stadij. Vidljivo je izražena razlika ekspresije između embrionalnog i odraslog stadija (58%) na x osi (PC1). Na y osi prikazane su razlike među ponavljanjima sekvenciranja za pojedini stadij (PC2). Vidljivo je da i u odraslom (RGC) i u embrionalnom (H9) stadiju postoji po jedno ponavljanje koje se značajnije razlikuje (14%) od ostala dva unutar stadija. Upravo su ove razlike jedan od razloga zašto je poželjno u eksperimentalnom dijelu istraživanja načiniti više ponavljanja za svaki stadij. U slučaju da unutar stadija postoje ponavljanja koja značajno odudaraju od ostalih, takva ponavljanja je moguće isključiti iz dalje obrade kako bi se povećala statistička osjetljivost. U ovom konkretnom slučaju to nije bilo potrebno učiniti jer su razlike i u ponavljanjima koja odstupaju još uvijek razmjerno male i ne dovode do miješanja vrijednosti dvaju stadija.



Slika 5 PCA plot, dvodimenzionalni prikaz razlika genske ekspresije među stadijima – PC1, i među ponavljanjima unutar stadija – PC2 (H9 – embrionalni stadij, RGC – odrasli stadij)

Konačno, nakon obavljene analize diferencijalne ekspresije trebalo je odrediti koje su nekodirajuće RNA najznačajnije promijenjene tijekom staničnog razvoja. Obradom podataka u programskom paketu R dobiveno je 16 takvih RNA molekula, čija je diferencijalna ekspresija prikazana na slici 6 i u tablici 1. U tablici 1 prikazane su uz razlike ekspresije i p-vrijednosti ekspresije, na temelju kojih su



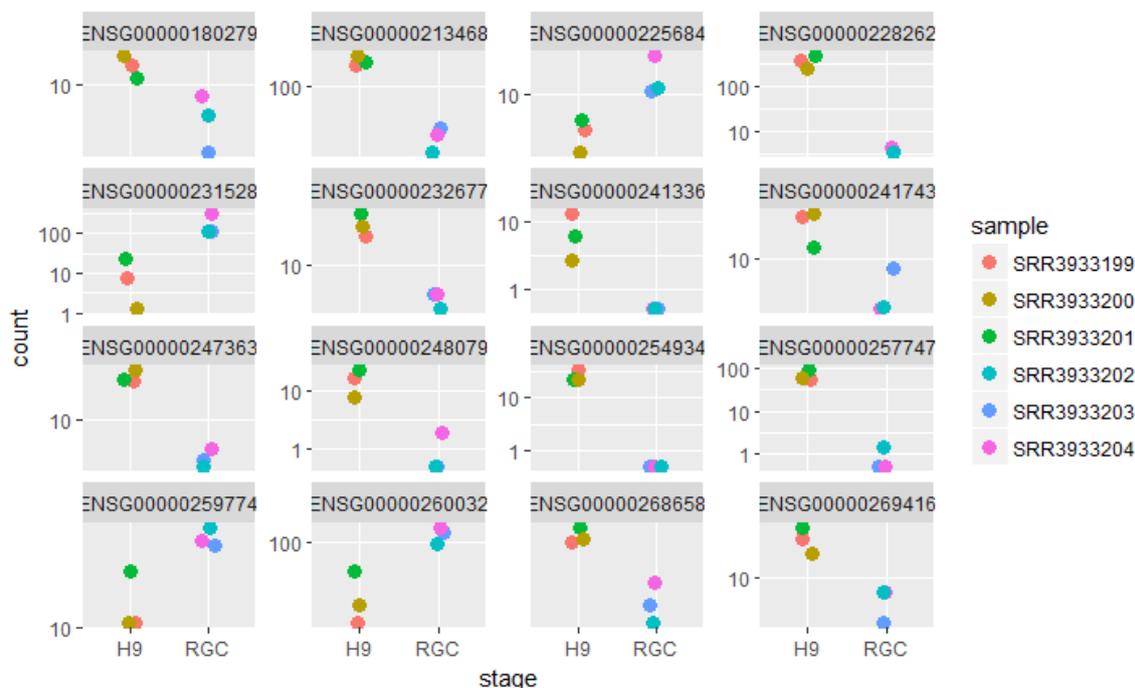
izdvojene RNA molekule prema kriteriju statističke značajnosti diferencijalne ekspresije. Razlike ekspresija izdvojenih nekodirajućih RNA prikazane su grafički na slici 6.

Tablica 1 Nekodirajuće RNA sa statistički značajnom diferencijalnom ekspresijom, razlika srednjih vrijednosti njihove ekspresije među stadijima, p-vrijednosti njihove ekspresije i njihova imena

ncRNA Ensembl imena	Razlike ekspresije	p-vrijednosti	Imena ncRNA
ENSG00000225684	2,98	$3,70 \times 10^{-3}$	FAM225B
ENSG00000232677	-1,99	$1,73 \times 10^{-2}$	LINC00665
ENSG00000247363	-2,04	$1,73 \times 10^{-2}$	LOC100507250
ENSG00000248079	-3,96	$1,99 \times 10^{-3}$	DPH6-AS1
ENSG00000254934	-5,41	$4,60 \times 10^{-6}$	LINC00678
ENSG00000241336	-3,53	$3,32 \times 10^{-2}$	LINC01487
ENSG00000257747	-6,06	$7,10 \times 10^{-11}$	LOC101928449
ENSG00000259774	1,60	$1,73 \times 10^{-2}$	LOC103171574
ENSG00000228262	-6,41	$6,86 \times 10^{-32}$	LINC01320
ENSG00000269416	-1,87	$2,94 \times 10^{-2}$	LINC01224
ENSG00000241743	-2,15	$1,94 \times 10^{-2}$	XACT
ENSG00000180279	-1,90	$9,73 \times 10^{-2}$	MGC45922
ENSG00000231528	3,38	$1,10 \times 10^{-2}$	FAM225A
ENSG00000213468	-2,59	$7,74 \times 10^{-13}$	FIRRE
ENSG00000268658	-1,62	$1,22 \times 10^{-3}$	LINC00664
ENSG00000260032	0,97	$4,99 \times 10^{-2}$	NORAD

U prvom stupcu tablice 1 navode se nazivi nekodirajućih RNA kako su navedeni u Ensembl bazi podataka. U drugom se stupcu navode razlike srednjih vrijednosti ekspresije tih RNA molekula između dva stadija, tj. logaritmi po bazi 2 kvocijenta srednjih vrijednosti ekspresija među stadijima (tzv. log fold change). Pri tome se oduzimaju srednje vrijednosti ekspresije u odrasлом stadiju od srednjih vrijednosti ekspresije u embrionalnom stadiju. Stoga negativne vrijednosti označavaju veću ekspresiju u embrionalnom stadiju, a pozitivne veću ekspresiju u odrasлом stadiju. Treći stupac sadrži p-vrijednosti ekspresije nekodirajućih RNA. Vidljivo je da su sve p-vrijednosti manje od 0,1 zbog čega se ekspresije tih 16 nekodirajućih RNA smatraju statistički značajnima. U zadnjem su stupcu tablice navedena imena nekodirajućih RNA pomoću kojih sam istražio njihovu ekspresiju u mrežnici u dostupnim bazama podataka.

Na svakom od 16 grafova na slici 6, x os predstavlja stadij razvoja stanica, a y os razinu ekspresije u određenom ponavljanju sekvenciranja. Za većinu dobivenih nekodirajućih RNA (12 od 16) vidljivo je da njihova ekspresija opada u odrasлом stadiju. Za ostatak (4 od 16) vidljivo je povećanje ekspresije u odrasлом stadiju. Iz toga se može zaključiti da je 12 nekodirajućih RNA sa smanjenom ekspresijom uključeno u procese vezane za rani embrionalni razvoj, te da su u odrasлом stadiju manje značajni za funkcioniranje stanica. Za 4 nekodirajuće RNA s povećanom razinom ekspresije analogno se može zaključiti da je njihova funkcija značajnija i dolazi do izražaja kod odraslih ganglijskih stanica mrežnice, a da u embrionalnom stadiju ne igraju značajnu ulogu.



Slika 6 Statistički značajna diferencijalna ekspresija nekodirajućih RNA, prikazana za svako ponavljanje – obojenu točku, posebno (H9 – embrionalni stadij, RGC – odrasli stadij)

RASPRAVA

Rezultati istraživanja slažu se s početnom hipotezom. Naime, vidljivo je da postoje razlike u ekspresiji nekodirajućih RNA između dva stadija, kao i, u manjoj mjeri, među ponavljanjima unutar stadija. Nije bilo očekivano da će jedno ponavljanje sekvenciranja u svakom stadiju odstupati od druga dva. Takva se razlika može pripisati greškama tijekom eksperimentalne pripreme: izolaciji RNA iz stanica, postupku pripreme biblioteke za sekvenciranje ili u samom postupku sekvenciranja.

Uloge i značaj šesnaest nekodirajućih RNA s najznačajnijom diferencijalnom ekspresijom mogu se pronaći u različitim bazama podataka dostupnima na internetu. U ovom sam istraživanju odabrao bazu podataka GeneCards zato što ona sadrži podatke iz velikog broja različitih izvora (GeneCards®).

Počevši iz gornjeg lijevog kuta slike 6 na desno, istražio sam u bazi podataka GeneCards ekspresiju gena koji kodiraju tih 16 nekodirajućih RNA u tkivima i organima u tijelu čovjeka.

Za samo 3 od 16 nekodirajućih RNA čiju sam ekspresiju istražio postoje podaci o ekspresiji u živčanom tkivu mrežnice (ENSG00000213468, ENSG00000180279 i ENSG00000225684). U ovom se istraživanju pokazalo da je ekspresija RNA pod pristupnim brojevima ENSG00000213468 i ENSG00000180279 veća u embrionalnom nego u odraslom stadiju, a RNA pod pristupnim brojem ENSG00000225684 ima veću ekspresiju u odraslom stadiju. Za ostalih 13 ne postoje podaci o ekspresiji u mrežnici, a za dvije od tih 13 (ENSG00000241743 i ENSG00000260032) uopće ne postoje podaci o ekspresiji u ljudskim tkivima i organima u bazi podataka GeneCards. Za molekulu RNA pristupnog broja ENSG00000241743 u ovom se istraživanju pokazalo da ima veću ekspresiju u embrionalnom stadiju, dok je za molekulu pristupnog broja ENSG00000260032 vidljiva veća ekspresija u odraslom stadiju. Na temelju podataka dobivenih u ovom istraživanju moguće je provesti eksperiment kojem bi u



fokusu bila uloga 13 novoidentificiranih nekodirajućih RNA u mrežnici za koje je ovo istraživanje pokazalo da su u njoj izražene. Također, ovo istraživanje predstavlja i demonstraciju mogućnosti dodatne analize već postojećih eksperimentalnih podataka, gdje je vidljivo da su analizom takvih podataka moguća i dodatna otkrića koja nisu bila planirana početno postavljenim hipotezama. Količina podataka dobivena iz visokoprotočnih pokusa sekvenciranja (eng. high-throughput sequencing) je, naime, toliko velika da je čak i nemoguće iscrpno obuhvatiti sve aspekte informacije koje iz njih proizlaze, već se dodatno znanje može iz njih izvući i naknadno, uz nove hipoteze.

ZAKLJUČCI

Glavni su zaključci ovog istraživanja:

- ✔ Postoji razlika u ekspresiji nekodirajućih RNA između embrionalnog i odraslog stadija ganglijskih stanica mrežnice.
- ✔ Osim među stadijima, razlika u ekspresiji nekodirajućih RNA postoji i među ponavljanjima sekvenciranja unutar svakog stadija.
- ✔ Pronađeno je 16 nekodirajućih RNA sa statistički značajnom diferencijalnom ekspresijom između dva stadija.
- ✔ Od tih 16 RNA molekula, njih 12 pokazuje veću ekspresiju u embrionalnom stadiju, što upućuje na njihovu ulogu u procesima specifičnima za matične stanice.
- ✔ Ostatak od 4 molekule RNA pokazuje veći stupanj ekspresije u odraslom stadiju, što ukazuje na njihov značaj u procesima karakterističnima za odrasle ganglijske stanice mrežnice.
- ✔ Iz dostupnih baza podataka pokazalo se da 13 od 16 nekodirajućih RNA s najizraženijom diferencijalnom ekspresijom pronađenih u ovom istraživanju nemaju ekspresiju u mrežnici, te se u ovom istraživanju ustvrdilo da u mrežnici postoji ekspresija tih RNA molekula, što je temeljni doprinos ovog rada.

ZAHVALA

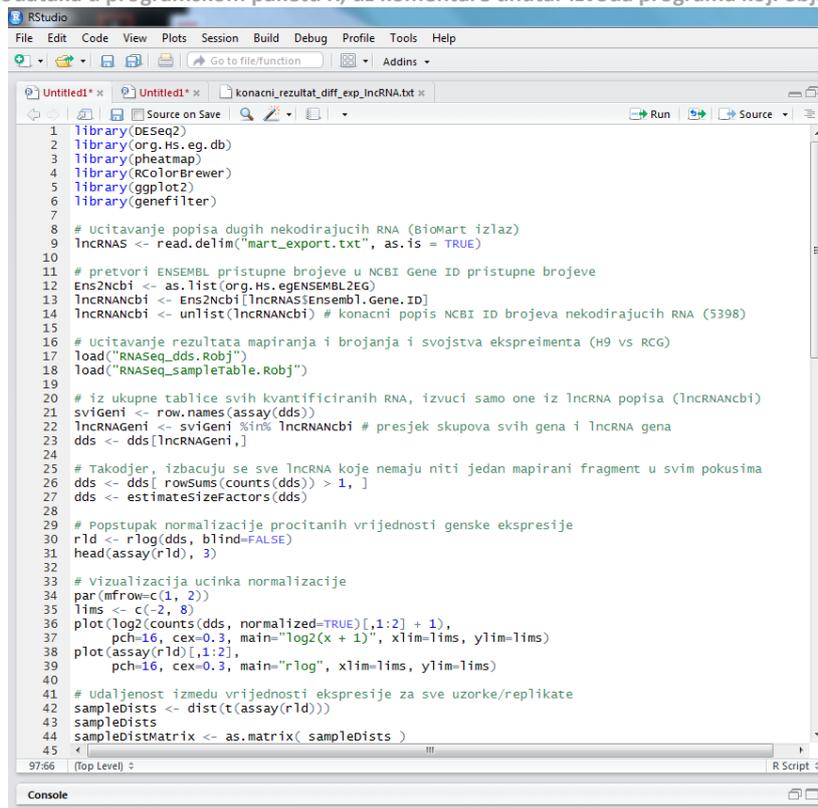
Zahvaljujem prof. dr. sc. Kristianu Vlahovičeku na pomoći u usmjeravanju na baze podataka iz kojih sam preuzimao podatke za analizu i uvođenje u programski paket u kojem je ta analiza obavljena.

LITERATURA

- Gerstein, M. i sur. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10: 57–63.
- Gill, K. P. i sur. 2016. Enriched retinal ganglion cells derived from human embryonic stem cells. *Sci. Rep.* 6: 30552.
- Lee, S. E. i Palazzo, A. F. 2015. Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Front. Genet.* <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00002>, pristupljeno 3.1.2017.
- Love, M. I. i sur. 2016. RNA-seq workflow: gene-level exploratory analysis and differential expression <http://www.bioconductor.org/help/workflows/rnaseqGene/#ref>, pristupljeno 3.1.2017.
- Reuter, A. J. i sur. 2015. High-throughput sequencing technologies. *Molecular Cell* 58: 586–597.
- Mader S. S. 2006. *Human biology*. McGraw-Hill, New York, str. 250-254
- Rinn, J. L. i Chang, H. Y. 2012. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 8: 145–166.
- Bioconductor 2003. <https://cran.r-project.org/>, pristupljeno 3.1.2017.
- Ensembl genome browser 88 2017. <http://www.ensembl.org/index.html>, pristupljeno 3.1.2017.
- GeneCards®: The Human Gene Database 1996. <http://www.genecards.org>, pristupljeno 4.2. 2017.

PRILOZI

Prilog 1 Obrada podataka u programskom paketu R, uz komentare unutar izvoda programa koji objašnjavaju postupke

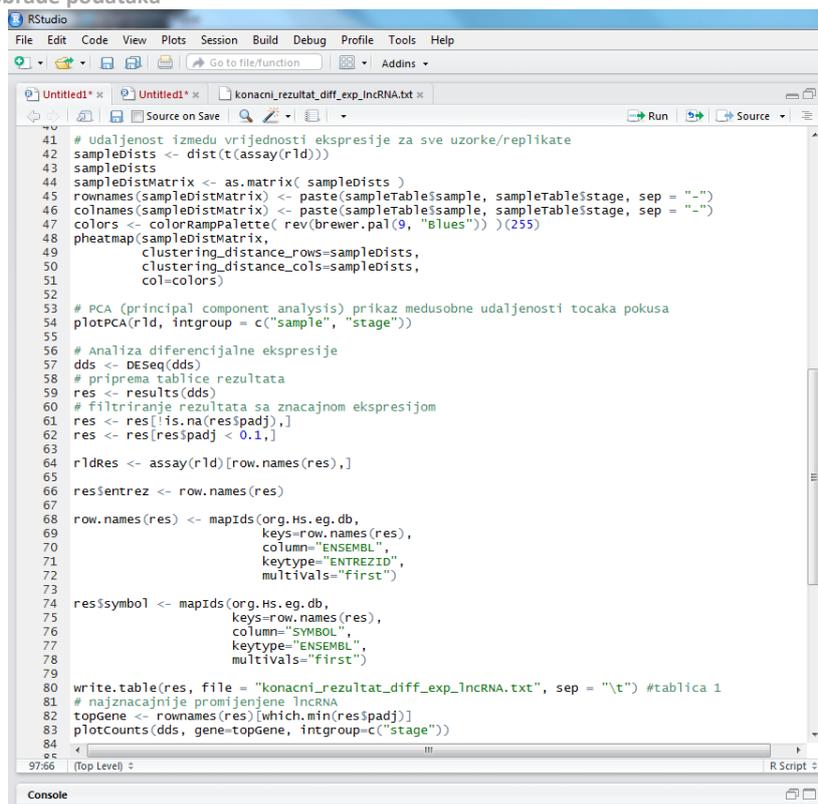


```

1 library(DESeq2)
2 library(org.Hs.eg.db)
3 library(pheatmap)
4 library(RColorBrewer)
5 library(ggplot2)
6 library(genefilter)
7
8 # učitavanje popisa dugih nekodirajućih RNA (BioMart izlaz)
9 lncRNAs <- read.delim("mart_export.txt", as.is = TRUE)
10
11 # pretvori ENSEMBL pristupne brojeve u NCBI Gene ID pristupne brojeve
12 Ens2Ncbi <- as.list(org.Hs.egENSEMBL2EG)
13 lncRNANcbi <- Ens2Ncbi[lncRNAs$Ensembl.Gene.ID]
14 lncRNANcbi <- unlist(lncRNANcbi) # konacni popis NCBI ID brojeva nekodirajućih RNA (5398)
15
16 # učitavanje rezultata mapiranja i brojanja i svojstva eksperimenta (H9 vs RCG)
17 load("RNASeq_dds.Robj")
18 load("RNASeq_sampleTable.Robj")
19
20 # iz ukupne tablice svih kvantificiranih RNA, izvuci samo one iz lncRNA popisa (lncRNANcbi)
21 sviGeni <- row.names(assay(dds))
22 lncRNAGeni <- sviGeni[intersect(lncRNANcbi, sviGeni)] # presjek skupova svih gena i lncRNA gena
23 dds <- dds[lncRNAGeni,]
24
25 # Također, izbacuju se sve lncRNA koje nemaju niti jedan mapirani fragment u svim pokusima
26 dds <- dds[ rowSums(counts(dds)) > 1, ]
27 dds <- estimateSizeFactors(dds)
28
29 # Postupak normalizacije procitanih vrijednosti genske ekspresije
30 rld <- rlog(dds, blind=FALSE)
31 head(assay(rld), 3)
32
33 # vizualizacija učinka normalizacije
34 par(mfrow=c(1, 2))
35 lms <- c(-2, 8)
36 plot(log2(counts(dds, normalized=TRUE)[,1:2] + 1),
37      pch=16, cex=0.3, main="log2(x + 1)", xlim=lms, ylim=lms)
38 plot(assay(rld)[,1:2],
39      pch=16, cex=0.3, main="rlog", xlim=lms, ylim=lms)
40
41 # udaljenost između vrijednosti ekspresije za sve uzorke/replikate
42 sampleDists <- dist(t(assay(rld)))
43 sampleDists
44 sampleDistMatrix <- as.matrix( sampleDists )
45
97:66 (Top Level)
R Script

```

Prilog 2 Nastavak obrade podataka



```

41 # udaljenost između vrijednosti ekspresije za sve uzorke/replikate
42 sampleDists <- dist(t(assay(rld)))
43 sampleDists
44 sampleDistMatrix <- as.matrix( sampleDists )
45 rownames(sampleDistMatrix) <- paste(sampleTable$sample, sampleTable$stage, sep = "-")
46 colnames(sampleDistMatrix) <- paste(sampleTable$sample, sampleTable$stage, sep = "-")
47 colors <- colorRampPalette( rev(brewer.pal(9, "Blues")) )(255)
48 pheatmap(sampleDistMatrix,
49          clustering_distance_rows=sampleDists,
50          clustering_distance_cols=sampleDists,
51          col=colors)
52
53 # PCA (principal component analysis) prikaz međusobne udaljenosti točaka pokusa
54 plotPCA(rld, intgroup = c("sample", "stage"))
55
56 # Analiza diferencijalne ekspresije
57 dds <- DESeq(dds)
58 # priprema tablice rezultata
59 res <- results(dds)
60 # filtriranje rezultata sa značajnom ekspresijom
61 res <- res[!is.na(res$padj),]
62 res <- res[res$padj < 0.1,]
63
64 rldRes <- assay(rld)[row.names(res),]
65
66 res$ntrez <- row.names(res)
67
68 row.names(res) <- mapIds(org.Hs.eg.db,
69                        keys=row.names(res),
70                        column="ENSEMBL",
71                        keytype="ENTREZID",
72                        multival="first")
73
74 res$symbol <- mapIds(org.Hs.eg.db,
75                    keys=row.names(res),
76                    column="SYMBOL",
77                    keytype="ENSEMBL",
78                    multival="first")
79
80 write.table(res, file = "konacni_rezultat_diff_exp_lncRNA.txt", sep = "\t") #tablica 1
81 # najznacajnije promijenjene lncRNA
82 topGene <- rownames(res)[which.min(res$padj)]
83 plotCounts(dds, gene=topGene, intgroup=c("stage"))
84
97:66 (Top Level)
R Script

```



Prilog 3 Završetak obrade podataka

```
RStudio
File Edit Code View Plots Session Build Debug Profile Tools Help
Go to file/function Addins
Source on Save Run Source
92
93 # najznacajnije promijenjene lncRNA
94 topGene <- rownames(res)[which.min(res$padj)]
95 plotCounts(dds, gene=topGene, intgroup=c("stage"))
96
97 # prikupljanje podataka o ekspresiji za sve diferencijalno eksprimirane gene (16)
98 topGenes <- sapply(rownames(res), function(x) {
99   topGene <- plotCounts(dds, gene=res[x, "entrez"], intgroup=c("sample", "stage"), returnData=TRUE)
100   topGene$gene <- x
101   topGene
102 }, simplify = FALSE)
103 topGenes <- do.call(rbind, topGenes)
104
105 # vizualizacija
106 ggplot(topGenes, aes(x=stage, y=count, color=sample)) +
107   facet_wrap(~gene, scales = "free_y") +
108   scale_y_log10() +
109   geom_point(position=position_jitter(width=.1,height=0), size=3)
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
135:1 (Top Level) R Script
Console
```

USPOREDBA KEMOKINEZE U ORGANIZMIMA *AMOEBE PROTEUS* I *ARCELLA VULGARIS*

Marin Biliškov, 3. razred

Josip Ivica, 3. razred

III.gimnazija, Split

Mentor: Ines Alujević

SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj različitih otopina (etanola, glicerola i natrijeva klorida u koncentracijama 0.05M, 0.1M i 0.2M) na kemokinezu vrsta *Amoeba proteus* i *Arcella vulgaris*. Kretanje organizama u otopinama snimano je pomoću Flexy kamere i analizirano računalnim programom vlastite izrade. Izračunati su i uspoređeni sljedeći parametri vezani uz gibanje organizama: brzina i kut (smjer) kretanja organizama te omjer pomaka i puta koji prevali organizam (*engl.*, NGDR, net-gross displacement ratio). Rezultati su pokazali da glicerol i etanol u otopinama smanjuju brzinu organizama izuzev u otopini etanola 0.05M. Glicerol u svim otopinama djeluje kao kemoatraktant. Otopina etanola 0.05M djeluje kao kemorepelent. Duže izlaganje etanolu izaziva prekid gibanja i stiskanje ameba. Izlaganje otopini natrijeva klorida dovodi do zaustavljanja gibanja organizama i prelaska *A. proteus* u začahureni oblik. *A. vulgaris* ne pokazuje uočljiva gibanja. Promjene u brzini, uzrokovane promjenom koncentracija kemikalija su oštre i mogu se koristiti pri utvrđivanju prisustva navedenih spojeva u uzorkovanoj vodi.

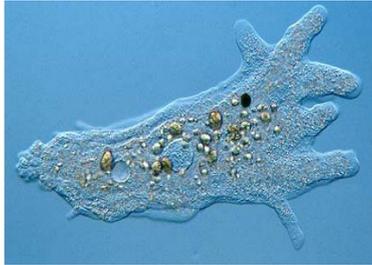
Ključne riječi: smjer, brzina, Net-gross distance ratio, kemoatraktanti, kemorepelenti

UVOD

Praživotinje (Protozoa) pokretljivi su jednostanični organizmi složene stanične građe s organelima koje obavljaju sve životne uloge – izmjenu tvari, disanje, kretanje i razmnožavanje. Najčešće se razmnožavaju binarnim dijeljenjem, a rjeđe multiplom diobom (Matoničkin i sur., 1998). *Amoeba proteus* i *Arcella vulgaris* praživotinje su iz skupine korjenonožaca (Sarcodina). Pripadnici ove skupine kreću se na specifičan način stvarajući „izdanke“ (pseudopodije) iz središnjega dijela citoplazme. Njihovo stvaranje posljedica je izmjene koloidnog stanja citoplazme, koja iz rjeđeg tekućeg sol-stanja može prelaziti u gušće gel-stanje i obrnuto. Najveći pseudopodij određuje smjer kretanja. Pseudopodiji mogu biti različitog oblika (nitasti-filopodiji, prstasti-lobopodiji, mrežasti-retikulopodiji te ravni i „ukočeni“ - aksopodiji). Vanjska membrana korjenonožaca zadire u kontrolu procesa kretanja. Elektrofiziološkim eksperimentima dokazana je značajna razlika u električnom potencijalu membrane na prednjem i stražnjem dijelu pseudopodija.

Amoeba proteus (gola ameba) najjednostavnija je praživotinja građena od jedne stanice s jezgrom, bez zaštitne opne i/ili ljušturice (slika 1). Dugačka je od 0.01 mm do 0.5 mm. Oblik tijela joj je promjenljiv, giba se polako pružanjem pseudopodija, kojima hvata i hranu (sitne alge i manje praživotinje), hrani se fagocitozom, a razmnožava diobom. Živi u vodi ili vlažnoj zemlji, a za vrijeme suše začahuri se u cistu.

Arcella vulgaris (okućena ameba) pripadnik je roda *Arcella* čiji su pripadnici ovijeni ljušturama s jednim središnjim otvorom kroz koji se pružaju pseudopodiji (slika 2). Promjer ljušture kod ovih ameba je 70 – 130 μm . Kao i ostale amebe, stanovnik je voda koje su bogate organskim otpadom.

Slika 1 *Amoeba proteus*Slika 2 *Arcella vulgaris*

Pokretne reakcije praživotinja na vanjske podražaje nazivaju se taksijama. Prema naravi podražaja razlikuju se fototaksije (uzrokovane svjetlošću), geotaksije (uzrokovane silom težom), kemotaksije (uzrokovane kemijskim podražajima), termotaksije (uzrokovane temperaturom) i dr. Taksije mogu biti pozitivne ili negativne, ovisno o tome gibaju li se organizmi ili stanice u smjeru podražaja ili se udaljavaju od izvora podražaja.

Kineze su neusmjerene promjene u gibanju organizama uzrokovane vanjskim čimbenicima. Dijele se na ortokineze (promjene u brzini gibanja) i klinokineze (promjene u frekvenciji i/ili intenzitetu zakretanja).

Kemokineza je promjena u gibanju organizma koja se javlja kao reakcija na koncentraciju kemijskih tvari u okolini. Nije specifična reakcija, tj. izazivaju je određene strukturne komponente u spojevima, a ne isključivo jedan spoj (Takiguchi i sur, 2002). Kemotaksija, vrlo bitna pojava u praživotinja, a i u mikroorganizmima općenito, usmjerena je promjena gibanja organizma uz ili niz koncentracijski gradijent tvari koja omogućava brzo pronalaženje hrane zbog spojeva koji se nalaze u njoj te bijeg od predatora iz nepovoljnoga okruženja zbog istoga razloga. Prema starijim poimanjima, kemotaksija je pretpostavljala postojanje nekakvog osjeta za gradijent. U suvremenom poimanju, naime, kemotaksija proizlazi iz učinaka kemokineze koji moduliraju vjerojatnost da će se organizam zadržati u nekome području, smanjujući vjerojatnost da se zadrži u području niske koncentracije privlačnih tvari (kemoatraktanata), a povećavajući je da se zadrži u područjima više koncentracije. Obrnuto vrijedi za odbojne tvari (kemorepelente).

Kako bi se temeljito opisala kemokineza potrebno je definirati nekoliko parametara kao što su apsolutna brzina organizma, smjer kretanja i NGDR (*engl.*, net-gross displacement ratio; omjer pomaka i prijeđenoga puta), čija vrijednost ukazuje na lokaliziranost organizma (zadržavanje u istom području).

Cilj ovoga istraživanja je usporediti ponašanje dva jednostavna organizma (*Amoeba proteus* i *Arcella vulgaris*) u otopinama različitih tvari i koncentracija mjerenjem gore navedenih parametara.

Naše pretpostavke su:

- Pojaviti će se barem manje razlike u kemokinezi među vrstama.
- Među jedinkama iste vrste neće biti značajnih razlika u kemokinetičkom ponašanju.
- Promjene koje izaziva kemokineza biti će proporcionalne koncentraciji tvari do granice određene osmotskim tlakom.



- Ponašanje organizma u otopinama bit će uvjetovano strukturnim komponentama tvari, tj. razlika u ponašanju organizama u otopinama tvari sličnih strukturnih komponenti (glicerol i etanol) bit će manja nego u onima koje se razlikuju u strukturnim komponentama (glicerol i NaCl).

Ako se ustanovi da je kemokinetička reakcija organizama na neke tvari dovoljno specifična, moguće je primijeniti ovo istraživanje u analizi kvalitete vode i u brzom i jednostavnoj determinaciji sličnih organizama. Dodavanjem organizama uzgojenih u kulturi u uzorke vode za analizu i praćenjem njihove kineze moguće je predvidjeti prisutnost i približnu koncentraciju nekih tvari. Razlike u kemokinezi različitih vrsta mogle bi pomoći u njihovoj determinaciji.

Ideja za ovaj projekt potječe iz pokušaja istraživanja kemotaksije koja omogućuje oplodnju u papratnjača (kretanje spermatozoida potaknuto jabučnom kiselinom iz arhegonija). Zbog dostupnosti materijala (organizama) odlučili smo se za istraživanje kemotaksije praživotinja, a zbog modernog poimanja kemotaksije, opredijelili smo se za istraživanje kemokineze.

METODE RADA

Materijal

Koristile su se kulture vrsta *Amoeba proteus* i *Arcella vulgaris* nabavljene od tvrtke Carolina lab supply. Kulture su čuvane u uvjetima sobne temperature (20° C) na istome mjestu.

Postupak

Pripremljene su otopine koncentracija 0.05 M, 0.1 M i 0.2 M glicerola, etanola i natrijeva klorida. Kao kontrolna otopina korištena je flaširana izvorska voda.

U Petrijeve zdjelice promjera 8.5 cm dodane su otopine u visini 2mm od dna zdjelice (što se pokazalo optimalnim za mikroskopiranje). Zdjelice su postavljene na stolić mikroskopa. U otopine su dodani organizmi iz kulture te promatrani pomoću pričvršćene Fleksy kamere povezane s računalom. U svakoj od otopina snimano je pojedinačno ponašanje sedam (± 1) organizama svake vrste u vremenskom periodu od 5 minuta. Sve su se snimke računalno sakupile za daljnju analizu.

Snimke su analizirane određivanjem koordinata pojedinačnih organizama pomoću računalnoga programa vlastite izrade. Program je napisan u programskom jeziku Python i prati gibanje organizama na snimci pomoću funkcije za ručno praćenje (eng. "Manual tracking") u sklopu modula MoviePy. Podatci o položaju organizama bilježe se u .txt datoteke za kasniju analizu.

Statistička analiza

Za svaki promatrani organizam u različitim otopinama određeni su parametri koji opisuju kemokinezu: brzina organizma, smjer kretanja te NGDR. U svim navedenim formulama x_t , y_t su x i y koordinate jezgre pojedinoga organizma na snimci u trenutku t . Računale su se srednje, prosječne, minimalne, maksimalne i medijalne vrijednosti svih triju parametara za svaki pojedini organizam u svakoj od otopina, a kasnije je izračunata standardna devijacija tih vrijednosti.

Izračunavanje brzine organizma

Brzina organizma v između trenutaka t_1 i t_2 računa se pomoću formule:



$$v = \frac{d[(x(t_1), y(t_1)), (x(t_2), y(t_2))]}{t_1 - t_2},$$

pri čemu je $d[(x(t_1), y(t_1)), (x(t_2), y(t_2))]$ udaljenost između točaka s koordinatama $x(t_1)$, $y(t_1)$, $x(t_2)$ i $y(t_2)$.

Određivanje smjera kretanja

Smjer kretanja između trenutaka t_1 i t_2 izražen je pomoću kuta ϕ kojega pravac kretanja organizma zatvara s apscisom koordinatnog sustava, a računa se pomoću formule:

$$\phi = \arctg \frac{y(t_2) - y(t_1)}{x(t_2) - x(t_1)}$$

Frekvencija i intenzitet njegove promjene su veličine koje opisuju klinokinetičko djelovanje kemokineze.

Određivanje NGDR (*net-gross displacement ratio*)

NGDR omjer je pomaka i puta koji prevali organizam.

Računa se pomoću formule:

$$NGDR = \frac{x}{s}$$

Gdje je x pomak, a s ukupni prevaljeni put organizma. Mjeri se u intervalima od 1 sekunde i predstavlja recipročnu vrijednost zakrivljenosti putanje organizma, što je bitno za određivanje na koliki je prostor ograničen organizam. Pri stalnoj brzini, veće vrijednosti NGDR-a ukazuju na manju lokaliziranost organizma, a manje ukazuju na suprotno (Strom i sur, 2007).

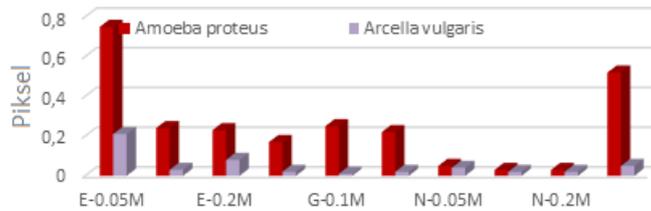
REZULTATI

Za svaki promatrani organizam u različitim otopinama određeni su parametri koji opisuju kemokinezu: brzina organizma, smjer kretanja te NGDR. Računale su se srednje, prosječne, minimalne, maksimalne i medijalne vrijednosti svih triju parametara za svaki pojedini organizam u svakoj od otopina, kao i standardna devijacija tih vrijednosti.

Iz statističke obrade podataka izbačeni su podaci koji odstupaju od srednje vrijednosti više od 0.3 rad u mjerenjima smjera i odstupanjem većim od 0.2 pixel/s u mjerenjima brzine (1 piksel = 5 μ m). U većini mjerenja, odstupanja od srednjih vrijednosti jako su mala (manja od 0.1 pixel/s za brzine i 0.2 rad za kutove) i gotovo konstantna, a podaci koji su eliminirani vjerojatno su posljedica pogreške u postupku (npr. trešnje aparature, strujanja okolnog zraka).

Brzine

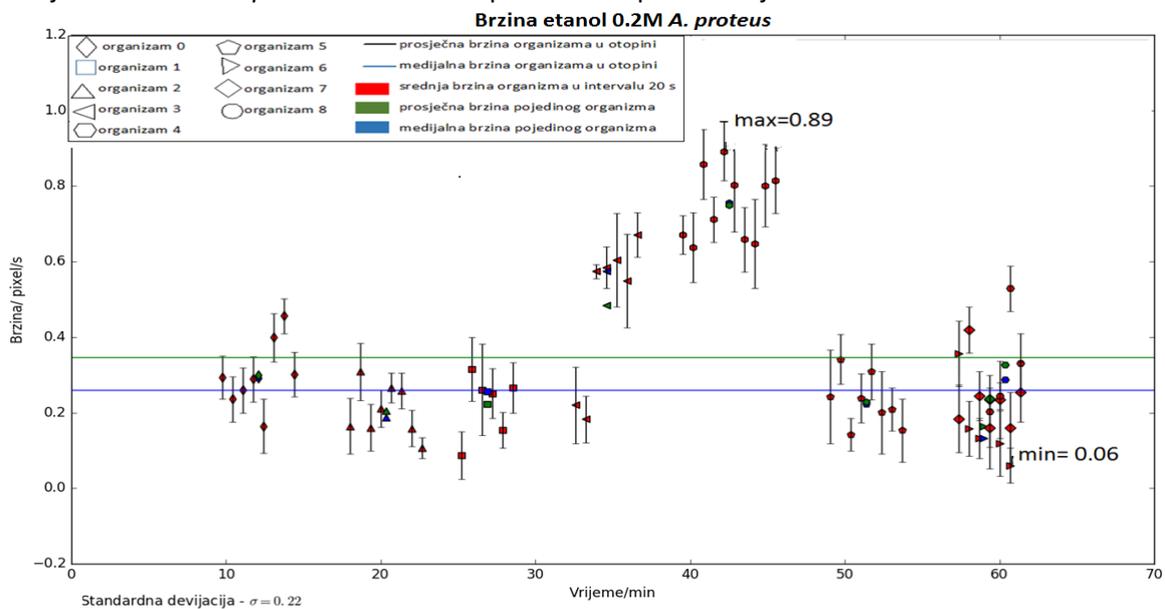
Prosječne brzine vrsta *Amoeba proteus* i *Arcella vulgaris* u različitim otopinama prikazane su na slici 3 i izražene u pikselima po sekundi pri čemu 1 piksel odgovara približnoj vrijednosti od 5 μ m.



Slika 3 Prosječne brzine vrsta *Amoeba proteus* i *Arcella vulgaris* u otopinama (E – etanol; G – glicerol; N – natrijev klorid; K. S. – kontrolna skupina)

Brzine *A. vulgaris* znatno su manje u odnosu na brzine *A. proteus*. *A. proteus* i *A. vulgaris* se kreću vrlo sporo u natrijevu kloridu. Najniže vrijednosti zabilježene su u 0.1 M i 0.2 M otopini natrijevog klorida za *A. proteus* 0.03 piksel s⁻¹ ili 0.15 μm s⁻¹, a za *A. vulgaris* 0.02 piksel s⁻¹ ili 0.1 μm s⁻¹. Najviše vrijednosti zabilježene su u 0.05 M otopini etanola kod obje vrste, s naglaskom na gibanje *A. proteus* koje je gotovo četiri puta brže od *A. vulgaris* (*A. proteus* 0.75 piksel s⁻¹ ili 3.75 μm s⁻¹, *A. vulgaris* 0.21 piksel s⁻¹ ili 1.05 μm s⁻¹).

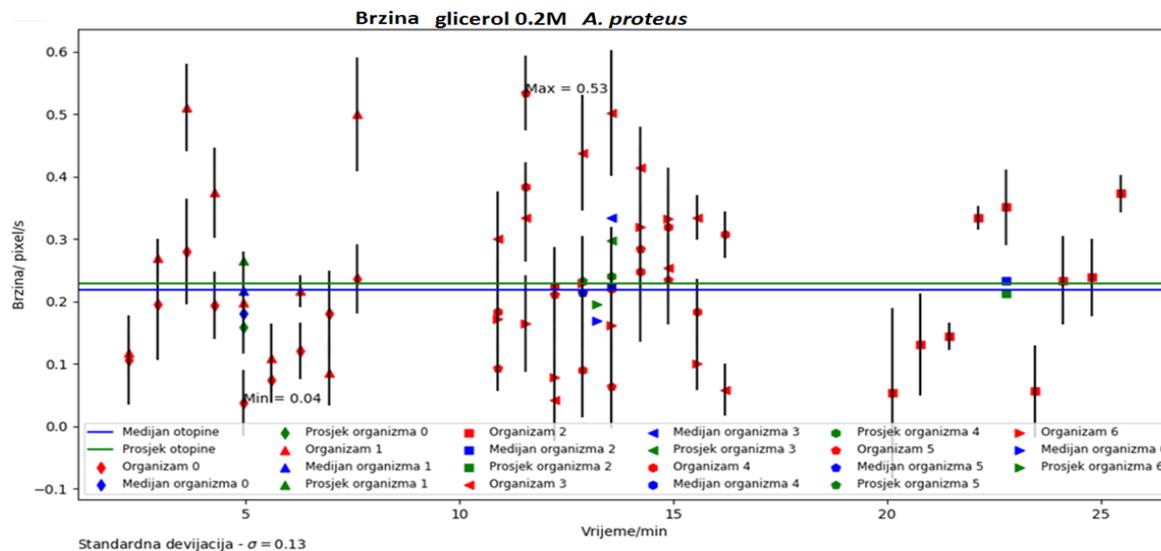
Kretanje vrste *Amoeba proteus* u 0.2 M otopini etanola prikazano je na slici 4.



Slika 4 Brzina pojedinačnih *Amoeba proteus* u etanolu koncentracije 0.2M.

Jedinke vrste *A. proteus* promatrane u ovoj otopini pokazuju najveće promjene u brzini s obzirom na vrijeme kroz koje su bile izložene djelovanju etanola. Značajniji porast brzine pokazuju organizmi koji su praćeni u periodu između 35 i 49 min (max=0.89 piksel s⁻¹ ili 4.45 μm s⁻¹). Nakon tog perioda organizmi praćeni u periodu između 50-55 min i 55-60 min pokazuju smanjenje brzine (min=0.06 piksel s⁻¹ ili 0.3 μm s⁻¹). Kretanje *A. proteus* u 0.2 M otopini glicerola prikazano je na slici 5.

Jedinke vrste *A. proteus* u glicerolu pokazuju smanjenje brzine. Povećane vrijednosti brzina pojedinih organizama su kratkotrajne (max= 0.53 piksel s⁻¹ ili 2.65 μm s⁻¹) nakon čega slijedi pad brzine (min=0.04 piksel s⁻¹ ili 0.2 μm s⁻¹).

Slika 5 Brzine pojedinačnih *Amoeba proteus* u glicerolu koncentracije 0.2M

Net-gross displacement ratio (NGDR)

Net'gross displacement ratio (NGDR) organizama u pojedinoj otopini prikazan je u tablici 1.

Tablica 1 Medijalne i prosječne vrijednosti NGDR-a u svim otopinama za vrste *Amoeba proteus* i *Arcella vulgaris* (crvenom bojom označene su najviše vrijednosti, a plavom najniže vrijednosti NGDR-a).

		NGDR									
		Kontrolna skupina	Etanol			Glicerol			NaCl		
			0.05M	0.1M	0.2M	0.05M	0.1M	0.2M	0.05M	0.1M	0.2M
<i>Amoeba proteus</i>	medijalni	0.95	0.96	0.68	0.80	0.42	0.84	0.57	0.29	0.49	0.38
	prosječni	0.94	0.80	0.67	0.68	0.47	0.77	0.56	0.34	0.53	0.47
<i>Arcella vulgaris</i>	medijalni	0.25	0.55	0.37	0.57	0.52	0.26	0.39	0.17	0.49	0.58
	prosječni	0.25	0.57	0.45	0.53	0.52	0.28	0.44	0.29	0.56	0.58

Vrijednost NGDR-a pokazuje velika odstupanja medijalne i prosječne vrijednosti. Visoke vrijednosti NGDR-a upućuju na manju lokaliziranost organizma i obrnuto. Lokaliziranost vrste *Amoeba proteus* najmanja je u kontrolnoj otopini gdje je izmjerena najveća prosječna vrijednost NGDR= 0.94 i medijalna vrijednost NGDR= 0.95 te u otopini 0.05 M etanola gdje je medijalna vrijednost NGDR= 0.96. Najniže vrijednosti NGDR-a zabilježene su u otopinama 0.05 M NaCl za *A. proteus* gdje je medijalna vrijednost NGDR= 0.29, a za vrstu *Arcella vulgaris* medijalna vrijednost NGDR iznosila je 0.17. Maksimalne, minimalne vrijednosti omjera pomaka i ukupnog prijeđenog puta (NGDR) *A. proteus* u pojedinoj otopini te standardne devijacije prikazane su u tablici 2.

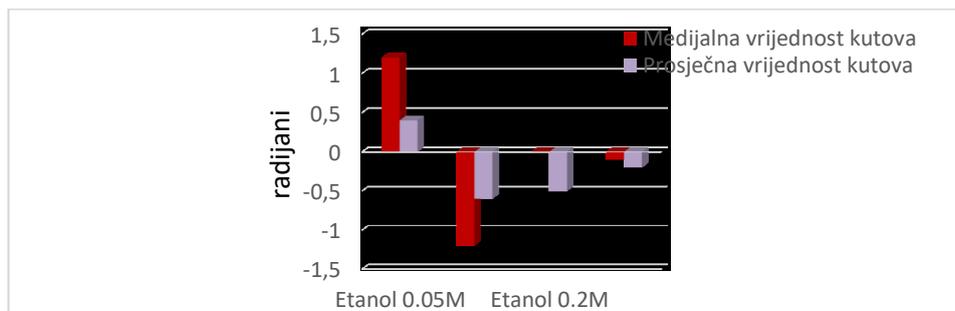
Tablica 2 Maksimumi, minimumi i standardne devijacije NGDR-a vrste *Amoeba proteus* u različitim otopinama (crvenom bojom označene su najviše vrijednosti, a plavom najniže vrijednosti NGDR-a).

		NGDR			
		Kontrolna skupina	Etanol 0.1M	Glicerol 0.1M	NaCl 0.1M
<i>Amoeba proteus</i>	maksimum	0.99	0.88	0.99	0.8
	minimum	0.87	0.45	0.47	0.2
	standardna devijacija	0.04	0.21	0.19	0.25

Maksimalne vrijednosti NGDR-a ili minimalnu lokaliziranost pokazuje *A. proteus* u kontrolnoj otopini i 0.1 M glicerolu (NGDR = 0.99). Minimalne vrijednosti NGDR-a ili maksimalnu lokaliziranost pokazuje *A. proteus* u 0.1 M NaCl (NGDR=0.2). Standardna devijacija najmanja je u kontrolnoj skupini, u ostalim otopinama raste i približnih je vrijednosti.

Smjer i promjena smjera

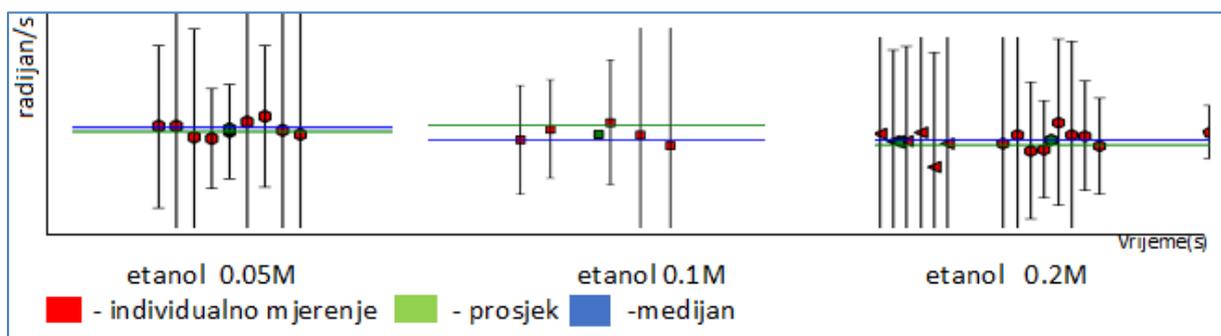
Smjerovi zakretanja organizama s obzirom na apscisu izraženi su u radijanima i njihove promjene prikazane su na slici 6.



Slika 6 Medijalne i prosječne vrijednosti promjene smjera vrste *Amoeba proteus* u otopinama etanola i kontrolnoj skupini.

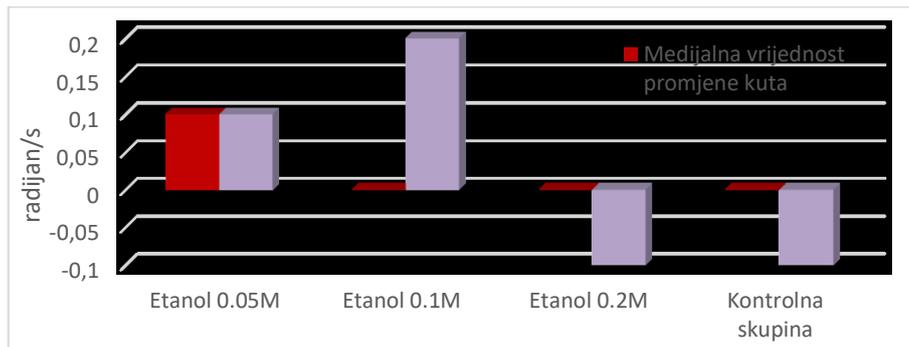
Pozitivna vrijednost smjera znači da s apscisom (x-osi) zatvara kut između 0° i 180° , a negativne vrijednosti upućuju na kut između 180° i 360° . Vidljivo da su ti kutovi nepravilno raspoređeni (ne rastu niti padaju konstantno) što upućuje na to da vrsta *Amoeba proteus* ne pokazuje nikakvu usmjerenost u gibanju.

Promjene smjera pojedinačnih *A. proteus* u periodu promatranja od 5 min u otopinama etanola prikazane su na slici 7.



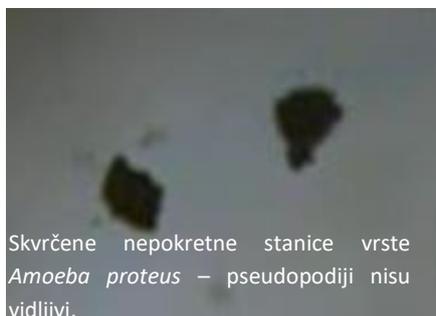
Slika 7 Periodična oscilacija promjene smjera u grafovima gibanja jedinki vrste *Amoeba proteus* u različitim koncentracijama etanola.

Uočava se nekakva vrsta „sinusoidalnog“ gibanja, promjene smjera, što upućuje na periodično gibanje, odnosno osciliranje *A. proteus* u otopinama. Promjene smjera jedino je bilo moguće izračunati za otopine etanola za *A. proteus* jer su gibanja vrsta *A. vulgaris* i *A. proteus* u glicerolu i natrijevu kloridu bila toliko mala i neprimjetna da je pri računanju kuta dolazilo do prevelike pogreške (slika 8).



Slika 8 Medijalne i prosječne vrijednosti promjene smjera zakretanja vrste *Amoeba proteus* u otopinama etanola i kontrolnoj skupini.

Najizraženiju promjenu smjera pokazivali su organizmi u 0.1 M etanolu gdje medijalna vrijednost promjene kuta iznosi 0.2. Ponašanje *A. proteus* u otopinama 0.2 M natrijeva klorida i 0.1 M etanola prikazane su na slici 9 i slici 10.



Slika 9. *Amoeba proteus* u 0.2 M otopini natrijeva klorida.



Slika 10. *Amoeba proteus* u otopini 0.1 M etanola.

U otopini natrijevog klorida amebe su se „skvrčile“, pseudopodiji se nisu formirali, čitava citoplazma je bila ispunjena gustom tvari. U otopini etanola pojavljivala su se središta guste tvari koja čini citoplazmu i prozirni deformirani pseudopodiji.

RASPRAVA

Promatranjem vrste *Arcella vulgaris* u svim otopinama nisu uočena značajna gibanja dok *Amoeba proteus* pokazuje bitne razlike u brzini gibanja u različitim otopinama i njihovim različitim koncentracijama (slika 3). Naša pretpostavka da će glicerol i etanol djelovati kao kemoatraktanti potvrđena je za glicerol mjerenjima u svim otopinama glicerola. Brzina organizama je smanjena u odnosu na onu u kontrolnoj otopini što ukazuje na težnju organizma da se zadrži u povoljnom mediju. Dobiveni rezultati, u usporedbi s istraživanjima Ueda i sur. (1976) koji pronalaze kemorepelentno djelovanje alkohola na *Plasmodium polycephalum* i Takiguchi i sur. (2002) koji ne pronalaze nikakav učinak fenola na *Paramecium caudatum*, ukazuju na različito ponašanje različitih praživotinja u mediju u kojem je prisutan alkohol kao i na razlike koje su uvjetovane različitim vrstama alkohola.

Glicerol je, kako je pretpostavljeno, izazvao veći pad brzine u odnosu na kontrolnu skupinu nego etanol u jednakim koncentracijama. U 0.05 M otopinama brzina u glicerolu četiri je puta od manja od one izmjerene u etanolu (slika 3). Vrijednosti brzina u otopinama 0.1 M ne razlikuju se bitno jer se približavaju minimalnoj brzini. Moguća objašnjenja su da je glicerol tvar koja je produkt razgradnje



lipida - izvora hrane dok etanol u prirodnom mediju nastaje kao rezultat alkoholnog vrenja u anaerobnim uvjetima. Istraživanje provedeno od strane Takiguchi i sur. (2002) ukazuje na to da kemokinezu izazivaju određene strukturne komponente u spojevima, a ne isključivo jedan spoj. Kemokineza kao reakcija na prisutnost alkohola u mediju reakcija je na prisutnost -OH skupina (glicerol kao trovalentni alkohol posjeduje tri -OH skupine).

U djelovanju glicerola i etanola prisutna je donja granica brzine oko 0.2 pixela/s što sugerira da mehanizmi koji su uzrokovali promjenu imaju gornju granicu aktivacije (npr. zasićenost receptora ili blokiranje tvari koje potiču gibanje i sl.).

Protivno našim očekivanjima, otopina etanola koncentracije 0.05 M je povećala brzinu organizama u odnosu na kontrolnu skupinu, no u toj je otopini ukupno vrijeme promatranja organizama bilo nešto manje nego prosječno (30 min u odnosu na prosječnih 50 min) što je moglo izazvati odstupanja. Moguće je da etanol zaista izaziva povećanje brzine pri manjim koncentracijama i tako djeluje kao kemorepelent što je pronađeno u ispitivanju kemotaksija u *Physarum polycephalum* (Ueda i sur, 1976).

Uočeno je izrazito brzo postizanje donje granice brzine *A. proteus* nakon koje nastupa prestanak kretanja (u etanolu se postiže pri 0.2 M, a u glicerolu već pri 0.05 M), što upućuje na veću osjetljivost organizama prema kemijskim tvarima od očekivane. Reakcije u otopinama koncentracija nižim od 10 mM su uočene i u istraživanju provedenom od strane Ueda i sur. (1976), što ukazuje na prilagodbu organizama većom osjetljivošću na kemijske tvari u njihovom prirodnom okolišu. Za kemotaksije koje proizlaze iz kemokineza nisu ključne samo visoke koncentracije kemoatraktanata na okupljalištima protozoa (mulj, trula organska tvar) već i detekcija organizama u njihovoj neposrednoj blizini koji proizvode samo manje koncentracije ovakvih tvari.

Podatci o smjeru gibanja nisu dostupni za sve otopine zbog poteškoća u mjerenju pri nižim brzinama (pri niskim brzinama mala pogreška u očitavanju položaja izaziva preveliku pogrešku u izračunu smjera kretanja). Iz očitanih podataka uočava se da organizmi ne preferiraju niti jedan smjer. Aritmetička sredina smjerova približna je nuli, makar se u pojedinim otopinama javljaju odstupanja, koja ne pokazuju nikakva zajednička obilježja (sam njihov prosjek daje vrijednost približnu nuli). Promjena u smjeru gibanja pokazuje jednako svojstvo, no jako je malo raspršena (standardna devijacija = 0.02). Promjena smjera u otopinama pokazuje izraženije ekstreme nego u kontrolnoj skupini.

Mjera NGDR, iako se u svojim srednjim vrijednostima priklanjala očekivanjima, imala je značajna odstupanja. Dok je u kontrolnoj skupini standardna devijacija iznosila 0.02, u otopinama čak i pri najnižim korištenim koncentracijama iznosila oko 0.2 ili više, te su vrijednosti nerijetko dostizale maksimalne. Ova varijacije nije imala nikakvu očitu poveznicu sa smjerom gibanja niti s vremenom snimanja. NGDR ima gotovo maksimalnu moguću vrijednost u kontrolnoj skupini i 0.1 M otopini glicerola, što ukazuje na minimalnu lokaliziranost. Najviše prosječne i medijalne vrijednosti NGDR-a uz kontrolnu otopinu pokazuje i 0.05 M otopina etanola.

Otopina natrijeva klorida i više koncentracije etanola nakon nekoga vremena (približno 5 min za 0.2 M otopinu natrijeva klorida i 60 min za 0.2 M etanol) počele su izazivati "skupljanje" organizama. Učinak na stanicu bio je različite prirode. U etanolu su se pojavljivala središta guste tvari koja čini citoplazmu,



ali i prozirni deformirani pseudopodiji, dok se u otopini natrijevog klorida pseudopodiji nisu formirali, čitava citoplazma je bila ispunjena gustom tvari. Ponašanje organizama u otopini natrijevog klorida vjerojatno je posljedica prelaska u stadij čahure koji je prirodni mehanizam kojim amebe preživljavaju nepovoljne uvjete (sušna razdoblja). Navedeno upućuje na razliku djelovanja između natrijevog klorida i etanola. Ovu razliku ne uzrokuje samo osmotski tlak. Začahurivanje se događa u NaCl 0.05 M, ali ne i u etanolu 0.1 M, iako su vrijednosti osmotskog tlaka u tim otopinama jednake. S obzirom na deformirane pseudopodije i promijenjen izgled citoplazme vjerojatno se radi o prodoru etanola kao organskog otapala u stanicu koji dovodi do poremećaja, dok natrijev klorid izaziva dehidraciju organizma. Štetno djelovanje etanola na stanice amebe može se povezati i s djelovanjem istog na stanice ljudske jetre.

Mjerenja koja su izvršena na vrsti *Arcella vulgaris* zbog minimalnih gibanja nisu bila dostatna za kvalitetnu usporedbu. Kao i *A. proteus*, *A. vulgaris* najveće brzine postiže u 0.05 M otopini etanola no te su vrijednosti znatno niže u usporedbi s *A. proteus*. *Arcella vulgaris* posjeduje hitinsku ljušturicu kroz koju izlazi jedan središnji pseudopodij nedostatan za postizanje većih brzina. Hitinska ljušturica smanjuje utjecaj otopine na membranu i osjetljivost na kemijske podražaje što rezultira minimalnim gibanjima ili izostankom gibanja u ostalim otopinama.

Nedostatak ovog istraživanja je relativno mali broj organizama kojima smo raspolagali i nemogućnost ponavljanja mjerenja u pojedinim otopinama. Intervali u kojima su detektirani organizmi u vidnom polju bili su donekle nepredvidivi što je moglo uzrokovati neujednačenost u dobivenim podacima za neke otopine. Sama mjerenja vršena su kroz duži vremenski period što se moglo odraziti i na promjene u kulturi organizama.

Primjena istraživanja u smislu razlikovanja vrsta sličnog izgleda zahtijevala bi usporedbe organizama koje npr. pripadaju istom rodu i ne razlikuju se s obzirom na prisutnost ovojnice kao *A. proteus* i *A. vulgaris*. Primjena u detekciji ispitivanih kemikalija i njihovom udjelu u analizi uzorkovane vode dodavanjem vrste *A. proteus* iz kulture svakako je moguća jer je ovaj organizam pokazao specifičnost u ponašanju u različitim otopinama.

ZAKLJUČCI

Na osnovu provedenog istraživanja doneseni su slijedeći zaključci:

- ✔ Glicerol i etanol u otopinama smanjuju brzinu organizama.
- ✔ Izlaganje vrste *Amoeba proteus* otopinama kuhinjske soli u koncentracijama većim od 0.05 M izaziva prekid gibanja i stiskanje (začahurivanje) amebe.
- ✔ Vrsta *Arcella vulgaris* ne pokazuje uočljiva gibanja.
- ✔ Duže izlaganje etanolu izaziva prekid gibanja i stiskanje amebe.
- ✔ Stiskanje ameba uzrokovano natrijevim kloridom i etanolom kvalitativno je različito.
- ✔ Postoji minimalna brzina *A. proteus* koju mogu uzrokovati otopine etanola ili glicerola bez izazivanja stiskanja organizma.
- ✔ U glicerolu i etanolu se organizmi u konačnici manje pomiču od početnoga položaja.
- ✔ Promjene u brzini, uzrokovane promjenom koncentracija kemikalija su oštre.
- ✔ Nijedan smjer se ne preferira drugim.
- ✔ Promjene u smjeru osciliraju naprijed-nazad i naizgled su nespecifično povezane s NGDR-om.



LITERATURA

- Matoničkin I., Habdija I., Primc-Habdija B., Mrkša N. 1998. Beskralješnjaci: biologija nižih avvertebrata. Školska knjiga, Zagreb, str.133.
- Strom S. L., Wolfe G. V., Bright K. J. 2007. Responses of marine planktonic protists to amino acids: feeding inhibition and swimming behavior in the ciliate *Favella* sp. *Aquatic microbial ecology* 47: 107-121.
- Takiguchi N., Tajima T., Asayama K., Ikeda T., Kuroda A., Kato J., Ohtake H. 2002. Behavioral responses of the ciliated protozoan *Paramecium caudatum* to 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and its analogues. *Journal of bioscience and bioengineering* 93: 416-420.
- Ueda T., Muratsugu M., Kurihara K., Kobatake Y. 1976. Chemotaxis in *Physarum polycephalum*: Effects of chemicals on isometric tension of the plasmodial strand in relation to chemotactic movement. *Experimental cell research* 100: 337-344.

UTJECAJ FOLIJARNE GNOJIDBE DUŠIKOM NA PRINOS I KVALITETU BRGUJSKOG KUPUSA (*BRASSICA OLERACEA* L. VAR. *CAPITATA*)

Kijara Pauletić, 3. razred
Valentina Puškadija, 3. razred

Srednja Škola Mate Balote, Poreč
Mentor: Marija Žužić

SAŽETAK

Brgujski kupus autohtona je istarska vrsta sa područja općine Matulj, točnije Velikog i Malog Brguda. Zbog važnosti očuvanja tradicijskih kultivara tj. njihovog genetskog bogatstva vrste, zbog važnosti konzumiranja kvalitetnih namirnica te zbog važnosti povećanja prinosa izabrana je za istraživanje ova povrtnica iz roda *Brassica*. Prekomjerno gnojenje klasičnim KAN gnojivom prouzrokuje ispiranje dušika u tlo i podzemne vode (krški reljef), što dovodi do povećane koncentracije nitrata u tlu i vodama, a indirektno i u ljudskom organizmu, što može biti štetno. Stoga se u istraživanju primijenila folijarna gnojidba 15%-tnom otopinom slobodnih aminokiselina. Takva vrsta gnojidbe ne zagađuje okoliš pa tako niti čovjeka. Tretirani uzorci uspoređivani su s kontrolnim uzorcima, koji su istovremeno špricani običnom vodom. Kod oba uzorka primijenjena je i standardna gnojidba KAN-om. Kupus je sađen u četiri reda sa po 15 jedinki (tretman i kontrola). Razmaci među jedinkama bili su različiti: 25 cm, 40 cm, 55 cm i 70 cm. Cilj ovog rada bio je ispitati koliko dodatna ishrana aminokiselinama preko listova (folijarna gnojidba) i različiti razmaci sadnje utječu na povećani rast brgujskog kupusa kao što su to već dokazali Šturm i sur. (2010) na bijelom kupusu (uz uvjet da se istovremeno koncentracija dušika u kupusu ne poveća iznad dozvoljene; Kolota i Chohura, 2015). Obavljene su dvije vrste mjerenja. U prvom mjerenju izmjerene su masa, visina i širina glavice te visina i širina kocena. Rezultati su pokazali da su vegetativni parametri tretiranih uzoraka veći, ali bez statističkog značaja. Također je primijećena razlika na različitim razmacima sadnje, ali se neočekivano srednji razmak od 40 cm pokazao kao najmanje prigodan za sadnju kupusa jer daje najmanji prinos. U ovom dijelu istraživanja hipoteza se nije pokazala točnom. Drugo mjerenje učinjeno je uz pomoć Yara N-testera koji mjeri količinu nitrarnog aniona u kupusu. Ovo mjerenje je potvrdilo hipotezu da se količina dušika povećala folijarnom gojidbom aminokiselinama, ali je povećanje bilo ispod granica štetnosti za čovjeka. Dakle, preporučujemo primjenjivanje dodatnog dušika folijarnom gnojidbom u obliku slobodnih aminokiselina s ciljem povećanja uroda, ali što je najvažnije očuvanje okoliša i time zaštite našega zdravlja. Također se preporuča folijarna gnojidba iz razloga što se dušik u obliku aminokiselina brže i lakše apsorbira u stanice listova za razliku od KAN-a preko korijena.

Ključne riječi: KAN gnojivo, nitrati, slobodne aminokiseline, Istra

UVOD

Svi se suočavamo sa problemima današnjice povezanim uz prehranu. U svoj organizam želimo unositi što zdravije namirnice provjerenog podrijetla i visoke kvalitete, a da nisu prošle sumnjive tretmane tijekom uzgoja. Također smo upoznati sa svjetskim problemom nedostatka i pronalazjenja načina da se proizvede što veća količina hrane. Zbog navedenog, odlučilo se dublje istražiti ovu tematiku, a posebno istražiti utječe li folijarna gnojidba na povećanje prinosa brgujskog kupusa, kako su to već znanstvenici i dokazali na bijelom kupusu (Šturm i sur, 2010).

Kupus, kao i sve ostale biljka iz roda *Brassica*, zeljasta je biljka sa cjelovitim listovima i cvatom na vrhu glavne osi. Cvijet ima dva kruga lapova i četiri latice te šest prašnika (dva kraća i četiri duža), a u sredini je plodnica građena od dva plodna lista iz koje se stvara plod komuška. Kupus potječe iz Sredozemlja, a uzgaja se već više od 2500 godina. Kao kultivirana vrsta, poznata je bila Grcima već u 4. stoljeću pr. Kr., a rimski ga pisci spominju od 3. stoljeća pr. Kr. nadalje. U srednju se Europu proširio od 8 do 15. stoljeća, a već su u 8. stoljeću bili poznati bijeli i crveni tipovi kupusa (Lešić i sur, 2002). Kako se sve više značaja pridaje lokalnim sortama, odnosno, tradicijskim kultivarima, istraživanje je postavljeno na jednom



tradicijom istarskom kultivaru kupusa – brgujskom kupusu. Brgujski kupus potječe sa područja Malog i Velikog Brguda, u Općini Matulji, po kojima je i dobio ime te se ondje i dalje tradicijski uzgaja kao domaći kupus. To je stara eko-populacija srednje ranog do kasnog kupusa koji se tradicijski uzgaja u Primorju i Istri. Brgujski kupus, po tipu je bijeli kupus sa antocijanskim obojenjem, koji mu daje karakteristično ljubičasto-zelenu boju. Vegetacijsko razdoblje brgujskog kupusa iznosi prosječno 90 dana. Biljka je do zadnjih uspravnih listova visoka prosječno oko 46 cm, glavice ukupnog promjera 68 cm, što uključuje i listove rozete, a prosječne težine glavice od 1,9 kg. Vanjska stabljika, prosječne je duljine od oko 12 cm.

U uzgoju kupusa, kao i svake druge biljke, bitno je osigurati kvalitetne uvjete za rast. Osim ekoloških čimbenika, bitnu ulogu odigrava ishrana bilja, tj. biljci dostupna hranjiva. Ovakvo istraživanje je važno jer se ne koncentrira samo na materijalnu dobit te količinu kupusa koja će se ostvariti, već se stavlja naglasak i na okoliš te kvalitetu finalnog proizvoda. Spoj tih segmenata daje cjelovitu sliku o ishrani bilja (Vukadinović i Vukadinović, 2011). Povrćarska je proizvodnja zahtjevnija od ostalih poljoprivrednih proizvodnja jer su za ostvarivanje visokih prinosa po jedinici površine potrebna 3 do 10 puta bogatija tla hranjivima u odnosu na ostale kulture (Lešić i sur, 2002).

Dušik je element koji pozitivno utječe na rast i razvoj biljaka, pa tako i na kupus. Značaj dušika za svaku biljku ogleda se u njegovim ulogama unutar samog organizma. Dušik je esencijalni biogeni element, kako za rast i razvoj biljaka, tako i za kvalitetu poljoprivrednih proizvoda. Zbog navedenog, njegov nedostatak dovodi do zakržljalog rasta same biljke, usporena je fotosinteza i smanjena količina proizvedene glukoze u biljci (Yasutaka Kano i sur, 2007). Biljke najviše usvajaju dušik u obliku amonijskog i nitratnog iona, te kao molekulu dušika. Zbog izrazito bitne funkcije u metabolizmu biljaka, u poljoprivrednoj se proizvodnji diljem svijeta koriste velike količine dušičnih gnojiva (Šturm i sur, 2010). Primjer takvog gnojiva je KAN, koji je korišten u ovom istraživanju, a poznat je kao dušično gnojivo za prihranu koje sadrži 46% dušika, od čega polovicu u amonijskom te polovicu u nitratnom obliku.

Međutim, ako količina primijenjenih gnojiva nadmašuje zahtjeve biljaka za dušikom, višak se gnojiva najčešće u obliku nitrata ispire u tlo i podzemne vode. Sve to može dovesti do rizika za okoliš i zdravlje ljudi zbog potencijalnog prisustva nitrata u pitkoj vodi. Isto tako, prekomjerna gnojidba može podići količinu nitrata u samom jestivom dijelu biljke (Balik i sur, 2003). Prevelika konzumacija dušika najviše šteti djeci i trudnicama, posebno osjetljivim skupinama koje moraju posebno paziti da ne premašuju dnevnu dozu od 3,65 mg dušika po kg tjelesne mase. Kako je baš kupus jedna od najznačajnijih poljoprivrednih kultura u ljudskoj prehrani, posebice u Hrvatskoj, uzgaja se diljem Hrvatske, što često dovodi do toga da se uzgaja na krškim terenima gdje su prisutne podzemne vode. Stoga je rizik od zagađenja nitratima još veći. Zbog mogućih negativnih posljedica standardne gnojidbe KAN-om važno je istražiti učinak folijarne gnojidbe aminokiselinama, kao i ispitati povećava li takva vrsta gnojidbe prinos brgujskog kupusa.

Ciljevi istraživanja:

- ☛ Ispitati hoće li primjena aminokiselina, kao dušičnog oblika koji se može aplicirati putem lišća pozitivno utjecati na vegetativne parametre i prinos kupusa.
- ☛ Ispitati djelovanje folijarne gnojidbe pri različitim razmacima sadnje kupusa.



- Ispitati koncentraciju ukupnog dušika u tretiranom kupusu.

Hipoteza:

- Primjena dušičnog gnojiva u obliku aminokiselina preko listova kupusa povećat će vegetativne parametre kao i prinos brgujskog kupusa.
- Razmak između jedinki kupusa utjecat će na vegetativne parametre na način da se prinos povećava povećanjem razmaka među jedinkama.
- Folijarna gnojidba aminokiselinama povećat će koncentraciju ukupnog dušika u kupusu, ali ne iznad dozvoljene granice.

METODE RADA

Pokus je postavljen i odrađen na imanju poljoprivredne škole (slika 1). Sadnja sadnica kupusa obavljena je 27.7., a berba 1.12.



Slika 1 Pokusni nasad brgujskog kupusa pokraj SŠ 'Mate Balota' Poreč

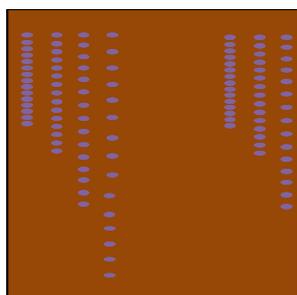
Posađene su dvije površine po 4 reda kupusa s 15 glavica. Ukupno je tretirano 60 glavica kupusa kontrolom i 60 glavica AMINO-gnojibom (slika 2). Jedna je površina bila kontrola, a druga je tretirana AMINO gnojibom.

KONTROLA: gnojidba KAN-om kroz tlo, u količini od 10 g po m² te tretiranje listova čistom vodom;

AMINO-gnojidba: KAN-om kroz tlo, u količini od 10 g po m² te gnojidba kroz list dušikom u obliku 15 % otopine slobodnih aminokiselina -'DRIN' (slika 3) do ocjeđivanja.

Brgujski kupus je na obje površine (kontrola i AMINO-tretman) posađen u četiri različita razmaka:

- 1) razmakom od 25 cm;
- 2) razmakom od 40 cm;
- 3) razmakom od 55 cm ;
- 4) razmakom od 70 cm.



Slika 2 Shema zasađenih jedinki kupusa za tretiranje kontrolom i AMINO-gnojibom pri različitim razmacima



Slika 3 Korištena gnojiva u pokusu na brgujskom kupusu

Listovi su špricani AMINO-tretmanom do ocjeđivanja u tri navrata:

- 1) 15.8.2016. 2) 1.9.2016. 3) 15.9.2016.

U isto vrijeme kontrolni uzorak je šprican čistom vodom.

Nakon berbe kupusa, iz svakog je reda (kontrola i AMINO-gnojidba) nasumično ubrano 10 glavica kupusa i izmjereni su sljedeći parametri (slika 4):

- 1) Masa glavice 3) Širina glavice 5) Širina kocena
2) Visina glavice 4) Visina kocena

Mjerenje parametara

Nakon berbe kupusa izmjerena je masa, visina i širina glavice te visina i širina kocena. Mjerenje je obavljeno pomoću ravnala i precizne digitalne pomične mjerke. Ravnalo je korišteno za mjerenje glavice, a pomična mjerka za mjerenje kocena.



Slika 4 Mjerenje vegetativnih parametara brgujskog kupusa

Određivanje nitrata u listovima brgujskog kupusa

Određivanje nitrata u listovima brgujskog kupusa provedeno je korištenjem LAQUA Nitrate NO₃-kita tj. Yara N-testom. Tekućina ispuštena gnječenjem lista kupusa ulivena je na senzor kite za određivanje nitrata.

Analiza podataka

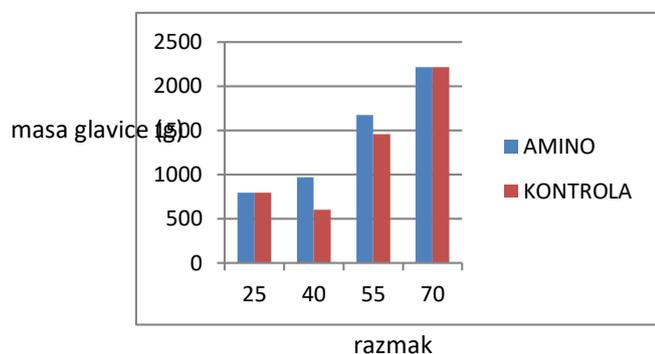
Dobiveni rezultati po pitanju prinosa, vegetativnih parametara i količini nitrata analizirani su računanjem srednjih vrijednosti po pojedinom tretmanu i razmaku sadnje te uspoređivani izračunom standardne greške. Osim Microsoft Excella, korišten je i XLSTAT dodatak za Excell. Rezultati se prikazuju grafički kako slijedi.

REZULTATI

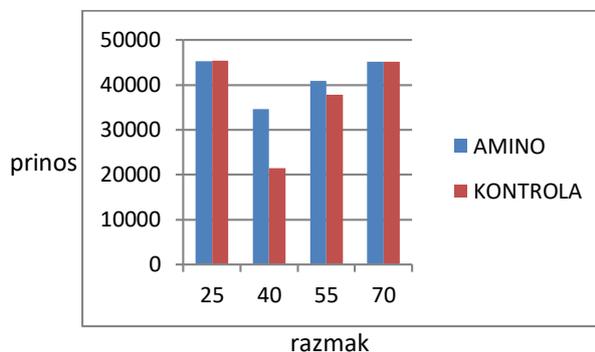
Masa, prinos i vegetativni parametri glavice kupusa u kontroli i AMINO-tretmanu pri različitim razmacima

Iz slike 5 vidi se djelovanje AMINO-tretmana na povećanje glavica kupusa kod razmaka od 40 cm i 55 cm. Kod razmaka od 25 cm i 70 cm nema utjecaja. Iz slike 6 vidi se razlika u prinosu kod razmaka od 40

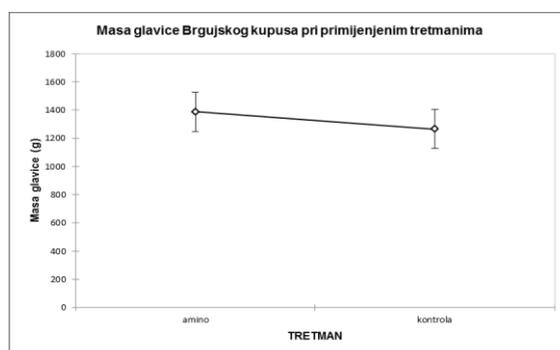
cm i 55 cm, dok je za razmace od 25 cm i 70 cm prinos isti. Iz slike 7 je vidljivo da je veća prosječna masa glavice utvrđena pri primjeni AMINO-tretmana (oko 1400 g) u odnosu na KONTROLU (oko 1300 g). Međutim, stupci pogreške koji predstavljaju standardnu pogrešku ukazuju da ta razlika nije statistički značajna.



Slika 5 Masa brgujskog kupusa pri različitim razmacima sadnje

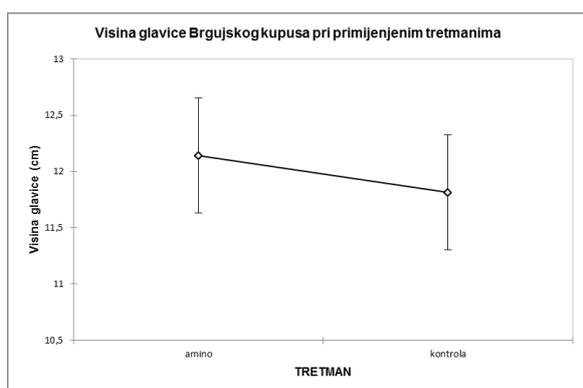


Slika 6 Prinos brgujskog kupusa pri različitim razmacima sadnje

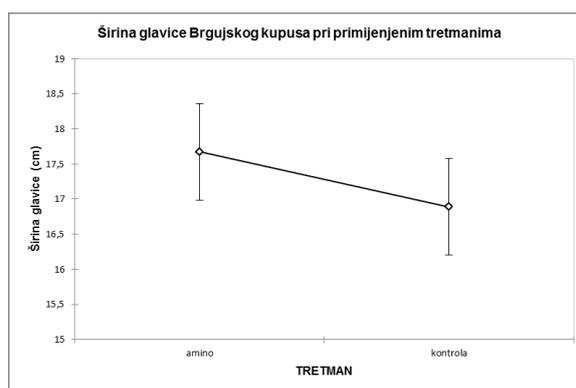


Slika 7 Masa glavice brgujskog kupusa pri primijenjenim tretmanima

Iz slike 8 je opet vidljivo da je veća prosječna visina glavice utvrđena pri primjeni AMINO-tretmana (oko 12,2 cm) u odnosu na KONTROLU (oko 11,9 cm). Međutim, stupci pogreške koji predstavljaju standardnu pogrešku ukazuju da ta razlika nije statistički značajna. I za širinu glavice brgujskog kupusa iz slike 9 je opet vidljivo da je veća prosječna širina glavice utvrđena pri primjeni AMINO-tretmana (oko 17,8 cm) u odnosu na KONTROLU (oko 17 cm). Međutim, stupci pogreške koji predstavljaju standardnu pogrešku ukazuju da ta razlika nije statistički značajna.



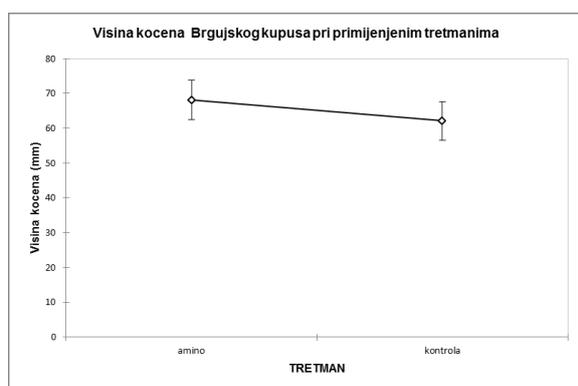
Slika 8 Visina glavice brgujskog kupusa pri primijenjenim tretmanima



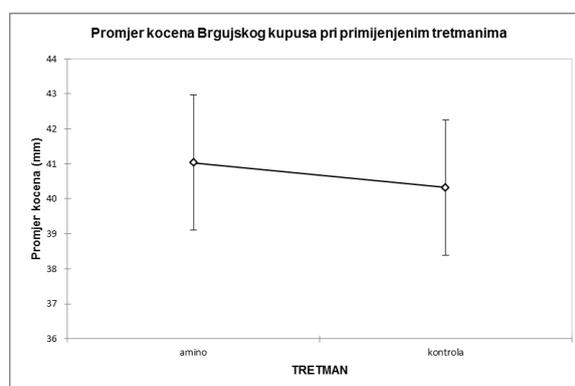
Slika 9 Širina glavice brgujskog kupusa pri primijenjenim tretmanima

Iz slike 10 je vidljivo da je veća prosječna visina kocena utvrđena pri primjeni AMINO-tretmana (oko 70 mm) u odnosu na KONTROLU (oko 65 mm). Međutim, stupci pogreške koji predstavljaju standardnu pogrešku ukazuju da ta razlika nije statistički značajna.

Slika 11 prikazuje prosječne vrijednosti promjera kocena te je vidljivo da je pri primjeni AMINO-tretmana promjer kocena nešto veći (oko 41,5 mm) u odnosu na KONTROLU (oko 40,8 mm). Međutim, stupci pogreške koji predstavljaju standardnu pogrešku ukazuju da ta razlika nije statistički značajna.

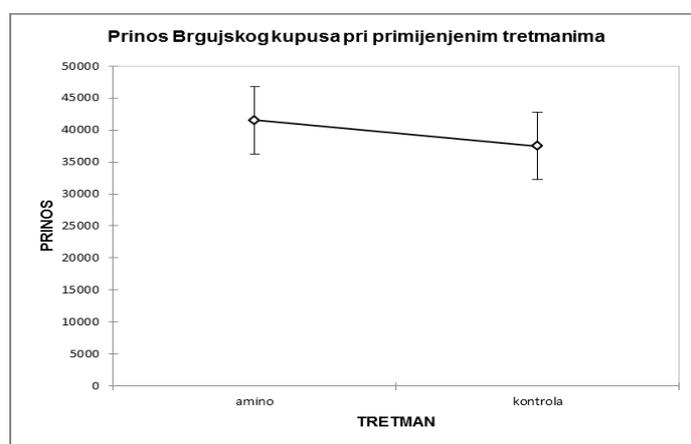


Slika 10 Visina kocena brgujskog kupusa pri primijenjenim tretmanima



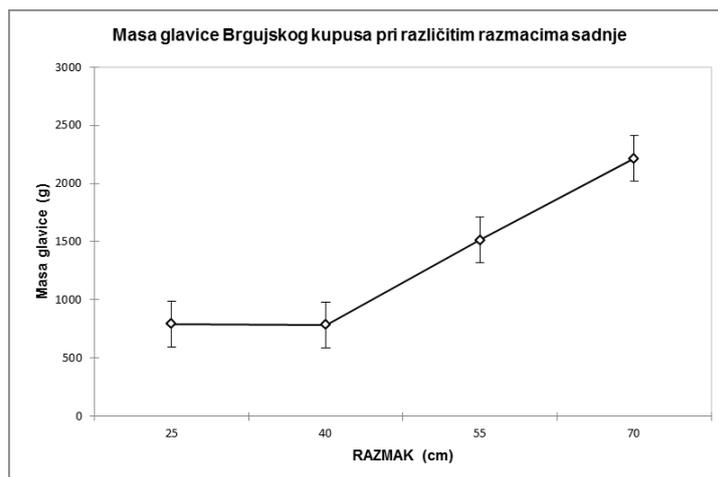
Slika 11 Promjer kocena brgujskog kupusa pri primijenjenim tretmanima

Slika 12 prikazuje prosječne vrijednosti prinosa, jednog od najbitnijih parametara u bilo kojoj poljoprivrednoj proizvodnji. Prinos glavica brgujskog kupusa pri primjeni AMINO-tretmana je veći (oko 43 tone) u odnosu na KONTROLU (oko 36 tona). Međutim, stupci pogreške koji predstavljaju standardnu pogrešku ukazuju da ta razlika nije statistički značajna.



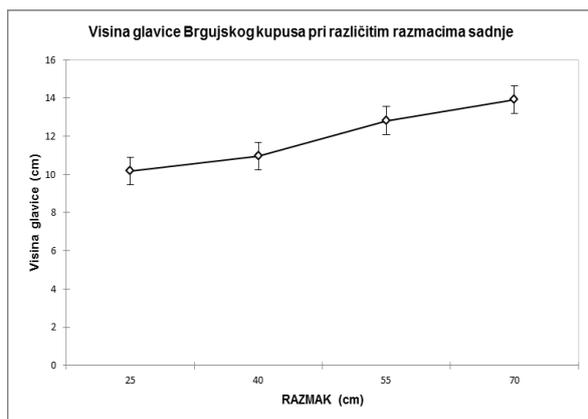
Slika 12 Prinos brgujskog kupusa pri primijenjenim tretmanima

Slika 13 prikazuje prosječne vrijednosti mase glavica brgujskog kupusa pri primjeni AMINO-tretmana na različitim razmacima sadnje. Vidljivo je da se masa glavice značajno ne razlikuje pri razmacima 25 i 40 cm, ali je masa glavice statistički značajno veća pri razmaku 55 cm te najveća pri razmaku 70 cm (oko 2200 g).

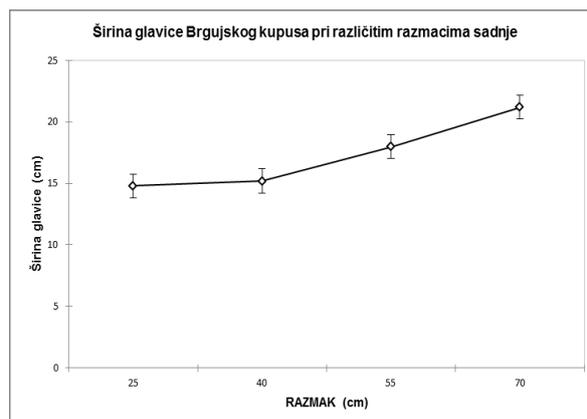


Slika 13 Masa glavice brgujskog kupusa pri primijenjenom AMINO tretmanu i razmacima sadnje

Slika 14 prikazuje prosječne vrijednosti visine glavica brgujskog kupusa pri primjeni AMINO tretmana na različitim razmacima sadnje. Vidljivo je da se visina glavice značajno ne razlikuje pri razmacima 25 i 40 cm, ali je visina glavice statistički značajno veća pri razmacima 55 cm i 70 cm (oko 13, odnosno 14 cm), koji se međusobno ne razlikuju značajno. Slika 15 prikazuje prosječne vrijednosti širine glavica brgujskog kupusa pri primjeni AMINO tretmana na različitim razmacima sadnje. Vidljivo je da se širina glavice značajno ne razlikuje pri razmacima 25 i 40 cm, ali je širina glavice statistički značajno veća pri razmaku 55 cm te najveća pri razmaku 70 cm (oko 22 cm).

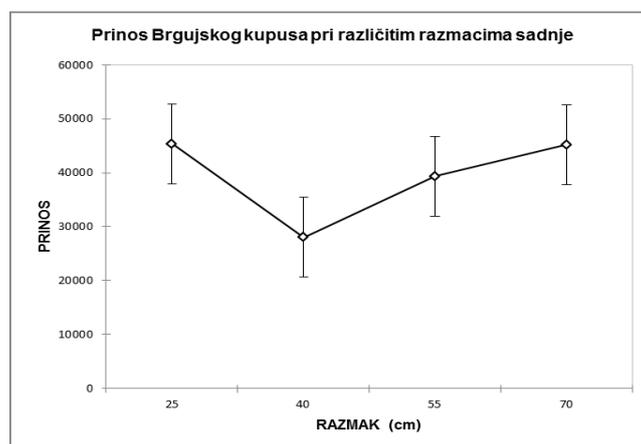


Slika 14 Visina glavice Brgujskog kupusa pri primijenjenom AMINO tretmanu i razmacima sadnje



Slika 15 Širina glavice brgujskog kupusa pri primijenjenom AMINO tretmanu i razmacima sadnje

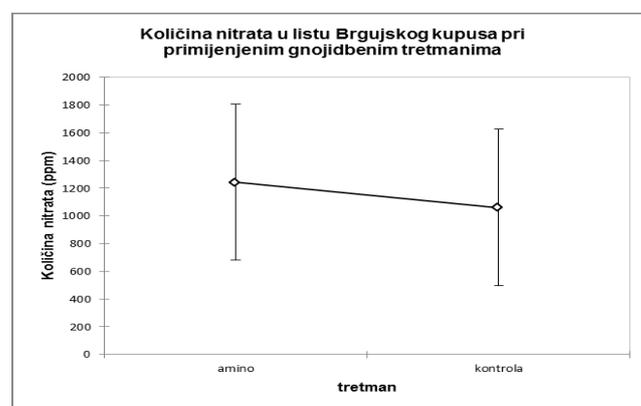
Slika 16 prikazuje prosječne vrijednosti prinosa glavica brgujskog kupusa pri različitim razmacima sadnje. Pri primjeni AMINO tretmana prinos je najveći na razmacima od 25 i 70 cm. Dobiveni prinosi se statistički ne razlikuju, osim prinosa pri razmaku od 40 cm, koji je značajno manji od onog pri 25 cm.



Slika 16 Prinos brgujskog kupusa pri primijenjenom AMINO tretmanu i razmacima sadnje

Količina nitrata u listu brgujskog kupusa

Slika 17 prikazuje prosječne vrijednosti količine nitrata u listu brgujskog kupusa pri primjeni gnojidbenih tretmana. Primjena AMINO gnojidbenog tretmana malo je povećala količinu nitrata u brgujskom kupusu, ali to povećanje nije statistički značajno. Izmjerene su vrijednosti ispod pragova koji predstavljaju rizik za ljudsko zdravlje.



Slika 17 Količina nitrata u listu brgujskog kupusa pri primijenjenim gnojidbenim tretmanima

RASPRAVA

Istraživanja drugih znanstvenika pokazala su da je gnojenje dušikom putem lista bolje od gnojidbe putem tla zbog malog ispiranja spojeva u tlo i zbog većih prinosa koji povećavaju ekonomsku dobit (Šturm i sur, 2010). U provedenom istraživanju utvrdilo se da primjena AMINO-tretmana (dušičnog gnojiva u obliku aminokiselina putem lista) u odnosu na kontrolni tretman utječe na povećanje svih istraživanih vegetacijskih parametara brgujskog kupusa te na prinos istog. AMINO-tretman je utjecao na povećanje prosječne masa tretiranih glavica kupusa i to najviše na razmacima od 40 i 55 cm dok kod razmaka od 25 i 70 cm nije bilo utjecaja. Stoga se može zaključiti da je najbolji utjecaj AMINO-tretmana na rast kupusa pri razmacima od 40 i 55 cm. Što se tiče ukupnog prinosa glavice kupusa (kg/ha), najveća razlika u prinosu između kontrole i tretiranih uzoraka je također na razmacima od 40 i 55 cm. Prosječna masa glavice tretirane AMINO-tretmanom veća je za otprilike 100 g u odnosu na kontrolu. Visina tretirane glavice je također veća za 3 mm. Širine glavica razlikuju se od oko 8 mm u korist AMINO-tretmana. Razlika u visina kocena je oko 5 mm, a razlika u promjeru kocena je 7 mm. Što se tiče prinosa,



ako bi se istraživanje prevelo na veće površine (hektari), postojala bi razlika u prinosu između AMINO-tretmana i kontrole od oko 7 tona kupusa što je najveći pokazatelj ovog istraživanja koliko folijarna gnojidba pozitivno utječe na prinos.

S obzirom na razmake sadnje, masa glavice je jednaka pri razmacima 25 i 40 cm, a naglo raste pri razmacima od 55 i 70 cm). Visina i širina glavice raste porastom razmaka za nekoliko centimetara u prosjeku. Pri primjeni-AMINO tretmana, ukupan prinos pri razmacima od 25 i 70 cm je isti, ali je značajno manji pri razmaku od 40 cm iz razloga što se razmak između glavica povećao (u odnosu na 25 cm), ali su parametri glavica tj. njihove veličine ostale iste. Kod proizvodnje kupusa proizvođač mora sam odlučiti želi li dobiti veći broj manjih glavica i tada će saditi na razmaku od 25 cm ili želi dobiti manji broj većih glavica i tada će saditi na razmaku od 70 cm.

Po pitanju količine nitrata u listovima primjena AMINO tretmana malo je povećala količinu nitrata, ali to povećanje nije statistički značajno i ne predstavlja rizik za ljudsko zdravlje. U učinjenom mjerenju Yara N-testom u tretiranim listovima pronađena je količina od 1300 ppm, a znanstvenici (Kolota i Chochura, 2015.) dobili su vrijednosti od 1000 do 1400 ppm i protumačili je kao ne štetnu za ljudsko zdravlje. Tako pronađena vrijednost od 1300 ppm ne predstavlja opasnost za čovjeka.

ZAKLJUČCI

Istraživanjem su djelomično potvrđene hipoteze postavljene na početku istraživanja. Primjena dušičnog gnojiva u obliku aminokiselina preko listova kupusa povećala je vegetativne parametre kao i prinos brgujskog kupusa što je potvrdilo našu hipotezu. Razmak između jedinki kupusa tretiranih folijarnom gnojibom pokazuje da je prinos kod svih razmaka približno jednak osim pri razmaku od 40 cm jer se razmak između glavica povećao, a veličina glavica je ostala ista. Po pitanju odnosa između razmaka i prinosa naša hipoteza nije bila točna. Folijarna gnojidba aminokiselinama očekivano je povećala koncentraciju ukupnog dušika u kupusu, ali ne u koncentracijama koje predstavljaju opasnost za čovjeka. Gledajući s ekološke strane, folijarna gnojidba aminokiselinama neće zagađivati pitku vodu ispiranjem u tlo. Isto tako povećala se prosječna količina nitrata u listu brgujskog kupusa pri primjeni AMINO-tretmana, ali povećanje nije prešlo dopuštene granice koje predstavljaju rizik za ljudsko zdravlje, osim za djecu. Kako bi ovo istraživanje bilo potpunije moglo bi se provesti na više vrsta biljaka, dakle ne samo na kupusu već i na drugim lisnatim biljkama (blitva, špinat, salata i dr.). Također bi se moglo izvršiti istraživanje samo folijarnom gnojibom bez KAN-a, kako bi se utvrdila mogućnost zamjene KAN-a aminokiselinama zbog minimalnog zagađenja okoliša.

LITERATURA

- Kolota E., Chohura P. 2015. Control of head size and nutritional value of cabbage by plant population and nitrogen fertilization. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* 14: 75-85.
- Lešić R., Borošić J., Buturac I., Herak-Čustić M., Poljak M., Romić D. 2004. *Povrčarstvo. II dopunjeno izdanje.* Agronomski fakultet, Zrinski d.d., Čakovec.
- Šturm M., Kacijan- Maršić N., Zupanc V., Bračić-Železnik B., Lojen S., Pintar M.. 2010. Effect of different fertilisation and irrigation practices on yield, nitrogen uptake and fertiliser use efficiency of white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.). *Scientia Horticulturae* 125: 103–109.
- Vukadinović V., Vukadinović V. 2011. *Ishrana bilja - III.* Izdanje, Osijek.
- Zebarth B. J., Freyman S., Kowalwnko C. G. 1991. Influence od nitrogenfertilization on cabbage yield, head nitrogen content and extractable soil in organic nitrogen at harvest. *Canadian Journal of Plant Science* 71: 1275-1280.
- Kano Y., Nakagawa H., Sekine M., Goto H., Sugiura A. 2007. Effect of nitrogen fertilizer on cell size and sugar accumulation in the leaves of cabbage. *Hort Science* 42: 1490-1492.

PLUTAJUĆI MIKROFITI KAO BIOINDIKATORI OTPADNIH VODA

Angela Jajčević, 3. razred

Medicinska škola Karlovac, Karlovac

Mentor: Sanja Penić

SAŽETAK

Ovaj rad rezultat je istraživanja na području fitoremedijacije. Fitoremedijacija je ekološki prihvatljiva tehnologija pri kojoj se biljke koriste za razgradnju, asimilaciju, metabolizam ili detoksikaciju najraznovrsnijih onečišćivača iz vode, tla i sedimenta. Biljka korištena u ovom istraživanju je plutajuća jednosupnica vodena leća (*Lemna minor*, L.). Razvojem sirarstva na području Karlovačke županije javio se problem zbrinjavanja otpadnih voda mini-sirana pa je fitoremedijacijski potencijal leće ispitan u otopini sirutke. Nakon neuspjelog pokušaja uzgoja vodene leće u čistoj sirutki, traženo je optimalno razrjeđenje sirutke u vodi. U daljnjem istraživanju korišteno je najpovoljnije razrjeđenje za rast i razmnožavanje vodene leće te su praćeni biološki (izgled biljke i duljina korijena, prirast broja biljaka, prirast mase svježe tvari) i fizikalno-kemijski parametri (pH, vodljivost i temperatura otopine, kemijska potrošnja kisika). Dobiveni rezultati mogu poslužiti kao temelj za nastavak istraživanja fitoremedijacijskog potencijala vodene leće koja se koristi u standardiziranom protokolu ISO/DIS 20079 (2004) za ispitivanje ekotoksikološkog stanja slatkovodnih voda i koja posjeduje mnoga pozitivna svojstva kao što je sposobnost apsorpcije velike količine otopljenih hranjivih tvari (nitrata, fosfata, kalcija, natrija, itd.) iz vode u vrlo kratkom vremenskom intervalu te značajno reduciranje suspendirane krutine u vodi, biokemijsku potrošnju kisika (BPK) i kemijsku potrošnju kisika (KPK).

Ključne riječi: biološki parametri, fitoremedijacija, fizikalno-kemijski parametri, sirutka, vodena leća

UVOD

Sirutka

Sirutka je nusprodukt proizvodnje sira čiji kemijski sastav ovisi o tehnologiji proizvodnje sira i kakvoći mlijeka. Pri proizvodnji sira od ukupne količine mlijeka 10 % čini sir, a ostatak je sirutka. To je tekućina zeleno-žute boje koja se sastoji od 93 % vode i 7 % suhe tvari. Ovisno o primijenjenoj tehnologiji sirutka može imati različit pH (kisela ili slatka sirutka) te nositi različito organsko opterećenje (primarna ili sekundarna sirutka). Slatka nastaje pri proizvodnji tvrdih sireva, njen pH iznosi od 5,8 do 6,6, a kisela nastaje pri proizvodnji svježih sireva i nižeg je pH. Najvrjednije komponente sirutke su bjelančevine koje sadrže sve esencijalne aminokiseline, masti, mineralne tvari i vitamini (posebno vitamini topivi u vodi). Sirutka kojoj je uklonjena voda (tzv. suha sirutka) je puno dugotrajnija, jer je u njoj onemogućen rast mikroorganizama, ali zahtijeva postrojenje za sušenje. Sirutka se može upotrebljavati za pripremu probiotičkih fermentiranih napitaka (dobar primjer je Finska s fermentiranim napitkom „Gefilus“), u pripremi hrane za dojenčad, za povećanje nutritivne vrijednosti brojnih mliječnih proizvoda, u farmaceutskoj industriji, pa čak i za proizvodnju alkoholnih pića poput sirutkinog piva i vina. Njenu vrijednost kao napitka ističe još Hipokrat (460. god. pr. Kr.) kao lijek za brojne bolesti ili smetnje. U našim domaćinstvima koristi se uglavnom kod hranidbe stoke (Ignjatović, 2016).

Plutajući mikrofiti

Biljke iz porodice sočivica (Lemnaceae), kojoj pripada i vodena leća, već se duže vrijeme koriste u biljnoj fiziologiji i fitokemiji za određivanje biološke aktivnosti različitih tvari i u toksikologiji za procjenu toksičnosti kemikalija (Hillman, 1961). Većina biljaka iz ove porodice ima sposobnost akumulacije teških metala, fenola, herbicida i surfaktanata, tj. fitoremedijacije. Tvari čiji učinak se želi istražiti dodaju se na hranjivu podlogu te se na temelju rasta i razvoja biljaka određuje učinak te tvari na biljku. Najčešće se mjeri količina kisika proizvedenog fotosintezom, količina fotosintetskih pigmenta, prirast



biomase, rast i razvoj, duljina korijena, aktivnost enzima (Lewis, 1995). Porodica Lemnaceae obuhvaća četiri roda: *Lemna*, *Spirodela*, *Wolffia* i *Wolffiella*. Svi navedeni rodovi su pogodni za uzgoj u laboratoriju, jer su malih dimenzija, vide se golim okom, jednostavne su građe, ne zahtijevaju puno prostora za uzgoj, razmnožavaju se brzo i vegetativno što omogućuje genetičku jednakost. U ovom istraživanju korištena je vodena leća (*Lemna minor* L.). Vodena leća je svijetlo zelena, sitna biljka, pliva na vodi i ima mali korijen duljine 1-2 cm koji slobodno visi. Biljka rijetko cvjeta (svibanj i lipanj) neuglednim cvjetovima. Nalazi se u vodama stajačicama (barama, lokvama, ribnjacima). Razmnožava se vegetativno, vrlo rijetko sjemenom. Sadrži velik udio bjelančevina (38 %), masti i minerala pa je jestiva kao salata ili dodatak juhama (Grlić, 1990).

Prije dvije godine ispitivala sam sposobnost vodene leće kao pročišćivača vode koju smo onečistili jednim sastojkom deterdženta, linearnim alkilbenzen sulfonatom (LAS-om). Dokazali smo da je leća pročistila 40 % dodanog sastojka. Budući da se na Veleučilištu u Karlovcu u procesnom praktikumu mljekarstva proizvode različite vrste sireva, zanimalo me postoji li mogućnost uzgoja leće u sirutki. Zadnjih godina sirarstvo se značajno razvilo u našoj županiji, a sirutka se kao glavni nusprodukt ove proizvodnje uglavnom koristi za hranidbu stoke, tek manji postotak kao hranjivi napitak ili za proizvodnju ukusnog sira „skute“. To je sir vrlo nježne strukture i kratkog roka trajanja zbog čega se rijetko proizvodi jer nije popularan za konzumiranje i plasman na tržište. Na području naše županije djeluje 55 registriranih objekata za proizvodnju mlijeka i mljekarskih proizvoda (sir i vrhnje) te 11 malih proizvođača sira, kao i mljekara „Kim“ (Savjetodavna služba Karlovac, interni podaci). Od kada je „Kim – mljekara Karlovac“ u korporaciji s Lactalis grupom, bavi se isključivo preradom sirovog mlijeka što značajno smanjuje organsko opterećenje vode. Zbog velike količine organske tvari sirutka spada u otpadne vode. Prema zakonu o vodama (NN 153/09) dozvoljena količina organske tvari koja se ispušta u površinske i podzemne vode je 125 mg/l, a sirutka sadrži veću količinu organske tvari od propisane zakonom. Organske tvari mogu se ukloniti iz sirutke konvencionalnim metodama, ali za male sirare to predstavlja veliki materijalni trošak. Budući da nosi manje organsko opterećenje, u istraživanju smo koristili sekundarnu sirutku.

Odabrali smo vodenu leću zbog njene mnogostruke primjene, ali i podataka da u vrlo kratkom vremenskom intervalu (od 7 do 15 dana) može ukloniti više od 90 % organskog opterećenja. Naime, vodena leća se brzo širi po površini vode, te može potpuno zakloniti prodiranje svjetlosti i uzrokovati eutrofikaciju. Ovo svojstvo vodene leće koristi se u pozitivne svrhe, kod pročišćavanja otpadnih voda bogatih hranjivim tvarima. Vodena leća reducira i suspendiranu krutinu u vodi, biokemijsku potrošnju kisika (BPK) i kemijsku potrošnju kisika (KPK). Dokazalo se da velikom učinkovitošću smanjuje koncentraciju nitrata, fosfata i amonijaka u vodi. (Cindrić i Popović, 2016).

Stoga je cilj ovog istraživanja bio pronaći optimalne uvjete potrebne za uporabu *Lemna minor* L. za fitoremedijaciju otpadne vode iz sirane.

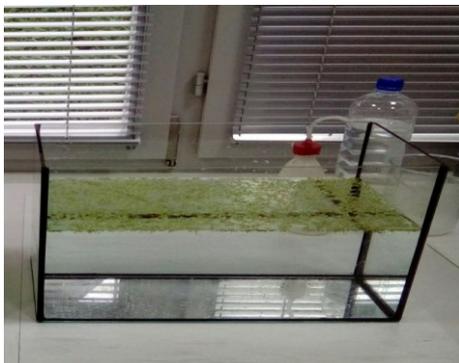
Na temelju dosadašnjih istraživanja o fitoremedijacijskoj sposobnosti biljaka iz porodice sočivica, postavila sam hipotezu:

Lemna minor L. će smanjiti organsko opterećenje koje nosi otpadna voda nastala u tijeku proizvodnje sira.

METODE RADA

Biljni materijal

Za ispitivanje sposobnosti fitoremedijacije otpadne vode nastale pri proizvodnji sira korištena je vodena leća (*Lemna minor* L.) uzgajana u laboratorijskim uvjetima u kabinetu naše škole od rujna 2016. godine (slika 1).



Slika 1 Vodena leća u kabinetu naše škole

Sirutka

Korištena je tzv. sekundarna sirutka dobivena pri proizvodnji sira škripavca iz procesnog praktikuma mljekarstva na Veleučilištu u Karlovcu (slika 2).



Slika 2 Procesni praktikum mljekarstva na Veleučilištu u Karlovcu

Istraživanje sam započela u rujnu, a završila u prosincu 2016. godine. Istraživanje smo podijelili u dvije faze. U prvom dijelu istraživanja pronašli smo optimalno razrjeđenje sirutke. Leća se nije održavala u čistoj sirutki. Već nakon dva dana su gotovo sve jedinice uginule. Stoga smo morali pronaći razrjeđenje u kojem je omogućen rast i razmnožavanje vodene leće. U drugom dijelu smo pratili biološke pokazatelje i mjerili fizikalno-kemijske parametre otopine sirutke s vodenom lećom. Zbog nedostatka kemijskog laboratorija u prostoru naše škole za istraživanje fizikalno-kemijskih parametara sirutke koristili smo prostor kemijskog laboratorija Veleučilišta u Karlovcu.

Određivanje fizikalno kemijskih parametara sirutke

Fizikalno-kemijski parametri mjereni su prema standardiziranim metodama međunarodne organizacije za normizaciju (ISO) (Kuleš i Habuda-Stanić, 2000).

Pristupljeno je iznalaženju *optimalnog razrjeđenja sirutke* u kojem je omogućen optimalan rast i razmnožavanje vodene leće.

Napravljeno je po 500 ml 10 modelnih otopina s različitim faktorima razrjeđenja sirutke. Sirutka je razrijeđena na faktore razrjeđenja : 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 i 200. U pripremljene otopine dodano je po 10 jedinki vodene leće što prikazuje slika 3.



Slika 3 Modelne otopine sirutke s lećom

Praćeno je razmnožavanje leće u različitim razrjeđenjima sirutke kroz tjedan dana.

Nakon tri uzastopna ponavljanja iznalaženja optimalnog razrjeđenja zaključila sam da se leća najbolje razmnožila u otopini sirutke faktora razrjeđenja 60, tj. otopini sirutke koja sadrži 491,67 ml vode i 8,33 ml sirutke. Prirast broja jedinki (razmnožavanje leće) praćen kroz tjedan dana prikazan je u poglavlju *Rezultati*.

S obzirom na dobivene rezultate, iz kojih je vidljivo da se leća najbolje razmnožila u otopini sirutke faktora razrjeđenja 60, odlučila sam je koristiti za daljnje istraživanje sposobnosti fitoremedijacije vodene leće.

Nakon pronalaženja optimalnog razrjeđenja sirutke, napravila sam tri istovjetna primjerka razrijeđene sirutke (po 500 ml) u koje sam stavila po 10 jedinki vodene leće. Na jedinkama sam kroz tjedan dana pratila sljedeće parametre:

- izgled biljke i duljinu korjenčića - izgled biljke odredila sam promatranjem boje biljke tijekom sedam dana, a duljinu korjenčića mjerila sam pomoću ravnala;
- prirast broja biljaka - prirast broja biljaka odredila sam brojenjem leće kroz tjedan dana (brojila sam svaku jedinku);
- prirast mase svježe tvari.

Dobivene podatke uvrstila sam u sljedeći izraz (Ensley i sur, 1994):

$$\text{Prirast broja biljaka} = \frac{\text{broj biljaka}_{n\text{-tog dana}} - \text{broj biljaka}_{1. \text{dana}}}{\text{broj biljaka}_{1. \text{dana}}}$$

(n=2,3,4,5,6,7)

Prirast mase svježe tvari odredila sam vaganjem svježih biljaka nultog, prvog i zadnjeg dana istraživanja. Prirast mase svježe tvari računala sam prema sljedećem izrazu (Ensley i sur., 1994):

$$\text{Prirast mase biljaka (mg)} = \frac{\text{masa svježe tvari}_{7. \text{dana}} - \text{masa svježe tvari}_{1. \text{dana}}}{\text{masa svježe tvari}_{1. \text{dana}}}$$

Fizikalno kemijske parametre određivala sam u čistoj sirutki i u dva uzorka sirutke s lećom. Slika 4 prikazuje tzv. slijepu probu (0. uzorak) i dvije otopine sirutke s 10 jedinki leće (uzorak 1 i 2).



Slika 4 Uzorci sirutke za fizikalno kemijsku analizu

Na pripremljenim uzorcima tijekom pet dana mjerila sam sljedeće parametre:

- a) pH
- b) vodljivost i temperaturu otopina
- c) kemijsku potrošnju kisika.

Parametre pod točkama a i b (pH, vodljivost i temperaturu otopine sirutke) izmjerila sam pomoću multimetra (slika 5).



Slika 5 Određivanje pH, vodljivosti i temperature otopine sirutke

Kemijsku potrošnju kisika odredila sam na temelju utroška kalijevog permanganata u otopinama sirutke prema Čohi (1990). Prije ispitivanja utroška kalijevog permanganata, svaki uzorak sam homogenizirala miješanjem na vortexu. Slike 6 i 7 prikazuju homogenizaciju i titraciju uzorka s kalijevim permanganatom.



Slike 6 i 7 Homogeniziranje uzorka i određivanje količine utošenog kalijevog permanganata

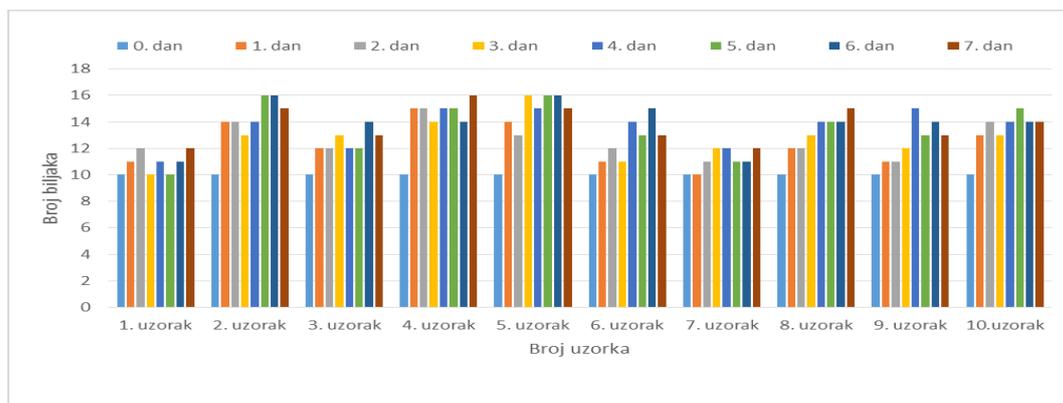
REZULTATI

Određivanje optimalnog razrjeđenja sirutke

Optimalno razrjeđenje sirutke leće odabrano je praćenjem razmnožavanja leće u otopinama različitih razrjeđenja kroz 7 dana.

Tablica 1 Razmnožavanje leće u modelnim otopinama sirutke

Broj jedinki leće u uzorcima								
	0. dan	1. dan	2. dan	3. dan	4. dan	5. dan	6. dan	7. dan
1. uzorak	10	11	12	10	11	10	11	12
2. uzorak	10	14	14	13	14	16	16	15
3. uzorak	10	12	12	13	12	12	14	13
4. uzorak	10	15	15	14	15	15	14	16
5. uzorak	10	14	13	16	15	16	16	15
6. uzorak	10	11	12	11	14	13	15	13
7. uzorak	10	10	11	12	12	11	11	12
8. uzorak	10	12	12	13	14	14	14	15
9. uzorak	10	11	11	12	15	13	14	13
10.uzorak	10	13	14	13	14	15	14	14



Slika 8 Razmnožavanje leće u modelnim otopinama sirutke

Biološki parametri

Izgled biljke i duljina korjenčića

Nakon provedenog istraživanja zaključila sam da nije došlo do promjene boje biljke te da iste izgledaju zdravo. Također, sve biljke imaju korjenčić koji se u prosjeku produžio za 2 mm (slike 9 i 10).



Slike 9 i 10 Izgled biljaka i duljina korjenčića nakon tjedan dana

Prirast broja biljaka

Kroz tjedan dana broj jedinki leće znatno se povećao što je prikazano u tablici 2.

Tablica 2: Broj jedinki leće u sirutki 0. i 7. dan

Broj jedinki leće			
	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3
0. dan	10	10	10
7. dan	20	27	25

Prirast broja biljaka dobila sam uvrštavanjem prosječnog prirasta broja biljaka u odgovarajući izraz. Prirast broja biljaka: $(24 - 10)/10 = 1.4$ Na temelju računa zaključujem da je prirast broja jedinki leće 1.4.

Prirast mase biljaka

Vaganjem uzoraka leće odredila sam prirast mase svježe tvari što prikazuje tablica 3.

Tablica 3 Masa svježe leće 0., 1. i 7. dana istraživanja

Masa svježe leće (g)			
	0. dan	1. dan	7. dan
0. uzorak	0,0014	0,0029	0,0050
1. uzorak	0,0027	0,0050	0,0080
2. uzorak	0,0025	0,0045	0,0070

Za računanje prirasta mase uvrstila sam dobivene podatke u odgovarajući izraz. Prirast mase biljaka (mg) = $(0,066 - 0,0041)/(0,0041) = 0,62$ mg Temeljem računa zaključujem da se masa leće u prosjeku povećala za 0.62 mg.

Fizikalno-kemijski parametri otopine sirutke

pH

Tablica 4 prikazuje pH otopine sirutke 0., 1., i 2. uzorka. pH 0. uzorka se gotovo nije promijenio dok se pH uzoraka 1 i 2 malo povisio. Sirutka korištena za našu analizu ubraja se u slatke sirutke, a blago povišenje pH možemo protumačiti metaboličkim reakcijama vodene leće.

Tablica 4 Praćenje promjena pH otopina tijekom vremena

pH otopine sirutke			
	0. dan	1. dan	7. dan
0. uzorak	7,02	7,20	7,09
1. uzorak	7,02	6,86	7,18
2. uzorak	7,02	6,91	7,08

Vodljivost i temperatura

Vodljivost je od nultog dana istraživanja do zadnjeg dana istraživanja u porastu u sva tri uzorka. Pretpostavljam da su uzrok porasta vodljivosti metabolički procesi u sirutki (djelovanje mikroorganizama), ali i u vodenoj leći. Temperatura se nije bitno mijenjala tijekom istraživanja (tablice 5 i 6).

Tablica 5 Promjene vodljivosti otopine sirutke

Vodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$)			
	0. dan	1. dan	7. dan
0. uzorak		566	656
1. uzorak	526	561	625
2. uzorak		558	733

Tablica 6 Promjene temperature u otopini sirutke

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)			
	0. dan	1. dan	7. dan
0. uzorak		22,2	21,5
1. uzorak	21,5	22,6	21,3
2. uzorak		22,1	21,4

Potrošnja KMnO_4 i izračun kemijske potrošnje kisika (KPK)

U otopini sirutke bez leće i u otopinama sirutke s lećom mjerila sam utrošak kalijevog permanganata potrebnog za oksidaciju organske tvari u sirutki. Tablica 7 prikazuje utrošak kalijevog permanganata od 0. dana do kraja istraživanja. Vidljivo je da je utrošak kalijevog permanganata u otopini sirutke s lećom manji.

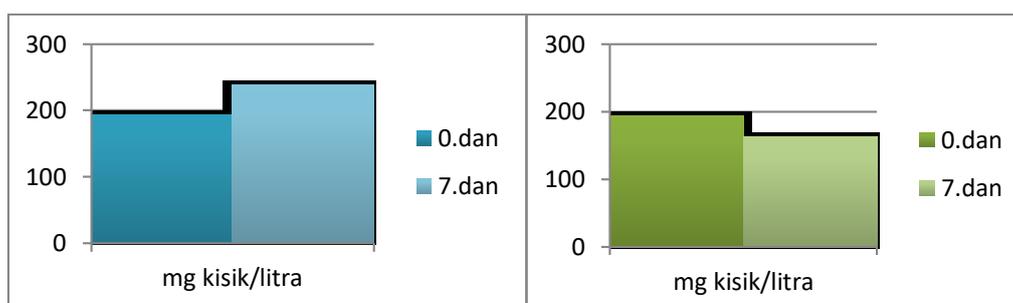
Tablica 7 Utrošak kalijevog permanganata u otopini sirutke

Utrošak kalijevog permanganata (ml)			
	0. dan	1. dan	7. dan
0. uzorak			7,5 ml
1. uzorak	6,1 ml	6,1 ml	5,1 ml
2. uzorak			5,1 ml

Na temelju utroška kalijevog permanganata izračunala sam i kemijsku potrošnju kisika. Izračun KPK temeljem utroška kalijevog permanganata je proveden prema formuli $\text{PERMANGANATNI BROJ [mg KMnO}_4/\text{l]} = \text{V (0.002M KMnO}_4\text{) UTROŠEN NA TITRACIJU [mL]} \times f (\text{KMnO}_4) \times 3.16 \times 0.253$:

- za 6.1 ml kalijevog permanganata utrošeno je 4.88 mg $\text{O}_2/\text{l} \Rightarrow 4,88 \times 40$ (naše razrjeđenje) = 195 mg O_2/l
- za 7.5 ml kalijevog permanganata utrošeno je 5,996 mg $\text{O}_2/\text{l} \Rightarrow 5.996 \text{ mgO}_2/\text{l} \times 40 = 239.84 \text{ mgO}_2/\text{l}$
- za 5.1 ml kalijevog permanganata utrošeno je 4.07 mg $\text{O}_2/\text{l} \Rightarrow 4.07 \text{ mgO}_2/\text{l} \times 40 = 163 \text{ mgO}_2/\text{l}$

Budući da 1. dana mjerenja nije došlo do promjene utroška kalijevog permanganata pa time ni kemijske potrošnje kisika, slike 11 i 12 prikazuju kemijsku potrošnju kisika 0. dana pokusa i nakon tjedan dana. Temeljem izračuna zaključujem da se kemijska potrošnja kisika u otopini sirutke s lećom smanjila sa 195 mg O_2/l na 163 mg O_2/l , čime smo dokazali hipotezu.



Slika 11 Kemijska potrošnju kisika u otopini bez leće

Slika 12 Kemijska potrošnja kisika u otopini s lećom



RASPRAVA

Zbog složenosti analiza i tehnike izvedbe ovim istraživanjem napravila sam dio planiranog istraživanja. Na početku istraživanja pokušala sam leću uzgojiti u čistoj sirutki, međutim zbog određene količine masti u sirutki, leća je već drugi dan uginula. Tražeći optimalno razrjeđenje sirutke, vidjela sam da kod manjih razrjeđenja sirutke biljka brzo gubi boju i korjenčić joj otpada. Razrjeđenje sirutke koje sam koristila za daljnje istraživanje dosta je veliko (faktor razrjeđenja 60) što govori o tome da je sirutka voda bogata organskom tvari i da leća može samo djelomično smanjiti količinu organske tvari. Leća i ostale biljke iz porodice sočivica uglavnom su se koristile za fitoremedijaciju voda onečišćenih teškim metalima (Jain i sur, 1989).

Temeljem brojenja jedinki, praćenjem izgleda leće, mjerenjem duljine korjenčića i vaganjem leće, mogu zaključiti da je biljka napredovala u vodenoj otopini sirutke. Broj jedinki se povećao, korjenčić se produžio, a izračun prirasta mase pokazuje također pozitivnu vrijednost. Leći odgovara otopina sirutke, odnosno sirutka predstavlja hranjivu podlogu leći. Mjereći fizikalno-kemijske parametre otopine sirutke i otopine sirutke s vodenom lećom (pH, vodljivost, temperaturu i kemijsku potrošnju kisika) zaključujem da se pH otopine sirutke s lećom malo povisio, kao i vodljivost. Ovo zahtijeva detaljniju analizu metaboličkih procesa u samoj leći, enzima koje ona luči ili mikrobiološku analizu otopine sirutke. Odredila sam utrošak kalijevog permanganata na uzorcima na temelju kojih sam izračunala kemijsku potrošnju kisika. Obzirom da se utrošak kalijevog permanganata u otopini sirutke s lećom smanjio sa 6.1 ml na 5.1 ml, proizlazi da je i kemijska potrošnja kisika (KPK) manja, tj. da je vodena leća smanjila količinu otopljene organske tvari u sirutki.

Vrste iz porodice sočivica (Lemnaceae) pokazuju veliki bioakumulacijski i biotransformacijski potencijal, kao i produktivnost biomase. Potencijal leće kao fitoremedijatora pojačava se još više zbog sposobnosti da se primjenjuje na višestruke zagađivače, a nije štetna za okoliš. Istraživanja su dokazala da leća dobro pročišćuje glavne zagađivače kućanskih otpadnih voda. Potvrđeno je da je leća dobar akumulator za mnoge metale poput bakra, kroma, kadmija, olova, urana, arsena i cinka. Neke vrste leće (*Lemna gibba* L. i *Lemna minor* L.) pokazale su sposobnost da fitotransformiraju organske zagađivače poput klorfenola (sastojak biocida), DDT-a (diklor-difenil-trikloretan), te organofosfornih pesticida. Leća prekriva površinu vode i smanjuje prodiranje svjetlosti u vodu pa može kontrolirati rast algi i razmnožavanje komaraca. Iz leće se mogu izolirati spojevi koji se koriste protiv ličinki komaraca što može imati značajan komercijalni učinak. Također, može se koristiti za smanjenje isparavanja (evaporacije) otpadnih voda u sušnim predjelima. Zbog svoje jednostavnosti i ekonomičnosti, fitoremedijacija se u azijskim zemljama istražuje kao potencijalan način uklanjanja fosfata, nitrata, nemetala i metala iz okoliša. U Indiji se razmatra mogućnost korištenja fitoremedijatora za smanjenje zagađenja uzrokovanog rudarstvom i industrijalizacijom (Nair i Kani, 2016). Fitoremedijacija je primjenjiva i u kućanstvima te manjim gospodarstvima. Poznat je primjer obitelji iz Brazila koja koristi vodenu leću u svojim ribnjacima. Pokazalo se da vodena leća smanjuje broj komaraca (jer pokriva velik dio površine vode gdje komarci odlažu jaja), sprječava prekomjerno razmnožavanje algi, hrana je ribama, filter je za vodu zbog akumuliranja nitrata, ali i teških metala, a može se koristiti i kao bio gorivo (Helpgarden, 2014).

Bez obzira na brojne prednosti leće, primjena joj je ograničena zbog veličine i građe. Biljka je malih dimenzija, ograničena je samo na površinski sloj vode, a korijen joj nije pričvršćen za dno zbog čega



vrlo lako može otplutati. Zbog njezine sposobnosti akumuliranja teških metala, postoji mogućnost trovanja životinje koja ju je konzumirala. Primjena leće ograničena je na specijalne svrhe fitoremedijacije i specijalne uvjete.

ZAKLJUČAK

Smatram da bi istraživanje dalo pouzdanije rezultate ako bi se obuhvatile proširene fizikalno-kemijske analize koje bi uključile sljedeće parametre: ukupne otopljene tvari (TDS), određivanje gustoće, količinu taložive tvari, ukupni suhi ostatak, količinu suspendirane tvari, BPK5, koncentraciju klorida, sulfata, nitrata, amonijaka, te količinu masti i ulja. Na vodenoj leći bi bilo dobro izmjeriti i količinu biljnih pigmenata (klorofila a, klorofila b i karotenoida).

Predlažem i alternativne metode korištenja sirutke. Sirutka sadrži preko 75 % proteina, važne minerale poput kalcija, fosfora, kalija i natrija, te vitamine A, B1 i B2. Obzirom na porast broja registriranih objekata za proizvodnju mlijeka i mljekarskih proizvoda (sir i vrhnje) te malih proizvođača sira predlažem senzibiliziranje šire javnosti o hranjivoj vrijednosti sirutke putem brošura, plakata, reklama i slično. Time bi se proširila i konzumacija „skute“, sira od sirutke te smanjila količina zaostale sirutke od proizvodnje sira. Ostatak se može iskoristiti za pripremu različitih namaza, mliječnih napitaka i kao hranjiva podloga za uzgoj čistih kultura u proizvodnji sira (Ignjatović, 2016). Na taj način bi se uvelike smanjila količina sirutke koja odlazi u naše vode.

Druga mogućnost je ispitati sposobnost fitoremedijacije i ostalih biljaka iz porodice sočivica. Ukoliko istraživanja daju dobre rezultate, mogli bi se u malim objektima, koji se bave proizvodnjom sira, napraviti spremnici za sirutku u koje bi se stavljala vodena leća. Leća bi kroz tjedan dana smanjila količinu organske tvari u sirutki. Ako bi količina organske tvari bila u skladu s pravilnikom o otpadnim vodama, pročišćena sirutka bi se mogla ulijevati i u površinske vode.

LITERATURA

- Abramović A., Perenčević M., Šćuric M. 1986. Proizvodnja sirutke u prahu u „Sireli“, Bjelovar. *Mljekarstvo* 37: 49-55.
- Helpgarden. 2014. Vodena leća. Može li ova biljka spasiti svijet? Helpgarden. <http://www.hr.helpgarden.com/vodena-leća-može-li-ova-biljka-spasiti>, pristupljeno 20.6.2016.
- Božanić R. 2012. Mogućnost iskorištenja sirutke. 40 Hrvatski simpozij mljekarskih stručnjaka, Lovran 23.10.2012.
- Božanić R., Jeličić I., Bilušić T. 2010. Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda. Plejada, Zagreb.
- Cindrić I., Popović N. 2016. Potencijal vodene leće (Lemnaceae) za fitoremedijaciju sastavnica okoliša, VI. Međunarodni stručno-znanstveni skup „Zaštita na radu i zaštita zdravlja“ od 21. do 24. 09. 2016., Zadar.
- Čoha F. 1990. Voda za piće-Standardne metode za ispitivanje higijenske ispravnosti. Privredni pregled, Beograd.
- Ensley H. E., Barber J. T., Polito M. A., Oliver A. I. 1994. Toxicity and metabolism of 2,4-dichlorophenol by the aquatic angiosperm *Lemna gibba*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13: 325-331.
- Forni C., Braglia L., Harren F. J. M., Cristescu S. M. 2012. Stress responses of duckweed (*Lemna minor* L.) and water velvet (*Azolla filiculoides* Lam.) to anionic surfactant sodium-dodecyl-sulphate (SDS). *Aquatic Toxicology* 110-111: 107-113.
- Gračanac I. 2012. Usporedba osjetljivosti dvije kulture vrste *Lemna gibba* L. (laboratorijske i kulture iz ribnjaka Narta) na bakar. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek.
- Grić Lj. 1990. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. August Cesarec, Zagreb.
- Hillman W. S., Culley Jr. D. D. 1978. The uses of duckweed. *American Scientist* 66: 442-451.
- Ignjatović D. 2016. Iskustva u preradi sirutke u prehrambenoj industriji „Sirela“ u Bjelovaru. Završni rad. Poljoprivredni odjel, Veleučilište u Požegi.
- Jain S. K., Vasudevan P., Jha N. K. 1989. Removal of some heavy metals from polluted water by aquatic plants: Studies on duckweed and water velvet. <http://agris.fao.org/agrissearch/search.do?recordID=US201301753441>, pristupljeno 2.7.2016.
- Kuleš M., Habuda-Stanić M. 2000. Analiza vode. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek.
- Marošević S., Peraković K. 1981. Potrebe i mogućnosti iskorištavanja sirutke kod nas. *Mljekarstvo* 31: 10-22.



- Nair C. S., Kani K. M. 2016. Phytoremediation of Dairy Effluent Using Aquatic Macrophytes. International Journal of Scientific & Engineering Research 7: 253-259.
- Pravilnik o upotrebi mlijeka, mliječnih proizvoda i proizvoda na bazi mlijeka koji se smatraju nusproizvodima životinjskog podrijetla koji nisu za prehranu ljudi materijala kategorije 3. Narodne novine br. XX/09.
- Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda. Narodne novine br. 80/2013.
- Pevalek-Kozlina B. 2003. Fiziologija bilja. Profil, Zagreb.
- Radić Brkanac S., Stipaničev D., Širac S., Glavaš, K., Pevalek-Kozlina B. 2010. Biomonitoring of surface waters using Duckweed (*Lemna minor* L.). Conference Balwois, Ohrid.
- Tratnik Lj., Božanić R. 2012. Mlijeko i mliječni proizvodi. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
- Wang Z., Xiao B., Song L., Wang Ch., Zhang J. 2012. Responses and toxin bioaccumulation in duckweed (*Lemna minor* L.) under microcystin-LR, linear alkybenzene sulfonate and their joint stress. Journal of Hazardous Materials 229-230: 137-144.

RAST I RAZVOJ IZDANKA I KVRŽICA GRAŠKA (*Pisum sativum* L.) OVISNO O PODRIJETLU SJEMENA I VRSTI TLA

Edvard Bedoić, 4. razred

V. gimnazija Zagreb, Klaićeva 1

Mentor: Vesna Burušić

SAŽETAK

Grašak (*Pisum sativum* L.) je jednogodišnja biljka iz porodice Fabaceae. Zastupljen je u prehrani čovjeka zbog velike količine minerala, vitamina i bjelančevina. Ciljevi rada su utvrditi iz kojeg će sjemena - kupovnog ili domaćeg - grašak brže isključiti, brže rasti i dati veći prinos te utvrditi u kojem će tipu tla biljka postići najviši stadij rasta i razvoja i kako će se, i hoće li se, oblikovati kvržice na njenom korijenu. Kao pokusna biljka izabran je grašak sorte Rondo (*Pisum sativum* L. cv. medullare 'Rondo') zbog jednostavnosti uzgoja naspram ostalih mahunarki. Dobiveni rezultati će ukazati na pogodnosti i/ili nedostatke sijanja domaćeg ili kupovnog sjemenja u određene tipove tla. U radu se koriste tri tipa tla: kupovna zemlja za cvijeće, iskorištavano tlo te obnovljeno tlo. U ovom radu se koriste i dva tipa sjemena graška, oba sorte Rondo (*Pisum sativum* L. cv. medullare 'Rondo'): kupovno sjeme (proizvođača MIAGRA) te domaće sjeme (podrijetlom iz Zagrebačke županije). Vrijeme uzgoja je podijeljeno u četiri stadija u razmacima od mjesec dana, dakle, ukupno 4 puna mjeseca. Statističkom analizom utvrđeno je da su biljke izrasle iz domaćeg sjemenja ostvarile statistički značajniji rast od onih kupovnih (za duljinu stabljika: $t = -3.53$, $p < 0.001$); za duljinu korijena: $t = -4.852$, $p < 0.001$). Također, utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u broju kvržica ($t = -1.416$, $p > 0.05$) u trima tlima. Daljnjom analizom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između duljina stabljika u iskorištavanom tlu u odnosu na kupovnu zemlju ($F = 6.026$; $p < 0.007$), pri čemu je zaključak sljedeći: iskorištavano tlo bolje pogoduje duljini stabljike u odnosu na kupovnu zemlju, ali i ne u odnosu na obnovljeno tlo. Za duljinu korijena također postoji statistički značajna razlika, ali je granična. U iskorištavanom tlu biljke imaju veći korijen u odnosu na zemlju za cvijeće, ali je i korijen podjednak u odnosu na biljke iz obnovljenog tla ($F = 3.673$; $p < 0.05$). Za broj kvržica je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika ($F = 0.946$; $p > 0.05$).

Ključne riječi: mahunarke, obnovljeno tlo, iskorištavano tlo, kupovno sjeme, domaće sjeme

UVOD

Grašak

Grašak (*Pisum sativum* L.) je jednogodišnja biljka iz porodice mahunarki (*Fabaceae*). Koristi se u prehrani čovjeka jer je bogat bjelančevinama, mineralima i vitaminima te je jedna od najstarijih kultiviranih biljaka, udomaćenih u Plodnom polumjesecu prije nekih 11.000 godina. Njegovi kultivari se dijele u tri skupine prema uzrastu: niski, poluvisoki i visoki. Za razliku od niskog, poluvisoki i visoki trebaju imati oslonac u kasnijima stadijima rasta. Grašak se može saditi praktički cijele godine, no pri visokim temperaturama je osjetljiv na plamenjaču i pepelnicu te ga je bolje saditi u rano proljeće ili kasnu jesen. Kod nižih temperatura, vrijeme klijanja mu je do tri tjedna u kojima postoji opasnost da klicu napadnu i unište štetočine (Gul i sur, 2006). Grašak je „samonepodnošljiva“ biljka, pa je kod uzgoja bitna primjena širokog plodoreda koji povećava prozračnost čime se smanjuje opasnost od zaraza.

Simbioza graška i bakterija iz roda rhizobium

Na korijenu graška i drugih biljaka iz porodice Fabaceae nalaze se kvržice (noduli) ispunjene simbiotskim nitrofikacijskim bakterijama (Alegro i sur, 2014). Simbiozu s graškom čini bakterija vrste *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Nester i sur, 2001), aerobni Gram-negativni bacili koji, biljci nedostupan elementarni dušik fiksira iz zraka te ga prerađuje u amonijev kation (NH_4^+), oblik dušika dostupan biljci. Zauzvrat, biljke bakteriji namiruju ugljikove spojeve. Kad kvržice poprime ružičastu boju, znak je da su bakterije aktivne te da je fiksacija u tijeku (Dolenec i Rusak, 2010).



Agroekološki uvjeti

Grašak uspijeva u uvjetima umjerene i vlažne klime, pri optimalnoj temperaturi oko 18°C, uz dovoljan pristup sunčeve svjetlosti. Kada se primijeti da je zemlja prilično suha, potrebno je zaliti sadnice. Na većim površinama obradive zemlje, grašku je potrebno navodnjavanje. Za kvalitetan rast i razvoj graška, pH tla treba biti u rasponu 6.5-7.5. Tlo treba biti rastresito i usitnjeno, kako bi se korijen što bolje razgranao. Grašak se ne smije saditi u pro hladnu zemlju jer tada sporije niče.

Procesom urbanizacije, sela nestaju, a malena obiteljska poljoprivredna gospodarstva zamijenjena su velikim poljodjelskim korporacijama kojima je cilj što veći prinos i profit dok kvaliteta njihovih proizvoda sve više opada zbog tretiranja posađenih kultura raznim kemikalijama. Biljke se ne tretiraju samo u razvoju već se tretira i njihovo sjeme pripravcima koji mu omogućuju dulje razdoblje uporabe sjemena i zaštitu od štetnika (podatci izneseni u emisiji „Plodovi zemlje“, 2015. god).

Namjera ovog istraživačkog rada bila je ispitati kako podrijetlo sjemenja i vrsta tla utječu na rast i razvoj graška te nastajanje kvržica na njegovu korijenju.

Ciljevi rada su:

- ☛ utvrditi iz kojeg će sjemena - kupovnog ili domaćeg - grašak brže isključiti, brže rasti i dati veći prinos;
- ☛ utvrditi u kojem će tipu tla biljka postići najviši stadij rasta i razvoja i kako će se, i hoće li se, oblikovati kvržice na njenom korijenju.

Kao pokusna biljka izabran je grašak sorte Rondo (*Pisum sativum* L. cv. *medullare* 'Rondo') zbog jednostavnosti uzgoja naspram ostalih mahunarki. Dobiveni rezultati će ukazati na pogodnosti i/ili nedostatke sisanja domaćeg ili kupovnog sjemenja u određene tipove tla.

Naime, kupovno sjeme je tretirano tekućom koncentriranom suspenzijom TMTD THIRAM S-42 (podatak se nalazi na pakiranju sjemena koje pakira i deklarira MIAGRA). Ta suspenzija omogućuje zaštitu sjemena, klice i izdanka od štetnika, nepovoljnog vremena i bolesti. Tretiranjem se produžuje skladištenje, a time i korištenje sjemena (prosječni rok uporabe kupovnog sjemena iznosi tri godine, dok je domaćeg sjemena puno kraća), pri čemu se ne umanjuje kvaliteta sjemena, odnosno kvaliteta njegova izdanka (www.syngenta.hr). Zbog svih procesa zaštite koje je kupovno sjeme prošlo u odnosu na ono domaće, hipoteza ovog rada je da će veći prirast te više kvržica na korijenu stvoriti biljka izrasla iz kupovnog sjemena posijanog u zemlju za cvijeće. Naime, u zemlji za cvijeće su pH-vrijednost, količina humusa i mikronutrijenata - prilagođeni optimalnom uzgoju biljaka, te je ta zemlja rahla i prozračna. Za druga dva tipa tla, pH vrijednosti i količine nutrijenata nisu ujednačene niti su tla rahla i prozračna.

METODE RADA

Odabir uzoraka tla

U radu se koriste tri tipa tla. Prvi tip je kupovna zemlja za cvijeće, drugi iskorištavano tlo, a treći obnovljeno tlo. Zemlja za cvijeće (Terra Dobra, proizvođač agroHoblaj), kupljena je u trgovini poljoprivrednom opremom. Iskorištavano tlo uzeto je na polju u okolici Vrbovca (Zagrebačka županija) na kojem se dugi niz godina, bez ikakve pauze, uzgajaju različite kulture. Obnovljeno tlo je uzeto na livadi također iz okolice Vrbovca, gdje se nikad nije ništa sadilo te gdje je više puta provedena zelena



gnojidba. I iskorištavano i obnovljeno tlo pripadaju tipu smeđeg tla karakterističnog za područje iz kojeg su uzete, a po teksturi su ilovasta. Uzorci se uzimaju tako da se prvo uz pomoć motike odstrani sloj trave, a zatim se uz pomoć lopate uzme dovoljna količina zemlje u koju će se kasnije saditi uzorci sjemena graška.

ODREĐIVANJE pH-VRIJEDNOSTI TLA

U ovome radu mjerena je pH-vrijednost tla kako bi se usporedila njena vrijednost s optimalnom za rast graška. Vrijednost pH kupovne zemlje je poznata od proizvođača, ali će se ponovno izmjeriti kako bi se provjerila točnost navedenog podatka.

Materijal za mjerenja pH tla obuhvaća: uzorke tla, preciznu vagu (0.01 g) elektromagnetsku miješalicu, centrifugu, laboratorijsku čašu (10, 50 i 100mL), pipete (5 i 10mL), kivete (1.25mL), menzuru (10mL), pH-metar, vodenu otopinu kalcijeva klorida (CaCl_2) volumnog udjela $w=0.02$.

Prvo se na preciznoj vagi izvaže 5.00 g zemlje osušene na zraku, zatim se u čaši od 100 mL pomiješa izvagana zemlja prethodno pomiješana s 12,5 mL vodene otopine kalcijeva klorida. Nakon toga se smjesa stavi na elektromagnetsku miješalicu gdje se miješa 60 sekundi ili koliko je potrebno da se dobije homogena smjesa. Po završetku miješanja, dobivena smjesa se ulije u kivete koje se zatim stave u centrifugu kako bi se ostatak neotopljenog tla sedimentirao. Na centrifugiranje se stavi toliki broj kiveta kojim se može prikupiti minimalno 5 mL ekstrakta. Prije nego što se sonda pH-metra uroni u dobiveni ekstrakt, elektroda pH-metra se mora, uz pomoć standardiziranih otopina (pufera) kalibrirati (puferi vrijednosti pH: 4.00, 7.00 i 10.01). Po završetku kalibracije, sonda pH-metra se još jednom dobro ispere u čistoj destiliranoj vodi. Dobiveni ekstrakt se prelije u čašu od 10 mL, zatim se u njega uroni sonda pH-metra. Ona ostaje u čaši sve dok se dobiveno očitavanje ne ustali, a zatim se očita pH-vrijednost i zapiše. Navedeni postupak se ponavlja i za preostala dva tipa zemlje.

Sijanje sjemena

Prije sijanja sjemena, potrebno je usitniti i obnovljenu i iskorištavanu zemlju kako bi bila slične rahlosti kao kupovna zemlja za cvijeće. Pored tri tipa tla, u ovom radu se koriste i dva tipa sjemena graška, oba sorte Rondo (*Pisum sativum* L. cv. *medullare* 'Rondo'): kupovno sjeme (proizvođača MIAGRA) te domaće sjeme (podrijetlom iz Zagrebačke županije). U prozirne plastične čaše (0.7 L) stavi se 400 g zemlje. Zatim se u zemlji napravi udubljenje gdje se umetne sjeme graška. Sjeme se prekrije s još zemlje.

Budući da se sjeme sije u tri tipa tla, svaki se tip tla označi slovom. Skupina A je kupovna zemlja, koja je ujedno izabrana kao kontrolna skupina jer su za nju od proizvođača poznate pojedine vrijednosti. Skupina B sadrži obnovljeno tlo, a C iskorištavano tlo. Svaka od tih skupina je dodatno podijeljena na još dvije podskupine: u podskupinu 1 posijano je kupovno sjeme, a u podskupinu 2 domaće. Istraživanjem se, dakle, analizira ukupno šest skupina, od kojih su dvije skupine (A1 i A2) kontrolne za svaki tip sjemena.

U kolovozu 2015. u svakoj skupini posađeno je 25 sadnica, sveukupno 150 sadnica. Masa zemlje, u svakoj od šest skupina, bila je jednaka, kako bi bili osigurani jednaki uvjeti za sve skupine. Budući da su uzorci tla uzeti iz prirode „zbijeniji“ od onih za cvijeće, zauzimaju dvostruko manji volumen.



Klijanje

Prilikom uzgoja promatrat će se vrijeme potrebno da iz sjemenke proklije klica.

Uzgoj biljaka

Biljke su uzgajane u sobi za uzgoj gdje im je omogućen stalan pristup svjetlosti te temperatura od oko 20°C. Zalijevane su jednom tjedno, ulijevanjem vodovodne vode u podmetače na kojima se nalaze sadnice. Na taj je način izbjegnuto stvaranje kore na površini zemlje koja bi mogla spriječiti izlazak klijanca. Nakon tri tjedna, u čašama u kojima nije ništa proklijalo, sjeme je zamijenjeno novim.

Mjerenje duljine stabljike i korijena te utvrđivanje broja kvržica

Vrijeme uzgoja je podijeljeno u četiri stadija u razmacima od mjesec dana, dakle, ukupno 4 puna mjeseca. Svakih mjesec dana uzeto je pet sadnica iz svake skupine. Svakoj od njih se uz pomoć ravnala izmjeri i zabilježi duljina stabljike. Nakon toga svaka se sadnica izvadi iz čaše i pažljivo očisti od zemlje kistom kako bi ostao samo korijen s kvržicama. Izmjeri se duljina najdužeg izdanka korijena te se na svakom korijenu izbroji i zabilježi broj kvržica.

Opisane su metode ponavljane za svaku sadnicu i sve skupine tijekom sva tri stadija uzgoja, te fotografirane.

Statistička analiza

Za statističku analizu izmjerenih podataka odabrani su: student T-test, analiza varijance i post-hoc test (Scheffeov test) koji se nadovezuje na prijašnje testove. Cilj ovih analiza je traženje statistički značajne razlike u mjerenim parametrima između promatranih skupina biljaka. Kada se kaže da je nešto statistički značajno, to znači da su prosječne razlike između uspoređivanih skupina dovoljno velike da to nisu posljedice slučajnosti, već da je u pitanju neko svojstvo koje jedna od uspoređivanih skupina ima, a ostale ne. Statistički značajnom razlikom se u ovom istraživanju se smatralo kad je $p < 0.05$ (p = razina rizika, odnosno vjerojatnost pogreške). To znači da je uz $p < 0.05$, 95% vjerojatna značajnost izmjerenih razlika (Petz, 2012). Korištena je besplatna probna verzija računalnog programa *IBM SPSS Statistics* verzije 21, gdje se postupak obavlja na slijedeći način:

1. Za T-TEST; na izborniku Analyze se odabere Compare Means i Independent Sample T-TEST. Zatim se pod Test Variables unesu svi podaci koji će se koristiti u statistici, odnosno duljine biljaka, korijena i broj nodula. Kako se ne mogu upisivati slova, nego samo brojevi, zemlja za cvijeće (A) se kodira s brojkom 1; obnovljena zemlja (B) se kodira s 2; te iskorištavana zemlja (C) kodira se s 3. Vrsta sjemena također se kodira, kupovno (1) sa 0, a domaće (2) sa 1. Zamjenom toga dobiva se slijedeće: A1= 1/0, A2=1/1, B1=2/0, B2=2/1, C1=3/0, C2=3/1. Zatim se klikne na Define Groups. Podskupina 1 je tada 0, a podskupina 2 je 1. Pritisne se na Continue te zatim OK. Računalni program nakon toga daje output s tablicama T- TEST-a.
2. Za analizu varijance; klikne se na izborniku Analyze, odabere se ponovo Compare Means te zatim se odabere One Way Anova. Zatim se pod Dependent List upišu duljine biljaka, korijena i broj kvržica, dok se pod Factor unosi vrsta zemlje. Klikne se na Post-hoc, stavi se kvačica na Scheffe te pritisne Continue i OK. U output se pojave tablice.



REZULTATI

Eksperiment je u početku bio podijeljen u četiri stadija rasta, no u četvrtom stadiju (mjesecu) su sve biljke, namijenjene za taj stadij, uvenule, stoga mjerenja nisu mogla biti provedena. Pri analizi rezultata uzet će se u obzir i taj četvrti stadij kako bi se pokušalo objasniti razlog uvenuća biljaka.

ph analiza tla

Iz tablice 1 uočava se da najvišu pH vrijednost ima kupovna zemlja, dok gotovo da nema razlike u pH vrijednost obnovljenog i iskorištavanog tla.

Tablica 1 pH vrijednosti triju tipa tala

TIP TLA	pH VRIJEDNOST
KUPOVNA ZEMLJA (A)	7.23
OBNOVLJENO TLO (B)	6.64
ISKORIŠTAVANO TLO (C)	6.60

Klijanje

Prema tablici 2 vidljivo je da su najbrže proklijale biljke iz skupine sa domaćim sjemenom u iskorištavanom tlu (C2). Najsporije su proklijale biljke iz kupovnog sjemena (prilog 1 - DESNO) u kupovnoj zemlji (A1). Također se vidi kako su u sva tri tipa tla brže iskljale biljke iz domaćeg sjemena (prilog 1 - LIJEVO).

Tablica 2 Vrijeme (u danima) potrebno da proklija sjeme u svih 6 skupina

SKUPINA	t/ dani
KUPOVNA ZEMLJA I KUPOVNO SJEME (A1)	13
KUPOVNA ZEMLJA I DOMAĆE SJEME (A2)	8
OBNOVLJENO TLO I KUPOVNO SJEME (B1)	8
OBNOVLJENO TLO I DOMAĆE SJEME (B2)	7
ISKORIŠTAVANO TLO I KUPOVNO SJEME (C1)	8
ISKORIŠTAVANO TLO I DOMAĆE SJEME (C2)	5

Duljina stabljike i korijena te broj kvržica u kupovnoj zemlji

Nakon mjesec dana rasta, prosječna duljina stabljike graška posađenog u kupovnoj zemlji (A) bila oko 13 cm za kupovno i za domaće sjeme, a duljina korijena oko 4 cm za oba sjemena. Kvržice se do tada još nisu vidjele (tablica 3).

Nakon dva mjeseca rasta u kupovnoj zemlji, duljina stabljike prosječno je dosegla 21.5 cm kod biljaka iskljalih iz kupovnog sjemena (A1), a 23.54 cm kod biljaka iskljalih iz domaćeg sjemena (A2)(prilog 3). Vidljiva je i razlika u duljini korijena u korist domaćeg sjemena. Kvržice su se tada pojavile u broju 1 – 2 (tablica 4).

Prema vrijednostima u tablici 5 zapaža se kako biljke u kupovnoj zemlji izrasle iz domaćeg sjemena (A2) imaju veće duljine stabljike i korijena. Korijenje je dobro razgranato (prilog 4 - LIJEVO). U stadiju 3 pojavljuje se više kvržica, kojih je opet više u biljkama izraslima iz domaćeg sjemena (A2).

Tablica 3 Duljina stabljike i korijena te broj kvržica na grašku uzgojenom u kupovnoj zemlji (A) iz kupovnog (1) i domaćeg sjemena (2) u prvom stadiju

MJERENJE 1	DULJINA/ cm				N	N
	STABLIKA		KORIJEN		KVRŽICE	
IZMJERENA SADNICA BROJ	A1	A2	A1	A2	A1	A1
1	12	13.5	4	5	0	0
2	13	13	3	5.3	0	0
3	11.4	13.7	3.8	4.9	0	0
4	13.8	14.4	4.5	5	0	0
5	12.1	13.7	3.7	4.6	0	0
SREDNJA VRIJEDNOST	12.46	13.66	3.8	4.96	0	0

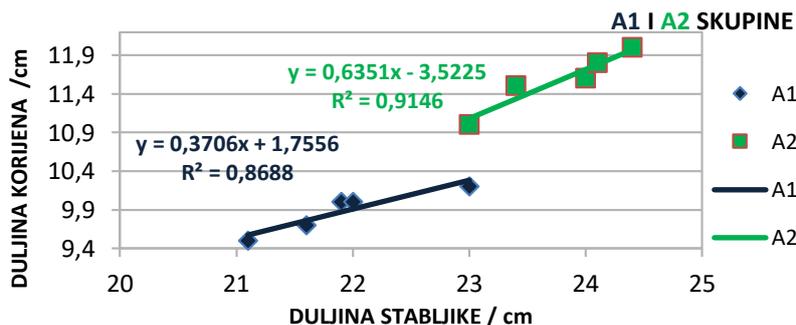
Tablica 4 Duljina stabljike i korijena te broj kvržica na grašku uzgajanom u kupovnoj zemlji (A) iz kupovnog (1) i domaćeg sjemena (2) u drugom stadiju

MJERENJE 2	DULJINA/ CM				N	N
	STABLIKA		KORIJEN		KVRŽICE	
IZMJERENA SADNICA BROJ	A1	A2	A1	A2	A1	A2
1	21	23	9	10	0	0
2	21.3	23.3	9.3	10.2	1	1
3	21.5	23.5	9.5	10.3	1	2
4	21.7	23.8	9.6	10.8	1	2
5	22	24.1	10.2	11	2	2
SREDNJA VRIJEDNOST	21.5	23.54	9.52	10.46	1	1.4

Tablica 5 Duljina stabljike i korijena te broj kvržica na grašku uzgajanom u kupovnoj zemlji (A) iz kupovnog (1) i domaćeg sjemena (2) u trećem stadiju

MJERENJE 3	DULJINA/ cm				N	N
	STABLIKA		KORIJEN		KVRŽICE	
IZMJERENA SADNICA BROJ	A1	A2	A1	A2	A1	A2
1	21.1	23	9.5	11	2	2
2	21.6	23.4	9.7	11.5	0	2
3	21.9	24	10	11.6	0	2
4	22	24.1	10	11.8	2	2
5	23	24.4	10.2	12	3	4
SREDNJA VRIJEDNOST	21.9	23.8	9.9	11.6	1.4	2.4

Slika 1 prikazuje raspršenje nastalo u skupinama A1 i A2 u trećem stadiju uzgoja. Iz vrijednosti R^2 može se vidjeti kako korelacija za skupinu kupovne zemlje i kupovnog sjemena (A1) iznosi 87%, dok kod kupovne zemlje i domaćeg sjemena (A2) ta korelacija iznosi 92%. Sukladno tome, veća je korelacija duljine korijena i stabljike u skupini A2.



Slika 1 Ovisnost duljine korijena o duljini stabljike skupine A1 (kupovna zemlja i kupovno sjeme) i A2 (kupovna zemlja i domaće sjeme) s interpoliranim regresijskim pravcem za treći stadij



Duljina stabljike i korijena te broj kvržica u obnovljenom tlu

Iz tablica 6 i 7 može se iščitati kako biljke iz obnovljenog tla (prilog 2) u stadijima 1 i 2 imaju dulji korijen i stabljiku u biljaka izraslih iz domaćeg sjemena (B2). U stadiju 1 kvržice se ne nalaze ni u jednoj skupini, a u stadiju 2 veći broj kvržica imaju biljke iz domaćeg sjemena (B2).

Tablica 6 Duljina stabljike i korijena te broj kvržica na grašku uzgajanom u obnovljenom tlu (B) iz kupovnog (1) i domaćeg sjemena (2) u prvom stadiju

MJERENJE 1	DULJINA/ CM				N	N
	STABLIKA		KORIJEN			
IZMJERENA SADNICA BROJ	B1	B2	B1	B2	B1	B2
1	19	20	4.5	5	0	0
2	20.3	19.7	4.7	5.5	0	0
3	18.9	21.3	4.2	5.6	0	0
4	19.7	18.5	5	4.8	0	0
5	18.5	21.5	5.3	4.6	0	0
SREDNJA VRIJEDNOST	19.28	20.2	4.74	5.1	0	0

Prema dobivenim vrijednostima iz tablice 8, može se vidjeti kako su veće vrijednosti duljine korijena i stabljike te brojnosti kvržica u skupini biljaka izraslih iz domaćeg sjemena (B2) i u ovom trećem stadiju rasta. Korijen je u obje skupine dobro razgranat i podijeljen (prilog 4 - SREDINA).

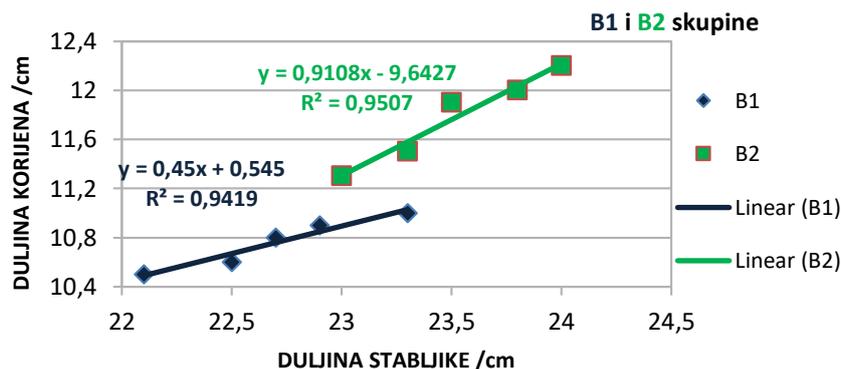
Slika 2 prikazuje raspršenje nastalo u skupinama u obnovljenom tlu, B1 i B2 za stadij 3. Iz vrijednosti R^2 vidi se kako je korelacija u B1 skupini 94%, dok je u B2 95%.

Tablica 7 Duljina stabljike i korijena te broj kvržica na grašku uzgajanom u obnovljenom tlu (B) iz kupovnog (1) i domaćeg sjemena (2) u drugom stadiju

MJERENJE 2	DULJINA/ CM				N	N
	STABLIKA		KORIJEN			
IZMJERENA SADNICA BROJ	B1	B2	B1	B2	B1	B2
1	22	22.5	9.7	10	2	2
2	22.3	22.6	9.9	10.5	2	2
3	22.7	22.8	9.9	10.7	2	2
4	23	23	10	11	2	3
5	23	23.3	10.3	11.3	1	3
SREDNJA VRIJEDNOST	22.6	22.84	9.96	10.7	1.8	2.4

Tablica 8: Duljina stabljike i korijena te broj kvržica na grašku uzgajanom u obnovljenom tlu (B) iz kupovnog (1) i domaćeg sjemena (2) u trećem stadiju

MJERENJE 3	DULJINA/ CM				N	N
	STABLIKA		KORIJEN			
IZMJERENA SADNICA BROJ	B1	B2	B1	B2	B1	B2
1	22.1	23	10.5	11.3	0	3
2	22.5	23.3	10.6	11.5	2	3
3	22.7	23.5	10.8	11.9	3	3
4	22.9	23.8	10.9	12	3	3
5	23.3	24	11	12.2	3	4
SREDNJA VRIJEDNOST	22.7	23.5	10.76	11.8	2.2	3.2



Slika 2 Ovisnost duljine korijena o duljini stabljike skupine B1 (obnovljeno tlo i kupovno sjeme) i B2 (obnovljeno tlo i domaće sjeme) s interpoliranim regresijskim pravcem u trećem stadiju

Duljina stabljike i korijena te broj kvržica u iskorištavanom tlu (C1 i C2)

Prema vrijednostima iz tablica 9 i 10, za stadij 1 i 2, za grašak posijan u iskorištavano tlo (C) vide se veće vrijednosti duljine korijena i stabljika u skupini domaćeg sjemena (C2). U drugom stadiju u obje skupine ima kvržica, pri čemu je njihova brojnost opet veća u skupini domaćeg graška (C2), dok u prvom stadiju nema kvržica ni u jednoj skupini.

Tablica 9 Duljina stabljike i korijena te broj kvržica na grašku uzgajanom u iskorištavanom tlu (C) iz kupovnog (1) i domaćeg sjemena (2) u prvom stadiju

MJERENJE 1	DULJINA/ cm				N	
	STABLIKA		KORIJEN		KVRŽICE	
IZMJERENA SADNICA BROJ	C1	C2	C1	C2	C1	C2
1	18.5	20	6	8.5	0	0
2	18	19.8	6.3	8.6	0	0
3	18.6	21.6	6.5	8	0	0
4	18.7	21	5.8	7.9	0	0
5	18.2	19.7	6.1	8.5	0	0
SREDNJA VRIJEDNOST	18.4	20.42	6.14	8.3	0	0

Tablica 10 Duljina stabljike i korijena te broj kvržica na grašku uzgajanom u iskorištavanom tlu (C) iz kupovnog (1) i domaćeg sjemena (2) u drugom stadiju

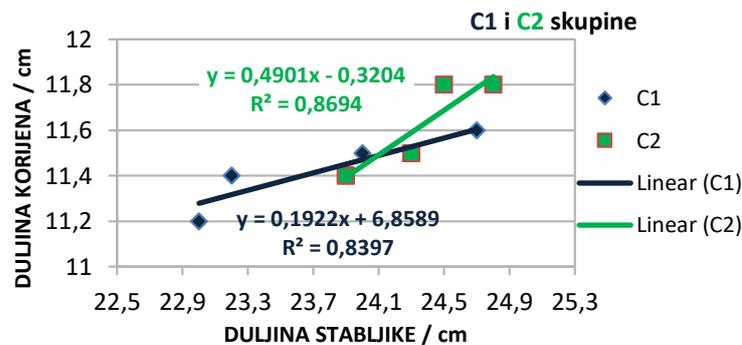
MJERENJE 2	DULJINA/ cm				N	
	STABLIKA		KORIJEN		KVRŽICE	
IZMJERENA SADNICA BROJ	C1	C2	C1	C2	C1	C2
1	19	20.5	7.5	8	2	2
2	19.3	20.7	8	8.3	0	1
3	19.5	20.8	8.3	8.5	1	2
4	19.8	21.1	8.5	8.7	2	2
5	21	21.3	8.9	9	1	2
SREDNJA VRIJEDNOST	19.72	20.88	8.24	8.5	1.2	1.8

Iz tablice 11 (kao i u prijašnjim tablicama za skupine C) vidljiva je veća vrijednost duljine korijena i stabljike te brojnosti kvržica kod domaćeg graška (C2). Korijen je dobro razvijen i razgranat u obje skupine (prilog 4 - DESNO).

Slika 3 prikazuje raspršenja nastala u skupinama C1 i C2 u trećem stadiju. Iz vrijednosti R^2 vidljivo je kako korelacija za skupinu C1 iznosi 84%, dok za skupinu C2 iznosi 87%.

Tablica 11 Duljina stabljike i korijena te broj kvržica na grašku uzgajanom u iskorištavanom tlu (C) iz kupovnog (1) i domaćeg sjemena (2) u trećem stadiju

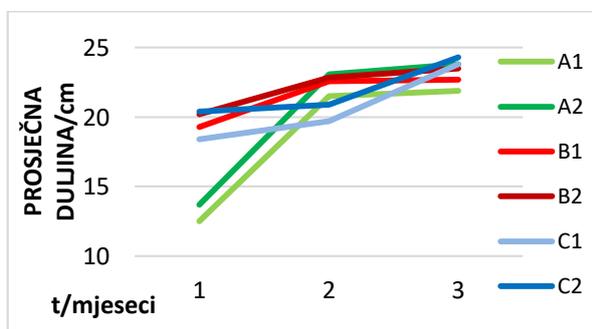
MJERENJE 3	DULJINA/ CM				N	N
	STABLIKE		KORIJEN			
IZMJERENA SADNICA BROJ	C1	C2	C1	C2	C1	C2
1	23	23.9	11.2	11.4	0	0
2	23.2	23.9	11.4	11.4	2	0
3	24	24.3	11.5	11.5	3	4
4	24.3	24.5	11.5	11.8	3	3
5	24.7	24.8	11.6	11.8	3	4
SREDNJA VRIJEDNOST	23.84	24.28	11.44	11.58	2.2	2.2



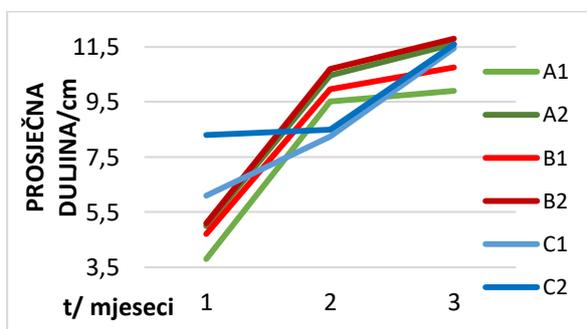
Slika 3 Ovisnost duljine korijena o duljini stabljike skupine C1 (iskorištavano tlo i kupovno sjeme) i C2 (iskorištavano tlo i domaće sjeme) s interpoliranim regresijskim pravcem u trećem stadiju

Odnos prosječnih duljina biljaka i njihovih korijena za sva tri stadija rasta

Slika 4 prikazuje kretanje prosječne duljine stabljika kroz sva tri stadija rasta. Najveći je razvitak zabilježen kod skupine A (kupovna zemlja- zeleno označene linije), dok je najveću duljinu stabljike imala skupina C, odnosno skupina C2 (iskorištavano tlo i domaće sjeme - tamno plava linija). Iz slike 5 može se iščitati kako je najveći razvitak korijena ostvaren u B2 skupini (obnovljeno tlo i domaće sjeme - tamno crvena linija) koja je, također, dosegla najveću duljinu korijena.



Slika 4 Prosječna duljina stabljika kroz tri stadija rasta



Slika 5 Prosječne duljine korijena biljaka tri stadija

Statistički testovi

Prvi statistički test napravljen uz pomoć računalnog programa *SPSS Statistics* je bio *T-TEST*. Aritmetičke sredine dobivene su zbrajanjem duljina stabljika, korijena i brojnosti kvržica iz svih skupina i podskupina 1, odnosno 2., te podijeljene sa brojem analiziranih biljaka iz stadija tri (N) koji je kod svih iznosio 15. Pri obradi podataka uzeta je u obzir dana pretpostavka koja je glasila da će biljke koje su izrasle iz



kupovnog sjemena imati veće vrijednosti duljine stabljika i korijena te veću brojnost kvržica. Očekuje se statistički značajna razlika za sve tri promatrane stavke u korist biljaka izraslih iz kupovnog sjemena.

Tablica 12 Grupna statistika t-test-a

	sjeme	N	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Standardna pogreška
duljina_stabljike	kupovno	15	22,8200	1,00584	,25971
	domaće	15	23,8600	,53559	,13829
duljina_korijena	kupovno	15	10,6933	,69124	,17848
	domaće	15	11,6467	,31818	,08215
kvržice	kupovno	15	1,9333	1,27988	,33046
	domaće	15	2,6000	1,29835	,33523

T-TEST-om su uspoređivane cijele grupe kupovnog (podskupina 1) naspram domaćeg (podskupina 2) sjemena. Dobiveni su rezultati: DULJINA STABLJIKE: $t = -3.53$, $p < 0.001$ Objašnjenje: razlika je statistički značajna. Da bi se vidjelo u čiju korist ide ta razlika mora se osvrnuti na aritmetičke sredine (M), odnosno prosjeke duljina tih dviju grupa, gdje je M (kupovno sjeme) = 22.82, a M(domaće sjeme) = 23.86. DULJINA KORIJENA: $t = -4.852$, $p < 0.001$ Objašnjenje: opet ima statistički značajne razlike: M (kupovno) = 10.69, M(domaće) = 11.65 KVRŽICE: $t = -1.416$, $p > 0.05$. Objašnjenje: prema dobivenim rezultatima vidi se kako nema statistički značajne razlike.

Po završetku izvođenja T-TEST analize, trebalo je još provesti analizu varijance, ANOVA TEST i Scheffe Test. Drugi dio pretpostavke glasi da će grašak najbolje uspijevati u zemlji za cvijeće. Tu se nalaze tri skupine (tri vrste tla) koje se međusobno uspoređuju, što znači da svaka od tri tipa tla ima 10 biljaka iz stadija tri koje će se ispitati (5 iz podskupine 1 te 5 iz podskupine 2), gdje se ponovo računa aritmetička vrijednost duljina stabljika i korijena i brojnosti kvržica. Kada ima tri ili više skupina koje se uspoređuju, koristi se statistička metoda koja se naziva jednostavna analiza varijance. Konačni produkt jednostavne analize varijance naziva se F-omjer i on služi samo za detekciju statistički značajne razlike. Drugim riječima, ako je F- omjer značajan (po istim kriterijima od $p < 0.05$ ili $p < 0.01$), to znači da negdje između promatrane tri skupine postoji značajna razlika, ali se ne zna između kojih točno. Moguće da se razlikuju sve tri, a moguće je da razlika postoji između samo dviju od tri. Zato se koristi post-hoc test, a to je ustvari Scheffe test, koji će pronaći između kojih skupina postoji ta razlika. Dobiveni su sljedeći rezultati: DULJINA BILJKE: $F = 6.026$, $p < 0.007$ Objašnjenje: Postoji statički značajna razlika. Scheffe testom utvrđeno je da se razlikuju samo iskorištavana zemlja (M=24.06) u odnosu na zemlju za cvijeće (22.85). DULJINA KORIJENA: $F = 3.673$, $p < 0.05$ Objašnjenje: Postoji statistički značajna razlika, ali je granična. I Scheffe test je opet pokazao isto, da u iskorištavanoj zemlji biljke imaju veći korijen u odnosu na zemlju za cvijeće, također da je korijen podjednak u odnosu na biljke iz obnovljene zemlje. KVRŽICE: $F = 0.946$, $p > 0.05$ Objašnjenje: Utvrđeno je da nema značajne razlike.

RASPRAVA

Kako bi se istražio utjecaj podrijetla sjemena i vrste tla na rast i razvoj stabljike i korijenja te nastajanja bakterijskih kvržica kod graška, koristilo se kupovno sjeme proizvođača MIAGRA i domaće netretirano sjeme posijano u tri tipa tla: kupovna zemlja za cvijeće, obnovljeno tlo te iskorištavano tlo, kroz četiri stadija rasta. Sve biljke u sobi za uzgoj imale su jednake uvjete za klijanje i daljnji rast.



Svaki dan se u sobi za uzgoj promatralo koliko je klica prokljalo te kojoj skupini pripadaju. Domaće je sjeme najbrže prokljalo u skupini sa iskorištavanom zemljom (za pet dana). Prema zapažanjima za kupovno sjeme utvrđeno je kako je najsporije prokljalo u kupovnoj zemlji. Za izlazak klice je skupini sa kupovnom zemljom trebalo u prosjeku trinaest dana. Postoji puno mogućih razloga za to, primjerice sama starost sjemena. Kupovno sjeme ima godinu proizvodnje 2014., dok domaće sjeme ima 2015. Još jedan razlog lošijeg klijanja i razvoja mogao bi biti to što je kupovno sjeme tretirano tekućom koncentriranom suspenzijom TMTD THIRAM S-42 koja omogućava bolju zaštitu sjemenu od raznih čimbenika (nepovoljnog vremena, raznih štetočina i bolesti). Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti kako su biljke izrasle iz kupovnog sjemena slabije i sporije napredovale od onih izraslih iz domaćeg sjemena, što znači da prvi dio hipoteze nije potvrđen.

Zbog zahtjevnosti postupka eksperimenta te manjka potrebne opreme nije se mogla izmjeriti količina mikronutrijenata u obnovljenom i iskorištavanom tlu, dok je u kupovnoj zemlji poznata od proizvođača. Kako je obnovljeno tlo uvijek služilo kao livada te je na njoj provedena zelena gnojidba, može se pretpostaviti da ono ima veći udio mikronutrijenata od iskorištavanog tla. Sam udio dušika očito nije utjecao na klijanje te rast i razvoj izdanka i njegova korijena, što se može potkrijepiti dobivenim rezultatima i rezultatima Gula i sur. (2006). Dobiveni rezultati su pokazali kako je najpogodnije baš iskorištavano tlo (za rast i razvoj izdanka) koje bi trebalo imati najniži udio dušika i ostalih mikronutrijenata, što odbacuje drugi dio hipoteze.

Biljke koje su uspjele ući u četvrti stadij počele su gubiti svoju masu i čvrstoću te su na poslijetku uvenule. Postoji nekoliko mogućih razloga uvenuća biljaka: korijen graška može ići u dubinu do 50 cm, a kako je dubina u čaši bila tek 5 cm, može se pretpostaviti da su se ogranci korijena počeli međusobno preplitati i pucati zbog nedovoljnog volumena zemlje. U trećem stadiju je u obnovljenoj i iskorištavanoj zemlji počeo rasti poljski slak (*Convolvulus arvensis* L.) koji je počeo gušiti biljku.

ZAKLJUČCI

Iz ovog je istraživanja proizašlo nekoliko zaključaka:

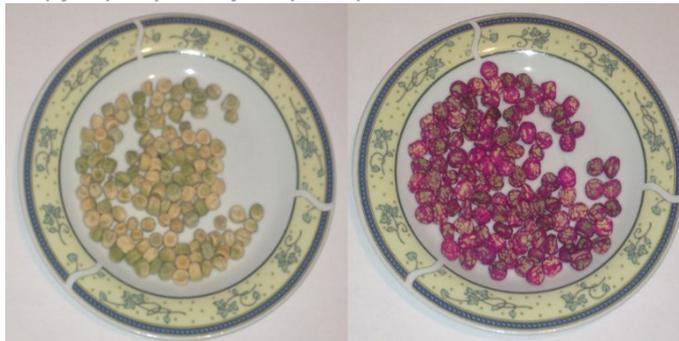
- ✔ biljke izrasle iz domaćeg sjemena u odnosu na biljake iz kupovnog sjemena:
 - ostvarile su statistički značajniji rast
 - imaju dulje korijenje (veće su korelacije duljine korijenja i stabljike)
 - ne postoji statistički značajna razlika u broju kvržica
- ✔ iskorištavano tlo bolje pogoduje biljci za rast i razvoj u odnosu na kupovnu zemlju, ali ne i u odnosu na obnovljeno tlo
- ✔ najduži korijen ostvarile su biljke u obnovljenom tlu
- ☞ navedena hipoteza u istraživanju nije potvrđena.

LITERATURA

- Dolenec Z., Rusak G. 2013. Živi svijet 2, Profil, Zagreb.
- Gul N. I., Jilani M. S., Waseem K. 2006. Effect of split application of nitrogen levels on the quality and quality parameters of pea (*Pisum sativum* L.). International journal of agriculture & biology 8: 226-230.
- Nester E. W., Anderson D. G., Roberts C. E. Jr., Pearsall N. N., Nester M. T. 2001. Microbiology: a human perspective (3rd edition). McGraw Hill- higher education, New York.
- Pavletić Z. 1978. Mikrobiologija za biologe. Sveučilišna Naklada Liber, Zagreb.
- Petz B. 2012. Osnovne statističke metode za nematematičare. Naklada Slap, Jastrebarsko.

PRILOZI

Prilog 1 Domaće sjeme graška (lijevo) i kupovno sjeme (desno)



Prilog 2 Sadnica graška



Prilog 3 Mjerenje duljine stabljike



Prilog 4 Razgranatost korijena i brojnost kvržica za kupovno (lijevo), obnovljeno (sredina) i iskorištavano tlo (desno) kod biljke izrasle iz kupovnog sjemena



UTJECAJ OTPADNE VODE IZ PRERADE MASLINA NA PROMJENE U MITOZI *Allium cepa* L. I *Vicia faba* L.

Dina Cvitanović, 4. razred
Veronika Ilić, 4. razred

Srednja škola „Antun Matijašević Karamaneo“, Vis
Mentor: Josipa Poduje

SAŽETAK

Jedna od najpoznatijih biljaka Mediterana je zasigurno maslina. Maslinovo ulje dobiva se preradom maslina i pri tome se stvara otpadna voda OMW (Olive Mill Wastewaters). Maslinarstvo je jedna od osnovnih djelatnosti otoka Visa i maslinovo ulje dobiveno na našem otoku je izuzetno cijenjeno. Dokazano je da maslinovo ulje ima pozitivan učinak na naše zdravlje, ali što s štetnim učinkom otpadnih voda, to nas je pitanje potaknulo na ovo istraživanje. Opći cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj otpadnih voda na promjene u mitozu kod *Allium cepa* L. i *Vicia faba* L. te utjecaj otpadnih voda kod prerade maslina na broj i intenzitet rasta korjenčića *Allium cepa* L. tretiranih različitim razrjeđenjima otpadnih voda. Za praćenje promjena u mitozu korišteni su slijedeći parametri: mitotski indeks, udio pojedinih faza mitoze, učestalost i tipovi kromosomskih aberacija, a za praćenje broja i intenziteta rasta korjenčića *Allium cepa* L. mjereno je vrijeme duljina korjenčića kroz vremenski interval od mjesec dana. Radi utvrđivanja statističkih odstupanja svi rezultati biti će obrađeni X^2 testom za analizu varijance. Naša pretpostavka je da otpadne vode iz prerade maslina uzrokuju smanjenu mitotsku aktivnost i povećavaju pojavnost kromosomskih aberacija kod bilja. Na temelju istraživanja zaključili smo da je rast korjenčića *Allium cepa* L. uspoređen djelovanjem otpadne vode iz procesa prerade maslina te veći volumni udio otpadne vode više inhibira rast korjenčića *Allium cepa* L., broj korjenčića *Allium cepa* L. izloženih djelovanju otpadne vode je manji u odnosu na kontrolnu skupinu i smanjuje se porastom volumnog udjela otpadne vode, otpadne vode iz prerade maslina uzrokuju smanjenu mitotsku aktivnost i povećavaju pojavnost mitotskih i kromosomskih aberacija kod *Allium cepa* L. i *Vicia faba* L. Uočene su slijedeće mitotske i kromosomske aberacije: c-mitoza, anafazni mostovi, mikronukleus, slijeplost kromosoma, lutajući kromosomi, a učestalost i vrste mitotskih i kromosomskih aberacija ovise o udjelu otpadne vode i vrsti biljke. Nakon oporavka klijanca od 24 h u destiliranoj vodi povećava se mitotska aktivnost kod obje biljke i smanjuje pojavnost mitotskih i kromosomskih aberacija. Uočene promjene u mitozu ukazuju na mutageno djelovanje otpadnih voda iz prerade maslina te je nužna ugradnja sustava za pročišćavanje otpadnih voda u uljarama i pravilno zbrinjavanje otpadnih voda iz procesa prerade maslina.

Cljučne riječi: mitotska aktivnost, kromosomske aberacije, mutageno djelovanje, otpadna voda

UVOD

Jedna od najpoznatijih biljaka Mediterana je zasigurno maslina. Poznata od pamtivijeka o čemu nam svjedoče brojni arheološki nalazi njezinih slika u špiljama. Maslina je suptropska zimzelena biljka koja je iznimno cijenjena zbog svog ovalnog ploda tamnozeleno do crne boje. Tijekom povijesti odigrala je važnu ulogu u razvoju civilizacija, prehrani, medicini, umjetnosti...Ipak, danas je najznačajnija zbog maslinovog ulja kojeg karakterizira ugodna aroma koja potječe od aromatičnih tvari, vitamina E, fenola, hidrokarbona koji se nalaze u malom udjelu za razliku od masnih kiselina koje čine više od 95%. Od masnih kiselina najzastupljenija je oleinska kiselina u udjelu od 65 do 85% zbog koje je maslinovo ulje poželjno za ljudsko zdravlje. Opće je poznato da maslinovo ulje ili „tekuće zlato“, kako ga je Homer nazvao, ima ljekovita svojstva, no jeste li se ikad zapitali kako uopće nastaje?

Maslinovo ulje dobiva se preradom maslina u kojoj razlikujemo više faza. Prvo, nakon berbe ubrani se plodovi odnose na pranje i čišćenje. Nakon toga stavljaju se u elektromlin iz kojeg dobijemo samljeveno tijesto. Ono se odvodi na daljnju separaciju ulja od krutih čestica i biljne vode. Konačno, izdvajanje ulja dobiva se prilikom procesa centrifugiranja. U svim tim procesima dodaje se voda, posebice prilikom



centrifugiranja gdje se doda od 10 do 50 L vode na 100 kg maslina. Završetkom prerade dobije se 20% maslinovog ulja, 30% polučvrstog otpada te 50% otpadne vode. Poznate su tehnike koje omogućavaju da čvrsti ostaci iz prerade maslina uz učinkovito generiranje daju vrlo kvalitetni kompost (Biokompost). Problem zbrinjavanja otpadne vode se često zanemaruje. Ovisno o tipu procesa količina otpadne vode odstupa od 0.5 do 1.5 m³ na 1000 kg maslina.

Pojam otpadna voda, u svjetskoj literaturi poznata kao OMW (Olive Mill Wastewaters) odnosi se na vodu koja se koristi tijekom prerade, u koju ulazi i voda od pranja maslina, biljna voda, dodana voda u procesu centrifugiranja, te voda od pranja i čišćenja sustava. Tamno smeđe je boje, karakterističnog mirisa, pH joj varira od 3 do 6 te je karakterizira visoka vodljivost. Njezini sastojci najčešće se prikazuju pomoću parametara: kemijske potrošnje kisika koja iznosi između 40 i 220 g/L, petodnevne biokemijske potrošnje kisika koja iznosi između 35 i 110 g/L, ukupnog organskog ugljika koji varira između 25 i 45 g/L i ukupnih fenola između 0.5 i 24 g/L (Oreščanin, 2015). Elnabris (2014) je proučavao učinak otpadnih voda na četiri morska beskralježnjaka. Mijenjao je koncentracije otpadnih voda od 1.5 do 10% gdje je primijećeno da je s povećanjem koncentracije otpadnih voda rasla i smrtnost organizama. Smrtnost se pokazala najvećom 97,5%-tnom za vrstu *B. plicatilis* koja je bila izložena 24 sata u otopini s 10% OMW. Fitotoksični učinak OMW potvrđen je na algi *Ankistrodesmus braunii* i to zbog prisutnosti niskomolekularnih fenolnih spojeva (Oreščanin, 2015). Toksični učinak je povezan sa prisutnošću fenolnih spojeva i to galne kiseline i oleuropeina. Također, El Hajjoui et al (2007) je proveo istraživanje na biljci *Vicia faba* L. kod koje udio od 10% otpadnih voda uzrokuje povećanje mikronukleusa, a udio od 20% uzrokuje potpuni zastoj mitotske aktivnosti, čemu su najveći uzrok sastavni fenolni spojevi.

Bob *Vicia faba* L. je jednogodišnja biljka iz roda grahorica (*Vicia*), porodice mahunarki (Fabaceae). Može narasti od 50 do 100 cm, a karakterizira ga uspravan rast bez vitica. Listovi su mu mesnati, zelenkaste boje, a na cvatovima se mogu raspoznati do četiri mirišljava, bijela cvijeta. Bob *Vicia faba* L. je najznačajniji zbog svog zelenkastog ploda veličine do 3 cm koji je vrlo cijenjen u kulinarstvu. Biljku se može pronaći na svakom kontinentu, najčešće se uzgajaju i to na vlažnim mjestima, na bogatom tlu. Jedan od najstarijih i najčešće upotrebljivanih biljnih testova za proučavanje djelovanja različitih kemijskih spojeva na genom viših biljaka je Allium-test, kojeg je 1938. godine uveo Levan, upotrijebivši korjenčice zdravih lukovica običnog luka (*Allium cepa* L.). Allium-test pokazao se pogodan za utvrđivanje inhibicije rasta korjenčića, kromosomskih aberacija kao i za ispitivanje raznih supstanci iz okoliša na proces mitoze (Roša, 1998). Kromosomske aberacije su strukturne promjene kromosoma koje se javljaju zbog loma kromosoma, grešaka prilikom razdvajanja kromosoma u pojedinim fazama ili zbog grešaka tijekom krosingovera. Kromosomske aberacije dijelimo na delecije, duplikacije, inverzije i translokacije (Pavlica i Balabanić 2016). Te se promjene mogu pratiti pomoću mikroskopa koji daje uvid u izgled kromosoma u točno određenim fazama.

Maslinarstvo je jedna od osnovnih djelatnosti otoka Visa i maslinovo ulje dobiveno na našem otoku je izuzetno cijenjeno. Dokazano je da maslinovo ulje ima pozitivan učinak na naše zdravlje, ali što s štetnim učinkom otpadnih voda, to pitanje nas je potaknulo na ovo istraživanja.

Opći cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj otpadnih voda na promjene u mitozu kod *Allium cepa* L. i *Vicia faba* L. te utjecaj otpadnih voda kod prerade maslina na broj i intezitet rasta korjenčića *Allium*



cepa L. tretiranih različitim volumnim udjelima otpadnih voda. Za praćenje promjena u mitozu korišteni su slijedeći parametri: mitotski indeks, udio pojedinih faza mitoze, učestalost i tipovi kromosomskih aberacija, a za praćenje broja i intenziteta rasta korjenčića *Allium cepa* L. mjeren je broj i duljina korjenčića kroz vremenski interval od mjesec dana. Radi utvrđivanja statističkih odstupanja svi rezultati biti će obrađeni X^2 testom za analizu varijance.

Naša pretpostavka je da otpadne vode iz prerade maslina uzrokuju smanjenu mitotsku aktivnost i povećavaju pojavnost kromosomskih aberacija kod bilja. Provedeno istraživanje ima primjenu u poljoprivredi te zaštitu okoliša jer ukoliko se uoči značajno mutageno djelovanje otpadnih voda ukazati ćemo na nužnost upotrebe sustava za pročišćavanje otpadnih voda u uljarama te pravilno zbrinjavanje otpadnih voda iz procesa prerade maslina.

METODE RADA

U istraživačkom radu korišten je *Vicia faba* L., *Allium cepa* L. i otpadna voda OMW koja je nastala u procesu prerade maslina.

Određivanje pH vrijednosti otpadne vode dobivene u procesu prerade maslina

U staklenu čašu od 100 mL ulije se 10 mL otpadne vode dobivene u procesu prerade maslina i pomoću univerzalnog indikator papira MACHEREY-NAGEL odredi pH vrijednost otpadne vode dobivene u procesu prerade maslina. Potom se određuje pH vrijednost različitih razrjeđenja otpadne vode.

Priprema razrjeđenja otpadne vode (volumni udio) dobivene u procesu prerade maslina

U staklene čaše od 100 mL napravljeno je 0,5%, 1,0%, 2,5%, 5% i 10% razrjeđenje otpadne vode (volumni udio) dobivene u procesu prerade maslina u destiliranoj vodi.

Allium cepa L. pod utjecajem otpadne vode dobivene u procesu prerade maslina

Za istraživanje korišteno je ukupno 30 lukovica *Allium cepa* L. (svaki volumni udio i kontrola po 5 mjerenja). Lukovicama *Allium cepa* L. veličine 15-20 mm i težine oko 4 g skalpelom su odstranjeni osušeni dijelovi kako bi korijen mogao rasti. Postavljene su na epruvete napunjene destiliranom vodom tako da donjim dijelom dodiruju površinu vode. Praćen se rast korjenčića do dužine oko 1 cm. Nakon što su korjenčići narasli do 1 cm izdvojene su lukovice koje su bile kontrolna skupina i one su nastavile rast u destiliranoj vodi, a ostale lukovice su tretirane 24 sata otopinama otpadne vode dobivene u procesu prerade maslina u volumnim udjelima 0,5%, 1,0%, 2,5%, 5% i 10%. Nakon 24 sata dio korjenčića se fiksira mješavinom etanola i octene kiseline u omjeru 3:1 i pripremi za mikroskopiranje, a dio materijala je prebačen u destiliranu vodu na oporavak od 24 sata i potom fiksiran i pripremljen za mikroskopiranje. Također je vršeno praćenje kontrolne skupine i skupina pod utjecajem različitih razrjeđenja otpadne vode tijekom 4 tjedna. Svaki tjedan su prebrojani korjenčići na svim lukovicama *Allium cepa* L. i izmjerena im je duljina, izmjerene vrijednosti bilježene su u radni dnevnik, izračunate prosječne vrijednosti dobivenih rezultata te statistički obrađene.

Vicia faba L. pod utjecajem otpadne vode dobivene u procesu prerade maslina

U staklenu čašu od 200 mL stavljeno je 55 sjemenki *Vicia faba* L. (svaki volumni udio i kontrola po 5 mjerenja) i destilirana voda na sobnu temperaturu i praćena je pojava prvih zdravih klica. Dio klijanaca fiksiran je i pripremljen za mikroskopiranje, a ostali klijanci sa dobro razvijenom klicom tretirani su 24



sata otopinama otpadne vode dobivene u procesu prerade maslina u volumnom udjelu 0,5%, 1.0%, 2.5%, 5% i 10%. Nakon 24 sata dio klica se fiksira i pripremi za mikroskopiranje, a dio materijala je prebačen u destiliranu vodu na oporavak od 24 sata i potom fiksiran i pripremljen za mikroskopiranje.

Određivanje mitotskog indeksa, udio pojedinih faza mitoze te uočavanje vrsta i učestalosti kromosomskih aberacija kod *Allium cepa* L. i *Vicia faba* L.

Vršni dio korjenčića duljine do 1 cm odstranjen je sa svježih korjenčića *Allium cepa* L. kontrolne skupine i lukovica izloženih utjecaju otpadnih voda različitih volumnih udjela, potom je stavljen pomoću pincete u staklenu posudu s destiliranom vodom i tamo ostavljen 1 minutu. Nakon toga vršni dio korjenčića je premješten 10 minuta u staklenu posudu sa 6M klorovodičnom kiselinom. Ponovo se korjenčići stavljaju u destiliranu vodu oko 1 minute kao bi bili isprani nakon čega se premještaju u staklenu posudu sa acetoorceinom gdje se oboje slijedećih 20 minuta. Vršni dio korjenčića duljine oko 0,5 mm stavljen je na predmetno stakalce i prekriven sa pokrovnim stakalcem. Preko pokrovnog stakalca stavljen je komadić filter papira te palcem preparat pritisnut kako bi se stanice preparata jednoslojno rasporedile. Pripremljeni preparat promatran je pod mikroskopom, zbog jednostavnijeg prebrojavanja oko 200 stanica po preparatu te uočavanja stanica u diobi i onih koje nisu u diobi, preparat je fotografiran. Od stanica koje su u diobi određuje se udio stanica u profazi, metafazi, anafazi i telofazi. Također se određuju vrste i učestalost kromosomskih aberacija kod korjenčića tretiranih različitim razrjeđenjima otpadne vode i nakon oporavka od 24 sata u destiliranoj vodi. Po prethodnoj recepturi pripremljeni su i promatrani klijanci *Vicia faba* L. kontrolne skupine i klijanci pod utjecajem otpadne vode različitog razrjeđenja te klijanci nakon oporavka u destiliranoj vodi. Također se određuju vrste i učestalost kromosomskih aberacija.

Statistička obrada rezultata

Sve dobivene vrijednosti statistički su obrađene.

Izračunavanje prosječne duljine korjenčića lukovica *Allium cepa* L.

Formula za izračunavanje prosječne duljine korjenčića lukovica:

$$MKL = \frac{DKL}{NL}$$

MKL= prosječne duljine korjenčića lukovica

DKL= zbroj duljina svih korjenčića lukovica

NL= broj korjenčića svih lukovica

Izračunavanje prosječnog broja korjenčića lukovica *Allium cepa* L.

Formula za izračunavanje prosječnog broja korjenčića lukovica:

$$MKL = \frac{DKL}{NL}$$

MKL= prosječnog broja korjenčića lukovica

DKL= zbroj korjenčića lukovica

NL= broj lukovica



Provođenje hi – kvadrat (X^2) testa

Kako bi utvrdili statističku značajnost dobivenih rezultata tj. jesu li odstupanja kontrolnih skupina i skupina biljka izloženih utjecaju otpadne vode dobivene u procesu prerade maslina statistički značajna proveden je hi-kvadrat (X^2) test.

Formula za izračunavanje X^2 -testa:

$$X^2 = \sum \frac{(f_0 - f_t)^2}{f_t}$$

Izračunavanje mitotskog indeksa

Mitotski indeks (MI) govori koliki je udio stanica u korjenčiću promatranog *Allium cepa* L. i *Vicia faba* L. u mitozu u odnosu na ukupan broj stanica promatranog uzorka.

Formula za izračunavanje mitotskog indeksa:

$$MI = \frac{\text{broj stanica u mitozu}}{\text{ukupan broj stanica}}$$

Izračunavanje udjela pojedinih faza mitoze

Udio pojedinih faza mitoze govori koliki je udio stanica u korjenčiću promatranog *Allium cepa* L. i *Vicia faba* L. u pojedinoj fazi u mitozu u odnosu na ukupan broj stanica koje su u diobi promatranog uzorka.

$$\text{Udio pojedine faze u mitozu} = \frac{\text{broj stanica u pojedinoj fazi mitoze}}{\text{ukupan broj stanica u diobi}}$$

REZULTATI

Rezultati mjerenja prosječne duljine korjenčića *Allium cepa* L.

U vremenskom intervalu od 20. listopada 2016. do 2. veljače 2017. provedene su dvije serije istraživanja tj. promatran je razvoj korjenčića *Allium cepa* L. Mjerena je duljina korjenčića kontrolne skupine te duljina korjenčića lukovice *Allium cepa* L. tretirane različitim razrjeđenjima otpadne vode iz prerade maslina. Izmjeren pH otpadne vode iz prerade maslina bez razrjeđenja je 4, a potom je mjereno za svaki volumni udio. Mjerenja su vršena pomoću pomične mjerke i ravnala svakih sedam dana tijekom jednog mjeseca.

U tablici 1 je vidljivo da je rast korjenčića manjeg intenziteta kod većih volumnih udjela otpadne vode, osobito kod 10% volumnog udjela rast je gotovo zaustavljen.

Tablica 1 Prosječna duljina korjenčića *Allium cepa* L. kod različitih razrjeđenja otpadne vode iz prerade maslina

Volumni udio/%	7. dan	14. dan	21. dan	28. dan
Kontrola	3,43	4,52	5,3	5,4
0,5	1,46	3,68	5,4	5,5
1	0,99	3,42	5,32	6,1
2,5	0,79	4,03	5,15	5,4
5	0,46	2,65	3,2	4,13
10	0,57	0,81	0,81	0,8



Kako bi bilo provjereno jesu li rezultati statistički značajni korišten je statistički χ^2 -test. Uz p-vrijednost $p=0,05$, očitana χ^2 -vrijednost je 3,843, dakle sve vrijednosti iznad očitane vrijednosti iz tablice govore o statistički značajnoj razlici između dva promatrana uzorka. U tablici 2 vidljivo je kako su dobivene vrijednosti za volumni udio 10% 28. dan mjerenja više od očitane vrijednosti iz tablice stoga postoji statistički značajna razlika.

Tablica 2 Rezultati χ^2 -testa za prosječne duljine korjenčića *Allium cepa* L. kod različitih volumnih udjela otpadne vode iz prerade maslina

Volumni udio/ %	rezultati χ^2 testa			
	7. dan	14. dan	21. dan	28. dan
0,5	1,13	0,17	0,001	0,55
1	1,74	0,27	0,00007	0,0019
2,5	2,03	0,05	0,004	0,09
5	2,57	0,77	0,83	0
10	2,38	3,04	3,8	3,92

Rezultati mjerenja broja korjenčića lukovica *Allium cepa* L.

U vremenskom intervalu od 20. listopada 2016. do 2. veljače 2017. provedene su dvije serije istraživanja. Mjeren je broj korjenčića kontrolne skupine te broj korjenčića lukovice *Allium cepa* L. tretirane različitim volumnim udjelima otpadne vode iz prerade maslina. Izmjeren pH otpadne vode iz prerade maslina bez razrjeđenja je 4, a potom je mjeren za svako razrjeđenje. Mjerenja su vršena pomoću pomične mjerke i ravnala svakih sedam dana tijekom jednog mjeseca. U tablici 3 vidljivo je broj korjenčića se smanjuje s porastom volumnog udjela otpadne vode i najmanji je kod 10% te se nakon 21. dana ne pojavljuju novi korjenčići. 14. dan kod razrjeđenja 0,5%, 1% i 5% veći je broj korjenčića u odnosu na kontrolnu skupinu, 21. dan mjerenja kod 0,5% i 2,5 % volumnog udjela broj korjenčića je veći od kontrolne skupine. U tablici 4 naveden su rezultati χ^2 -testa za prosječan broj korjenčića *Allium cepa* L. Za značajnost na razini 5% ($p=0,05$) očitana vrijednost je 3,843, u tablici 4 vidljivo je da kod volumnog udjela od 10% vrijednost za 7., 14., 21. i 28. dan mjerenja viša od 3,843 što pokazuje statistički značajnu razliku.

Tablica 3 Prosječan broj korjenčića *Allium cepa* L. kod različitih volumnih udjela otpadne vode iz prerade maslina

Volumni udio/%	7. dan	14. dan	21. dan	28. dan
Kontrola	20	21	22	22
0,5	16	24	23	24
1	16	25	22	21
2,5	11	19	23	19
5	21	23	20	20
10	7	8	9	9

Tablica 4 Rezultati χ^2 -testa za prosječan broj korjenčića *Allium cepa* L. kod različitih volumnih udjela otpadne vode iz prerade maslina

Volumni udio/%	rezultati χ^2 testa			
	7. dan	14. dan	21. dan	28. dan
0,5	0,8	0,42	0,045	0,18
1	0,8	0,76	0,76	0,045
2,5	4,05	0,19	0,045	0,41
5	0,05	0,19	0,18	0,18
10	8,45	8,0	7,68	7,68

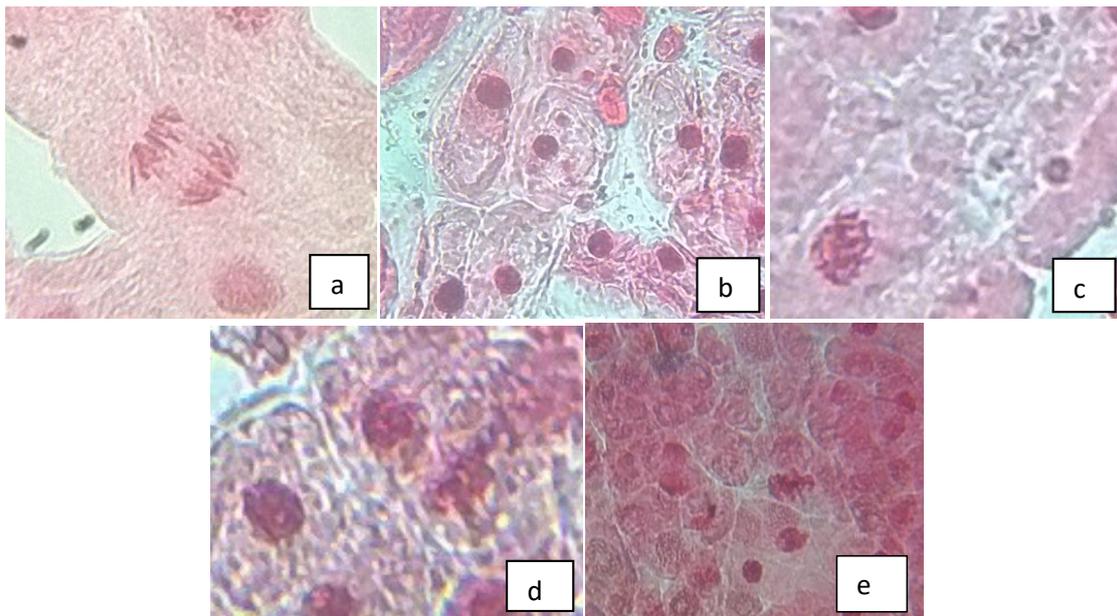
Rezultati mitotskog indeksa i učestalosti kromosomskih aberacija

Kako bi utvrdili utjecaj otpadne vode iz prerade maslina na *Allium cepa* L. određen je mitotski indeks, te udio pojedinih faza mitoze te pojavnost promjena u mitozu.

U tablici 5 vidljivo je da se mitotski indeks smanjuje s povećanjem volumnog udjela otpadne vode, također najviše promjena u mitozu je uočeno pri volumnom udjelu 10%, čak 12 kromosomskih aberacija, od kojih je 8 c-mitoza. Mikronukleusi su uočeni kod volumnih udjela 5 i 10%. Slijepljeni kromosomi su uočeni kod volumnih udjela 0,5%, 2,5%, 5% i 10%. Lutajući kromosom je uočen kod volumnog udjela otpadne vode od 10%, a anafazni mostovi kod 1% i 10% volumnog udjela otpadne vode (slika 1). Za značajnost na razini 5% ($p=0,05$) očitana vrijednost je 3,843, u tablici 5 vidljivo je kako su dobivene vrijednosti manje te ne postoji statistički značajna razlika.

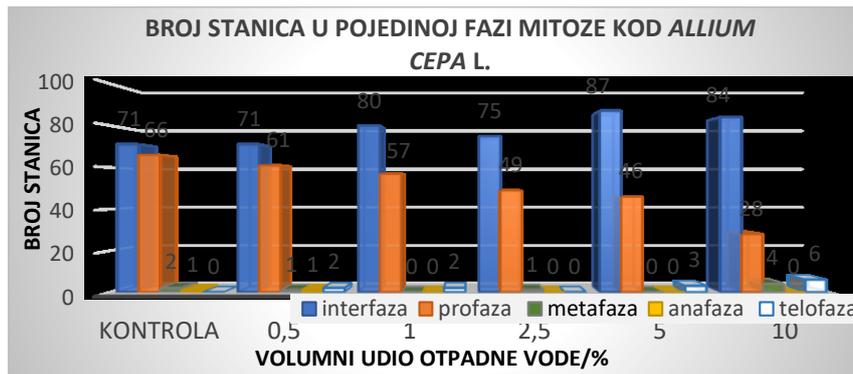
Tablica 5 Određivanje mitotskog indeksa, χ^2 -testa i mitotskih promjena kod korjenčića *Allium cepa* L. pri različitim volumnih udjela otpadne vode iz prerade maslina

Volumni udio/%	Kiselost (pH)	Ukupan broj stanica	Broj stanica u mitozu	Mitotski indeks/%	χ^2	Mitotske i kromosomske aberacije					Ukupan broj aberacija
						C - mitoza	Anafazni mostovi	Lutajući kromosomi	Slijepljeni kromosomi	Mikronukleus	
Kontrola	7	140	69	49		0	0	0	0	0	0
0,5	7	137	66	48	0.0002	0	0	0	1	0	1
1	7	142	62	44	0.002	2	1	0	0	0	3
2,5	6	129	54	42	0.01	2	0	0	2	0	4
5	6	142	55	39	0.02	4	0	0	1	1	6
10	5	134	50	37	0.02	8	1	1	1	1	12



Slika 1 Kromosomske aberacije: a) lutajući kromosom, b) mikronukleus, c) c-mitotička stanica, d) anafazni most, e) slijepljeni kromosomi

Na slici 2 prikazan je broj stanica pojedinih faza u mitozu, najviše stanica se nalazi u interfazi i profazi kod svih skupina. Broj stanica u profazi se smanjuje pri povećanju volumnog udjela otpadne vode. Kod volumnog udjela 10% uočene su 4 stanice u metafazi i 6 stanica u telofazi što je najveći broj stanica u telofazi u odnosu na ostale volumne udjele i kontrolnu skupinu.



Slika 2 Broj stanica u pojedinoj fazi mitoze pri različitim volumnim udjelima otpadne vode

U tablici 6 je vidljivo da se udio stanica u mitozu smanjuje s porastom volumnog udjela otpadne vode. Najmanji udio stanica u mitozu uočeno je kod 10% volumnog udjela otpadne vode. U najvećem udjelu su stanice u profazi mitoze, dok su udjeli ostalih faza znatno manji.

Tablica 6 Udio pojedine faze u mitozu kod *Allium cepa* L. pri različitim volumnim udjelima otpadne vode

	Ukupan broj stanica u mitozu	Profaza/%	Metafaza/%	Anafaza/%	Telofaza/%
Kontrola	69	95,65	2,9	1,45	0,0
0,5	66	92,42	1,52	1,52	3,03
1	62	91,94	0,0	0,0	3,23
2,5	54	90,74	1,85	0,0	0,0
5	55	83,64	0,0	0,0	5,45
10	50	56,0	8,0	0,0	12,0

Nakon izlaganja korjenčića 24 h različitim volumnim udjelima otpadne vode iz prerade maslina korjenčići su stavljeni na oporavak u destiliranu vodu još 24 h i potom mikroskopirane stanice te određivan mitotski indeks, udio pojedinih faza u mitozu te učestalost pojedinih kromosomskih aberacija.

U tablici 7 je vidljivo da se mitotski udio smanjuje s povećanjem volumnog udjela otpadne vode, ne postoji statistički značajna razlika jer su vrijednosti χ^2 -testa niži od 3,843. Pri 0,5% volumnom udjelu otpadne vode uočeno je 8 kromosomskih aberacija i to 7 c-mitoza i jedna stanica sa slijepljenim kromosomom. Najviše kromosomskih aberacija uočeno je kod volumnog udjela otpadne vode 1%, ukupno 9 od toga 6 c-mitoza, 2 anafazna mosta i jedna stanica sa slijepljenim kromosomom. Kod volumnog udjela 10% uočene su dvije stanice sa c-mitozom. Mikronukleusi i lutajući kromosomi nisu uočeni.

Iz slike 3 je vidljivo da je najveći udio stanica u interfazi i profazi. Broj stanica u pojedinoj fazi u diobi se smanjuje sa povećanjem volumnog udjela otpadne vode iako su korjenčići bili na oporavku. Kod volumnog udjela 0,5% 48 stanica je u profazi, 5 u metafazi, nisu uočene stanice u anafazi dok je 6 stanica bilo u telofazi. Kod volumnog udjela 1% 45 stanica je bilo u profazi, 3 u metafazi, nisu uočene stanice u anafazi, a u telofazi je bilo 6 stanica. Pri volumnom udjelu 2,5% i 5% 53 stanice su bile u profazi te nisu uočene stanice u metafazi. Kod volumnog udjela 5% nije bilo stanica u anafazi, a 2 stanice su

uočene u telofazi. Pri volumnom udjelu od 10% 44 stanice su bile u profazi, 1 stanica u metafazi, 4 stanice u anafazi i 2 stanice u telofazi.

Tablica 7 Određivanje mitotskog indeksa, X²-testa i mitotskih promjena kod korjenčića *Allium cepa* L. pri različitim volumnim udjelima otpadne vode iz prerade maslina nakon oporavka od 24 h

Volumni udio/%	Kiselost (pH)	Ukupan broj stanica	Broj stanica u mitozu	Mitotski indeks/%	χ^2	Mitotske i kromosomske aberacije					Ukupan broj aberacija
						C - mitoza	Anafazni mostovi	Lutajući kromosomi	Slijepjeni kromosomi	Mikronukleus	
Kontrola	7	140	69	49		0	0	0	0	0	0
0,5	7	143	67	47	0.008	7	0	0	1	0	8
1	7	137	63	46	0.001	6	2	0	1	0	9
2,5	6	137	59	43	0.007	0	0	0	0	0	0
5	6	134	55	41	0.01	0	0	0	0	0	0
10	5	136	53	39	0.02	2	0	0	0	0	2



Slika 3 Broj stanica u pojedinoj fazi mitoze pri različitim volumnim udjelima otpadne vode nakon oporavka od 24h

U tablici 8 je vidljivo da se udio stanica u mitozu smanjuje s porastom volumnog udjela otpadne vode iako su stanice bile na oporavku. Broj stanica u mitozu je veći u odnosu na stanice prije oporavka. Najmanji udio stanica u mitozu uočeno je kod 10% volumnog udjela otpadne vode. U najvećem udjelu su stanice u profazi mitoze, dok su udjeli ostalih faza znatno manji.

Tablica 8 Udio pojedine faze u mitozu kod *Allium cepa* L. pri različitim volumnim udjelima otpadne vode nakon oporavka od 24 h

	Ukupan broj stanica u mitozu	Profaza/%	Metafaza/%	Anafaza/%	Telofaza/%
Kontrola	69	95,65	2,9	1,45	0,0
0,5	67	71,64	7,46	0,0	8,96
1	63	71,43	4,76	0,0	9,52
2,5	59	89,83	0,0	3,39	6,78
5	55	96,36	0,0	0,0	3,64
10	53	83,02	1,89	7,55	3,77

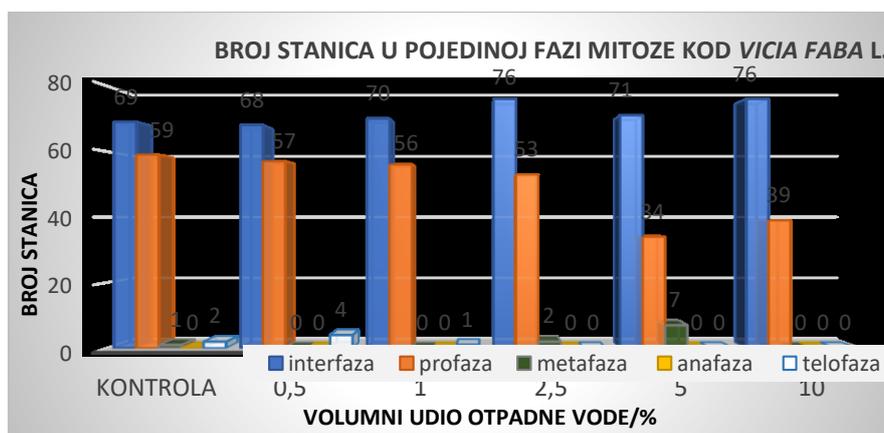
Kako bi utvrdili utjecaj otpadne vode iz prerade maslina na *Vicia faba* L. određen je mitotski indeks, te udio pojedinih faza mitoze te pojavu promjena u mitozu.

U tablici 9 je vidljivo da mitotski indeks opada s porastom volumnog udjela otpadne vode kojom su tretirani klijanci *Vicia faba* L. Pomoću χ^2 -testa izračunate su vrijednosti koje ne ukazuju na statistički značajne razlike iako su razlike uočene. Pri volumnom udjelu od 5% uočene su promjene u mitozu tj. 8 c-mitoza, 1 stanica sa anafaznim mostom. Kod volumnog udjela 10% uočeno je 5 stanica sa c-mitozom te 1 stanica sa slijepljenim kromosomima i mikronukleusa.

Tablica 9 Određivanje mitotskog indeksa, χ^2 -testa i mitotskih promjena kod korjenčića *Vicia faba* L. pri različitim volumnim udjelima otpadne vode iz prerade maslina

Volumni udio/%	Kiselost (pH)	Ukupan broj stanica	Broj stanica u mitozu	Mitotski indeks/%	χ^2	Mitotske i kromosomske aberacije					Ukupan broj aberacija
						C - mitoza	Anafazni mostovi	Lutajući kromosomi	Slijepljeni kromosomi	Mikronukleus	
Kontrola	7	132	63	48		1	0	0	0	0	1
0,5	7	129	61	47	0.0002	0	0	0	0	0	0
1	7	127	57	45	0.001	0	0	0	0	0	0
2,5	6	131	55	42	0.007	0	0	0	0	0	0
5	6	121	50	41	0.01	8	1	0	0	0	9
10	5	122	46	38	0.02	5	0	0	1	1	7

Iz slike 4 je vidljivo da je najveći udio stanica u interfazi i profazi. Udio pojedinih faza mitoze se smanjuje sa povećanjem volumnog udjela otpadne vode. Kod volumnog udjela 0,5%, 57 stanica je u profazi te 4 stanice u telofazi, u anafazi metafazi stanice nisu uočene. Kod volumnog udjela 1% 56 stanica je bilo u profazi te 1 stanica u telofazi. U anafazi i metafazi stanice nisu uočene. Pri volumnom udjelu 2,5% i 5% stanice u anafazi i telofazi nisu uočene dok pri 2,5% u profazi je bilo 53, a u metafazi 2% stanica. Kod 5% 34 stanice su bile u profazi, a 7 u metafazi. Pri volumnom udjelu 10% 39 stanica je bilo u profazi ostale faze mitoze nisu zamijećene.



Slika 4 Broj stanica u pojedinoj fazi mitoze pri različitim volumnim udjelima otpadne vode kod *Vicia faba* L.

Tablica 10 Udio pojedine faze u mitozu kod *Vicia faba* L. pri različitim volumnim udjelima otpadne vode

	Ukupan broj stanica u mitozu	Profaza/%	Metafaza/%	Anafaza/%	Telofaza/%
Kontrola	63	93,65	1,59	0,0	3,17
0,5	61	93,44	0,0	0,0	6,56
1	57	98,22	0,0	0,0	1,75
2,5	55	96,38	3,64	0,0	0,0
5	50	68,0	14,0	0,0	0,0
10	46	84,78	0,0	0,0	0,0

U tablici 10 je vidljivo da je najveći udio stanica koje se nalaze u profazi te da se udio stanica u svim fazama smanjuje porastom volumnog udjela otpadne vode. U anafazi stanice nisu uočene kod nijednog razrjeđenja otpadne vode. Udio telofaze se smanjuje porastom volumnog udjela otpadne vode te se iznad 2,5% stanice ne pojavljuju u toj fazi.

Nakon izlaganja klijanaca 24 h različitim volumnim udjelima otpadne vode iz prerade maslina, klijanci su stavljeni na oporavak u destiliranu vodu još 24 h i potom mikroskopirane stanice te određivan mitotski indeks, udio pojedinih faza u mitozu te učestalost pojedinih kromosomskih aberacija.

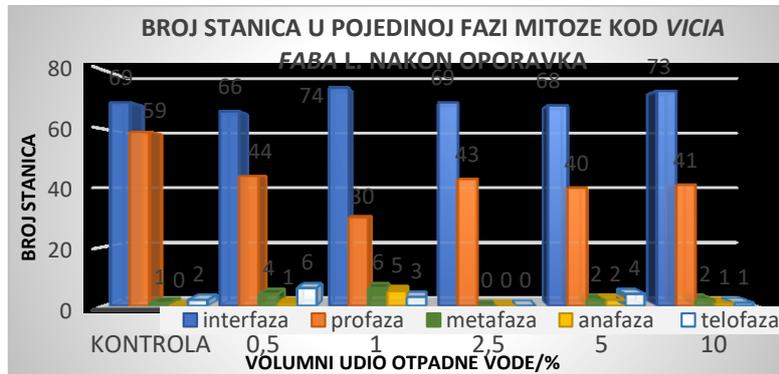
Tablica 11 Određivanje mitotskog indeksa, rezultata χ^2 -testa i mitotskih promjena kod korjenčića *Vicia faba* L. pri različitim volumnim udjelima otpadne vode iz prerade maslina nakon oporavka od 24 h

Volumni udio/%	Kiselost (pH)	Ukupan broj stanica	Broj stanica u mitozu	Mitotski indeks/%	χ^2	Mitotske i kromosomske aberacije					Ukupan broj aberacija
						C - mitozu	Anafazni mostovi	Lutajući kromosomi	Slijepljeni kromosomi	Mikronukleus	
Kontrola	7	132	63	48		1	0	0	0	0	1
0,5	7	122	56	46	0.0008	1	0	0	0	0	1
1	7	130	56	43	0.005	4	3	1	0	0	8
2,5	6	121	52	43	0.005	5	0	0	0	0	5
5	6	116	48	41	0.01	0	0	0	0	0	0
10	5	119	46	39	0.01	0	0	1	0	0	1

U tablici 11 je vidljivo da mitotski indeks opada s porastom volumnog udjela otpadne vode kojom su tretirani klijanci *Vicia faba* L. iako su bili na oporavku. Pomoću χ^2 -testa izračunate su vrijednosti koje ne ukazuju na statistički značajne razlike iako su razlike uočene. Najveći broj kromosomskih promjena uočen je kod volumnog udjela 1% i to 8 od čega 4 c-mitoza, 3 anafazna mosta i 1 stanica sa lutajućim kromosomom. 5 c-mitoza uočeno je kod 2,5% otpadne vode, kod 5% nije bilo kromosomskih aberacija, a kod 10% uočena je jedna stanica sa lutajućim kromosomom. Stanice sa slijepljenim kromosomima i mikronukleusi nisu uočene.

U slici 5 je vidljivo da se broj stanica u mitozu smanjuje sa porastom volumnog udjela otpadne vode iako su klijanci *Vicia faba* L. bili na oporavku, najveći broj stanica je u interfazi i profazi kod svih volumnih udjela. Broj stanica u profazi pri volumnom udjelu 0,5% je 44, 4 stanice su u metafazi, 1 u

anafazi te 6 u telofazi. Pri 1% 30 stanica je u profazi, 6 u metafazi, 5 u anafazi i 3 u telofazi. Kod 2,5% 43 stanice su u profazi u ostalim fazama nisu uočene stanice. Kod 5% 40 stanica je u profazi, po dvije u metafazi i anafazi te 4 u telofazi. Pri 10% razrjeđenju 41 stanica je bila u profazi, 2 u metafazi i po jedna u anafazi i telofazi.



Slika 5 Broj stanica u pojedinoj fazi mitoze pri različitim volumnim udjelima otpadne vode kod *Vicia faba* L. nakon oporavka

U tablici 12 je vidljivo da se udio stanica u diobi smanjuje porastom volumnog udjela otpadne vode. Udio stanica u profazi je najveći, ali za razliku od prije oporavka udio stanica u ostalim fazama je znatno veći. Izuzetak je razrjeđenje od 2,5% gdje je najveći udio stanica u profazi dok druge faze nisu ni uočene.

Tablica 12 Udio pojedine faze u mitozu kod *Vicia faba* L. pri različitim volumnim udjelima otpadne vode nakon oporavka od 24 h

	Ukupan broj stanica u mitozu	Profaza/%	Metafaza/%	Anafaza/%	Telofaza/%
Kontrola	63	93,65	1,59	0,0	3,17
0,5	56	78,57	7,14	1,79	10,71
1	56	53,57	10,71	8,93	5,36
2,5	52	82,69	0,0	0,0	0,0
5	48	83,33	4,17	4,17	8,33
10	46	89,13	4,35	2,17	2,17

RASPRAVA

Opći cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj otpadnih voda na promjene u mitozu kod *Allium cepa* L. i *Vicia faba* L. te utjecaj otpadnih voda kod prerade maslina na broj i intenzitet rasta korjenčića *Allium cepa* L. tretiranih različitim razrjeđenjima tj. volumnim udjelima otpadnih voda. Za praćenje promjena u mitozu korišteni su slijedeći parametri: mitotski indeks, udio pojedinih faza mitoze, učestalost i tipovi kromosomskih aberacija, a za praćenje broja i intenziteta rasta korjenčića *Allium cepa* L. mjereno je vrijeme i duljina korjenčića kroz vremenski interval od mjesec dana. Radi utvrđivanja statističkih odstupanja svi rezultati su obrađeni χ^2 -testom za analizu varijance. Naša pretpostavka je da otpadne vode iz prerade maslina uzrokuju smanjenu mitotsku aktivnost i povećavaju pojavnost kromosomskih aberacija kod bilja.

Na početku istraživanja izmjereno je pH otpadne vode iz prerade maslina. Oreščanin (2015) u svom radu navodi da je pH čiste otpadne vode 3-6, naša izmjerena vrijednost je bila 4. Na početku istraživanja lukovice *Allium cepa* L. su tretirane sa 100%, 50%, 20% otpadnom vodom, ali nisu klijali. El Hajjoui et al (2007) je proveo istraživanje na biljci *Vicia faba* L. i utvrdio da udio od 20% uzrokuje potpuni zastoj



mitotske aktivnosti, čemu su najveći uzrok sastavni fenolni spojevi (Oreščanin, 2015). Što je i potvrdilo naše istraživanje stoga su priređene otopine volumnih udjela 0,5%, 1%, 2,5%, 5% i 10%. Za 0,5% i 1% pH=7, 2,5% i 5% pH=6, a 10% pH=5.

U istraživanju je uočen usporen rast korjenčića *Allium cepa* L. u odnosu na kontrolnu skupinu što odgovara našoj pretpostavci. Također je potvrđena pretpostavka da će rast biti usporeniji kod korjenčića tretiranih većim volumnom udjelom otpadne vode. Kako bi bilo provjereno jesu li opažene razlike statistički značajne, korišten je statistički X^2 -test (uz $p=0,05$). Nakon 28. dana mjerenja uočena je statistički značajna razlika utvrđena pomoću X^2 -testa u duljini korjenčića tretiranih 10% volumnim udjelom otpadne vode u odnosu na duljinu korjenčića kontrolne skupine. Pretpostavka da otpadne vode iz prerade maslina uzrokuju i smanjenje broja korjenčića *Allium cepa* L. također je potvrđena i u skladu je sa istraživanjem Roša (1998), koji navodi da se *Allium*-test pokazao kao pogodan za utvrđivanje inhibicije rasta korjenčića, kromosomskih aberacija, kao i za ispitivanje raznih supstanci iz okoliša na proces mitoze. Istraživanje je pokazalo da je najmanji broj korjenčića *Allium cepa* L. kod volumnog udjela otpadne vode 10% i to smanjenje je vidljivo već nakon 7 dana tretiranja otpadnom vodom. Uočena je razlika u broju korjenčića tretiranih i manjim volumnim udjelom otpadne vode, a kod volumnog udjela 10% ta razlika je i statistički značajna).

Za praćenje promjena u mitozu korišten je mitotski indeks koji pokazuje smanjenje u odnosu na kontrolnu skupinu kod *Allium cepa* L. i smanjenje je izraženije kod većih volumnih udjela otpadne vode. Uočene su određene mitotske i kromosomske aberacije. Najveći broj aberacija uočen je pri volumnom udjelu otpadne vode od 10%. Na razini kromosoma uočene su lutajući kromosomi i mikronukleusi, aberacija na razini diobenog vretena je bila c-mitoza i anafazni most te subkromatidna aberacija slijepljenost kromosoma. Takve kromosomske aberacije je uočila i Roša (1998) u svom istraživanju utjecaja fosfogipsa na *Allium cepa* L. Udio pojedinih faza u mitozu također se razlikuje kod kontrolne skupine i skupina tretiranih otpadnim vodama. Uočeno je da je najviše stanica u interfazi i u profazi. Prema Krsnik Rasol i sur. (2015) u interfazi i profazi stanica se za vrijeme staničnog ciklusa najduže i nalazi u tim fazama. Uočeno smanjenje stanica u profazi sa porastom volumnog udjela otpadne vode ukazuje na mitodepresivan učinak otpadne vode, ali i mitostimulativan učinak volumnog udjela od 10% na stanice u telofazi. Nakon oporavka od 24h u destiliranoj vodi kod svih volumnih udjela otpadne vode uočen je porast mitotske aktivnosti u odnosu na stanice prije oporavka, ali te promjene nisu značajne te to ukazuje da bi oporavak trebao biti dulji. Broj kromosomskih aberacija je manji u odnosu na kromosomske aberacije prije oporavka stanica i smanjenje je izraženije kod većih volumnih udjela otpadne vode. Kod volumnog udjela 0,5% i 1% primijećen je veći broj kromosomskih aberacija u odnosu na veće volumne udjele otpadne vode, javljaju se aberacije na razini diobenog vretena: c-mitose i anafazni mostovi te subkromatidna aberacija slijepljenost kromosoma. Broj stanica u profazi i interfazi je i nakon oporavka veći u odnosu na ostale faze staničnog ciklusa, pri većem volumnom udjelu od 10% nije uočen veći broj stanica u telofazi to ukazuje da oporavak ne djeluje mitostimulativno.

Za praćenje promjena u mitozu korišten je mitotski indeks koji pokazuje smanjenje u odnosu na kontrolnu skupinu kod *Vicia faba* L. i smanjenje je izraženije kod većih volumnih udjela otpadne vode (tablica 9). Uočene su određene mitotske i kromosomske aberacije. Najveći broj aberacija uočen je pri



volumnom udjelu otpadne vode od 5 i 10%. Na razini kromosoma uočene su lutajući kromosomi i mikronukleusi, aberacija na razini diobenog vretena je bila c-mitoza te subkromatidna aberacija slijepljenost kromosoma. Ukupan broj kromosomskih i mitotskih aberacija kod *Vicia faba* L., koji je manji od onog opaženog u *Allium cepa* L., mogle bi biti posljedica razlike u veličini kromosoma. Uočeno je da je najviše stanica u interfazi i u profazi, porast volumnog udjela otpadne vode djeluje mitodepresivno i kod 10% udjela uočene su stanice samo u profazi. Nakon oporavka od 24 h u destiliranoj vodi kod svih volumnih udjela otpadne vode uočen je porast mitotske aktivnosti u odnosu na stanice prije oporavka, ali te promjene nisu značajne. Broj kromosomskih aberacija je manji u odnosu na kromosomske aberacije prije oporavka stanica i smanjenje je izraženije kod većih volumnih udjela otpadne vode. Veći broj kromosomskih aberacija uočen je kod 1 i 2,5 %, dok se kod 5 i 10% broj aberacija manji u odnosu na stanice prije oporavka. Nakon oporavka udio stanica u profazi je manji, a udio stanica u drugim fazama veći u odnosu na stanice prije oporavka. Samo kod 2,5% volumnog udjela nađene su stanice samo u profazi. Rezultati ukazuju da oporavak djeluje mitostimulativno na meristemske stanice *Vicia faba* L. El Hajjoui et al (2007) je proveo istraživanje na biljci *Vicia faba* L., kod koje udio od 10 % otpadnih voda uzrokuje povećanje mikronukleusa to je potvrdilo i naše istraživanje jer se kod 10% volumnog udjela uočio mikronukleus, a nakon oporavka ih nismo uočili (Oreščanin, 2015).

Provedeno istraživanje ima primjenu u poljoprivredi te zaštiti okoliša jer uočene promjene u mitozu ukazuju na mutageno djelovanje otpadnih voda te je nužna ugradnja sustava za pročišćavanje otpadnih voda u uljarama i pravilno zbrinjavanje otpadnih voda iz procesa prerade maslina.

ZAKLJUČCI

Na osnovu provedenog istraživanja doneseni su slijedeći zaključci:

- ✔ rast korjenčića *Allium cepa* L. je usporen djelovanjem otpadne vode iz procesa prerade maslina te veći volumni udio otpadne vode više inhibira rast korjenčića *Allium cepa* L.;
- ✔ broj korjenčića *Allium cepa* L. izloženih djelovanju otpadne vode je manji u odnosu na kontrolnu skupinu i smanjuje se porastom volumnog udjela otpadne vode;
- ✔ otpadne vode iz prerade maslina uzrokuju smanjenu mitotsku aktivnost i povećavaju pojavnost mitotskih i kromosomskih aberacija kod *Allium cepa* L. i *Vicia faba* L.;
- ✔ u najvećem udjelu je bila interfaza i profaza kod obje biljke, ostale faze mitoze su bile u manjem udjelu;
- ✔ uočene su slijedeće mitotske i kromosomske aberacije: c-mitoza, anafazni mostovi, mikronukleus, slijepljenost kromosoma, lutajući kromosomi;
- ✔ učestalost i vrste mitotskih i kromosomskih aberacija ovise o udjelu otpadne vode i vrsti biljke;
- ✔ nakon oporavka klijanca od 24h u destiliranoj vodi povećava se mitotska aktivnost kod obje biljke i smanjuje pojavnost mitotskih i kromosomskih aberacija;
- ✔ uočene promjene u mitozu ukazuju na mutageno djelovanje otpadnih voda iz prerade maslina te je nužna ugradnja sustava za pročišćavanje otpadnih voda u uljarama i pravilno zbrinjavanje otpadnih voda iz procesa prerade maslina.



LITERATURA

- Barbério A. 2013. Bioassays with plants in the monitoring of water quality, water treatment, <http://www.intechopen.com/books/water-treatment/bioassays-with-plants-in-the-monitoring-of-water-quality>, pristupljeno 1.10.2016.
- Firbas P., Amon T. 2013. Allium chromosome aberration test for evaluation effect of cleaning municipal water with constructed wetland (CW) in Sveti Toma, Journal of Bioremediation & Biodegradation <https://www.omicsonline.org/allium-chromosome-aberration-test-for-evaluation-effect-of-cleaning-municipal-water>, pristupljeno 1.10.2016
- Krsnik Rasol M., Krajačić M., Lukša Ž. 2015. Organizacija nasljedne tvari i stanični ciklus, U Čorić S. (ur.), Život 1. Školska knjiga, d.d., Zagreb, str. 120-122.
- Oreščanin V. 2015. Toksični učinci otpadne vode od prerade maslina, Gospodarenje otpadom, <http://gospodarenjeotpadom.hr/toksicni-ucinci-otpadne-vode-od-prerade-maslina/>, pristupljeno 12.10.2016.
- Pavlica M., Balabanić J. 2016. Mutacije gena i kromosoma, U Draganović Matekalo (ur.), Genetika i evolucija. Školska knjiga, d.d., Zagreb, str.41-45.
- Roša J. 1998. Utjecaj fosfogipsa iz industrijskog odlagališta na hrast lužnjak (*Quercus robur*)/The influence of phosphogypsum from an industrial dump on the pedunculate oak (*Quercus robur*). Šumarski list 11-12: 491-506.

UTJECAJ BILJNIH AKTIVNIH TVARI NA SPOSOBNOST OKSIDACIJE MELANINA VODIKOVIM PEROKSIDOM

Pamela Bubaš, 4. razred

Gimnazija Petra Preradovića, Virovitica

Mentor: Ines Tovarović

SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti kako različite koncentracije vodikovog peroksida u vodenoj otopini utječu na razgradnju melanina u kosi i kako na oksidativna svojstva vodikovog peroksida utječe dodatak biljnih pigmenta i vitamina C u reakcijsku smjesu. Biljne pigmente izolirala sam procesom ekstrakcije iz zelenih listova. Proces sam započela postupkom maceriranja listova trave koje sam nakon toga kuhala u etanolu. Smjesu sam nakon kuhanja i hlađenja filtrirala. Biljne pigmente izdvojila sam iz filtrata pomoću benzena, 20 %-tne alkoholne otopine lužine i destilirane vode. Vodene otopine vodikova peroksida različitih koncentracija dobila sam razrjeđivanjem 30 %-tne vodene otopine H₂O₂. Razrjeđenje sam provela dodavanjem određenog volumena vode u koncentriraniju otopinu. U istraživanju sam koristila pigmente karotene, klorofile i ksantofile. Koristila sam kosu kao izvor melanina. Ukupno sam provodila 5 ispitivanja. Prvo ispitivanje bilo je bez biljnih pigmenta kako bih ispitala oksidaciju samog vodikova peroksida na kosu. U drugoj skupini reakcijskih smjesa ispitivalo se antioksidativno djelovanje ksantofila, u trećoj skupini klorofila, u četvrtoj karotena, a u petoj vitamina C. U svakoj skupini ispitivanja su provođena u šest reakcijskih smjesa koje su se razlikovale prema koncentraciji vodikovog peroksida. Istraživanje je pokazalo da biljne aktivne tvari smanjuju svoje antioksidativno djelovanje povećanjem koncentracije vodikovog peroksida. Također je pokazalo da uz prisutnost svjetlosti najjače antioksidativno djelovanje ima karoten. Klorofil pokazuje prooksidativno djelovanje. Ksantofil i vitamin C ne pokazuju znatnije antioksidativno niti prooksidativno djelovanje.

Ključne riječi: antioksidansi, slobodni radikali, biljni pigmenti, vitamin C

UVOD

Zbog ubrzanog načina života, stresa i manjka tjelovježbe naše tijelo izloženo je brojnim negativnim čimbenicima koji utječu na naše zdravlje. U našem organizmu, pod utjecajem različitih negativnih čimbenika, nastaju molekule koje nazivamo slobodni radikali. Slobodni radikali su jaki oksidansi koji zbog manjka elektrona napadaju druge molekule, najčešće bjelančevine, lipide i ugljikohidrate i uzimaju im elektrone. Na taj način oštećuju i uništavaju stabilne molekule koje postaju destabilizirane i one postaju slobodni radikali što rezultira stvaranjem sve većeg broja slobodnih radikala koji oštećuju osnovne građevne jedinice u našem tijelu – stanice. Reakcija vezivanja postaje lančana i ona se naziva oksidativni stres. Time stanice gube svoj integritet, dolazi do njihovog oštećenja ili postaju potpuno nefunkcionalne. Upravo zbog toga, slobodni radikali smatraju se glavnim uzrokom starenja i nastanka brojnih bolesti. Slobodni radikali mogu djelovati na građu molekule DNA i uzrokovati njena oštećenja. Promjene u genima dovode do mutacija, a mutacije stanica mogu dovesti i do malignih stanica i teških oštećenja stanica. Vodikov peroksid poznat je kao tvar koja se koristi za izbjeljivanje kose pa me zanimalo kako će na proces promjene melanina u kosi utjecati koncentracija vodikovog peroksida u vodenoj otopini. Vodikov peroksid je jedno od najjačih oksidacijskih sredstava koje, ovisno o koncentraciji, može uzrokovati vrlo teška oštećenja tkiva. Upotrebljava se za izbjeljivanje kose. Najčešći postupak izbjeljivanja kose je „blajhanje“. Blajh je prah koji pomiješan s vodikovim peroksidom stvara kemijsku reakciju na kosi i razara njezin prirodni pigment melanin. Prvo se sloj glatkih kutikula kose omekša pomoću amonijaka u blajhu kako bi postao propustan za tekućinu za izbjeljivanje. Pod utjecajem blajha, pH-vrijednost raste te kosa bubri i njezin se gornji sloj, kutikula, otvara kako bi izbjeljujući sastojci mogli prodrijeti u vlas. Tako vodikov peroksid može prodrijeti duboko u vlas gdje



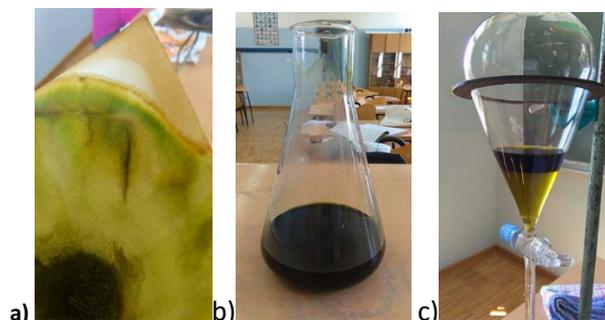
oksidira postojeće pigmente koji postaju bezbojni. Kako bi se naše tijelo obranilo od slobodnih radikala u organizam je potrebno unositi antioksidanse. Oni stabiliziraju slobodne radikale i sprječavaju pokretanje slijeda kemijskih reakcija (oksidativni stres) koji uzrokuje oštećivanje stanica. Antioksidansi se u našem tijelu mogu sintetizirati ili se u organizam mogu unositi putem prehrane (vitamin C) te kozmetičkih preparata (vitamin E). Biljne aktivne tvari pokazuju antioksidativna svojstva. U mnogim biokemijskim mehanizmima, koji su zaslužni za starenje, važnu ulogu imaju biološki aktivni spojevi prirodnog podrijetla, posebice biljni pigmenti. Biljni pigmenti imaju antioksidativni karakter (Lević i sur, 2008). Po kemijskom sastavu, pigmenti su porfirini, karotenoidi i flavonoidi. Porfirini se nalaze u obliku klorofila u zelenim biljkama. Karotenoidi su moćne fitokemikalije koje djeluju kao snažni antioksidansi i imaju antikarcinogena svojstva. Dije se u dvije skupine: karoteni (narančasti pigmenti) i ksantofili (žuti pigmenti). Vitamin C ili askorbinska kiselina je vitamin topljiv u vodi. Najjači je antioksidans među vitaminima topljivim u vodi. Zbog svog snažnog antioksidativnog potencijala, aktivnosti u biosintetskom putu kolagena, kao i fotozaštitnog učinka, vitamin C se opravdano koristi u prevenciji oštećenja i tretiranju prerano ostarjele kože. U uvjetima koje imamo u školi nemoguće je pratiti utjecaj mutagena na molekulu DNA pa sam odlučila svoj rad temeljiti na istraživanju utjecaja vodikovog peroksida na pigment kojeg svi imamo u svom tijelu, a to je melanin. Opći cilj ovog istraživačkog rada je odrediti kako različite koncentracije vodikovog peroksida u vodenoj otopini utječu na razgradnju melanina u kosi i kako na oksidativna svojstva vodikovog peroksida utječe dodatak biljnih pigmentata (klorofila, ksantofila i karotena) i vitamina C u reakcijsku smjesu. Prije samog eksperimenta postavila sam hipotezu koja glasi: biljne aktivne tvari smanjuju oksidaciju melanina vodikovim peroksidom. Sukladno hipotezi postavila sam tri cilja. Specifični cilj 1: karoteni će pokazati najslabije antioksidativno svojstvo jer se otapaju u benzenu koji je organsko otapalo pa se ne miješa s vodom. Specifični cilj 2: vitamin C će pokazivati najjači antioksidativni učinak (kosa će najmanje posvijetliti). Specifični cilj 3: antioksidativna svojstva biljnih aktivnih tvari smanjit će se porastom koncentracije vodikova peroksida u reakcijskoj smjesi.

METODE RADA

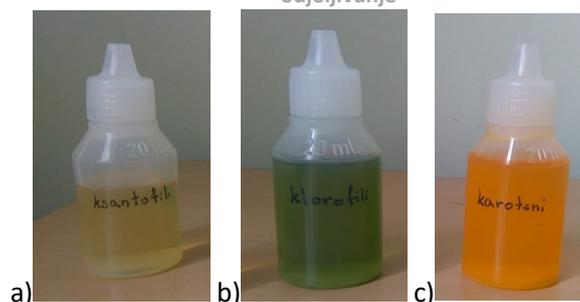
Izolacija pigmentata iz listova trave

Biljni pigmenti izolirani su procesom ekstrakcije iz zelenih listova trave koje sam prikupila u okolišu škole. Proces je započet postupkom maceriranja listova trave (pomoću tučka i tarionika) koji su nakon toga kuhani u etanolu. Smjesa je nakon kuhanja i hlađenja filtrirana (slika 1a). Filtrat koji je dobiven sadrži biljne pigmente koje je potrebno razdvojiti (slika 1b). Razdvajanje pigmentata provedeno je lijevkom za odjeljivanje. Klorofil *a* i *b*, te karoteni izdvojeni su iz smjese uz pomoć benzena. Benzen je korišten u prozračenoj prostoriji jer u školi nemamo digestor. Benzenom je rukovano oprezno koristeći rukavice i zaštitnu kutu. Na taj su način u alkoholnom sloju ostali samo ksantofili (slika 1c). Pomoću menzure odvojeno je 20 mL otopine koja je potom dodana u lijevak za odijeljivanje. Zatim je u isti lijevak za odijeljivanje dodano 10 – 20 mL benzena i nekoliko puta dobro je protresen lijevak. Tijekom protresanja povremeno je otvaran ventil na lijevku. Zatim je lijevak stavljen na stalak i izvađen je čep. Donji sloj ostao je zelen pa je zbog toga dodano još benzena. U gornjem, zelenom, benzenskom sloju nalaze se klorofil *a* i *b* te karoteni, a u donjem, žutom, alkoholnom sloju ksantofili. Ksantofile su ispušteni iz lijevka, a u preostalu smjesu klorofila i karotena dodan je približno isti volumen 20%-tne alkoholne otopine lužine (KOH). Protresanjem smjese u lijevku za odjeljivanje razdvojio se narančasti benzenski sloj u kojem su karoteni (gornji sloj) i modrozeleni alkoholni sloj u kojem se nalaze klorofil *a*

i b (donji sloj). Kada su se slojevi odvojili prvo je ispušten donji sloj, u kojem su klorofili, potom je dio gdje se slojevi dodiruju bačen i na kraju je ispušten u epruvetu gornji sloj u kojem su karoteni (slika 2).



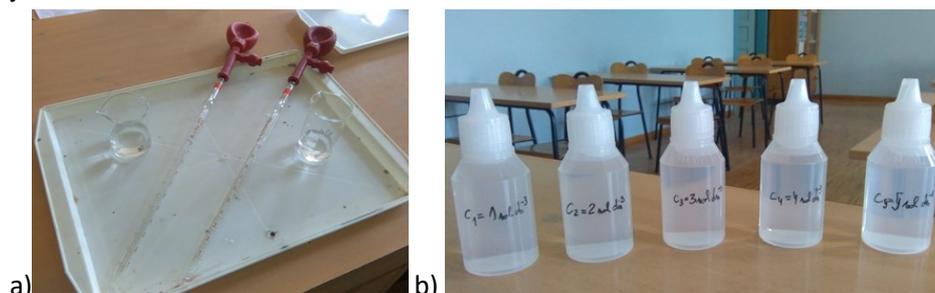
Slika 1 a) filter papir nakon filtriranja, b) etanolna otopina pigmenta c) Odijeljeni slojevi biljnih pigmenta u lijevku za odjeljivanje



Slika 2 Otopine pigmenta: a) etanolna otopina klorofila, b) benzenska otopina karotena, c) etanolna otopina ksantofila

Razrjeđivanje H_2O_2

Vodne otopine vodikova peroksida različitih koncentracija dobila sam razrjeđivanjem 30%-tne vodene otopine H_2O_2 . Razrjeđenje sam provela dodavanjem određenog volumena vode u koncentriraniju otopinu. Potreban volumen vode kod svakog razrjeđenja računala sam prema formulama: $c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$ i $V_3 = V_2 - V_1$, pri čemu je V_1 volumen koncentriranije otopine (30%-tne otopine H_2O_2), c_1 množinska koncentracija koncentriranije otopine ($c(H_2O_2) = 9,7895 \text{ mol dm}^{-3}$), V_2 volumen razrijeđenije otopine, c_2 množinska koncentracija razrijeđenije otopine i V_3 volumen vode. Množinska koncentracija prve otopine je 1 mol dm^{-3} , a pete otopine 5 mol dm^{-3} . Nakon izračunavanja potrebnog volumena vode i volumena vodikovog peroksida krenula se s pripremom tih otopina. Pomoću pipete i propipete (slika 3a) odredila sam potrebni volumeni vode i 30%-tne otopine vodikovog peroksida u bočici s kapaljkom (slika 3b). Postupak sam provela za pet vodenih otopina vodikova peroksida različitih množinskih koncentracija.



Slika 3 a) Pribor za razrjeđenje otopina (propipeta, pipeta i čaše); b) pripremljene vodene otopine vodikovog peroksida različitih koncentracije ($c_1 = 1 \text{ mol dm}^{-3}$, $c_2 = 2 \text{ mol dm}^{-3}$, $c_3 = 3 \text{ mol dm}^{-3}$, $c_4 = 4 \text{ mol dm}^{-3}$, $c_5 = 5 \text{ mol dm}^{-3}$)

Pramen kose

Kosa korištena za izvođenje pokusa je moja. Tamno smeđe je boje. Pramenovi kose na kojima sam provodila ispitivanja bili su dugi oko 2 centimetra i sadržavali su stotinjak vlasi. Ukupno ih je bilo 30. Svaki pramen učvrstila sam tako da sam ga povezala plastičnom niti (slika 4).



Slika 4 Jedan od pramenova kose korištenih u eksperimentu

Nakon pokusa razinu svijetljenja mjerila sam prema ljestvici koja se zove *Hair Color Chart* (slika 5). Ona se koristi u salonima za uljepšavanje kose i u rasponu je od 1 do 12 gdje je najtamnija nijansa kose (crna boja) označena brojem 1, a broj 12 označuje najsvjetliji ton boje kose (plava boja). Uspoređujući moju kosu s ljestvicom odredila sam da je moja kosa nijanse broj 2. Svijetljenjem je moja kosa došla do nijanse broj 10 po ljestvici.



Slika 5 Slika lijevo prikazuje ljestvicu po kojoj se određuju nijanse boje kose, a slika desno prikazuje nijanse smeđe kose u stupnjevima svijetljenja prema ljestvici lijevo.

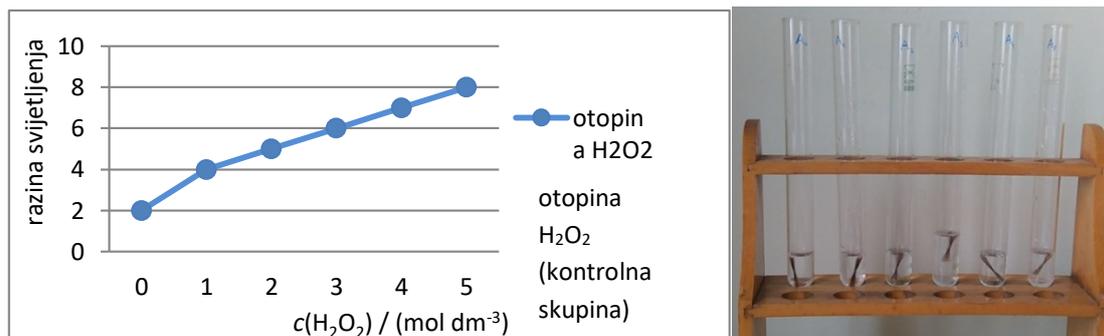
Djelovanje H_2O_2 i biljnih pigmentata

Pratila sam djelovanje otopina različitih koncentracija vodikovog peroksida na kosu, djelovanje otopine vodikovog peroksida uz dodatak klorofila, zatim djelovanje otopine vodikovog peroksida uz dodatak karotena, djelovanje otopine vodikovog peroksida uz dodatak ksantofila i na kraju djelovanje otopine vodikovog peroksida uz dodatak 1,5 %-tne vodene otopine askorbinske kiseline odnosno vitamina C. U epruvetama se nalaze vodena otopina vodikovog peroksida, pramen kose i dvadesetak kapi otopine pigmentata (karoteni, ksantofili ili klorofili) odnosno askorbinske kiseline. Radi lakšeg praćenja uzoraka označila sam svaku skupinu otopina slovima (od A do E) i brojevima (od 0 do 5), npr. otopina vodikovog peroksida s karotenima koncentracije 1 mol dm^{-3} označena je s B₁, sljedeća s koncentracijom 2 mol dm^{-3} označena je s B₂ itd. Također kod svake skupine otopina je i kontrolna skupina označena brojem 0, npr. C₀ u kojoj se ne nalazi vodikov peroksid nego samo voda i otopina pigmenta odnosno vitamina C kako bi provjerila djelovanje samih pigmentata odnosno vitamina C na melanin u kosi. Nakon pripremljenih uzoraka promatrala sam promjene koje se događaju na kosi i bilježila opažanja.

REZULTATI

Reakcije biljnih aktivnih tvari i vodikovog peroksida na melanin

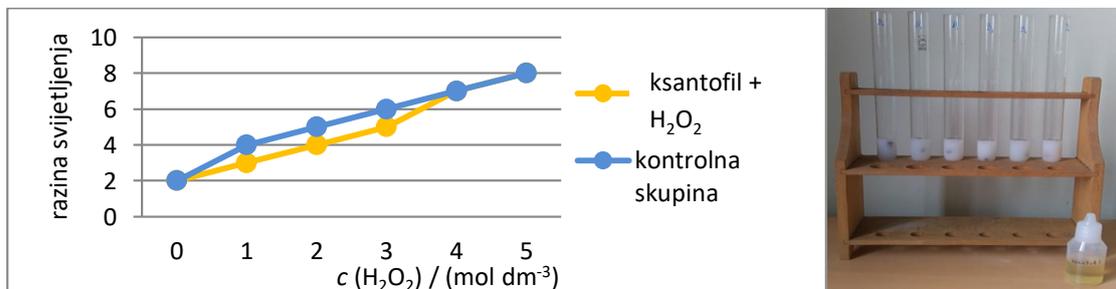
U prvoj skupini (A skupina), ispitivala sam djelovanje samo otopine vodikovog peroksida na melanin. Skupinu A ili kontrolnu skupinu koristila sam za ispitivanje svijetljenja kose s porastom koncentracije H_2O_2 bez prisutnosti biljnih pigmenata (slika 6) i kasnije kao usporedbu kod djelovanja H_2O_2 na oksidaciju melanina kojem su dodani biljni pigmenti ili vitamin C. Odredila sam da će vrijeme svih reakcija prilikom ispitivanja biti 60 minuta. Nakon nekog vremena primijetila sam da se u epruvetama počinju stvarati mjehurići na vlasima kose. Količina mjehurića rasla je s porastom koncentracije vodikova peroksida. Nakon 60 minuta svaki pramen kose izvadila sam iz epruvete, isprala ga vodom i osušila. Isto sam ponovila i kod sljedećih reakcijskih smjesa. Kosa je u prvoj reakcijskoj smjesi (skupina A), na kojoj sam ispitivala stupanj oksidacije, posvijetlila do razine 8. Najjače je posvijetlila ona u vodenoj otopini najveće koncentracije H_2O_2 . Stupnjeve oksidacije određivala sam prema skali *Hair Colour Chart*. U prvoj reakcijskoj smjesi u kojoj je koncentracija H_2O_2 bila 1 mol dm^{-3} došlo je do najvećeg skoka u svijetljenju obzirom na izvornu boju kose (s 2 na 4) (slika 6). Kod ostalih reakcijskih smjesa stupanj svijetljenja povećavao se linearno. U 2. reakcijskoj smjesi u kojoj je koncentracija vodikovog peroksida bila 2 mol dm^{-3} stupanj svijetljenja bio je s 2 na 5. U 3. reakcijskoj smjesi u kojoj je koncentracija vodikovog peroksida bila 3 mol dm^{-3} stupanj svijetljenja bio je s 2 na 6. U 4. reakcijskoj smjesi u kojoj je koncentracija vodikovog peroksida bila 4 mol dm^{-3} stupanj svijetljenja bio je s 2 na 7. U 5. reakcijskoj smjesi u kojoj je koncentracija vodikovog peroksida bila 5 mol dm^{-3} stupanj svijetljenja bio je s 2 na 8.



Slika 6 Lijevo: Stupnjevi svijetljenja kose u reakcijskim smjesama A (s dodatkom vodikovog peroksida – KONTROLNA SKUPINA); Desno: Reakcijske smjese skupine A (samo uz dodatak vodene otopine vodikovog peroksida – KONTROLNA SKUPINA)

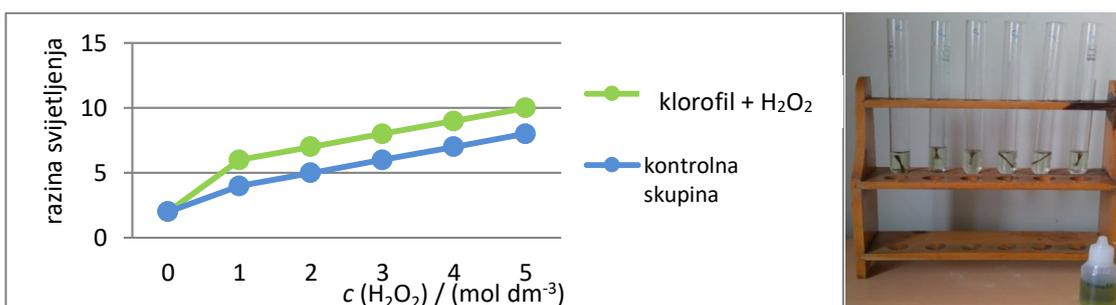
U drugoj skupini (B skupina) uz vodikov peroksid u svaku reakcijsku smjesu dodavala sam i pigment ksantofil (slika 7). To je bila alkoholna otopina koja se s vodenom otopinom vodikovog peroksida miješala. Dodavala sam 20 kapi otopine ksantofila u svaku reakcijsku smjesu u skupini B. Miješanjem vodikovog peroksida i otopine ksantofila smjesa je postala mutna i bijela. Reakcija je bila trenutna. Tijekom reakcije pojavljivali su se mjehurići na površini vlasi kose kao u prethodnoj ispitivanoj skupini u kojoj nije bilo dodatka ksantofila. Kosa na kojoj sam ispitivala stupanj oksidacije posvijetlila je do razine 8. Najjače je posvijetlila ona u najvećoj koncentraciji H_2O_2 . Stupnjeve oksidacije određivala sam prema skali *Hair Colour Chart*. Pri manjim koncentracijama stupanj svijetljenja povećavao se linearno. Do najvećeg skoka u svijetljenju došlo je u 4. reakcijskoj smjesi gdje je koncentracija H_2O_2 bila 4 mol dm^{-3} (s 2 na 7) (slika 7). U 1. reakcijskoj smjesi u kojoj je koncentracija vodikovog peroksida bila 1 mol dm^{-3}

dm⁻³ stupanj svijetljenja bio je s 2 na 3. U 2. reakcijskoj smjesi u kojoj je koncentracija vodikovog peroksida bila 2 mol dm⁻³ stupanj svijetljenja bio je s 2 na 4. U 3. reakcijskoj smjesi u kojoj je koncentracija vodikovog peroksida bila 3 mol dm⁻³ stupanj svijetljenja bio je s 2 na 5. U 4. reakcijskoj smjesi u kojoj je koncentracija vodikovog peroksida bila 4 mol dm⁻³ stupanj svijetljenja bio je s 2 na 7. U 5. reakcijskoj smjesi u kojoj je koncentracija vodikovog peroksida bila 5 mol dm⁻³, stupanj svijetljenja bio je s 2 na 8. U usporedbi s A skupinom u B skupini kosa je posvijetlila do jednake razine. Ksantofil nije pokazao ni antioksidativno ni prooksidativno djelovanje.



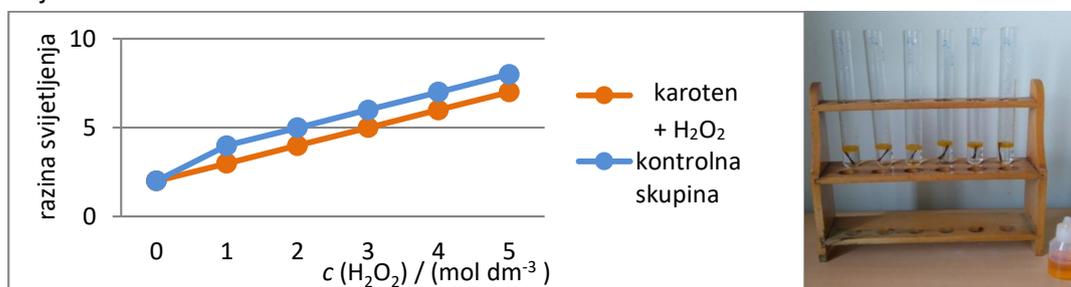
Slika 7 Lijevo: Usporedba stupnjeva svijetljenja kose u reakcijskim smjesama u skupini A (kontrolna skupina) i B (uz dodatak ksantofila); Desno: Reakcijske smjese skupine B (uz dodatak otopine ksantofila)

U trećoj skupini (C skupina) uz vodikov peroksid u reakcijsku smjesu dodavala sam i pigment klorofil (slika 8). To je bila alkoholna otopina koja se s otopinom vodikovog peroksida i vode miješala. Dodavala sam 20 kapi otopine klorofila u svaku reakcijsku smjesu skupine C. Miješanjem vodenih otopina vodikovog peroksida s otopinom klorofila smjesa je bila bistra i svijetlo zelena. Tijekom reakcije pojavljivali su se mjehurići na površini vlasi kose kao u ispitivanoj skupini A u kojoj nije bilo dodatka klorofila. Nakon 60 minuta svaki pramen kose izvadila sam iz epruvete, isprala ga vodom i osušila. Kosa na kojoj sam ispitala stupanj oksidacije posvijetlila je do razine 10. Najjače je posvijetlila ona u reakcijskoj smjesi s najvećom koncentracijom H₂O₂. Stupnjeve oksidacije određivala sam prema skali *Hair Colour Chart*. Pri većim koncentracijama stupanj svijetljenja povećavao se linearno (slika 8). Do najvećeg skoka u svijetljenju došlo je u 1. reakcijskoj smjesi gdje je koncentracija H₂O₂ bila 1 mol dm⁻³ (s 2 na 6). U 2. reakcijskoj smjesi u kojoj je koncentracija vodikovog peroksida bila 2 mol dm⁻³ stupanj svijetljenja bio je s 2 na 7. U 3. reakcijskoj smjesi u kojoj je koncentracija vodikovog peroksida bila 3 mol dm⁻³ stupanj svijetljenja bio je s 2 na 8. U 4. reakcijskoj smjesi u kojoj je koncentracija vodikovog peroksida bila 4 mol dm⁻³ stupanj svijetljenja bio je s 2 na 9. U 5. reakcijskoj smjesi u kojoj je koncentracija vodikovog peroksida bila 5 mol dm⁻³ stupanj svijetljenja bio je s 2 na 10. U usporedbi sa skupinom A u skupini C došlo je do jačeg svijetljenja kosa. Klorofil je pokazao prooksidativno djelovanje.



Slika 8 Lijevo: Usporedba stupnjeva svijetljenja kose u reakcijskim smjesama u skupini A (kontrolna skupina) i C (uz dodatak klorofila); Desno: Reakcijske smjese skupine C (uz dodatak otopine klorofila)

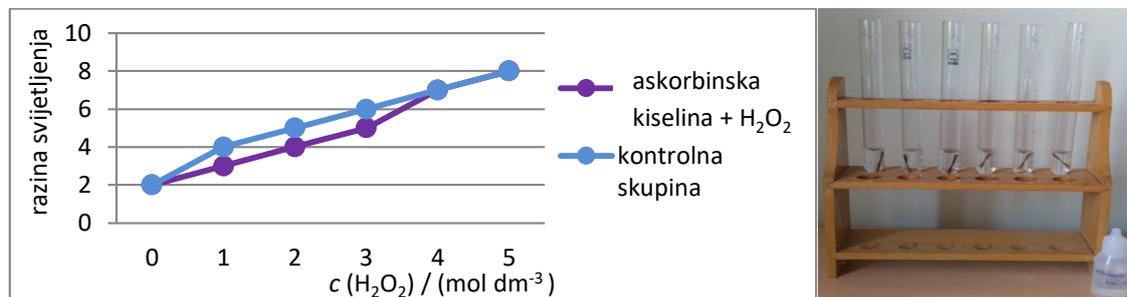
U četvrtoj skupini (D skupina) uz vodikov peroksid u reakcijsku smjesu dodavala sam i pigment karoten (slika 9). To je bila benzenska otopina koja se s otopinom vodikovog peroksida i vode nije miješala nego je otopina karotena ostala na površini otopine vodikova peroksida, pa sam zbog toga tijekom vremena reakcije povremeno protresala svaku epruvetu. Dodavala sam 20 kapi otopine karotena po svakom mjerenju. Tijekom reakcije pojavljivali su se mjehurići na površini vlasi kose kao u ispitivanoj skupini A u kojoj nije bilo dodatka karotena. Kosa na kojoj sam ispitivala stupanj oksidacije posvijetlila je do razine 7. Najjače je posvijetlila ona u najvećoj koncentraciji H_2O_2 . Stupnjeve oksidacije određivala sam prema skali *Hair Colour Chart*. Stupanj svijetljenja povećavao se linearno (slika 9). Do skokova u svijetljenju nije došlo. U 1. reakcijskoj smjesi gdje je koncentracija H_2O_2 bila 1 mol dm^{-3} stupanj svijetljenja bio je s 2 na 3. U 2. reakcijskoj smjesi u kojoj je koncentracija vodikovog peroksida bila 2 mol dm^{-3} stupanj svijetljenja bio je s 2 na 4. U 3. reakcijskoj smjesi u kojoj je koncentracija vodikovog peroksida bila 3 mol dm^{-3} stupanj svijetljenja bio je s 2 na 5. U 4. reakcijskoj smjesi u kojoj je koncentracija vodikovog peroksida bila 4 mol dm^{-3} stupanj svijetljenja bio je s 2 na 6. U 5. reakcijskoj smjesi u kojoj je koncentracija vodikovog peroksida bila 5 mol dm^{-3} stupanj svijetljenja bio je s 2 na 7. U usporedbi sa skupinom A u skupini D kosa je slabije posvijetlila. Karoten je pokazao antioksidativno djelovanje.



Slika 9 Lijevo: Usporedba stupnjeva svijetljenja kose u reakcijskim smjesama u skupini A (kontrolna skupina) i D (uz dodatak karotena); Desno: Reakcijske smjese skupine D (uz dodatak otopine karotena)

U petoj skupini (E skupina), uz vodikov peroksid, u reakcijsku smjesu dodavala sam i askorbinsku kiselinu (vitamin C) (slika 10). To je bila kisela vodena otopina koja se s vodenom otopinom vodikovog peroksida miješala. Smjesa je bila prozirna i bezbojna. Dodavala sam 20 kapi askorbinske kiseline po svakom mjerenju. Tijekom reakcije pojavljivali su se mjehurići na površini vlasi kose kao u prethodnoj ispitivanoj skupini u kojoj nije bilo dodatka askorbinske kiseline. Nakon 60 minuta svaki pramen kose izvadila sam iz epruvete, isprala ga vodom i osušila. Kosa na kojoj sam ispitivala stupanj oksidacije posvijetlila je do razine 8. Najjače je posvijetlila ona u najvećoj koncentraciji H_2O_2 . Stupnjeve oksidacije određivala sam prema skali *Hair Colour Chart*. Pri manjim koncentracijama stupanj svijetljenja povećavao se linearno (slika 10). Do najvećeg skoka u svijetljenju došlo je u 4. reakcijskoj smjesi gdje je koncentracija H_2O_2 bila 4 mol dm^{-3} (s 2 na 7). U 1. reakcijskoj smjesi u kojoj je koncentracija vodikovog peroksida bila 1 mol dm^{-3} stupanj svijetljenja bio je s 2 na 3. U 2. reakcijskoj smjesi u kojoj je koncentracija vodikovog peroksida bila 2 mol dm^{-3} stupanj svijetljenja bio je s 2 na 4. U 3. reakcijskoj smjesi u kojoj je koncentracija vodikovog peroksida bila 3 mol dm^{-3} stupanj svijetljenja bio je s 2 na 5. U 4. reakcijskoj smjesi u kojoj je koncentracija vodikovog peroksida bila 4 mol dm^{-3} stupanj svijetljenja bio je s 2 na 7. U 5. reakcijskoj smjesi u kojoj je koncentracija vodikovog peroksida bila 5 mol dm^{-3}

stupanj svijetljenja bio je s 2 na 8. U usporedbi sa skupinom A u skupini E kosa je posvijetlila do jednake razine. Askorbinska kiselina nije pokazala ni antioksidativno ni prooksidativno djelovanje.



Slika 10 Lijevo: Usporedba stupnjeva svijetljenja kose u reakcijskim smjesama u skupini A (kontrolna skupina) i E (uz dodatak askorbinske kiseline); Desno: Reakcijske smjese skupine E (uz dodatak otopine vitamina C)

Uspoređujući samo reakcijske smjese s dodatkom pigmenta primijetila sam da najveće antioksidativno djelovanje pokazuje pigment karoten. Pri najvećoj koncentraciji vodikova peroksida, koja je bila 5 mol dm^{-3} , pramen kose posvijetlio je do razine 7 prema skali *Hair Colour Chart*. Stupanj svijetljenja kose povećavao se linearno od najmanje koncentracije vodikova peroksida do najveće koncentracije vodikova peroksida. Za razliku od karotena pigment klorofil pokazao je prooksidativno djelovanje. Pri najvećoj koncentraciji vodikova peroksida, koja je bila 5 mol dm^{-3} , pramen kose posvijetlio je do razine 10 prema skali *Hair Colour Chart*. Već pri najmanjoj koncentraciji vodikova peroksida koja je bila 1 mol dm^{-3} došlo je do najvećeg skoka u svijetljenju (s 2 na 6). Porastom koncentracije vodikova peroksida linearno se povećavao stupanj svijetljenja kose. Pigment ksantofil, u usporedbi s prethodna dva pigmenta, nije pokazao niti značajnije antioksidativno niti prooksidativno djelovanje. Pri najvećoj koncentraciji vodikova peroksida, koja je bila 5 mol dm^{-3} , pramen kose posvijetlio je do razine 8 prema skali *Hair Colour Chart*. Pri manjim koncentracijama vodikova peroksida stupanj svijetljenja povećavao se linearno. Do manjeg skoka u svijetljenju, s 2 na 7, došlo je pri većoj koncentraciji (4 mol dm^{-3}). Djelovanje pigmenta ksantofila pri manjim koncentracijama vodikova peroksida jednako je djelovanju pigmenta karotena.

Uspoređujući pigmente s vitaminom C primijetila sam da vitamin C pokazuje slabije antioksidativno djelovanje od pigmenta karotena, ali pokazuje jače antioksidativno djelovanje od pigmenta klorofila. Također sam primijetila da ima jednako antioksidativno djelovanje kao i pigment ksantofil u svim reakcijskim smjesama. Pri najvećoj koncentraciji vodikova peroksida, koja je bila 5 mol dm^{-3} , pramen kose posvijetlio je do razine 8 prema skali *Hair Colour Chart*. Pri manjim koncentracijama vodikovog peroksida stupanj svijetljenja povećavao se linearno. Do manjeg skoka u svijetljenju, s 2 na 7, došlo je pri većoj koncentraciji (4 mol dm^{-3}).

RASPRAVA

Slobodni radikal je svaka kemijska vrsta koja u vanjskoj ljusci posjeduje jedan ili više nesparenih elektrona. Slobodni radikali su kemijski nestabilni i vrlo reaktivni spojevi, u ljudskom organizmu stalno se odvijaju reakcije koje dovode do stvaranja slobodnih radikala (Žanetić, 2006). Antioksidansi sprječavaju oksidaciju drugih molekula tako što doniraju jedan ili više elektrona slobodnom radikalu, čime ga stabiliziraju i sprječavaju pokretanje slijeda kemijskih reakcija koji uzrokuje oštećivanje stanica. Antioksidansi su α -tokoferol, β -karoteni, drugi nevitaminski karotenoidi, askorbinska kiselina, razni enzimi (npr. glutation peroksidaza) i dr. (Žanetić, 2006). U ovom istraživanju ispitivala sam djelovanje



antioksidansa naoksidativno djelovanje vodikovog peroksida na melanin. Korišteni antioksidansi u istraživanju bili su biljni pigmenti karoteni, ksantofili i klorofili te vitamin C. Ispitala sam djelovanje navedenih antioksidansa pri različitim koncentracijama vodene otopine vodikovog peroksida. Organski proizveden ružmarin sadrži određene spojeve koji pokazuju snažnu antioksidacijsku aktivnost kao što je karnosolna kiselina, karnosol i ružmarinska kiselina (Gunstone, 2004). Ekstrakt ružmarina pokazuje bolju antioksidacijsku aktivnost u odnosu na α -tokoferol, askorbil palmitat i limunsku kiselinu, a s njima u kombinaciji (limunska kiselina), naročito s askorbil palmitatom pokazuje povećanje antioksidacijskog utjecaja (Lijić, 2016). Ispitivanjem antioksidativnog djelovanja vitamin C u rezultatima ovog istraživanja nije pokazao niti znatnije antioksidativno niti prooksidativno djelovanje. Pri manjim koncentracijama vodikovog peroksida vitamin C pokazao je antioksidativno djelovanje, ali pri većim koncentracijama vitamin C je pokazivao jednako djelovanje kao i kontrolna skupina u kojoj nije bilo dodatka tvari koje pokazuju antioksidativno djelovanje. U istraživanju antioksidativnog djelovanja biljnih pigmenata na oksidacijsko djelovanje vodikova peroksida ksantofil je pokazao jednako djelovanje kao i vitamin C. Pri manjim koncentracijama ksantofil je pokazao antioksidativno djelovanje, a pri većim koncentracijama nije pokazao niti antioksidativno niti prooksidativno djelovanje. Klorofil je u ovom istraživanju pokazao prooksidativno djelovanje. Prooksidacijsko djelovanje imaju klorofil i hem-spojevi. Klorofil djeluje kao prooksidans samo uz djelovanje svjetlosti, a hem-spojevi sastavni su dio nekih proizvoda, pa se prilikom proizvodnje mora koristiti svježije ulje (Pavlović, 2014). Prooksidativno djelovanje klorofila rezultat izvođenja pokusa na svjetlosti pa je zato veći i pri najmanjim koncentracijama došlo do velikog skoka u oksidaciji. Karoten je u istraživanju pokazao antioksidativno djelovanje. U usporedbi s kontrolnom skupinom pokazao je najjače antioksidativno djelovanje u usporedbi s drugim reakcijskim smjesama. Rezultati ovog istraživanja mogu se unaprijediti daljnjim istraživanjima u kojima bi se ispitalo djelovanje klorofila u tami. Također, ispitivanje je provedeno samo na jednom uzorku kose pa je moguće proširiti istraživanje i na drugim tipovima kose. „Paleta“ antioksidansa je velika pa se u daljnja istraživanja mogu uvrstiti i druge tvari koje pokazuju antioksidativno djelovanje.

ZAKLJUČCI

Na osnovu provedenog istraživanja doneseni su slijedeći zaključci:

- ✔ Početna hipoteza o smanjenju oksidacije melanina vodikovim peroksidom pomoću biljnih pigmenata ispostavila se djelomično točnom.
- ✔ Karoten, ksantofil i vitamin C smanjuju oksidaciju, ali pri manjim koncentracijama vodikovog peroksida.
- ✔ Klorofil je potaknuo oksidaciju melanina zbog prisutnosti svjetla.
- ✔ Za razliku od pretpostavke da će karoten pokazati najmanje antioksidativno djelovanje zbog prisutnosti benzena karoten je pokazao najjače antioksidativno djelovanje pri svim koncentracijama vodikovog peroksida.
- ✔ Ksantofil i vitamin C pokazali su antioksidativno djelovanje pri manjim koncentracijama vodikovog peroksida, ali pri većim koncentracijama vodikovog peroksida nisu pokazali niti antioksidativno niti prooksidativno djelovanje. Pri višim koncentracijama vodikovog peroksida ksantofil i vitamin C daju jednake rezultate kao i kontrolna skupina.
- ✔ Antioksidativna svojstva karotena, ksantofila i vitamina C smanjivala su se porastom koncentracije vodikovog peroksida u reakcijskoj smjesi.



- ☑ Prooksidativna svojstva klorofila smanjivala su se porastom koncentracije vodikovog peroksida u reakcijskoj smjesi.

LITERATURA

- Gunstone F. D. 2004. The chemistry of oils and fats. Blackwell Publishing, UK.
- Lević Lj., Pribiš V., Filipčev B., Kuljanin T. 2008. Promena antioksidativnog potencijala finih kvasnih peciva pri dodavanju voća i povrća osmotski dehidriranom u melasi šećerne repe. Tehnološki fakultet, Institut prehrambene tehnologije, Novi Sad.
- Lijić A. 2016. Utjecaj dodatka antioksidanasa i sinergista na oksidacijsku stabilnost ulja pistacije. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Osijek.
- Pavlović D. 2014. Utjecaj mikrovalnog zagrijavanja i dodatka antioksidansa na promjenu održivosti biljnih ulja. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Osijek.
- Žanetić M. 2006. Znanstvene vrijednosti maslinovog ulja. Institut za jadranske kulture i melioraciju krša, Split.
- Što je vodikov peroksid i kako djeluje u tijelu? Power Sept. <http://www.powersept.hr/vodikov-peroksid>, pristupljeno 20.12.2016.
- Vlaškalčić J. 2011. Biologija.com.hr Kako zloglasni slobodni radikali utječu na naše zdravlje? <http://biologija.com.hr/modules/AMS/article.php?storyid=8294>, pristupljeno 16.12.2016.
- B 2016. Oksidacijski stres, slobodni radikali i antioksidansi. Belupo. <http://www.belupo.hr/Default.aspx?sid=4763>, pristupljeno 16.12.2016.
- USPTFACE 2016. Hydrogen Peroxide is a Powerful Oxidizer. USP technologies Solutions for a clean environment. <http://www.h2o2.com/products-and-services/us-peroxide-technologies.aspx?pid=112>, pristupljeno 19.12.2016.
- Jašić M. 2009. Tehnologija hrane. Pigmenti. <http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/pigmenti>, pristupljeno 4.12.2016.
- SPNKAV 2016. Boja kose. Blistava plava kosa na nježan način. Schwarzkopf Profesionalna njega kose za Vas. http://www.schwarzkopf.com.hr/skhr/hr/home/boja_kose/plava_kosa/savjetovanje_o_boji/izbjeljivanje.html, pristupljeno 17.1.2017.
- S 2009. Izbjeljivanje kose. She.hr <http://she.hr/izbjeljivanje-kose/>, pristupljeno 17.1.2017.