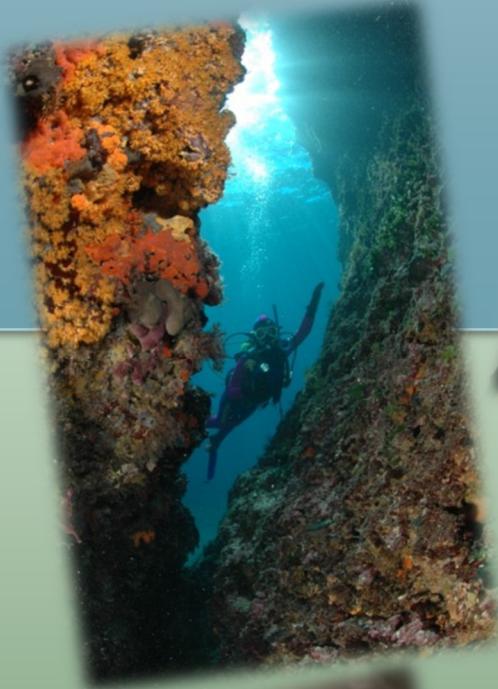




Hrvatsko biološko društvo
Societas biologorum croatica

Bioznačac

časopis učeničkih istraživanja iz biologije



2020.



Pokrovitelj:



ISSN 1849-837X

BIOZNALAC



časopis učeničkih istraživanja iz biologije

25. 11. 2020.

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 Bioznalac

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

Irena Labak, Marina Ništ, Miroslav Samardžić, Andreja Lucić, Mirela Sertić Perić, Filip Stević

Web urednik

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

Bioznalac je elektronički časopis na web stranici HBD-a

i izlazi najmanje jednom godišnje

SADRŽAJ

Bioznalac 2020.

Članak	Autori	Naslov rada	Razred	Mentor	Naziv škole	Stranice
1	<i>Lucija Glavičić Marović</i>	STRUKTURA RIBLIJIH ZAJEDNICA U HVARSKOM KANALU	8.	<i>Ivana Buljan</i>	OŠ Josipa Jurja Strossmayera Zagreb	1-17
2	<i>Karmen Jelović Dora Sovulj</i>	ŽUĆENJE SMOKVE	7.	<i>Tamara Banović</i>	OŠ Josip Pupačić Omiš	18 - 26
3	<i>Katarina Vilić Vita Šeremet</i>	PRIMAMLJIVA, ALI ŠTETNA OVISNOST O GLUTAMINATIMA	8.	<i>Đurđica Patafta</i>	OŠ Ljudevita Gaja Zaprešić	27 - 38
4	<i>Klara Pintarić Lana Paulić</i>	UČINAK NEUROAKTIVNIH TVARI NA OBLIK MREŽE PAUKA KRIŽARA (<i>Araneus diadematus</i> Clerck, 1758)	3.	<i>Antun Milinković</i>	Gimnazija Karlovac Karlovac	39 - 55
5	<i>Jan Špiclin</i>	UTJECAJ NANOČESTICA SREBRA NA OKSIDACIJSKI STRES U OBIČNE LUCERNE (<i>Medicago sativa</i> L.)	2.	<i>Marko Šaftran</i>	Prva gimnazija Varaždin Varaždin	56 - 68
6	<i>Đurđica Kovačić</i>	UTJECAJ PRIRODNIH I KOMERCIJALNIH DEZINFICIJENSA NA RAST I RAZVOJ BAKTERIJA	1.	<i>Vesna Dobronić</i>	III. gimnazija Split	69 - 77
7	<i>Antonio Eršegović Filip Strmečki</i>	UTJECAJ RAZLIČITIH VRSTA HRANE NA RAST VIJETNAMSKOG PALIČNJAKA (<i>Medauroides extradentata</i>)	4.	<i>Martina Tušek</i>	Srednja škola Ivanec Ivanec	78 - 88
8	<i>Jakov Brozović Petra Katić</i>	MOTORIKA PALIČNJAKA U OVISNOSTI O RAZLIČITIM PODLOGAMA I SMJERU KRETANJA	2.	<i>Jasminka Žiža</i>	Gimnazija Karlovac Karlovac	89 - 103
9	<i>Laura Štampar Dora Tuksar</i>	ANTIBAKTERIJSKI UČINAK BILJNIH ULJA NA NEPATOGENI SOJ BAKTERIJE <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213TM	2.	<i>Lara Kralj</i>	Gimnazija Josipa Slavenskog Čakovec	104 - 114
10	<i>Tara Nemčić</i>	USPOREDBA KOLIČINE ANTOCIJANA U UZORCIMA BOROVNICE, ARONIJE I MALINE	2.	<i>Romana Halapir Franković</i>	V. gimnazija Zagreb	115 - 124
11	<i>Rea Pešušić</i>	UTJECAJ MALOPRODAJNIH BIOCIDNIH SREDSTAVA NA BAKTERIJE	2.	<i>Karlo Horvatin</i>	Prirodoslovna škola Vladimira Preloga Zagreb	125 - 130
12	<i>Matej Ivan Sjekavica</i>	UTJECAJ VITAMINSKIH DODATKA PREHRANI NA MITARENJE PAPIGICE TIGRICE	7.	<i>Vida Bilogrević Gatolin</i>	Osnovna škola Ive Andrića Zagreb	131 - 136



STRUKTURA RIBLIJIH ZAJEDNICA U HVARSKOM KANALU

Lucija Glavičić Marović, 8. razred

Osnovna škola Josipa Josipa Jurja Strossmayera, Zagreb
Mentor: Ivana Buljan

SAŽETAK

Ovim istraživanjem su opisane riblje zajednice Hvarskog kanala uključujući brojnost vrsta i jedinki. Istraživanje je provedeno na dubinama od 5 do 20 metara pomoću metode vizualnog cenzusa i korištenjem autonomne ronilačke opreme. Na sve četiri ronilačke lokacije identificirana je prisutnost samo 18 vrsta, od kojih jedna vrsta (*Chromis chromis*) prevladava sa 60,8%. Smanjenje prirodnih predavata radi izlova ribolovnih vrsta utjecalo je na povećanje brojnosti vrste *Chromis chromis*. Većina jedinki (98,6%), prema kategoriji ugroženosti od izumiranja, pripada kategoriji najmanje zabrinjavajućih svojti (LC) i ne-ribolovnim vrstama (83,7%). Ribolovna aktivnosti dodatno ugrožava bioraznolikost te, osim smanjenog broja ribolovnih vrsta, pronalazimo većinom juvenilne jedinke ribolovnih vrsta. Utvrđena je velika sličnost između prisutnosti vrsta na četiri ronilačke lokacije, a ona je najveća između dvije ronilačke lokacije, koje imaju skoro identične biocenoze.

Ključne riječi: *riblje zajednice; bioraznolikost; brojnost jedinki; dominantnost vrsta; sličnost populacija*

UVOD

Hvarski kanal je jedno od prometnijih područja Jadrana, te se odlikuje visokom razinom turističke i ribolovne aktivnosti. More Hvarskog kanala ne spada u zaštićeno područje, a ribolovne aktivnosti odvijaju se slobodno i bez zapreke unutar ribolovne zone G unutarnjih voda RH. Budući da se radi o području gdje je pritisak ljudskih aktivnosti velik, može se očekivati da su riblje zajednice Hvarskog kanala veoma ugrožene.

Jardas i sur. (2008) navode da su glavni uzroci ugroženosti vrsta ribolov, degradacija staništa, onečišćenje, uznemirivanje, invazivne vrste i klimatske promjene.

Jedan od načina na koji čovjek utječe na strukturu i brojnost ribljih zajednica je kroz ribolovne aktivnosti. Jardas i sur. (2008) navode da je populacija jadranskih riba otvorenog i priobalnog mora danas znatno prorijeđena zbog dugotrajnog i nerazumnog iskorištavanja. Autori navode da je u razdoblju od 30 godina, između 1960. i 1990., količina ulova smanjena za 60% te da je velik problem što se love sve manji i manji primjerici riba. Kruschel i sur. (2012) procjenjuju strukturu i brojnost ribljih zajednica uspoređujući ribolovno zaštićena područja (NP Kornati) s ostalim okolnim nezaštićenim područjima te nalaze da povećani ribolovni napor dovodi do smanjenja populacije predatorskih vrsta riba, što dovodi do promjena u sustavu ribljih zajednica.

Cilj ovog istraživanja je detaljno opisati riblje zajednice Hvarskog kanala uključujući brojnost vrsta i jedinki. Istraživanje ribljih zajednica Hvarskog kanala provedeno je prikupljanjem video materijala na dubinama od 5 do 20 metara pomoću metode vizualnog cenzusa i korištenjem autonomne ronilačke opreme. Pri ostvarivanju cilja istraživanja, identificirat će se prisutnost i brojnost ribljih vrsta te će se navesti kvalifikacija vezana uz rizičnost od izumiranja sukladno hrvatskoj (Jardas i sur., 2008) i međunarodnoj metodologiji (IUCN, 2019).

Posebna pozornost obratit će se na klasifikaciju riba u ribolovne i ne-ribolovne vrste. Pod ribolovnom vrstom podrazumijevaju se sve one koje uobičajeno čine ulov za ljudsku konzumaciju te imaju gospodarsku iskoristivost. One vrste koje se ne smatraju ribolovnim vrstama, spadaju u gospodarski nevažne svojte, a u



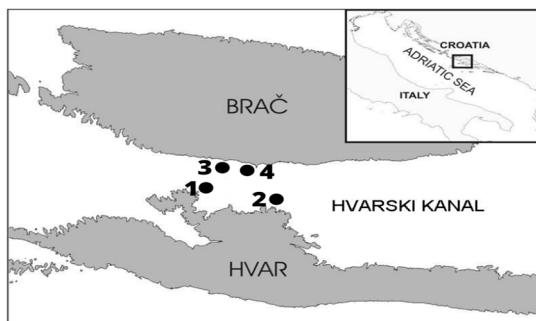
slučaju da budu ulovljene čine prilov. Jedan od podciljeva ovog istraživanje je opisati i na koji način ribolovne i ostale ljudske aktivnosti utječu na raznolikost i brojnost ribljih zajednica. Posebna pozornost posvetit će se i opažanjima vezano uz veličinu jedinki, kako bi se utvrdilo radi li se o juvenilnim ili odraslim jedinkama. Dodatni podcilj je utvrditi sličnosti i različitosti između ronilačkih lokacija.

Provodenje ovog istraživanja uključuje postavljanje sljedećih hipoteza, za koje se očekuje da će se potvrditi rezultatima:

- ↙ H1: Smanjen broj vrsta i jedinki, naročito onih vrsta koje ne spadaju u ribolovne vrste.
- ↙ H2: Dominantna prisutnost vrsta i veća brojnosti jedinki koje prema kvalifikaciji rizičnosti od izumiranja sukladno hrvatskoj (Jardas i sur., 2008) i međunarodnoj (IUCN, 2019) metodologiji spadaju u najmanje ugrožene svoje (LC).
- ↙ H3: Prevladavanje juvenilnih jedinki ribolovnih vrsta radi izlova odraslih jedinki.
- ↙ H4: Velika sličnost u prisutnosti vrsta na različitim ronilačkim lokacijama, naročito onima koji dijele iste biocenoze.

Područje istraživanja

Hvarski kanal je morski kanal, koji se nalazi u Jadranskom moru između otoka Brač i Hvara koji predstavljaju sjevernu i južnu među. Na istočnoj strani međa je glavno suhozemlje, a na zapadnoj strani nema prave međe, odnosno može se uzeti crta koja povezuje Zamorski rat na otoku Braču i rt Kabel na Hvaru ili otvoreno more. Za područje istraživanja odabrane su četiri ronilačke lokacije: dvije na otoku Hvaru (Smočiguzica (1) i Tatinja (2)) i dvije na otoku Braču (Golublja špilja (3) i Zlatni rat (4)) prikazane na slici 1:



Slika 1 Ronilačke lokacije na Hvarskom kanalu

Terenski rad

Terensko istraživanje je provedeno u listopadu 2019. Vođen je terenski dnevnik u kojemu su za svaku od ronilačkih lokacija izmjerene i zabilježene koordinate pomoću GPS uređaja; temperatura mora na površini i dubini od 20 metara, jačina vjetra i morske struje na površini mora ronilačkih lokacija te početak i završetak urona.

Metode istraživanja

U istraživanju su se koristile sljedeće metode:

- Ronjenje s autonomnim ronilačkim aparatom (SCUBA ronjenje);
- Metoda vizualnog cenzusa i snimanje video i foto materijala na dubinama od 5 do 20 metara;
- Mjerenje dubine i dužine transekta pomoću ronilačkog kompjutora i konopa;
- Identifikacija vrsta, određivanje brojnosti i kvalifikacija biocenoza transekta;
- Statistička analiza podataka.



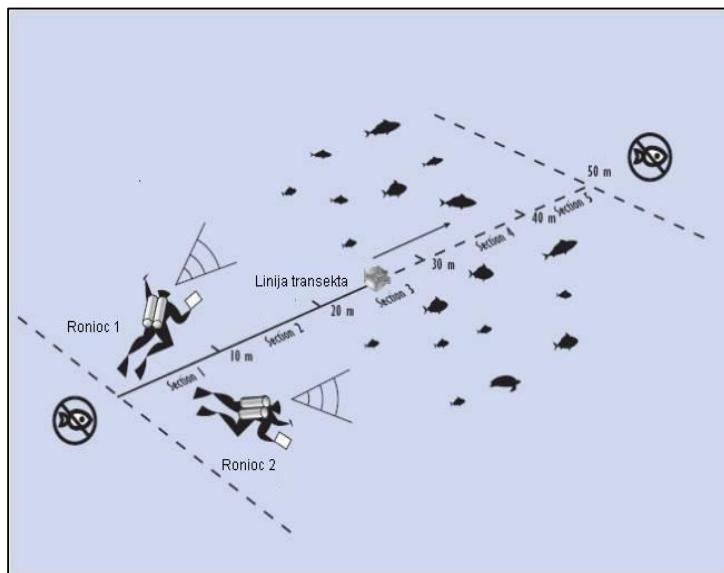
Ronjenje s autonomnim ronilačkim aparatom

Ronjenje s autonomnim ronilačkim aparatom (SCUBA ronjenje) je zahtjevno i opasno te u prvom redu mora biti sigurnost ronioca koji je prošao ronilački tečaj. Ronjenje se iz sigurnosnih razloga uvek izvodi u paru i grupi. U ovom istraživanju, sudjelovala su dva ronioca koja su oba pratila brojnost i različitost vrsta pazeći da vizualnim cenzusom snimanjem video kamerom obuhvate sve ribe koje se nalaze u predmetnom transektu. Osobno sam bila zadužena za snimanje video materijala, dok je sa mnom u paru bio još jedan ronilac zadužen za mjerjenje dubine transekta i ostalih parametara važnih za ronjenje (potrošnja zraka, praćenje dekompresijskog režima).

Metoda vizualnog cenzusa

Labrosse i sur. (2002) opisuju metodu vizualnog cenzusa pri ronjenju s autonomnim ronilačkim aparatom koja je detaljno proučena i primijenjena u terenskom radu. Pri metodi vizualnog cenzusa podaci se mogu uzimati na terenu zapisivanjem na posebnu ploču za pisanje pod vodom, fotografiranjem i snimanjem video materijala. Svaka metoda prikupljanja podataka o ribljim zajednicama ima svoja ograničenja, a jedno od ograničenja ove metode uključuje podcijenjenost broja predatorskih vrsta i velikih jedinki, koje ronioci ne uspiju uočiti u slučaju loše vidljivosti ili brzog prolaska ribe (Bozec i sur., 2011).

Metoda vizualnog cenzusa uključuje podjelu ronilačke lokacije na transekte dužine 50 metara i širine 5 metara. Za određivanje točne dužine transekta korišten je prethodno izmjereni konop od 50 m zamotan u kolut koji se lako može odmotati i ponovo zamotati. Slika 2 prikazuje metodu vizualnog cenzusa kako je primijenjena u ovom istraživanju.



Slika 2 Prikupljanje vizualnog cenzusa na transektu dužine 50 metara i širine 5 metara u ronilačkom paru

Na svakoj lokaciji snimljeni su video materijali na ukupno osam transekta i četiri dubine: dva na početnoj dubini od 20 metara (T1 i T2), zatim dva na dubini od 15 metara (T3 i T4), potom dva na dubini od 10 metara (T5 i T6), te naposljetku dva na dubini od 5 metara (T7 i T8). Svaki transekt označen je na način da prva dva slova predstavljaju oznaku za ronilačku lokaciju (Smočiguzica (SM), Tatinja (TA), Golublja šipilja (GS), Zlatni rat (ZR)), te oznaku transekta. Tako na primjer prvi transekt na dubini 20 metara na lokaciji Smočiguzica ima oznaku SMT1, a posljednji transekt na dubini od 5 metara na lokaciji Zlatni rat oznaku ZRT8. Za snimanje video materijala korištena je GO-PRO kamera.



Analiza podataka

Identifikacija vrsta i određivanje brojnosti jedinki pojedine vrste

Nakon terenskog rada, pristupilo se radu u kabinetu gdje je izvršena identifikacija vrsta i određivanje brojnosti jedinki pojedine vrste. Za identifikaciju vrsta korištena je prethodno proučena literatura: Jardas (1996), Jardas i sur. (2008), Froese i Pauly (2019), IUCN (2020).

Kod brojanja je korišten princip procjene brojnosti riba na način da se zapisuje točan broj jedinki iste vrste ukoliko je manji od deset, a ukoliko se radi o jatu riba onda se vrši procjena u odnosu na veličinu grupe riba. Princip brojanja riba kod pregleda transekta uključuje:

- ↙ Pojedinačno 1-10 kom;
- ↙ Grupa 11-20 kom;
- ↙ Grupa 21-50 kom;
- ↙ Grupa 51-100 kom;
- ↙ Grupa 101-200 kom;
- ↙ Grupa 201-500 kom;
- ↙ Grupa vise od- 500 kom.

Za procjenu ukupnog broja jedinki koji se nalazi u jatu, korištena je metoda zaokruživanja prosječne vrijednosti broja riba u grupi zaokružene na cijeli broj. Na primjer, za grupu 11-20 riba procijenjen broj jedinki iznosi 16, a za grupu od 21-50 riba procijenjen broj jedinki iznosi 36.

Prilikom pregleda pojedinog transekta nerijetko se ista vrsta pojavila pojedinačno i u grupi. Procijenjeni broj jedinki iste vrste izračunat je tako da predstavlja ukupan broj jedinki koje su metodom vizualnog cenzusa identificirane unutar transekta. Procijenjen broj jedinki za svaki transekt ronilačkih lokacija korišten je za procjenu dominantnosti vrsta.

Klasifikacija vrsta prema stupnju ugroženosti

Svaka vrsta kvalificirana je prema stupnju ugroženosti vrsta sukladno hrvatskoj (Jardas i sur., 2008) i međunarodnoj (IUCN, 2019.) metodologiji. Najprije je provjereno nalazi li se vrsta na popisu Crvene knjige morskih vrsta Hrvatske (Jardas i sur., 2008). U slučaju da vrsta nije pronađena na tom popisu, za kvalifikaciju stupnja ugroženosti vrsta korištena je međunarodna (IUCN, 2019) metodologija. Dodatno je proučen Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama (NN 144/2013).

Prema kvalifikaciji stupnja ugroženosti vrsta razlikujemo izumrle svojte (Extinct, EX), izumrle u prirodi (Extinct in the Wild, EW), kritično ugrožene (Critically Endangered, CR), ugrožene (Endangered, EN), osjetljive (Vulnerable, VU), gotovo ugrožene svojte (Near Threatened, NT), najmanje zabrinjavajuće svojte (Least Concern, LC) i nedovoljno poznate svojte (Data Deficient, DD).

Klasifikacija vrsta u ribolovne i ne-ribolovne vrste

Prilikom kvalifikacije vrsta u ribolovne i ne-ribolovne vrste, korišten je popis riba naveden u Prilogu III Uredbe vijeća br. 1967/2006 od 21. prosinca 2006. (EZ, 2016) o mjerama upravljanja za održivo iskorištavanje ribolovnih resursa u Sredozemnom moru, koji osim ribolovnih vrsta navodi i najmanje veličine morskih organizama za ribolov. Dodatno je korištena stručna literatura (Jardas, 1996, Jardas i sur., 2008).



Iako se u ovom radu ne procjenjuju veličine svake pojedine jedinke, u raspravi se osvrćemo na opažanja veličine ribolovnih i ne-ribolovnih vrsta i procjeni u kojoj mjeri se radi o juvenilnim ili odraslim primjercima.

Dominantnost vrsta

Za svaki od 32 transekta i 4 ronilačke lokacije izračunato je koje riblje vrste su dominantne koristeći koeficijent dominantnosti jedne vrste koji je izračunat kao postotni udio procijenjenog broja jedinki jedne vrste u ukupnom broju jedinki svih vrsta.

$$D_i = \frac{n_i}{n} \times 100$$

gdje je

D_i – dominantnost vrste i na transektu / ronilačkoj lokaciji

n_i – procijenjeni broj jedinki vrste i na transektu / ronilačkoj lokaciji

n – procijenjeni ukupni broj jedinki svih vrsta na transektu / ronilačkoj lokaciji

Prema stupnju dominantnosti, vrste smo podijelili na eudominantne ($>=70\%$), dominantne (50%-69%), subdominantne (25%-49%), recendentne (10-24%) i subrecendentne vrste ($<=9\%$) označene redom od najvećeg do najmanjeg postotka učestalosti u ukupnom broju svih jedinki pojedinog transekta odnosno ronilačke lokacije.

Sörensenov indeks sličnosti

Sörensenov indeks sličnosti korišten je kako bismo usporedili sličnosti između brojnosti vrsta (S) ili broja jedinki (N) za dvije različite ronilačke lokacije:

$$CC_s = \frac{2c}{S_1 + S_2}$$

gdje je:

CCs – Sörensenov indeks sličnosti

C – broj zajedničkih vrsta na dvije različite lokacije

S_1 – broj vrsta samo na prvoj lokaciji

S_2 – broj vrsta samo na drugoj lokaciji

Za usporedbu sličnosti i različitosti više lokacija koriste se metode multivariatne analize, koja nije predmet ovog istraživanja.

Klasifikacija biocenoza

Riblje zajednice žive unutar morskih zajednica (biocenoza), a na četiri ronilačke lokacije i ukupno 32 transekta pronađene su različite biocenoze. Biocenoze su klasificirane sukladno metodologiji koju je razvila Bakran-Petricioli (2011) za Nacionalnu kvalifikaciju staništa i uključuju:

- G.3.4.1. Biocenoza infralitoralnih šljunaka;
- G.3.5.1. Biocenoza naselja vrste *Posidonia oceanica*;
- G.3.6.1. Biocenoza infralitoralnih alga;
- G.4.3.1. Koraligenska biocenoza;
- G.4.3.2. Biocenoza polutamnih špilja.

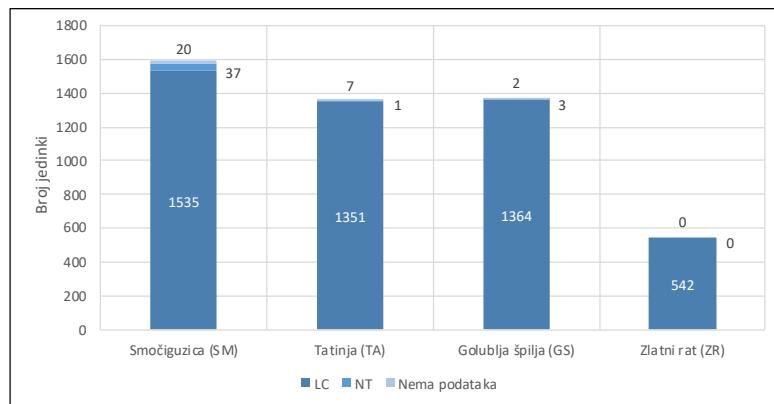


REZULTATI

Analiza strukture ribljih zajednica

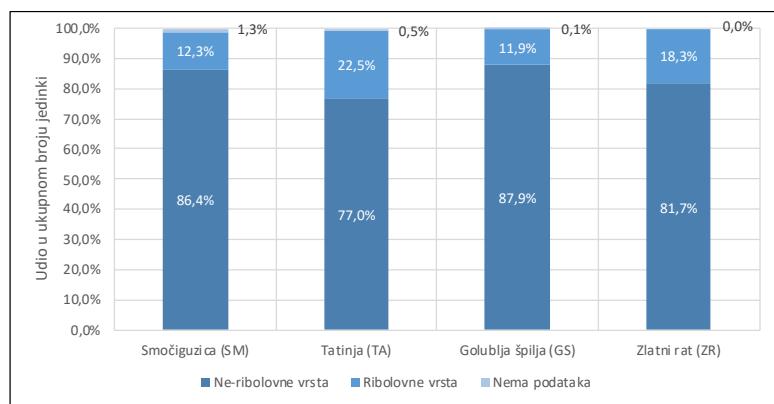
U Prilogu I prikazani su prisutnost i brojnost vrsta za svaku od 4 ronilačke lokacije i ukupno 32 transekta. Također su detaljno kvalificirane biocenoze za svakih transekt. U Prilogu II prikazane su snimke terenskog rada.

Ukupno je identificirano 18 vrsta i procijenjena brojnost istih na 4833 jedinke. Za 29 jedinki ili 0,6% od ukupnog procijenjenog broja riba nije se moglo identificirati pripadnost vrsti. Ogromna većina (98,6%) jedinki pripada kategoriji najmanje zabrinjavajuće svoje (Least Concern, LC), a svega 41 (0,8%) jedinki pripadala je kategoriji gotovo ugrožene svoje (Near Threatened, NT) ponajviše vrsti *Diplodus sargus* (šarag), ali i vrstama *Diplodus puntazzo* (pic) i *Scorpaena notata* (škarpinica). Ronilačka lokacija Smočiguzica ima najveći broj procijenjenih jedinki (1592), koju slijede Golublja špilja (1369) i Tatinja (1359), a najmanji broj jedinki procijenjen je za Zlatni rat (542). Slika 3 prikazuje procjenu broja jedinki na ronilačkim lokacijama prema kategoriji rizičnosti od izumiranja.



Slika 3 Procjena broja jedinki na ronilačkim lokacijama prema kategoriji rizičnost od izumiranja

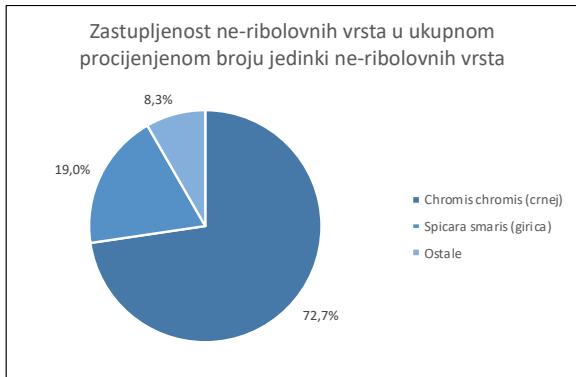
Velika većina jedinki pripada kategoriji ne-ribolovnih vrsta, no pronalazimo i one ribolovne. Najveći udio u ukupnom broju jedinki koje pripadaju ribolovnoj vrsti pronalazimo na Tatinji (22,5%). Zanimljivo je da Zlatni rat, koja je lokacija s daleko najmanjom brojnosti ribljih zajednica, ima visok postotak jedinki koje pripadaju ribolovnim vrstama (18,3%). Slika 4 prikazuje strukturu ukupnog broja jedinki prema pripadnosti ribolovnim i ne-ribolovnim vrstama za sve četiri ronilačke lokacije.



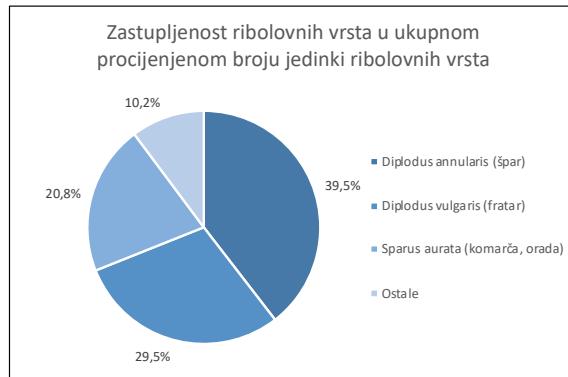
Slika 4 Struktura ukupnog procijenjenog broja jedinki prema kategoriji ribolovne vrste (%)



Na sve četiri lokacije, ukupno procijenjen broj jedinki ne-ribolovnih vrsta iznosi 4069, a onih ribolovnih 764. Od ne-ribolovnih vrsta najviše su zastupljeni *Chromis chromis* (crnej) sa 72,7% od ukupnog broja jedinki ne-ribolovnih vrsta i *Spicara smaris* (girica) sa 19,0%. Od ribolovnih vrsta najviše su zastupljeni *Diplodus annularis* (špar) sa 39,5% od ukupnog broja jedinki ribolovnih vrsta, *Diplodus vulgaris* (fratar) sa 29,5% i *Sparus aurata* (komarča, orada) sa 20,8%. Slike 5. i 6. prikazuju zastupljenost najčešćih ne-ribolovnih i ribolovnih vrsta na sve četiri lokacije.

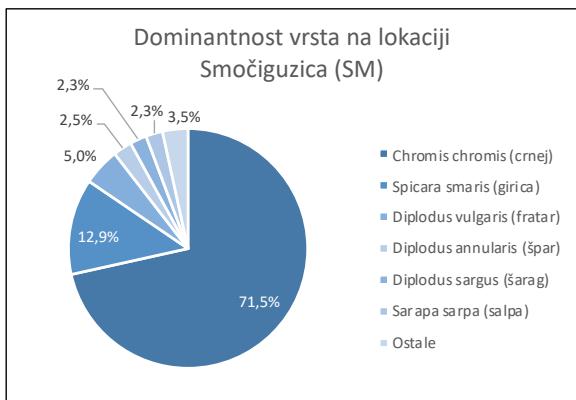


Slika 5 Zastupljenost ne-ribolovnih vrsta u ukupnom procijenjenom broju jedinki ne-ribolovnih vrsta

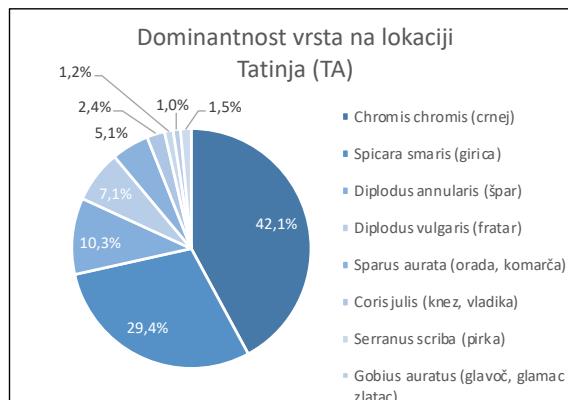


Slika 6 Zastupljenost ribolovnih vrsta u ukupnom procijenjenom broju jedinki ribolovnih vrsta

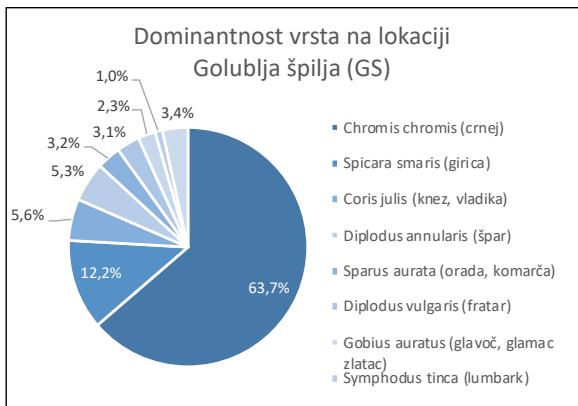
Chromis chromis (crnej) je eudominantna vrsta na tri lokacije: Smočiguzica (71,5%), Zlatni rat (69,2%) i Golublja špilja (63,7%). Na Tatinji pronalazimo dvije subdominantne vrste: *Chromis chromis* (crnej) (42,1%) i *Spicara smaris* (girica) (29,4%). Možemo izdvojiti još i dvije recendentne vrste, a to su *Spicara smaris* (girica) na lokacijama Smočiguzica (12,9%) i Golublja špilja (12,2%), *Diplodus annularis* (špar) na lokaciji Tatinja (10,3%). Sve ostale vrste su subrecedentne, a slike 7 – 10 navode sve vrste prema dominantnosti na sve četiri lokacije koje su zastupljene sa barem 1% od ukupnog procijenjenog broja jedinki.



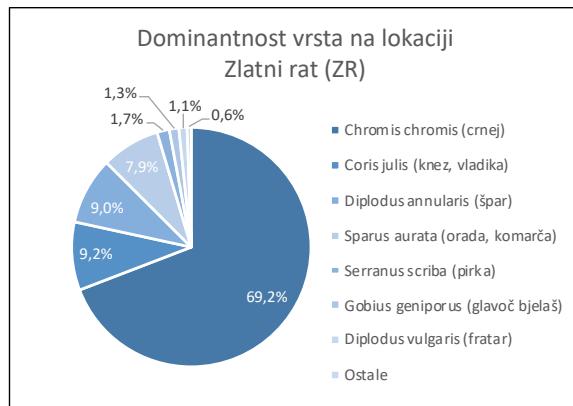
Slika 7 Dominantnost vrsta na lokaciji Smočiguzica (SM)



Slika 8 Dominantnost vrsta na lokaciji Tatinja (TA)



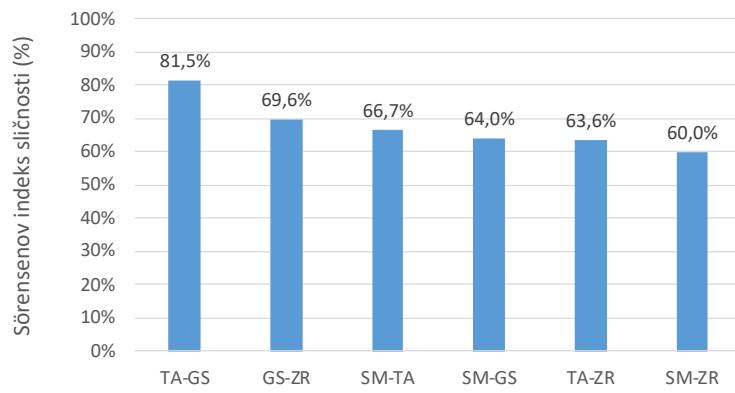
Slika 9 Dominantnost vrsta na lokaciji Golublja špilja (GS)



Slika 10 Dominantnost vrsta na lokaciji Zlatni rat (ZR)

Na sve četiri lokacije nalazimo ukupno 18 vrsta, s time da je najveći broj vrsta identificiran na lokaciji Golubinja špilja (14), zatim Tatinja (13), Smočiguzica (11) i Zlatni rat (9). Većina vrsta zajednička je svima ili nekim od lokacija. Tri vrste identificirane su samo na Smočiguzici: *Diplodus puntazzo* (pic), *Diplodus sargus* (šarag) i *Sarpa sarpa* (salpa). Dvije vrste identificirane su samo na Golubljoj špilji: *Serranus cabrilla* (klanjac) i *Syphodus tinca* (lumbark). Jedna vrsta identificirana je samo na Tatinji: *Tripterygion tripteronotum* (pjevčić).

Prema Sörensenovom indeksu sličnosti vrsta između ronilačkih lokacija, najveća sličnost u prisutnosti vrsta je između lokacija Tatinja (TA) i Golublja špilja (GS) te iznosi 81,5%. Najmanja sličnost u prisutnosti vrsta je između lokacija Smočiguzica (SM) i Zlatni rat (ZR) te iznosi 60,0%. Slika 11 prikazuje Sörensenov indeks sličnosti vrsta između ronilačkih lokacija.



Slika 11 Sörensenov indeks sličnosti vrsta između ronilačkih lokacija



Tablica 1 Prisutnost vrsta i bioraznolikost na četiri ronilačke lokacije

Lokacija	Ribolovna vrsta (+/-)	Kategorija rizičnosti od izumiranja	Smočiguzica (SM)	Tatinja (TA)	Golublja špilja (GS)	Zlatni rat (ZR)
<i>Chromis chromis</i> (Linnaeus, 1758)	-	LC	+	+	+	+
<i>Coris julis</i> (Linnaeus, 1758)	-	LC	+	+	+	+
<i>Dicentrarchus labrax</i> (Linnaeus, 1758)	+	LC	-	-	-	-
<i>Diplodus annularis</i> (Linnaeus, 1758)	+	LC	+	+	+	+
<i>Diplodus puntazzo</i> (Cetti, 1777)	+	NT	+	-	-	-
<i>Diplodus sargus sargus</i> (Linnaeus, 1758)	+	NT	+	-	-	-
<i>Diplodus vulgaris</i> (Geoffroy St Hilaire, 1817)	+	LC	+	+	+	+
<i>Gobius auratus</i> (Risso, 1810)	-	LC	+	+	+	-
<i>Gobius geniporus</i> (Valenciennes, 1837)	-	LC	-	+	+	+
<i>Gobius vittatus</i> (Vinciguerra, 1883)	-	LC	-	-	-	-
<i>Mullus surmuletus</i> (Linnaeus, 1758)	-	LC	-	-	-	-
<i>Parablennius rouxi</i> (Cocco, 1833)	-	LC	-	-	-	-
<i>Sarpa sarpa</i> (Linnaeus, 1758)	+	LC	+	-	-	+
<i>Serranus cabrilla</i> (Linnaeus, 1758)	-	LC	-	-	+	-
<i>Scorpaena notata</i> (Rafinesque, 1810)	+	NT	-	+	+	-
<i>Scorpaena scrofa</i> (Linnaeus, 1758)	+	NT	-	-	-	-
<i>Serranus scriba</i> (Linnaeus, 1758)	-	LC	+	+	+	+
<i>Sparus aurata</i> (Linnaeus, 1758)	+	LC	+	+	+	+
<i>Spicara maena</i> (Linnaeus, 1758)	-	LC	-	+	-	-
<i>Spicara smaris</i> (Linnaeus, 1758)	-	LC	+	+	+	-
<i>Spondyliosoma cantharus</i> (Linnaeus, 1758)	-	NT	-	-	-	-
<i>Sympodus mediterraneus</i> (Linnaeus, 1758)	-	LC	-	+	+	-
<i>Sympodus ocellatus</i> (Linnaeus, 1758)	-	LC	-	-	-	-
<i>Sympodus doderleini</i> Jordan, 1890	-	DD	-	-	-	-
<i>Sympodus tinca</i> (Linnaeus, 1758)	-	LC	-	-	+	-
<i>Thalassoma pavo</i> (Linnaeus, 1758)	-	LC	-	-	-	-
<i>Thorogobius ephippiatus</i> (Lowe, 1839)	-	LC	-	-	+	+
<i>Scorpaena scrofa</i> (Linnaeus, 1758)	-	LC	-	-	-	-
<i>Tripterygion tripteronotum</i> (Risso, 1810)	-	LC	-	+	-	-
Ukupno broj identificiranih vrsta po transekstu/lokaciji			11	13	14	9

RASPRAVA

Istraživanjem ribljih zajednica u Hvarskom kanalu identificirano je ukupno samo 18 vrsta, od čega 15 pripada kategoriji najmanje ugroženih svojti (LC) prema stupnju ugroženosti, a 3 pripadaju kategoriji gotovo ugrožene svojte (NT). Nije pronađena niti jedna jedinka ostalih kategorija koje su prema stupnju ugroženosti u većem riziku od izumiranja. S obzirom da je u Jadranskom moru popisano ukupno 442 vrste ribe (Jardas, 2008), ovo istraživanje je obuhvatilo tek mali dio vrsta prisutnih u Jadranskom moru i opaža se da je raznolikost promatranih ribljih zajednica Hvarskog kanala koje su obuhvaćene ovim istraživanjem izrazito mala.

Vrsta *Chromis chromis* (crnej) je eudominantna na tri ronilačke lokacije i subdominantna na jednoj ronilačkoj lokaciji. U sažetku svog znanstvenog rada, Pinnegar (2018) navodi da je ta vrsta tipično najbrojnija u stjenovitom priobalnom okruženju Mediteranskog mora. *Chromis chromis* hrani se zooplanktonom i jajačcima riba, a predatori koji se hrane vrstom *Chromis chromis* uključuju galebe i ostale priobalne ptice, te predatorske ribolovne vrste. Pinnegar (2018) navodi da su populacije vrste *Chromis chromis* izrazito brojne na onim lokacijama gdje su smanjene količine predatorskih ribolovnih vrsta radi ribolovnog iskorištavanja čovjeka. Kruschel i sur. (2012) također zaključuju da povećani ribolovni napor dovodi do smanjenja populacije predatorskih vrsta riba, što dovodi do promjena u sustavu zajednica riba.



Izračunate vrijednosti Sörensenovog indeksa sličnosti vrsta između ronilačkih lokacija se kreću između 81,5% (između lokacija Tatinja (TA) i Golublja špilja (GS)) i 60,0% (između lokacija Smočiguzica (SM) i Zlatni rat (ZR)), što ukazuje da su sve četiri ronilačke lokacije vrlo slične prema prisutnim vrstama. S jedne strane, veliku sličnost između vrsta na ronilačkim lokacijama možemo objasniti njihovom blizinom i činjenicom da su pronađene vrste široko rasprostranjene. No, s druge strane, ronilačke lokacije imaju različite biocenoze stoga smo mogli očekivati i drugačiji rezultat. Činjenica da je vrijednost Sörensenovog indeksa sličnosti najveća upravo između lokacija Tatinja (TA) i Golublje špilje (GS) može se objasniti na način da su te dvije lokacije izrazito slične i po biocenozi. Na Tatinji, u 7 transekta prevladava G.3.6.1. Biocenoza infralitoralnih alga, te samo jedan transekt na 5 m dubine je G.3.4.1. Biocenoza infralitoralnih šljunaka. Na Golubljoj špilji (GS) također prevladavaju G.3.6.1. Biocenoza infralitoralnih alga na 6 transekta te nalazimo G.3.4.1. Biocenozu infralitoralnih šljunaka na 5 m dubine. Razlika u biocenozama između te dvije lokacije je samo u jednom transketu u kojem se nalazi Golublja špilja i to je G.4.3.2. Biocenoza polutamnih špilja.

U svrhu zaštite ribljih zajednica, Hrvatska je donijela niz pozitivnih propisa, počevši od proglašenja zaštićenog ekološko-ribolovnog pojasa (ZERP) 2003. godine. Jedan od takvih zakona je i Uredba vijeća br. 1967/2006 koja u Prilogu III propisuje najmanju veličinu riba koje se mogu loviti (EZ, 2006). Tako je na primjer za vrstu *Sparus aurata* (orada, komarča) propisana najmanja veličina 20 cm. No upravo na primjeru vrste *Sparus aurata* možemo istaknuti da su postojeći propisi nedovoljni u zaštiti te vrste, koja je jedna od izrazito cijenjenih ribolovnih vrsta. Naime, riba *Sparus aurata* je dvospolac, koja svoju spolnu zrelost dostiže kada napuni otprilike 2 godine i naraste u veličinu od 20 cm (Jardas i sur., 2008). Nakon prvog mriještenja i između 2. i 6. godine, kada naraste na veličinu oko 30 cm i mase preko 0,5 kg, većina jedinki promjeni spol u ženski. Zbog velikog izlova potencijalnih ženki, promijenila se prirodna ravnoteža između spolova, što nepovoljno utječe na obnavljanje populacije. U ovom terenskom istraživanju, identificirali smo ukupno 159 jedinki vrste *Sparus aurata* na četiri ronilačke lokacije: Tatinja (69), Golublja špilja (44), Zlatni rat (43) i Smočiguzica (3). Većina identificiranih primjeraka procijenjena je na veličinu manju od 20 cm, dakle radi se o pretežito juvenilnim jedinkama koje još nisu spolno sazrele i ne mogu doprinijeti obnavljanju populacije. Dodatno, možemo se osvrnuti da ostale ribolovne vrste koje smo identificirali u ovom terenskom istraživanju, a kojima je propisana najmanja veličina izlova: *Diplodus annularis* (12 cm), *Diplodus puntazzo* (18 cm), *Diplodus sargus* (23 cm), *Diplodus vulgaris* (18 cm). Iako ovim terenskim istraživanjem nismo u mogućnosti precizno mjeriti veličine jedinki, pažljivim pregledom video materijala uočeno je da se pretežito radi o juvenilnim jedinkama koje u najvećem broju slučajeva ne dostižu propisanu najmanju veličinu izlova.

Osim ribolovne aktivnosti, utjecaj čovjeka na riblje zajednice mjeri se i u razvoju turizma, ponajviše nautičkog turizma i ronilačkog turizma. Hvarski kanal je jedan od najviše posjećenih turističkih dijelova Jadrana, a svaka od ronilačkih lokacija svake godine privlači veliki broj ronilaca. Terensko istraživanje provedeno je u listopadu 2019., na kraju turističke sezone, i može se očekivati da uznemirivanje čovjeka ima velik utjecaj na riblje zajednice. Za postizanje objektivnijeg uvida u raznolikost i brojnost ribljih zajednica Hvarskog kanala, istraživanje bi trebalo provesti tijekom duljeg vremenskog perioda i svakako u proljeće, prije početka turističke sezone.

Dodatno, onečišćenje mora može izrazito nepovoljno utjecati na riblje zajednice. Tijekom provedenog terenskog istraživanja nismo opazili nikakve znakove onečišćenja mora.



Od invazivnih algi pronađena je *Caulerpa racemosa* na dvije ronilačke lokacije: Tatinja i Zlatni rat. Invazivne alge jedan su od uzročnika narušene bioraznolikosti ribljih zajednica u Jadranskom moru. Radi se o algama koje su prirodno i široko rasprostranjene u tropskim morima, a u Sredozemno more unesene su brodovima u prošlom stoljeću (Jardas i sur., 2008). Invazivne alge djeluju na način da se agresivno šire pri čemu istiskuju zavičajne vrste i time narušavaju prirodnu ravnotežu staništa ribljih zajednica u izvorima hrane i mjestima za reprodukciju.

Klimatske promjene su također jedan od važnih čimbenika koje bi u budućnosti moglo nepovoljno utjecati na riblje zajednice. Svjedoci smo povećanja temperature zraka i mora, a Jardas i sur. (2008) navode da izostanak hladnih zima nepovoljno utječe na opstanak nekih vrsta riba u Jadranu. Prilikom provedbe terenskog istraživanja, izmjerena temperatura vode na površini mora na svim lokacijama bila je 22°C, a na dubini od 20 metara iznosila je 20°C. Takve su temperature vrlo ugodne za ronilačku aktivnost, no nisu uobičajene za dubine od 20 metara.

ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja ribljih zajednica Hvarskog kanala, potvrdili smo sve četiri hipoteze navedene u uvodu.

H1: Smanjen broj vrsta i jedinki, naročito onih vrsta koje ne spadaju u ribolovne vrste

U ovom istraživanju identificirana je prisutnost samo 18 vrsta na četiri ronilačke lokacije, od kojih je jedna vrsta (*Chromis chromis*) prevladava. Možemo zaključiti da je smanjenje prirodnih predatora utjecalo na povećanje brojnosti vrste *Chromis chromis*, a nadalje svojim djelovanjem na iscrpljivanja zaliha zooplanktona i hranjenjem jajačima drugih riba, *Chromis chromis* dodatno doprinosi u smanjenju brojnosti i prisutnosti ostalih vrsta riba.

H2: Dominantna prisutnost vrsta i brojnosti jedinki koje prema kvalifikaciji rizičnosti od izumiranja spadaju u najmanje zabrinjavajuće svoje (LC).

Rezultatima istraživanja potvrđeno je da ogromna većina jedinki (98,6%) pripada jednoj od 15 vrsta u kategoriji najmanje zabrinjavajuće svoje (LC), te da samo 41 jedinka (0,8%) pripada jednoj od 3 vrste koje su gotovo ugrožene svoje (NT).

H3: Prevladavanje juvenilnih jedinki ribolovnih vrsta radi izlova odraslih jedinki.

Opažanjem je potvrđeno da procijenjena veličina jedinki prisutnih ribolovnih vrsta svojom veličinom većinom spada u juvenilne vrste. Odrasle jedinke ribolovnih vrsta nisu gotovo uopće prisutne na ronilačkim lokacijama radi ribolovne aktivnosti određene zakonima i propisima u kojima se juvenilne jedinke štite od izlova, ali ne i odrasle jedinke. Nadalje, utvrđeno je da kod jedne vrste (*Sparus aurata*) izlov juvenilnih jedinki narušuje prirodnu ravnotežu među spolovima, budući da je da vrsta dvospolac koja svoj život započinje kao mužjak i završava kao ženka,

H4: Veliku sličnosti između prisutnosti vrsta na različitim ronilačkim lokacijama naročito onima koji dijele iste biocenoze.

Rezultatima istraživanja potvrđena je velika sličnost između prisutnosti vrsta na četiri ronilačke lokacije s vrijednosti Sörensenovog indeksa sličnosti između 81,5% i 60,0%, te da je sličnost najveća između dvije ronilačke lokacije koje imaju skoro identične biocenoze (u sedam od ukupno osam transekata). Sličnost između prisutnosti vrsta četiri ronilačke lokacije možemo objasniti blizinom lokacija i prisutnošću široko rasprostranjenih vrsta. Također, sličnosti između prisutnosti vrsta doprinosi podudarnost u biocenozama.

**LITERATURA**

- Bakran-Petricioli, T. 2011. Priručnik za određivanje morskih staništa u Hrvatskoj prema Direktivi o staništima EU, Državni zavod za zaštitu prirode Zagreb, <http://www.haop.hr/sites/default/files/uploads/publications/2018-01/Bakran-Petricioli%20-%20Priručnik%20za%20morska%20stanista.pdf>, pristupljeno 15. 1. 2020.
- Bozec, Yves-Marie & Kulbicki, Michel & Laloë, Francis & Mou-tham, Gerard & Gascuel, Didier. 2011. Factors affecting the detection distances of reef fish: Implications for visual counts. Marine Biology. 158. 969-981.
https://www.researchgate.net/publication/225304004_Visual_census_methods_underestimate_density_and_diversity_of_cryptic_reef_fish/stats, pristupljeno 12. 02. 2020.
- EZ. Uredba vijeća br. 1967/2006. 2006. o mjerama upravljanja za održivo iskoriščavanje ribolovnih resursa u Sredozemnom moru, dostupno na: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1967&from=HR>, pristupljeno 12. 02. 2020.
- Froese, R. and D. Pauly. Editors. 2019. FishBase. World Wide Web electronic publication. <http://www.fishbase.org>, pristupljeno 12. 02. 2020.
- IUCN 2020. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-1. <https://www.iucnredlist.org> ISSN 2307-8235, pristupljeno 12. 02. 2020.
- Jardas, I. 1996. Jadranska ihtiofauna, monografija, školska knjiga, Zagreb
- Jardas, I., Pallaoro, A., Vrgoč, N., Jukić-Peladić S. 2008. Crvena knjiga morskih riba Hrvatske, Ministarstvo kulture i Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, <http://www.haop.hr/hr/publikacije/crvena-knjiga-morskih-riba-hrvatske>, pristupljeno 12. 02. 2020.
- Kruschel, C., Schultz S.T. Bakran-Petricioli T., Petricioli D. 2012. Usporedba brojnosti predatora i raznolikosti riba u zaštićenim područjima (NP Kornati, Hrvatska) i susjednim područjima u kojima je dozvoljen ribolov, Croatian Journal of Fisheries : Ribarstvo, Vol. 70 No. Supplement 1, https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=143909, pristupljeno 12. 12. 2019
- Labrosse, P., Kulbicki, M., Ferraris, J. 2002. Underwater visual fish census surveys : proper use and implementation (na hrvatskom: „Podvodna vizualna istraživanja popisa riba: pravilna uporaba i provedba“), Secretariat of the Pacific Community Noumea, New Caledonia, https://www.researchgate.net/publication/282170595_Underwater_visual_fish_census_surveys_proper_use_and_implementation, pristupljeno 12. 12. 2019.
- NN 144/2013. 2013. Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_12_144_3086.html, pristupljeno 12. 02. 2020.
- Pinnegar, J. 2018. Why the damselfish Chromis chromis is a key species in the Mediterranean rocky littoral – a quantitative perspective. Journal of Fish Biology. 92. 851-872. 10.1111/jfb.13551.
https://www.researchgate.net/publication/323752795_Why_the_damselfish_Chromis_chromis_is_a_key_species_in_the_Mediterranean_rocky_littoral_-_a_quantitative_perspective/stats, pristupljeno 12. 12. 2019.



Prilog 1 Prisutnost i brojnost vrsta, kvalifikacija biocenoza prema ronilačkim lokacijama

Tablica 2 Prisutnost i brojnost vrsta, kvalifikacija biocenoza za ronilačku lokaciju Smočiguzica (SM)

Lokacija	Smočiguzica	Smočiguzica	Smočiguzica	Smočiguzica	Smočiguzica	Smočiguzica	Smočiguzica	Smočiguzica
Datum	19/10/2019	19/10/2019	19/10/2019	19/10/2019	19/10/2019	19/10/2019	19/10/2019	19/10/2019
Oznaka transekt-a	SM_T1	SM_T2	SM_T3	SM_T4	SM_T5	SM_T6	SM_T7	SM_T8
Vrijeme (početak urona)	11 h	11 h	11 h	11 h	11 h	11 h	11 h	11 h
Dubina (m)	20	20	15	15	10	10	5	5
Biocenoza**	G.4.3.1.	G.4.3.1.	G.4.3.1.	G.4.3.1.	G.4.3.1.	G.4.3.1.	G.4.3.1.	G.4.3.1.
Chromis chromis (Linnaeus, 1758)	tri skupine 21-50, pojedinačno 3	skupina 21-50, skupina 21-50, skupina 51-100, pojedinačno 2	skupina 101-200, pojedinačno 6	skupina 11-20, skupina 21-50, skupina 51-100	skupina 101-200, skupina 201-500	skupina 101-200	skupina 11-20	16
Coris julis (Linnaeus, 1758)	3	1	1	1	2	1	4	2
Dicentrarchus labrax (Linnaeus, 1758)								
Diplodus annularis (Linnaeus, 1758)	2				2	skupina 21-50		
Diplodus puntazzo (Cetti, 1777)				1				
Diplodus sargus sargus (Linnaeus, 1758)		6	4	skupina 11-20, pojedinačno 3		2		5
Diplodus vulgaris (Geoffroy St Hilaire, 1817)	8	13	skupina 21-50	8			9	6
Gobius auratus (Risso, 1810)			3	1				
Gobius geniporus (Valenciennes, 1837)								
Gobius vitellus (Vinciguerra, 1883)								
Mullus surmuletus (Linnaeus, 1758)								
Parablennius rouxi (Cocco, 1833)								
Sarpa sarpa (Linnaeus, 1758)			skupina 21-50					
Serranus cabrilla (Linnaeus, 1758)								
Scorpaena notata (Rafinesque, 1810)								
Scorpaena scrofa (Linnaeus, 1758)								
Serranus scriba (Linnaeus, 1758)	1	1			1		4	5
Sparus aurata (Linnaeus, 1758)			3					
Spicara maena (Linnaeus, 1758)								
Spicara smaris (Linnaeus, 1758)	skupina 11-20, skupina 21-50		3	skupina 101-200				
Spondyliosoma cantharus (Linnaeus, 1758)								
Sympodus mediterraneus (Linnaeus, 1758)								
Sympodus ocellatus (Linnaeus, 1758)								
Sympodus doderleini Jordan, 1890								
Sympodus lineatus (Linnaeus, 1758)								
Thalassoma pavo (Linnaeus, 1758)								
Thorogobius ephippiatus (Lowe, 1839)								
Scorpaena scrofa (Linnaeus, 1758)								
Tripterygion tripteronotum (Risso, 1810)								
Jedinke neidentificiranih vrsti	5	4	6	2			1	2
Ukupno broj identificiranih vrsta po transekstu/lokaciji	6	5	8	7	4	4	4	5

* Kategorija rizičnosti od izumiranja: izumrle svoje (Extinct, EX), izumrle u prirodi (Extinct in the Wild, EW), kritično ugrožene (Critically Endangered, CR), ugrožene (Endangered, EN), osjetljive (Vulnerable, VU), gotovo ugrožene svoje (Near Threatened, NT), najmanje zabrinjavajuće svoje (Least Concern, LC) i ne dovoljno poznate svoje (Data Deficient, DD).

** Nacionalna kvalifikacija staništa (Bakran-Petricioli (2011)): G.3.4.1. Biocenoza infralitoralnih šljunaka; G.3.5.1. Biocenoza naselja vrste Posidonia oceanica; G.3.6.1. Biocenoza infralitoralnih alga; G.4.3.1. Koraligenska biocenoza; G.4.3.2. Biocenoza polutarnih špilja.



Struktura ribljih zajednica u Hvarskom kanalu

Mentor:
Buljan I.

Tablica 3 Prisutnost i brojnost vrsta, kvalifikacija biocenoza za ronilačku lokaciju Tatinja (TA)

Lokacija	Tatinja	Tatinja	Tatinja	Tatinja	Tatinja	Tatinja	Tatinja	Tatinja
Datum	20/10/2019	20/10/2019	20/10/2019	20/10/2019	20/10/2019	20/10/2019	20/10/2019	20/10/2019
Oznaka transepta	TA_T1	TA_T2	TA_T3	TA_T4	TA_T5	TA_T6	TA_T7	TA_T8
Vrijeme (početak urona)	11 h	11 h	11 h	11 h	11 h	11 h	11 h	11 h
Dubina (m)	20	20	15	15	10	10	5	5
Biocenoza*	G.3.6.1.	G.3.6.1.	G.3.6.1.	G.3.6.1.	G.3.6.1.	G.3.6.1.	G.3.6.1.	G.3.4.1.
<i>Chromis chromis</i> (Linnaeus, 1758)	12	dvije skupine 11-20	dvije skupine 11-20, skupina 21-50, pojedinačno 24	dvije skupine 11-20, pojedinačno 17	tri skupine 11-20, skupina 21-50, pojedinačno 11	tri skupine 11-20, pojedinačno 28	skupina 11-20, dvije skupine 51-100, pojedinačno 26	tri skupine 11-20, dvije skupine 51-100, pojedinačno 32
<i>Coris julis</i> (Linnaeus, 1758)	6			2	5	2	7	4
<i>Dicentrarchus labrax</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Diplodus annularis</i> (Linnaeus, 1758)			8	1	1	dvije skupine 11-20, pojedinačno 35	skupina 21-50, skupina 11-20, pojedinačno 11	skupina 11-20
<i>Diplodus puntazzo</i> (Cetti, 1777)								
<i>Diplodus sargus sargus</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Diplodus vulgaris</i> (Geoffroy St Hilaire, 1817)	5	2	5	3	skupina 11-20, skupina 21-50, pojedinačno 5	1	6	17
<i>Gobius auratus</i> (Risso, 1810)	2	1	4	4		2		
<i>Gobius genigiborus</i> (Valenciennes, 1837)					2		1	2
<i>Gobius vittatus</i> (Vinciguerra, 1883)								
<i>Mullus surmuletus</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Parablennius rouxi</i> (Cocco, 1833)								
<i>Sarpa sarpa</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Serranus cabrilla</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Scorpaena notata</i> (Rafinesque, 1810)				1				
<i>Scorpaena scrofa</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Serranus scriba</i> (Linnaeus, 1758)				3	1	2		10
<i>Sparus aurata</i> (Linnaeus, 1758)					14	1	11	skupina 21-50, pojedinačno 7
<i>Spicara maena</i> (Linnaeus, 1758)						5		
<i>Spicara smaris</i> (Linnaeus, 1758)		skupina 21-50, dvije skupine 51-100, skupina 101-200	tri skupine 11-20, skupina 21-50, pojedinačno 8				1	
<i>Spondylosoma cantharus</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Syphodus mediterraneus</i> (Linnaeus, 1758)						1		
<i>Syphodus ocellatus</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Syphodus doderleini</i> Jordan, 1890								
<i>Syphodus tenuis</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Thalassoma pavo</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Thorogobius ephippiatus</i> (Lowe, 1839)								
<i>Scorpaena scrofa</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Tripterygion tripteronotum</i> (Risso, 1810)	3			4			1	
Jedinke neidentificiranih vrsti	3			4				
Ukupno broj identificiranih vrsta po transektu/lokaciji	4	4	6	7	7	9	8	7

* Kategorija rizičnosti od izumiranja: izumrle svoje (Extinct, EX), izumrle u prirodi (Extinct in the Wild, EW), kritično ugrožene (Critically Endangered, CR), ugrožene (Endangered, EN), osjetljive (Vulnerable, VU), gotovo ugrožene svoje (Near Threatened, NT), najmanje zabrinjavajuće svoje (Least Concern, LC) i ne dovoljno poznate svoje (Data Deficient, DD).

** Nacionalna kvalifikacija staništa (Bakran-Petricioli (2011)): G.3.4.1. Biocenoza infralitoralnih šljunaka; G.3.5.1. Biocenoza naselja vrste *Posidonia oceanica*; G.3.6.1. Biocenoza infralitoralnih alga; G.4.3.1. Koraligenska biocenoza; G.4.3.2. Biocenoza polutarnih špilja.



Tablica 4 Prisutnost i brojnost vrsta, kvalifikacija biocenoza za ronilačku lokaciju Golublja špilja (GS)

Lokacija	Golublja špilja	Golublja špilja	Golublja špilja	Golublja špilja	Golublja špilja	Golublja špilja	Golublja špilja	Golublja špilja
Datum	21/10/2019	21/10/2019	21/10/2019	21/10/2019	21/10/2019	21/10/2019	21/10/2019	21/10/2019
Oznaka transepta	GS_T1	GS_T2	GS_T3	GS_T4	GS_T5	GS_T6	GS_T7	GS_T8
Vrijeme (početak urona)	11 h	11 h	11 h	11 h	11 h	11 h	11 h	11 h
Dubina (m)	20	20	15	15	10	10	5	5
Biocenoza**	G.3.6.1.	G.3.6.1.	G.3.6.1.	G.3.6.1.	G.3.6.1.	G.3.6.1.	G.4.3.2.	G.3.4.1.
<i>Chromis chromis</i> (Linnaeus, 1758)	3	skupina 100-200, pojedinačno 20	dvije skupine 11-20, skupina 21-50, pojedinačno 11	četiri skupine 11-20, pojedinačno 12	četiri skupine 11-20, pojedinačno 19	skupina 100-200, skupina 31-50, skupina 11-20, pojedinačno 21	skupina 51-100, skupina 21-50, skupina 14	tri skupine 21-50, skupina 51-100, pojedinačno 38
<i>Coris julis</i> (Linnaeus, 1758)	18	7	6	4	17	3	10	12
<i>Dicentrarchus labrax</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Diplodus annularis</i> (Linnaeus, 1758)	1	2	5			6		skupina 11-20, skupina 51-100, pojedinačno 7
<i>Diplodus puntazzo</i> (Cetti, 1777)								
<i>Diplodus sargus sargus</i> (Linnaeus, 1758)					2			
<i>Diplodus vulgaris</i> (Geoffroy St Hilaire, 1817)	5				11	2	4	13
<i>Gobius auratus</i> (Risso, 1810)		4	7	10	4	3	4	
<i>Gobius geniporus</i> (Valenciennes, 1837)			3	2			3	
<i>Gobius vittatus</i> (Vinciguerra, 1883)								
<i>Mullus surmuletus</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Parablennius rouxi</i> (Cocco, 1833)								
<i>Sarpa sarpa</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Serranus cabrilla</i> (Linnaeus, 1758)	3	2	4	1				
<i>Scorpaena notata</i> (Rafinesque, 1810)								1
<i>Scorpaena scrofa</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Serranus scriba</i> (Linnaeus, 1758)		2		1			4	4
<i>Sparus aurata</i> (Linnaeus, 1758)				10			skupina 11-20	skupina 11-20, pojedinačno 2
<i>Spicara maena</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Spicara smaris</i> (Linnaeus, 1758)		skupina 11-20, skupinna 21-50, pojedinačno 15	dvije skupine 11-20, pojedinačno 16	skupina 11-20	skupinan 21-50	skupina 11-20		
<i>Spondyliosoma cantharus</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Syphodus mediterraneus</i> (Linnaeus, 1758)								4
<i>Syphodus ocellatus</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Syphodus doderleini</i> Jordan, 1890								
<i>Syphodus tinca</i> (Linnaeus, 1758)					1	1	4	3
<i>Thalassoma pavo</i> (Linnaeus, 1758)								5
<i>Thorogobius ephippiatus</i> (Lowe, 1839)	4	3			1			1
<i>Scorpaena scrofa</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Tripterygion tripteronotum</i> (Risso, 1810)								
Jedinke neidentificiranih vrsti					2			
Ukupno broj identificiranih vrsta po transektu/lokaciji	6	8	7	11	7	7	8	10

* Kategorija rizičnosti od izumiranja: izumrle svoje (Extinct, EX), izumrle u prirodi (Extinct in the Wild, EW), kritično ugrožene (Critically Endangered, CR), ugrožene (Endangered, EN), osjetljive (Vulnerable, VU), gotovo ugrožene svoje (Near Threatened, NT), najmanje zabrinjavajuće svoje (Least Concern, LC) i ne dovoljno poznate svoje (Data Deficient, DD).

** Nacionalna kvalifikacija staništa (Bakran-Petricoli (2011)): G.3.4.1. Biocenoza infralitoralnih šljunaka; G.3.5.1. Biocenoza naselja vrste *Posidonia oceanica*; G.3.6.1. Biocenoza infralitoralnih alga; G.4.3.1. Koraligenska biocenoza; G.4.3.2. Biocenoza polutarnih špilja.



Tablica 5 Prisutnost i brojnost vrsta, kvalifikacija biocenoza za ronilačku lokaciju Zlatni rat (ZR)

Lokacija	Zlatni rat	Zlatni rat	Zlatni rat	Zlatni rat	Zlatni rat	Zlatni rat	Zlatni rat	Zlatni rat
Datum	24/10/2019	25/10/2019	26/10/2019	27/10/2019	28/10/2019	29/10/2019	30/10/2019	31/10/2019
Oznaka transepta	ZR_T1	ZR_T2	ZR_T3	ZR_T4	ZR_T5	ZR_T6	ZR_T7	ZR_T8
Vrijeme (početak urona)	11 h	11 h	11 h	11 h	11 h	11 h	11 h	11 h
Dubina (m)	20	20	15	15	10	5	5	5
Biocenoza**	G.3.5.1.	G.3.5.1.	G.3.5.1.	G.3.5.1.	G.3.6.1.	G.3.6.1.	G.3.4.1.	
<i>Chromis chromis</i> (Linnaeus, 1758)				skupina 11-20, pojedinačno 2	skupina 11-20, pojedinačno 19	18	dvije skupine 21- 50, pojedinačno 6	tri skupine 21-50, dvije skupine 11- 20, jedna skupina 51-100, pojedinačno 10
<i>Coris julis</i> (Linnaeus, 1758)	4	3	2	2	16	9	10	4
<i>Dicentrarchus labrax</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Diplodus annularis</i> (Linnaeus, 1758)	1	2	3	4	3			skupina 21-50
<i>Diplodus puntazzo</i> (Cetti, 1777)								
<i>Diplodus sargus sargus</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Diplodus vulgaris</i> (Geoffroy St Hilaire, 1817)			1			3		2
<i>Gobius auratus</i> (Risso, 1810)								
<i>Gobius geniporus</i> (Valenciennes, 1837)		1	2				1	3
<i>Gobius vittatus</i> (Vinciguerra, 1883)								
<i>Mullus surmuletus</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Parablennius rouxi</i> (Cocco, 1833)								
<i>Sarpa sarpa</i> (Linnaeus, 1758)					1			
<i>Serranus cabrilla</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Scorpaena notata</i> (Rafinesque, 1810)								
<i>Scorpaena scrofa</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Serranus scriba</i> (Linnaeus, 1758)	1	1	2		4			1
<i>Sparus aurata</i> (Linnaeus, 1758)							skupina 21-50	7
<i>Spicara maena</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Spicara smaris</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Spondyliosoma cantharus</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Symphodus mediterraneus</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Symphodus ocellatus</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Symphodus doderleini</i> Jordan, 1890								
<i>Symphodus tinca</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Thalassoma pavo</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Thorogobius ephippiatus</i> (Lowe, 1839)								2
<i>Scorpaena scrofa</i> (Linnaeus, 1758)								
<i>Tripterygion tripteronotum</i> (Risso, 1810)								
Jedinke neidentificiranih vrsti								
Ukupno broj identificiranih vrsta po transektu/lokaciji	3	5	4	3	5	3	4	8

* Kategorija rizičnosti od izumiranja: izumrle svojte (Extinct, EX), izumrle u prirodi (Extinct in the Wild, EW), kritično ugrožene (Critically Endangered, CR), ugrožene (Endangered, EN), osjetljive (Vulnerable, VU), gotovo ugrožene svojte (Near Threatened, NT), najmanje zabrinjavajuće svojte (Least Concern, LC) i ne dovoljno poznate svojte (Data Deficient, DD).

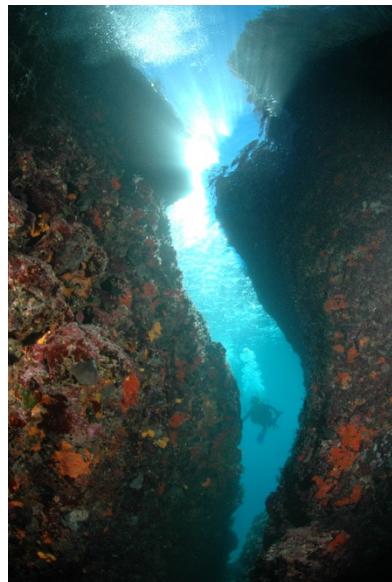
** Nacionalna kvalifikacija staništa (Bakran-Petricioli (2011)): G.3.4.1. Biocenoza infralitoralnih šljunaka; G.3.5.1. Biocenoza naselja vrste *Posidonia oceanica*; G.3.6.1. Biocenoza infralitoralnih alga; G.4.3.1. Koraligenska biocenoza; G.4.3.2. Biocenoza polutarnih špilja.



Prilog 2 Snimke terenskog rada



Slika 12 Golublja špilja

Slika 13 *Diplodus vulgaris* (fratar)
na Smočiguzici

Slika 14 Golublja špilja

Slika 15 Početak označavanja
transekta pomoću konopaSlika 16 Označavanje transekta
pomoću konopaSlika 17 Završetak označavanja
transekta pomoću konopaSlika 18 *Chromis chromis*
(crnej)Slika 19 *Sparus aurata*
(orada, komarča)Slika 20 *Scorpaena notata*
(škarpinica, škarpući)



ŽUĆENJE SMOKVE

Karmen Jelović i Dora Sovulj, 7. razred

Osnovna škola Josip Pupačić, Omiš

Mentor: Tamara Banović

SAŽETAK

Tijekom posljednjih pet godina motrimo i bilježimo fenološke promjene na jedinku smokve (*Ficus carica L.*) koja se nalazi na južnoj strani školskog dvorišta i koja je izložena sunčevom zračenju tijekom cijelog dana. Istraživanje je obavljeno tijekom razdoblja žućenja lišća, u razdoblju od listopada do prosinca 2019. godine. Cilj rada bio je odrediti prisutnost biljnih pigmenata u različito obojenim listovima smokve tijekom žućenja. Promjene su se pratile na tri razine: (i) vizualna promjena boje lišća, (ii) uočavanje biljnih pigmenata u stanicama lista korištenjem mikroskopa i pametnog telefona te (iii) odjeljivanje i određivanje pigmenata metodom kromatografije na papiru. Rezultati kromatografije na papiru pokazuju da su u zeleno obojenim listovima, osim dvije vrste klorofila, uvijek prisutni iksantofili i karotenoidi, odnosno žuti i narančasti pigmenti. Takvi pigmenti vidljivi su i mikroskopom, ali samo u svjetlo zeleno obojenim listovima, dok su u tamno zelenim listovima mikroskopom vidljivi samo zeleni pigmenti. U smeđim i žutim listovima izostaje prisutnost zelenih pigmenata te se može zaključiti da se u tako obojanim listovima klorofil razgrađuje i nestaje.

Ključne riječi: biljni pigmenti; klorofil; žućenje lišća; kromatografija

UVOD

Tijekom pet posljednjih godina, u okviru GLOBE programa koji djeluje u našoj školi, motrimo i bilježimo fenološke promjene smokve (*Ficus carica L.*). Smokva je listopadna biljka, prirodno rasprostranjena na području starog svijeta širom toplijih krajeva te je nezaobilazna biljka mediteranskog područja. O dugoj tradiciji uzgoja smokve u Dalmaciji svjedoči edikt cara Dioklecijana iz 301. godine koji potvrđuje da se u ovim područjima smokva užgajala jako davno (GVA, 2018). Smokva je otporna na sušu i ne zahtijeva bogato, plodno tlo. Životni vijek joj je oko 200 godina. Najčešće dolazi u obliku grma, iznimno joj stablo može narasti i do 10 m visine, tvoreći široku krošnju s jako razvijenim, dugim no slabo razgranatim granama. Listovi su naizmjenični, rastu na vrhovima grana, na peteljci dugoj 3 – 6 cm, jednostavnii su, dužine 10 – 25 cm, duboko usječeni čime su podijeljeni na 3 – 5 režnjeva. Pri osnovi su srcoliki ili ravni, na rubovima cjeloviti, kožasti, na licu tamnozeleni i hrapavo dlakavi, a naličje im je svijetlozeleno i malo dlakavo (Priroda i biljke, 2020).

Jedinka smokve na kojoj pratimo fenološke promjene u okviru GLOBE programa visoka je 7,2 m, razgranjena, širine krošnje promjera oko 3 m. Raste na tlu kojega smo, prema GLOBE protokolu, odredili kao pjeskovitu ilovaču. Vrsta tla na kojem smokva raste određivana je prije početka fenoloških motrenja, u ožujku 2016. godine i to dvjema metodama: sedimentacijom u menzuri i metodom probe prstima (*feel* metoda). Promatrano stablo smokve smješteno je na južnoj strani školskog vrta, nezaklonjeno i izloženo sunčevom zračenju tijekom čitavoga dana. Koristeći GLOBE protokole, tijekom godine, bilježimo pojavu prvih pupova i mjerimo prirast duljine lista u centimetrima te pojavu žućenja i otpadanja listova. Pupanje i ozelenjavanje pratimo od početka ožujka, dok žućenje lista pratimo od početka listopada. Ovisno o vremenskim uvjetima, vrijeme fenoloških promjena razlikuje se od godine do godine.

Pigmenti ili bojila su tvari različitog kemijskog sastava koji daju boju različitim tvorevinama u živom svijetu jer selektivno apsorbiraju i reflektiraju svjetlost određenih valnih duljina. Tako, primjerice, tvar plave boje upija (apsorbira) zeleni i crveni spektar sunčevog zračenja, a odbija (reflektira) plavi dio spektra te ju zato i vidimo plavo obojenu (Radić i Pongrac Štimac, 2016).



Zeleni pigmenti u biljnoj stanici nazivaju se klorofili, u najvećoj koncentraciji su zastupljeni klorofil *a* i klorofil *b*. Klorofili apsorbiraju valne duljine crvene i plave boje pa stoga našem oku izgledaju zelene boje. Molekule klorofila nisu stabilne te ih jaka sunčeva svjetlost lako uništi. Zbog toga biljna stanica mora proizvoditi nove molekule klorofila. Osim klorofila, u biljnoj stanici postoje i drugi pigmenti. Veliku skupinu pigmenata tvore karotenoidi koje dijelimo u dvije skupine: žute pigmente ksantofile i narančaste pigmente karotenoide (Vrtlarija Kalići, 2010).

Približavanjem jeseni, pokreće se čitav niz metaboličkih procesa kod biljaka, a najuočljivija promjena kod listopadnih stabala je promjena boje lišća i njihovo opadanje. Budući da biljke u svojim listovima sadrže zeleni biljni pigment klorofil, koji je važan za proces fotosinteze i opstanak biljaka, zanimalo nas je nestaje li klorofil iz lišća nakon što započne njihovo žućenje. Istraživačka pitanja koja smo si postavili su: Je li klorofil prisutan u listu smokve nakon što ono počne žutiti? Jesu li u zelenom listu prisutni i neki drugi biljni pigmenti osim klorofila?

Cilj je ovoga rada odrediti prisutnost biljnih pigmenata u različito obojenim listovima smokve tijekom žućenja. Naša je prepostavka da u zelenom listu smokve, osim klorofila, postoje i neki drugi biljni pigmenti. Također, pretpostavljamo da tijekom žućenja iz lista nestaje klorofil i da su u žuto, narančasto i smeđe obojenim listovima prisutne druge vrste pigmenata.

METODE

Područje i razdoblje istraživanja

Istraživanje se provodilo od početka listopada do polovine prosinca 2019. godine na jedinki smokve (*Ficus carica* L.), koja je samonikla biljka, smještena u južnom dijelu školskog dvorišta (geografska širina: 43.44309 sjeverno, geografska dužina: 16.6921 istočno, nadmorska visina: 2 m n.m.).

Koncem je označeno 30 listova smokve na kojima se prate promjene. Opažanja su obavlјana na tri razine: makroskopski - vizualno opažanje žućenja (*green down*), mikroskopski - uočavanje pigmenata u stanicama listova pomoću mikroskopa i pametnog telefona te odjeljivanje pigmenata iz alkoholnog ekstrakta metodom kromatografije na papiru.

Žućenje lišća (*green down*)

Žućenje (*green down*) se prati na 30 označenih listova. Promjena boje bilježi se na prvih deset označenih i numeriranih listova prema priloženoj karti boja (slika 1). Ostalih dvadeset listova koristi se za izradu mikroskopskih preparata i odvajanje biljnih pigmenata metodom kromatografije na papiru.

Koristeći GLOBE protokole za žućenje lišća uspoređivana je boja označenih i numeriranih listova s kartom boja. Boja lista je određena na način da se najveći dio površine lista bojom preklapa s određenom bojom na karti te mu je pridružena odgovarajuća šifra s karte boja (GLOBE, 1994a, b). Opažanja su obavlјana dva do tri puta tjedno, počevši od 1. listopada 2019. godine i motrenje za svaki list traje do njegovog opadanja sa stabla. Vođena je evidencija za svaki od deset označenih listova, tako da se u pripremljenu tablicu uz datum upisivala određena oznaka boje s karte za svaki od promatranih listova.



Slika 1 Karta boja korištena za praćenje žućenja listova smokve (GLOBE, 1994a)

Mikroskopiranje stanica lista smokve

Tijekom žućenja lista smokve, izrađeni su mikroskopski preparati tankih presjeka različito obojenih listova. Na predmetno stakalce stavlja se kapljica vode. List se prereže tako da se razdvoji tanka kožica. Tanki, gotovo prozirni dio lista stavi se u pripremljenu kapljicu vode na predmetnom stakalcu i pokrije pokrovnim stakalcem. Tako pripremljeni uzorci promatralju se mikroskopom za pametni telefon povećanja 60 x. Za promatranje se u radu koristio pametni telefon Samsung Galaxy S10, kojim se fotografira slika uvećanog mikroskopskog preparata. Na fotografijama se uočavaju biljne stanice koje sadržavaju pigmente različitih boja. Izrađena su po tri mikroskopska preparata od svih listova označenih različitom oznakom s karte boja. Za izradu mikroskopskih preparata korišteni su koncem označeni, ali ne numerirani listovi koji se bojom preklapaju s označenim numeriranim listovima.

Odvajanje biljnih pigmenata metodom kromatografije

Kako bi se ispitala i prisutnost pigmenata koji se ne mogu uočiti okom ili mikroskopom, koristila se metoda odvajanja biljnih pigmenata metodom kromatografije. Kromatografija je metoda razdvajanja tvari iz homogenih smjesa koja se temelji na različitoj brzini putovanja molekula ili iona nošenih otapalom po nepokretnoj fazi. Pojedini sastojci smjese putuju različitom brzinom i na taj način se odijele (Rudarska, 2018).

List određene boje, kojem se određuju pigmenți, usitni se škarama, izrezujući tanke, kratke trake. Usitnjениm lišćem napuni se tarionik, doda 5 ml 96%-trog alkohola etanola te batićem usitnjava i miješa sadržaj desetak minuta. Sadržaj se ostavi mirovati te se nakon 30 min profiltrira. Filtrat je otopina alkohola i biljnih pigmenta ekstrahiranih iz listova te je otopina uglavnom zeleno, a ponekad i



žućkasto ili smeđe obojana. Filtrat se profiltrira u laboratorijsku čašu, koja se uroni u vruću vodenu kupelj, kako bi se omogućilo hlapljenje alkohola. Nakon 30 minuta, čaša s alkoholom se izvadi iz vodene kupelji i ohladi. Pripremi se filter papir za kromatografiju, tako da se izrežu trake 1 cm široke i 12 cm dugačke. Na visini 2 cm od dna papira, olovkom se označi tzv. startna linija. Rubom kovanice se prijeđe preko ohlađene smjese alkohola i biljnih pigmenata te se kovanicom prijeđe preko startne linije i pričeka da se naneseni sadržaj osuši. Zatim se papir s uzorkom stavi u epruvetu, u koju se prethodno ulije 1 ml 96%-tnog alkohola etanola (Radić i Pongrac Štimac, 2016). Razina alkohola, koja je inicijalno bila ispod startne linije, nakon kratkog vremena se počinje uzdizati na papiru za kromatografiju, prelazi preko nanesenog uzorka i sa sobom nosi boju. Biljna boja je homogena smjesa različitih pigmenata koji se kreću različitom brzinom nošeni otapalom alkoholom. Kromatografija na papiru zasniva se na razdiobi tvari koju razdjeljujemo (npr. ekstrakt pigmenata) između otapala kao tekuće mobilne faze (alkohol etanol) i stacionarne faze krutog adsorbensa (filter-papir). Kod ovakve kromatografije, otapalo se uspinje uz papir zbog kapilarnih sila, prenoseći bolje topljive tvari iz smjese dalje od startne linije. Slabije topljive tvari u smjesi otapalo će sporije otopiti te samim time i prenijeti kraći dio puta. Teško topive tvari će s otapalom prevaliti najmanji dio puta. Mjesto na koje nanosimo uzorak naziva se start, a fronta je mjesto najveće udaljenosti mobilne faze (otapala) od starta. Brzina prolaska tvari po papiru proporcionalna je prijeđenom putu. O brzini prelaska tvari možemo zaključiti iz omjera prijeđenog puta tvari od starta i udaljenosti fronte od starta (Lisjak i sur., 2009). Kada je otapalo zaustavilo svoje kretanje, papir za kromatografiju se izvadi iz epruvete i pusti da se osuši kroz nekoliko minuta. Nakon sušenja, na papiru za kromatografiju vidljivo je onoliko tragova boje koliko pigmenata ima u listu biljke. Ravnalom se mjeri udaljenost koju je doseglo otpalo i udaljenost koju je dosegao pigment te se izračunava faktor zaostajanja za pojedine pigment. Faktor zaostajanja (R_f) jednak je omjeru udaljenosti koju je dosegao pigment i udaljenosti koju je doseglo otapalo.

REZULTATI

U razdoblju od 1. listopada 2019. godine, zabilježene su promjene boja deset listova jedinke smokve (*Ficus carica* L.) tijekom žućenja. Promjene su bilježene sve do trenutka otpadanja lišća. Rezultati su prikazani u tablici 1. Listovi označeni brojevima 1, 2, i 3, koji su se nalazili na najnižem položaju u krošnji, ujednačeno su mijenjali boju od početka praćenja do 4. studenoga 2019., kada se počinje uočavati razlika u boji prilikom žućenja. Ovi listovi su otpali među posljednjima, u razdoblju od 2. do 16. prosinca 2019. Listovi označeni brojevima od 4 do 7 nalazili su se u srednjem dijelu krošnje stabla, mijenjali su boju nejednako, otpali su među prvima te su i otpadali s većim vremenskim odmakom, od 18. listopada do 25. studenoga 2019. Listovi koji su se nalazili najviše u krošnji, označeni brojevima 8, 9 i 10 mijenjali su boju uglavnom jednoliko i svi su otpali sa stabla u jednom danu, 19. studenog 2019. godine.

Tablica 1 Praćenje promjene boje listova smokve tijekom žućenja prema karti boja

Datum	List 1	List 2	List 3	List 4	List 5	List 6	List 7	List 8	List 9	List 10
1.10.19. 3/2	5GY 3/2	5GY 3/2	5GY 3/2	5GY 3/2	5G 4/2	5GY 3/2	5GY 3/2	5G 4/2	5GY 3/2	5GY 3/2
4.10.19. 3/2	5GY 3/2	5GY 4/8	5GY 3/2	5GY 3/2	5G 4/2	5GY 3/2	5GY 4/8	5G 4/2	5GY 3/2	5GY 3/2
9.10.19. 3/2	5GY 3/2	5GY 4/8	5GY 3/2	5GY 3/2	5G 4/2	5GY 3/2	5GY 4/8	5GY 4/8	5GY 3/2	5GY 3/2
11.10.19. 3/2	5GY 3/2	5GY 4/8	5GY 3/2	5GY 4/8	5GY 3/2	5GY 3/2	5GY 4/8	5GY 4/8	5GY 3/2	5GY 3/2
14.10.19. 3/2	5GY 3/2	5GY 4/8	5GY 3/2	5GY 4/8	5GY 3/2	5GY 3/2	5GY 4/8	5GY 4/8	5GY 3/2	5GY 3/2



vidljive dvije vrste pigmenata: svijetlo žuti i tamno žuti odnosno žuto-narančasti. Kromatografijom na papiru također se izdvajaju žuti i narančasti pigmenti, dok zelenih pigmenata nema. U smeđe obojanim listovima (7.5Y 3/4 i 5R 3/4) na mikroskopskom preparatu uočava se i smeđe obojani pigment, a uz smeđi, kromatografijom se odvajaju i žuti i žuto-narančasti pigmenti, dok zeleni pigmenti nisu uočljivi.

Tablica 2 Usporedni prikaz rezultata praćenja promjene boje lišća smokve tijekom žučenja: promjena boje prema karti boja, fotografija mikroskopskog preparata i rezultat kromatografije na papiru

Datum i šifra boje lista prema karti boja	Fotografija mikroskopskog preparata	Fotografija filter-papira nakon kromato-grafije	Pigmenti	Udaljenost u cm koju su prešli pigmenti (b)	Udaljenost u cm koju je prešlo otapalo (a)	Rf - faktor zaostajanja Rf=b/a
1.10.19. 5GY 3/2			klorofil b klorofil a ksantofil karoten	2,7 cm 4,0 cm 4,3 cm 5,4 cm	6 cm 6 cm 6 cm 6 cm	0,45 0,66 0,71 0,90
1.10.19. 5G 4/2			klorofil b klorofil a ksantofil karoten	2,6 cm 3,8 cm 4,3 cm 5,5 cm	6 cm 6 cm 6 cm 6 cm	0,43 0,63 0,71 0,92
4.10.19. 5GY 4/8			klorofil b klorofil a ksantofil karoten	2,8 cm 3,9 cm 4,5 cm 5,6 cm	6,2 cm 6,2 cm 6,2 cm 6,2 cm	0,45 0,63 0,72 0,90



16.10.19. 2.5Y 8/12			<table border="1"> <tr><td>ksantofil</td><td>4,6 cm</td><td>6,5 cm</td><td>0,71</td></tr> <tr><td>karoten</td><td>5,9 cm</td><td>6,5 cm</td><td>0,91</td></tr> </table>	ksantofil	4,6 cm	6,5 cm	0,71	karoten	5,9 cm	6,5 cm	0,91								
ksantofil	4,6 cm	6,5 cm	0,71																
karoten	5,9 cm	6,5 cm	0,91																
21.10.19. 5GY 7/12			<table border="1"> <tr><td>klorofil b</td><td>2,8 cm</td><td>6,1 cm</td><td>0,46</td></tr> <tr><td>klorofil a</td><td>4,0 cm</td><td>6,1 cm</td><td>0,65</td></tr> <tr><td>ksantofil</td><td>4,4 cm</td><td>6,1 cm</td><td>0,72</td></tr> <tr><td>karoten</td><td>5,7 cm</td><td>6,1 cm</td><td>0,93</td></tr> </table>	klorofil b	2,8 cm	6,1 cm	0,46	klorofil a	4,0 cm	6,1 cm	0,65	ksantofil	4,4 cm	6,1 cm	0,72	karoten	5,7 cm	6,1 cm	0,93
klorofil b	2,8 cm	6,1 cm	0,46																
klorofil a	4,0 cm	6,1 cm	0,65																
ksantofil	4,4 cm	6,1 cm	0,72																
karoten	5,7 cm	6,1 cm	0,93																
23.10.19. 5GY 6/10			<table border="1"> <tr><td>klorofil b</td><td>2,9 cm</td><td>6,5 cm</td><td>0,46</td></tr> <tr><td>klorofil a</td><td>4,2 cm</td><td>6,5 cm</td><td>0,65</td></tr> <tr><td>ksantofil</td><td>4,6 cm</td><td>6,5 cm</td><td>0,71</td></tr> <tr><td>karoten</td><td>6,1 cm</td><td>6,5 cm</td><td>0,94</td></tr> </table>	klorofil b	2,9 cm	6,5 cm	0,46	klorofil a	4,2 cm	6,5 cm	0,65	ksantofil	4,6 cm	6,5 cm	0,71	karoten	6,1 cm	6,5 cm	0,94
klorofil b	2,9 cm	6,5 cm	0,46																
klorofil a	4,2 cm	6,5 cm	0,65																
ksantofil	4,6 cm	6,5 cm	0,71																
karoten	6,1 cm	6,5 cm	0,94																
23.10.19. 5GY 5/10			<table border="1"> <tr><td>klorofil b</td><td>2,8 cm</td><td>6,2 cm</td><td>0,45</td></tr> <tr><td>klorofil a</td><td>4,0 cm</td><td>6,2 cm</td><td>0,64</td></tr> <tr><td>ksantofil</td><td>4,4 cm</td><td>6,2 cm</td><td>0,72</td></tr> <tr><td>karoten</td><td>5,7 cm</td><td>6,2 cm</td><td>0,92</td></tr> </table>	klorofil b	2,8 cm	6,2 cm	0,45	klorofil a	4,0 cm	6,2 cm	0,64	ksantofil	4,4 cm	6,2 cm	0,72	karoten	5,7 cm	6,2 cm	0,92
klorofil b	2,8 cm	6,2 cm	0,45																
klorofil a	4,0 cm	6,2 cm	0,64																
ksantofil	4,4 cm	6,2 cm	0,72																
karoten	5,7 cm	6,2 cm	0,92																



25.10.19 7.5YR 3/4			<table border="1"> <tr><td>ksantofil</td><td>4,5 cm</td><td>6,1 cm</td><td>0,72</td></tr> <tr><td>karoten</td><td>5,6 cm</td><td>6,1 cm</td><td>0,91</td></tr> <tr><td>antocijan</td><td>5,9 cm</td><td>6,1 cm</td><td>0,97</td></tr> </table>	ksantofil	4,5 cm	6,1 cm	0,72	karoten	5,6 cm	6,1 cm	0,91	antocijan	5,9 cm	6,1 cm	0,97				
ksantofil	4,5 cm	6,1 cm	0,72																
karoten	5,6 cm	6,1 cm	0,91																
antocijan	5,9 cm	6,1 cm	0,97																
25.10.19 2.5Y 8/6			<table border="1"> <tr><td>klorofil b</td><td>2,8 cm</td><td>6,5 cm</td><td>0,43</td></tr> <tr><td>klorofil a</td><td>4,2 cm</td><td>6,5 cm</td><td>0,65</td></tr> <tr><td>ksantofil</td><td>4,6 cm</td><td>6,5 cm</td><td>0,71</td></tr> <tr><td>karoten</td><td>6,1 cm</td><td>6,5 cm</td><td>0,94</td></tr> </table>	klorofil b	2,8 cm	6,5 cm	0,43	klorofil a	4,2 cm	6,5 cm	0,65	ksantofil	4,6 cm	6,5 cm	0,71	karoten	6,1 cm	6,5 cm	0,94
klorofil b	2,8 cm	6,5 cm	0,43																
klorofil a	4,2 cm	6,5 cm	0,65																
ksantofil	4,6 cm	6,5 cm	0,71																
karoten	6,1 cm	6,5 cm	0,94																
28.10.19 5R 3/4			<table border="1"> <tr><td>ksantofil</td><td>4,7 cm</td><td>6,4 cm</td><td>0,73</td></tr> <tr><td>karoten</td><td>5,8 cm</td><td>6,4 cm</td><td>0,91</td></tr> <tr><td>antocijan</td><td>6,2 cm</td><td>6,4 cm</td><td>0,97</td></tr> </table>	ksantofil	4,7 cm	6,4 cm	0,73	karoten	5,8 cm	6,4 cm	0,91	antocijan	6,2 cm	6,4 cm	0,97				
ksantofil	4,7 cm	6,4 cm	0,73																
karoten	5,8 cm	6,4 cm	0,91																
antocijan	6,2 cm	6,4 cm	0,97																
6.11.19 2.5Y 6/6			<table border="1"> <tr><td>klorofil b</td><td>2,8 cm</td><td>6,1 cm</td><td>0,46</td></tr> <tr><td>klorofil a</td><td>4,0 cm</td><td>6,1 cm</td><td>0,65</td></tr> <tr><td>ksantofil</td><td>4,4 cm</td><td>6,1 cm</td><td>0,72</td></tr> <tr><td>karoten</td><td>5,7 cm</td><td>6,1 cm</td><td>0,93</td></tr> </table>	klorofil b	2,8 cm	6,1 cm	0,46	klorofil a	4,0 cm	6,1 cm	0,65	ksantofil	4,4 cm	6,1 cm	0,72	karoten	5,7 cm	6,1 cm	0,93
klorofil b	2,8 cm	6,1 cm	0,46																
klorofil a	4,0 cm	6,1 cm	0,65																
ksantofil	4,4 cm	6,1 cm	0,72																
karoten	5,7 cm	6,1 cm	0,93																

RASPRAVA

Praćenjem žućenja lišća smokve (*Ficus carica L.*), smještene na južnoj strani školskog dvorišta uočava se pojava žućenja lišća od sredine listopada, a proces odbacivanja lišća traje do polovice prosinca. Prema rezultatima provedenog istraživanja utvrđeno je da na mikroskopskim preparatima vizualno zeleno obojanih listova, dominiraju zeleni pigmenti. Na pojedinim mikroskopskim preparatima mogu se uočiti svijetlo zeleni i tamno zeleni pigmenti, dok se u jako tamno obojanim listovima ne uočava



takva razlika već dominira tamno zeleni pigment. Na mikroskopskim preparatima načinjenim od svjetlozeleno obojanih listova mogu se uočiti i žuti pigmenti koji okom nisu vidljivi. Metodom kromatografije na papiru u zelenim listovima, uz tamniji klorofil *a* i svjetlijii klorofil *b*, u zelenim listovima izdvojeni su i žuti pigmenti ksantofili i žuto-narančasti pigmenti karotenoidi. Takvi rezultati u skladu su s našom pretpostavkom, ali i s dosadašnjim saznanjima (Lisjak i sur., 2009; Radić i Pongrac Štimac, 2016). Promjenom boje lišća, mijenja se i sastav biljnih pigmenata na način da zeleni pigmenti klorofil *a* i *b* propadaju pa žuti i narančasti pigmenti postaju vidljivi mikroskopom te se izdvajaju i na filter-papiru metodom kromatografije. Tom metodom potvrđuje se nedostatak klorofila u žuto obojenom lišću, što je u skladu s našom pretpostavkom. U smeđim listovima, uz ksantofile i karotenoide, metodom kromatografije izdvajaju se i smeđi pigmenti koji nastaju procesom žućenja lišća, a isti su vidljivi mikroskopom. Prema Lisjak i sur. (2009), na papiru za kromatografiju prvo se odvajaju pigmenti kojim imaju najmanju topljivost u otpalu. U našem slučaju prvo se odvajao svijetlo zeleni pigment klorofil *b*, a potom i klorofil *a*, koji ima tamno zelenu boju. Bolju topljivost ima žuti pigment ksantofil koji se izdvaja treći, a četvrti po redu se izdvaja narančasti pigment karoten. U uzorcima sa smeđim pigmentom, smeđi pigment se izdvojio posljednji što znači da je najbolje topljiv u alkoholu etanolu od svih prisutnih pigmenata. Da se radi o istoj vrsti pigmenata u različito obojanim listovima pokazuju podjednaki faktori zaostajanja za svaki od pigmenata u svim uzorcima.

ZAKLJUČCI

Na osnovu provedenog istraživanja, može se zaključiti da su žuti i narančasti pigmenti sastavni dio svih listova, ali u zeleno obojanim listovima nisu vidljivi okom jer ih prekriva velika količina zelenog pigmenta klorofila. Žućenjem lišća u biljnim stanicama klorofil propada, dok su ksantofili i karotenoidi i dalje prisutni u biljnim stanicama. Tijekom žućenja, u smeđim listovima također propada klorofil, a uz žute i narančaste pigmente mogu se uočiti i smeđe-crveni pigmenti koji se tijekom žućenja stvaraju u listovima biljaka.

LITERATURA

- GLOBE. 1994a. Color change od leaves. https://www.globe.gov/documents/18702582/47430627/Task+2+%E2%80%93+Color+Change+of+Leaves.pdf/27a5_1ba7-bf95-4ff7-85dc-f5e189640070, pristupljeno 1. 10. 2019.
- GLOBE. 1994b. Green-Down protocol. <https://www.globe.gov/documents/355050/849d4a1a-96dd-4965-ab36-0ae77a447cd9>, pristupljeno 1. 10. 2019.
- GVA (Geopark Viški Arhipelag). 2018. Smokva Ficus carica var. sativa. <https://geopark-vis.com/smokva-ficus-carica-var-sativa>, pristupljeno 4. listopada 2019.g
- Lisjak M., Špoljarović M., Agić D., Andrić L. 2009. Određivanje kloroplastnih pigmenata, Praktikum iz fiziologije bilja. Poljoprivredni fakultet, Osijek, str. 1-6.
- Priroda i biljke. 2020. Plantea. Smokva (Ficus carica). <https://www.plantea.com.hr/smokva/>, pristupljeno 3. 1. 2020.
- Radić M., Pongrac Štimac Z. 2016. Kromatografija biljnih pigmenata – „Utrka“ molekula iz lista špinata. Prirodoslovna lepeza.
- Rudarska. 2018. Vježba 10. Kromatografija. Opća kemija s vježbama – ekološki tehničar 1. razred. http://www.rudarska.hr/wp-content/uploads/2018/02/Vje%C5%BEba_10_Kromatografija.pdf, pristupljeno 3. 1. 2020.
- Vrtlarija Kalići. 2010. Jesenske boje kod biljaka - kako i zašto? <https://vrtlarijakalici.jimdofree.com/o-biljkama/trajnice/jesenske-boje-kod-biljaka-kako-i-za%C5%A1to/>, pristupljeno 5. 9. 2020.

PRIMAMLIJIVA, ALI ŠTETNA OVISNOST O GLUTAMINATIMA

Katarina Vilić i Vita Šeremet, 8. razred

OŠ Ljudevita Gaja, Zaprešić

Mentor: Đurđica Patafta

SAŽETAK

Aditive E 620 – E 625, poznatih kao „poboljšivači i pojačivači okusa“ (kratica MSG) konzumiramo u različitim namirnicama (grickalice, paštete, hrenovke, salame,...). Istraživanje je provedeno na uzorku od 140 učenika. Rezultati su uspoređivani kod učenika viših i nižih razreda. Ciljevi istraživanja su bili ispitati koliko se učenici zdravo hrane i razmišljaju o kvaliteti namirnica koje konzumiraju, postoji li mogućnost ovisnosti učenika o namirnicama obogaćenim aditivima na bazi glutaminata (E 620 – E 625), kolika je preferencija namirnica koje sadrže aditive E 620 – E 625 kod učenika viših i nižih razreda te u kojem su odnosu indeks tjelesne mase (BMI) učenika i konzumacija namirnica obogaćenih aditivima na bazi glutaminata (E 620 – E 625). Dokazano je da je svijest o štetnosti pojedinih namirnica s aditivima E620 – E625 među učenicima nižih razreda vrlo niska. Učenici viših razreda pokazuju veću sklonost prema hrani s glutaminatima. Duljim vremenom konzumiranja takvih namirnica, povećava se i moguća ovisnost o glutaminatima.

Ključne riječi: aditivi E620 – E625; preferencija učenika; zdrava i nezdrava prehrana; tjelesna masa

UVOD

Vrlo se rijetko razmišљa o činjenici zašto su namirnice poput različitih vrsta grickalica, gotovih juha i umaka, začina, suhomesnatih proizvoda, hrenovka i mnogih drugih proizvoda prijatnog i primamljujućeg okusa, kojeg smatramo tzv. petim elementom okusa, tzv. umami. Mnogi restorani koriste takve proizvode u svojoj ponudi. Ne radi se o kvaliteti namirnica, već o aditivima koji se u Europskoj uniji vode kao E620 – E625, „poboljšivači i pojačivači okusa“. Često se spominje kratica E621 aditiva – MSG (eng., monosodium glutamate).



Slika 1 Bijeli prah mononatrijevog glutaminata (MSG) $C_5H_8NO_4Na$ (E621)
(izvor: <https://hu.wikipedia.org/wiki/N%C3%A1trium-glutam%C3%A1t>)

Po kemijskom sastavu aditivi E620 – E625 soli glutaminske aminokiseline (slika 1). MSG je izumio japanski znanstvenik Kikunae Ikeda 1908. godine, izolirajući ga iz alge kombu. MSG može biti biljnog ili životinjskog podrijetla. E621 prirodno se nalazi i u mesu, mlijeku, rajčici no tada ne predstavlja opasnost za organizam.

Povećanje tjelesne mase na štakorima uzrokovano hranjenjem štakora mononatrijevim glutaminatom proučavao je Zachary Sexton. Štakori imaju dobru prirodnu regulaciju tjelesne težine i u normalnim se okolnostima neće lako udebljati no kada se tretiraju glutaminatom, znatno im se poveća tjelesna masa (slika 2).



Slika 2 Zdravi štakor i štakor hranjen mononatrijevim glutaminatom (Sexton, 2014)

Glutaminat nema nikakvu pozitivnu hranidbenu vrijednost, međutim djeluje na mozak te povećava apetit. Stoga se konzumiranje hrane s aditivom E621 često povezuje i s pretilosti, jer MSG isključuje „prekidač“ u mozgu koji regulira našu potrebu za hranom te bi zato taj aditiv mogao dovesti do povećanja mase osobe, zbog pretjeranog unosa hrane. Na temelju velike potrošnje i niske dobi osoba koje konzumiraju hranu s navedenim aditivima, možemo zaključiti da je svijest o štetnosti ovih aditiva u Hrvatskoj vrlo niska. Ti su aditivi zabranjeni u Europi kao dodatak dječjoj hrani no prehrambena industrija dodaje ih u mnoštvo proizvoda. Na taj se način potiče kupnja nezdravih proizvoda. Ovi se problemi prvi put spominju kao "sindrom kineskog restorana", jer su osobe koje su često jele kinesku hranu, u kojoj se koriste velike količine glutaminata, upravo nakon jela dobivale reakcije poput migrene, nervoze želuca, proljeva, nepravilnosti rada srca, pogoršanja astme ili nagle promjene raspoloženja.

Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije, ovisnost je duševno, a ponekad i tjelesno stanje, koje nastaje međudjelovanjem živog organizma i sredstva ovisnosti. Obilježavaju ga ponašanje i drugi duševni procesi, koji uključuju povremeno ili redovito uzimanje sredstva ovisnosti, u namjeri da se doživi učinak tog sredstva na duševne procese ili da se izbjegne nelagoda zbog odsutnosti sredstva. Uskraćivanje sredstva ovisnosti dovodi do kriza sličnih kao i kod fizičke ovisnosti. Pojam ovisnosti ne odnosi se samo na psihoaktivne droge. Čovjek može biti ovisan, primjerice, o hrani, igrama na sreću, televiziji, internetu, poslu, a zajednička je značajka da aktivnosti vezane uz te ovisnosti postaju središte života, što često može dovesti do zanemarivanja osnovnih životnih potreba. Različite ovisnosti imaju i različit značaj, utjecaj i posljedice te ovisnost ne mora nužno biti posve negativna pojava, iako se najčešće takvom smatra (Kuzman, 2003). Ovisnost o hrani je pojam koji se koristi za pretjeranu žudnju za hranom. Iako društvo i zdravstvene ustanove nenormalan unos hrane ne tretiraju kao ovisnost, ona to uistinu jest. Ukoliko se bez neke namirnice ne može, odnosno ukoliko je osoba treba kako bi se suočila s emocijama, znači da je ovisna (Centar zdravlja, 2012). Znanstvenici Centra za znanost i politiku hrane na Sveučilištu Yale razvili su upitnik o ovisnosti o hrani.

Ovisnost o aditivima u hrani ne može se uspoređivati s teškim ovisnostima kao što je narkomanija, alkoholizam ili pušenje. S obzirom na to da se aditivi od E620 do E625 primjenjuju već dugi niz godina, u široj populaciji ljudi vjerojatno postoji navika kupovanja takve hrane. Roditelji djeci, već od malih nogu, nesvesno kupuju namirnice s aditivima. Razvijanjem svijesti o štetnosti ovakvih spojeva u



prehrani i promjenom prehrambenih navika, lako se može riješiti ovisnost o ovakvoj hrani. Najveći je problem aditiva to što ih zdravstvene ustanove i prehrambena industrija još uvijek vode kao bezopasne dodatke hrani, a ne kao štetne.

Znakovi koji mogu upućivati na ovisnost o hrani su, na primjer:

- a) da se jede u tajnosti
- b) da se nakon jela osjeća krivnja
- c) da se o hrani razmišlja više od jednog sata dnevno i takvo razmišljanje usrećuje osobu
- d) jede se nakon što osoba doživi stresan trenutak, gdje hrana postaje tvar koja štiti od negativnih emocija
- e) osoba ne može prestati jesti čak ni kada nije gladna
- f) kad ne jede neku namirnicu, osoba doživljava razne simptome, kao što su vrtoglavica, drhtanje ili znojenje.

Ukoliko se kod osobe mogu prepoznati 3 ili više simptoma, postoji velika vjerojatnost da pokazuje povećanu preferenciju prema hrani koja sadrži glutamine ovisna (Centar zdravlja, 2012). Ovi su simptomi u skladu s upitnikom za ovisnost o hrani koji su sastavili znanstvenici s Yalea.

Istraživanja tri skupine srednjoškolskih učenika celjske škole u Sloveniji na uzorku od 322 učenika pokazala su da učenici svjesno uzimaju hranu s natrijevim glutaminatom kao što su čips, krekeri, hrana s vegetom, konzervirana hrana jer im je hrana ukusnija, a čak 56% ispitanika uzima ovakvu hranu bez razloga, što se može pripisati mogućnosti ovisnosti učenika o takvim namirnicama (Gulin i Podgoršek, 2014).

Ideja za ovo istraživanje potekla je od učenika koje svakodnevno viđamo na hodnicima kako jedu hranu koja sadrži aditive E 620 – E 625, ali i iz vlastitog iskustva s takvim namirnicama. Naime, čak i pomisao na neke namirnice kao što su čips, smoki, razni *fast food* proizvodi, hrenovke, pašteta, različite vrste salama, kod većine budi apetit i želju za jelom. Osim toga, većina učenika za vrijeme velikog odmora, umjesto zdravog obroka, bira neku nezdravu grickalicu ili namirnicu s navedenim aditivima.

Ciljevi istraživanja su bili:

1. ispitati koliko se učenici zdravo hrane i razmišljaju o kvaliteti namirnica koje konzumiraju;
2. ispitati postoji li mogućnost ovisnosti učenika o namirnicama obogaćenim aditivima na bazi glutaminata (E 620 – E625);
3. ispitati kolika je preferencija namirnica koje sadrže aditive E620-E625 kod učenika viših i nižih razreda;
4. ispitati u kojem su odnosu indeks tjelesne mase (BMI) učenika i konzumacija namirnica obogaćenih aditivima na bazi glutaminata (E 620 – E 625).

Pretpostavke su bile:

1. Učenici viših razreda manje će razmišljati o štetnosti hrane koju konzumiraju te će imati nezdravije prehrambene navike od učenika nižih razreda.
2. Učenici nižih razreda manje će preferirati hranu s pojačivačima okusa u odnosu na učenike viših razreda.



3. Učenici većeg indeksa tjelesne mase (BMI), bilo da su pretili ili imaju prekomjernu tjelesnu masu, više će preferirati hranu s E620-E625 aditivima i neće voditi brigu o zdravim namirnicama.

Za potrebe ovog rada pronašli smo samo jedno istraživanje djelovanja glutaminata na školsku djecu (Gulin i Podgoršek, 2014).

METODE

U istraživanju sudjeluju učenici nižih razreda (1., 3. i 4. razredi - 70 učenika) te viših razreda (6. i 8. razredi – 70 učenika).

Anketna pitanja

Kod pisanja i sastavljanja upitnika, vodila se briga da učenici razumiju o čemu se radi, da upitnik nije predug, da su pitanja smislena, jezgrovita i po mogućnosti kratka. Anketnim upitnikom (slika 3) ispitivala se dob učenika, tjelesna masa, visina, prehrambene navike, raspored namirnica koje bi tog trena ispitivanja učenik htio konzumirati, pitanja kojima se htjelo istražiti u kojoj mjeri učenici preferiraju namirnice u čijem se sastavu nalaze aditivi E620 – E625 i koja upućuju na mogućnost ovisnosti o tim aditivima, postoji li veza između pretilih učenika i preferencije namirnica s aditivima E620-E625 i svjesnost učenika o namirnicama koje unose u tijelo.

ANKETA JE ANONIMNA, ODGOVARAJ POTPUNO ISKRENO.

1. Koliko imаш godina? _____
2. Koliko iznosi tvoja tjelesna masa? _____ Visina: _____
3. Koliko često jedeš voće na dan? 0 1 2 3 4 5 i više
4. Koliko često jedeš grickalice na dan? 0 1 2 3 4 i više
5. Odaberi redom prve četiri ponudene namirnice koje bi ovog trena konzumirao/la.

1. _____	2. _____	3. _____	4. _____
----------	----------	----------	----------
6. Jedeš li ponekad grickalice u tajnosti? DA NE
7. Osjećaš li nakon što pojedeš grickalice krivnju? DA NE
8. Jedeš li grickalice kada si pod stresom? DA NE
9. Jedeš li grickalice čak i kad nisi gladan/la? DA NE
10. Usrećuje li te pomisao na npr. čips, smoki i sl.? DA NE
11. Jesi li ikad razmišljao/la o štetnosti hrane koju svakodnevno konzumiraš ? DA NE

Slika 3 Anketa za istraživanje preferencije i moguće ovisnosti o namirnicama koje sadrže MSG

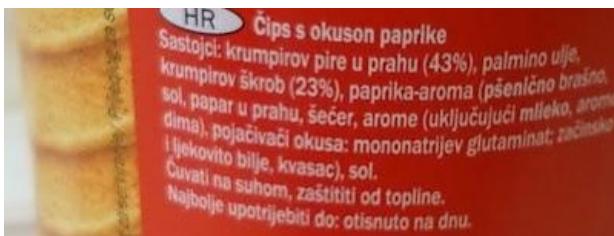
Odabir namirnica za demonstraciju pred učenicima

Određene su dvije kategorije namirnica (slike 4 – 6):

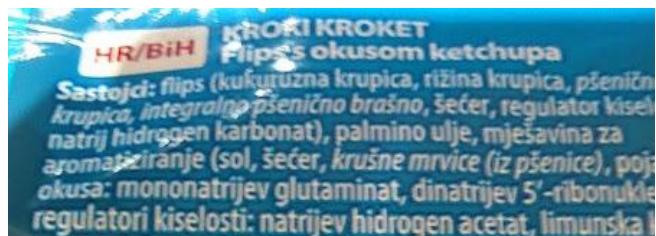
1. namirnice koje sadrže aditive E620-E625: čips, Kroki Kroket, salama, pašteta



2. namirnice bez dodanih aditiva E620-E625: VOĆE: jabuka, naranča; POVRĆE: mrkva, rajčica



Slika 4 Sastojci čipsa s aditivom E621



Slika 5 Kroki Kroket s aditivom E621

Vodila se briga da odabrane namirnice voli većina učenika. Također da imaju i dobar izbor vrsta namirnica kako bi rezultati bili što točniji. Odabrane zdrave namirnice moraju biti vizualno i okusno privlačne obzirom da boja može privući više pažnje učenika na odabir namirnica. Namirnice s aditivima birane su tako da je njihova boja gotovo podjednaka, jer se njihov odabir temelji upravo na zapamćenom okusu u mozgu, pa će ovdje osjetilo okusa imati presudnu ulogu, a to će dodatno potvrditi utjecaj aditiva na organizam. Odabrane namirnice su posložene u jednake posudice, kako bi se izbjeglo privlačenje neke namirnice obzirom na vanjski izgled, pakiranje, reklamu i sl.



Slika 6 Odabrane namirnice spremne za istraživanje

Ispitivanje učenika

Ispitivani uzorak je bio 140 učenika.

Učenici su bili podijeljeni u 2 kategorije:

1. učenici nižih razreda ispitivani s pladnjem s namirnicama (70 učenika)
2. učenici viših razreda ispitivani s pladnjem s namirnicama (70 učenika)

U dogовору с разредnicima i učiteljicama, ispitivani su učenici pod satovima razrednika. Anketiranje je provedeno pojedinačno i bilo je nenajavljeni, kako bi se izbjegla dogovaranja između učenika i kako bi rezultati ankete bili što vjerodostojniji. Istraživanje je provedeno u kabinetu iz biologije te u kabinetu razredne nastave.

70 učenika nižih razreda i 70 viših razreda ispitivano je sa svježim namirnicama na sljedeći način: Nakon ulaska učenika u kabinet, učenike se zamoli da se opuste i prezentira im se pladanj sa svježim namirnicama. Svakom učeniku je izmjerena visina i masa (slike 7 i 8). Učenike se zamoli da pažljivo čitaju anketna pitanja i iskreno odgovaraju (slika 9). U slučaju nekih nejasnoća, učenicima se pružaju dodatne informacije.



Analiza rezultata anketa

Obzirom da je analiza ankete zahtjevna i zahtijeva neka stručnija znanja, podaci su analizirani na jednostavan matematički način. Nakon anketiranja, dobiveni podaci razvrstavani su prema dolje navedenim skupinama.

Potreban postotak izračunavan je svaki put pomoću sljedeće jednadžbe npr. :

$$\% (X) = \frac{\text{broj učenika koji se nezdravo hrane}}{\text{ukupan broj učenika u toj skupini (70)}}$$

Dobiveni se podaci unose u Excel tablicu i grafički prikazuju s podacima izraženim u postocima.

Prema zadanim ciljevima podatci su razvrstavani u 12 skupina i potom analizirani pomoću gore navedene jednadžbe.



Slika 7 Mjerenje učenikove visine



Slika 8 Mjerenje učenikove mase



Slika 9 Provodenje ispitivanja

Koliko se učenici zdravo hrane i razmišljaju o kvaliteti namirnica koje konzumiraju, praćeno je kod sljedećih skupina:

1. skupina – **Koliko se učenici nižih razreda hrane (ne)zdravo (uzorak od 70 učenika)** – taj je podatak dobiven analizom 3. i 4. pitanja ankete, a rezultati su grafički prikazani (slika 10)

2. skupina – **Koliko se učenici viših razreda hrane (ne)zdravo (uzorak od 70 učenika)** – taj je podatak dobiven analizom 3. i 4. pitanja ankete, a rezultati su grafički prikazani (slika 10)

3. skupina – **Koliko su učenici nižih razreda svjesni štetnosti hrane koju svakodnevno konzumiraju (uzorak od 70 učenika)** – rezultat je dobiven analizom 11. anketnog pitanja, a rezultati su grafički prikazani

4. skupina – **Koliko su učenici viših razreda svjesni štetnosti hrane koju svakodnevno konzumiraju (uzorak od 70 učenika)** – rezultat je dobiven analizom 11. anketnog pitanja, a rezultati su grafički prikazani

Mogućnost pojave ovisnosti učenika o namirnicama obogaćenim aditivima na bazi glutaminata (E620 – E625) praćeno je kod sljedećih skupina:

5. skupina – **Moguća ovisnost učenika nižih razreda o hrani s aditivima E620-E625 (uzorak od 70 učenika)** – taj je podatak dobiven analizom 6. – 10. anketnog pitanja



6. skupina – Moguća ovisnost učenika viših razreda o hrani s aditivima E620-E625 (uzorak od 70 učenika) – taj je podatak dobiven analizom 6. – 10. anketnog pitanja

Koliko često učenici biraju namirnice koje sadrže aditive E620-E625 kod učenika viših i nižih praćeno je kod sljedećih skupina:

7. skupina – Kolika je sklonost prema namirnicama s E620-E625 kod učenika nižih razreda (uzorak od 70 učenika) – taj je podatak dobiven analizom 5. pitanja ankete

8. skupina - Kolika je sklonost prema namirnicama s E620-E625 kod učenika viših razreda (uzorak od 70 učenika) – taj je podatak dobiven analizom 5. pitanja ankete

U kojem su odnosu indeks tjelesne mase (BMI) učenika i konzumacija namirnica obogaćenih aditivima na bazi glutaminata (E 620 – E 625) praćeno je kod sljedećih skupina:

9. skupina – Koliko pretili učenici viših i nižih razreda preferiraju namirnice s E620-E625 aditivima – rezultati su dobiveni izračunavanjem BMI učenika, a potom su ankete pretilih učenika stavljane na stranu te je promatrano 5. anketno pitanje, kao u 7. i 8. skupini

10. skupina – Moguća sklonost pretilih učenika viših i nižih razreda o namirnicama s aditivima E620 – E625 – rezultati su dobiveni izračunavanjem BMI učenika, a potom su ankete pretilih učenika stavljane na stranu te su promatrana 6. – 10. anketna pitanja, kao u 5. i 6. skupini

11. skupina – Koliko učenici s prekomjernom tjelesnom masom viših i nižih razreda preferiraju namirnice s E620-E625 aditivima? – rezultati su dobiveni izračunavanjem BMI učenika, a potom su ankete učenika s prekomjernom tjelesnom masom stavljane na stranu te je promatrano 5. anketno pitanje, kao u 7. i 8. skupini, grafički su prikazani

12. skupina - Moguća ovisnost učenika s prekomjernom tjelesnom masom viših i nižih razreda o namirnicama s aditivima E620 – E625 – rezultati su dobiveni izračunavanjem BMI učenika, a potom su ankete učenika s prekomjernom tjelesnom masom stavljane na stranu te su promatrana 6. – 10. anketna pitanja, kao u 5. i 6. skupini, grafički su prikazani.

Anketna pitanja bitna za 1. i 2. skupinu (3. i 4. anketno pitanje), analizirana su na sljedeći način:

ANKETA JE ANONIMNA, ODGOVARAJ POTPUNO ISKRENO.

1. Koliko imаш godina? _____

2. Koliko iznosi tvoja tjelesna masa? _____ Visina: _____

3. Koliko često jedeš voće na dan? 0 1 2 3 4 5 i više

4. Koliko često jedeš grickalice na dan? 0 1 2 3 4 i više

Slika 10 treće i četvrto anketno pitanje bitno za 1. i 2. skupinu

Od broja koji je učenik zaokružio u 3. pitanju, oduzimao se broj koji je učenik zaokružio u 4. pitanju. Ako je razlika pozitivna zaključeno je da se učenik hrani zdravo, a ako je razlika negativna učenik se hrani nezdravo. Potom se izračunava postotak učenika koji se hrane zdravo, odnosno nezdravo pomoću već navedene jednadžbe za izračunavanje postotka.

3. i 4. skupina analizirane su prema jednadžbi za izračunavanje postotka.

Kako bi se ispitala prepostavka kolika je ovisnost učenika nižih i viših razreda, a koja se ispituje u 5. i 6. skupini, te usporedili kod kojih je ovisnost veća, analizirana su anketna pitanja pod brojem 6. – 10 (slika 11).



6. Jedeš li ponekad grickalice u tajnosti?	DA	NE
7. Osjećaš li nakon što pojedeš grickalice krivnju?	DA	NE
8. Jedeš li grickalice kada si pod stresom?	DA	NE
9. Jedeš li grickalice čak i kad nisi gladan/la?	DA	NE
10. Usrećuje li te pomisao na npr. čips, smoki i sl.?	DA	NE

Slika 11 anketna pitanja bitna za 5. i 6. skupinu

Izdvajani su svi odgovori u anketama u kojima je zaokruženo tri ili više potvrđnih odgovora, budući da takvi odgovori mogu upućivati na moguću sklonost ovisna (Centar zdravlja, 2012). Rezultat je prikazan grafički u odnosu na ukupan broj učenika koji su sudjelovali u istraživanju (70 učenika).

Obzirom na postavljenu hipotezu koliko učenici preferiraju namirnice s E620 – E625 aditivima, izdvajano je pitanje broj 5 ankete koje se ispituje u 7. i 8. skupini (slika 12).

5. Odaber i redom prve četiri ponuđene namirnice koje bi ovog treninga konzumirao/la. 1. _____ 2. _____ 3. _____ 4. _____

Slika 12 anketno pitanje broj pet bitno za 7. i 8. skupinu

Ako su učenici, od četiri ponuđena mjesta upisali tri ili četiri namirnice s aditivima (npr. čips, smoki, naranča, pašteta), zaključeno je da učenici više preferiraju namirnice s MSG-om. Na temelju ukupnog broja učenika nižih odnosno viših razreda izračunavan je postotak, a rezultati su prikazani grafički.

Prilikom ispitivanja kolika je veza povećane tjelesne mase s ovisnošću o glutaminatima računala se BMI vrijednost (kg/m^2). S obzirom na visinu, masu i dob učenika dobivena je BMI vrijednost – indeks tjelesne mase. Izračunava se iz djetetove mase i visine.

$$\text{BMI} = \frac{\text{masa}(\text{kg})}{\text{visina} \times \text{visina}(\text{m})}$$

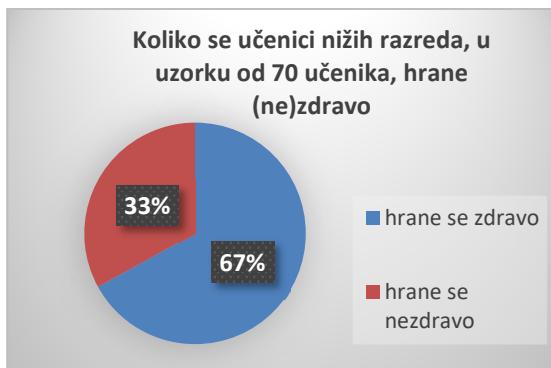
Na temelju podataka iz anketa i uz pomoć internetskog kalkulatora (Pliva zdravlje, 2001), određeno je u koju skupinu spada pojedini učenik. Ako je vrijednost bila ispod 5, učenik je pothranjen; ako je bila od 5-85, normalne je tjelesne mase; ako je bila 85 – 95, učenik ima prekomjernu tjelesnu masu, a ako je vrijednost veća od 95, učenik je pretio. Potom su izdvajani anketni listići temeljem kojih se procijenilo jesu li učenici pretili ili imaju prekomjernu tjelesnu težinu. Kad je određen njihov broj, izračunavan je postotak onih koji su odabrali tri ili četiri ponuđene namirnice s aditivima E620 – E625. Na taj način ispitana je podatak kolika je veza pretilih učenika s preferencijom namirnica s MSG-om. Osobito važna pitanja za ovo istraživanje su ona od 6. do 10. pitanja. Ako je kod pojedinih učenika prisutno tri i više potvrđnih odgovora, smatra se da kod njega postoji ovisnost o grickalicama s aditivima E620 – E625.

REZULTATI

Na grafički prikazanim rezultatima 1. i 2. skupine (slike 13 i 14), uočava se da se od 70 učenika nižih razreda, njih 67% hrani zdravo, a 33% se hrani nezdravo, dok se od 70 ispitanih učenika viših razreda, njih 64% hrani zdravo, a 36% nezdravo. 67% učenika nižih, odnosno 64% učenika viših



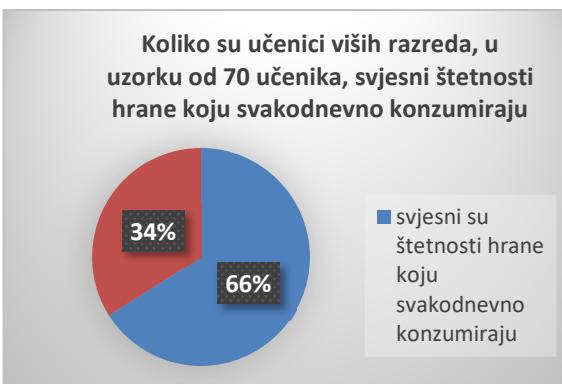
razreda tijekom dana jede više voća, nego li grickalica, a 33% učenika nižih razreda, odnosno 36% učenika viših razreda tijekom dana jede više nezdravih grickalica, nego voća.



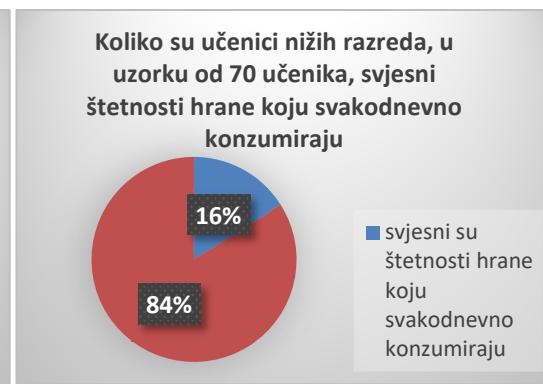
Slika 13 rezultati 1. skupine



Slika 14 Rezultati 2. skupine

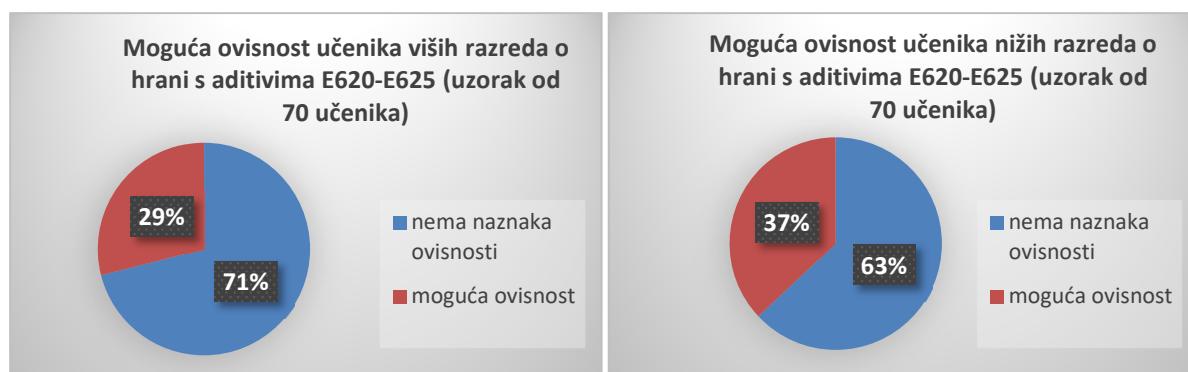


Slika 15 Rezultati 3. skupine



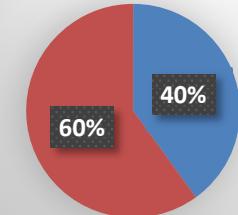
Slika 16 Rezultati 4. skupine

Na slici 15 vide se rezultati 3. skupine. Samo 16% učenika nižih razreda, od njih 70, na 11. anketnom pitanju zaokružilo je da razmišljaju o štetnosti hrane koju svakodnevno konzumiraju, dok je njih 84% na tom pitanju zaokružilo da ne razmišljaju o štetnosti hrane koju svakodnevno konzumira. Slika 16 prikazuje rezultate 4. skupine te iz grafa vidimo da je 66% učenika viših razreda svjesno štetnosti hrane koju svakodnevno konzumiraju, dok njih 34% ne razmišlja o štetnosti hrane koju svakodnevno konzumira.



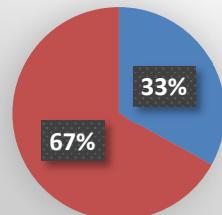


Kolika je sklonost prema namirnicama s E620-E625 kod učenika viših razreda (uzorak od 70 učenika)



Slika 19. Rezultati 7. skupine

Kolika je sklonost prema namirnicama s E620-E625 kod učenika nižih razreda (uzorak od 70 učenika)



Slika 20. Rezultati 8. skupine

Prema rezultatima 5. skupine (slika 17), opaža se da je 63% učenika nižih razreda u anketnim pitanjima pod brojevima 6. – 10. zaokružilo više od dva negativna odgovora, a njih 37% tri ili više pozitivnih odgovora, što upućuje na mogućnost ovisnosti tih učenika o hrani s aditivima E620 – E625. Na slici 18 su prikazani rezultati 6. skupine, iz kojih se očitava da 71% učenika viših razreda nema naznaka ovisnosti, dok je kod 29% učenika viših razreda moguća ovisnost.

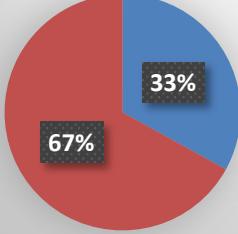
Rezultati 7. skupine prikazani su na slici 19. 80% učenika nižih razreda manje preferira namirnice s E620 – E625 aditivima, dok ih 20% preferira više od namirnica bez tih aditiva. Slika 20 prikazuje rezultate 8. skupine. Manje od polovice ispitanih učenika viših razreda, njih 40%, manje preferira namirnice s E620 – E625 aditivima, dok ih čak 60% preferira više od namirnica bez tih aditiva.

Izračunavanjem indeksa tjelesne mase učenika, utvrđeno je da niti jedan ispitivani učenik nižih i viših razreda nije pretio te zato nismo dobili rezultate 9. i 10. skupine.

Dva učenika nižih razreda ima prekomjernu tjelesnu masu, a od ispitivanih učenika viših razreda, četiri učenika imaju prekomjernu tjelesnu masu.

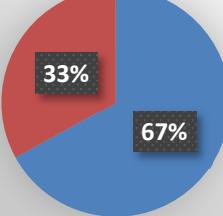
Slika 21 prikazuje rezultate 11. skupine. 33% učenika s prekomjernom tjelesnom masom (dva učenika) ima manju preferenciju prema namirnicama s E620 – E625 aditivima, dok 67% učenika (četiri učenika) više preferira namirnice s tim aditivima.

Kolika je preferencija namirnica s E620-E625 kod učenika s prekomjernom tjelesnom masom (uzorak od 3 učenika)



Slika 21. Rezultati 11. skupine

Moguća ovisnost učenika s prekomjernom tjelesnom masom o hrani s aditivima E620-E625 (uzorak od 6 učenika)



Slika 22. Rezultati 12. skupine

Rezultati 12. skupine, prikazani su slikom 22. Četiri učenika s prekomjernom tjelesnom masom (67%) nemaju naznaka ovisnosti o namirnicama s aditivima E620 – E625, dok dva učenika s prekomjernom tjelesnom masom (33%) upućuju na moguću ovisnost.



RASPRAVA

Iako postoje brojni radovi koji upućuju na štetnost glutaminata, koji su ispitivani najčešće na pokusnim životinjama, nismo mogli pronaći radove znanstvenika s kojima bismo uspoređivali naše rezultate. Smatramo da su rezultati ovog rada važni, jer su pokazatelj koliko se učenici loše hrane te bi se trebala posvetiti veća pažnja o kvaliteti prehrane i zdravim navikama djece, ali i odraslih.

Prva prepostavka bila je da će tijekom istraživanja učenici viših razreda za razliku od učenika nižih razreda manje razmišljati o štetnosti hrane koju konzumiraju te će imati nezdravije prehrambene navike. Rezultati 1. i 2. skupine pokazuju da se većina učenika i nižih i viših razreda hrani zdravo te se ne vidi velika razlika između učenika viših i nižih razreda u tim skupinama. Učenici viših razreda se za 3% učenika više hrane nezdravo od učenika nižih razreda, što potvrđuje zadalu prepostavku. Ipak, postotci učenika nižih razreda (33%) i viših razreda (36%), koji tijekom dana jedu više grickalica nego voća nisu zanemarivi niti mali te bi trebalo pripaziti da se kod tih učenika ne razvije veća sklonost ili zdravstvene teškoće uzrokovane takvom hranom koja sadrži aditive E620 – E625. Rezultati 3. i 4. skupine ne potvrđuju prvu hipotezu, jer samo 16% učenika nižih razreda razmišlja o štetnosti hrane koju svakodnevno konzumira, a kod učenika viših razreda štetnosti hrane svjesno je 66% učenika.

Rezultat je zabrinjavajući jer učenici nižih razreda tek trebaju uči u razdoblje pojačanog rasta i razvoja. Trebalo bi ih educirati o pravilnoj i zdravoj prehrani. Kod učenika viših razreda s obzirom da više uče o zdravlju i pravilnoj prehrani vjerojatno postoji veća svijest o štetnosti neke hrane pa je taj rezultat bolji.

Druga postavljena hipoteza je bila da će učenici nižih razreda imati manju sklonost prema hrani s pojačivačima okusa, dok će stariji učenici imati veću. Nakon što su odgovorili na 6. – 10. pitanje, pokazalo se da je kod 37% učenika nižih razreda prisutna moguća ovisnost o E620 – E625 aditivima, a kod učenika viših razreda moguća je kod 29% učenika. Ova prepostavka također nije potvrđena. Ovakvi bi se rezultati mogli povezati s rezultatima iz 3. skupine, jer učenici nižih razreda, koji nisu upućeni u štetnost određenih namirnica, više konzumiraju te namirnice te to može dovesti do većeg konzumiranja hrane s glutaminatima.

Treća hipoteza bila je da će učenici viših razreda više odabirati namirnice koje sadrže aditive E620 – E625 od učenika nižih razreda. 60% učenika viših razreda, a 20% učenika nižih razreda više preferira takve namirnice. Ova hipoteza je potvrđena. Ovakvi rezultati u skladu su s time da dulje vrijeme uzimanja namirnica s navedenim aditivima utječe na veću preferenciju prema namirnicama s glutaminatima kod učenika viših razreda. Ovakvim rezultatima se potvrđuje i da se moguća ovisnost o namirnicama s navedenim aditivima može lako sprječiti edukacijom o njihovoj štetnosti, jer učenici viših razreda, iako više preferiraju takvu hranu (ukusnija im je i radije ju izabiru od hrane bez aditiva), ipak ju zbog svjesnosti o njihovoj štetnosti izbjegavaju te se nije stvorila velika ovisnost. Rezultati pokazuju kako veći broj učenika bira hranu lošije kvalitete, što je u skladu s podacima autora Gulin i Podgoršek (2014).

Četvrtu hipotezu nismo mogli sigurno provjeriti zbog premalenog broja ispitanika, ali uočavamo da je ipak i u tako malom slučajnom uzorku od šestero učenika dvoje od njih pokazivalo znakove ovisnosti o hrani s glutaminatima, a četvero ih je više preferiralo takvu hranu. Ipak ova hipoteza ostaje neprovjerena zbog premalog broja ispitanika.



ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata, zaključujemo da je svijest o štetnosti pojedinih namirnica s aditivima na bazi glutaminata među učenicima nižih razreda niska što dugoročno može dovesti do nepoželjnih posljedica za zdravje učenika u kasnijoj životnoj dobi. Učenici i odrasli koji brinu o njima trebali bi se više educirati o njihovoј štetnosti. Time bi se smanjila moguća preferencija prema njima. Zaključujemo i da se sa sve duljim vremenom konzumiranja takvih namirnica povećava sklonost prema namirnicama s glutaminatima što se vidi po prehrambenim navikama učenika viših razreda. Zato je bitno na vrijeme poučiti učenike nižih razreda o opasnostima aditiva E620 – E625 te upozoravati šиру javnost o njihovoј štetnosti.

ZAHVALA

Zahvaljujemo se učiteljicama Branki Perinčić, Juliji Rogar, učitelju Mariu Ključeviću i njihovim učenicima te svim učenicima viših razreda koji su nam pomogli u našem istraživanju.

LITERATURA

- Centar zdravlja 2012. Jeste li ovisni o hrani? <http://www.centarzdravlja.hr/hrana-i-zdravje/zdrava-prehrana/jeste-li-ovisni-o-hrani/?refresh=1>, pristupljeno: 12. 12. 2019.
- Gulin J. i Podgoršek D. 2014. Na sledi petemu okusu. Komisija mladi za Celje. Gimnazija u Celju. Celje. <https://www.knjiznica-celje.si/raziskovalne/4201403344.pdf>, pristupljeno: 12. 12. 2019.
- Pliva zdravlje 2001. BMI- indeks tjelesne mase. <https://www.plivazdravlje.hr/zdravlje-online/bmi>, pristupljeno: 12. 1. 2020.
- PMC 2011. Histochemical studies of the effects of monosodium glutamate on the liver of adult wistar rats. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3507088/>, pristupljeno: 12. 1. 2020.
- SD 2000. Locomotor and learning deficits in adult rats exposed to monosodium-l-glutamate during early life. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394000009587>, pristupljeno: 13. 1. 2020.
- Sexton, Z. 2014. Stuff that is really MSG. <https://zacharysexton.com/stuff-really-msg/>, pristupljeno: 6. 12. 2020.
- WAPF 2009. New Propaganda About MSG. <http://www.westonaprice.org/health-topics/new-propaganda-about-msg/>, pristupljeno 6. 12. 2020.



UČINAK NEUROAKTIVNIH TVARI NA OBLIK MREŽE PAUKA KRIŽARA (*Araneus diadematus* Clerck, 1758)

Klara Pintarić i Lana Paulić, 3. razred

Gimnazija Karlovac, Karlovac
Mentor: Antun Milinković

SAŽETAK

Za istraživanje utjecaja neuroaktivnih tvari sadržanih u lijekovima Indometacin (Belupo), Dramina (JGL) i Tramadol (Farmal) na oblik paukove mreže, zbog svoje sposobnosti pletenja pravilne mreže, odabrana je vrsta pauk križar (*Araneus diadematus* Clerck, 1758). Četrdeset jedinki paukova, podijeljenih u četiri skupine po deset jedinki, stavljeno je u drvene okvire. Svi pauci ostavljeni su sedam dana da ispletu mreže kojima su izmjereni sljedeći parametri: najveći i najmanji promjer mreže, najveći i najmanji razmak između susjednih radikalnih niti na četvrtini promjera mreže, najveći i najmanji razmak između susjednih poprečnih niti na četvrtini promjera mreže te broj polja na mreži. Nakon toga svaka od tri eksperimentalne skupine tretirana je jednim od navedenih lijekova te su na mrežama ponovno izmjereni odabrani parametri i uspoređeni s prosjecima mjerena prije primjene lijekova. Četvrta skupina je kontrolna skupina koja je ostavljena da tijekom trajanja istraživanja plete mreže bez primjene lijekova. Cilj istraživanja je usporedba izgleda paukove mreže u uvjetima bez prisustva djelatnih tvari s izgledom paukove mreže uz djelovanje djelatnih tvari sadržanih u trima odabranim lijekovima. Dobivenim rezultatima potvrđena je početna hipoteza da će lijek Tramadol izazvati najveće promjene u obliku mreže (prosječna vrijednost odstupanja svih mjerjenih parametara nakon primjene lijeka je 86,98%), a Dramina najmanje (prosječna vrijednosti odstupanja svih mjerjenih parametara nakon primjene lijeka je 39,04%). Prosječno odstupanje svih parametara nakon primjene lijeka u skupini tretiranoj Indometacinom je 78,06%. Zanemarivo mala odstupanja u obliku mreže i mjeranim parametrima kod kontrolne skupine (1,75%) u vrijeme prije i nakon primjene lijekova u ostalim skupinama dokazuju da su promjene u drugim skupinama izazvane lijekovima, a ne nekim drugim čimbenikom. Odabrani lijekovi svojim djelovanjem uzrokuju značajne promjene u obliku mreže pauka križara.

Ključne riječi: pauk križar; neuroaktivni lijekovi; oblik mreže

UVOD I OBRAZLOŽENJE TEME

U modernom društvu, porast prekomjerne uporabe lijekova sve je češća tema rasprava stručnjaka. Podaci Hrvatskog zavoda za zdravstveno osiguranje (HZZO) u razdoblju od 2001. do 2005. godine ukazuju na nagli porast broja recepata za lijekove u Hrvatskoj s 29,1 na 34,8 milijuna godišnje s tendencijom daljnje porasta (Gajski, 2009). Svaka primjena lijeka unosi promjene u normalna fiziološka zbivanja i uz pozitivan učinak može izazvati i negativne promjene ili nuspojave, naročito pri učestaloj i nepravilnoj upotrebi. Potaknute ovom problematikom i zanimljivim rezultatima istraživanja Witta (1971) i Noevera i sur. (1995) o djelovanju kofeina, benzedrina i kloral hidrata na živčani sustav pauka križara (*Araneus diadematus* Clerck, 1758) i sposobnost pletenja mreže u ove vrste, prvi je put provedeno istraživanje koje testira utjecaj lijekova iz triju različitih skupina (protuupalni lijek Indometacin, antihistaminik Dramina i opiodni analgetik Tramadol) na oblik i formu mreže pauka križara.

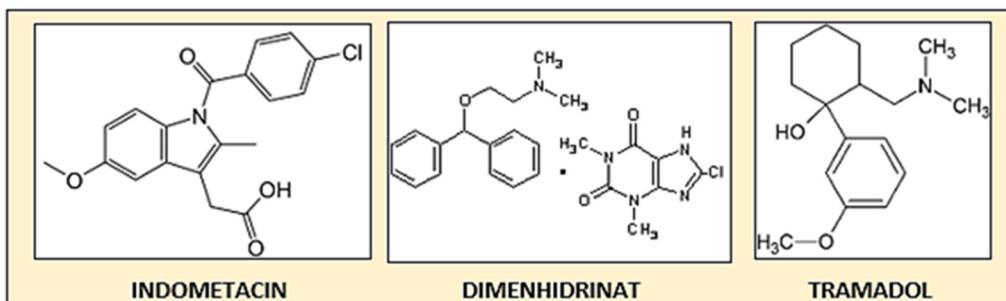
Indometacin (Indometacin, 25 mg/kapsula, Belupo, Koprivnica, Republika Hrvatska) pripada skupini nesteroidnih protuupalnih lijekova, a sadrži djelatnu tvar indometacin (slika 1), derivat indolocetene kiseline. Primjenjuje se u odraslim i djece starije od 14 godina u liječenju upalnih reumatskih bolesti, artritisa, gihta, bolnih stanja i slično. Izdaje se u ljekarnama samo na recept. Optimalna dnevna doza je individualna, a prilikom predoziranja i nepravilne upotrebe često se mogu pojaviti neke od nuspojava



koje su većinom rezultat djelovanja indometacina na središnji živčani sustav čovjeka, na koji djeluje i u slučaju korištenja u preporučenim dozama: teški umor, dezorientiranost, preosjetljivost na svjetlost, oštećenja perifernih živaca, halucinacije, konvulzije (nenamjerno, naglo skupljanje mišića), depresija i nervozna (Belupo, 2015).

Dramina (Dramina, 50 mg/tableta, JGL, Rijeka, Republika Hrvatska) je lijek iz skupine antihistaminika, izdaje se bez recepta, a primjenjuje se za prevenciju mučnine, povraćanja i vrtoglavice vezane za bolest putovanja. Djelatna tvar je dimenhidrinat (slika 1) koji potiče inhibiciju acetilkolina (prijenosnika živčanih impulsa u ljudi). Nuspojave koje se očituju zbog utjecaja na središnji živčani sustav čovjeka su pospanost, tjeskoba, poremećaji ravnoteže, manjak koordinacije, vrtoglavica i halucinacije (JGL, 2011).

Tramadol (Tramadol Farmal retard, 100 mg/tableta, Farmal, Ludbreg, Republika Hrvatska) s produljenim oslobađanjem sadrži djelatnu tvar tramadol (slika 1) i pripada skupini jakih (opioidnih) analgetika s učinkom na središnji živčani sustav čovjeka. Ublažava bol djelujući na centar za bol u mozgu. Primjenjuje se u liječenju umjerenih do jakih bolova. Uočene nuspojave su omaglica, glavobolja, umor te rjeđe poremećaji osjeta (trnci, obamrlost), gubitak svijesti, epileptički napadaj, halucinacije, zamućen vid i psihološke poteškoće čija težina i priroda ovise o samom bolesniku i dužini liječenja (Yumpu, 2013).



Slika 1 Strukturne formule aktivnih tvari u odabranim lijekovima (indometacin u Indometacinu, dimenhidrinat u Dramini i tramadol u Tramadolu) (preuzeto s mrežnih stranica: <https://bit.ly/3kNDFDW>, <https://bit.ly/3oLK6d2>, <https://bit.ly/37Xpn03>, pristupljeno 21.10.2019.)

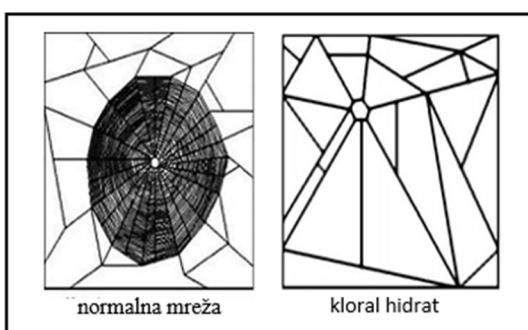
Izlaganjem paukova križara (*Araneus diadematus*, slika 2) kofeinu, benzedrinu i kloral hidratu, Namazi (2017) je prvi put dokazao povezanost izgleda paukove mreže i signala mozga pauka čime je u korelaciju doveo izgled paukove mreže s djelovanjem navedenih tvari na živčani sustav pauka.



Slika 2 Pauk križar (*Araneus diadematus* Clerck, 1758) (izvor: Pintarić, 2019)



U svom radu, Namazi (2017) potvrđuje rezultat prethodnih istraživanja Witta (1971) i Noevera i suradnika (1995) prema kojima tvar s najsnažnijim neuroaktivnim učinkom (kloral hidrat) uzrokuje najveće deformacije paukove mreže (slika 3). Kloral hidrat je bezbojna prozirna kristalna tvar uvedena u medicinsku praksu kao zamjena za opijum i alkohol. Daje se za umirenje dojenčadi i djece svih dobi, a kako djeluje i kao antikonvulziv (lijek s učinkom na živčani sustav, prvenstveno na moždanu koru), rabi se u hitnoj primjeni za umirivanje grčeva. Pri primjeni ovog lijeka mogu se pojaviti nuspojave poput mentalne zbunjenosti, halucinacija, vrtoglavice, pospanosti, noćnih mora i druge. Kloral hidrat više se ne primjenjuje u većini europskih zemalja, dok je u SAD-u još uvijek u upotrebi (HE, 2011).



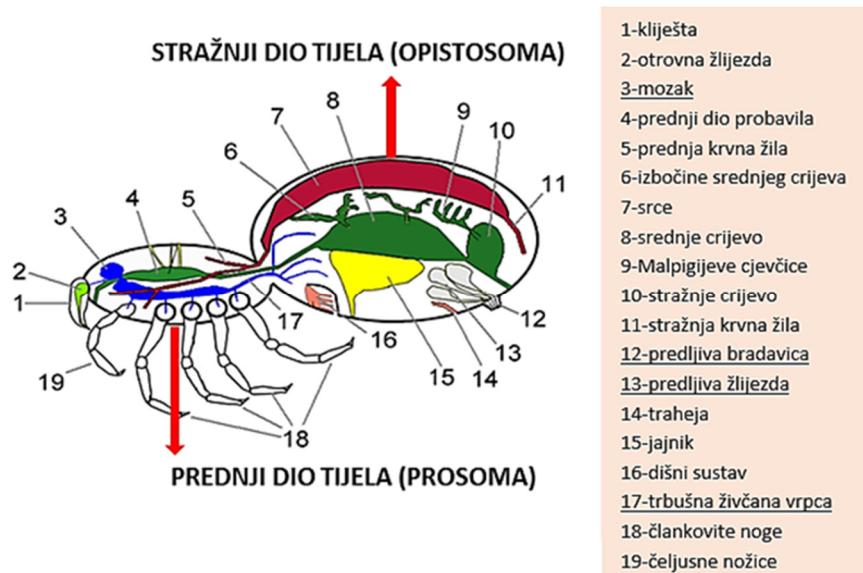
Slika 3 Izgled mreže pauka križara (*A. diadematus*) uz djelovanje kloral hidrata u Namazijevom (2017) istraživanju (izvor: Namazi, 2017)

Zbog svoje sposobnosti pletenja vrlo simetrične mreže, pauci iz porodice križara (Araneidae), kojoj pripada i pauk križar (*Araneus diadematus*), pokazali su se vrlo pogodnim organizmima za ovo istraživanje. Tijelo je podijeljeno na prosomu (prednji dio tijela) i opistosomu (stražnji dio tijela). Na prosomi se ističu člankoviti privjesci: kliješta, čeljusne nožice i četiri para nogu. Spektar boja tijela proteže se od svijetlih nijansi smeđe do gotovo crne, a na opistosomi su izražene bijele pjege koje podsjećaju na oblik križa, po kojima je i dobio ime. Mužjaci su izduženi i manjih dimenzija (od 5 do 13 mm) dok su ženke okruglaste i veličine od 6 do 20 mm. Središnji živčani sustav čini im mozak (slika 4, označeno brojem 4), koji se sastoji od protocerebruma i tritocerebruma te trbušna živčana vrpcu (slika 4, označeno brojem 17) duž koje su nanizani gangliji. Svi gangliji prosome, a često i opistosome, spajaju se u veliki podždrijelni ganglij (Matoničkin, 1981). Četiri para dugačkih člankovitih nogu, sastavljenih od sedam članaka, prekrivene su dlačicama koje služe kao primatelji podražaja. Većina pauka ima osam jednostavnih očiju, međutim neke vrste, koje grade mreže i nisu aktivni „lovci“ svog plijena, imaju slabije razvijen vid te mogu imati manji broj očiju. Pauk križar ima dva para središnjih i dva para vanjskih okašaca, a slabije razvijen osjet vida nadomješta usavršenim sustavom primanja vibracija iz mreže kojim se koriste prilikom lova (Arnold, 2014). Mreže većinom pletu ženke, a promjer mreže može biti i do 40 centimetara. Pletu ih poglavito u noćnim satima, između 2 i 5 sati ujutro. Hrane se uglavnom kukcima (muhe, pčele, ose, komarci) u koje kliještima ubrizgovaju otrov, nakon čega u plijen ispuštaju probavne sokove koji rastope unutrašnjost plijena u kašastu smjesu pogodnu za usisavanje u probavilo (Rainer, 2011). Pauk križar je rasprostranjen u Europi i Sjevernoj Americi, a staništa su mu uglavnom rubovi šuma, grmlje, kora drveća, voćnjaci itd. Životni vijek mu je dvije godine, a prezimljava ispod kore drveća ili pod suhim lišćem (Habdija i sur., 2004, 2011). Prede svilenu paučinu koju koristi za izgradnju gnijezda i mreža u koje mami i hvata plijen, za stvaranje sigurnosnih niti te za izradu kokona (zapretka koji štiti i grije paukova jaja). Pauk križar plete raznovrsne niti, ovisno o potrebi. U slučaju izrade mreže za hvatanje plijena, svila se oblaže ljepljivom tvari koju luče žlijezde blizu predljivih bradavica (slika 4).



označeno brojem 12 i 13) smještenih na kraju opistosome (Kerovec, 1998). Oblik mreže ove porodice pauka (Araneidae) karakterističnog je kružnog oblika sa simetričnim uzorkom.

Slika 4 Anatomija pauka (preuzeto s mrežne stranice: <https://bit.ly/2TDpkhp>, pristupljeno 21.10.2019.)



Cilj ovog rada je usporedba izgleda paukove mreže u uvjetima bez prisustva djelatnih tvari (indometacin, dimenhidrinat i tramadol) s izgledom paukove mreže uz djelovanje navedenih djelatnih tvari sadržanih u trima odabranim lijekovima (Indometacin, Dramina i Tramadol) te povezati utjecaj navedenih lijekova sa sposobnošću pletenja mreže pauka križara koje je ostvareno koordinacijom lokomotornog i živčanog sustava (Namazi, 2017).

Glavna hipoteza jest da će lijekovi utjecati na oblik mreže ispletene nakon primjene određenog lijeka. Također, proučavanjem nuspojava i posljedica korištenja odabranih lijekova te sukladno s rezultatima Wittovog (1971) rada i rada Noevera i sur. (1995), prema kojima je tvar s najsnaznijim neuroaktivnim učinkom (kloral hidrat) prouzročila najveću promjenu u obliku mreže pauka križara, prepostavljamo da će najizraženije odstupanje mjerena parametara (promjer mreže, razmak između susjednih radikalnih niti na četvrtini promjera mreže, razmak između susjednih poprečnih na četvrtini promjera mreže te broj formiranih polja) prije i nakon primjene već spomenutih lijekova biti prisutno kod paukova tretiranih Tramadolom jer od ispitivanih lijekova ima najsnazniji učinak na živčani sustav čovjeka popraćen najvećim brojem nuspojava. Nadalje, prepostavljamo da će najmanje odstupanje biti vidljivo na mreži paukova tretiranih Draminom čiji je učinak na živčani sustav čovjeka najslabiji i broj nuspojava najmanji.

Statistički dokazano značajno odstupanje prosječne vrijednosti mjerena parametara u izgledu mreže pauka križara nakon primjene lijekova u odnosu na onaj prije primjene lijekova, zbog povezanosti djelovanja živčanog sustava pauka i organa za pletenje mreže, može ukazivati da je uzrok tih promjena djelovanje aktivnih tvari lijekova na živčani sustav pauka, i posljedično, na oblik i uzorak paukove mreže.



Ovim radom želi se istaknuti važnost pravilne primjene lijekova u strogo definiranim dozama i što je više moguće izbjegavanje primjene ispitivanih lijekova za manje zdravstvene tegobe povezane s njihovom indikacijom jer velik broj osoba koristi različite lijekove, posebice za bolove manjih intenziteta, i onda kada nije neophodno uzimati lijek.

METODE RADA

Prikupljanje pauka križara

Istraživanje djelovanja triju različitih aktivnih tvari sadržanih u odabranim lijekovima (Indometacin (Belupo), Dramina (JGL) i Tramadol (Farmal)) provedeno je na četrdeset jedinki pauka križara (*Araneus diadematus* Clerck, 1758) u trajanju od dva tjedna. Pauci su sakupljeni ispod zaštitnih trske mladog drveća zasađenog u novim dvoredima grada Karlovca, ispod lišća ili ispod kore gdje se uobičajeno skrivaju u kasnu jesen (slika 5). Prikupljeni su u jutarnjim satima kada se mreže lakše razaznaju jer se na njima nalaze kapljice rose. Nakon što je uočena njihova mreža karakteristično pravilnog oblika, pažljivim promatranjem njene okolice, u blizini su često pronađena i jajašca ovijena zapretkom, a dalnjim temeljitim pretraživanjem drveta pronađena je i ženka koja se skriva u blizini i čuva jaja (Kerovec, 1998). Vrstu pauk križar (*Araneus diadematus*) lako je razlikovati od ostalih vrsta paukova na istom staništu zbog bijelih mrlja na smeđoj opistosomi koje podsjećaju na oblik križa. Za istraživanje su odabrane ženke zbog veće brojnosti u populacijama, jer češće pletu mreže i većih su dimenzija od mužjaka koji se rjeđe pronalaze jer ih u doba parenja (jesen) ženke najčešće pojedu (Habdija i sur., 2004). Jedinke su potom nježno pincetom unesene u epruvete i zatim prebačene u okvire u kojima će isplesti mreže.



Slika 5 Prikaz staništa gdje su pronađene jedinke paukova križara (izvor: Pintarić, 2019)

Eksperimentalni period

Uzgoj pauka u eksperimentalnim uvjetima

Svaka jedinka premještena je u za tu priliku izrađen zasebni drveni okvir od jelovine (slika 6), obostrano obložen crnom mrežicom za kukce, dimenzija preuzetih iz Namazijevog (2017) istraživanja (50 cm × 50 cm × 10 cm) koje nadmašuju maksimalne vrijednosti dimenzija promjera mreže (40 cm) kako bi se mogla pratiti eventualna povećanja istih. Mrežica za kukce odabrana je zbog veličine otvora koji su dovoljno veliki da propuštaju zrak, no premaleni da bi se pauk uspješno kroz njih provukao, a zbog crne boje mrežice, paukova mreža je dobro vidljiva i lako mjerljiva. Okviri su potrebni zbog eliminiranja nepravilnosti koje bi eventualno nastale zbog razlika uvjeta i prostora u kojima bi mreže bile oblikovane bez okvira. Pauci nisu hranjeni kako bi bili potaknuti da pletu mrežu za lov, a tijekom trajanja



eksperimenta svaki drugi dan dana im je vata natopljena vodom (Namazi, 2017). Temperatura prostorije u kojoj je istraživanje provedeno tijekom eksperimentalnog perioda bila je 21°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$).



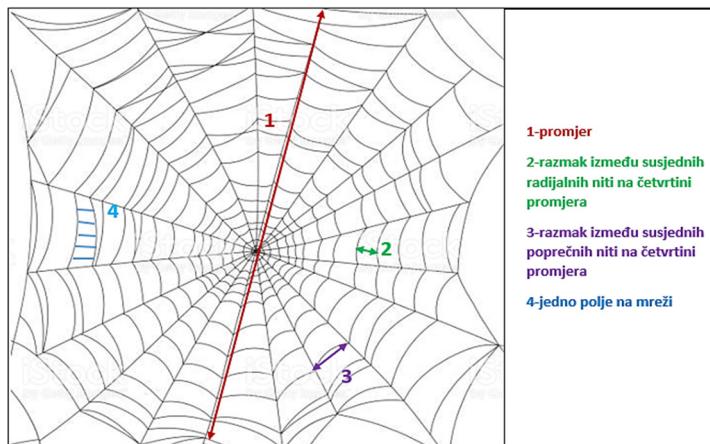
Slika 6 Primjer okvira od jelovine (izvor: Paulić, 2019)

U prvom dijelu istraživanja jedinke su sedam noći ostavljene u okvirima kako bi isplele mreže koje će biti uspoređene s mrežama nakon primjene određenog lijeka u drugom dijelu istraživanja. Pauci su u okvire stavljeni navečer kako bi preko noći ispleli mrežu jer je uobičajeno vrijeme pletenja mreže od 2 do 5 sati ujutro. Mreža je potom fotografirana na kartonskoj crnoj podlozi fotografskim aparatom (Nikon) D3500 DSLR s objektivom veličine 55 mm, pomoću metra je na nekoliko mjesta izmjerен promjer mreže (duljina dužine koja spaja dvije točke krajnje kružnice, a prolazi središtem mreže), razmak između susjednih radijalnih niti na četvrtini promjera i razmak između susjednih poprečnih niti na četvrtini promjera (slika 7) te je za svaki parametar određena najveća i najmanja vrijednost. Izbrojana su i polja formirana na mreži (tablica 1). Zbog specifičnog oblika mreže, koja nije pravilna kružnica, potrebno je izmjeriti najveće i najmanje vrijednosti parametara kako bi promjene oblika bile jasnije vidljive u rezultatima jer ukoliko bi se promatrao prosjek vrijednosti veličina promjera i razmaka između niti, deformacije ne bi bile toliko uočljive (porast veće vrijednosti i smanjenje manje vrijednosti, zbog koje mreža poprima oblik sličniji elipsi nego kružnici, ne bi bilo vidljivo u prosjeku). Mjereni parametri odabrani su za što precizniju usporedbu mreža i statističko dokazivanje nastalih deformacija.

Tablica 1 Izgled tablice za unos izmjerenih vrijednosti parametara svake jedinke zasebno

Broj jedinke		Promjer mreže (u cm)		Razmak između susjednih radijalnih niti na četvrtini promjera (u cm)		Razmak između susjednih poprečnih niti na četvrtini promjera (u cm)		Broj polja formiranih na mreži
		najveći	najmanji	najveći	najmanji	najveći	najmanji	
	Mjerenje prije primjene lijeka							
	Mjerenje nakon primjene lijeka							

Od ukupnih rezultata izračunat je prosjek za svaki parametar mreže svakog pojedinog pauka po formuli: $x_p = \frac{x_1+x_2+\dots+x_n}{n}$ gdje je x_p prosječna veličina odabranog parametra, n ukupan broj dana mjerena, a od x_1 do x_n veličine parametara izmjerene određenog dana.

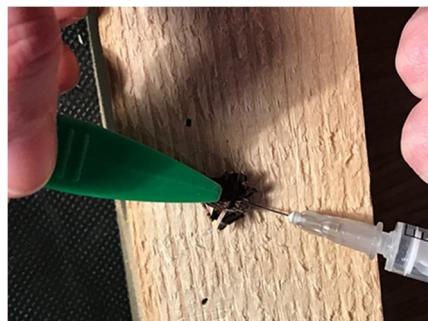


Slika 7 Prikaz parametara koji su bili mjereni na svakoj mreži pauka križara (preuzeto s mrežne stranice: <https://bit.ly/2Ge6TNi>, pristupljeno 12.11.2019.)

Tretman lijekovima

Pauci su potom podijeljeni u četiri skupine po deset jedinki. Tri skupine su bile eksperimentalne, odnosno jedinkama je dan jedan od odabranih lijekova različit za svaku skupinu (Indometacin, Dramina i Tramadol), a jedna je skupina ostavljena kao kontrolna, odnosno navedeni parametri u oba su perioda mjereni bez primjene lijeka. Svim paucima nakon primjene lijeka mjereni su isti, ranije navedeni parametri kao i prije primjene lijeka. Paucima u prvoj skupini dana je vodena otopina Indometacina koncentracije indometacina od $10 \mu\text{g/mL}$, paucima u drugoj skupini dana je vodena otopina Dramine koncentracije dimenhidrinata od $10 \mu\text{g/mL}$, a paucima u trećoj vodena otopina Tramadola koncentracije tramadola od $10 \mu\text{g/mL}$. Posljednjoj, kontrolnoj skupini, nisu dani lijekovi. Koncentracije vodenih otopina određene su prema koncentracijama navedenim u literaturi (Namazi, 2017). Vodene otopine aktivnih tvari lijekova u koncentracijama od $10 \mu\text{g/mL}$ dobivene su otapanjem tablete odabranog lijeka u jednoj litri destilirane vode, a nakon njena otapanja i dobivanja homogene vodene otopine uzet je 1 mL otopine lijeka u koji je ovisno o masi aktivne tvari u tableti dodana odgovarajuća količina destilirane vode da bi se dobila željena koncentracija aktivne tvari u otopini ($10 \mu\text{g/mL}$). Za izračunavanje razrjeđenja otopina korištena je formula: $\gamma_1 \times V_1 = \gamma_2 \times V_2$ (γ_1 = masena koncentracija prije razrjeđenja, V_1 = volumen otopine prije razrjeđenja, γ_2 = masena koncentracija nakon razrjeđenja, V_2 = volumen otopine nakon razrjeđenja).

Vodena otopina određenog lijeka volumena 1 mL injektirana je svakom pauku iz pojedine skupine direktno u usta u ponoć (slika 8) kako bi se osiguralo da su pauci u trenutku pletenja mreže (između 2 i 5 sati ujutro) bili pod utjecajem lijeka (Namazi, 2017). Iako je svakom pauku injektiran jednak volumen otopine, bitno je naglasiti da ovom metodom primjene lijekova nije moguće utvrditi točan volumen koji je svaki pauk primio upravo zbog njihove malene veličine i malog volumena same otopine. Sljedeće jutro, mreže su fotografirane, izmjereni su ranije spomenuti parametri, nakon čega su mreže uništene kako bi ih pauk probavio (Benfoardo i Kistler, 1973).

Slika 8 Prikaz davanja određenog lijeka pauku križaru (*A. diadematus*) direktno u usta (izvor: Pintarić, 2019)

Obrada rezultata

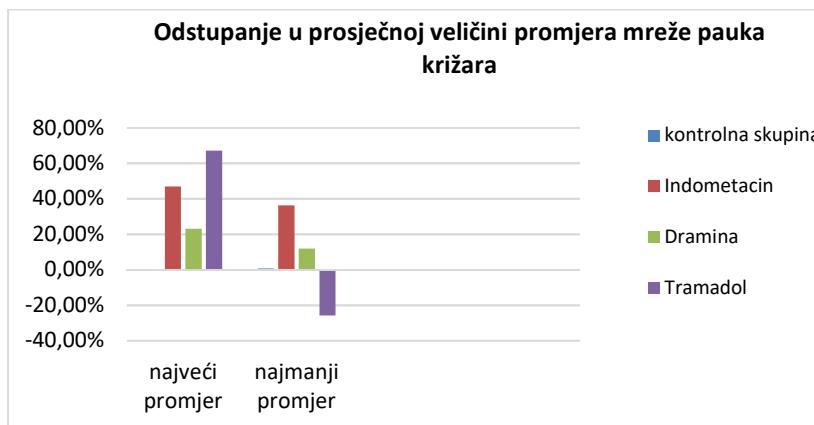
Rezultati mjerena mreže iste jedinke prije i poslije davanja lijeka uspoređeni su u programu Microsoft Office Excel 2018 (Microsoft) i SPSS-u (Statistical Package for the Social Sciences, IBM), programu za statističku obradu podataka. Unošenjem podataka u tablice omogućena je jednostavna analiza vrijednosti parametara (program SPSS nudi opciju izrade različitih tablica za prikaz odnosa odabralih parametara te jednostavno izračunavanje standardne devijacije) te izrada grafičkih prikaza i dijagrama pomoću kojih su razlike u odstupanju izgleda mreže pauka križara prije i nakon davanja određenog lijeka jasno vidljive čime je omogućeno preciznije i brže izvođenje zaključaka. Za određivanje statističke značajnosti rezultata proveden je t-test. T-test je statistički test koji definira značajnost rezultata pomoću t-vrijednosti koja je određena kao kvocijent razlike između aritmetičkih sredina u dvije situacije mjerena (prije i poslije apliciranja lijeka) M_D i standardne statističke pogreške aritmetičke sredine σ_{M_D} . Razlika između aritmetičkih sredina zadana je formulom $M_D = \frac{\sum(x_1 - x_2)}{N}$ pri čemu je x_1 aritmetička sredina svih mjerena za određenu jedinku prije primjene lijeka, x_2 aritmetička sredina svih mjerena za istu jedinku nakon primjene lijeka, a N veličina uzorka. Standardna pogreška aritmetičke sredine izračunata je po formuli $\sigma_{M_D} = \frac{\sigma_D}{\sqrt{N}}$ pri čemu je σ_D standardna devijacija razlika, a N veličina uzorka. Nakon izračunavanja t-vrijednosti iz Tablice za t-test očitana je značajnost pomoću navedenih razina rizika i stupnja slobode df koji je definiran kao $df = N - 1$. Prema Tablici za t-test, za stupanj slobode 9 (stupanj slobode u ovome istraživanju) kao značajno je definirano svako odstupanje čija je apsolutna vrijednost t-vrijednosti veća od 1,83. Radi provjere pravilnosti distribucije podataka izračunat je i koeficijent varijacije podataka za svaku grupu koji je definiran kao kvocijent aritmetičke sredine i standardne devijacije. Slike paukovih mreža obrađene su u programu Adobe Photoshop Express (Adobe) kako bi niti mreže bile što bolje vidljive.

REZULTATI

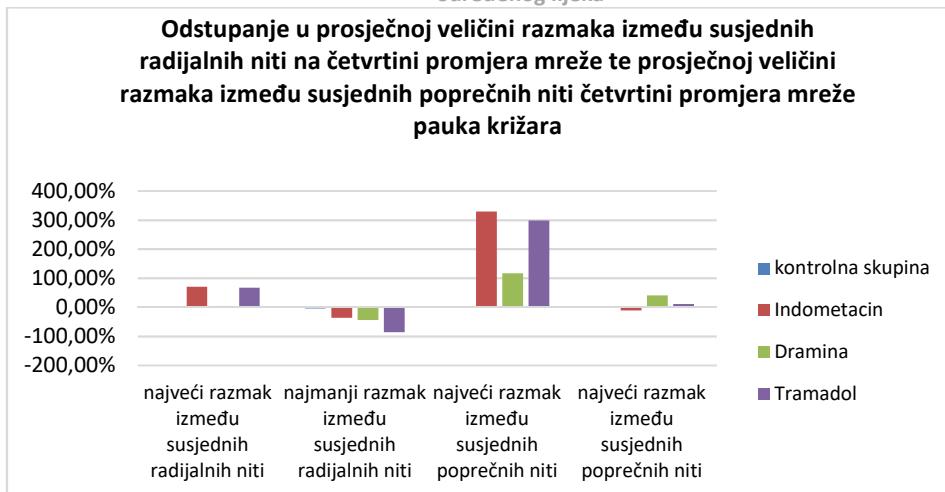
Nakon provedenih mjerena odabralih parametara mreža pauka križara (najveći i najmanji promjer, najveći i najmanji razmak između susjednih radikalnih niti na četvrtini promjera, najveći i najmanji razmak između susjednih poprečnih niti na četvrtini promjera te broj polja mreže) dobiveni rezultati obrađeni su po skupinama.

Kontrolna skupina

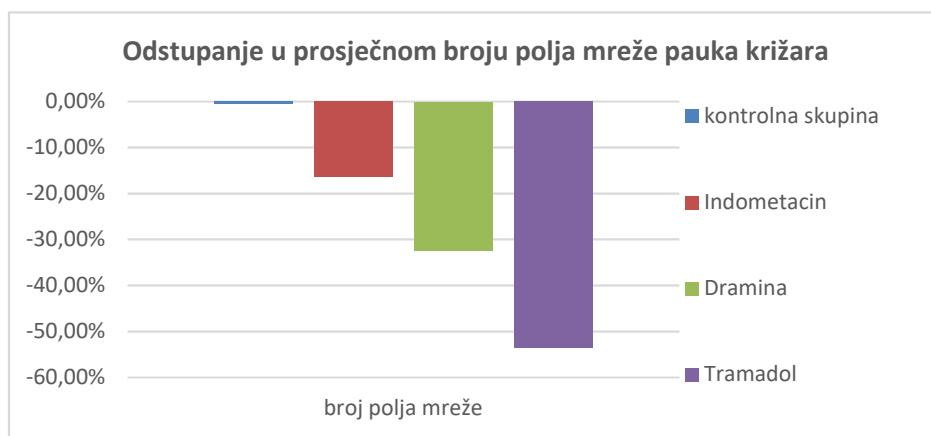
Prva mjerena kontrolne skupine provedena su u razdoblju prije primjene lijekova u eksperimentalnim skupinama (period mjerena 1), a druga mjerena kontrolne skupine provedena su u razdoblju primjene odabralih lijekova u eksperimentalnim skupinama (period mjerena 2). Kao što je vidljivo u tablici 2,



Slika 9 Odstupanje u prosječnoj veličini najvećeg i najmanjeg promjera mreže pauka križara prije i nakon primjene određenog lijeka



Slika 10 Odstupanje u prosječnom izmjenom razmaku između susjednih radijalnih niti na četvrtini promjera mreže pauka križara prije i nakon primjene određenog lijeka te prosječnoj vrijednosti razmaka između susjednih poprečnih niti na četvrtini promjera mreže pauka križara prije i nakon primjene određenog lijeka

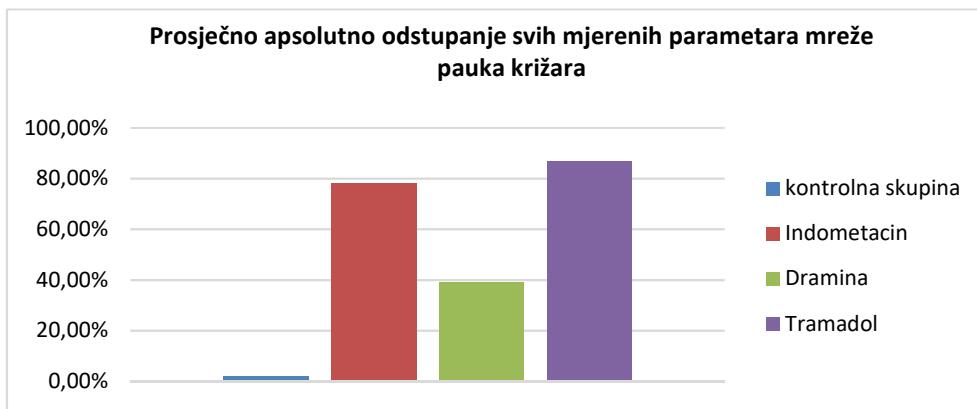


Slika 11 Odstupanje u prosječnom broju polja mreže prije i nakon primjene određenog lijeka

Prosječno apsolutno odstupanje svih mjerjenih parametara u kontrolnoj skupini iznosi 1,75%, u prvoj eksperimentalnoj skupini (tretiranoj Indometacincem) 78,06%, u drugoj eksperimentalnoj skupini (tretiranoj Draminom) 39,04%, a u trećoj eksperimentalnoj skupini (tretiranoj Tramadolom) 86,98% (slika 12). Odstupanje svih mjerjenih parametara mreže u skupinama tretiranima lijekovima

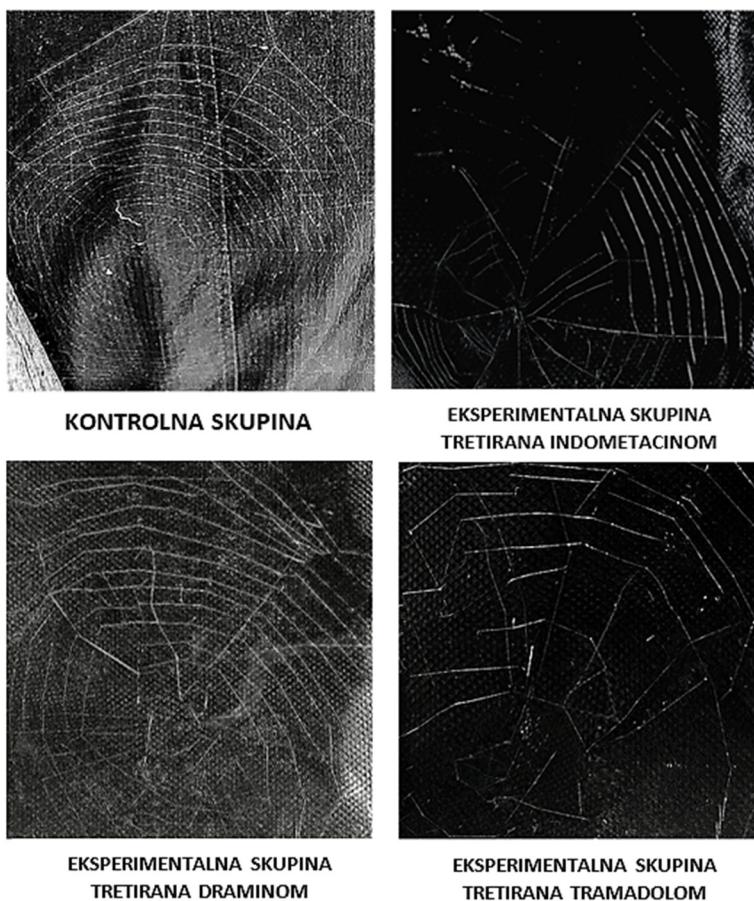


Indometacinom, Draminom i Tramadolom, osim najvećeg razmaka između susjednih radijalnih niti na četvrtini promjera (koje nije značajno) statistički su značajna s rizikom od pogrešnog zaključka manjim od 2%.



Slika 12 Prosječna apsolutna odstupanja svih mjerjenih parametara mreže pauka križara (promjer mreže, razmak između susjednih radijalnih niti na četvrtini promjera, razmak između susjednih poprečnih niti na četvrtini promjera i prosječan broj polja formiranih na mreži) prije i nakon primjene određenog lijeka

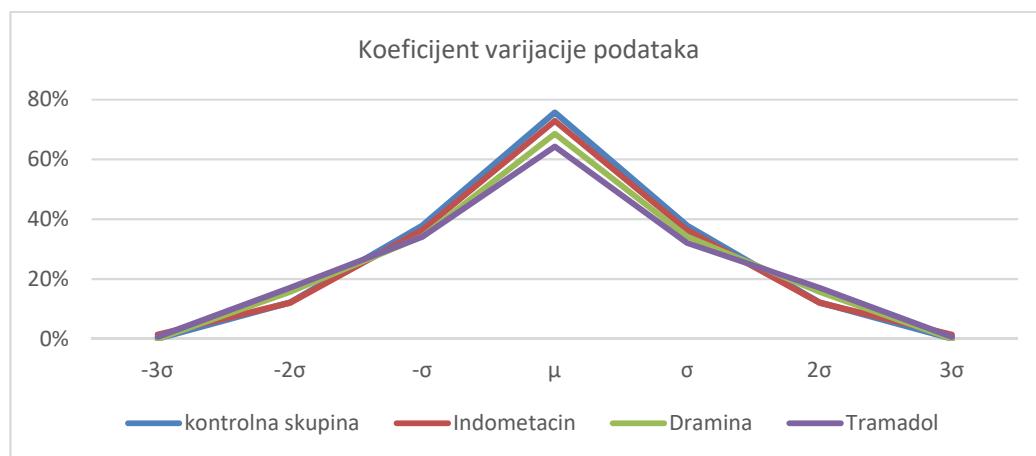
Deformacije mreže pauka križara (*Araneus diadematus*) nakon primjene lijeka jasno su vidljive na slici 13 usporedbom mreže kontrolne skupine kojoj nije apliciran lijek s ostalim skupinama kojima je apliciran određeni lijek svojstven svakoj skupini.





Slika 13 Izgled mreža pauka križara kontrolne skupine i eksperimentalnih skupina nakon aplikacije određenog lijeka
(izvor: Paulić, 2019)

Graf na slici 14 prikazuje malu disperziju podataka, koja prati Gaussovku krivulju, što dokazuje da su podaci pri svakoj skupini mjerena parametara za različite jedinke paukova koncentrirani oko aritmetičke sredine istih, odnosno nema značajnog odstupanja pri mjerenu istog parametra u istoj skupini jedinki.



Slika 14 Koeficijent varijacije podataka u kontrolnoj i eksperimentalnim skupinama pauka križara (*A. diadematus*)

RASPRAVA

Analizom rezultata istraživanja učinka neuroaktivnih tvari sadržanih u odabranim lijekovima (Indometacin, Dramina, Tramadol) na izgled mreže pauka križara (*Araneus diadematus*) i promjene u veličinama pojedinih parametara utvrđen je njihov značajan utjecaj. Najmanja odstupanja u svim mjerjenim parametrima pokazuje kontrolna skupina što potvrđuje tvrdnju da je na izgled mreže pauka u ostalim skupinama utjecao aplicirani lijek.

Istraživanje je pokazalo da je najveća promjena vrijednosti mjerjenih parametara vidljiva u skupinama tretiranim Tramadolom i Indometacnom s nešto izraženijim utjecajem Tramadola (za 8,91% veća odstupanja od Indometacna) što je u skladu s utvrđenim nuspojavama u primjeni istih lijekova kod čovjeka te potvrđuje rezultate Namazijevog (2017) istraživanja prema kojemu tvar s najsnažnijim neuroaktivnim učinkom (u Namazijevom (2017) istraživanju nazvana najtoksičnijom) uzrokuje najveće promjene u obliku i uzorku mreže zbog izravne povezanosti živčanog sustava pauka i izgleda njegove mreže.

Promjena veličina prosječnog najvećeg i najmanjeg promjera mreža, prosječnog najvećeg i najmanjeg razmaka niti te prosječnog broja polja formiranih na mreži nakon primjene lijekova može ukazivati na poremećaje u prostornoj koordinaciji jer su udaljenosti između radikalnih niti i razmak između poprečnih niti kao i njihova dužina veće, čime se smanjuje broj polja te preciznost i pravilnost pletenja mreže. To može ukazivati na pogoršanje fine motorike (smetenost), što su učinci slični nuspojavama primjene istih lijekova kod ljudi (Belupo, 2015; JGL, 2011; Yumpu, 2013). Promjenu lokomotornih sposobnosti u čovjeka nakon uzimanja Tramadola implicira i istraživanje koje su proveli Symeon i sur. (2017) na dvije vrste laboratorijskih miševa u kojemu je uporabom vruće ploče i mjeranjem vremena reakcije miševa dokazan utjecaj tramadola na povećanje razine stresa, psihomotoriku i hiperaktivnost



miševa kao rezultat djelovanja ovog lijeka na živčani sustav koji je, zbog sličnosti s ljudskim, miševe učinio povoljnim za vršenje farmakoloških testiranja. S druge strane, u istraživanju utjecaja indometacina na motoriku zečeva koje su proveli Pantović i sur. (2005) nije utvrđen utjecaj samog lijeka na motoričku aktivnost zečeva što je u suprotnosti s nuspojavama koje indometacin može izazvati kod ljudi i rezultatima ovoga rada prema kojima indometacin uzrokuje značajnu promjenu obliku mreže pauka križara (*Araneus diadematus*).

Potvrđena je početna hipoteza da će tvar s najvećim utjecajem na promjenu oblika i uzorka mreže biti Tramadol koji ima najjači utjecaj na živčani sustav čovjeka, što je u skladu s rezultatima istraživanja Witta (1971) i Noevera i sur. (1995) kod kojih je tvar s najsnažnijim neuroaktivnim djelovanjem (kloral hidrat) najviše utjecala na deformaciju mreže.

Kako bi se utvrdio izravan utjecaj apliciranih lijekova na živčani sustav pauka, potrebno je promatrati aktivnost živčanog sustava pauka za vrijeme pletenja mreže, a ne samo oblik mreže, kako bi se eliminirala mogućnost da je promijenjen izgled mreže rezultat djelovanja lijeka na neki drugi organski sustav, što u ovom radu nije bilo moguće provesti. Za daljnje istraživanje predlažemo ponavljanje istraživanja u mračnoj, zvučno izoliranoj prostoriji, kako bi se osiguralo da svi podražaji dolaze isključivo od lijekova, i usporedbe rezultata odstupanja istih parametara mreže u novom istraživanju s rezultatima ovog istraživanja. Nadalje, za jednostavnije provođenje pokusa valja izraditi prozirne okvire od akrilnog stakla (Namazi, 2017) koji bi olakšali provođenje istraživanja. Također, predlažemo apliciranje vode kontrolnoj skupini na način koji se eksperimentalnim skupinama aplicirala vodena otopina lijekova (injektiranjem), čime bi se uklonio utjecaj stresa pri samom injektiranju lijekova kao faktora u oblikovanju mreže, kao i pronalazak preciznije i praktičnije metode primjene vodenih otopina lijekova jedinkama pauka kako bi se osigurala veća točnost i lakše doziranje volumena lijeka koji je svaki pauk primio. Za jasnije slike potrebno je koristiti fotografski aparat veće kvalitete i bolje svjetlosne uvjete te profesionalno obraditi slike.

Ovo istraživanje utjecaja lijekova na oblik mreže pauka križara doprinos je farmakologiji i arahnologiji te otvara mogućnost brojnim dodatnim istraživanjima na sličnu tematiku uz koja bi rezultati ovoga istraživanja imali veliku praktičnu primjenu. Jedna od mogućnosti za daljnje istraživanje jest promatranje dugotrajnog utjecaja lijekova na oblik mreže pauka križara promatranjem promjena izgleda mreže i vrijednosti parametara u dužem vremenskom razdoblju primjene lijekova kako bi se ustvrdila eventualna trajna oštećenja živčanog sustava pauka. Također, moguće je ponovno provesti ovakvo istraživanje uz praćenje aktivnosti pauka tijekom pletenja mreže te vremena potrebnog za pletenje. Nadalje, ukoliko bi se dalnjim istraživanjima direktno dokazao utjecaj neuroaktivnih lijekova na živčani sustav pauka, paukovo pletenje mreže moglo bi poslužiti kao jednostavan test za utvrđivanje neuroaktivnosti uzoraka nepoznatih tvari.

ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti:

- u kontrolnoj skupini nema statistički značajnog odstupanja mjerjenih parametara mreže pauka križara u periodu aplikacije lijekova u eksperimentalnim skupinama i mjerjenja u periodu prije aplikacije lijekova u eksperimentalnim skupinama (prosječno odstupanje iznosi 1,75%)



- odabrani lijekovi (Indometacin (Belupo), Dramina, Tramadol (Farmal)) imaju značajan utjecaj na oblik i dimenzije mreže pauka križara
- najveće prosječno odstupanje u obliku i dimenzijama mreže prije i nakon aplikacije lijeka prisutno je u skupini tretiranoj Tramadolom (86,98%), zatim u skupini tretiranoj Indometacincem (78,06%), a najmanje je prisutno kod skupine tretirane Draminom (39,04%).

LITERATURA

- Arnold C. 2014. Spiders Listen to Their Webs. National Geographic.
<https://www.nationalgeographic.com/news/2014/6/140605-spiders-silk-webs-pluck-string-vibrations/>, pristupljeno 4. 10. 2019.
- Belupo. 2015. Uputa o lijeku: INDOMETACIN BELUPO 25 mg tvrde kapsule.
https://www.belupo.hr/media/products/Indometacin_kapsule-U.pdf, pristupljeno 6.11.2019.
- Benfoardo J., Kistler K.-H. 1973. Growth of the OrbWeaver, *Araneus diadematus*, and Correlation with Web Measurements, North Carolina Department of Mental Health Raleigh, North Carolina
- Gajski L. 2009. Rast potrošnje lijekova i visoki troškovi farmakoterapije, U Čović A. (ur.), Lijekovi ili priča o obmani. Pergamena, Zagreb, str. 19. – 24.
- Habdić I., Primc Habdić B., Radanović I., Vidaković J., Kučinić M., Špoljar M., Matonićkin R., Miliša M. 2004. Kolutićavi Celomata, U Feletar D. (ur.), Protista-Protozoa i Metazoa-Invertebrata. Meridijan, Samobor, str. 285. – 288.
- Habdić I., Primc Habdić B., Radanović I., Špoljar M., Matonićkin Kepčija R., Vujčić Karlo S., Miliša M., Ostojić A., Sertić Perić M. 2011. Arthropoda, U Novoselić D. (ur.), Protista-Protozoa i Metazoa-Invertebrata: strukture i funkcije. Alfa, Zagreb, str. 327. – 333.
- JGL. 2011. Dramina. Jadran-galenski laboratorij. <https://www.jgl.hr/proizvod/dramina-tablete-5-x-50-mg>, pristupljeno 1.11.2019.
- Kerovec M. 1998. Pauci, Drvo znanja 7. SysPrint d.o.o., Zagreb
- kloral hidrat. *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2020. Pristupljeno 2. 11. 2020. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=31980>
- Matonićkin I. 1981. Tip organizacije polimera – mnogokolutičavci, U Sambolek-Hrbić E. (ur.), Beskranjevnaci – biologija viših avertebrata. Školska knjiga, Zagreb, str. 137. – 141.
- Namazi H. R. 2017. The Complexity Based Analysis of the Correlation between Spider's Brain Signal, ARC Journal of NeuroscienceVolume 2, Issue 3 2017, PP 38-44 ISSN 2456-057X DOI: <http://dx.doi.org/10.20431/2456-057X.0203006>, pristupljeno 4.10.2019.
- Noever, David A.; Cronise, Raymond J.; Relwani, Rachna A. Using spider-web patterns to determine toxicity. NASA teach Briefs, 19 (4) 1995.
- Pantović R, Draganić P, Eraković V, Blagović B, Milin C, Simonić A. Effect of indomethacin on motor activity and spinal cord free fatty acid content after experimental spinal cord injury in rabbits. Spinal Cord. 2005 Sep;43(9):519-26. doi: 10.1038/sj.sc.3101763. PMID: 15852057.
- Rainer F. F. 2011. Biology of Spiders. Oxford University Press, New York
- Symeon I. i sur. 2018. Evaluation of the effects of tramadol on analgesic response and locomotor activity on two different strains of laboratory mice. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society.
https://www.researchgate.net/publication/322881517_Evaluation_of_the_effects_of_tramadol_on_analgesic_response_and_locomotor_activity_on_two_different_strains_of_laboratory_mice, pristupljeno 3.11.2020.
- Witt P. N. 1971. Drugs alter web-building of spiders: a review and evaluation. Behav. Sci. 16, 98 – 112
- Yumpu (2013). Uputa o lijeku – Tramadol Farmal retard. <https://www.yumpu.com/xx/document/view/16391484/uputa-o-lijeku-farmal-dd>, pristupljeno 1.11.2019.



UTJECAJ NANOČESTICA SREBRA NA OKSIDACIJSKI STRES U OBIČNE LUCERNE (*Medicago sativa* L.)

Jan Špiclin, 2. razred

Prva gimnazija Varaždin, Varaždin

Mentor: Marko Šafra

SAŽETAK

Nanotehnologija je u posljednje vrijeme vrlo popularna u svijetu, a najčešće se u svakodnevnom životu koriste nanočestice srebra (AgNP). S obzirom na to da se nanosrebro često koristi kao antimikrobnog sredstva u kućanstvima, cilj ovog istraživanja bio je istražiti kako ono djeluje na populaciju lucerne (*Medicago sativa*, L.). Tema ovog istraživanja značajna je zato što se nanosrebro sve češće koristi u industriji i može lako dospjeti u okoliš. Istražen je utjecaj na klice lucerne zato što se lucerna smatra tzv. „super hranom“ i prepostavlja se da će se sve češće koristiti u prehrabenoj industriji. U ovom istraživanju, lucerna je tretirana različitim koncentracijama nanosrebra te je VIS spektrofotometrijom određivana količina ukupnih proteina i količina prolina, a UV/VIS spektrofotometrijom određivana je aktivnost katalaze. Istraživanje je pokazalo da nanočestice srebra nemaju utjecaj na postotak klijavosti klica i na njihove morfometrijske parametre no utječu na ekspresiju staničnih proteina. Deseti dan nakon što su biljke proklijale, razlika u ekspresiji proteina između negativne kontrole i eksperimentalnih skupina vrlo je velika. Razlika u ekspresiji proteina između eksperimentalnih skupina statistički nije značajna, pa bi daljnja istraživanja trebalo provesti s većim koncentracijama nanosrebra u otopini. Prolin je neesencijalna aminokiselina koju biljka stvara u uvjetima oksidacijskog stresa. Mjerenja pokazuju da je najviša koncentracija prolina u negativnoj kontroli, a najmanja na koncentraciji od 200 ppm što nije u skladu s očekivanjima. Određivanje aktivnosti katalaze bilo je neuspješno te bi se dalnjim istraživanjima trebala istraživati aktivnost katalaze i sinteza vlastitog nanosrebra.

Ključne riječi: nanosrebro, lucerna, oksidacijski stres, spektrofotometrija

UVOD

Danas, razvojem znanosti i napretkom tehnologije, nanotehnologija i njezini proizvodi sve češće pronalaze put u svakodnevni život čovjeka. Nanotehnologija je skup disciplina koje se bave istraživanjem materijala i njihovih svojstava na nano-skali (Yan i Chen, 2019). Takvi materijali poprimaju potpuno nova fizička, kemijska, elektronička i biološka svojstva od istih makromaterijala zato što je usitnjavanjem na veličine ispod 100 nm došlo do povećanja njihove dodirne površine (Rezvani i sur., 2012). Nanomaterijali imaju široku primjenu u svim područjima, posebice u medicini, elektrotehnici, fizici, kemijskoj i prehrabenoj industriji (Bajan, 2017). S obzirom na to da danas nanotehnologija ima široku primjenu u znanosti i industriji, a prepostavlja se da će se proizvodnja nanomaterijala u budućnosti znatno povećati, postavlja se pitanje jesu li nanomaterijali dovoljno istraženi i kakav će utjecaj imati na organizme i ekosustave dospiju li u okoliš (Yuan i sur., 2018). O tome da većina nanomaterijala nema pozitivan, već potencijalno negativan utjecaj na živi svijet, govori podatak da Danska ima vlastitu bazu podataka u kojoj se nalazi popis svih proizvoda koji sadrže nanomaterijale. Svaki proizvod koji sadrži nanomaterijale označen je pomoću 5 točkica različite boje s obzirom na rizik koji on predstavlja za okoliš i ljude (Jørgensen, 2013). Prve tri točke uvek se odnose na potencijal izloženosti profesionalnih korisnika, potrošača i okoliša (tim redoslijedom), a posljednje dvije boje odnose se na potencijal opasnosti za ljude i okoliš. (Jørgensen, 2013). Boje označavaju jesu li indikacije izloženosti ili učinaka visoke (crvena), srednje (žuta), niske (zelena) ili nepoznate (siva) – npr. ●●●●●.



Nanočestice srebra jedan su od komercijalno najraširenijih i u industriji najvažnijih nanomaterijala. Dobro su poznate po svojem antibakterijskom i antimikoznom djelovanju (Pixel-Industry, 2014). Još od davnina ionsko srebro koristilo se kao antiseptik protiv različitih infekcija. Iz tog razloga, nanočestice srebra često se koriste kao sastojak u pesticidima i umjetnim gnojivima u poljoprivredi (Cramer i sur., 2011). Zbog sve veće otpornosti bakterija na antibiotike, nanočestice srebra danas se upotrebljavaju kao antibakterijsko sredstvo, jer je dokazano da djeluju štetnije na bakterije od antibiotika i ionskog srebra (Pixel-Industry, 2014). Nanosrebro u kontaktu s bakterijama i gljivicama nepovoljno će utjecati na stanični metabolizam i inhibirati rast stanica jer otežava disanje, smanjuje bazalni metabolizam i štetno djeluje na sustav za prijenos elektrona i transport tvari kroz membranu mikrobnih stanica (Sadeghi i sur., 2012). Nanosrebro inhibira diobu i rast onih bakterija i gljivica koje izazivaju infekciju, miris, svrbež i čireve (Cramer i sur., 2011). Također, zbog gore navedenih svojstava, nanosrebro se sve češće koristi kao antialergijsko sredstvo (Pixel-Industry, 2014). Iako nanočestice srebra danas imaju široku primjenu, one još uvijek nisu dovoljno dobro istražene, te postoji mnogo nepoznanica o njihovom potencijalno štetnom kratkoročnom i dugoročnom djelovanju na živi svijet.

Biljke su sesilni organizmi te su tijekom evolucije zadržali obilježja koja su im omogućila preživljavanje u promjenjivim uvjetima okoliša. Kao posljedica promjenjivih tj. stresnih uvjeta rasta, u biljnem organizmu vrlo često dolazi do pojave oksidacijskog stresa koji će rezultirati aktivacijom antioksidativnog odgovora tj. obrambenog mehanizma biljke. Oksidacijski stres pojava je neravnoteže oksidansa (slobodnih radikala) i antioksidansa s tendencijom stvaranja oksidansa, što uzrokuje oštećenja biološki važnih makromolekula u stanici, ali i samih staničnih struktura (Yasur i Usha Rani, 2013). Oksidansi nastaju u biljnoj stanici procesom aerobnog metabolizma, kao međuprodukti oksidacije vode u molekularni kisik u fotosintetskom transportnom lancu elektrona. Pojava oksidacijskog stresa uglavnom je uzrokvana utjecajem raznih abiotičkih čimbenika kao što su suša, obilje vode, visoka ili niska temperatura, utjecaj različitih tvari, teški metali itd. (Bajan, 2017). U takvim uvjetima stvaraju se reaktivne kisikove jedinke (ROS) koje oštećuju molekule lipida, proteina i molekulu DNA što može dovesti do stanične smrti (Lukšić, 2019). U ROS se ubrajaju vodikov peroksid (H_2O_2), superoksidni radikal (O_2^-), hidroksilni radikal (OH^-) i perhidroksilni radikal (HO_2^{\cdot}). Indikator oksidacijskog stresa je prolin zato što ga biljka stvara u stresnim uvjetima (Bonassini L, 2018). Prolin za biljke ima više životno važnih funkcija kada se one nađu u uvjetima oksidacijskog stresa. Najranije uočena i najviše istraživana funkcija prolina u stresnim uvjetima je uloga kompatibilnog osmolita. Prolin je molekula topljiva u vodi koja stanici omogućava održavanje volumena jer joj omogućuje primanje vode (Chen i Jiang, 2010). Osim toga, prolin održava enzime peroksidazu i katalazu funkcionalnima. Prolin može reagirati s hidroksilnim radikalima i potencijalno sa singletnim kisikom te ih neutralizirati. Kaul i sur. (2008) dokazali su da prolin reagira s vodikovim peroksidom te da pritom nastaju molekule hidroksiprolina.

Ova je tema odabrana zato što se smatra da je vrlo važno istražiti potencijalno negativni utjecaj donedavno nepoznatih tvari, a koje su u vrlo kratkom vremenu ušle u široku komercijalnu upotrebu. Zbog nagle tržišne ekspanzije, nije ostavljeno dovoljno vremena kako bi se istražile eventualne negativne posljedice upotrebe nanočestica, posebice one dugoročne. Nažalost, nanočestice nisu izolirani slučaj gdje „nova tehnologija“ osvaja komercijalno tržište brže nego što znanost i medicina mogu donijeti zaključke o njezinoj sigurnosti za zdravlje organizama i održivost ekosustava (Butt i sur., 2019). Ovim istraživanjem želi se ukazati na potencijalnu opasnost prekomjerne upotrebe nanočestica.



srebra na rast i razvoj biljaka, koristeći lucernu kao modelni organizam u eksperimentu zbog njezine široke primjene i luke dostupnosti. Ako će se nanomaterijali u budućnosti sve više proizvoditi i komercijalno upotrebljavati, zasigurno će mnogo njih završiti u okolišu.

Cilj ovog istraživanja uvidjeti je kakve će se morfološke i fiziološke promjene dogoditi na jedinkama lucerne pod utjecajem različitih koncentracija nanosrebra te kako ono utječe na razinu oksidacijskog stresa u biljke.

S obzirom na to da je nanosrebro vrlo reaktivni materijal te ima vrlo jaka antimikrobnja svojstva (Pixel-Industry, 2014), očekuje se da će se povećanjem koncentracije nanosrebra, povećavati i razina oksidacijskog stresa koji će imati utjecaj i na same morfološke karakteristike biljke. Poznato je da na korijenu lucerne žive bakterije koje obavljaju proces fiksacije dušika i tako opskrbljuju biljku nitratima, potrebnima za normalan rast i razvoj jer je dušik u sastavu mnogih biološki važnih molekula poput proteina i nukleinskih kiselina. Kako čestice nanosrebra imaju antimikrobnja svojstva, moglo bi doći do uništenja mutualističkog odnosa lucerne i bakterija, zbog čega bi bio otežan ili onemogućen rast biljaka. Pretpostavka je da će duljina klice i duljina korijena biljke pod utjecajem nanosrebra biti manja od one biljke koja će rasti u normalnim uvjetima (negativna kontrola). Također, očekujemo da će molekularne metode pokazati promjenu na staničnoj razini između eksperimentalne i kontrolne skupine. Pretpostavka je da će eksperimentalna skupina u svojim stanicama, zbog povećanog stresa uzrokovanih česticama nanosrebra, imati nižu stopu genske ekspresije pa time i nižu koncentraciju ukupnih staničnih proteina u usporedbi s kontrolnom skupinom. Također, vrijednosti „markera“ oksidacijskog stresa u biljkama, poput koncentracije enzima katalaze i aminokiseline prolina u eksperimentalnoj skupini bit će povišeni u usporedbi s kontrolnom skupinom.

Na temelju svega navedenog iznose se sljedeće hipoteze:

1. Povećanjem koncentracije nanosrebra očekuje se porast razine oksidacijskog stresa, odnosno povećanje koncentracije prolina te veća razlika u koncentraciji prolina između negativne kontrole i eksperimentalnih skupina.
2. Povećanjem koncentracije nanosrebra očekuje se smanjenje ukupne ekspresije staničnih proteina i velika razlika u ekspresiji staničnih proteina.
3. Očekuje se da će biljke u eksperimentalnim skupinama s većom koncentracijom nanosrebra biti manje veličine od onih s manjom koncentracijom nanosrebra.
4. Očekuje se razlika u ekspresiji ukupnih proteina 2. dan nakon klijanja i 10. dan nakon klijanja.
5. Očekuje se veća aktivnost katalaze u skupinama s većim koncentracijama nanosrebra.

METODE

Cijelo istraživanje podijeljeno je u pet faza te je u cijelosti napravljeno u školi:

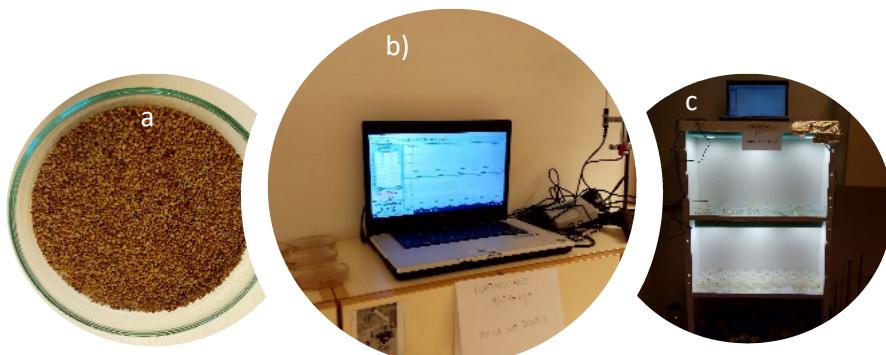
1. istraživanje literature i izrada plana istraživanja
2. priprema materijala i klijanje klica
3. priprema baždarnih krivulja, reagensa i ostalih komponenata
4. mjerena
5. analiza i statistička obrada podataka



U svrhu ovog istraživanja uzgajale su se klice biljke lucerne (*Medicago sativa* L.) te se ispitivao utjecaj čestica nanosrebra na pojavu oksidacijskog stresa, odnosno ekspresiju proteina 2. i 10. dan nakon što su klice prokljale, morfometrijska obilježja, koncentraciju prolina i aktivnost katalaze.

Tablica 1 Popis varijabli u istraživanju i način na koji su one mjerene, odnosno kontrolirale

Tip varijable	Ime varijable	Raspon varijabli, način njihovog mjerena i kontroliranja
Nezavisna	koncentracija nanočestica srebra u hranjivom mediju	Korišteno je pet otopina nanosrebra koncentracija 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm i 200 ppm (slika 2a).
Zavisna	duljina kliničnog izdanka	Mjerenje duljine kliničnog izdanka uz pomoć ravnala s najmanjom podjelom od 1 mm ($\pm 0,5$ mm).
	duljina kliničnog korjeničića	Mjerenje duljine kliničnog korjeničića uz pomoć ravnala s najmanjom podjelom od 1 mm ($\pm 0,5$ mm).
	koncentracija staničnih proteina	Mjerenje apsorbancije ekstrakata staničnih proteina uz pomoć spektrofotometra pri valnoj duljini od 595 nm koristeći Bradfordov reagens.
	koncentracija prolina	Mjerenje apsorbancije prolina spektrofotometrom nakon inkubacije staničnog ekstrakta s ninhidrinskim reagensom pri valnoj duljini od 520 nm.
Kontrolna	izvor nanočestica srebra	U pripremi svih koncentracija nanosrebra korištena je ista matična otopina (<i>Vitabay Med, Colloidal Silver Concentrate 1200 ppm</i>). Na taj način osigurana je uniformnost čestica tj. jednaka veličina.
	sterilni uvjeti rada	Tijekom cijelog istraživanja posebna pažnja posvećena je osiguravanju sterilnih uvjeta rada. Korištenjem ekspres lonca (autoklaviranje) sterilizirana je destilirana voda koja je korištena za pripremu svih otopina te plastični nastavci za mikropipete (slika 2b). Metodom suhe sterilizacije steriliziran je sav metalni i stakleni pribor te filter papir koji je korišten kao podloga za klijanje sjemenki. Priprema sjemenki za klijanje, kao i njihovo sađenje u Petrijeve zdjelice rađeno je u trokutu s tri upaljena plinska plamenika (tzv. sterilni trokut).
	uvjeti rasta	Sve sjemenke u Petrijevim zdjelicama rasle su u jednakim uvjetima s minimalnom promjenom u temperaturi i osvijetljenosti prostorije (slika 1b).
	broj replikanata	Sve eksperimentalne grupe sađene su u deset ponavljanja (Petrijevih zdjelica) s po 10 sjemenki kako bi se osigurao statistički značajan uzorak čak i u slučaju kontaminacije nekih od Petrijevih zdjelica. Kontrolne grupe sađene su u sedam ponavljanja s po 10 sjemenki.



Slika 1 a) sjemenke lucerne korištene u istraživanju; b) klijalište smješteno na vrh ormara (senzori za temperaturu i intenzitet svjetlosti koriste se kako bi se uvjeti mogli održavati što je moguće stalnjikima); c) inicijalna komora za klijanje koja se pokazalo neuspješnom

Priprema biljnog materijala i postavljanje klijališta

Sjemenke su dezinficirane u 1 %-tnoj otopini izosana (20 minuta) i nakon toga isprane sterilnom destiliranom vodom. Eksperimentalne sjemenke stavljene su u otopine nanosrebra odgovarajućih koncentracija (25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm i 200 ppm) na 8 sati kako bi nabubrile. Sjemenke pozitivne kontrole stavljene su na bubreњe u otopinu natrijeva klorida koncentracije 0,25 M, a sjemenke negativne kontrole u sterilnu destiliranu vodu kroz isto vremensko razdoblje. Po 10 je



sjemenki preneseno u sterilne Petrijeve zdjelice u koje je prethodno stavljen sterilni filter papir. Prije nego što su Petrijeve zdjelice bile stavljene na ormari na klijanje zaliveni su s 5 mL odgovarajućih otopina (iste one u kojima su bile namakane). Ovisno o potrebi (ukoliko je filter papir bio suh) sjemenke su dodatno zalijevane sve do 10. dana, odnosno završetka istraživanja. Tijekom klijanja senzorima je mjerena količina svjetlosti i temperatura zraka (slika 1b).



Slika 2 Osnovni pribor za izvođenje istraživanja: a) Sve potrebne otopine i sterilizirani pribor; b) Ekspres Ionac koji je korišten kao autoklav; c) UV/ViS spektrofotometar korišten za mjerjenja apsorbancije

Mjerenja provedena dva dana nakon klijanja lucerne

Drugog dana nakon što su klice proklijale mjerena je koncentracija ukupnih proteina. Razlog tome su istraživanja koja sugeriraju da je u početnim stadijima rasta koncentracija staničnih proteina povišena, kao odgovor stanice na stanje stresa i pokušaj obrane (Yan i Chen, 2019). Koncentracija ukupnih proteina određivana je pomoću Bradfordovog reagensa. Tijek mjerjenja je uključivao:

- 1 Priprema PBS pufera
- 2 Priprema Bradfordovog reagensa
- 3 Izrada baždarne krivulje za spektrofotometrijsko određivanje ekspresije staničnih proteina pomoću otopina PBS pufera i pilećeg albumina
- 4 Vaganje klica iz Petrijevih zdjelica
- 5 Maceriranje klica te razrjeđivanje s PBS puferom (za 0,1 g tkiva dodan je 1 mL PBS pufera)
- 6 Dobivene otopine PBS pufera i maceriranih klica prebacete se u Falcon epruvete volumena 15 mL i stave u centrifugu na 5 minuta (3 500 okretaja po minuti)
- 7 Nakon prvog centrifugiranja, supernatant je potrebno preliti iz Falcon epruveta u Eppendorf epruvete te ponovno centrifugirati 15 minuta (12 000 okretaja po minuti)
- 8 Nakon drugog centrifugiranja, supernatant iz Eppendorf epruveta ponovno se vrati u Falcon epruvete te se u njih doda Bradfordov reagens u omjeru 1:10 (volumen reagensa:volumen biljnog ekstrakta) i izolira od svjetlosti na 5 minuta (slika 6k)
- 9 Mililitar sadržaja iz Falcon epruvete prenese se pomoću mikropipete u kivetu te se napravi 5 spektrofotometrijskih mjerena pri valnoj duljini 595,2 nm za svaku kontrolnu i eksperimentalnu skupinu
- 10 Preko prethodno eksperimentalno izrađene baždarne krivulje pilećeg albumina i dobivenih mjerena apsorbancije izračuna se ukupna masa proteina u lucerni (slika 3).



Priprema PBS pufera

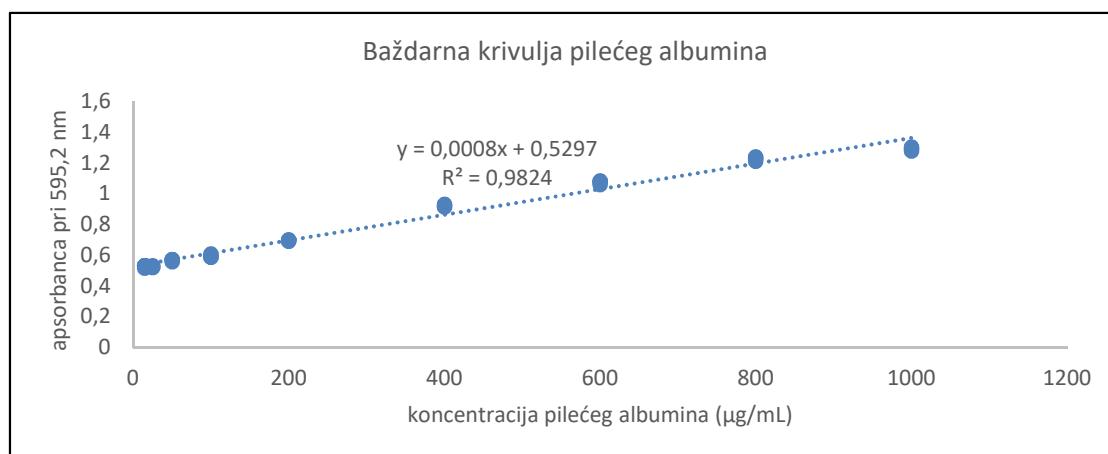
Za litru PBS pufera potrebno je: 8 g natrijevog klorida, 200 mg kalijevog klorida, 1,78 g natrijeva hidrogenfosfata dihidrata i 240 mg kalijeva dihidrogenfosfata. Sve to valja otopiti u odmjernoj tirkici volumena 1 L. Nakon toga potrebno je pH pufera podesiti na 7,4. To je napravljeno pomoću pH senzora. Početni pH pufera iznosi oko 7,8. Pomoću 0,1M klorovodične kiseline pH je spušten na 7,4.

Priprema Bradfordovog reagensa

U 50 mL metanola otopi se 50 mg Coomassie Blue G-250 boje u odmjernoj tirkici volumena 1L. Tome se doda 100 mL 85%-tne fosforne kiseline i 500 mL deionizirane vode. Sadržaj je potrebno dobro promiješati, a zatim deioniziranom vodom dopuniti do oznake. Nakon gotove sinteze, otopinu je potrebno filtrirati pomoću naboranog filter papira kako bi se otklonile veće čestice nečistoće. Boja je podložna fotolizi te ju je potrebno zaštитiti aluminijskom folijom i držati u hladnjaku na 4 °C.

Izrada baždarne krivulje pilećeg albumina

Najprije se pripreme otopine PBS pufera i različitih koncentracija pilećeg albumina (25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 i 1000 µg/mL). U otopine se doda BSA reagens u omjeru 1:10. Otopine se stave u prostor bez svjetlosti na 5 minuta. Nakon toga 1 mL svake otopine potrebno je prenijeti u kivetu i staviti na spektrofotometar. Na apscisu korisnik unosi koncentracije, a na ordinati se ispisuju apsorbancije koje je spektrofotometar na valnoj duljinu 595,2 nm izmjerio. Na kraju je potrebno točke spojiti pravcem te ispisati jednadžbu pravca pomoću koje će se kasnije računati koncentracije proteina (slika 3).



Slika 3 Graf ovisnosti apsorbancije pri 595,2 nm o koncentraciji pilećeg albumina (baždarna krivulja za mjerjenje koncentracije straničnih proteina)

Mjerena provedena 10 dana nakon klijanja lucerne

Desetog dana nakon što su klice prokljale ponovno je mjerena koncentracija ukupnih proteina, ali su i ravnalom mjerena morfometrijska obilježja klica (duljina korijena, duljina stabljike i broj listova) te je spektrofotometrijski određivana koncentracija prolina.

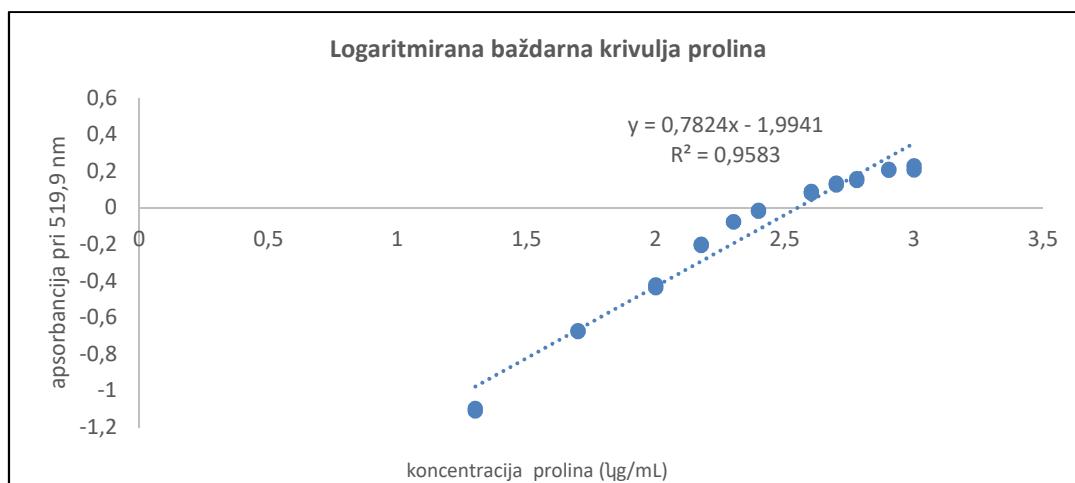
Koncentracija proteina određivana je na isti način kao i 2. dan nakon što su klice prokljale.

Određivanje koncentracije prolina

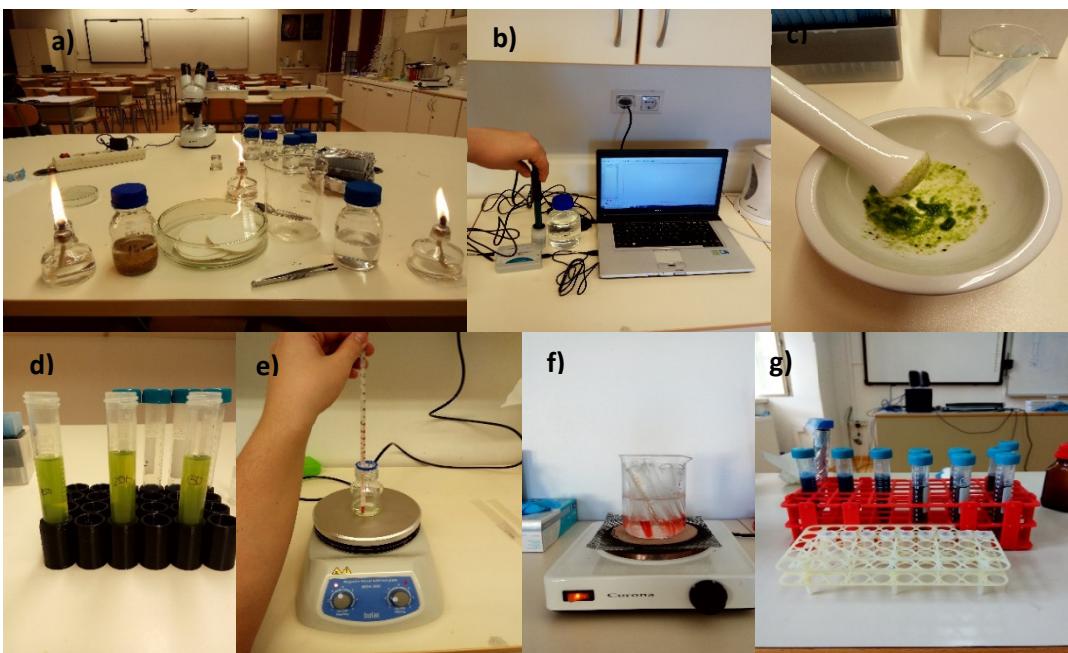
Prvi korak u određivanju koncentracije prolina je eksperimentalna izrada baždarne krivulje. Baždarna krivulja rađena je pomoću reakcijske smjese ninhidrina i otopina različitih koncentracija prolina (20, 50, 100, 150, 200, 250, 400, 500, 600, 800, 1000 µg/mL) (slika 4). Ninhidrin je otopljen u 100 %-tnoj



octenoj kiselini i 20 %-tnoj sulfosalicilnoj kiselini na temperaturi od 70 °C tako da se dobije reakcijska smjesa ninhidrina. Kasnije je 50 µL otopine biljnog tkiva i PBS pufera stavljeno u 1 mL rekacijske smjese ninhidrina. Sadržaj je kvantitativno prenesen u epruvete i zagrijavan u vodenoj kupelji 15 minuta. Nakon 15 minuta otopine su dobile crveno-narančastu boju. Otopina s većom koncentracijom prolina poprimila je jače crvenu boju. Nakon zagrijavanja epruvete su na 5 minuta stavljene u led kako bi se zaustavila reakcija. Kasnije je spektrofotometrijski ispitivana apsorbancija na valnoj duljini od 520 nm. Za svaku je skupinu napravljen 5 spektrofotometrijskih mjerena kao kontrola. Nakon očitanih svih apsorbancija prema jednadžbi pravca baždarne krivulje izračunate su vrijednosti koncentracije prolina eksperimentalnih skupina.



Slika 4 Graf ovisnosti koncentracije čistog prolina o apsorbanciji pri 519,9 nm (baždarna krivulja za određivanje koncentracije prolina)



Slika 5 Ključni koraci u provođenju istraživanja: a) Selekcija sjemenki pod lupom te stavljanje istih na klijanje u sterilnim uvjetima; b) Namještanje pH vrijednosti PBS pufera; c) Maceriranje klica; d) Otopine lucerne i PBS pufera nakon 1. centrifuge; e) Otapanje ninhidrina na magnetnoj miješalici uz zagrijavanje; f) Zagrijavanje otopine ninhidrina i macerirane lucerne te PBS pufera; g) BSA reagens te otopine lucerne



Statističke metode

U ovome istraživanju korištene su sljedeće deskriptivne statističke metode: standardna devijacija, ANOVA test, Pearson test te Tukey test. Standardna devijacija matematička je metoda koja govori o pouzdanosti rezultata i njihovoj raspršenosti oko aritmetičke sredine (preciznost i točnost mjerjenja). Ona prati Gaussovku krivulju. Ako je standardna devijacija mala to znači da su mjerena jako grupirana jedna oko drugoga – preciznost mjerjenja i metode je velika. ANOVA test je utvrdio postoji li ili ne značajna razlika između testiranih grupa (tj. koja je vjerojatnost da se takav ili bolji rezultat dogodi čisto slučajno). Ukoliko ima značajne razlike, provodi se daljnja analiza (Pearson i Tukey test) kako bi se utvrdilo između kojih grupa zapravo postoji razlika (uz preduvjete, alfa 0,05 → znači da je vjerojatnost da se takav ili bolji rezultat pojavi manja od 5 %).

REZULTATI

Rezultati su analizirani u skladu s postavljenim hipotezama.

Postotak klijavosti

Određivanjem postotka klijavosti lucerne utvrđen je približno jednak postotak klijavosti u negativnoj kontrolnoj skupini i ostalim eksperimentalnim skupinama. Niti jedna klica u pozitivnoj kontrolnoj skupini (otopinu natrijeva klorida koncentracije 0,25 M) nije proklijala. Napravljen je ANOVA test koji je pokazao da nema statistički značajne razlike između negativne kontrole i bilo koje od eksperimentalnih skupina (F vrijednost = 1,685, F_{crit} vrijednost 2,286, p vrijednost = 0,144).

Morfometrijska mjerena

U tablici 2 prikazane su morfometrijske vrijednosti 10 dana starih klica lucerne. ANOVA testom utvrđeno je da nema statistički značajne razlike u duljinama korijena između negativne kontrolne skupine i eksperimentalnih skupina. S druge strane, ANOVA test je pokazao da postoji statistički značajna razlika u duljinama stabljike između negativne kontrole i eksperimentalnih skupina. Tukey testom utvrđeno je da je najveća razlika postoji između eksperimentalne skupine s koncentracijom nanosrebra 25 ppm i skupine s koncentracijom nanosrebra 150 ppm (p vrijednost = 0,0002). Također, utvrđene su i manje značajne razlike između skupine koncentracije 25 ppm i skupina koncentracije 200 ppm (p vrijednost = 0,0005) te negativne kontrolne skupine (p vrijednost = 0,0023). ANOVA testom je potvrđeno da postoji i značajna razlika u broju listova. Najveća razlika u broju listova klica lucerne je između grupe koncentracije 25 ppm i grupe koncentracije 150 ppm (p vrijednost = 0,0001). Pearsonovim testom dokazano je da ne postoji korelacija između duljina korijena i stabljike unutar skupina (r vrijednosti < 0,3).

Ekspresija staničnih proteina

Tretmani klica destiliranom steriliziranom vodom negativne kontrole 2. dan pokazali su gotovo jednaku ekspresiju staničnih proteina kao i eksperimentalne skupine tretirane nižim koncentracijama AgNP (25 ppm i 50 ppm). Na slici 7 vidljivo je da porastom koncentracija AgNP iznad 50 ppm masa staničnih proteina pada. Također, utvrđeno je da između koncentracija staničnih proteina različitih skupina (F vrijednost = 544,052, F_{crit} vrijednost = 2,445, p vrijednost = 0,018) postoji statistički značajna razlika. Dodatnom analizom (Tukey test) utvrđeno je da postoje značajne razlike između negativne kontrolne skupine i svih eksperimentalnih skupina, a najveća razlika postoji između negativne kontrolne skupine i eksperimentalne skupine koncentracije 200 ppm (p vrijednost = 0).



Tablica 2 Prikaz vrijednosti morfometrijskih obilježja klica lucerne

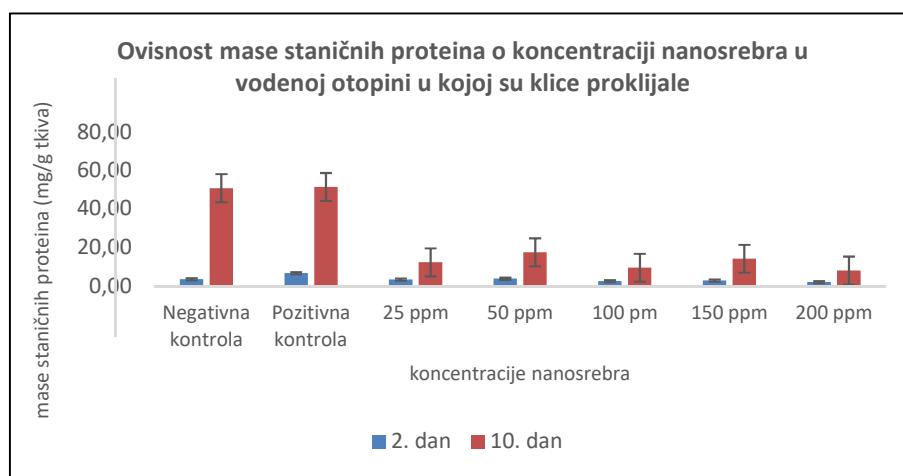
	Testna skupina	Duljina korijena / cm	Duljina klice / cm	Broj listova
Kontrolne skupine	Negativna kontrola	2,46	3,11	1,65
	Pozitivna kontrola		nije proklijalo (sve vrijednosti = 0)	
Eksperimentalne skupine	c(AgNP) = 25 ppm	2,09	2,65	1,52
	c(AgNP) = 50 ppm	2,39	3,03	1,84
	c(AgNP) = 100 ppm	2,29	3,05	1,94
	c(AgNP) = 150 ppm	2,26	3,18	1,63
	c(AgNP) = 200 ppm	2,44	3,15	1,78

Na slici 6 vidljiv je nagli porast masa proteina u negativnoj i pozitivnoj kontrolnoj skupini 10. dan, ali i u svim eksperimentalnim skupinama. Najveći porast mase proteina u eksperimentalnim skupinama ima grupa koja je tretirana koncentracijom 50 ppm AgNP. Uspoređujući s negativnom kontrolnom skupinom, u svih eksperimentalnih skupina mnogo je manji porast mase proteina. Statistički značajna razlika između negativne skupine i eksperimentalnih skupina utvrđena je i ANOVA testom, a Tukey testom ponovno je utvrđeno da najveća razlika postoji između negativne kontrolne skupine i eksperimentalne skupine koncentracije 200 ppm (p vrijednost = 0).

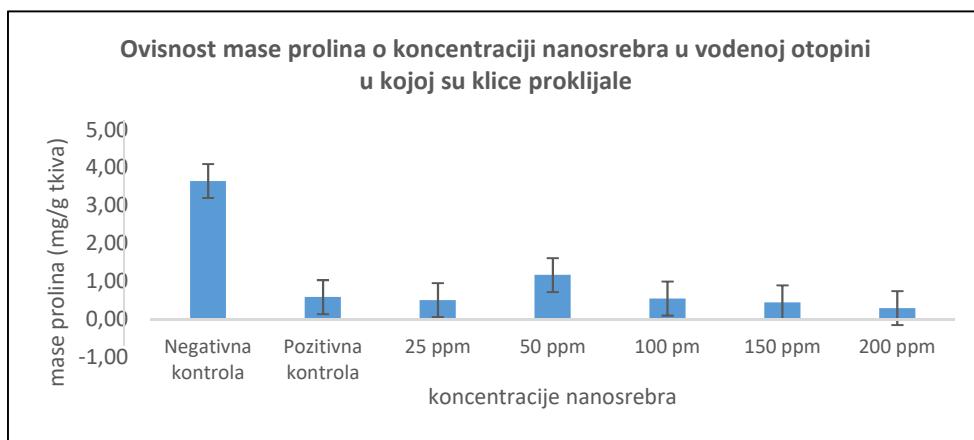
Također, napravljen je t-test kako bi se utvrdilo postoji li značajna razlika između koncentracija staničnih proteina 2-og i 10-og dana nakon klijanja u eksperimentalnim skupinama. Rezultati testa potvrđuju da su razlike u koncentracijama proteina značajne (F vrijednost = 7,461, F_{crit} vrijednost 4,747, p vrijednost = 0,018).

Koncentracija prolina

Na slici 7 vidljivo je da je najveća koncentracija prolina u negativnoj kontrolnoj skupini, a najmanja u skupini koncentracije 200 ppm AgNP. U svim eksperimentalnim skupinama koncentracije prolina približno su jednake, osim u skupini koncentracije 50 ppm gdje je koncentracija prolina znatno viša, nego u ostalih eksperimentalnih skupina. ANOVA testom utvrđeno je da postoje statistički značajne razlike između negativne kontrolne skupine i svih ostalih skupina. Najveća razlika je između negativne kontrolne skupine i eksperimentalne skupine koncentracije 200 ppm (p vrijednost = 0).

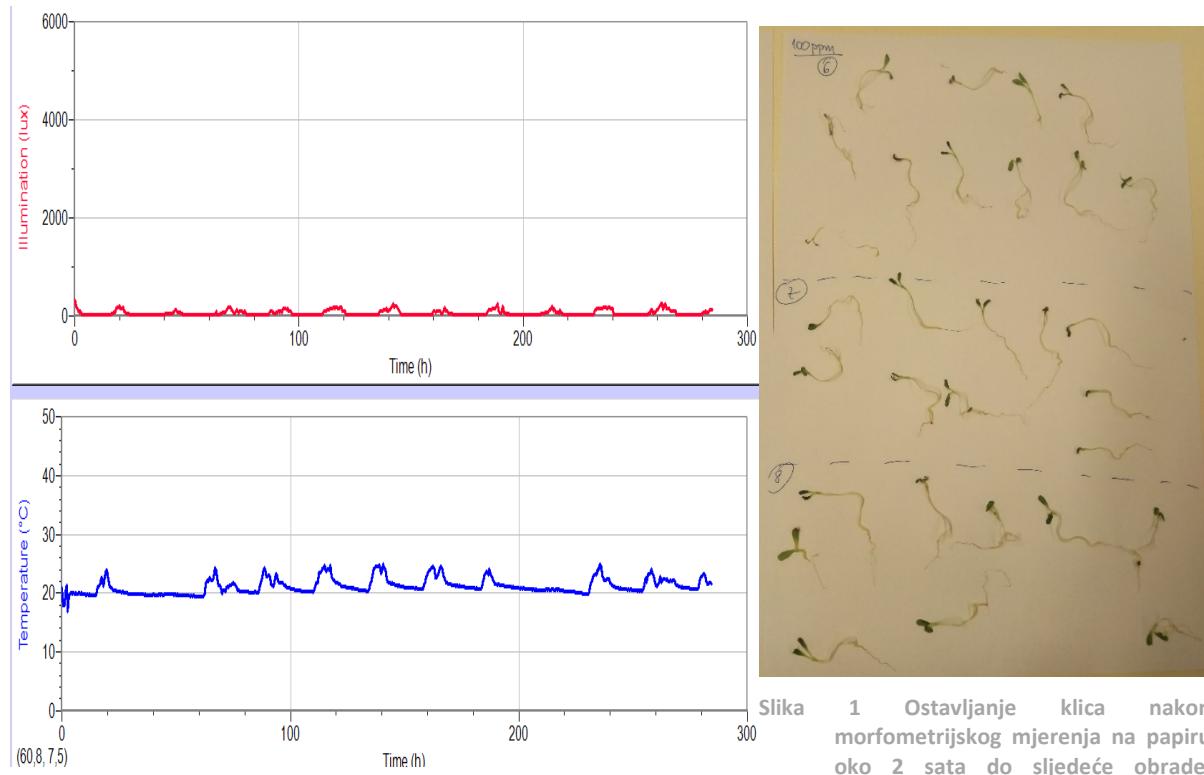


Slika 6 Utjecaj nanočestica srebra na masu staničnih proteina u klica lucerne



Slika 7 Utjecaj AgNP na koncentraciju prolina u klica lucerne

Na slici 8 vidljiva je promjena temperature i količine svjetlosti koja je mogla utjecati na rezultate, a na slici 9 moguća pogreška koja je mogla utjecati na same rezultate.



RASPRAVA

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem ne poklapaju se u potpunosti s hipotezama iznesenim na temelju znanstvenih činjenica pronađenih u literaturi, no istražuje se biološki sustav koji je vrlo nepredvidiv te postoji mnogo parametara koji mogu utjecati na konačni rezultat dobiven nekim mjerjenjem. Npr. Bajan je 2017. godine dobila negativnu korelaciju između masa prolina i koncentracija nanočestica srebra.



Postotak klijavosti eksperimentalnih skupina gotovo je jednak postotku klijavosti klica negativne kontrole što ukazuje na to da nanosrebrno na utječe na parametar klijavosti. Klice pozitivne kontrolne skupine nisu proklijale što znači da je visok salinitet biljkama mnogo više šteti, nego nanočestice srebra (AgNP). Pretpostavlja se da su male razlike koje ipak postoje u klijavosti klica između negativne kontrole i eksperimentalnih skupina izazvane mehaničkim oštećenjima sjemenki, premalom količinom svjetlosti, premalom ili prevelikom količinom vode ili nekim drugim abiotičkim ili biotičkim činiteljem, a ne djelovanjem nanosrebra. Ne isključuje se niti ljudska pogreška pri izvođenju istraživanja.

Morfometrijska obilježja također pokazuju da AgNP ne djeluje negativno na klice lucerne. Većina rezultata vrlo je slična rezultatima negativne kontrolne skupine. ANOVA test pokazuje da ima statistički značajnih razlika u vrijednostima, no te vrijednosti su premale da bi se moglo tvrditi da je to zbog utjecaja nanosrebra na klice. Jedina skupina koja odskače od ostalih je eksperimentalna skupina koncentracije nanosrebra 25 ppm. S obzirom na to da je riječ o jednoj skupini, moguće da je na razlike u rezultatu, odnosno na manje morfometrijske vrijednosti utjecao neki vanjski faktor (npr. kontaminacija Petrijevih zdjelica sporama plijesni ili bakterijama). Standardne devijacije u mjerjenjima unutar skupina su male što znači da su sva mjerena grupirana vrlo blizu srednjih vrijednosti.

Ekspresija staničnih proteina koja je mjerena 2. i 10. dan nakon što su klice proklijale potvrđuje neke od početnih hipoteza istraživanja. Drugi dan mase staničnih proteina u klicama bile su mnogo manje nego nakon desetog dana. Jedina skupina koja odstupa je pozitivna kontrolna skupina, ali to možemo objasniti činjenicom da klice nisu proklijale pa su u mjerjenjima korištene čitave sjemenke zajedno sa sjemenom lupinom koje su bogatije proteinima. Zbog činjenice da sjemenke nisu proklijale rezultat ne možemo uspoređivati s ostalim skupinama. Porastom koncentracije AgNP dolazi do padanja masa staničnih proteina. Deseti dan rezultati su izraženiji i mogu se analizirati. Najviše proteina ponovno ima pozitivna kontrolna skupina, ali to je ponovno zato što niti jedna klica nije proklijala pa su korištene sjemenke. Sve skupine koje su bile tretirane nanosrebrom imaju znatno manju masu proteina od skupine koja nije bila tretirana nanosrebrom. Kao što je i očekivano najmanju masu ima skupina tretirana najvećom koncentracijom nanosrebra. Na grafu se mogu vidjeti dvije anomalije, a to su povećane mase kod skupina tretiranih s 50 i 150 ppm. Iako su sve biljke bile na istoj sobnoj temperaturi i približno jednako izložene svjetlu, ne isključuje se mogućnost utjecaja abiotičkog faktora na neusklađenosti masa tih skupina s ostalim skupinama. Također, prilikom mjerjenja 10. dan došlo je do ljudske pogreške. Klice su najprije izmjerene, a zatim su stavljane na papire i označavane su brojkama. Kako je mjerjenje trajalo oko 2 sata, klice su se djelomično osušile i time se smanjio udio vode u njihovom tkivu što je direktno uzrokovalo i smanjenje u masi biljnog materijala, a time indirektno i mase staničnih proteina zbog činjenice da su one mjerene u mg/g tkiva. Kako bi se to izbjeglo, u budućim istraživanjima, klice obavezno nakon obavljenog morfometrijskog mjerjenja treba vratiti u Petrijeve zdjelice u kojima će se održavati stalna vlažnost. Yasur i Usha Rani (2013) su dobili slične rezultate u masama staničnih proteina klica tretiranih različitim koncentracijama nanosrebra.

Zbog predviđanja mogućnosti pogreške u mjerenu masa proteina i utjecaja vanjskog faktora u ovom je istraživanju mjerena i koncentracija prolina desetog dana nakon što su klice proklijale. Skupine koje imaju najveću masu proteina imaju i najveću koncentraciju prolina što je neobično zato što biljke sintetiziraju prolin u stanju oksidacijskog stresa, odnosno povećane koncentracije oksidansa, no biljke u tom stanju mogu pojačano stvarati antioksidativne enzime i proteine zadužene za stanični popravak te na taj način dovesti do povećanja mase staničnih proteina po gramu tkiva. S obzirom na to da su



duljine stabljika, korijena i brojnost listova negativne kontrole i eksperimentalnih skupina gotovo jednake, možemo zaključiti da AgNP ne uzrokuje veliki oksidacijski stres na lucernu što nije u skladu s nekim prethodnim istraživanjima (Bajan, 2013; Yasur i Usha Rani, 2013).

Daljnja istraživanja na tu temu svakako bi trebala uzeti u obzir navedene pogreške i načine kako te pogreške u budućim istraživanjima spriječiti. Osim toga, mogli bi se mikroskopski proučavati korijeni i stabljike klica kontrolnih skupina i eksperimentalnih skupina kako bi se vizualno vidjelo ima li oštećenja u biljnim tkivima i ako da, kakva su ta oštećenja. Ukoliko mogućnosti i opremljenost laboratorija dozvoljavaju, bilo bi korisno napraviti SDS-PAGE elektroforezu kako bi se s većom sigurnošću mogle utvrditi razlike u sastavu i količini staničnih proteina te Comet test s ciljem utvrđivanja dolazi li do oštećenja na nasljednoj uputi. Preporuka je svakako pripremiti vlastito nanosrebro.

ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata donose se sljedeći zaključci:

- ➊ Rezultati pokazuju da je postotak klijavost svih testnih skupina visok. U svim skupinama iznosi gotovo 100 %, izuzev 2. i 3. skupina (50 i 100 ppm) koje imaju klijavost od 88 % i 94 % u usporedbi s negativnom kontrolom,
- ➋ Ne može se sa sigurnošću tvrditi utječu li rastuće koncentracije nanosrebra u mediju (25 – 200 ppm) na morfometrijske parametre (duljinu korijena, stabljike i brojnost listova) klica lucerne. Između nekih eksperimentalnih skupina (25 i 200 ppm) postoje statističke značajne razlike u vrijednostima, međutim ona je neznatna i do nje je moglo doći zbog utjecaja neko drugog okolišnog čimbenika,
- ➌ Kod klijanaca lucerne tretiranim nanosrebrom dolazi do opadanja mase ukupnih staničnih proteina u usporedbi s kontrolnom skupinom što se poklapa s literaturom (Yasur i Usha Rani, 2013). Također, masa ukupnih staničnih proteina poprima veće vrijednosti u klicama desetog dana nakon klijanja u usporedbi s klicama nakon drugog dana što se poklapa s iznesenim hipotezama,
- ➍ U svim testnim skupinama koncentracija prolina niža je od koncentracije u negativnoj kontroli što je u potpunosti suprotno s rezultatima pronađenim u stručnoj literaturi (Bajan, 2017).

ZAHVALA

Od srca se zahvaljujem mentoru, Marku Šafranu, na trudu, vremenu, strpljenju, savjetima, dugosatnim ostajanjima u školskom laboratoriju i potpori koji mi je pružio u osmišljavanju teme i provođenju ovog istraživanja.

Veliko hvala i profesorici Martini Vidović na poticaju za prijavu na natjecanje, savjetima prilikom provođenja istraživanja te pripremanju za državno natjecanje.

Hvala svim profesorima zbog kojih sam zavolio znanost, te Prvoj gimnaziji Varaždin koja mi je omogućila odraditi istraživanje koje iziskuje zahtjevnu laboratorijsku opremu.

LITERATURA

- Bajan, Ž. 2017. Oksidacijski stres u biljkama duhana (*Nicotiana tabacum* L.) izloženim nanočesticama srebra. Diplomski rad. Zagreb. Sveučilište u Zagrebu.
- Bonassin L. 2018. Uloga kompatibilnih osmolita u odgovoru biljaka na osmotski stres. Diplomski rad. Zagreb. Sveučilište u Zagrebu.
- Cramer G i sur. 2011. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology*, 11(1), 163.
- Hayat S. i sur. 2012. Role of proline under changing environments. *Plant Signaling & Behavior*, 7(11), 1456–1466.
- Jørgensen C. 2013. The Nanodatabase is developed by the DTU Environment, the Danish Ecological Council and Danish.



- Sadeghi B. i sur. 2012. Comparison of the anti-bacterial activity on the nanosilver shapes: Nanoparticles, nanorods and nanoplates. *Advanced Powder Technology*, 23(1), 22–26.
- Yan A., Chen Z. 2019. Impacts of Silver Nanoparticles on Plants: A Focus on the Phytotoxicity and Underlying Mechanism. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 1003
- Yasur J., Usha Rani P. 2013. Environmental effects of nanosilver: impact on castor seed germination, seedling growth, and plant physiology. *Environ Sci Pollut Res* 20: 8636–8648
- Yuan L. i sur. 2018. Stress Responses of Aquatic Plants to Silver Nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, 52(5), 2558–2565.



UTJECAJ PRIRODNIH I KOMERCIJALNIH DEZINFICIJENSA NA RAST I RAZVOJ BAKTERIJA

Đurđica Kovačić, 1. razred

III. gimnazija, Split
Mentor: Vesna Dobronić

SAŽETAK

Cilj istraživanja je bio odrediti koje od korištenih sredstava ima antibakterijska svojstva te koje najučinkovitije inhibira rast bakterija. U tu svrhu provedeno je istraživanje u kojem je uspoređeno djelovanje komercijalnih dezinficijensa (sapun, antibakterijski sapun, antibakterijski gel za ruke) i prirodnih dezinficijensa (vodeni ekstrakt kliničića, vodeni ekstrakt češnjaka, ulje lavande, ulje smilja) na rast i razvoj bakterija. Uzorci su uzeti s kvaka učionica. Brisevi su nacijseljeni u tripton soja bujon, nakon inkubacije napravljena su decimalna razrjeđenja koja su zatim nacijseljena na hranjivi agar. Nakon inkubacije hranjivog agara, izbrojene su kolonije. U pokusima su mijenjani sljedeći parametri: vrijeme inkubacije tripton soja bujona i hranjivog agara, vrsta dezinficijensa te volumen dezinficijensa. Rezultati su pokazali da je ulje lavande najučinkovitije inhibiralo rast bakterijskih kolonija, dok je najmanje učinkovit antibakterijski gel za ruke. Dezinficijensi su učinkovitiji kad su stavljeni u većem volumenu (1 mL) nego u manjem (0,2 mL) te antibakterijski sapun na bazi pentanola bolje inhibira rast bakterija od običnog sapuna na bazi natrijeva benzoata.

Ključne riječi: dezinficijensi; mikroorganizmi; sapun; biljni ekstrakti

UVOD

Jeste li se ikada zapitali djeluju li antibakterijski sapun i običan sapun jednako na bakterije? Je li bolje koristiti „prirodne tvari“ ili komercijalne tvari za dezinfekciju? Zašto najčešće peremo ruke vodom i sapunom, a ne gelom za suho pranje ruku?

Bakterije možemo podijeliti na dvije velike skupine: sporogene i nesporogene. Sporogene bakterije, za razliku od nesporogenih, u nepovoljnim uvjetima (kao što je djelovanje dezinficijensa) imaju mogućnost stvaranja spora koje su metabolički neaktivne i otporne stanice koje čuvaju genetički materijal dok uvjeti ponovno ne postanu povoljni. Učinkovitost nekog dezinficijensa ovisi o njegovim svojstvima kao i o vrsti bakterija na koje se primjenjuje (Hajsig i Delaš, 2016). Za uzgoj bakterija koriste se hranjive podloge koje sadrže vodu i hranjive tvari te specifične dodatke, ovisno o potrebama pojedinih vrsta bakterija. Hranjive podloge za uzgoj bakterija prema konzistenciji možemo podijeliti na: čvrste, polučvrste i tekuće (bujoni). Uzgoj bakterija provodi se u inkubatoru na stalnoj temperaturi tijekom određenog vremenskog razdoblja (Hajsig i Delaš, 2016).

Dezinficijensi su sredstva čija je svrha uništavanje mikroorganizama, usporavanje njihova rasta i razmnožavanja ili njihovo uklanjanje. Sam proces dezinfekcije primjena je različitih metoda (kemijskih, mehaničkih i fizikalnih) i sredstava kojima se broj mikroorganizama smanjuje na razinu koja nije opasna za ljude. To je uništavanje svih bakterija koje nemaju sposobnost stvaranja spora (Hajsig i Delaš, 2016). Dezinficijensi mogu djelovati na bakterije denaturacijom proteina, oštećenjem citoplazmatske ovojnica ili blokiranjem enzimskih sustava. Za učinak dezinficijensa, uz temperaturu i vrijeme djelovanja, odgovorna je i njegova aktivna tvar (Duraković, 1996). Komercijalni dezinficijensi se sastoje od sintetiziranih kemijskih tvari dok su prirodni dezinficijensi oni na bazi biljnih ekstrakta te nemaju pridodanih aktivnih tvari.



U ovom istraživanju, sapun je na bazi natrijeva benzoata, koji je dokazani antiseptik, ali može potencijalno biti opasan u velikim količinama (Healthline, 2019), dok je antibakterijski sapun na bazi pentanola, koji je također dokazani antiseptik (NCBI, 2014). Aktivna tvar antibakterijskog gela za ruke je etanol čiji je udio 70% kako bi bio učinkoviti antiseptik (Koronavirus, 2020). Kliničić ima različita svojstva, između ostalog i antiseptičko. Njegov glavni sastojak je eugenol, za koji je dokazano da djeluju antiseptički, što implicira da i kliničić sadrži antiseptičko svojstvo (Viduka, 2018). Češnjaku su također dokazana antibakterijska svojstva, a jedan od sastojaka koji mu daje ta svojstva je biljni antibiotik fitoncid alicin (Franjić, 2017). Lavandina aktivna tvar je terpinene-4-ol, kojemu su dokazana antibakterijska svojstva, ali i za samo ulje lavande postoje različita istraživanja u kojima se spominje njegovo antibakterijsko svojstvo na čak i neke vrste bakterija koje su rezistentne na antibiotike (Wilkinson i Cavanagh, 2005). Aktivna tvar smilja je linalool, kojemu su dokazana antibakterijska svojstva (Herman i sur., 2015).

U projektu, s državnog natjecanja biologije iz 2014. godine, koji je naslovljen „Učinkovitost prirodnih i sintetskih antimikrobnih tvari na mikroorganizme u svakodnevici“, istražen je utjecaj dezinficijensa na bakterije s različitim predmeta kojima se svakodnevno koristimo. Od prirodnih tvari, jedino su se eterično ulje lavande i ružmarina pokazali učinkovitim. Korišten je i „antibakterijski gel za ruke 48“ te je zaključeno da gelovi za suho pranje ruku ne mogu učinkovito zamijeniti pranje ruku sapunom i vodom (Vidović, 2014).

Poticaj za ovo istraživanje bila je spoznaja da većina mojih vršnjaka prije užine ne opere ruke ili, ukoliko ih opere, higijenu obavi uglavnom različitim gelovima za suho pranje unatoč činjenici da je kupaonica u neposrednoj blizini učionice. Na moje upite o razlozima njihovog postupka i ponašanja, uslijedili su odgovori koji su svedeni pod zajedničku rečenicu: „Ma pusti, neće mi se ništa dogoditi“. Upravo me taj pristup potaknuo na ovo istraživanje. Odlučila sam osvijestiti svoje vršnjake o potencijalnim opasnostima nepranja ruku te promovirati učinkovitost higijenskih navika.

Cilj istraživanja je bio odrediti koje od korištenih sredstava ima antibakterijska svojstva te koje najučinkovitije inhibira rast bakterija. Time sam htjela skrenuti pažnju učenicima i priateljima na učinkovitost dezinficijensa. Kako bih ispunila cilj, istražila sam i usporedila djelovanje komercijalnih i prirodnih dezinficijensa na razmnožavanje bakterija te utvrdila postoji li razlika u djelovanju između običnog sapuna i antibakterijskog sapuna.

Moje hipoteze su:

1. Antibakterijski sapun će najbolje inhibirati razvoj kolonija bakterija jer mu je to ciljana namjena.
2. Većim volumenom dezinficijensa učinak inhibiranja kolonija će biti bolji tj. veći broj kolonija će biti inhibiran.
3. Komercijalni dezinficijensi će jače inhibirati razvoj kolonija bakterija nego oni koji sadrže prirodne ekstrakte biljaka.

METODE

Materijali

Za provedbu istraživanja korišteni su materijali i uređaji za standardne mikrobiološke tehnike nasađivanja bakterija te komercijalni i prirodni dezinficijensi (tablica 1, slika 1).

Tablica 1 Korišteni materijali u istraživanju

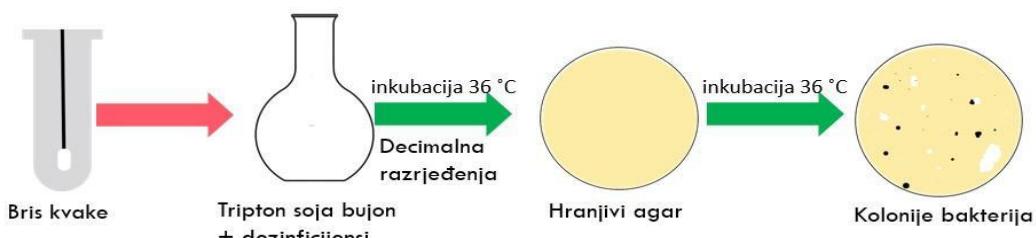
Laboratorijski pribor	sterilni brisevi	mikrobiološke eze	Petrijeve zdjelice	pipete
Uređaji	tresilica	inkubator na 36°C	lupa s povećanjem 5x	/
Mikrobiološke podloge	fiziološka otopina (FO)	Tripton soja bujon (TSB)	hranjivi agar (HA)	/
Komercijalni dezinficijensi/aktivna tvar	sapun / natrijev benzoat	antibakterijski sapun / pentanol	antibakterijski gel za ruke / etanol	/
Prirodni dezinficijensi/aktivna tvar	voden ekstrakt klinčića / eugenol	voden ekstrakt češnjaka / fitoncid alicin	ulje lavande / Terpinene-4-ol	ulje smilja / linalool
Kontrolni uzorak	Sterilna fiziološka otopina odgovarajućeg volumena (ovisno o volumenu dezinficijensa)			



Slika 1 Korišteni dezinficijensi

Postupak istraživanja

Postupak istraživanja je prikazan shematski na slici 2 i opisan detaljno u tablici 2. U sedam odvojenih pokusa promijenjen je jedan od parametara (volumen dezinficijensa, vrijeme inkubacije i vrsta dezinficijensa), tako da je dobivena mogućnost istraživanja učinka svakog pojedinog parametra. Svaki od ovih pokusa ponovljen je sa svakim pojedinim dezinficijensom. U svakom pokusu postojala je i kontrolna skupina u kojoj je umjesto dezinficijensa dodana odgovarajuća količina sterilne fiziološke otopine.



Slika 2 Shematski prikaz postupka istraživanja

U svrhu istraživanja uzeti su brisevi kvaka, koji su stavljeni u epruvete s fiziološkom otopinom. Dobiveni uzorak (bakterije brisa u fiziološkoj otopini) naciapljen je na tripton soja bujon (TSB) zajedno s dezinficijensom. Tako naciapljeni TSB inkubiran je na 36°C tijekom 24 ili 48 sati. Nakon inkubacije TSB je precijepljen na hranjivi agar (HA) i stavljen na inkubaciju pri temperaturi od 36°C tijekom 24 ili 48 sati. U 3., 4., 5., 6. i 7. pokusu napravljena su decimalna razrjeđenja TSB-a te su ona naciapljena na HA (tablica 2, slika 3, prilog 1).



Tablica 2 Plan istraživanja

Pokus broj	Volumen nasijanog uzorka brisa	Volumen dezinficijensa	Volumen TSB	Vrijeme inkubacije TSB	Vrijeme inkubacije HA
1	1 mL	1 mL	8 mL	24 h	24 h
2	1 mL	1 mL	8 mL	48 h	24 h
3	1 mL	0,2 mL	8 mL	24 h	24 h
4	1 mL	0,2 mL	8 mL	24 h	48 h
5	1 mL	0,5 mL	8 mL	24 h	24 h
6	1 mL	0,5 mL	8 mL	24 h	48 h
7	1 mL	0,5 mL	8 mL	48 h	24 h

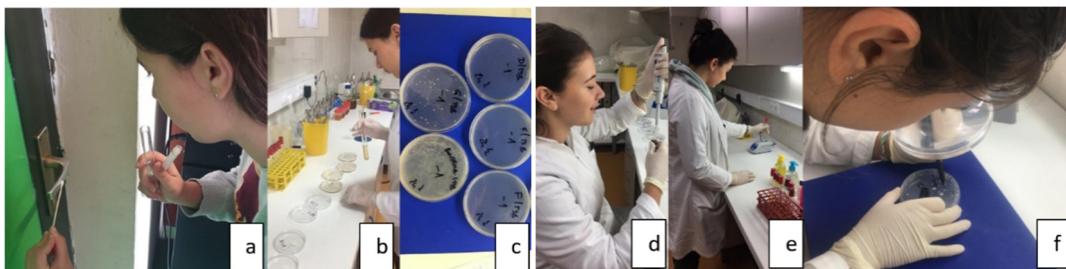
Uzimanje briseva i nacijspljivanje na Tripton soja bujon (TSB)

Uzeti su brisevi s triju kvaka (učionica matematike (M), informatike (I) te vanjska kvaka toaleta) i stavljeni u tri različite epruvete s fiziološkom otopinom (slika 3). Brisevi su uzimani tako da je sterilni, suhi štapić s pamukom na vrhu, prvo namočen uranjanjem u epruvetu s fiziološkom otopinom i lagano ocijeđen uz stijenk u epruvete. Tako navlaženim štapićem temeljito je prebrisana svaka kvaka pojedinačno, a zatim je svaki štapić vraćen u svoju epruvetu s 10 mL fiziološke otopine. Uzorci su pomiješani i nacijspljeni u 8 mL tripton soja bujona (TSB) (Biolife, Italija), zajedno s pojedinim dezinficijensom. Nacijspljeni bujoni su stavljeni u inkubator na 36 °C tijekom 24 odnosno 48 sati.

Za svaki dezinficijens su napravljena po četiri decimalna razrjeđenja te je mijenjano vrijeme inkubacije hranjivog agara. Sveukupno je nasađeno 196 petrijevih zdjelica.

Precjepljivanje na hranjivi agar (HA) i izrada decimalnih razrjeđenja

Nakon inkubacije su uzorci iz svih bujona precjepljeni na hranjivi agar (slika 3). Kako bi dobili što točniji broj poraslih kolonija, napravljena su decimalna razrjeđenja TSB-a u sterilnoj fiziološkoj otopini. Decimalna razrjeđenja su rađena tako da je, nakon inkubacije, uzet po 1 mL TSB-a i stavljen u 9 mL fiziološke otopine, pri čemu se dobilo razrjeđenje od 10^{-1} . Potom je uzet po 1 mL fiziološke otopine iz razrjeđenja od 10^{-1} i stavljen u 9 mL fiziološke otopine, pri čemu se dobilo razrjeđenje od 10^{-2} . Postupak je ponovljen do razrjeđenja od 10^{-9} . Epruvete s bujom su se tijekom izrade razrjeđenja prislanjane na treskalicu kako bi se sadržaj dobro homogenizirao. Po 1 mL svakog razrjeđenja stavljen je u Petrijevu zdjelicu i preliv u 20 mL otopljenog hranjivog agara. Nacijspljeni hranjivi agar stavljen je još jednom u inkubator na 36 °C te su rezultati očitani nakon 24 odnosno 48 sati (slika 3, prilog 1).



Slika 3 a) Uzimanje brisa; b) precjepljivanje na HA; c) rezultati, d) nacijspljivanje u TSB; e)homogeniziranje TSB-a; f) brojanje kolonija

Brojenje kolonija i izražavanje rezultata

Za brojenje kolonija korišteni su lupa i flomaster kojim su označavane izbrojane kolonije (HRN EN ISO 6222: 2000). Rezultati su izraženi kao broj kolonija u svakoj Petrijevoj zdjelici. Uzgojene kolonije u Petrijevoj zdjelici promatrane su pod lupom uz povećanje 5x. Svaka je kolonija na poklopcu označena



točkom pomoću vodootpornog markera (slika 4f). Petrijeve zdjelice na kojima je naraslo više od 300 kolonija označene su kao „bb“ jer ih zbog velike brojnosti kolonija nije bilo moguće prebrojati. U slučaju izrade decimalnih razrjeđenja procijenjeni broj bakterija u 1 mL (cfu/mL) izračunat je formulom broj bakterija u decimalnom razrjeđenju $\times 10^{n}$ gdje n označava potenciju decimalnog razrjeđenja. Dobiveni broj bakterija je izražen kao cfu ili „colony forming unit“ što označava broj bakterija koje su sposobne stvoriti kolonije, tj. sposobne su za život (Sciencing, 2017).

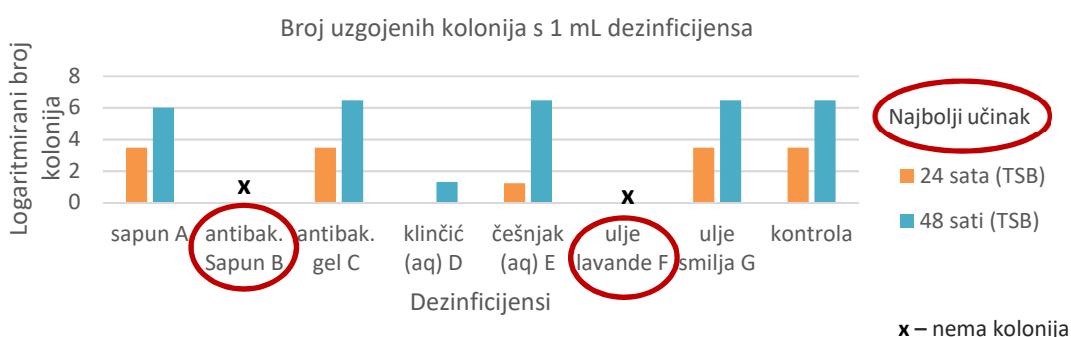
Statistička obrada podataka

Za bolju razlučivost rezultata korištena je statistička metoda logaritmiranja kako bi se istaknula razlika u brojčanim vrijednostima grafa. Formula koja je korištena: ako vrijedi da je $x^y = z$, onda vrijedi da je $\log_x z = y$ pod uvjetom da je $z > 0$, a $x > 0$ i različit od 1. $x = \langle 0, \infty \rangle / \{1\}$, $y \subset R$, $z = \langle 0, \infty \rangle$ (Dakić i Elezović, 2009). Rezultati su grafički prikazani.

REZULTATI

U pokusu 1 (tablica 2, slika 4) ulje lavande, antibakterijski sapun za ruke i voden ekstrakt klinčića u potpunosti su inhibirali rast i razvoj kolonija. Voden ekstrakt češnjaka je također inhibirao rast i razvoj kolonija, ali ne u potpunosti kao ulje lavande, voden ekstrakt klinčića i antibakterijski sapun. Kod sapuna, antibakterijskog gela za ruke i ulja smilja nije bilo vidljive razlike u broju kolonija u usporedbi s kontrolnom skupinom.

U pokusu 2 (tablica 2, slika 4), u usporedbi s pokusom 1, došlo je do porasta broja kolonija sa svim dezinficijensima, osim s uljem lavande i antibakterijskim sapunom gdje kolonije nisu narasle.

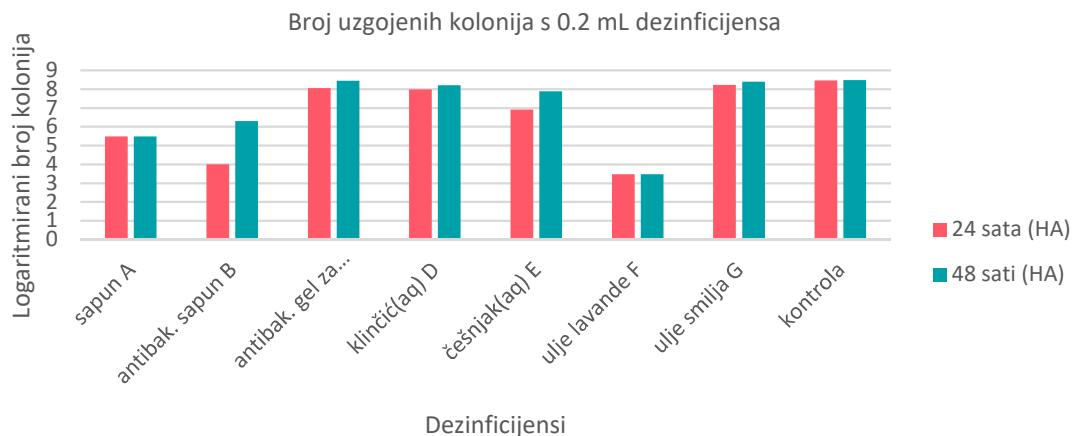


Slika 4 Rast bakterijskih kolonija s obriskva kvake u prisutnosti 1 mL 7 različitih dezinficijensa nakon 24 i 48 sati inkubacije u tripton soja bujonu (TSB)

U pokusu 3 i 4 (tablica 2, slika 5) nijedan dezinficijens nije u potpunosti inhibirao kolonije.

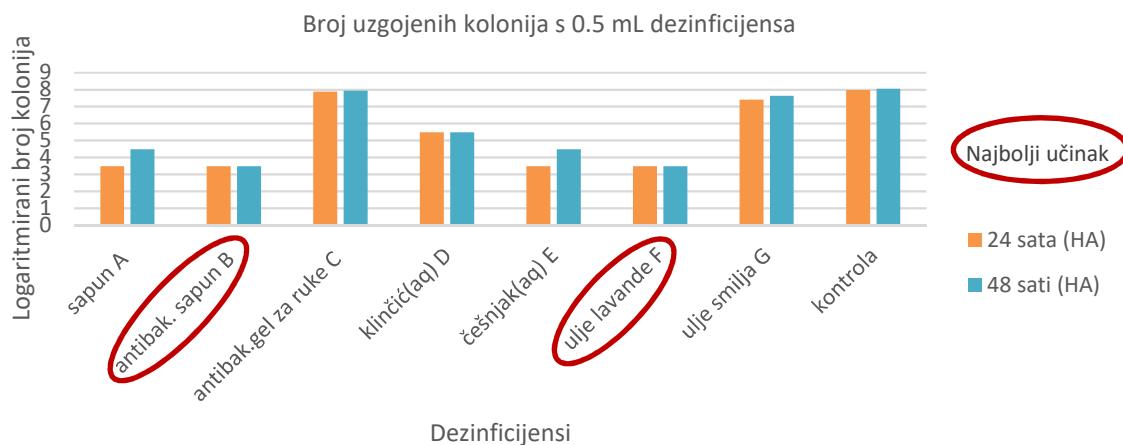
U pokusu 3 svi dezinficijensi su djelovali inhibitorno, a najbolje je djelovalo ulje lavande.

U pokusu 4, s produženim vremenom inkubacije HA, došlo je do porasta bakterijskih kolonija sa svim dezinficijensima osim sa sapunom i uljem lavande gdje broj kolonija nije narastao (slika 4).



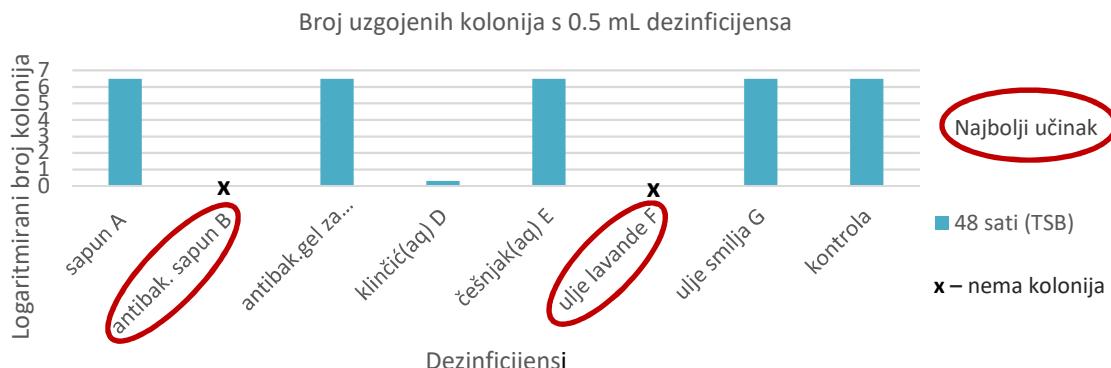
Slika 5 Rast bakterijskih kolonija s obriska kvake u prisutnosti 0.2 mL 7 različitih dezinficijensa tijekom 24 i 48 sati inkubacije na hranjivom agaru (HA)

U pokusu 5 i 6 (tablica 2, slika 6) nijedan dezinficijens nije u potpunosti inhibirao kolonije. U pokusu 5 najbolje su djelovali ulje lavande, voden ekstrakt češnjaka, antibakterijski sapun i sapun dok je voden ekstrakt klinčića spriječio rast kolonija, ali ne podjednako dobro. Ulje smilja i antibakterijski gel za ruke su pokazali minimalna inhibitorna svojstva.



Slika 6 Rast bakterijskih kolonija s obriska kvake u prisutnosti 0.5 mL 7 različitih dezinficijensa tijekom 24 i 48 sati inkubacije na hranjivom agaru (HA)

U pokusu 7 (tablica 1, slika 7) ulje lavande i antibakterijski sapun su djelovali najbolje te u potpunosti inhibirali rast kolonija. Voden ekstrakt klinčića je inhibirao rast kolonija ali ne podjednako dobro kao ulje lavande i antibakterijski sapun. Sapun, antibakterijski gel za ruke, voden ekstrakt češnjaka i ulje smilja uopće nisu inhibirali rast i razvoj kolonija u usporedbi s kontrolnom skupinom.



Slika 7 Rast bakterijskih kolonija s obriska kvake u prisutnosti 0.5 mL 7 različitih dezinficijensa nakon 48 sati inkubacije u tripton soja bujonu (TSB)

RASPRAVA

Cilj istraživanja je bio odrediti koje od korištenih sredstava ima antibakterijska svojstva te koje najučinkovitije inhibira rast bakterija (slika 1). Koristeći metode uzimanja briseva, nacjepljivanja na tripton soja bujon, precjepljivanja na hranjivi agar, izrade decimalnih razrjeđenja, brojanja kolonija i logaritmiranja te mijenjanjem vremena inkubacije TSB-a i hranjivog agara kao i volumen dezinficijensa dobiveni su zanimljivi rezultati (slike 2 i 3).

Dezinficijensi

Sapun je smanjio rast bakterija u svim pokusima osim u 7., gdje je TSB bio inkubiran 48 sati (slika 7). Možda bi sapun pokazao antibakterijska svojstva da je stavljen u volumen od 0,5 ml, uz inkubaciju TSB tijekom 24 sata. Sapun je manje inhibirao rast bakterijskih kolonija od antibakterijskog sapuna, unatoč istraživanjima da sapun djeluje jednako dobro kao antibakterijski sapun (FDA, 2019). Smatram da je to zbog drugačije baze jer je korišteni sapun u mojem pokusu bio na bazi natrijevog benzoata dok su sapuni korišteni u istraživanju bili na bazi tricoclarbana (CDC, 2015). Tricoclarban je od 2016. zabranjeni sastojak u sapunima SAD-a jer nije dokazana njegova učinkovitost u usporedbi s običnim sapunom i potencijalno je opasan kad se koristi kroz duže razdoblje (International Business Times, 2016).

Antibakterijski sapun je inhibirao rast bakterijskih kolonija, ali ne podjednako dobro koliko i ulje lavande. Iako je američki Center for Disease Control and Prevention (CDC) rekao da nema dokazane razlike u antibakterijskoj učinkovitosti između običnog i antibakterijskog sapuna, ipak su dobiveni različiti rezultati (slika 7). U mom istraživanju je antibakterijski sapun bolje djelovao, a razlog može biti taj što je antibakterijski sapun koji sam ja koristila na bazi pentanola, a sapun je na bazi natrijevog benzoata. Više je istraživanja napravljeno o antimikrobnim svojstvima pentanola nego natrijeva benzoata (Healthline, 2019; NCBI, 2014). Antibakterijski sapun, također, u potpunosti je inhibirao rast i razvoj bakterijskih kolonija u 1., 2. i 7. pokusu (slike 4 i 7), ali u usporedbi s uljem lavande lošije je djelovao u 3. i 4. pokusu (tablica 2; slika 5). S obzirom na to da smo u 3. i 4. pokusu koristili manji volumen dezinficijensa (0,2 mL) u odnosu na pokus 1 i 2 (1 mL) te pokus 7 (0,5 mL), ovaj rezultat me navodi na pretpostavku da je za dezinfekcijski učinak antibakterijskog sapuna potrebna veća koncentracija, za razliku od sapuna i ulja smilja kod kojih se najviše uoči razlika u odnosu na kontrolnu skupinu u pokusu 5 kada je količina dezinficijensa bila 0,5 mL (slika 6; tablica 2). Za antibakterijski gel za ruke utvrđena su antibakterijska svojstva samo u 3. pokusu gdje je pokazan minimalni učinak dezinficijensa (slika 5). Iako je alkohol dokazani dezinficijens i nalazi se u antibakterijskom gelu za ruke,



on je djelotvoran samo kad je 70 %-tni (Koronavirus, 2020) U trenutku stavljanja antibakterijskog gela u TSB je došlo do razrjeđivanja alkohola i vjerojatno se zbog toga antibakterijski gel za ruke nije pokazao učinkovitim dezinficijensom. Ovi rezultati su u skladu s projektom s državnog natjecanja iz biologije gdje je zaključeno da gelovi za suho pranje ruku ne mogu zamijeniti pranje ruku s vodom i sapunom (Vidović, 2014). Vodeni ekstrakt kliničića je najbolje djelovao u 1. pokusu zbog čega zaključujem da bolje djeluje u većem volumenu kada je TSB inkubiran 24 sata (slika 4). Dokazano je da češnjak ima antibakterijska svojstva. Jedan od sastojaka koji mu daje ta svojstva je biljni antibiotik fitoncid alicin (Franjić, 2017). Moji rezultati se podudaraju s navedenim istraživanjem (slike 5 i 6). Vodeni ekstrakt češnjaka je pokazao antibakterijska svojstva, ali ni u jednom pokusu nije u potpunosti inhibirao rast bakterija. Postoji mogućnost da češnjaku treba određena količina i/ili vrijeme inkubacije pri čemu bi njegova dezinfekcijska svojstva došla do izražaja ili su, moguće, na kvaki bili takvi mikroorganizmi koji su otporni na antibakterijske tvari iz češnjaka. Ulje lavande se pokazalo najboljim dezinficijensom (slike 4 i 5). Ono je u potpunosti inhibiralo rast bakterija u 1., 2. i 7. pokusu. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjem s državnog natjecanja iz biologije gdje je dokazano da lavanda ima antibakterijska svojstva (Vidović, 2014). Dokazano je da smilje djeluje antimikrobno na određene vrste bakterija (Mucalo, 2015) Ovi rezultati su nešto drugačiji jer je ulje smilja minimalno smanjilo rast bakterijskih kolonija u 3., 4., 5. i 6. pokusu, a u ostalim pokusima nije bilo razlike u odnosu na kontrolu (slike 4, 5, 6 i 7). Sukladno tome zaključujem da ulje smilja nije učinkoviti dezinficijens, tj. da nema dobar dezinfekcijski učinak na mikroorganizme preuzete s kvake. U budućem istraživanju bismo mogli ispitati dezinfekcijski učinak smilja na pojedine vrste mikroorganizama.

Volumen dezinficijensa

U pokusima 1 i 2, za razliku od pokusa 3 i 4 (slike 4 i 5), primjećujemo da su neki dezinficijensi poput antibakterijskog sapuna i ulja lavande, ali i kliničića u pokusu 2, u potpunosti inhibirali rast bakterijskih kolonija dok su u pokusima 3 i 4 slabije inhibirali rast bakterijskih kolonije. Zbog toga zaključujem da dezinficijensi bolje djeluju stavljeni u većem volumenu nego u manjem.

Preporuke za poboljšanje

Zahvaljujući ovom istraživanju, svojim vršnjacima mogu razložiti konkretne informacije o tome koji od korištenih dezinficijensa najbolje inhibira rast bakterija. Najboljim dezinficijensom se pokazalo ulje lavande, ali na temelju ovog podatka ne mogu izvesti zaključak da su svi prirodni dezinficijensi bolje djelovali. Iz tog razloga bih preporučila ulje lavande kao najbolji od korištenih dezinficijenasa, no preporučila bih i antibakterijski sapun kao dobar dezinficijens iako u ovom istraživanju nije najviše inhibirao rast bakterijskih kolonija. Svojim vršnjacima bih savjetovala da redovito peru ruke jer se nikad ne zna koji je od ovih mikroorganizama potencijalno patogen, a pranjem ruku se znatno smanjuje mogućnost dobivanja različitih bolesti. Ovim istraživanjem sam postavila temelje i dala smjernice za buduća istraživanja. U budućim istraživanjima bilo bi poželjno podrobnije istražiti dezinfekcijsko djelovanje ulja lavande na pojedine vrste bakterija te usporediti rezultate s drugim prirodnim dezinficijensima također bi bilo poželjno izolirati aktivne tvari ovih dezinficijensa i promotriti djelovanje aktivnih tvari na različite vrste bakterije. Otvaraju se i ideje za istraživanje koji uključuju antibakterijske sapune i sapune drugačijih baza kako bi se bolje provjerio utjecaj bazi na učinkovitost sapuna kao i utjecaj materijala od kojih su napravljene kvake s kojih je uziman bris. Mogućnosti su brojne, kao i primjena. Jedan od prijedloga je i izrada učinkovitog sredstva za pranje ruku na prirodnoj bazi gdje bi školske zadruge zasigurno mogle polučiti odlične rezultate.



Pri ponavljanju ovog istraživanja bilo bi poželjno napraviti više decimalnih razrjeđenja i imati ponavljanja kako bi rezultati bili što precizniji.

ZAKLJUČCI

Na osnovu provedenog istraživanja doneseni su sljedeći zaključci:

- Svi korišteni dezinficijensi su pokazali antibakterijska svojstva
- Ulje lavande je najučinkovitije inhibiralo rast bakterija – opovrgнута 1. hipoteza.
- Prirodni dezinficijens je bolje inhibirao rast kolonija od komercijalnog – opovrgнута 3. hipoteza.
- Antibakterijski sapun na bazi pentanola je bolje inhibirao rast bakterija od običnog sapuna na bazi natrijeva benzoata
- Dezinficijensi stavljeni u većem volumenu su bolje inhibirali rast bakterijskih kolonija. – potvrđena 2. hipoteza.

ZAHVALA

Željela bih zahvaliti svim profesorima koji su mi izišli u susret tijekom pisanja ovog rada, kao i svojoj mentorici, prof. Dobronić.

LITERATURA

- Dakić B., Elezović N. 2009. Matematika 2, 2 dio. Element, Zagreb, str. 221
- Duraković S. 1996. Primijenjena mikrobiologija. Durieux, Zagreb
- Hajsig D., Delaš F. 2016. Priručnik za vježbe iz opće mikrobiologije. Hrvatsko mikrobiološko društvo, Zagreb
- Viduka K., 2018. Završni rad: Izolacija i identifikacija spojeva eteričnog ulja kliničića. Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, Preddiplomski studij prehrambene tehnologije, Split
- Mucalo Z., 2015. Diplomski rad: Smilje (*Helichrysum italicum* / Roth / G. Don): Od tradicionalne uporabe do znanstvenih istraživanja. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb
- Franjić A., 2017. Diplomski rad: Nutritivni sastav češnjaka (*Allium sativum L.*) iz ekološkog i konvencionalnog uzgoja. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb
- Vidović T. 2014. Učinkovitost prirodnih i sintetskih antimikrobnih tvari na mikroorganizme u svakodnevici. BIOZNALAC. <http://www.hbd-sbc.hr/wordpress/wp-content/uploads/2014/09/U%C4%8Dinkovitost-prirodnih-i-sintetskih-antimikrobnih-tvari-na-mikroorganizme-u-svakodnevici.pdf>, pristupljeno 12. 11. 2019.
- HRN EN ISO 6222:2000 Kakvoća vode- Brojenje uzgojenih mikroorganizama – Broj kolonija nacepljivanjem na hranjivi agar
- Centers for Disease Control and Prevention 2015. Handwashing: Antibacterial Soap <https://www.cdc.gov/handwashing/publications-data-stats.html>, pristupljeno 15. 3. 2020.
- U.S. Food and Drug Administration 2019. Antibacterial Soap ? You Can Skip It, Use Plain Soap and Water <https://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/antibacterial-soap-you-can-skip-it-use-plain-soap-and-water>, pristupljeno 15. 3. 2020.
- Healthline 2019. What is sodium benzoate? Everything you need to know <https://www.healthline.com/nutrition/sodium-benzoate#bottom-line>, pristupljeno 15. 3. 2020.
- NCBI 2014. Antimicrobial Activity of Pantothenol against Staphylococci Possessing a Prokaryotic Type II Pantothenate Kinase <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4103530/>, pristupljeno 21. 3. 2020.
- Koronavirus.hr 2020. Važne upute: kako spriječiti zarazu koronavirusom? <https://www.koronavirus.hr/sto-moram-znati/o-prevceniji/vazne-upute-kako-sprjeciti-zarazu-koronavirusom/38>, pristupljeno 22. 3. 2020.
- Sciencing 2017. What is a CFU in microbiology? <https://sciencing.com/cfu-microbiology-15601.html>, pristupljeno 23. 3. 2020.
- Wilkinson M J., Cavanagh MA H. 2005. Lavander essential oil: A review. Australian Infection Control. [https://www.publish.csiro.au/hj/pdf/hj05035#:~:text=Lavender%20oil%20\(primarily%20L.\(VRE\)%20b~R.](https://www.publish.csiro.au/hj/pdf/hj05035#:~:text=Lavender%20oil%20(primarily%20L.(VRE)%20b~R.), pristupljeno 10. 11. 2020.
- Herman A i sur. 2015. Linalool Affects the Antimicrobial Efficacy of Essential Oils. NCBI. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26553262/>, pristupljeno 10. 11. 2020.
- International Business Times 2016. Why Was Antibacterial Soap Banned? How To Get Clean Without Triclosan, Triclocarban <https://www.ibtimes.com/why-was-antibacterial-soap-banned-how-get-clean-without-triclosan-triclocarban-2410867>, pristupljeno 23. 3. 2020.

UTJECAJ RAZLIČITIH VRSTA HRANE NA RAST VIJETNAMSKOG PALIČNJAKA (*Medauroidea extradentata*)

Antonio Eršegović i Filip Strmečki, 4. razred

Srednja škola Ivanec, Ivanec

Mentor: Martina Tušek

SAŽETAK

Paličnjaci su životinje koje se često uzgajaju u učionicama biologije te se u takvim uvjetima mogu hraniti različitim vrstama hrane. Istraživanjem se željelo utvrditi koja vrsta hrane najbolje utječe na porast duljine tijela i mase vijetnamskog paličnjaka, a provodilo se s ciljem određivanja optimalne vrste hrane za uzgoj. Paličnjaci su tijekom istraživanja bili podijeljeni u pet skupina ovisno o vrsti hrane kojom su hranjeni, pri čemu je u svakoj skupini bilo osam paličnjaka, svaki u zasebnom terariju. Za prehranu paličnjaka tijekom istraživanja korišteni su svježi listovi maline, kupine, ruže, kupovne salate i bršljana. Tijekom istraživanja su jednom tjedno, tijekom osam tjedana, mjerene duljina tijela (pomičnom mjerkom) i masa (analitičkom vagom). Rezultati su pokazali da listovi biljaka iz porodice Rosaceae povoljnije utječu na porast duljine tijela i mase u odnosu na listove kupovne salate te bršljana. Na porast duljine tijela najviše su utjecali listovi ruže dok su na porast mase najviše utjecali listovi maline, a zatim listovi ruže. Listovi kupovne salate su u odnosu na ostale vrste hrane uzrokovali najmanji porast duljine tijela i mase, dok je bršljan uzrokovao smanjenje duljine tijela i mase te ugibanje određenog broja paličnjaka, zbog čega je prehrana lišćem bršljana prekinuta nakon tri tjedna. Rezultati su pokazali da se duljina tijela i masa vijetnamskog paličnjaka ne moraju mijenjati istim intenzitetom pod utjecajem određene vrste hrane. Biljke čiji su se listovi pokazali najboljim izborom za prehranu paličnjaka su ruža, koja je najviše utjecala na porast duljine tijela i nešto manje na porast mase, i malina koja je najviše utjecala na porast mase. Biljka koja je uzrokovala smanjenje mase i duljine tijela te čak ugibanje paličnjaka je bio bršljan.

Ključne riječi: duljina; masa; Rosaceae; salata; bršljan

UVOD

U učionicama biologije često se zbog potreba održavanja nastave nalaze različite vrste životinja. Među tim životnjama vrlo su česti paličnjaci, kukci koji svojim izgledom podsjećaju na grančicu. Navedeni kukci prikladni su za uzgajanje u učionici posebno zbog svojeg jednostavnog načina održavanja, a njihovim promatranjem i proučavanjem učenici mogu steći znanja o temeljnim obilježjima životinja pa tako i kukaca. Neke od karakteristika kukaca koje se mogu proučavati upravo na paličnjacima su: presvlačenje, nepotpuna preobrazba, mimikrija, partenogeneza...

Vijetnamski paličnjak, *Medauroidea extradentata* Brunner von Wattenwyl, 1907 prvi je puta zabilježen u mjestu Annam u Vijetnamu po čemu je i dobio ime. U Europu je prenesen 1949. te je nakon toga postao česti predmet istraživanja u laboratorijima (Carlberg, 1987). Navedena vrsta se lako uzgaja te je u mnogim populacijama mužjak gotovo potpuno nestao ostavivši tako samo partenogenetske ženke (Boucher i Varady-Szabo, 2005). Karakteristično obilježje razmnožavanja paličnjaka je upravo partenogeneza. Partenogeneza je nespolni način razmnožavanja prilikom kojeg se neoplođena jajna stanica razvija u jedinku i time nastaju klonovi majke. Navedeni način razmnožavanja se često naziva i jednopolno razmnožavanje zbog sudjelovanja samo ženske spolne stanice. Paličnjak ima nepotpunu preobrazbu, bez stadija kukuljice te se iz jaja razvija stadij nimfe (Huten i Čuljak, 2018).



Karakteristično obilježje kukaca, pa tako i paličnjaka, je presvlačenje. Presvlačenje je proces u kojemu životinja odbacuje staru kožu i/ili kutikulu u svrhu rasta organizma. Tijekom presvlačenja, paličnjaci mogu izgubiti noge, međutim gubitak nije toliko opasan jer će navedeni gubitak najvjerojatnije nadomjestiti tijekom sljedećih nekoliko presvlačenja (Maginnis, 2009).

Veličina paličnjaka može varirati od velikih do vrlo velikih pri čemu je jedna vrsta nedavno opisana kao najveća poznata vrsta kukca dužine čak do 570 mm. Usprkos njihovoj veličini, navedeni kukci su vrlo efikasni u kamuflaži pri čemu poprimaju izgled grančice ili lista. To je ujedno i razlog zašto u nekim dijelovima svijeta do nedavno nije bio poznat veliki broj vrsta paličnjaka (Aguiar i sur., 2014). Životni vijek mu je od jedne do dvije godine, a tijekom života ima mnogo potomaka (Bradler i Buckley, 2018).

Hrana kojom se vijetnamski paličnjak hrani u divljini nije u potpunosti poznata (Carlberg, 1987), međutim u uzgoju se hrani različitim vrstama biljaka. Najčešće se hrani listovima kupine (*Rubus fruticosus agg.* L.) (Casidy, 1978), a također u prehrani koristi i listove maline (*Rubus idaeus* L.), ruže (*Rosa canina* L.), oskoruše (*Sorbus* spp. L.), jagode (*Fragaria vesca* L.), vatre nog trna (*Pyracantha coccinea* M. Roemer), hrasta (*Quercus* sp. L.), končare (*Filipendula* sp. Mill.), drijena (*Cornus* sp. L.) i crvenog ribiza (*Ribes rubrum* L.) (Boucher i Varady-Szabo, 2005). Vijetnamski paličnjak najčešće koristi bršljan (*Hedera helix* L.) kao biljku penjačicu i rjeđe ga jede (Vrabec, 2010) dok lišće navedene biljke za hranu najčešće koristi indijski paličnjak, *Carausius morosus* Sinéty, 1901 koji se također može naći u uzgoju. Vijetnamski paličnjak u uzgoju se može hraniti i zelenom salatom (*Lactuca sativa* L.) (Olive i sur., 2016) što je osobito korisno za prehranu zimi kada je količina hrane ograničena. Boucher i Varady-Szabo (2005) govore da održavanje potrebne količine hrane za prehranu paličnjaka tijekom zimskih mjeseci može izazvati probleme u uzgoju te su stoga provedena određena istraživanja koja su nastojala razriješiti problem kako uspješno nabaviti najprikladniju vrstu hrane za prehranu paličnjaka zimi. Boucher i Varady-Szabo (2005) u svojem radu iznose kako su paličnjaci koji su jeli organski uzgojenu salatu narasli više od paličnjaka koji su jeli salatu kupljenu u lokalnoj trgovini koja nije bila ekološki uzgojena. Određeni broj paličnjaka, koji su jeli salatu kupljenu u maloprodaji, je uginuo, a onima koji su opstali je stopa rasta bila niža u odnosu na one hranjene salatom iz ekološkog uzgoja (Boucher i Varady-Szabo, 2005). Svježi listovi ruže su također jedna opcija prehrane za paličnjake, međutim vrsta hrane koju će paličnjak preferirati ovisi o vrsti paličnjaka. Paličnjaci koji se hrane lišćem kupine najčešće će kao hranu moći koristiti i listove ruže, međutim to se odnosi na listove koji su ubrani u prirodi dok listovi kupljeni u trgovini najčešće nisu prikladni zbog tretiranja različitim insekticidima. Listovi ruže su dobar izbor prehrane za paličnjake zbog izvora potrebnih hranjivih tvari, ali i obrane od predavatora u divljini (trnovi) (Carter, 2019).

Općenito kukcima, pa tako i vijetnamskom paličnjaku, povećava se masa tijekom njihovog rasta (Hoh, 2002). Kukci koji se u uzgoju razvijaju u skupini često su manji od onih koji se uzbajaju u izolaciji, a osim na veličinu, uvjeti uzgoja utječu i na masu. Razlika u masi kukaca je uočljivija kod kukaca koji se uzbajaju u skupini u odnosu na one koji se uzbajaju u izolaciji te je masa kukaca u izolaciji obično veća. Masa kukaca osobito je određena vrstom hrane kojom se kukac hrani. Tijekom vremenskog razdoblja u kojem kukac ne dobiva hranu najčešće dolazi do gubitka mase zbog smanjenja udjela vode i disanja dok se nakon hranjenja masa povećava (Chapman, 1998).

Cilj ovog istraživanja je ispitati utjecaj različitih vrsta hrane (svježeg lišća) na povećanje duljine tijela i mase vijetnamskog paličnjaka radi otkrivanja najbolje hrane za uzgoj u učionicama biologije. Najbolja



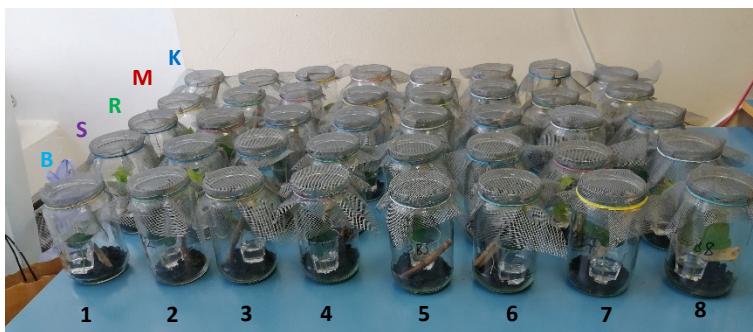
vrsta hrane želi se otkriti zbog ugibanja paličnjaka tijekom prethodne godine uslijed nedostatka hrane zimi, zbog čega su vijetnamski paličnjaci bili hranjeni salatom kupljenom u lokalnoj trgovini.

Pretpostavka je da će različite vrste hrane imati različiti utjecaj na povećanje duljine tijela i mase paličnjaka ovisno o njihovom različitom afinitetu prema određenim vrstama hrane. Prema podacima iz literature pretpostavlja se da će paličnjaci imati najveći afinitet prema kupini, što će se očitovati u najvećem porastu duljine tijela i mase, a manji prema ostalim biljkama iz iste porodice Rosaceae (malina i ruža). Također, pretpostavlja se da će prehrana lišćem bršljana i kupovne salate manje utjecati na porast duljine tijela i mase u odnosu na biljke iz porodice Rosaceae pri čemu bi bršljan trebao uzrokovati veći porast u odnosu na salatu. Kupovna salata je prema podacima iz literature negativno utjecala na porast duljine tijela i uzrokovala ugibanje paličnjaka. Obzirom na negativna iskustva u hranjenju paličnjaka kupovnom salatom, u slučaju njihovog ugibanja postupak će se prekinuti iz etičkih razloga. Također, pretpostavlja se da će broj presvučenih paličnjaka u skupini biti povezan s većim porastom duljine tijela.

METODE

Za istraživanje je odabran vijetnamski paličnjak, *Medauroidea extradentata* Brunner von Wattenwyl, 1907. Na početku istraživanja iz zajedničkog terarija s paličnjacima izdvojeni su mladunci, stadij nimfe približno iste starosti i veličine. Svaka jedinka smještena je u vlastiti terarij.

Terariji su razvrstani u pet skupina ovisno o hrani koja im je bila dostupna: u prvoj skupini nalazilo se svježe lišće kupine (oznaka K), u drugoj skupini nalazila se malina (oznaka M), u trećoj ruža (oznaka R), u četvrtoj salata (oznaka S) i u petoj bršljan (oznaka B). U svakoj skupini nalazilo se osam terarija s po jednim paličnjakom u svakom terariju (slika 1).



Slika 1 Terariji s paličnjacima po skupinama

Svi terariji su bili izloženi istim uvjetima i razlikovali se jedino po vrsti biljne hrane koja je stavljena u njih. Terarij je činila staklenka za zimnicu dovoljne veličine za neometan rast paličnjaka volumena 720 mL. Na dnu se nalazio sloj zemlje za cvijeće, a biljna hrana se nalazila u plastičnoj čaši u koju je stavljeno 20 mL vode pri čemu je svaki tjedan paličnjacima promijenjena voda. Svaki terarij je imao i grančicu, koja je omogućavala penjanje u više dijelove terarija i lakši dolazak do hrane. Vrh terarija bio je pokriven metalnom mrežicom koja je služila kao poklopac i istovremeno omogućavala prolazak zraka kroz terarij (slika 2).



Slika 2 Izgled svakog terarija za vrijeme istraživanja

Prije nego su stavljeni u terarije, paličnjacima je izmjerena duljina tijela pomoću digitalne pomicne mjerke Mitutoyo SR44 od dijela glave na kojem su prihvaćena ticala do kraja zatka kao što je prikazano na slici 3. Osim što je izmjerena duljina tijela, izmjerena je i masa pomoću analitičke vase KERN & SOHN GmbH (tip: ALS 120-4), što prikazuje slika 4. U razdoblju od osam tjedana ponavljan je isti postupak u svrhu prikupljanja rezultata promjene duljine i mase tijela paličnjaka.



Slika 3 Mjerenje duljine tijela paličnjaka



Slika 4 Mjerenje mase tijela paličnjaka

Terarij se održavao na način da su se paličnjacima svaki tjedan u plastичne čaše stavljavali svježi listovi biljaka mase 5 grama te se pritom voda u čaši zamijenila svježom. Paličnjaci piju kapljice vode sa stakla terarija te je stoga terarij bilo potrebno svakodnevno prskati približno istom količinom vode pomoću boce štrcaljke. Korištena je kupovna voda Jana s ciljem kontroliranja sastava vode kojom se terariji svakodnevno prskaju, a navedenim postupkom osiguravala se vlažnost zraka koja je potrebna za optimalni razvoj. Temperatura u prostoriji u kojoj su smješteni terariji je bila stalna i iznosila oko 25°C. Svježi listovi kupine, maline, ruže i bršljana sakupljeni su u prirodi, a salata (endivija) je kupljena u trgovini Trgocentar d.o.o. Hrana kojom su paličnjaci hranjeni odgovarala je hrani koja im je bila dostupna i ranije, osim ruže i bršljana koji su uvedeni zbog otkrivanja optimalne vrste hrane.

Tijekom istraživanja praćeno je i povremeno presvlačenje paličnjaka. Slika 5 prikazuje odbačeni egzoskelet nakon presvlačenja.

Prikupljeni podaci obrađeni su u programu Microsoft Excel modelom linearne regresije pri čemu su rezultati analizirani na temelju jednadžbi pravaca $y = ax + b$. Utjecaj vrste hrane na duljinu tijela i



masu paličnjaka kroz osam tjedana je analiziran na temelju koeficijenta smjera pravca (a) koji može biti pozitivan (>0), što označava povećanje duljine tijela i mase, ili negativan (<0) što označava smanjenje. Odsječak na osi y (b) nema statističku značajnu važnost i prilikom interpretiranja rezultata nije uvažavan. Uz svaku jednadžbu pravca je navedena vrijednost R^2 koja daje informaciju opisuje li dobivena krivulja s dovoljnom točnosti dobivene podatke. Što je vrijednost R^2 bliže 1, dobivena krivulja s većom točnosti opisuje odnos dviju veličina (X i Y) (Matejaš i Matejaš, 2016).



Slika 5 Paličnjakov egzoskelet na stjenci staklenke nakon presvlačenja

Rezultati su prikazani i geometrijskim sredinama verižnih indeksa. Geometrijska sredina označava n -ti korijen nekog skupa i prikladna je za multiplikativna svojstva (kod kojih su množenje i dijeljenje glavne operacije među vrijednostima obilježja). Jedan od osnovnih ciljeva analize vremenskih nizova je utvrditi dinamiku kojom se pojava mijenja kroz vrijeme. Verižni indeksi su pokazatelji dinamike vremenskog niza ili promatrane pojave (Matejaš i Matejaš, 2016).

Formule geometrijske sredine i verižnih indeksa :

$$V_t = \frac{x_t}{x_{t-1}} \quad (\text{verižni indeks})$$

$$G = \sqrt[n]{x_1 \cdot x_2 \cdot \dots \cdot x_n} \quad (\text{geometrijska sredina})$$

Cjelokupni plan istraživanja prikazan je shemom u tablici 1.

Tablica 1 Plan istraživanja

LISTOPAD/STUDENI 2019.

- formiranje problema
- definiranje ciljeva istraživanja
- postavljanje istraživačkog pitanja i hipoteze
- pronalazak odgovarajuće literature

STUDENI/PROSINAC 2019.

- postavljanje eksperimenta (terarija)
- svakodnevno održavanje terarija
- periodično svaki tjedan mjerjenje duljine i mase paličnjaka

SIJEČANJ/VELJAČA 2020.

- statistička obrada rezultata
- usporedba dobivenih rezultata s prije provedenim istraživanjima
- potvrđivanje/odbijanje hipoteze
- donošenje zaključaka

OŽUJAK - SVIBANJ 2020.

- predstavljanje rezultata široj zajednici zainteresiranih mladih biologa i stručnjaka

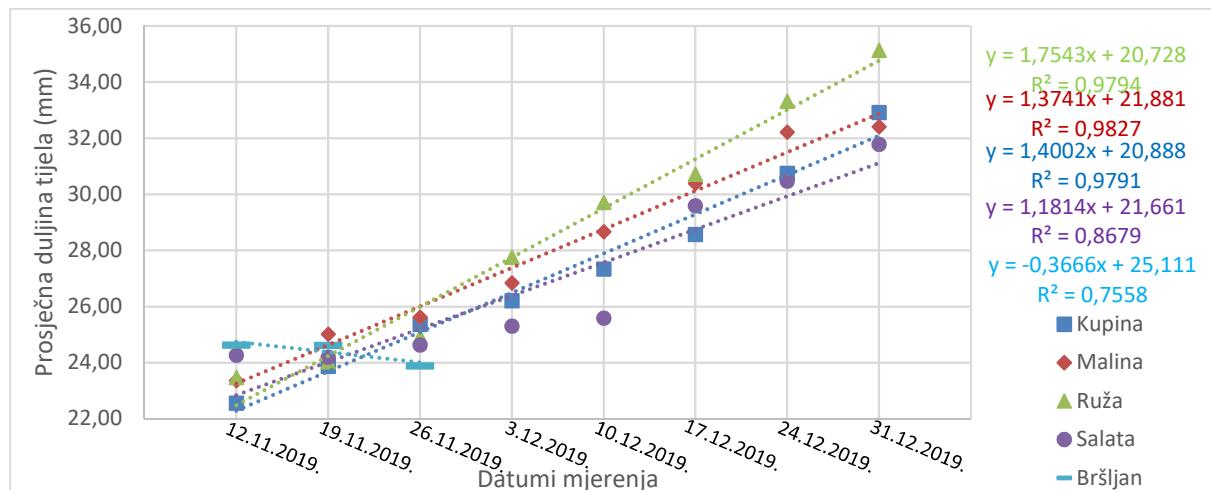


REZULTATI

Rezultati su izneseni prema redoslijedu navedenom u metodologiji, a prikazani su grafovima funkcija dobivenih modelom linearne regresije, tablicom koeficijenta smjera pravca i stupčastim dijagramima koji prikazuju verižne indekse za pojedinu vrstu hrane.

Mjerenje duljine tijela

Slika 6 prikazuje prosječnu duljinu tijela paličnjaka za svaku od pet skupina, ovisno o vrsti hrane, tijekom mjerjenja od osam tjedana. Najveći porast duljine tijela može se uočiti u skupini u kojoj su paličnjaci hranjeni ružom, iza čega slijede kupina, malina, salata i na kraju bršljan pod utjecajem kojega su paličnjaci počeli ugibati. Mjerenja u skupini u kojoj su vijetnamski paličnjaci hranjeni bršljanom su prekinuta nakon tri tjedna. Prema slici 6 pravac porasta prosječne duljine tijela pod utjecajem prehrane malinom položen je iznad pravca koji prikazuje porast prosječne duljine tijela pod utjecajem kupine, međutim koeficijent smjera pravca nam pokazuje da se duljina tijela paličnjaka ipak povećava više pod utjecajem kupine u odnosu na malinu na što nam ukazuje tablica 1.



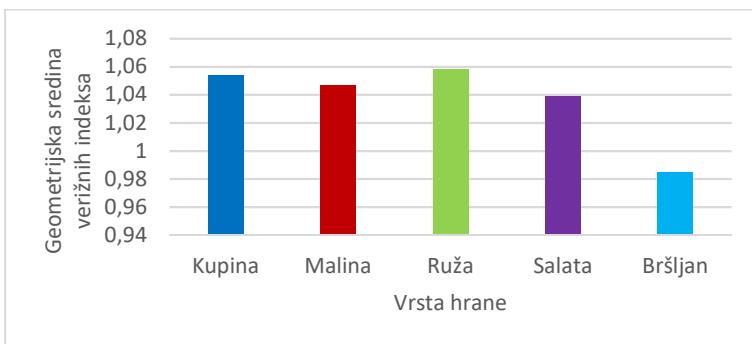
Slika 6 Prosječna duljina tijela paličnjaka ovisno o vrsti hrane

Tablica 2 prikazuje da je nagib pravca pod utjecajem prehrane kupinom veći u odnosu na nagib pravca pod utjecajem prehrane malinom. Najmanji i negativan koeficijent smjera imaju paličnjaci koji su se hranili bršljanom (-0,3666) što pokazuje da su postigli smanjenje veličine.

Tablica 2 Koeficijenti nagiba pravaca promjene veličine tijela ovisno o različitoj vrsti hrane

vrsata hrane	kupina	malina	ruža	salata	bršljan
koeficijent nagiba pravca	1,4002	1,3741	1,7543	1,1814	-0,3666

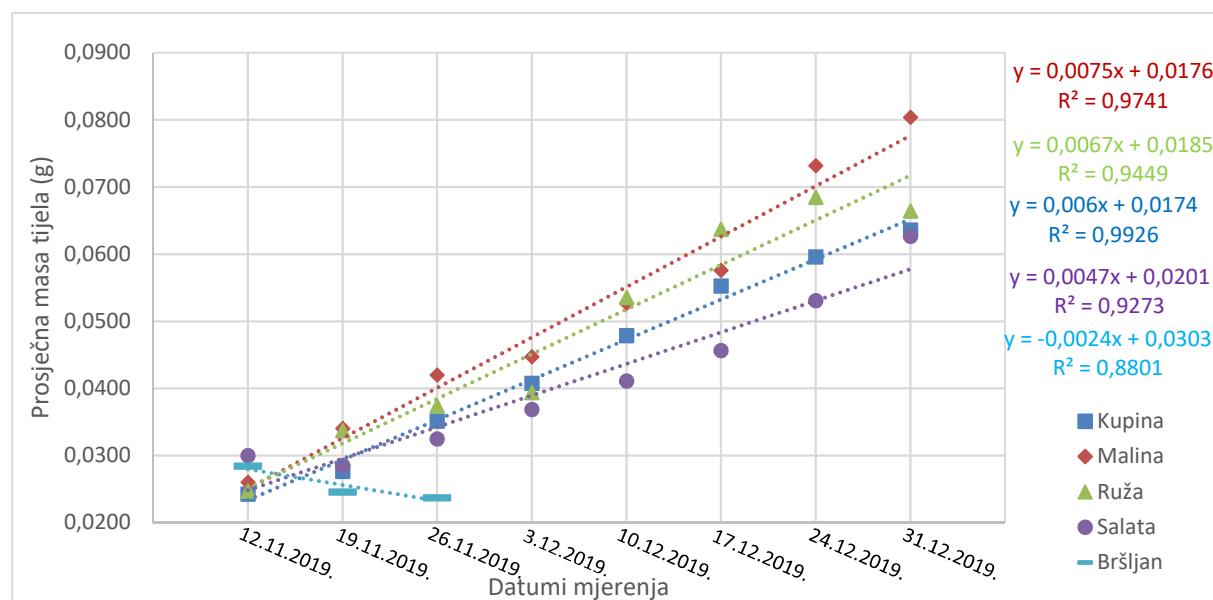
Slika 7 prikazuje geometrijske sredine verižnih indeksa promjene duljine tijela za pojedine vrste hrane. Rezultati pokazuju da su verižni indeksi kod prehrane ružom, kupinom, malinom i salatom veći od 1 što pokazuje povećanje duljine tijela u odnosu na početak mjerjenja dok paličnjaci koji su se hranili bršljanom imaju geometrijsku sredinu verižnih indeksa manju od 1 što znači da su postigli smanjenje duljine tijela u odnosu na početno mjerjenje. Najveći verižni indeks nalazimo kod paličnjaka hranjenih ružom (1,0585), nakon čega slijedi kupina (1,0542), malina (1,0470), salata (1,0391) te na kraju bršljan (0,9849) što je direktno povezano s porastom duljine tijela paličnjaka.



Slika 7 Geometrijske sredine verižnih indeksa promjene duljine tijela za različite vrste hrane

Mjerenje mase

Slika 8 prikazuje rezultate dobivene mjerenjem mase vijetnamskog paličnjaka u obliku aritmetičke sredine mase kroz osam tjedana za pet skupina hrane. Rezultati ukazuju da se masa paličnjaka najviše povećala uslijed prehrane malinom, nakon čega slijede ruža i kupina. Najmanji utjecaj na porast mase paličnjaka imala je salata dok je bršljan uzrokovao smanjenje mase tijela. Navedeni rezultati vidljivi su na temelju funkcije dobivene modelom linearne regresije prikazane u obliku jednadžbe (slika 8) koja je najbolje opisana koeficijentom nagiba pravca (tablica 2).



Slika 8 Prosječna masa tijela paličnjaka ovisno o vrsti hrane

Tablica 3 prikazuje koeficijente nagiba pravaca dobivenih prikazom promjene mase pri čemu veći nagib pravca ukazuje na brži rast mase.

Tablica 3 Koeficijenti nagiba pravaca promjene mase tijela ovisno o različitoj vrsti hrane

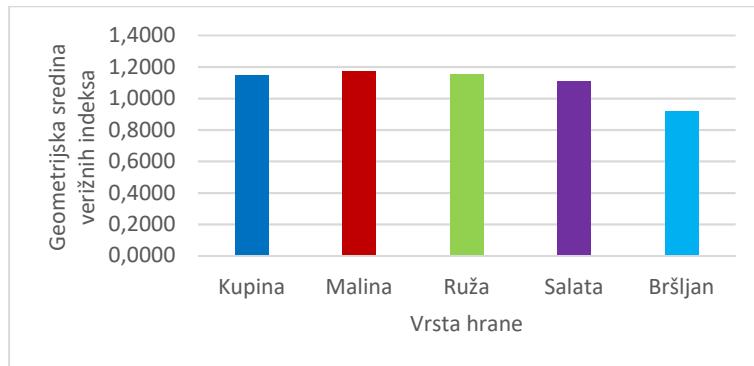
vrsta hrane	kupina	malina	ruža	salata	bršljan
koeficijent nagiba pravca	0,0060	0,0075	0,0067	0,0047	-0,0024

Slika 9 prikazuje geometrijske sredine verižnih indeksa promjene mase izračunate za pet vrsta hrane. Geometrijske sredine verižnih indeksa mase su veće od 1 za malinu, ružu, kupinu i salatu te pokazuju povećanje mase u odnosu na početak mjerenja dok su geometrijske sredine verižnih indeksa lišća



bršljana manje od 1 što ukazuje na smanjenje mase. Najveći verižni indeks promjene mase nalazimo kod paličnjaka hranjenih malinom (1,1701), nakon čega slijedi ruža (1,1538), kupina (1,1435), salata (1,1100) te na kraju bršljan (0,9159).

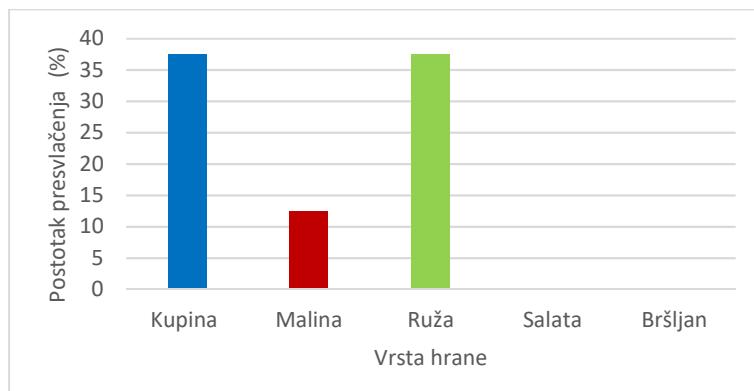
Mjerenje mase je također prekinuto za skupinu paličnjaka hranjenih bršljanom zbog ugibanja životinja.



Slika 9 Geometrijske sredine verižnih indeksa mase za različite vrste hrane

Presvlačenje paličnjaka

Nakon provedenog istraživanja izračunat je postotak presvlačenja paličnjaka u pojedinoj skupini. Slika 10 prikazuje da je u skupinama paličnjaka koji su se hranili lišćem ruže i kupine bio najveći broj presvučenih paličnjaka. U skupini koja se hranila lišćem maline bio je manji postotak presvučenih paličnjaka, dok u skupinama koje su se hranile lišćem kupovne salate i bršljana nije bilo presvlačenja.



Slika 10 Postotak presvlačenja paličnjaka ovisno o vrsti hrane

RASPRAVA

U ovom istraživanju ispitivan je utjecaj različitih vrsta hrane na duljinu tijela i masu vijetnamskog paličnjaka. Različite vrste hrane su različito utjecale na promjenu duljine tijela i mase vijetnamskog paličnjaka.

Rezultati mjerenja duljine tijela su pokazali da su na porast duljine tijela najviše utjecale biljke iz porodice Rosaceae ovim redom: listovi ruže, zatim listovi kupine i na kraju listovi maline. Manje su na porast duljine tijela utjecali listovi kupovne salate, a smanjenje duljine tijela su uzrokovali listovi bršljana. Navedeni rezultati su u skladu s tvrdnjama Boucher i Varady-Szabo (2005), koji navode da vijetnamskom paličnjaku najviše odgovara lišće biljaka iz porodice Rosaceae. Ruža je dobar izbor hrane za vijetnamskog paličnjaka zbog brojnih hranjivih tvari potrebnih za rast koje se nalaze u lišću. Osim



toga, vijetnamske paličnjake je najbolje hraniti lišćem ruže ubrane u divljini budući da su komercijalno uzgojene često prskane pesticidima (Carter, 2019). Listovi ruže kojima su hranjeni paličnjaci bili su sakupljeni uz put u ruralnom području. Kupina je, uz ružu, vrlo povoljno utjecala na porast duljine tijela paličnjaka. Naime, kupina, za razliku od drugih vrsta biljaka iz navedene porodice, ne stvara tako veliku količinu tanina koji imaju insekticidno djelovanje. Kupina je djelomično zaštićena od kukaca trnovima pa količina tanina u listovima ne mora biti toliko visoka kao kod srodnih vrsta (Tamayo Lorenzo, 2007). Navedeno se može primijeniti i na ružu koja također ima trnove, a koja je najviše utjecala na porast duljine tijela. Ruža i kupina prema tome imaju slabije insekticidno djelovanje. Zanimljivo je da je malina s obzirom na utjecaj na porast duljine tijela vijetnamskog paličnjaka iza ruže i kupine dok je na porast mase najviše utjecala.

Slično istraživanje ispitivanja utjecaja različite vrste hrane na dugovječnost, rast, polaganje jajašaca i preživljavanje vijetnamskog paličnjaka proveli su Boucher i Varady-Szabo (2005) pri čemu su, uz špinat, mrkvu i hrast, ispitivali utjecaj salate iz maloprodaje. Njihovi rezultati se djelomično poklapaju s rezultatima ovog istraživanja u smislu da su tijekom njihovog istraživanja vijetnamski paličnjaci kojima je bila dostupna salata iz maloprodaje počeli ugibati. Navedeno su objasnili činjenicom da je salata iz maloprodaje vjerojatno bila tretirana insekticidima (Boucher i Varady-Szabo, 2005). U ovom istraživanju vijetnamski paličnjaci nisu ugibali pod utjecajem prehrane kupovnom salatom, međutim pokazali su manji porast duljine tijela u odnosu na biljke iz porodice Rosaceae što se djelomično podudara s provedenim istraživanjem od Boucher i Varady-Szabo (2005).

Smanjenje duljine tijela i mase kod vijetnamskog paličnjaka je uzrokovala prehrana bršljanom. Istraživanja prehane bršljanom nisu provedena kod vijetnamskog paličnjaka pa rezultati prehrane bršljanom nisu mogli biti uspoređeni s drugim rezultatima. Navedena vrsta hrane je glavni izbor za indijskog paličnjaka koji se uglavnom hrani upravo bršljanom (Olive i sur., 2016). Različite vrste paličnjaka različito reagiraju na pojedine vrste hrane (Carter, 2019). U sastavu lišća bršljana nalazi se vrsta insekticida naziva falkarinol koji djeluje protiv mikroorganizama i različitih vrsta kukaca (Nirmal Sinha i sur., 2011) tako da se navedeni rezultat može objasniti štetnim utjecajem sastojaka lišća bršljana na vijetnamskog paličnjaka.

Dobiveni rezultati mjerenja mase za prehranu lišćem biljaka iz porodice Rosaceae i kupovnom salatom su u skladu s tvrdnjama Chapman (1998) koji navodi da se masa nakon hranjenja kukaca povećava. Utjecaj različitih vrsta hrane na porast mase kod vijetnamskog paličnjaka nije u potpunosti u korelaciji s rezultatima dobivenim mjerenjem porasta duljine tijela. Prilikom mjerenja mase, najveći porast je uzrokovala prehrana malinom, iza čega je uslijedila ruža. Navedeni rezultati mogu se objasniti sličnim hranjivim sastojcima u lišću maline i ruže pa paličnjaci koji preferiraju ružu, često jedu i malinu (Carter, 2019). Najmanji porast mase tijela vijetnamskog paličnjaka iz porodice Rosaceae je uzrokovala kupina.

Obzirom da rezultati mjerenja mase i duljine tijela nisu u potpunosti u korelaciji, dobiveni rezultati su u skladu s podacima koje navodi Aleksander (2015) koji objašnjava da masa i duljina tijela ne moraju rasti istim intenzitetom.

Rezultati praćenja presvlačenja su u skladu s rezultatima mjerenja duljine tijela vijetnamskog paličnjaka pri čemu je najveći postotak presvlačenja izračunat za ružu i kupinu dok je kod maline taj postotak manji. Kod paličnjaka hranjenih lišćem kupovne salate i bršljana nije uočen proces presvlačenja.



Navedeni rezultati su u skladu s rezultatima istraživanja Wadsworth i sur. (2014) koji su uočili da se pri svakom presvlačenju duljina tijela indijskog paličnjaka povećala.

Navedena pretpostavka utjecaja različitih vrsta hrane na porast duljine tijela i mase paličnjaka djelomično je potvrđena. Različite vrste hrane imaju različit utjecaj na porast duljine tijela i mase paličnjaka, no na porast duljine tijela najviše je utjecalo lišće ruže, dok je na porast mase najviše utjecalo lišće maline što nije u skladu s pretpostavkom da će na oboje najveći utjecaj imati lišće kupine. Biljke iz porodice Rosaceae pozitivnije su utjecale na porast duljine tijela i mase u odnosu na kupovnu salatu i bršljan što je u skladu s našim očekivanjem. Za razliku od očekivanja kako će bršljan moći poslužiti kao hrana paličnjacima, on je uzrokovao smanjenje njihove duljine tijela i mase.

ZAKLJUČCI

Provedeno istraživanje omogućilo je donošenje slijedećih zaključaka:

- ➊ Različite vrste hrane imaju različit utjecaj na porast duljine i mase tijela vijetnamskog paličnjaka.
- ➋ Biljke iz porodice Rosaceae uzrokuju veći porast duljine tijela i mase vijetnamskog paličnjaka u odnosu na kupovnu salatu i bršljan.
- ➌ Ruža najpovoljnije utječe na porast duljine tijela vijetnamskog paličnjaka.
- ➍ Malina najpovoljnije utječe na porast mase tijela vijetnamskog paličnjaka.
- ➎ Kupovna salata pozitivno utječe na porast duljine i mase tijela vijetnamskog paličnjaka, ali znatno manje od biljaka iz porodice Rosaceae.
- ➏ Bršljan se ne može koristiti kao hrana za vijetnamskog paličnjaka jer uzrokuje smanjenje mase i duljine tijela te dovodi do ugibanja paličnjaka
- ➐ Najbolja hrana za vijetnamskog paličnjaka je svježe lišće ruže i maline zbog najvećeg utjecaja na porast duljine odnosno mase tijela.
- ➑ Porast duljine tijela je povezan s učestalošću presvlačenja kukaca.
- ➒ Duljina i masa tijela vijetnamskog paličnjaka ne mijenjaju se ravnomerno.

LITERATURA

- Aguilar A. M. F., Aguin Pombo D., Gonçalves Y. M. 2014. Identification, rearing, and distribution of stick insects of Madeira Island: An example of raising biodiversity awareness. *Journal of Insect Science* 14 (49).
https://www.researchgate.net/publication/261526771_Identification_Rearing_and_Distribution_of_Stick_Insects_of_Madeira_Island_An_Example_of_Raising_Biodiversity_Awareness, pristupljeno 20. 10. 2019.
- Aleksander D. E. 2015. Size matters, U On the Wing: Insects, Pterosaurs, Birds, Bats and the Evolution of Animal Flight. Oxford University Press, New York, str. 56. <https://bit.ly/2WKlrdx>, pristupljeno 10. 3. 2020.
- Boucher S., Varady-Szabo H. 2005. Effects of different diets on the survival, longevity and growth rate of the Annam stick insect, *Medauroidea extradentata* (*Phasmatodea: Phasmatidae*). *Journal of Orthoptera Research* 14(1): 115-118.
[https://doi.org/10.1665/1082-6467\(2005\)14\[115:EODDOT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1665/1082-6467(2005)14[115:EODDOT]2.0.CO;2), pristupljeno 15. 10. 2019.
- Bradler S., Buckley T. R. 2018. Biodiversity of Phasmatodea. *Insect Biodiversity: Science and Society* 2 (1).
<https://www.researchgate.net/publication/326051925>, pristupljeno 15. 10. 2019.
- Carlberg U. 1987. Culturing stick - and leaf-insects (Phasmida) – A review. *Zeitschrift Fuer Versuchstierkunde* 29: 39–63.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3303738>, pristupljeno 17. 10. 2019.
- Carter A. 2019. The A-Z of Stick Insect Care & Advice. <https://www.stick-insect-advice.com/can-stick-insects-eat-ivy/>, pristupljeno 17. 10. 2019.
- Cassidy M. D. 1978. Development of an induced food plant preference in the indian stick insect, *Carausius morosus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 24: 87-93. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1978.tb02784.x>, pristupljeno 17. 10. 2019.
- Chapman R. F. 1998. Larval development, U The insects: structure and function. Cambridge University Press, Edinburgh, str. 373.



https://books.google.hr/books?id=jHUCdbqW4MAC&printsec=frontcover&vq=weight+los&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q=weight%20los&f=false, pristupljeno 20. 10. 2019.

Hoh Y. K. 2002. Growth and development, U Longman A-Level Course in Biology, growth, development and reproduction. Pearson Education South Asia, Singapore, str. 24. <https://bit.ly/33O2ulg>, pristupljeno 17. 10. 2019.

Huten T., Čuljak D. 2018. Pojava mužjaka vijetnamskog paličnjaka, *Medauroidea extradentata* (Brunner von Wattenwyl, 1907) koji se razmnožava partenogenetom, Završni rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Biologički zavod Biološkog odsjeka, Zagreb, <http://bit.ly/2RkhHyHP>, pristupljeno 15. 10. 2019.

Maginnis T. L. 2009. Autotomy in a Stick Insect (Insecta: Phasmida): Predation Versus Molting. Florida Entomologist 91(1). [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2008\)091\[0126:AIASII\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2008)091[0126:AIASII]2.0.CO;2), pristupljeno 21. 10. 2019.

Matejaš J., Matejaš M. 2016. Statistika - izabrane teme. Priručnik za učenike. Srednja škola Ivanec, Ivanec. <https://bit.ly/2WRPT5D>, pristupljeno 15. 10. 2020.

Nirmal Sinha K., Hui Y. H., Özgül Evranuz E., Siddiq M., Ahmed J. 2011. Polyacetylenes, U Handbook of Vegetables and Vegetables Processing. Wiley-Blackwell A John Wiley & Sons, Ltd., Publication, New Delhi, str. 147. <https://bit.ly/3dyuKTV>, pristupljeno 10. 3. 2020.

Olive G., Zimmer J. Y., Olive G. 2016. *Mentha spicata* var. *spicata* (L. 1753) and *Raphanus sativus* var. *sativus* (L. 1753): survival meal for *Medauroidea extradentata* (Brunner von Wattenwyl 1907) (Phasmatodea: Phasmatidae). Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences 81 (1): 190-193. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01270314>, pristupljeno 15. 10. 2019.

Tamayo Lorenzo J. 2007. European plants used for feeding stick and leaf insects. The Phasmid Study Group. Newsletter 111. <http://bit.ly/3ajpz1c>, pristupljeno 9. 3. 2020.

Vrabec K. 2010. Projekt praćenja i udomljavanja paličnjaka. http://www.skola-hodosan.hr/projekti/2009-10/091215_Palicnjaci/100618_Palicnjaci.htm, pristupljeno 17. 10. 2019.

Wadsworth T., Carriman A., Gutierrez A. A., Moffatt C., Fuse M. 2014. Ecdysis behaviors and circadian rhythm of ecdysis in the stick insect, *Carausius morosus*. Journal of Insect Physiology 0: 68-77. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4258443/>, pristupljeno 14. 3. 2020.



MOTORIKA PALIČNJAKA U OVISNOSTI O RAZLIČITIM PODLOGAMA I SMJERU KRETANJA

Jakov Brozović i Petra Katić, 2. razred

Gimnazija Karlovac, Karlovac
Mentor: Jasminka Žiža

SAŽETAK

Ovim smo projektom istražili kako se odabrane vrste kukaca ponašaju na različitim podlogama poput kore drveta, papira, stakla, stakla premazanog biljnim uljem, stakla premazanog biljnim uljem i posutog solju te podlozi ukošenoj pod kutom od 45°. Istraživanje je provedeno na dvjema vrstama paličnjaka, vijetnamskom i madagaskarskom ružičastokrilom (*Baculum extradentatum* i *Sipyloidea sipylyus*) te unutar vrste vijetnamskog paličnjaka na oba spola, i ženkama i mužjacima. Podlogu, tj. poligon prolazila je jedna po jedna jedinka, čiji je hod i ponašanje praćeno uređajem za fotografiranje. Istovremeno je bilježen dodir nogu s podlogom ucrtavanjem točaka vodootpornim markerom. Hod je potican dodirivanjem kraja zatka. Utvrđeno je da su na ravnom, glatkom papiru najbrži hod imali mužjaci vijetnamskog paličnjaka, a najsporiji hod imale su ženke madagaskarskog ružičastokrilog paličnjaka. Iz rezultata dobivenih višestrukim ponavljanjem pokusa zaključeno je da je više čimbenika utjecalo na brzinu hoda. Analizirana je građa nogu, masa i veličina tijela te starost jedinki. Nijedna od dviju vrsta paličnjaka nije uspjela hodati po staklenim podlogama koje su bile premazane biljnim uljem ili dodatno posute solju. Paličnjaci su izbjegavali hodanje po brusnom papiru i brzo su s njega prelazili na glatku površinu papira koja se nalazila sa strane. Rezultati istraživanja pokazali su da veća masa jedinki utječe na sporiji hod, a brže i spretnije su se kretali po podlogama od prirodnih materijala (papir, drvo).

Ključne riječi: kukci; hod; brzina; ponašanje; orientacija

UVOD

U prirodi susrećemo životinje koje se uspinju ili spuštaju niz objekte savladavajući prirodne prepreke. Uspinjući se na neku uzvisinu, zbog postojanja gravitacije, njihova tijela pritišću podlogu. Živčani sustav prilagođava kretanje tijela preprekama. Kako se kukci penju i spuštaju strmim putovima? Paličnjaci mogu dati odgovor na to pitanje. Imaju tri para člankovitih nogu, ljestvičasti živčani sustav koji čine parovi ganglia povezanih poprečno i uzdužno dvostrukom živčanom vrpcom (Dallmann i Schmitz, 2019). Za proučavanje hoda kukaca pogodni su paličnjaci, zbog svoje veličine i sporog hoda. Još nije razjašnjeno kako se kukci koji koračaju prilagođavaju novonastalim okolnostima tijekom hoda.

Paličnjaci (Phasmatodea) su kukci koji se sporo kreću i veći dio života provode na drvenastoj vegetaciji (Habdija i sur., 2011). Rasprostranjeni su po cijelom svijetu, ima ih oko 2000 vrsta, no najraznolikiji su u tropima, i to posebno u indo-malajskom području (Habdija i sur., 2011). Također su rasprostranjeni i na području Hrvatske, posebice u Dalmaciji, gdje se može naći vrsta europski paličnjak (*Bacillus rosii*) (Habdija i sur., 2011). U istraživanju su proučavane dvije strane vrste paličnjaka: vijetnamski (*Baculum extradentatum*) i madagaskarski ružičastokrili paličnjak (*Sipyloidea sipylyus*) (tablica 1). Ove su vrste odabrane zbog jednostavne nabave i uzgoja.

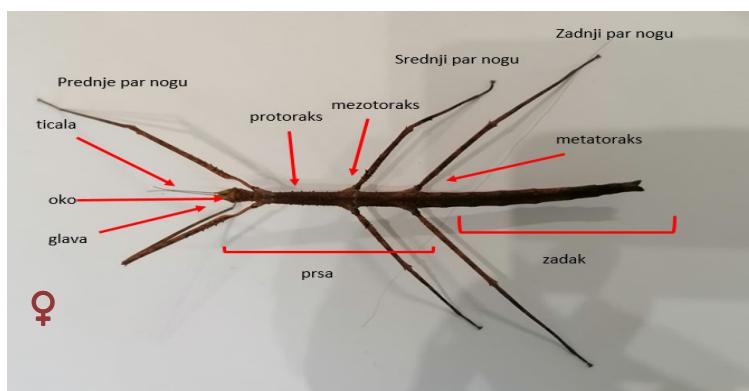
Tablica 1 Taksonomska pripadnost vijetnamskog i madagaskarskog ružičastokrilog paličnjaka

Sistematske kategorije	Vijetnamski paličnjak	Madagaskarski ružičastokrili paličnjak
Razred	Insecta	Insecta
Red	Phasmatodea	Phasmatodea
Porodica	Phasmatidae	Diapheromeridae
Rod	<i>Baculum</i>	<i>Sipyloidea</i>



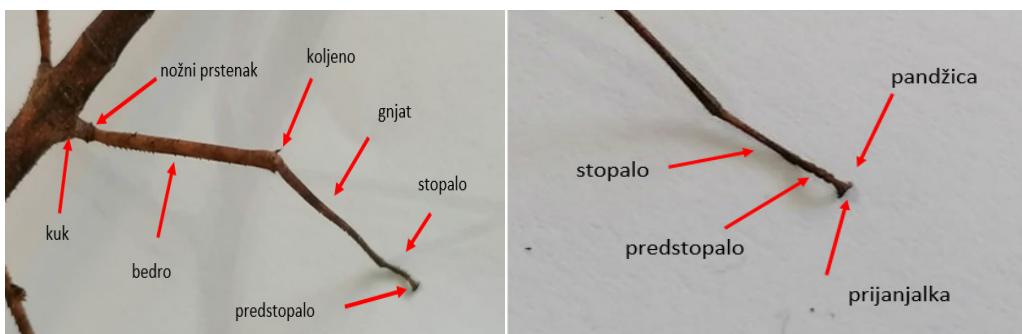
Sistematske kategorije	Vijetnamski paličnjak	Madagaskarski ružičastokrili paličnjak
Vrsta	 <i>Baculum extradentatum</i>	 <i>Sipyloidea sipylus</i>

Osnovna građa tijela svih paličnjaka je slična. Tijelo štapićastog oblika sastoji se od glave, prsa i zatka (*abdomena*) (slika 1).



Slika 1 Građa tijela vijetnamskog paličnjaka

Na površini je tijelo kukca zaštićeno višeslojnom hitinskom kutikulom koja ima funkciju egzoskeleta jer daje potporu i stalni oblik tijelu te oslonac svim mišićima tijela (Habdija i sur., 2011). Na glavi se nalaze člankovita ticala, sitnije složene oči, gornja usna i tri para člankovitih usnih organa (Habdija i sur., 2011). Usni organi paličnjaka služe za grizenje i usitnjavanje hrane. Pomoću ticala osjećaju promjenu temperature i kemijske tvari te istražuju svoje okruženje. Njihove složene oči sastavljene su od mnogo pojedinačnih očiju koje mogu vidjeti slike, kretnje i boju. Prsni kolutići međusobno se razlikuju po veličini. Prvi kolutić je najkraći, a srednji najduži. Na svakom prsnom kolutiću nalazi se jedan par člankovitih uniramnih nogu hodalica koje su podjednake veličine i morfološke građe (Habdija i sur., 2011). Noge se sastoje od šest članaka: kuk, nožni prstenak, bedro, gnjat, stopalo i predstopalo (slika 2) (Habdija i sur., 2011). Na predstopalu se nalaze dvije pandžice s prijanjalkom za hodanje po glatkim površinama (slika 2). Neke vrste paličnjaka mogu na srednjem kolutiću prsa imati krila.

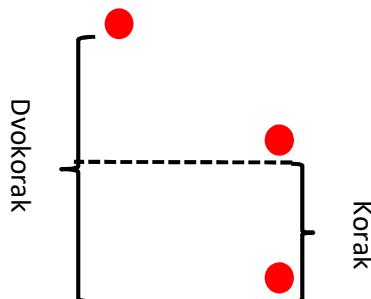


Slika 2 Građa člankovite noge hodalice vijetnamskog paličnjaka



Zadak zauzima cijelu stražnju polovicu tijela i na njemu se nalaze zadčani privjesci koji obavljaju osjetnu funkciju. Zadak (*abdomen*) sadrži probavni i reproduktivni sistem. Paličnjak diše uzdušnicama (trahejama) čiji su otvori (odušci) smješteni bočno na kolutićima prsa i zatka. Ima nepotpunu preobrazbu, iz jaja se izleže stadij nimfe (Habdija i sur., 2011). Nakon što dosegnu spolnu zrelost, stvaraju velik broj jaja, a jedino što zahtijeva pri uzgoju u terariju je visoka vлага zraka i kupinovo lišće u prehrani (Boucher i Varady-Szabo, 2005).

Razvoj poprečnoprugastih mišićnih vlakanaca udruženih u snopove koji grade skeletne mišiće jedno je od osnovnih obilježja koje kukcima omogućuje život na kopnu. Mišićna vlakanca sastoje se od kontraktilnih mezodermalnih stanica, mioblasta, koje se ujedinjuju u mnogojezgreni sincicij valjkastog (cilindričnog) oblika (Habdija i sur., 2011). S obzirom na položaj, mišići su podijeljeni u tri kategorije: uzdužne, dorzoventralne i dijagonalne. Prema funkciji koju obavljaju nožni mišići su depresori (potiskivači), levatori (podizači), abduktori (odmicači), reduktori (usporivači pokreta), fleksori (pregibači) i ekstenzori (istezači) (Habdija i sur., 2011). Oslonac mišićima je hitinski egzoskelet s mnogobrojnim unutarnjim izraslinama kojih se drže poprečnoprugasti mišići (Alegro i sur., 2014). Živčani sustav paličnjaka tijekom uspinjanja aktivira mišiće koji guraju prema naprijed, a tijekom spuštanja mišiće koji usporavaju. Ovisno o dinamici kontrakcije, mišići mogu reagirati na različite načine (Ballantyne i Rathmayer, 1981). Hod je niz ravnomjernih i naizmjeničnih koordiniranih pokreta udova i trupa s ciljem premještanja s jednog mesta na drugo u prostoru. Kod gibanja noge se ritmički pokreću dajući potporu tijelu i „pogon“ za kretanje. Na tlu se kukci pokreću uz pomoć tri para nogu čiji su pokreti tripodni i alternirajući (Habdija i sur., 2011). Kukac se tijekom hoda uvijek trima nogama oslanja na tlo (prednjom i stražnjom s desne strane i srednjom s lijeve), a preostalim trima čini pokret (prednjom i stražnjom s lijeve strane i srednjom s desne strane) (Habdija i sur., 2011). Korak je interval između dva kontakta stopala s podlogom (slika 3) (Miklić, 2017).



Slika 3 Dužina koraka i dvokoraka

Tijekom hoda vodoravnim terenom prednje noge paličnjaka imaju ulogu probijanja, srednji par nogu ima potpornu ulogu, a stražnje noge pružaju potpornu i pokretačku silu. Uloge nogu različite su kada je tijelo paličnjaka okrenuto naopačke; tada mu prednje i stražnje noge daju podršku tijelu dok srednje pružaju propulzivnu silu. Kod hodanja po okomitoj stazi sve noge pružaju potpornu i propulzivnu silu (Cruse, 1976). Obrazac kretanja prednjih nogu je najraznolikiji dok srednje noge vrše jednolične kretnje (Burns, 1972). Paličnjaci su sposobni prianjati na glatke površine poput stakla zbog prijanjalke (*arolium*) smještene na predstopalu noge (Endlein, 2010). Prijanjalka je fleksibilna, ravna kutikula obložena viskoznim tekućinama koje paličnjaku omogućuju da djeluje poput vakum čašice te omogućuje paličnjaku prijanjanje za podlogu. Kada kukac postavi nogu na površinu, prijanjalka se pasivno širi,



povećavajući površinu za prianjanje. Prianjalka zadržava kukca stabilnim na glatkim površinama, ali usporava njegovo kretanje (Endlein, 2010).

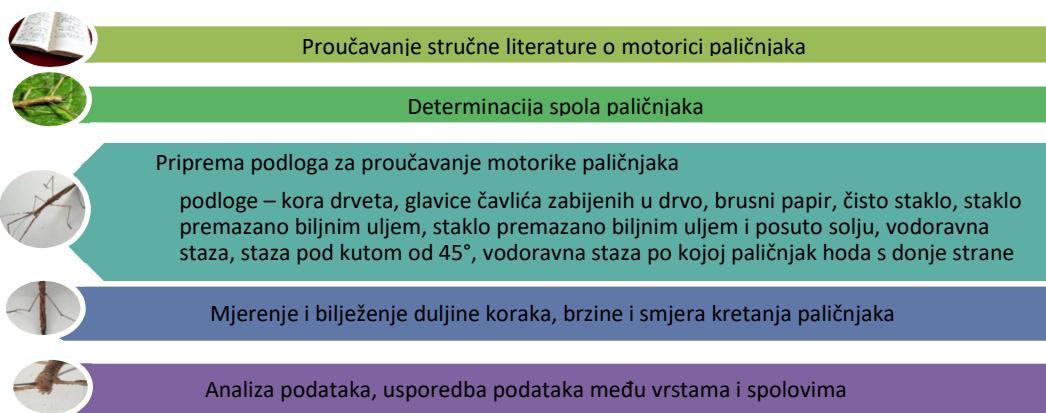
Povećanjem pritiska noge na staklenu podlogu povećava se površina prianjaljke. Kukac se može brže kretati na hrapavim podlogama koje ne zahtijevaju korištenje prianjalke. Uz prianjalku nalazi se par pandžica (*ungues*). Pandžice su bočno smještene na predstopalu pa vršno artikuliraju neravnine na podlozi prilikom kretanja. Kukci se kreću nogama na način da povećavaju kut noge prema podlozi kada je pritišće uz podlogu i smanjuju kut noge prema podlozi kada podižu nogu od podloge. (Endlein, 2010).

Cilj je istraživanja usporediti kako razlike u građi tijela vijetnamskog i madagaskarskog ružičastokrilog paličnjaka utječu na brzinu hoda i duljinu koraka. Uzakati na razlike u hodu između mužjaka i ženki ovisno o podlozi i nagibu podloge. Primarno će istraživanje biti usmjereno na proučavanju motorike kretanja paličnjaka u ovisnosti o različitim podlogama i pod utjecajem različitih vanjskih podražaja te praćenje brzine tijekom hoda. Cilj je istraživanja potvrđiti osnovni oblik nožnog kretanja čiji su pokreti najčešće tripodni i alternirajući. To znači da se kukac uvijek trima nogama oslanja na tlo (prednjom i stražnjom s desne strane i srednjom s lijeve strane), a preostalima trima čini pokret (prednjom i stražnjom nogom s lijeve strane i srednjom s desne strane) (Habdija, 2011.).

Pretpostavka je da će pri hodu na različitim podlogama mužjaci vijetnamskog paličnjaka ostvariti veću brzinu i razmak između koraka od ženki iste vrste zbog manje mase tijela i veće duljine člankovitih nogu. Uspoređujući hod ženki vijetnamskog i madagaskarskog ružičastokrilog paličnjaka, ženke druge vrste manje će se ljudjati pri kretanju i više će prianjati uz podlogu zbog krila koja su dio njihove tjelesne građe. Ženke vijetnamskog paličnjaka radit će veće korake i imati brži hod zbog manje mase u odnosu na madagaskarskog ružičastokrilog paličnjaka. Na ravnoj podlozi očekuje se stabilno kretanje i prianjanje uz podlogu dok se pri usponu na vertikalnoj podlozi očekuje nestabilan hod kod obje vrste bez obzira na spol. Hod svih vrsta paličnjaka na staklenim podlogama bit će sporiji u odnosu na kretanje na papiru i koridrveta jer prilikom hoda vakuum čašice na nogama bolje prianjavaju uz podlogu.

METODE

Istraživanje je provedeno od listopada 2019. do siječnja 2020. godine. Nakon odabira teme proučena je stručna literatura o paličnjacima te su postavljeni ciljevi i hipoteze.



Slika 4 Plan istraživanja

Jedinke paličnjaka raspoređene su u tri terarija prema vrsti i spolu. U terariju dimenzija (45 cm x 35 cm x 50 cm) nalazi se devet ženki vijetnamskog paličnjaka, dok je pet mužjaka smješteno u drugi terarij



približno istih dimenzija. Tri ženke madagaskarskog ružičastokrilog paličnjaka nalaze se u trećem terariju dimenzija (40 cm x 30 cm x 45 cm).

Madagaskarski ružičastokrili paličnjak (*Sipyloidea sipylos*) vrsta je paličnjaka koji posjeduju krila svjetlo ružičaste boje, prosječne duljine 4,5 cm (slika 5). U slučaju opasnosti koriste ih za let. Na tijelu svjetle boje nemaju nikakve izrasline. Zadak im je mekan i podsjeća na mahunu. Ženke narastu u duljinu do 10 cm i imaju krila bež boje. Nimfe nemaju krila i zelene su.

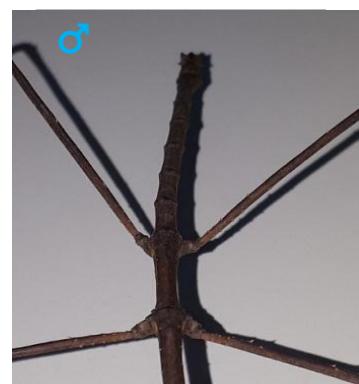


Slika 5 Ženka madagaskarskog ružičastokrilog paličnjaka

Veličina ženki vijetnamskog paličnjaka u rasponu je od 6 do 10 cm, a mužaci u rasponu od 6 do 8 cm. U zatku se nalaze snažni i vrlo čvrsti mišići koji mu služe kod pokretanja nogu. Mužaci i ženke vijetnamskog paličnjaka razlikuju se po sekundarnim spolnim karakteristikama na zatku (slika 6 i 7). U usporedbi s madagaskarskim ružičastokrilim paličnjakom, vijetnamski ne posjeduje krila.



Slika 6 Zadak ženke vijetnamskog paličnjaka

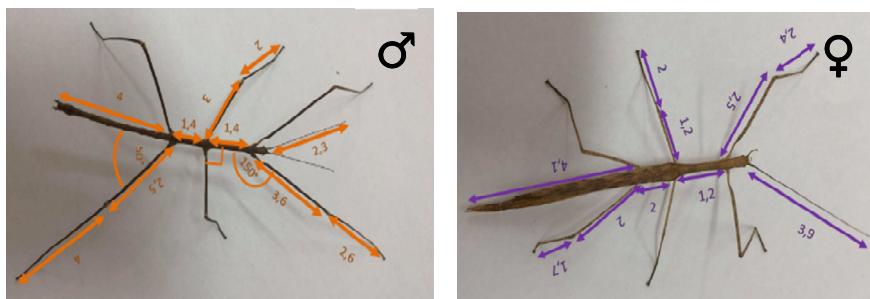


Slika 7 Zadak mužjaka vijetnamskog paličnjaka

Starost vijetnamskih paličnjaka je godinu dana, dok su ženke madagaskarskog ružičastokrilog paličnjaka stare jednu godinu i šest mjeseci. Svi su paličnjaci pogodni za istraživanje jer su u stadiju odraslih jedinki. Obilježja tijela svih jedinki paličnjaka iskazani su u tablici 2 kao prosječne vrijednosti.

Tablica 2. Izmjereni podaci paličnjaka

Prosjeci izmjerena vrijednosti/vrste	Vijetnamski paličnjak – ženka (<i>Baculum extradentatum</i>)	Vijetnamski paličnjak – mužjak (<i>Baculum extradentatum</i>)	Madagaskarski ružičastokrili paličnjak – ženka (<i>Sipyloidea sipylos</i>)
Masa [g]	1,3	0,4	0,8
Duljina tijela [cm]	11	8	10
Duljina ticala [cm]	1,3	2,3	3,9
Duljina prednje noge [cm]	7	8	5,5
Duljina srednje noge [cm]	5	5,2	3,8
Duljina zadnje noge [cm]	6,6	7	6



Slika 8 Duljina pojedinih dijelova tijela mužjaka vijetnamskog paličnjaka i madagaskarskog ružičastokrilog

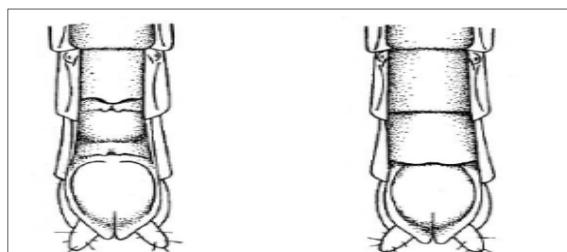
Terariji su smješteni u biološkom laboratoriju u dijelu prostorije koji nije bio izložen direktnoj Sunčevoj svjetlosti (slika 9). Fotoperioda je bila konstantna, izmjenjivala se kao u prirodnim uvjetima staništa te je bila kontrolirana umjetnim osvjetljenjem, 14 sati svjetla i 10 sati tame. Za podlogu u terariju korištena je vrtna zemlja. Unutar terarija postavljene su grančice breze, jabuke, ruže i bršljana kako bi okolina bila što sličnija prirodnom okruženju. Paličnjaci se hrane ružinim i kupinovim listovima, a listovi bršljana služe im za penjanje. Terarij se svakodnevno čisti uklanjanjem suhog lišća i izmeta. Prostorija u kojoj su terariji smješteni ima temperaturu oko 25 °C, a visoka vlažnost zraka održava se prskanjem vode svaka 24 sata.



Slika 9 Terarij s paličnjacima

Determinacija spola

Spol paličnjaka određen je na temelju morfologije zatka (*abdomena*), odnosno na temelju građe vanjskih spolnih organa. Mobilnim uređajem fotografirani su abdomeni paličnjaka (slika 6 i 7). Za određivanje spola korišten je slikovni prilog u publikaciji Wilbert (1953), (slika 10).



Slika 10 Izgled trbušne (ventralne) strane zatka ovisno o spolu; slika lijevo ženka nakon prvog presvlačenja, slika desno mužjak nakon prvog presvlačenja (preuzeto iz: Wilbert 1953).

Promatranje hoda paličnjaka

Hod paličnjaka proučavan je na devet ženki i pet mužjaka vijetnamskog paličnjaka te tri ženke madagaskarskog ružičastokrilog paličnjaka na dnevnom svjetlu i sobnoj temperaturi (22 – 25 °C).



Motorika kretanja promatrana je na tri različita poligona. Prvi je poligon staza u vodoravnom položaju, drugi je poligon ukošena staza pod kutom od 45° , a treći je poligon vodoravna staza po kojoj paličnjak hoda s donje strane. Staze su izrađene od uskih traka papira širine 30 cm i duljine od 50 cm. U drugom dijelu istraživanja praćen je hod paličnjaka po različitim podlogama: kori drveta, glavicama čavlića zabijenih u drvo, brusnom papiru, čistom staklu, staklu premazanom biljnim uljem i staklu premazanom biljnim uljem i posutom solju (slika 11). Kontrolna podloga je kora drveta jer je najsličnija prirodnom okruženju paličnjaka.



Slika 11 Neke od podloga na kojima je praćeno kretanje paličnjaka: staklo (čisto ili premazano biljnim uljem i posuto solju), brusni papir, čavlići zabijeni u komad drva

Tijekom gibanja paličnjaka štopericom na mobilnom uređaju mjerjen je interval između dva uzastopna dodira iste noge s podlogom. Dodir noge s podlogom zabilježen je točkom. Hod paličnjaka fotografiran je mobilnim uređajem. Tijekom kretanja paličnjaka bilježeno je vrijeme koje je potrebno da prijeđe stazu i točke koje je paličnjak dotaknuo nogama. Na mjestu koje je paličnjak dotaknuo nogom ucrtavane su točke pripadajuće boje. Mjesta na poligonu koja su dotaknule prednje noge označena su crvenim točkama, srednje noge zelenim točkama, a stražnje noge plavim točkama. Točke su bilježene vodootpornim markerima (slika 13). Na istraživanju motorike kretanja paličnjaka na ravnoj podlozi od papira, paličnjacima su vršci nogu bili umočeni u prehrambene boje. Vršci prednjih nogu umočeni su u crvenu prehrambenu boju, srednje u zelenu, a zadnje u plavu. Vrijeme koje je paličnjak proveo na poligonu mjereno je štopericom. Nakon što je jedna jedinka završila hod na poligonu, mjerena je duljina koraka određene noge spajanjem točaka na koje su paličnjaci položili stopalo. Isti postupak ponovljen je i za ostale jedinke. Nakon jednog sata ponovljen je pokus s istom jedinkom. Sve jedinke su poslije pokusa izvagane na digitalnoj vagi točnosti 0,1 g. Ravnalom je mjerena duljina tijela i duljina nogu. Kutomjerom su mjereni kutovi nogu i zglobova paličnjaka. Podaci iste vrste i spola zbrojeni su i podijeljeni brojem jedinki kako bi se dobila aritmetička sredina. Podatci o duljini koraka, smjeru i brzini kretanja analizirani su u programu *Microsoft Office Excel 2016*.

Na koji se način došlo do podataka prikazano je na sljedećim slikama: A) Mjerjenje mase tijela paličnjaka na digitalnoj vagi (slika 12) i B) Bilježenje koraka točkama pomoću markera (slika 13).



Slika 12 Mjerjenje mase tijela paličnjaka



Slika 13 Bilježenje koraka točkama

Sve slike izradili su autori osim slike 10.



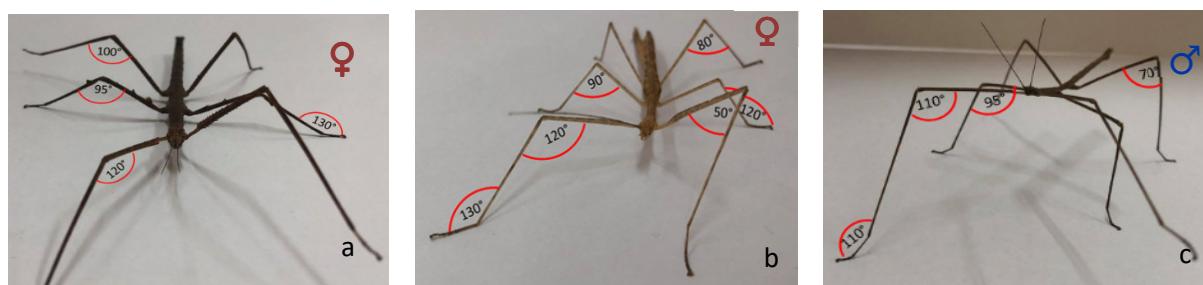
REZULTATI

Tijekom istraživanja uočena su tri karakteristična položaja tijela na vodoravnoj podlozi u ovisnosti o situaciji u kojoj se paličnjak nalazi te su označeni na slici 14 slovima A, B, C. Paličnjak se nalazi u položaju A kada je u stanju mirovanja te se u njegovu vidnom polju ne nalazi objekt u pokretu. Kada osjeti dodir na zatku postavlja se u položaj B u kojem podiže zadak. U položaju C paličnjak se nalazi kada mu se s prednje strane tijela prilazi objektom. Podizanje prsa i prednjih nogu za položaj C započinje dolaskom objekta u njegovo vidno polje na udaljenosti od 20 cm. Zabilježene su i najčešće radnje koje su potaknule paličnjaka na kretanje: dodir ticala, nogu ili nastavaka na zatku, špricanje vode i primicanje objekta s prednje strane tijela. Primijećeno je da se paličnjaci u terariju uvijek pokrenu tijekom špricanja vodom.



Slika 14 Položaji vijetnamskog paličnjaka: A – stanje mirovanja, B – podignuti zadak, C – podignuta prsa
Paličnjak se u položaj mirovanja, postavlja oslanjanjem na sva tri para člankovitih nogu (slika 15).

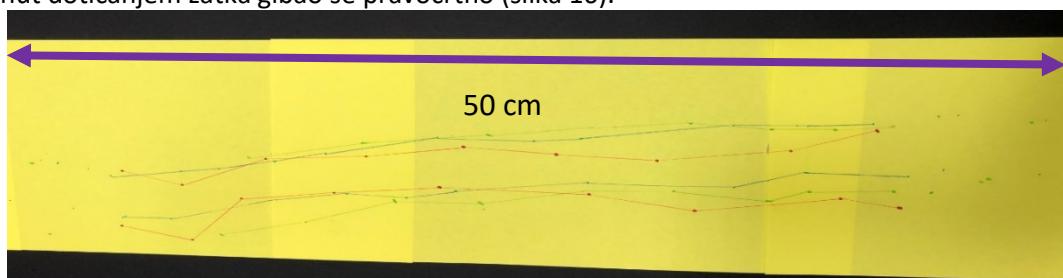
Prednje noge otvaraju se s unutarnjim kutom od 10° do 180° te kutom između bedra i gnjata od 120° . Srednje noge postavljaju se pod 90° u odnosu na prsa, a kut između bedra i gnjata je 95° . Zadnje noge postavljaju se prema stražnjoj strani tijela s obzirom na zadak od 50° , a stabilnost srednjim nogama održava se kutom zgloba od 100° . Provedeno mjerjenje objašnjava razliku između dviju vrsta s obzirom na duljinu tijela.



Slika 15 Unutarnji kutovi zglobova paličnjaka: a – ženka vijetnamskog paličnjaka, b – ženka madagaskarskog ružičastokrilog paličnjaka, c – mužjak vijetnamskog paličnjaka

Hod po ravnoj podlozi (papir)

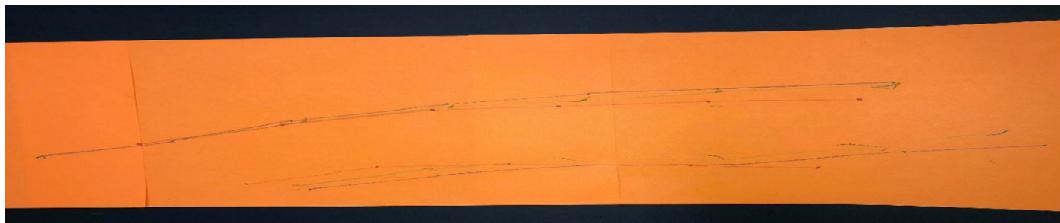
A) Madagaskarski ružičastokrili paličnjak na vodoravnoj podlozi (listu papira) duljine 50 cm. Paličnjak potaknut doticanjem zatka gibao se pravocrtno (slika 16).



Slika 16 Hod madagaskarskog ružičastokrilog paličnjaka na papiru

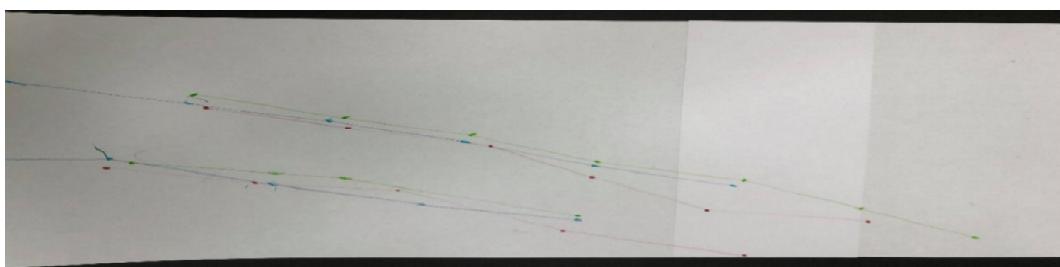


B) Ženka vijetnamskog paličnjaka na listu papira kretala sa također pravocrtno (slika 17).

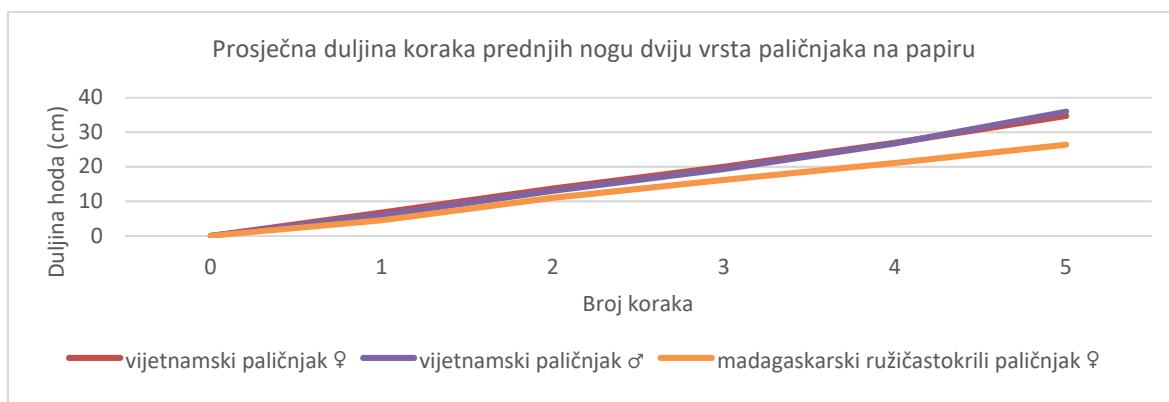


Slika 17 Hod ženke vijetnamskog paličnjaka na papiru

C) Mužjak vijetnamskog paličnjaka na listu papira kretao se isto pravocrtno (slika 18).

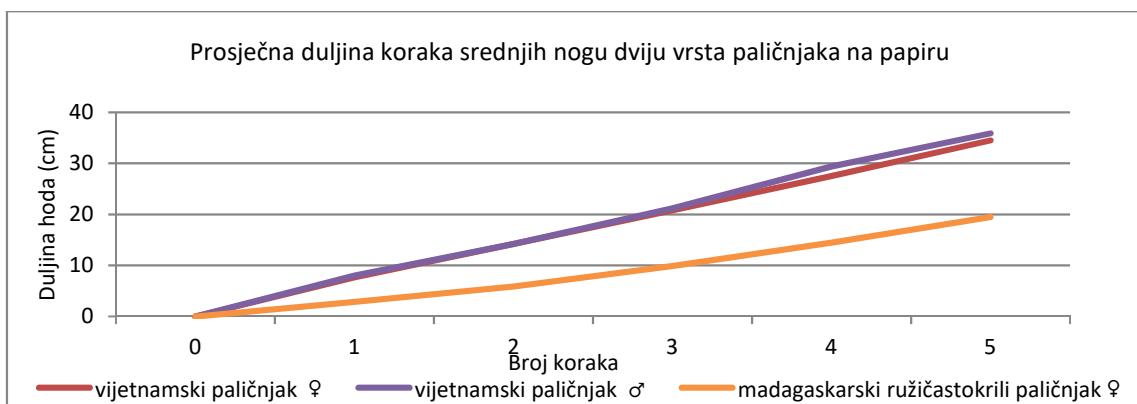


Slika 18 Hod mužjaka vijetnamskog paličnjaka na papiru



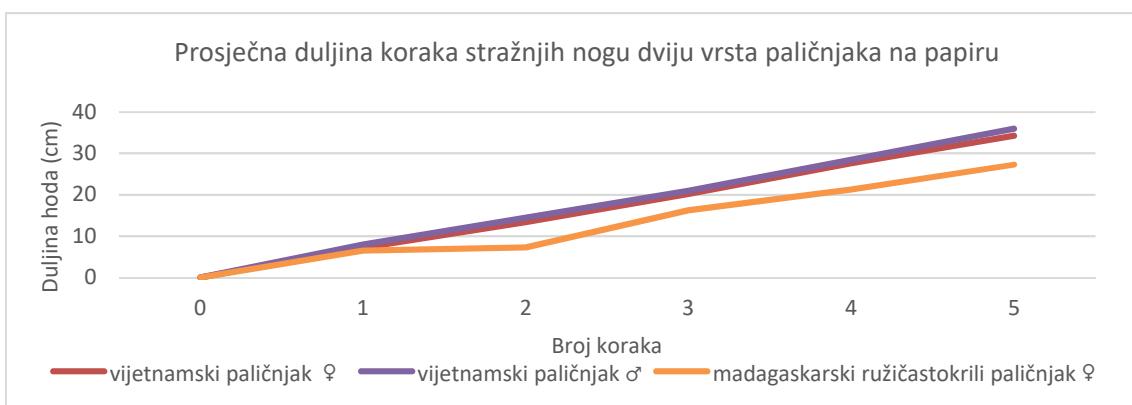
Slika 19 Prosječna duljina koraka prednjih nogu dviju vrsta paličnjaka na papiru

Prosječna duljina hoda prednjih nogu koju su odabrani paličnjaci prešli načinivši pet koraka predstavlja prosječnu duljinu hoda isezanu u centimetrima (slika 19). Najduži hod bilježi mužjak vijetnamskog paličnjaka (36 cm) te ga slijedi ženka vijetnamskog paličnjaka (34,7 cm) sa zanemarivom razlikom od 1,3 cm. Hod ženke madagaskarskog ružičastokrilog paličnjaka ima duljinu od 26,4 cm.



Slika 20 Prosječna duljina koraka srednjih nogu dviju vrsta paličnjaka na papiru

Prosječna duljina hoda srednjih nogu mužjaka vijetnamskog paličnjaka (slika 20) kao i prednjih nogu (slika 19) prednjači pred ženkom, ali i pred ženkom madagaskarskog ružičastokrilog paličnjaka. Tijekom pet koraka najkraći hod ostvarila je ženka madagaskarskog ružičastokrilog paličnjaka (19,5 cm).



Slika 21 Prosječna duljina koraka stražnjih nogu dviju vrsta paličnjaka na papiru

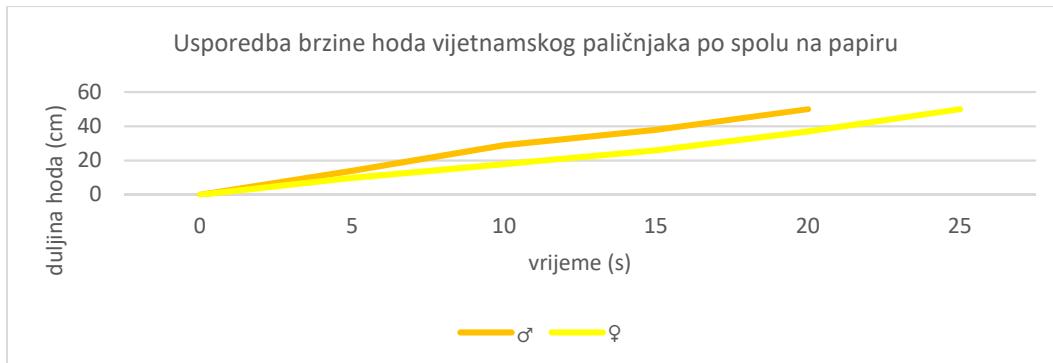
Mužjak vijetnamskog paličnjaka zadnjim nogama ostvario je najduži hod (36 cm) s obzirom na ostale jedinke (slika 21). U prosječnoj duljini hoda stražnjih nogu slijedi ga ženka vijetnamskog paličnjaka (34,3 cm), a najmanju prosječnu duljinu hoda ostvarila je ženka madagaskarskog ružičastokrilog paličnjaka (27,3 cm) kao i s prednjim (slika 19) i srednjim nogama (slika 20). Hod stražnjih nogu ženke madagaskarskog ružičastokrilog paličnjaka pokazuje prekide u hodu zbog naglih pokreta i stanki kretanja stražnjih nogu. Razlika u prosječnoj duljini hoda između mužjaka vijetnamskog paličnjaka i ženke madagaskarskog ružičastokrilog paličnjaka je 8,7 cm, a to je ujedno i najmanja razlika s obzirom na prednje i srednje noge.



Slika 22 Prosječna duljina koraka prednjih, srednjih i zadnjih nogu odabranih vrsta paličnjaka na papiru



Prosječne duljine koraka pojedinih nogu oba spola vijetnamskih paličnjaka podjednake su, dok su u ženki madagaskarskog paličnjaka one različite. (slika 22).

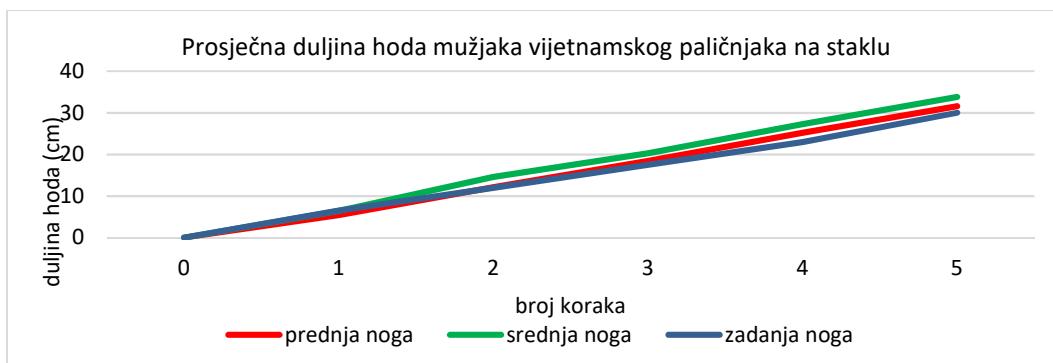


Slika 23 Usporedba brzine hoda vijetnamskog paličnjaka po spolu

Prosječna brzina hoda vijetnamskog paličnjaka mjerena je na listu papira duljine 50 cm. Mužjaci vijetnamskog paličnjaka najbrže su prošli stazu u prosječnom vremenu od 19.21 sekunde, dok je za isti put ženkama vijetnamskog paličnjaka bilo potrebno 26.10 sekundi (slika 23). Mužjaci su se od ženki razlikovali impulzivnijom kretnjom na početku jer nakon poticaja naglo počinju hodati te tijekom prvih 13 sekundi mogu postići brzinu od 3 cm/s. Nakon prijeđenih 34 cm usporavaju do potpunog zaustavljanja. Prosječna brzina hoda mužjaka na stazi od 50 cm je 2,63 cm/s. Hod ženki vijetnamskih paličnjaka ujednačeniji je s malim promjenama brzine, a njihova prosječna brzina hoda iznosila je 2,09 cm/s. Ženke madagaskarskog ružičastokrilog paličnjaka nisu uspjеле prijeći put od 50 cm ni nakon nekoliko ponavljanja te su napravile premaleni put da bi bilo moguće izračunati njihovu prosječnu brzinu.

Hod po ravnoj površini (staklo)

Hod paličnjaka na čistoj staklenoj površini ne razlikuje se od hoda po papiru. Međutim po staklu premazanom biljnim uljem paličnjaci se nisu kretali ni nakon poticaja već su se prednjim nogama pokušavali održati na staklu. Paličnjaci se nisu kretali ni po staklu posipanom solju već su nepomično stajali.

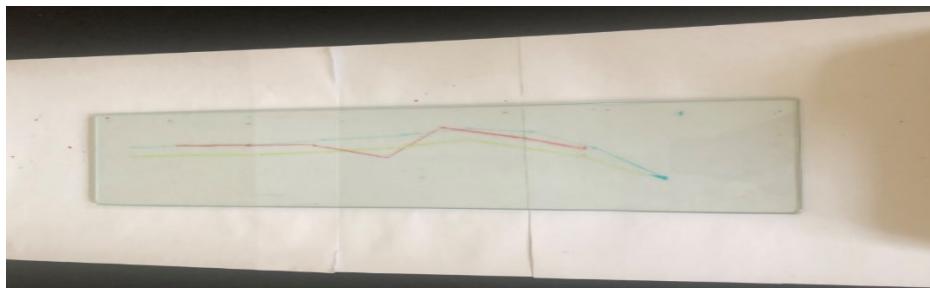


Slika 24 Prosječna duljina hoda mužjaka vijetnamskog paličnjaka na staklu

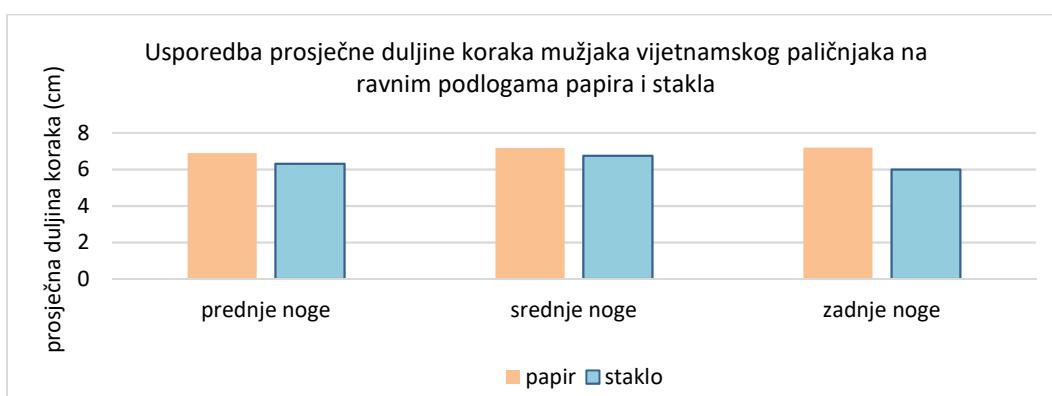
Hod paličnjaka testiran je na staklenoj podlozi ukošenoj pod kutom od 45°. Svi paličnjaci hodali su na isti način kao i po ravnoj podlozi. Kada je staklo premazano biljnim uljem i ukošeno, mužjak i ženka vijetnamskog paličnjaka nisu se kretali prema gore već su samo pružali otpor fiksiranjem zadnjih nogu.



Za razliku od vijetnamskih, madagaskarski ružičastokrili paličnjak pokušavao se održati na staklu svim nogama dok nije na kraju skliznuo sa stakla. Kada su paličnjaci stavljeni na vrh nagnutog stakla, svi su klizili prema dolje ne pokušavajući micati nogama na podlozi. Isti postupak napravljen je na staklenoj podlozi posutoj solju i rezultati su bili identični.



Slika 25 Hod paličnjaka po staklenoj podlozi



Slika 26 Usporedba prosječne duljine koraka mužjaka vijetnamskog paličnjaka na ravnim podlogama, papiru i staklu

Prosječna duljina koraka svih nogu mužjaka vijetnamskog paličnjaka na staklenoj podlozi kraća je nego na papiru (slika 26). Najdulje korake na obje podloge paličnjak je uradio sa srednjim nogama. Kod zadnjih nogu uočena je najveća razlika prosječnog koraka između navedenih podloga (1,2 cm).

Hod po ravnoj hrapavoj površini (brusni papir)

Paličnjaci stavljeni na brusni papir kao podlogu ponašali su se potpuno drugačije nego što su to činili na ravnoj glatkoj podlozi papira. Ženka vijetnamskog paličnjaka ne hoda po brusnom papiru i nakon poticaja (dodirom zatka). Prednjim nogama ispitivala je podlogu te napipavši glatku podlogu papira u blizini napravila je nekoliko koraka i prešla na papir (slika 27). Mužjak vijetnamskog paličnjaka nije poput ženke napipavao hrapavu podlogu brusnog papira, nego je odmah skrenuo na glatku podlogu papira i tamo se zadržao. Taj postupak ponovljen je više puta tijekom čega su se paličnjaci ponašali isto. Ženka ružičastokrilog madagaskarsog paličnjaka nije se kretala, ostala je stajati nepomično na brusnom papiru sve dok nije prenesena na glatku podlogu.

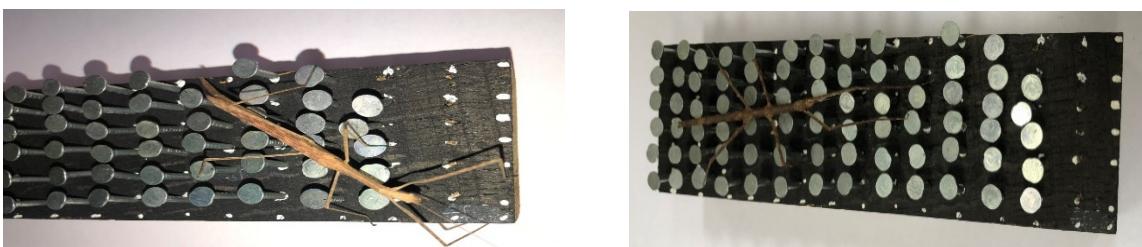


Slika 27 Hod vijetnamskih paličnjaka po hrapavoj ravnoj podlozi – brusni papir



Hod po glavicama čavlića

Sve jedinke paličnjaka prošle su kroz poligone od čavlića zabijenih u komad drveta. Vijetnamski paličnjaci nogama su birali glavice čavlića, dok je madagaskarska ružičastokrilna ženka nogama birala mjesta između čavlića (slika 28). Njegove srednje noge prilikom hoda uvijek su bile pod kutom od devedest stupnjeva i davale mu potrebnu ravnotežu, dok su prednje i stražnje noge svaki put bile pod kutom većim od devedeset stupnjeva kako bi se mogao pokretati. Na taj način uspješno je i s lakoćom prošao poligon. Ženka vijetnamskog paličnjaka nije bila toliko brza kao mužjak, ali njezin se hod nije razlikovao od njegova, bio je gotovo identičan.



Slika 28 Hod paličnjaka po čavlićima

Hod po neravnoj podlozi (kora drveta)

Sve vrste paličnjaka prohodale su po neravnoj podlozi na kori drveta (slika 29). Stazu je najbrže prošao mužjak vijetnamskog paličnjaka, a slijedila ga je ženka vijetnamskog paličnjaka. Najviše vremena za prolazak staze bilo je potrebno ženki madagaskarskog ružičastokrilog paličnjaka.



Slika 29 Hod paličnjaka po kori drveta

Hod paličnjaka po podlogama s donje strane stakla i kore od drveta

Hod paličnjaka po podlogama s donje strane bio je moguć na grančici, kori od drveta i na čistom staklu. Paličnjaci nisu hodali ni s donje strane papira, ni s donje strane stakla premazanim biljnim uljem, ni po glavicama čavlića. Kretanje s donje strane grančice ili kore drveta bilo je sporije od kretanja paličnjaka po ravnim podlogama čistog stakla ili kore drveta s gornje strane. Paličnjak se na grančici svim nogama prihvatio za grančicu pokušavajući održati ravnotežu (slika 30). Pri hodu s donje strane čistog stakla pokušavao je pronaći put do rubnog dijela stakla kako bi se popeo na gornju stranu stakla.

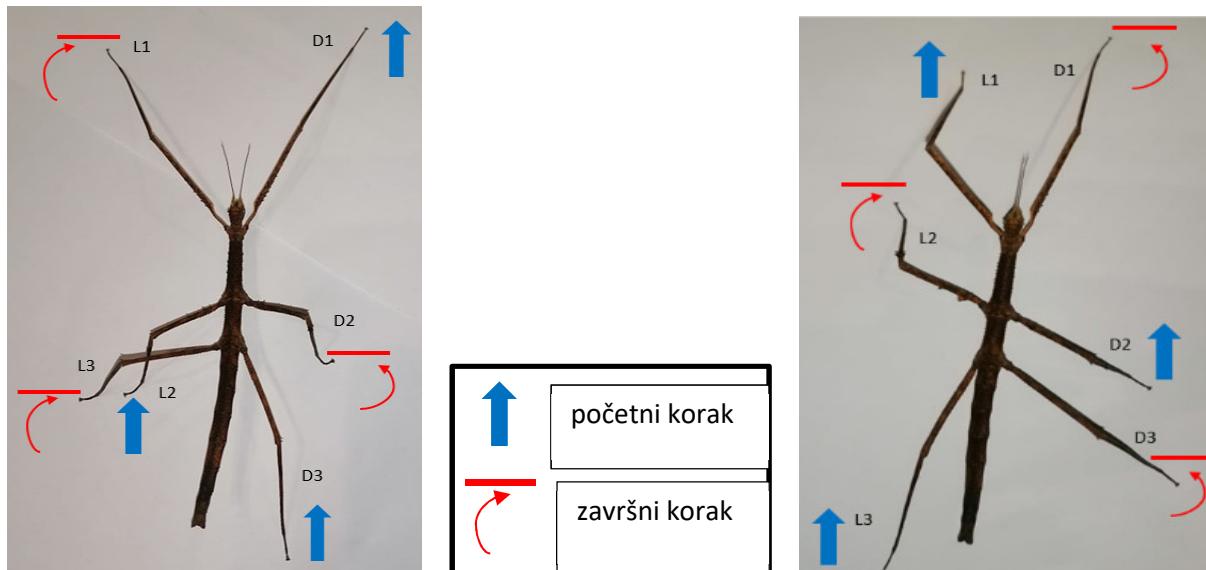


Slika 30 Hod paličnjaka s donje strane grančice



Tripodno kretanje paličnjaka

Sve odabrane vrste paličnjaka su se tripodno kretale na podlogama. Paličnjak se uvijek trima nogama oslanjao na podlogu (slika 31). Prvi korak napravio je srednjom nogom s lijeve strane i prednjom i stražnjom nogom s desne strane. Drugi korak je napravio prednjom i stražnjom nogom s lijeve strane i srednjom nogom s desne strane.



Slika 31 Tripodno i alternirajuće kretanje ženke vijetnamskog paličnjaka

RASPRAVA

Ovim istraživanjem proučena je motorika dviju vrsta paličnjaka u ovisnosti o različitim podlogama i smjeru kretanja. Ispitujući ponašanje i hod paličnjaka na različitim podlogama uočene su razlike između dviju vrsta paličnjaka, vijetnamskog i madagaskarskog ružičastokrilog paličnjaka. Zbog određene razlike u građi tijela, a naročito u građi nogu, razlikuje se kretanje na ispitivanim podlogama kao i smjer kretanja. Vijetnamski paličnjak prilikom hoda pokazao je veću snalažljivost u odabiru puta i brži hod, za razliku od madagaskarskog ružičastokrilog čiji je hod usporen čestim zastajkivanjima. Razlika između mužjaka i ženki vijetnamskog paličnjaka nije velika koliko je zamjetna razlika između vrsta. Treba istaknuti da mužjaci sve podlove prolaze brže za razliku od ženki. Prosječna masa ženki vijetnamskog paličnjaka za jedan je gram veća od prosječne mase mužjaka. Tijela s većom masom imaju manju akceleraciju tijekom ubrzavanja te su zbog toga ženke sporije hodale od mužjaka. Razlike unutar vrste madagaskarskog ružičastokrilog paličnjaka nije bilo moguće pratiti zbog nemogućnosti nabave mužjaka, stoga su podlove prolazile samo ženke.

Endlein (2010) je istraživao paličnjake i njihovu sposobnost prijanjanja na glatké površine poput stakla zbog prijaljke (*arolium*) smještene na predstopalu noge. Hod po staklu premazanom biljnim uljem za paličnjake bio je veliki izazov koji su „odbijali“ izvesti. Ženka ružičastokrilog madagaskarskog paličnjaka nije se htjela kretati, a također na isti način ponašali su se i vijetnamski paličnjaci. Takva podloga njima nije bila poznata. Pri promatranju kretanja paličnjaka na staklu potvđeni su rezultati Endleinovog istraživanja jer se paličnjaci kod kretanja na staklenoj podlozi koriste prijaljkama (*arolium*) smještenim na predstopalu noge.



Pri odabiru ovih podloga u samom istraživanju željeli smo dokazati snalažljivost paličnjaka u novim, umjetno odabranim podlogama i ekstremnim situacijama suprotno njihovom stvarnom okruženju. S obzirom na građu člankovitih nogu razvili su određene prilagodbe na prirodno stanište i teško se mogu prilagoditi na neke ekstremne uvjete (podloga premazana biljnim uljem i podloga premazana biljnim uljem i posuta solju).

Motorika paličnjaka u ovisnosti o različitim podlogama koje smo obuhvatili ovim radom samo je mali dio onoga što bi se još moglo istražiti. Bilo bi interesantno proučiti, uz određene instrumente (elektromiograf), kontrakciju pojedinih mišića ili provesti preciznije praćenje kretanja na ovim i još nekim drugim podlogama.

ZAKLJUČCI

Istraživanje o motorici paličnjaka u ovisnosti o različitim podlogama i smjeru kretanja potvrđilo je neke rezultate prethodnih istraživanja:

- ➊ Mužjaci vijetnamskog paličnjaka ostvarili su veću brzinu i veći razmak koraka od ženki iste vrste zbog manje mase tijela i veće duljine člankovitih nogu.
- ➋ Ženke vijetnamskog paličnjaka radile su veće korake i imale su brži hod od ženki madagaskarskog ružičastokrilog paličnjaka zbog oblika tijela i kuta koji su noge zatvarale pri oslanjanju na podlogu.
- ➌ Sve vrste imale su stabilno kretanje po ravnoj podlozi zbog dobrog prijanjanja uz podlogu.

LITERATURA

- Alegro A., Krajačić M., Lucić A. 2014. Život 2 – udžbenik iz biologije u drugom razredu gimnazije. Školska knjiga, Zagreb.
- Ballantyne D., Rathmayer W. 1981. On the function of the common inhibitory neurone in the walking legs of the crab. *Journal of comparative physiology* 143:111–122.
- Boucher S., Varady-Szabo H. 2005. Effects of different diets on the survival, longevity and growth rate of the Annam stick insect, *Medauroidea extradentata* (Phasmatodea: Phasmatidae). Orthopterists' Society, Quebec. [https://bioone.org/journals/Journal-of-Orthoptera-Research/volume-14/issue-1/10826467\(2005\)14/115:EODDOT\]2.0.CO;2/Effects-of-different-diets-on-the-survival-longevity-and-growth/10.1665/1082-6467\(2005\)14/115:EODDOT\]2.0.CO;2.full](https://bioone.org/journals/Journal-of-Orthoptera-Research/volume-14/issue-1/10826467(2005)14/115:EODDOT]2.0.CO;2/Effects-of-different-diets-on-the-survival-longevity-and-growth/10.1665/1082-6467(2005)14/115:EODDOT]2.0.CO;2.full), pristupljeno 9. 3. 2020.
- Burns M. D. 1972. The Control of Walking in Orthoptera. Department of Zoology, University of Glasgow. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.529.7618&rep=rep1&type=pdf>, pristupljeno 10. 1. 2020.
- Cruse H. 1976. The Function of the Legs in the Free Walking Stick Insect, *Carausius morosus*. Fachbereich Biologie der Universität, Pfaffenbergrstraße, D-6750 Kaiserslautern, Federal Republic of Germany.
- Dallmann C. J., Dürr V., Schmitz J. 2019. Motor control of an insect leg during level and incline walking. The Company of Biologists Ltd, Cambridge. <https://jeb.biologists.org/content/222/7/jeb188748.figures-only>, pristupljeno 10. 3. 2020.
- Endlein T. 2010. Mrav koji nosi 100 puta veću težinu od svoje. University of Cambridge, Cambridge. <http://metro-portal.hr/mrav-koji-nosi-100 puta-vecu-tezinu-od-svoje/33606>, pristupljeno 20. 3. 2020.
- Habdić I., Primc Habdić B., Radanović I., Špoljar M., Matoničkin Kepčija R., Vujičić Karlo S., Miliša M., Ostojić A., Sertić Perić M. 2011. Protista – Protozoa, Mezazoa – Invertebrata, Strukture i funkcije. Alfa, Čakovec.
- Habdić I., Primc Habdić B., Radanović I., Vidaković J., Kučinić M., Špoljar M., Matoničkin R., Miliša M. 2004. Protista – Protozoa i Metazoa – Invertebrata, Funkcionalna građa i praktikum – sveučilišni udžbenik iz biologije. Meridijani, Samobor.
- Hauten T., Čuljak D. 2018. Pojava mužjaka u vijetnamskog paličnjaka, *Medauroidea extradentata* (Brunner von Wattenwyl, 1907) koji se razmnožava partenogenetom. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
- Miklić P. 2017. Normalan hod i analiza hoda. Hrvatsko društvo za fizikalnu i rehabilitacijsku medicinu, Zagreb. <https://hdfrm.org/wp-content/uploads/2017/10/normalan-hod.pdf>, pristupljeno 1. 3. 2020.



ANTIBAKTERIJSKI UČINAK BILJNIH ULJA NA NEPATOGENI SOJ BAKTERIJE *Staphylococcus aureus ATCC® 29213™*

Laura Štampar i Dora Tuksar, 2. razred

Gimnazija Josipa Slavenskog Čakovec, Čakovec
Mentor: Lara Kralj

SAŽETAK

Zbog rezistencije koju bakterije mogu razviti na antibiotike, sve više važnosti pridodaje se prirodnim antibakterijskim tvarima koje također mogu pomoći u borbi protiv bakterija, poput eteričnih ulja ljekovitog bilja. Cilj je istraživanja utvrditi razlike u antibakterijskom djelovanju prirodnih eteričnih ulja navedenih biljaka, ima li razlike u antibakterijskom djelovanju kupovnog i samostalno izrađenog ulja lavande iste vrste, utječe li prisustvo flavonoida u uljima na antibakterijsko djelovanje te sadrže li sva korištena ulja flavonoide. Korišteni nepatogeni soj bakterije *Staphylococcus aureus ATCC® 29213™* vrsta je bakterije rezistentne na mnoge antibiotike koja može uzrokovati ozbiljne bolesti. Zato se sve više pažnje posvećuje otkrivanju antibakterijskog djelovanja u drugim tvarima. U ovom je istraživačkom projektu istraženo antibakterijsko djelovanje različitih lako dostupnih biljnih ulja Kirby-Bauer metodom. To su kupljena ulja engleske lavande, divlje origana, čajevca, crnog kima, muškatne kadulje, prave majčine dušice, sredozemnog smilja i anisa. Ta su ulja izabrana zbog aktivnih tvari koje sadrže, prvenstveno flavonoida koji su dokazani metodom tankslojne kromatografije (TLC), a mogu se dobiti i parnom destilacijom. Korišteno je jedno takvo samostalno dobiveno ulje engleske lavande i uspoređeno s kupovnim. Analizom dobivenih rezultata utvrđeno je da sve biljke koje sadrže flavonoide imaju antibakterijsko djelovanje. Najsnažnije djelovanje imaju ulje divlje origana i ulje prave majčine dušice. Najslabije djelovanje imaju ulja anisa, muškatne kadulje i sredozemnog smilja. Kupovno i samostalno dobiveno ulje engleske lavande razlikuju se u djelotvornosti na bakteriju *S. aureus*. Antibakterijsko djelovanje imaju biljke u čijim su uljima dokazani flavonoidi te sva korištena ulja sadrže flavonoide.

Ključne riječi: flavonoidi; *Staphylococcus aureus ATCC® 29213™*; Kirby-Bauer metoda; tankslojna kromatografija; parna destilacija

UVOD

Otkriće antibiotika mnogo je pridonijelo razvoju medicine te su oni postali neizbjegnim načinom liječenja infekcija, upala i bolesti uzrokovanih bakterijama (na primjer kuge, tuberkuloze, gonoreje, sifilisa i tetanusa). Antibiotici su lijekovi koji sprečavaju rast bakterija te pomažu suzbijanju različitih oblika bakterijskih infekcija. Danas je otkrivena rezistencija na mnoge antibiotike, a brzina nastanka te otpornosti ovisi o različitim čimbenicima među kojima je najvažnija učestalost potrošnje antibiotika (Musa, 2017). Rezistencija je pojava kada neki antibiotik ne djeluje učinkovito na bakteriju, a razlikuju se prirodna i stečena. Kod prirodne rezistencije ne dolazi do promjena u naslijednom materijalu bakterije, već određeni antibiotik zbog veličine molekula ne može proći kroz staničnu membranu. Stečena rezistencija bakterija na antibiotike nastaje genetskim promjenama na bakteriji prilikom čega nastaju novi proteini koji mogu inaktivirati antibiotik ili ga mogu transportirati van bakterije (Aigner i sur. 2011). Prema izvješću Svjetske zdravstvene organizacije o globalnom statusu antimikrobne rezistencije na najčešće rabljene lijekove iz 2014. godine *S. aureus* jedna je od bakterija koja je razvila rezistenciju na najviše antibiotika (Ćerić, 2015). Iz tih se razloga danas pokušavaju pronaći alternative te istraživači sve više posežu za tradicionalnim ljekovitim biljnim vrstama kao izvorom novih molekula s antibakterijskim i antiseptičkim djelovanjem. Antiseptici inaktiviraju mikrobe, primarno bakterije, redukcijom broja mikroba ili sprječavanjem njihove multiplikacije u što dužem razdoblju. Oni se bez štetnih posljedica mogu primijeniti na živom tkivu, za razliku od dezinficijensa koji se primjenjuju za tretiranje nežive tvari (Boban i Grga, 2016).

Bakterija *S. aureus* je Gram-pozitivni kok koji istodobno može biti komenzalni i patogeni organizam. Raste u velikim kuglastim kolonijama na hranjivim podlogama. Vrlo dobro uspijeva na krvnom agaru



koji je iz tog razloga korišten u ovom istraživačkom projektu. Optimalna temperatura za rast je 37 °C, no može rasti i na temperaturama od 10 °C do 46 °C. Ona je fakultativni anaerob, međutim, uz prisustvo kisika i ugljikova dioksida njezin je rast pojačan. Hrani se lipidima i proteinima te može fermentirati različite šećere. Među patogenima koji ne tvore spore smatra se najrezistentnijim patogenom. Vrlo dobro podnosi slanu podlogu od 7,5 % do 10 %, pH ekstreme i visoke temperature (60 minuta može biti na temperaturi od 60 °C). Patogen proizvodi koagulazu – enzim koji zgrušava plazmu i krv. Sadrži i enzime penicilinazu te hijaluronidazu koja razgrađuje hijaluronsku kiselinsku koja čini međustaničnu tvar vezivnih tkiva domaćina. Proizvodi toksine krvnih stanica (hemolizine i leukocidine), crijevne (enterotoksine) i epitelne toksine. *S. aureus* u kožu najčešće ulazi kroz rane i kožne žljezde. Sistemske infekcije bakterijom *S. aureus* utječu na razne organe. Bakterije naseljavaju nosnu šupljinu te se udisajem mogu proširiti na pluća i uzrokovati upalu pluća. Rizična su skupina kronični pacijenti koji koriste katetere i druge materijale kojima se bakterija može proširiti u organizam. Time dolazi do bakterijemije – prisustva bakterije u krvi. Ona cirkuliranjem tijelom bakteriju prenosi do organa. Infekcije zgloba mogu dovesti do deformirajućeg artritisa, a ulaskom bakterije u lubanju može se razviti teški oblik upale moždane ovojnica. Zato je važno boriti se protiv *S. aureusa*. (Park Talaro i Talaro, 2002).

Ljekovite biljke najčešće se primjenjuju u obliku eteričnih ulja. Eterična ili esencijalna ulja smjese su jače ili slabije hlapivih lipofilnih sastavnica izoliranih iz biljaka. Za njih je važno svojstvo hidrofobnosti zbog čega se mogu ugraditi u lipide bakterijske stanične i mitochondrijske membrane. Membrana je stoga propusnija i dolazi do gubitka molekula i iona iz stanice čija posljedica može biti i stanična liza (raspad stanice). Bakterije ne uspijevaju razviti rezistenciju na eterična ulja zato što su ona smjese tvari različitih mehanizama djelovanja, naspram antibioticima koji sadrže jednu aktivnu tvar protiv koje bakterija lako razvije rezistenciju (Ćerić, 2015). Iako su u ovom istraživačkom projektu ulja kupovna, korišteno je i eterično ulje lavande izolirano parnom destilacijom u školskom laboratoriju kako bi se usporedilo djelovanje kupovnog i samostalno dobivenog ulja. Antibakterijski učinak biljnih ulja proveo se Kirby-Bauer metodom.

Za istraživački projekt odabранo je 8 ljekovitih biljaka. Lavanda (*Lavandula angustifolia* M.) sadrži eterično ulje, estere (treslovina i linilacetat), glikozide (saponin i kumarin), alkohole (linalol, borneol, cineol), ketonkamfor i dr. Origano (*Origanum vulgare* L.) sadrži eterično ulje, alkohole (karvakrol, timol i borneol), gorke tvari, treslovinu tanin, keton kamfor, glikozid triterpeni mineralne soli. Čajevac (*Melaleuca alternifolia* / *Maiden & Betche* / *Cheel*) sadrži eterično ulje, glikozidterpen, alkohole (teroinen-4-ol i cineol). Crni kim (*Nigella sativa* L.) sadrži 4 diterpenska alkaloida, ulja (timokinon i timohidrokinon) i alkohol timol, ugljikohidrate, masti, vitamine, minerale, proteine, kalcij, željezo i kalij. Ljekovita Kadulja (*Salvia officinalis* L.) sadrži eterično ulje, smolu, flavonoide, treslovinu, gorke tvari, ketone (tujon i kamfor), alkohole (cineol i borneol), i ester bornil acetat. Prava majčina dušica (*Thymus vulgaris* L.) sadrži eterično ulje, alkohole (borneol, karvakrol i timol), glikozide (saponin i tanin), vitamine A, C, D i B-kompleks, magnezij, fosfor, kalij i cink. Sredozemno smilje (*Helichrysum italicum* L.) sadrži eterično ulje, gorke tvari, treslovinu i bioflavonoide. Anis (*Pimpinella anisum* L.) sadrži eterično ulje, bjelančevine, šećer, masna ulja, željezo, alkohole (anetol, estragol i anisov alkohol), anisovu kiselinsku i anis keton te aldehyde. (Ćerić, 2016; Greblo, 2009; Lovrić, 2014; Palfi, 2017).



Prvo znanstveno istraživanje baktericidnih svojstava para eteričnih ulja proveo je De la Croix 1881. godine (Parađiković, 2015). Ekstrakti lišća biljaka *Bryophyllum pinnatum* i *Kalanchoe crenata* testirana su na antimikrobnog djelovanje (Akinsulure i sur., 2007) na Gram-pozitivne organizme *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* i *Bacillus subtilis*. Hannan i sur. 2008. godine dokazali su antibakterijsko djelovanje crnog kima na *S. aureus*. Prema Rapis (2018) divlji origano (*Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P. H. Davis) djeluje antibakterijski na *S. aureus*. Ćerić (2015) je u svom istraživanju napravila sustavni pregled i usporedbu kemijskog sastava i antimikrobnog djelovanja eteričnih ulja velikog broja biljnih vrsta rodova *Salvia* i *Thymus*. Eterična ulja roda *Salvia* pokazala su se iznimno učinkovitim antibakterijskim sredstvima prema Gram-pozitivnim bakterijama. Najčešće ispitivane Gram-pozitivne vrste bakterija su *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis* te *Staphylococcus epidermidis*, a najrezistentnije su *Streptococcus pyogenes* i *S. aureus*. Najveću zonu inhibicije rasta bakterije *S. aureus* od 17 mm ostvarilo je eterično ulje *Salvia cedronella* te eterično ulje *Thymus pubescens* koje je ostvarilo zonu inhibicije rasta od 75 mm.

Djelovanje navedenih biljaka na mikroorganizme temelji se na međudjelovanju različitih tvari, no glavna se uloga može pripisati određenim aktivnim tvarima. Od glavnih skupina aktivnih tvari u biljkama baktericidno djelovanje imaju: glikozidi, alkaloidi, eterična ulja, flavonoidi, treslovine, saponini i gorke tvari (Parađiković, 2015). Fenolne sastavnice u eteričnim uljima smatraju se glavnima odgovornima za antibakterijsko djelovanje eteričnih ulja (Ćerić, 2015).

Flavonoidi pripadaju skupini polifenolnih spojeva – sastoje se od više aromatskih prstenova od kojih svaki ima barem jednu hidroksilnu skupinu. Sastoje se od 15 ugljikovih atoma tipa C₆-C₃-C₆. Dijele se na 13 podskupina od kojih su glavne: flavoni, flavanoni, flavonoli, izoflavoni i antocijanidini. Oni su aktivne tvari u mnogim biljkama te imaju farmakološka svojstva: protuupalna, antioksidacijska, antimikrobnia i dr. (Morović, 2018). S obzirom na to da ih ljudski organizam ne može sintetizirati, unose se konzumacijom voća i povrća te različitih biljaka. Postoji više metoda dokazivanja flavonoida, a u ovom je istraživačkom projektu korištena metoda tankoslojne kromatografije (TLC).

S obzirom na dosadašnja istraživanja koja dokazuju da je *S. aureus* jedna od bakterija koja je razvila rezistenciju na najviše antibiotika (Ćerić, 2015) i da su flavonoidi aktivne tvari u biljkama koje imaju baktericidno djelovanje (Morović, 2018), ovim istraživačkim projektom pokušala su se pronaći ulja ljekovitih biljaka koje imaju najbolji antibakterijski učinak djelovanjem flavonoida.

Cilj je istraživanja utvrditi razlike u antibakterijskom djelovanju prirodnih eteričnih ulja navedenih biljaka, ima li razlike u antibakterijskom djelovanju kupovnog i samostalno izrađenog ulja lavande iste vrste, utječe li prisustvo flavonoida u uljima na antibakterijsko djelovanje te sadrže li sva korištena ulja flavonoide. Glavni motiv istraživanja bio je utvrditi mogu li ulja djelovati antibakterijski na bakteriju *S. aureus*.

Na temelju napisanog istraživačke pretpostavke su:

- ➊ Sva ulja djeluju antibakterijski.
- ➋ Ne postoje razlike u djelovanju prirodnog kupljenog i izoliranog ulja lavande.
- ➌ Antibakterijsko djelovanje imaju biljke u čijim su uljima prisutni flavonoidi.
- ➍ Sva korištena ulja ne sadrže flavonoide.



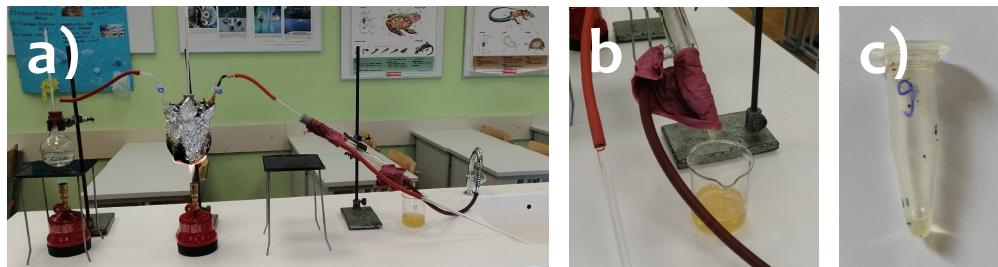
METODE

Od listopada 2019. do siječnja 2020. godine proveden je teorijski dio istraživanja koji se sastoji od postavljanja problema i proučavanja literature. Na temelju toga postavljene su hipoteze i odabrane metode istraživanja. Laboratorijski dio istraživanja proveden je u siječnju i veljači ove godine u Mikrobiološkom laboratoriju Zavoda za javno zdravstvo Međimurske županije te u školskom laboratoriju.

Dobivanje ulja engleske lavande (*Lavandula angustifolia* M.) parnom destilacijom

Eterična se ulja iz biljaka dobivaju parnom destilacijom koja omogućava vrenje komponenata ulja pri nižim temperaturama. Njihovo je vrelište na otprilike 160 °C, no vodena para povećava ukupni tlak u destilacijskom sustavu koji omogućava da zajedno s njom destiliraju tvari koje imaju vrelište više od 100 °C. Njezin produkt je hidrolat iz kojeg se isparavanjem razdvajaju voda i ulje.

Parna destilacija provedena je u školskom laboratoriju. Usitnjeni listići svježe ubrane lavande stavljeni su u troglavu tikvicu. Lavanda je zagrijavana do 160 °C tako da je kroz tikvicu prolazila vodena para temperature 100 °C te je dodatno zagrijavana plamenikom, čađavim plamenom. Tikvica je omotana folijom kako bi se spriječio gubitak topline. Upareno ulje s vodenom parom provedeno je Liebigovim hladilom. Opisana aparatura prikazana je na slici 1. Provedena je destilacija dobivenog hidrolata tako da je zagrijavan čađavim plamenom na 100 °C sve dok voda nije u potpunosti isparila i ostalo samo ulje. Postupak je ponovljen šest puta i dobivena su ulja pomiješana u jedno korišteno u dalnjem istraživanju.



Slika 1. a) Postupak parne destilacije; b) hidrolat engleske lavande dobiven parnom destilacijom; c) dobiveno ulje

Istraživanje antibakterijskog učinka biljnih ulja na bakteriju *S. aureus* Kirby-Bauer metodom

U mikrobiološkom laboratoriju korišten je uzorak nepatogenog soja *S. aureus* ATCC®29213™. Uzorak je dobiven iz sjedišta Microbiologics Inc.-a u Minnesoti. Izbor mikroorganizama u skladu je s preporukama Microbiology Societyja za siguran rad s učenicima u srednjoj školi. S obzirom na to da nepatogeni soj *S. aureus* može postati patogen, poduzete su sve mjere zaštite i osigurani sterilni uvjeti rada. Korištene su jednokratna kuta i maska za lice te rukavice, a siguran rad osiguran je temeljitim pranjem i dezinficiranjem ruku i radne površine. Korištena su ulja: divljeg origana, čajevca, crnog kima, muškatne kadulje, prave majčine dušice, sredozemnog smilja, anisa te kupovnog i destilacijom dobivenog ulja engleske lavande.

Difuzijskom Kirby-Bauer metodom određen je antibakterijski učinak eteričnih ulja iz biljaka navedenih na slici 2. na bakteriju *S. aureus*. Za svaku je od 6 serija određen McFarland standard. Taj se standard koristi u Europi, a zapravo je otopina barijeva klorida i sumporne kiseline. Njime se određuje koncentracija bakterija te je njegov standard 0.5, prihvata se od 0.46 do 0.54 (EUCAST, 2020).



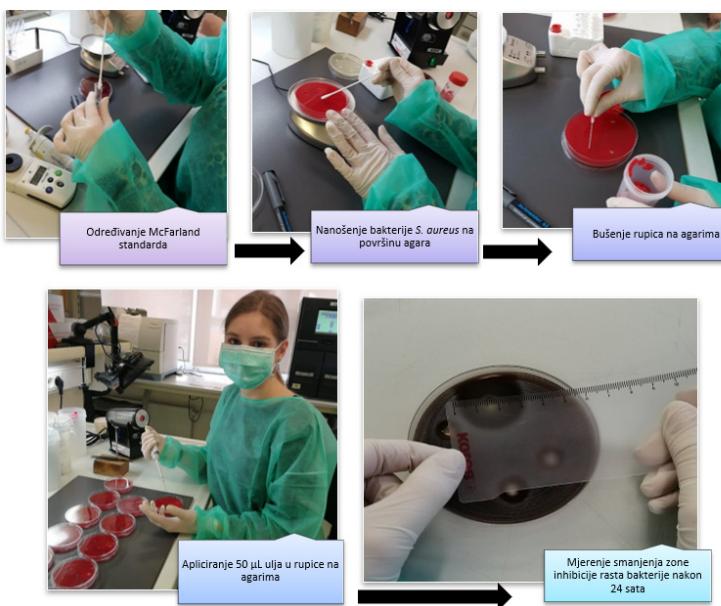
Vrijednosti McFarland standarda za svaku seriju prikazane su u tablici 1. Iz te je otopine *S. aureus* brisom nanesen na površinu krvnih agara u koncentričnim kružnicama. Nakon što je bakterija nasađena na agare, bušene su rupice od 6 mm koje su označene brojevima uzorka. Na jednu su podlogu nanesena 4 uzorka, a na drugu pet kako se ne bi preklapali. Na jedan agar nasađena je samo bakterija čini kontrolnu skupinu. U rupice je automatskom mikropipetom fiksнog volumena aplicirano 50 µL uzorka ulja. Agari s nasađenom bakterijom inkubirani su u termostatu na 37 °C tijekom 3 dana. Mjerenje je provedeno tri puta u razmaku od 24 h kada je mјeren promjer zone inhibicije rasta bakterija u milimetrima i to nakon prva 24 sata dva puta ručno i uređajem *Sirscan micro*, a nakon 48 sati dvaput i nakon 72 sata samo jednom ručno. Postupak Kirby-Bauer metode prikazan je slikom 3.



Slika 2. Korištena eterična ulja

Tablica 1. Vrijednosti McFarland standarda za svaku seriju

Serija	1	2	3	4	5	6	Kontrolna skupina
Vrijednost McFarlanda	0,50	0,47	0,52	0,52	0,52	0,53	0,50



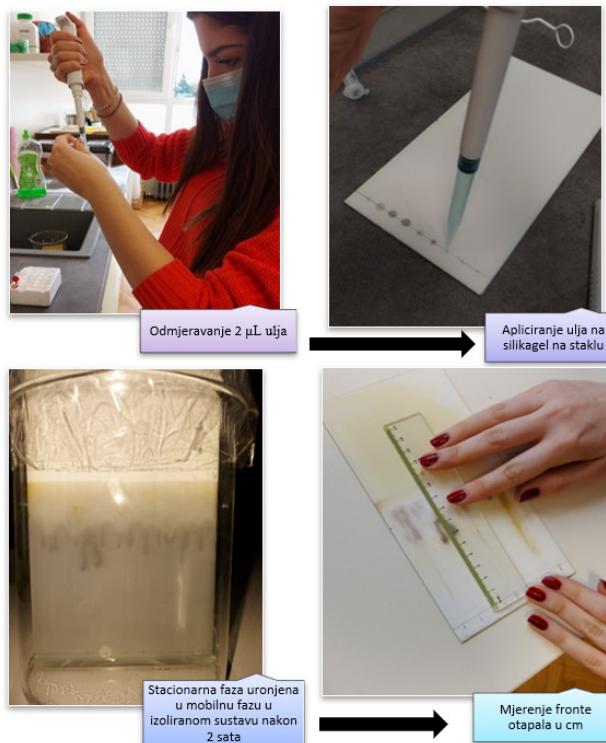
Slika 3. Shematski prikaz postupka Kirby-Bauer metode



Dokazivanje flavonoida u ljekovitim biljnim uljima metodom tankoslojne kromatografije (TLC)

Tankoslojna kromatografija temeljena je na separaciji sastojaka između dviju faza: stacionarne (nepokretne) i mobilne (pokretne). Određeni sastojci smjese topljivi u otapalu putuju nepokretnom fazom, a linija do koje je otapalo stiglo naziva se fronta otapala. Glavni je cilj te metode kvalitativna analiza smjesa – dokazivanje flavonoida u biljnim uljima u istraživačkom projektu.

Ona je provedena u školskom laboratoriju. Kao stacionarna faza korišten je silikagel na staklu. Linija 1 cm od ruba i između ulja označena je grafitnom olovkom. Okomite oznake na donjoj crti označavaju mesta na kojima je aplicirano $2 \mu\text{L}$ svih ispitivanih eteričnih ulja. Menzurom je odmjereno 54 mL otopine etanola i metanola te 6 mL koncentrirane klorovodične kiseline. Te su otopine pomiješane u višoj laboratorijskoj čaši i čine mobilnu fazu. U laboratorijsku čašu s mobilnom fazom okomito je uronjena stacionarna faza (silikagel na staklu). Ona je zatvorena manjom laboratorijskom čašom kako bi se zadržale pare otapala. Sustav je tako ostavljen 2 sata kako bi svi flavonoidi do kraja otputovali nepokretnom fazom. Kako bi rezultati bili vidljiviji, silikagel s frontama otapala poškropljen je otopinom joda i tako ostavljen par sati dok se nije u potpunosti posušio. Kraj tamnjeg obojenja označava mjerenu frontu otapala, a kraj svjetlijeg dosega samog otapala (klorovodične kiseline otopljene u mješavini etanola i metanola). Ravnalom je u centimetrima mjerena fronta otapala. Postupak je ponovljen 3 puta te je prikazan na slici 4.



Slika 4. Shematski prikaz kvalitativne analize smjesa metodom tankoslojne kromatografije

Statistička analiza rezultata

Dobiveni rezultati obrađeni su u programu Excel Microsoft Office. Rezultati antibakterijskog učinka biljnih ulja na bakteriju *S. aureus* difuzijskom Kirby-Bauer metodom dobiveni su računanjem prosječnih vrijednosti zona inhibicije rasta svakog od 3 dana. Od svake izmjerene vrijednosti oduzet je promjer rupica u agarima (6 mm) jer se tamo nije nalazila bakterija, već samo ulje. Ti su rezultati prikazani

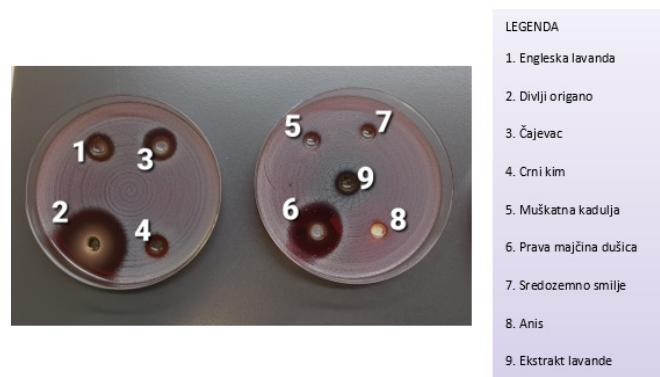


linijskim grafom te je za tu metodu izračunan i račun pogreške. Rezultati tankoslojne kromatografije kvalitativno su statističko analizirani računanjem prosječne vrijednosti dvaju ponavljanja jer su rezultati treće serije pokazali velika odstupanja.

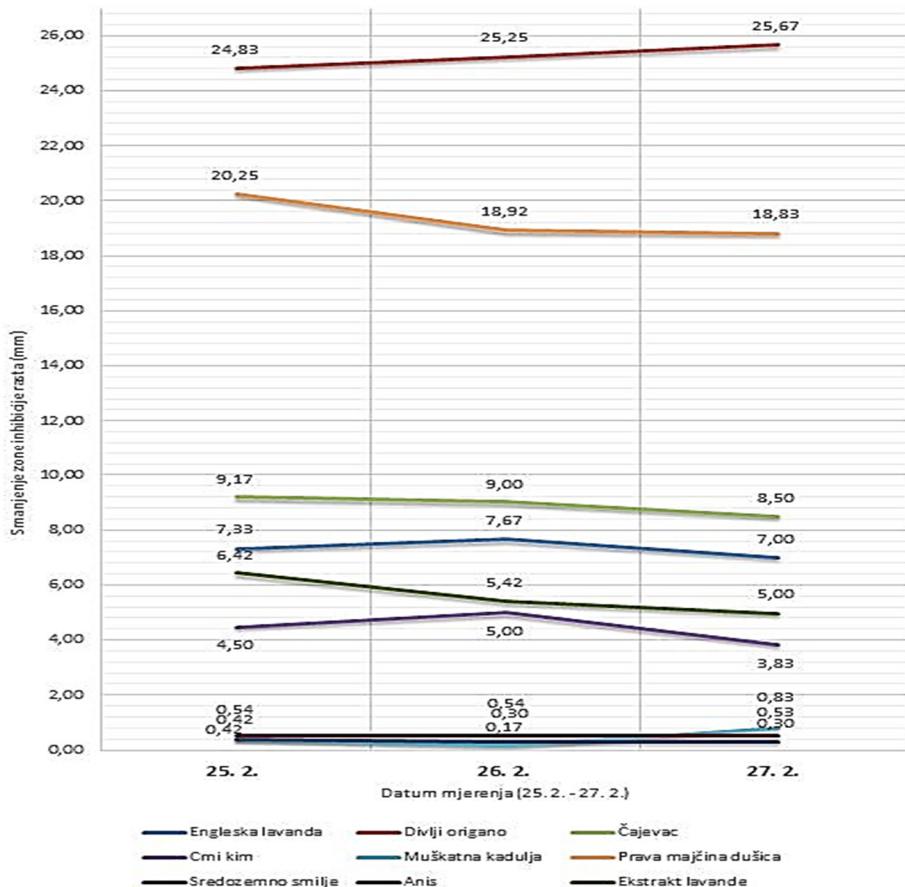
REZULTATI

Ispitivanje antibakterijskog učinka biljnih ulja na bakteriju bakterije *S. aureus* difuzijskom Kirby-Bauer metodom

Rezultati su prikazani na slici 5. te linijskim grafom na slici 6. Dobiveni su analizom 6 serija uspoređivanjem s jednom kontrolom. Najsnažnije antibakterijsko djelovanje imao je divlji origano, a sredozemno smilje pokazuje najslabija antibakterijska svojstva.



Slika 5. Antibakterijsko djelovanje ulja na bakteriju *S. aureus* nakon 24 sata



Slika 6. Antibakterijsko djelovanje biljnih ulja tijekom 72 sata

**Račun pogreške difuzijske Kirby-Bauer metode**

Račun apsolutne relativne pogreške pri mjerenu smanjenja zona inhibicije djelovanjem pojedinih ulja prikazan je u tablici 2. Rezultati su sortirani od najmanje apsolutne relativne pogreške prema najvećoj.

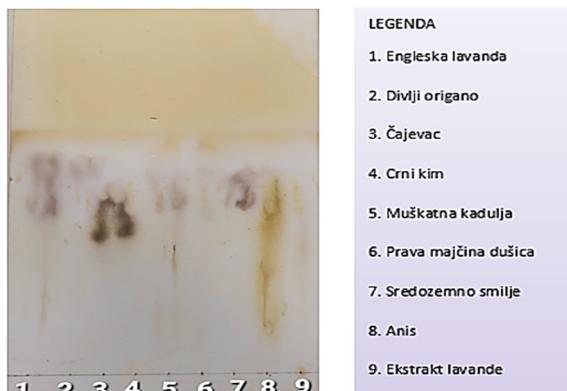
Vidljivo je da su rezultati većinom precizni, no jako odstupa muškatna kadulja s pogreškom od 76,6 %.

Tablica 2. Račun pogreške difuzijske Kirby-Bauer metode

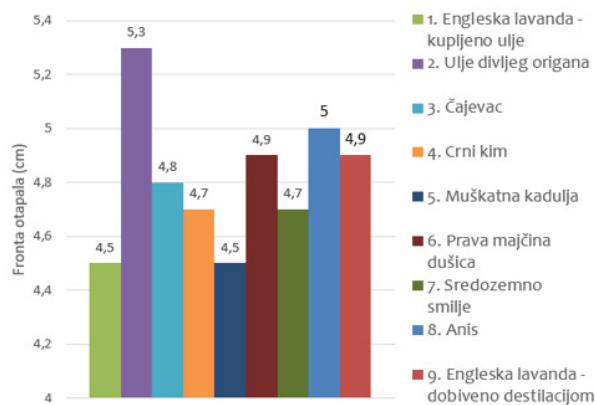
Vrsta biljnog ulja	Aritmetička sredina \bar{x} (mm)	Odstupanje od aritmetičke sredine Δx (mm)			Maksimalna apsolutna pogreška Δx_{max} (mm)	Aritmetička sredina (\bar{x}) ± standardna devijacija (Σ)	Apsolutna relativna pogreška ε_{aps} / %
Divlji origano	25,25	0,42	0,00	-0,42	0,42	$25,25 \pm 0,42$	1,66
Anis	0,54	0,00	0,00	0,01	0,01	$0,54 \pm 0,01$	1,85
Čajevac	8,89	-0,28	-0,11	0,39	0,39	$8,89 \pm 0,35$	4,39
Engleska lavanda	7,33	0,00	-0,34	0,33	0,34	$7,33 \pm 0,34$	4,63
Prava majčina dušica	19,33	-0,92	0,41	0,50	0,92	$19,33 \pm 0,80$	4,76
Crni kim	4,44	-0,06	-0,56	0,61	0,61	$4,44 \pm 0,59$	13,74
Ekstrakt engleske lavande	5,61	-0,81	0,19	0,61	0,81	$5,61 \pm 0,73$	14,44
Sredozemno smilje	0,34	-0,08	0,04	0,04	0,08	$0,34 \pm 0,07$	23,53
Muškatna kadulja	0,47	0,05	0,30	-0,36	0,36	$0,47 \pm 0,33$	76,60

Dokazivanje flavonoida u ljekovitim biljnim uljima metodom tankoslojne kromatografije (TLC)

Rezultati su dobiveni mjerenjem fronte otapala na slici 7., a vrijednosti u centimetrima prikazane su stupčastim dijagramom na slici 8.



Slika 7. Rezultati tankoslojne kromatografije par sati nakon škropljenja otopinom joda

Dokazivanje flavonoida u biljnim uljima metodom tankoslojne kromatografije (TLC)

Slika 8. Vrijednosti fronte otapala za korištena biljna ulja



RASPRAVA

Najjače antibakterijsko djelovanje na bakteriju *S. aureus* pokazalo je ulje divljeg origana s prosječnom zonom inhibicije rasta od 25,25 mm. To je mjereno ujedno i najpreciznije s absolutnom relativnom pogreškom od 1,66 %. Fronta otapala postigla je čak 5,3 cm. Uz flavonoide, moguće je djelovanje alkohola i terpena te je zbog jakog antibakterijskog svojstva djelovanje ulja uočeno i trećeg dana mjerena.

Drugi najveći promjer zone inhibicije rasta izmjerena je za eterično ulje prave majčine dušice čiji je prosječni promjer iznosio 19,3 mm, a relativna pogreška 4,76 %. Čerić (2015) u svojem istraživanju navodi da su ulja roda *Thymus* također pokazala odlično djelovanje protiv rezistentnih bakterija. Ovo je ulje dostiglo relativno visoku frontu otapala, vrijednosti 4,9 cm. Uz flavonoide, moguće je da su djelovanju pridonijele i aktivne tvari borneol, timol, karvakrol i saponin. Moguće je i da se nakon prvog dana zona inhibicije bakterije ponovno povećava jer je bakterija uspjela stvoriti rezistenciju te se može nesmetano umnožavati.

Ulje čajevca djeluje na bakteriju sa zonom inhibicije rasta prosječnog promjera 8,89 mm i točnosti mjerena 95,61 %. Palfi (2017) spominje da se čajevac već od 18. stoljeća koristi u medicinske svrhe te da sadrži terpinen-4-ol, γ -terpinen, ρ -cimen, 1,8-cineol i mnoge druge spojeve ključne za antibakterijsko djelovanje. Tankoslojnom kromatografijom postignuta je fronta otapala od 4,8 cm što je treći najbolji rezultat.

Kupovno ulje engleske lavande pokazalo je umjereni antibakterijsko djelovanje te prosječna vrijednost promjera zone inhibicije rasta iznosi 7,33 mm. Bogata je fenolnim spojevima, a fronta otapala postiže vrijednost 4,5 cm. Ulje lavande proizvedeno u školskom laboratoriju metodom parne destilacije ima slično, no malo slabije antibakterijsko djelovanje nego kupovno ulje, iako je fronta otapala 4,9 cm postigla veću vrijednost. Prosječni promjer smanjena zone inhibicije rasta iznosi 5,61 mm te se od kupovnog ulja razlikuje za 1,72 mm. Apsolutna relativna pogreška kupovne engleske lavande iznosi 4,63 %, dok pogreška ekstrakta engleske lavande iznosi 9,81 % više. Kupljena engleska lavanda pokazuje vrlo slična, no nešto jača svojstva u usporedbi s ekstraktom izoliranim parnom destilacijom, suprotno očekivanjima temeljenima na literaturi.

Umjereni antibakterijsko djelovanje pokazuje i ulje crnog kima sa zonom inhibicije rasta bakterija za prosječno 4,4 mm. Taj rezultat iznenađuje s obzirom na pronađene mnoge podatke o njegovoj širokoj potrošnji i djelovanju. Na odstupanje utječe i iznos absolutne relativne pogreške od 13,74 %. Utvrđena fronta otapala za ulje crnog kima iznosi 4,7 cm. Moguće je da ulje sadrži neki spoj na koji je bakterija već stvorila rezistenciju te iz tog razloga ima slabije djelovanje.

Izrazito slabo antibakterijsko djelovanje pokazuju anis, muškatna kadulja i sredozemno smilje.

Ulje anisa ostvarilo je zonu inhibicije rasta za prosječno 0,54 mm. Taj rezultat pokazuje relativno slabo antibakterijsko djelovanje čemu pridonosi i absolutna relativna pogreška iznosa 1,85%. Razlog takvog odstupanja vjerojatno je nagrizajuće svojstvo tog ulja. Ono sadrži anisovu kiselinu koja je uništila donji dio plastične Petrijeve zdjelice s agarom te je sve ulje već prvi dan iscurilo iz zdjelice i nije uspjelo djelovati. U ulju su dokazani flavonoidi, a fronta otapala je iznosila 5 cm.



U svom istraživanju Ćerić (2015) također dokazuje da ulja roda *Salvia* djeluju antibakterijski na multirezistentne bakterije među kojima je i bakterija *S. aureus*, iako je na neke vrste ulja tog roda rezistentna. Ulje muškatne kadulje u našem istraživanju je postiglo zonu inhibicije rasta od 0,47 mm, što je relativno mala vrijednost. Vrlo vjerojatan razlog lošeg rezultata proizlazi analizom računa pogreške čija absolutna relativna pogreška iznosi vrlo nepreciznih 76,60 %. Muškatna kadulja od fenolnih spojeva sadrži samo flavonoide (Ćerić, 2015), a ulje je dostiglo najnižu frontu otapala od 4,5 cm.

Sredozemno smilje također ima slabo djelovanje. Ulje je u prva dva dana ostvarilo zonu inhibicije rasta za prosječno 0,47 mm, a treći dan za ukupno 0,87 mm. Moguće je da ima sastavnice kojima treba više vremena da djeluju na bakteriju *S. aureus*. Ti rezultati također nisu dovoljno precizni zbog absolutne relativne pogreške od 23,53 %. Fronta otapala postigla je 4,7 cm dok je antibakterijsko djelovanje najslabije od svih ispitanih uzoraka.

Općenito na antibakterijsko djelovanje utječu i drugi faktori: izloženost temperaturi, svjetlost i zemljopisno porijeklo biljke (Greblo, 2009). Moguće je da utječe i koncentracija zasićenosti parama ulja u Petrijevim zdjelicama jer su na jednom agaru s bakterijom bila ispitana djelovanja više različitih ulja.

Tankoslojnom kromatografijom dokazano je prisustvo flavonoida u svim uzorcima ulja jer su sve fronte otapala postigle neku vrijednost. Moguće je da su vrijednost fronte otapala i udio flavonoida u uljima međusobno ovisni, i to proporcionalno. Dakle, viša fronta otapala – veći udio flavonoida. Tome u prilog idu rezultati visoke fronte otapala i jakog antibakterijskog djelovanja ulja divljeg origana, prave majčine dušice i čajevca. Zbog neusklađenosti rezultata fronte otapala i antibakterijskog djelovanja muškatne kadulje i sredozemnog smilja to se ne može tvrditi bez kvantitativne analize ulja. Pri proizvodnji eteričnog ulja nehlapivi fenoli vjerojatno zaostaju u otpadu (Greblo, 2009).

Različiti rezultati od očekivanih uvjetovani su i preciznošću mjerjenja. Osim slučajnih pogrešaka obrađenih statističkom analizom i analiziranih računom pogreške, uočene su i grube pogreške. Slučajne su pogreške uzrokovane nedovoljno preciznim mjernim instrumentima te su zasigurno glavni uzrok velikog odstupanja rezultata pri mjerenu minimalnih inhibicijskih zona. Grube pogreške uzrokuju ljudski propusti poput krivog mjerjenja, zapisivanja krivog rezultata i slično. One su uočene u metodi tankoslojne kromatografije te su zbog velikih odstupanja izostavljene iz analize.

Istraživanje bi se moglo unaprijediti korištenjem podloge za uzgoj bakterija na koje ulje anisa nema negativan učinak, nanošenjem po jednog uzorka ulja na svaki agar kako bi se izbjeglo djelovanje para drugih ulja i uspoređivanjem svih kupovnih sa svim destilacijom dobivenim uljima. Također, može se izvesti kvalitativna analiza ulja postupkom plinske kromatografije. Moguće je i koristiti isključivo računalne mjerne uređaje kako bi se velike absolutne relativne pogreške svele na minimum.

ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti:

- Sva korištena ulja djeluju antibakterijski.
- Postoje razlike u antibakterijskom djelovanju izoliranog i kupljenog ulja engleske lavande. Slabiji antibakterijski učinak ima ulje dobiveno parnom destilacijom.



- Antibakterijsko djelovanje na bakteriju *S. aureus* imaju biljke u čijim su uljima dokazani flavonoidi.
- Sva ulja sadrže flavonoide.

ZAHVALA

Zahvaljujemo Zavodu za javno zdravstvo Međimurske županije, Djelatnosti kliničke mikrobiologije, prim. Marini Payerl-Pal, dr. med., ravnateljici Zavoda i voditeljici Djelatnosti kliničke mikrobiologije; Ines Novak, dipl. ing. molekularne biologije, pomoćnici ravnatelja za kvalitetu i Anici Kocjan, zdravstvenoj tehničarki laboratorijskog smjera na pomoći, savjetima u priavljanju dijela materijala za istraživanje. Također zahvaljujemo profesoricama Tamari Srnec, dipl. ing. mat. i Gabrijeli Brljak, mag. educ. philol. croat. te ostalim profesorima Gimnazije Josipa Slavenskog Čakovec koji su doprinijeli unapređenju ovog projekta.

LITERATURA

- Aigner I., Schavan A., Rösler P. 2011. Grundlagen der Antibiotika-Resistenz, DART Deutsche AntibiotikaResistenzstrategie. Bundesministerium für Gesundheit, Berlin, str. 17-18.
- Akinsulure O.R., Aibinu I.E., Adenipekun T., Adelowotan T., Odugbemi T. 2007. In vitro antimicrobial activity of crude extracts from plants *Bryophyllum pinnatum* and *Kalanchoe crenata*. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 4(3), 338-344.
- Boban M., Grga M. 2016. Antiseptici i dezinficijensi. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Katedra za farmakologiju (odsjek zdravstvenih studija), Split.
- Ćerić J., 2015. Kemijski sastav i antimikrobno djelovanje eteričnih ulja iz biljnih vrsta rodova *Salvia* L. i *Thymus* L. (specijalistički rad). Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb.
- EUCAST, 2020. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disc diffusion method, version 8.0, str. 8.
- Greblo K., 2009. Antioksidativno i antimikrobno djelovanje eteričnog ulja i ekstrakata lavande (završni rad). Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
- Hannan A., Saleem S., Chaudhary S., Barkaat M., Usman Arshad M. 2008. Antibacterial activity of *Nigella sativa* against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Ayub Medical College, Abbottabad 20(3).
- Lovrić S. 2014. Fiziološka i ekonomска značajnost fenolnih spojeva u biljci (završni rad). Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Osijek.
- Morović M., 2018. Uvod, M. Morović (ur.), Flavonoidi – metaboličke promjene i utjecaj na enzimske sustave (diplomski rad). Sveučilište u Splitu Kemijsko – tehnički fakultet i Medicinski fakultet, Split, str. 2-6.
- Musa M., 2017. Uvod, M. Musa (ur.), Mechanizmi stjecanja otpornosti na antibiotike kod bakterija (završni rad). Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, str. 1.
- Palfi M. 2017. Antifungalno djelovanje eteričnih ulja i njihovih komponenti na fitopatogene gljivice u *in vitro* uvjetima (doktorska disertacija). Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Institut Ruđer Bošković, Osijek.
- Paradićković N., 2014. Ljekovito i začinsko bilje (Nastavni materijal za modul Ljekovito i začinsko bilje). Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
- Park Talaro K., Talaro A. 2002. The Coccoci of Medical Importance, J. Sims Fornango (ur.), Foundations in Microbiology, fourth edition. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York, str. 544-552.
- Rapis M. 2018. Alles, was ich über Oregano-Öl sagen wollte. Narayana Verlag, Kandem.

USPOREDBA KOLIČINE ANTOCIJANA U UZORCIMA BOROVNICE, ARONIJE I MALINE

Tara Nemčić, 2. razred

V. gimnazija, Zagreb

Mentor: Romana Halapir Franković

SAŽETAK

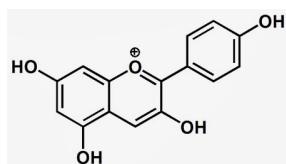
Istraživana je količina monomernih antocijana dobivenih iz voćnih sokova i kaša (aronije, borovnice, maline) izoliranih iz plodova uzgojenih u Hrvatskoj, te je prema provedenoj usporedbi sadržaja antocijana određen oblik voća najpogodniji za konzumaciju. Antocijani su određivani iz ekstrakata uzorka, koji su pripremljeni primjenom pH-diferencijalne metode, uz pomoć spektrofotometra modela UV/Vis Unicam Helios β , a pH-vrijednost uzorka je određivana pomoću univerzalnih indikatorskih papira. Najveća količina antocijana nađena je u aroniji i borovnici, za razliku od maline gdje je prisutan u manjim koncentracijama. Tijekom prerade količina se antocijana nije podjednako mijenjala, ali je u svim uzorcima određena u većim koncentracijama u posljednjem obliku obrade (pasterizirani sokovi). Pasterizacija uzorka, zbog termičke obrade ($80^{\circ}\text{C}/5\text{ min}$), je pripomogla i promovirala ekstrakciju i tako doprinijela većem sadržaju monomernih antocijana. Pasterizirani sokovi istraživanih crvenih voćnih vrsta, kao brz, jednostavan i pristupačan voćni obrok, izvrstan su izvor monomernih antocijana, suprotno uvriježenom mišljenju da je voćna kaša bogatija sadržajem bioaktivnih spojeva u odnosu na proizvod.

Ključne riječi: monomerni antocijani; pasterizirani sokovi; pH-diferencijalna metoda ekstrakcije

UVOD

Antioksidansi imaju ključnu ulogu u zaštiti stanice i organizma od oštećenja neutralizirajući slobodne radikale koji nastaju kao posljedica izloženosti dimu cigarete, različitim toksičnim tvarima, štetnom Sunčevom zračenju, itd. Veliki dio antioksidansa unosi se hranom koju konzumiramo, stoga je sve veći interes za istraživanjem ovih spojeva među znanstvenicima, ali i u industriji, koja dizajnira funkcionalnu hranu prema nutritivnim interesima potrošača (Granato i sur., 2020).

Voće kao prehrambena namirnica, osim izvora vlakana, brojnih vitamina i drugih hranjivih tvari, predstavlja jedan od najvećih izvora antioksidansa. Antioksidativni spojevi nalaze se u različitim vrstama voća, a njihova količina i kvalitativan sastav ovise o brojnim čimbenicima poput agro-tehničkih mjera uzgoja, klimatskih prilika, sortimentu, preradi, pa tako i o skladištenju svježih i/ili gotovih proizvoda (Tolić, 2015; Bursać i sur., 2015). Među voćem, a prema udjelu antioksidansa, posebno se ističu vrste bobičastog voća, u kojima su identificirani brojni bioaktivni spojevi sa dokazanim antioksidacijskim djelovanjima poput sastavnica polifenola, osobito flavonoida. Antocijani se ubrajaju u grupu flavonoidnih spojeva koji su glavni nosioci prirodne boje plodova voća i povrća koje ima crvenu, ljubičastu i plavu boju. Biljni su pigmenti topljivi u vodi i staničnom soku. Flavilijum struktura antocijana, načinjena od dva benzenska prstena povezana centralnim piranskim prstenom, a koja je prikazana na slici 1., deficitarna je na elektronu i zato je vrlo reaktivna. Iz tog razloga je i boja proizvoda koja potječe od sadržaja antocijana prilično nestabilna i promjene koje nastaju uglavnom su rezultat oksidacije, hidrolize ili ih uzrokuje dodatak soli ili metala.



Slika 1. Flavilijum struktura antocijana (G. Espino)



Stabilnost antocijana ovisi o mnogim čimbenicima, a naročiti utjecaj ima pH-vrijednost, upravo iz razloga što je antocijan u kemijskoj strukturi kation. Svojstvo antocijana da promjenom pH-vrijednosti mijenja strukturu i obojenost pigmenta, poslužilo je u razvijanju metoda za njihovo određivanje pa se tako danas kvantitativno određivanje monomernih antocijana najčešće provodi primjenom spektrofotometrijske pH diferencijalne metode (Fennema, 1985). Monomeri su manje molekule koja se međusobno povezuju formirajući polimere. Monomerni antocijani se u voću često nalaze kao polimeri. Monomerni antocijani imaju značaj u zdravoj prehrani jer se mogu probaviti u organizmu zbog jednostavnijeg strukturnog oblika (Repajić i sur., 2015).

Među glavnim predstavnicima trenda zdrave i funkcionalne prehrane u posljednje vrijeme ističe se takozvano bobičasto voće. Botanički gledano plodovi nekih od biljaka koje nutricionisti ubrajaju u bobičasto voće nisu bobe već zbirni plodovi (na primjer maline, kupine, jagode) no u ovom radu korišten je ovaj opisni izraz za korištene uzorce. Biljni pigmenti antocijani najznačajniji su za bobičasto voće gdje se, u usporedbi sa ostalim polifenolnim spojevima, nalaze u značajno većem udjelu. U plodovima različitih biljnih vrsta nalazimo različite vrste i udjele antocijana. Osim što su različite strukture antocijana različito obojene, različito su i stabilne tijekom prerade, stoga se posebna pažnja uslijed prerade treba posvetiti zaštiti njihove stabilnosti kako bi dobiveni proizvod i dalje bio nutritivno vrijedan (Repajić i sur., 2015).

Bobičasto voće privuklo je pažnju istraživača zbog potencijalnog pozitivnog utjecaja na zdravlje i sposobnosti prevencije kroničnih oboljenja. Danas se među voćem bogatim antioksidansima ističe i često spominju borovnica i aronija. U skorije vrijeme, aronija je pobudila veliki interes, no rijetko se konzumira kao svježa, te mnogo češće prerađena u sok ili želirani proizvod. Šumske borovnice, koje nisu monokultivirane, su danas pak sve manje zastupljene te su potrošačima sve više pristupačne tzv. američke borovnice, veće i kultivirane, vidno krupnijih bobica te sa sadržajem antocijana tek u pokožici (Varaždinske vijesti, 2017). Malina se puno češće spominje u kontekstu voća s idealnim omjerom vitamina, minerala i vlakana, a pokazano je da je odličan izvor elaginske kiseline i njezinih derivata.

Borovnica (*Vaccinium myrtillus* L.) se u Velikoj Britaniji od davnina koristila za brojne zdravstvene svrhe, poput liječenja probavnih smetnji. Ekstrakti bobica bogati polifenolnim kompleksima, osim vezanja i neutraliziranja slobodnih radikala, djeluju inhibirajuće na rast enteropatogenih bakterija, kao i bakteriostatski na tri stanične linije *Staphylococcus aureus*. Također imaju sposobnost da inaktiviraju i kratkotrajno imobiliziraju parazite bakterija ili praživotinja (Wang i sur., 2010).

Crna aronija (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott), podrijetlom je iz istočnog dijela Sjeverne Amerike, gdje je korištena za liječenje zdravstvenih stanja poput prehlade. Danas se aronija užgaja i u istočnoeuropskim zemljama, uključujući Hrvatsku, i Rusiju, gdje se koristi za proizvodnju domaćih ili komercijalnih sokova, džemova, voćnog čaja, vina i prirodnih prehrabnenih boja. Pokazuje visoku otpornost na mraz, oštećenja tijekom transporta i skladištenja u hladnom, zbog čega ima visoki potencijal za mehaniziranu berbu. Također, ima vrlo visoki sadržaj polifenola, i to fenolnih kiselina, proantocijanidina, antocijana, flavonola i flavanona. Zbog navedenih prednosti, u posljednje vrijeme povećana je popularnost aronije kao superiornog izvora antioksidansa (Tomić i sur., 2016).

Malina (*Rubus* sp.) koja se često konzumira se zbog svoje atraktivne boje i posebnog okusa, smatra se jednim od najbogatijih izvora prirodnih antioksidansa (Manganaris i sur., 2013). Malina se spominje još u kameno i brončano doba, a potječe iz Sjeverne Azije i Istočne Europe. Vjeruje se da je prvo pronađena



na planini Ida u Grčkoj, tako su joj Rimljani dali i ime Idaeus što u prijevodu znači "sa planine Ida". U vrijeme Rimljana i Grka upotrebljavana je kao lijek. Smatra se da su upravo Rimljani zaslužni za njen pojavljivanje u Europi. Maline su se intenzivnije počele uzgajati u XIX stoljeću. U XX stoljeću dogodila se masovna proizvodnja kultiviranih sorti (Volčević, 2005). Kultivirane sorte, uglavnom potječu od europske crvene maline (*R. idaeus vulgatus* Arrh.), američke crvene maline (*R. idaeobatus strigosus* Michx.) i crne maline (*R. idaeobatus occidentalis*) (Pritts, 2003).

Današnji stil života, koji se najčešće opisuje kao stresan i ubrzan, zbog velikog broja obaveza, prisilio je čovjeka da u svakodnevnu prehranu sve više uključuje brzo pripremljena jela koja su nutritivno deficitarna što dugoročno može imati negativne posljedice po zdravlje (Krsmanović, 2020). Kako bi što više izbjegli nezdrave namirnice, a i dalje koristili brzo pripremljene obroke, ljudi posežu za zdravim voćnim sokovima i već očišćenim, narezanim i pripremljenim obrocima voća i/ili povrća (Tomić i sur., 2016). U takvim obrocima ljudi najčešće izabiru voće bogato vitaminima i antioksidansima, pri čemu je jedan od najboljih izbora bobičasto voće, kao što je borovnica, malina i aronija. (Borić, 2015.)

Aronija, borovnica i maline su prepoznate kao vrlo vrijedne voćne vrste za kojima se kontinuirano bilježi rast potražnje na domaćem i inozemnom tržištu. Iz tog razloga one postaju sve učestalije u ponudi brojnih obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava u Republici Hrvatskoj što je istražio Šimić Z. za Jutarnji list (2018. godine).

Cilj ovog istraživanja je utvrditi i usporediti sadržaje monomernih antocijana u uzorcima kaša i voćnih sokova dobivenih iz plodova aronije, borovnice i maline, te odrediti vrstu voća i način obrade najpogodniji za konzumaciju. Time želimo utvrditi i je li aronija doista s razlogom favorizirana kao najbolji izvor monomernih antocijana. Također, istraživanjem ćemo provjeriti ovisnosti koncentracije antocijana o pH-vrijednosti voća.

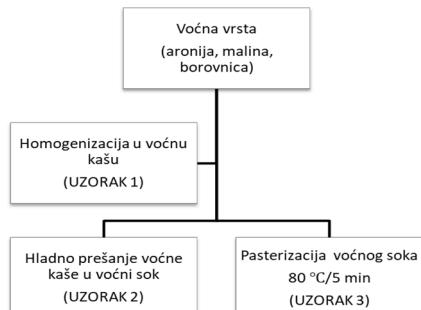
Prepostavljamo da aronija u svim oblicima sadrži više antocijana od borovnice i maline, da je najveći maseni udio antocijana prisutan u kaši zbog minimalne meaničke i ne termičke obrade te da je maseni udio antocijana veći što je pH – vrijednost uzorka manja.

METODE

U ovom projektu eksperimentalno su određene pH-vrijednosti i maseni udjeli monomernih antocijana u kašama i sokovima aronije, maline i borovnice. Borovnice, maline i aronije, približno 0,6 kg svake voćne vrste, nabavljene su ranije na tržnici od hrvatskih proizvođača te su skladištene u polietilenским vrećicama na -18 °C do provedbe analiza. Neposredno prije provedbe analiza, svi uzorci odmrznuti su na sobnoj temperaturi te je dio uzorka svake voćne vrste homogeniziran u kaše pomoću štapnog miksera.

Preostali dio svakog voća podvrgnut je hladnom prešanju pomoću sokovnika modela Hurom GI horizontalan sokovnik kako bi se od navedenih voćnih vrsta dobili sokovi. S ciljem utvrđivanja utjecaja toplinske obrade kao klasične metode za produljenje roka trajnosti voćnih sokova, svi pripremljeni sokovi su hermetički zatvoreni u staklene bočice i pasterizirani u vodenoj kupelji na temperaturi od 80 °C trajanju od 5 min.

Istraživanje je provedeno na ukupno 9 uzoraka kako je prikazano na slici 2., od čega po 3 uzorka za svako ispitivano voće.



Slika 2. Prikaz raspodjele 9 ispitivanih uzoraka

Određivanje pH -vrijednosti

U svakom uzorku, voćnim kašama svake voćne vrste kao i svim pripremljenim sokovima, svježim i pasteriziranim, određena je pH-vrijednost u tri ponavljanja pomoću univerzalnih indikatorskih listića prikazanih na slici 3.



Slika 3. Univerzalni indikatorski listić

Određivanje udjela monomernih antocijana

Za određivanje antocijana korištena je pH-diferencijalna metoda. pH-diferencijalna metoda zasniva na strukturnoj transformaciji kromofora antocijana u ovisnosti o promjeni pH. Antocijani podlježe reverzibilnoj strukturnoj transformaciji s promjenom pH koja se manifestira promjenom spektra absorbancije. pH-diferencijalna metoda za određivanje antocijana omogućava brzo i točno mjerjenje ukupnih antocijana, bez obzira na prisutnost polimeriziranih, degradiranih pigmenata i drugih tvari koje bi mogle smetati. Antocijani su određivani metodom prema Giusti i Wrolstadu (2001).

Postupak ekstrakcije

Uzorci su uzimani pipetom i odvagan je po 1 g uzorka (1-3 mL, ovisno o gustoći uzorka) na analitičkoj vagi modela Mettler Toledo MS-TS Analytical Balances. Odvagani uzorak stavljen je u tikvicu i pomiješan s 20 mL ekstrakcijskog otapala (1 % mravlje kiseline u 50 % otopini etanola). Tikvica je potom spojena na reflux hladilo i provođena je ekstrakcija pri 80 °C tijekom 15 min (vrijeme se mjeri od trenutka uspostavljanja θ = 80 °C). Nakon toga uzorak je profiltriran (kroz običan filter papir) u odmjernu tikvicu volumena 25 mL te kad se malo ohladio nadopunjen je sa ekstrakcijskim otapalom do oznake. Ovaj dio eksperimenta obavljen je u školskom kemijskom laboratoriju.

Postupak određivanja antocijana

Po 1 mL ekstrakta svakog uzorka otpipetiran je u dvije kivete. U jednu je kivetu dodano 4 mL pufera pH 1.5 (jer taj medij najviše odgovara svim antocijanima), a u drugu 4 mL pufera pH 4 (jer taj medij odgovara svim antocijanima u ravnoteži). Uzorcima se pomoću spektrofotometra modela UV/Vis Unicam Helios β prikazanog na slici 4. mjerila apsorbancija pri valnim duljinama od 520 nm - na toj



valnoj duljinu antocijani najbolje apsorbiraju i 700 nm - na toj se valnoj duljini najbolje apsorbiraju pigmenti koji ne dolaze od monomernih antocijana (Katalinić, 2006). Provjera uzorka je rađena paralelno. Ispitivanje se provedeno u Laboratoriju za procese konzerviranja i preradu voća i povrća Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog Sveučilišta u Zagrebu.



Slika 4. Spektrofotometar, model UV/Vis Unicam Helios β

U izračunu apsorbancije oduzimaju se te dvije vrijednosti dobivene mjerjenjem u različitim puferima kako bi se korigirala vrijednost monomernih antocijana, te da se oduzme onaj dio apsorbiranog pigmenta koji se odnosi na apsorpciju pri 520 nm, a ne potječe od monomernih antocijana. Ovo se provodi u svrhu preciznijeg izračuna udjela monomernih antocijana, jer se njihova struktura i boja izravno mijenja u ovisnosti o pH sredine (Katalinić, 2006).

Koncentracija antocijana računa se prema slijedećoj formuli:

$$c \text{ (antocijana)} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \frac{(A \cdot M \cdot FR \cdot 1000)}{\varepsilon \cdot l}$$

pri čemu su:

A - apsorbancija uzorka računata prema

$$A = (A_{520} - A_{700})^{\text{pH } 1.5} - (A_{520} - A_{700})^{\text{pH } 4.0}$$

M - molarna masa (za cijanidin-3-glukozid 449,2 [gmol] ^(-1))

FR - faktor razrjeđenja

ε - molarna absorptivnost, 26 900

I - duljina kivete, 1 cm

(M i ε su uzeti za dominantnu vrstu antocijana odnosno za cijanidin-3-glukozid).

Vrijednosti dobivene mjerjenjem apsorbancije pri dvije valne duljine te u dva pufera različitih pH-vrijednosti kao i koncentracije antocijana dobivene računanjem prethodnom formulom prikazat će se tablično. Maseni udjeli antocijana za uzorce svakog pojedinog voća bit će prikazani grafički. Ovisnost koncentracije antocijana o pH vrijednosti također će se prikazati tablično. Koncentracija je izražena kao mg antocijana po L ekstrakta, a maseni udio je izražen kao mg antocijana po 100 g voća.

Vrijednosti dobivene računanjem postotnih gubitaka/dobitaka masenih udjela antocijana prikazat će se grafički iz čega će se moći vidjeti povećanje ili smanjenje ekstrakcije antocijana ovisno o načinu mehaničke/termičke obrade. Postotni gubitci/dobitci masenih udjela antocijana izračunavaju se prema slijedećoj formuli:

$$X = \left(\frac{N_2}{N_1} / \frac{N_3}{N_2} - 100 \right) * 100$$

pri čemu su:

X-postotni gubitci/dobitci masenih udjela antocijana

N1-maseni udio antocijana kaše

N2- maseni udio antocijana soka

N3- maseni udio antocijana pasteriziranog soka.



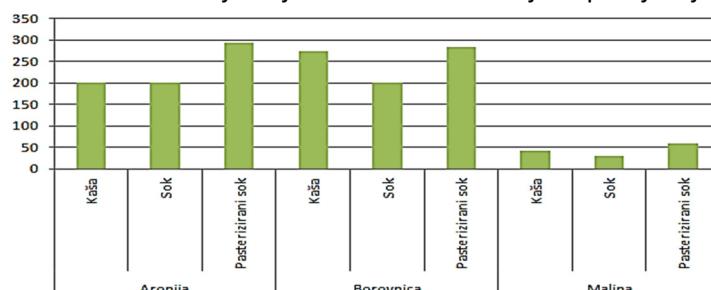
REZULTATI

U svim pripremljenim uzorcima aronije i borovnice izmjerena je vrijednost od pH 4, a u svim uzorcima maline izmjerena je vrijednost od pH 3 (tablica 1). U tablici 1. prikazane su vrijednosti apsorbancije za mjerene uzorce pri 520 i 700 nm, u pufferima pH- vrijednosti 1.5 i 4.0. Iz tablice je vidljiva najveća apsorbancija antocijana pasteriziranog soka aronije na 520 nm i kaše borovnice na 700 nm. Minimalna apsorbancija je u oba slučaja kod maline, gdje se na 520 nm minimalno apsorbirao sok, a na 700 nm pasterizirani sok.

Tablica 1. Vrijednosti apsorbancije pri 520 i 700 nm za uzorce kaše i sokova aronije, borovnice i maline

Vrsta voća	Oblik voća	Apsorbancija pri 520 nm		$A_{520\text{nm}}$ (pH 1,5 - pH 4,0)	Apsorbancija pri 700 nm		$A_{700\text{nm}}$ (pH 1,5 – pH 4,0)
		pH = 1,5	pH = 4,0		pH = 1,5	pH = 4,0	
Aronija	Kaša	1,205	0,228	0,997	0,045	0,034	0,011
	Sok	1,111	0,129	0,982	0,042	0,017	0,025
	Pasterizirani sok	1,598	0,180	1,418	0,020	0,003	0,017
Borovnica	Kaša	1,500	0,125	1,375	0,008	0,07	0,062
	Sok	1,072	0,104	0,968	0,004	0,008	0,004
	Pasterizirani sok	1,506	0,138	1,368	0,006	0,001	0,005
Malina	Kaša	0,286	0,071	0,215	0,010	0,027	0,017
	Sok	0,257	0,042	0,215	0,001	0,080	0,079
	Pasterizirani sok	0,328	0,051	0,277	0,011	0,011	0

Slika 5. prikazuje izračun masenih udjela antocijana u kaši, soku i pasteriziranom soku za svaku istraživanu vrstu voća. Pasterizirani sok aronije sadrži najveći maseni udio antocijana, a neznatno manje pasterizirani sok borovnice. Najmanji maseni udio antocijana primjećujemo u soku maline.



Slika 5. Maseni udjeli antocijana pojedine vrste voća i oblika - udio antocijana c (mg/100 g)

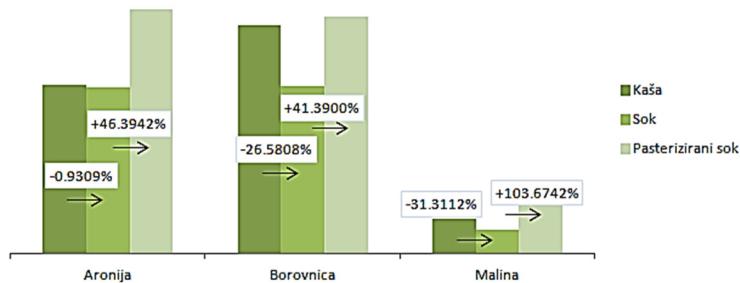
U tablici 2. prikazana je ovisnost masenog udjela antocijana u određenog uzorku o pH-vrijednosti uzorka. Iz podataka je vidljivo da uzorci s višim masenim udjelima imaju i viši pH dok je kod maline čiji svi uzorci imaju nižu pH-vrijednost zabilježen znatno manji udio antocijana.

Tablica 2. pH vrijednosti i maseni udjeli antocijana u istraživanim uzorcima kaša i voćnih sokova aronije, borovnice i maline

Uzorak	pH	Masenih udjela antocijana c (mg/100 g)
Aronija kaša	4	201,637
Aronija sok	4	199,760
Aronija pasterizirani sok	4	292,437
Borovnica kaša	4	274,070
Borovnica sok	4	201,220
Borovnica pasterizirani sok	4	284,505
Malina kaša	3	41,327
Malina sok	3	28,387
Malina pasterizirani sok	3	57,817



Slika 6. Prikazuje postotak dobivenih ili izgubljenih antocijana u ovisnosti o mehaničkoj i termičkoj preradi. Tako npr. zbog mehaničke prerade, sok aronije sadrži 0.931 % manji udio antocijana od kaše, a pasterizirani sok sadrži 46.394 % veći udio antocijana od soka koji nije termički obrađen.



Slika 6. Postotni gubitci masenog udjela antocijana iz uzorka kaša-sok i postotna povećanja masenog udjela antocijana iz uzorka i sok - pasterizirani sok

RASPRAVA

Postupak analize sastava neke tvari podložan je pogreškama koje mogu nastati zbog nepreciznosti u radu, opreme, nečistoća, a osobito ako svi postupci pripreme uzorka i mjerena nisu provedena po vrlo visokim kriterijima. Kako bi se umanjila mogućnost pogreške, provode se ponovljena mjerena, no zbog točnosti spektrofotometra, ponovljena mjerena nisu bila potrebna.

Naši rezultati apsorbancije, su za sve uzorke pokazali najbolju apsorbanciju pri 520 nm i pH-vrijednosti 1,5. U skripti dr. sc. Katalinić (2006) tablično prikazani oblici antocijana u medijima koji se razlikuju po pH-vrijednosti. Antocijani koji se nalaze u mediju kojem je $\text{pH} < 2$ kation antocijana je crveno obojen te svoj maksimum apsorbancije pokazuje upravo pri 520 nm što se u podudara s našim rezultatima.

Prikazana ovisnost udjela antocijana o vrsti voća na slici 5. djelomično potvrđuje našu hipotezu da od tri ispitivane vrste voća aronija doista ima najveći izmjereni udio antocijana, no to vrijedi samo za pasterizirani sok što je djelomično u skladu s istraživanjima Tomić i sur. (2016), Wang i sur. (2010) koji su svojim istraživanjima pokazali da aronija ima veći udio. Udio antocijana u malinama je najmanji u svim oblicima i znatno količinski odudara od udjela antocijana u aroniji. Borovnica ima slične vrijednosti udjela antocijana kao aronija u oblicima soka i pasteriziranog soka. U obliku pasteriziranog soka udio antocijana u borovnici je manji za 7,932 mg/100 g nego u aronije no u obliku soka i kaše borovnica ima veći udio antocijana. U soku borovnica ima samo 1,46 mg/100 g više antocijana od aronije, dok u obliku kaše znatno nadmašuje aroniju, za 72,433 mg/100 g. Mogući razlog tome je veća osjetljivost antocijana borovnica na mehaničku obradu koja može utjecati na promjenu oblika i stabilnost antocijana. Mehanička obrada općenito loše utječe na stabilnost antocijana jer se kod sve tri vrste voća opaža pad masenog udjela antocijana u preradi kaše u sok.

U istraživanju Katalinić (2006) objašnjeno je kako pod utjecajem povišene temperature u kiseloj sredini dolazi do hidrolize antocijana i nastajanja aglikonskog oblika - antocijanidina i šećera. Antocijanidin je nestabilniji od antocijana, slabije topljivosti i boje, a viša temperatura negativno djeluje na stabilitet i apsorpciju antocijana. Naši rezultati nisu u skladu s ovim istraživanjem budući da je vrijednost apsorpcije antocijana u pasteriziranom soku naših uzoraka svih vrsta bila veća od ostalih oblika. Smatramo da je razlog tome to što je pasterizacija u našem slučaju pomogla ekstrakciji pa u



pasteriziranom soku ima više pigmenata (antocijana). Sličan nalaz dobio je i Marsić i sur. (1948) u svom istraživanju. U istraživanju Bursać Kovačević i sur. (2016) u sokovima aronije uslijed provedenog postupka pasterizacije 80°C /2 min također je došlo do povećanja sadržaja antocijana u usporedbi s kontrolnim netretiranim sokovima.

Iz rezultata prikazanim u tablici 2. koja prikazuje ovisnost udjela antocijana o pH-vrijednostima uzorka, možemo zaključiti kako se pH vrijednost različitih uzorka istog voća ne mijenja prilikom mehaničke i termičke obrade. Tomić i suradnici u svom radu (2016) navode kako preradom sirovina dolazi do malih, gotovo neznatnih promjena pH-vrijednosti što je naše istraživanje također i pokazalo, to jest nije se promijenila pH-vrijednost u uzorcima kaše, soka i pasteriziranog soka iste vrste.

Istraživanje Tomića i sur. (2016.) ukazuje kako smanjenjem pH-vrijednosti raste udio antocijana no naši rezultati nisu u skladu s njihovim istraživanjem. Naše istraživanje pokazuje da je u uzorcima sa višim pH (aronija i borovnica) veći maseni udio antocijana a u nižem pH (malina) znatno niži maseni udio.

Antocijani pokazuju široki spektar boja zbog ionske prirode koja omogućava promjenu strukture antocijana s obzirom na pH, što rezultira različitim bojama i nijansama boja pri različitim pH-vrijednostima. U kiselom mediju antocijani se nalaze u obliku kationa i imaju crvenu boju, dok porastom pH antocijani prelaze iz obojenog u bezbojni-hidratizirani oblik. Utjecaj koncentracije H^{+} iona na stabilnost boje objašnjava se uspostavljanjem ravnoteže različitih tautomernih oblika kod različitih pH. Što je pH niži to je stabilnost boje veća jer je veći udio antocijana kation (Katilinić, 2006).

Moguće objašnjenje naših rezultata je najvjerojatnije pogreška pri mjerenu pH-vrijednosti pomoću indikatorskih papirića, što ste u ovom slučaju pokazalo nedovoljno preciznim. Izmjerene pH-vrijednosti bile bi puno preciznije i ne bi došlo do odstupanja da smo bili u mogućnosti određivati pH pomoću elektrode za mjerjenje pH što je svakako potrebno pa ćemo u nastavku istraživanja koristit precizniju metodu. Također, moramo uzeti u obzir kako smo određivali pH-vrijednost ekstraktima koji su osim uzorka sadržavali i 0.1 % mravlje kiseline u 50 % vodenoj otopini etanola što je utjecalo na povišenu vrijednost pH uzorka. U čistom uzorku teško bismo indikator papirićima odredili pH jer nisu dovoljno osjetljivi.

ZAKLJUČCI

Provedeno istraživanje sadržaja monomernih antocijana u uzorcima kaša i voćnih sokova dobivenih iz plodova aronije, borovnice i maline u svrhu određivanja vrste voća i načina obrade najpogodnijeg za konzumaciju iznjeljelo je slijedeće zaključke:

- ➊ Mehanička obrada loše utječe na stabilnost antocijana jer se kod sve tri vrste voća opaža pad masenog udjela antocijana u preradi kaše u sok.
- ➋ Pasterizirani sok imao je najveći maseni udio antocijana u usporedbi s kašom i sokom kod sve tri vrste voća.
- ➌ Aronija u usporedbi s borovnicom i malinom ima najveći maseni udio antocijana samo u pasteriziranom soku, dok u soku i kaši borovnica ima veći maseni udio.
- ➍ Aronija je zbog najvećeg masenog udjela u pasteriziranom soku, najpogodnija za termičku obradu i korištenje.
- ➎ Malina, iako ima relativno mali maseni udio antocijana, pogodna je za termičku obradu jer ima najveći postotni dobitak masenog udjela antocijana u preradi soka u pasterizirani sok.



- ↙ Metoda određivanja pH-vrijednosti indikatorskim papirićima pokazala se nedovoljno preciznom za ovaj tip uzorka
- ↙ Može se zaključiti da su pasterizirani sokovi istraživanih crvenih voćnih vrsta, kao brz, jednostavan i pristupačan voćni obrok, izvrstan izvor monomernih antocijana, unatoč tome što je uvriježeno mišljenje da je voćna kaša bogatija sadržajem bioaktivnih spojeva u odnosu na proizvod.

LITERATURA

- Borić S. 2015. Poduzetnički projekt na primjeru proizvodnje jagodičastog voća. Veleučilište u Karlovcu, <https://repozitorij.vuka.hr/islandora/object/vuka%3A29/dastream/PDF/view> (Datum pristupa: 13.11.2020.)
- Bursać Kovačević D., Gajdoš Kljusurić J., Putnik P., Vukušić T., Herceg Z., Dragović-Uzelac V. 2016. Stability of polyphenols in chokeberry juice treated with gas phase plasma, Food Chemistry, 212, 323 -331.
DOI:10.1016/j.foodchem.2016.05.192
- Bursać Kovačević D., Putnik P., Dragović-Uzelac V., Vahčić N., Skendrović Babojević, M., Levaj B.2015. Influences of organically and conventionally grown strawberry cultivars on anthocyanins content and color in purees and low-sugar jams, Food Chemistry, 181, 94-100. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.02.063.
- Espino G. Anthocyanins, the other pigments in the plant kingdom. University of Burgos, <http://ubuscientia.blogspot.com/p/anthocyanins-other-pigments-in-plant.html> (Datum pristupa: 13.11.2020.)
- Fennema O. R. 1985. Food Chemistry, Marcel Dekker, Inc., New York, str. 557-564.
- Giusti, M.M., Wrolstad, R.E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. U Current Protocols in Food Analytical Chemistry. R.E. Wrolstad, S.J. Schwartz (ur.). John Wiley & Sons, Inc. New York, NY. Pogl. 1.2.1 – 1.2.13
- Granato D., Barba F.J., Bursać Kovačević D., Lorenzo J.M., Cruz A.G., Putnik P. 2020. Functional Grash Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. Annual Review of Food Science and Technology, 11, (3), 93-118. DOI: 10.1146/annurev-food-032519-051708.
- Grash i sur. 2001. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. <Spectroscopy.file:///C:/Users/Tea/Downloads/giusti2001.pdf> (Datum pristupa:04.11.2020.)
- Pritts M. 2003. Greenhouse Raspberry Production
- Katalinić V. 2006. Kemija mediteranskog voća i tehnologija prerade. Kemijско-tehnološkog fakultet u Splitu, http://tkojetko.irb.hr/documents/13794_178.pdf (Datum pristupa: 17.03.2020.)
- Kordić M. 2015. Utjecaj načina hlađenja te sastava atmosfere na antioksidacijski kapacitet zapakiranih plodova malina tijekom skladištenja. Sveučilište u Zagrebu, <https://repozitorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf%3A6/dastream/PDF/view> (Datum pristupa: 17.03.2020.)
- Krsmanović E. 2020. Utjecaj medija na stjecanje prehrabnenih navika. Sveučilište Zadar, <https://zir.nsk.hr/islandora/object/unizd%3A4317/dastream/PDF/view> (Datum pristupa:13.11.2020.)
- Marsić M., Mikulić R. 1948. Rajčica i tehnologija rajčica. Nakladni zavod Hrvatske, Zagreb.
- Pritts M. 2003. Greenhouse Raspberry Production Guide. https://www.plantgrower.org/uploads/6/5/5/4/65545169/greenhouse_raspberry_production.pdf (Datum pristupa: 04.11.2020.)
- Repajić M., Bursać Kovačević D., Putnik P., Dragović-Uzelac V., Kušt J., Čošić Z., Levaj B. 2015. Influence of cultivar and industrial processing on polyphenols in concentrated sour cherry (*Prunus cerasus L.*) juice, Food Technology and Biotechnology, 53(2), 215-222.
- Šimić Z. 2018. OBTELJ KOVACIĆ UJEDINILA STRUČNJAKE I PROIZVOĐAČE BOBIČASTOG VOĆA 'Sokove i džemove od bobica radimo po bakinom receptu i pakiramo u boce-suvenire'.Jutarnji list, <https://www.jutarnji.hr/vijesti/hrvatska/obitelj-kovacic-ujedinila-strucnjake-i-proizvodace-bobicastog-voca-sokove-i-dzemove-od-bobica-radimo-po-bakinom-receptu-i-pakiramo-u-boce-suvenire-8036120> (Datum pristupa: 04.11.2020.)
- Tolić M. T., et al. "Phenolic Content, Antioxidant Capacity and Quality of Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Products." Food Technology and Biotechnology, vol. 53, br. 2, 2015, str. 171-179. <https://doi.org/10.17113/ftb.53.02.15.3833>. Citirano 15.01.2020
- Tomić A., Tomaz I., Jeromel A. 2016. Kemijski sastav voćnih vina od aronije. Glasnik Zaštite Bilja, 39(6), 63-69. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/172208> (Datum pristupa: 08.01.2020.)
- Trtinjak I. 2015. Utjecaj dodatka disaharida na udio fenola i antocijana u liofiliziranim kašama višnje. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, <https://repozitorij.ptfos.hr/islandora/object/ptfos%3A645/dastream/PDF/view> (Datum pristupa: 17.03.2020.)



- Wang B. C. 2010. The Stability and Antioxidant Activity of Anthocyanins from Blueberry. *Food Technology and Biotechnology*, 48 (1), 42-49. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/48434>
- Varaždinske vijesti.2017. Na OPG-u Đuras u Nedeljancu uzgajaju se američke borovnice <http://www.vidovec.hr/novosti/na-opg-u-duras-u-nedeljancu-uzgajaju-se-americkie-borovnice/>
- Volčević 2005. Jagoda, malina, kupina. <http://library.foi.hr/lib/knjiga.php?sqlx=45732&sqlid=20&B=20&H=>
- McDonner G., Denver Russell A. 1999. Antiseptics and disinfectants: Activity, action and resistance, 1999., <https://cmr.asm.org/content/cmr/12/1/147.full.pdf>, pristupljeno: 14. 12. 2019.



UTJECAJ MALOPRODAJNIH BIOCIDNIH SREDSTAVA NA BAKTERIJE

Rea Pešušić, 2. razred

Prirodoslovna škola Vladimira Preloga, Zagreb

Mentor: Karlo Horvatin

SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja je uzgojiti bakterije uzorkovane brisom površina u tramvaju te testirati učinak maloprodajnih dezinfekcijskih/antiseptičkih sredstava (kupovnog dezinficijensa za ruke, antibakterijskog sapuna i medicinskog alkohola, tj. 70%-tonog etanola) na rast kolonija bakterija iz uzorka. Prva hipoteza je da etanol najučinkovitije sprječava razvoj bakterijskih kolonija. Druga hipoteza je ta da antibakterijski sapun i maloprodajni dezinficijens imaju sličan utjecaj na bakterije. Pretpostavljalo se i da zona djelovanja dezinficijensa, tj. antiseptičkih sredstava na hranjivoj podlozi, neće biti vidljiva golom oku. Uzorci bakterija uzeti su iz niskopodnih tramvaja ZET-a sa gumenih rukohvata vatenim štapićima te naneseni na krutu hranjivu podlogu (agar) u Petrijevim zdjelicama, koje su bile prethodno. Površina Petrijevih zdjelica je bila podijeljena na četiri dijela. U tri dijela je postavljena spužvica (promjera 1x1 cm) natopljena: 70%-nim medicinskim alkoholom, maloprodajnim dezinficijensom za ruke, antibakterijskim sapunom, a zadnja četvrtina je bila ostavljena kao kontrola (bez spužvice). Petrijeve zdjelice su potom ostavljene da miruju tri dana u školskom laboratoriju (na oko 22°C), nakon čega su sve razvijene kolonije vidljive golim okom bile popisane, a vidljivi promjer oko natopljenih spužvica bez bakterija je izmijeren ravnalom. Zatim su uzeti uzorci svih kolonija te je provedeno bojenje po Gramu, radi razlikovanja uzgojenih kolonija. U svakoj je Petrijevoj zdjelici izbrojen broj različitih kolonija bakterija. Istraživanjem su potvrđene prva i druga hipoteza. 70%-tni medicinski alkohol dokazao se djelotvornijim od kupovnih dezinfekcijskih sredstava i antibakterijskih sapuna, a korištena kupovna sredstva za dezinfekciju nisu pokazala statistički značajnu razliku u učinkovitosti pri dezinfekciji.

Ključne riječi: biocid; dezinficijensi; bakterijske kolonije; mikroorganizmi; mikrobiološka analiza

UVOD

Biocidi su kemijski spojevi koji deaktiviraju mikroorganizme. Biocide dalje dijelimo ovisno o tome imaju li „–statski“ učinak (sprječavaju rast i sazvoj mikroorganizama – bakteriostatski, fungostatski i sporostatski) ili „–cidni“ učinak (ubijaju određene mikroorganizme – baktericidni, virocidni i sporicidni) (McDonner i Denver Russel, 1999). Antibiotici su biocidi koji ubijaju točno određene bakterije unutar tijela pri niskim količinama (McDonner i Denver Russel, 1999), dok su dezifencijensi i antiseptici biocidi koji imaju isto djelovanje, no drugačiju uporabu. Dezinficijensi se koriste za onesposobljavanje moguće patogenih mikroorganizama na površinama predmeta, dok se antiseptici koriste za onesposobljavanje moguće patogenih organizama na živom tkivu, na primjer, unutar rana. Ti mikroorganizmi su najčešće bakterije (Senior, 2018). Biocidi ubijaju bakterije na različite načine, ovisno o sastojcima od kojih su napravljeni. Na primjer, vodikov peroksid (H_2O_2) oksidira različite spojeve na površini bakterija, što izaziva raspadanje njihovih staničnih membrana (Senior, 2018). Alkoholi mogu izazvati štetu na staničnoj membrani i ubrzati denaturaciju proteina, na taj način ometajući stanične procese. Aldehydi, posebno glutaraldehidom, djeluju tako da u potpunosti unište staničnu stijenku, dok formaldehid može i probiti bakterijske spore. Smatra se da analidi djeluju tako da upiju u sebe citoplazmatsku membranu te na taj način unište bakteriju, a većinom se koriste u sapunima. Klorheksidin se uglavnom koristi u antisepticima, a djeluje tako da prvo uništi gornje slojeve stanice, zatim prijeđe putem pasivne difuzije unutar same bakterije i napadne njezinu unutrašnju membranu (McDonner i Denver Russel, 1999).

Bakterije se uzgajaju na hranjivoj podlozi, agaru. Web stranica Enciklopedija.hr navodi da je hranjiva podloga „prirodni ili umjetni medij za uzgoj organizama ili njihovih dijelova (tkiva, stanica), u kojem oni



rastu, trošeći tvari potrebne za sintezu staničnih sastojaka i za proizvodnju energije.” Mogu se koristiti za uzgoj kompleksnih i jednostavnih vrsta tkiva ili stanica, a razlikuju se, između ostalog, po tome jesu li tekuće ili čvrste. Tekuće podloge su, na primjer, mlijeko ili bujon, a čvrste želatina i agar. Sve one sadrže različite hranjive sastojke. Temeljni sastojci koje sadrže su voda, ugljik i izvori dušika i fosfora.

U ovome istraživanju cilj je uzgojiti bakterije iz tramvaja na krutoj hranjivoj podlozi te testirati učinak maloprodajnih dezinfekcijskih/antiseptičkih sredstava na njima – kupovnog dezinficijensa za ruke, antibakterijskog sapuna i medicinskog alkohola (etanol, 70 %-tni). Utjecaj će se gledati prema vidljivom radiusu oko spužvice natopljene biocidnim sredstvom unutar kojeg ne rastu bakterije. Također će se provesti Gram test, kojim će se procijeniti koliko različitih vrsta bakterija je prisutno na mjestu uzorkovanja. Odabrane su bakterije iz tramvaja, budući da se tramvajima voze stotine ljudi svakoga dana te su radi toga savršena mjesta za širenje zaraza. Da bi se to sprječilo, mnogi ljudi posežu za maloprodajnim biocidnim sredstvima, najčešće medicinskim alkoholom te raznim dezinficijensima, uključujući i antibakterijske sapune. Moja prva hipoteza je da etanol najučinkovitije sprječava razvoj bakterijskih kolonija (tj. na hranjivoj podlozi za uzgoj bakterija rezultira najvećim radijusom bez bakterija). Druga hipoteza je ta da antibakterijski sapun i maloprodajni dezinficijens imaju sličan utjecaj na bakterije. Ovi proizvodi su uglavnom razrijeđene verzije alkohola sa dodanim tvarima, ne bi li bili nježniji prema koži te stoga smatram da će imati sličan utjecaj. Pretpostavlja se i da zona djelovanja dezinficijensa, tj. antiseptičkih sredstava na hranjivoj podlozi, nije vidljiva golom oku.

METODE

Uzorci bakterija su bili uzeti iz niskopodnih tramvaja ZET-a sa gumenih visilica (koje bolje zadržavaju bakterije od metalnih držača) (Van Beek, 2011) vatenim štapićima te naneseni na krutu hranjivu podlogu (agar) u Petrijevim zdjelicama (koje su bile prethodno sterilizirane na 190 °C i agar je bio uliven u sterilnim uvjetima radi sprječavanja kontaminacije). Površina Petrijevih zdjelica je bila podijeljena na četiri dijela, u jedan je bila stavljena spužvica (promjer 1x1 cm) natopljena 70 %-tnim medicinskim alkoholom, u jedan maloprodajnim dezinficijensom za ruke, u jedan antibakterijskim sapunom, a zadnja četvrtina je bila ostavljena za kontrolnu skupinu, to jest, spužvica nije bila postavljena. Petrijeve zdjelice su potom bile ostavljene da miruju tri dana u školskom laboratoriju (na oko 22°C), nakon čega su sve razvijene kolonije vidljive golim okom bile popisane, a vidljivi promjer oko natopljenih spužvica bez bakterija je bio izmjerен ravnalom (slika 1). Zatim su bili uzeti uzorci svih kolonija, fiksirani provlačenjem kroz plamen, a bojanjem po Gramu je određena debljina njihove stjenke (slika 2) (Steward, 2019) te stavljeni pod povećanje od 1000× na svjetlosnom mikroskopu, radi razlikovanja uzgojenih kolonija. U svakoj je Petrijevoj zdjelici izbrojen broj različitih kolonija bakterija. Svaka je kolonija opisana te je određen oblik njihovih stanica i debljina stanične stjenke, kako bismo bili sigurni da se ne radi o istim bakterijskim vrstama.



Slika 1 Primjer Petrijeve zdjelice sa spužvicama (70 %-tni etanol gore desno, antibakterijski sapun dolje desno, dezinficijens za ruke dolje lijevo, kontrolna skupina gore lijevo)



Slika 2 Otopine korištene za bojanje po Gramu: Kristal violet (krajnje lijevo), Lugolova otopina (druga s lijeva), 70% etanol (drugi s desna) i karbol fuksin (krajnje desno).

Po jednoj vožnji tramvajem je bilo iskorišteno deset Petrijevih zdjelica, a proces je bio ponovljen ukupno tri puta. Ukupno je korišteno 30 Petrijevih zdjelica (tablica 1), a u svakoj je određen radius bez rasta bakterija za sva tri uzorka: 1. 70%-tni alkohol, 2. dezinficijens za ruke, 3. antibakterijski sapun (slika 1, tablica 1). Zadnja četvrtina Petrijeve zdjelice bila je bez ikakvog sredstva. Ukoliko bi se u toj četvrtini pokazale zone bez rasta bakterija, rezultati te Petrijeve zdjelice bili bi odbačeni zbog mogućih pogrešaka prilikom pripreme uzorka.

Tablica 1 Pregled skupina testiranih uzoraka u Petrijevoj zdjelici

Skupina 1	Skupina 2	Skupina 3	Kontrolna skupina
70%-tni medicinski alkohol	Dezinfcijens za ruke	Antibakterijski sapun	Bez sredstva

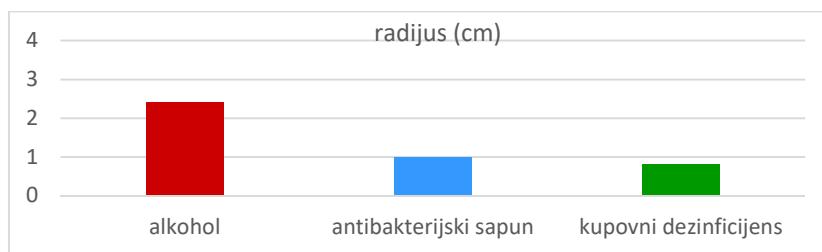
Za rezultate su bile prikazane srednje vrijednosti područja djelovanja biocida unutar svake grupe. Izračunata je aritmetička sredina radiusa inhibicije rasta bakterija za svaku skupinu uzoraka u sva tri pojedinačna ponavljanja ukupno.

Korišten je Studentov t-test za nesparene uzorke s razinom sigurnosti od 0,95. Ukupno su izrađena tri statistička testa. Prvi test određuje je li razlika u vrijednostima radiusa inhibicije rasta različita između 70%-tnog alkohola i dezinficijensa za ruke, a drugi određuje statističku razliku pri korištenju 70%-tnog alkohola i antibakterijskog sapuna.

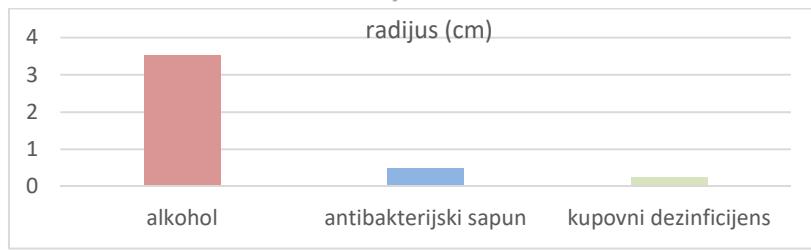
Treći statistički test uspoređuje zonu inhibicije pri usporedbi dezinficijensa za ruke i antibakterijskog sapuna kako bi se odredila moguća statistički značajna razlika između dva kupovna sredstva za dezinfekciju ruke.

REZULTATI

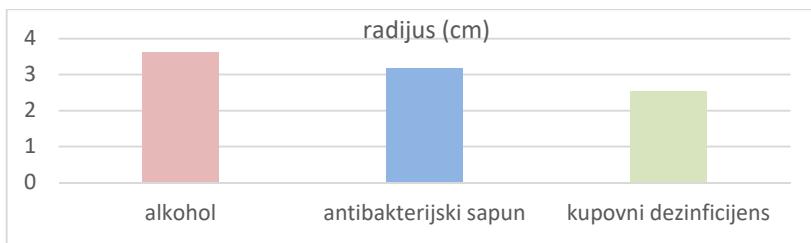
Radius djelovanja biocida bio je izmjerен po dužini i širini čistog područja oko svake spužvice u centimetrima. Kako područja nisu bila savršeno kružnog oblika, izračunat je prosjek područja djelovanja kao radius (npr., dužina 2 cm i širina 2,1 cm su bile računate kao radius 2,05 cm). Rezultati su prikazani ukupno kroz sva tri ponavljanja (slika 3.) te su prikazani i rezultati svakog ponavljanja zasebno (slike 4, 5 i 6).



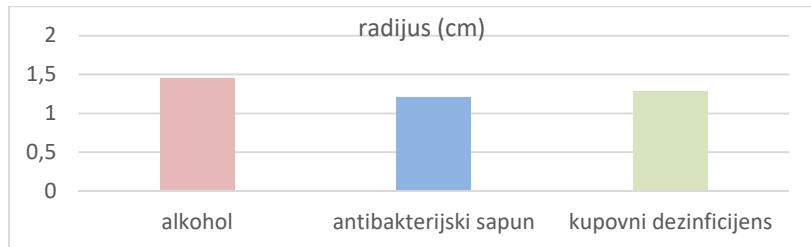
Slika 3 Aritmetička sredina radijusa inhibicije rasta za sva korištena sredstva. Prikazani su rezultati sva tri ponavljanja zajedno.



Slika 4 Aritmetička sredina radijusa inhibicije rasta za sva korištena sredstva. Prikazani su rezultati prvog ponavljanja.



Slika 5 Aritmetička sredina radijusa inhibicije rasta za sva korištena sredstva. Prikazani su rezultati drugog ponavljanja.



Slika 6 Aritmetička sredina radijusa inhibicije rasta za sva korištena sredstva. Prikazani su rezultati trećeg ponavljanja.

Rezultati statističkog testa ukazuju na sljedeće ukupne rezultate prilikom uspoređivanja pojedinih skupina testiranih uzoraka:

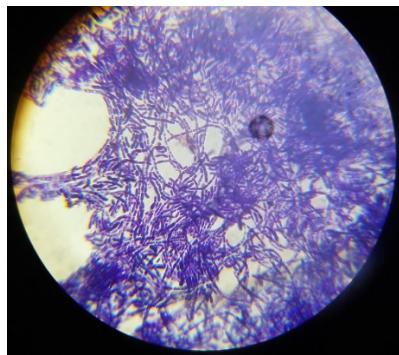
1. **alkohol – antibakterijski sapun:** razlika u radiusima ove dvije skupine **je** statistički značajna ($p = 0,002489$)
2. **alkohol – drogerijski dezinficijens:** razlika u radiusima ove dvije skupine **je** statistički značajna ($p = 0,000065$)
3. **antibakterijski sapun – drogerijski dezinficijens:** razlika u radiusima ove dvije skupine **nije** statistički značajna ($p = 0,4552$)

Iz toga slijedi da postoji statistički značajna razlika među alkoholom i antibakterijskim sapunom, te alkoholom i kupovnim dezinficijensom, no nema iste među antibakterijskim sapunom i kupovnim dezinficijensom.

Za sva je tri ponavljanja pokusa određen ukupni broj različitih kolonija bakterija. Uzorak svakog tipa kolonija bakterije je pripremljen za mikroskopiranje i uspoređivan (slika 7). Ukupno je pronađeno 8



različitih bakterijskih kolonija/vrsta u uzorcima. Svih 8 je pronađeno u prvom ponavljanju, dok je u drugom i trećem ponavljanju pronađeno samo 4 različitih bakerijskih kolonija (tablice 2 i 3).



Slika 7 Primjerak Gram pozitivne kolonije streptobacila, x1000

Tablica 2a Opisane bakterijske kolonije prvog, drugog i trećeg ponavljanja

Opisane bakterijske kolonije prvog ponavljanja		
Vrsta bakterije	Gram	Opis kolonije
bacili	negativno	Mutnobijela, svjetlucava, okruglog, pravilnog oblika, uzdignuta, različitih veličina
bacili	negativno	Sitna, ovalna, bijeda, pravilnog oblika, mat, ravna, jednakve veličine
bacili	negativno	Mutnobijela, mat, nepravilnog oblika, ravna, široka, različitih veličina
diplobacili	pozitivno	Jedna kolonija, sitna, okruglog oblika, svjetlucava, uzdignuta, tamnožuta
diplokoki	negativno	Svetložuta, sitna, uzdignutog kružnog pravilnog oblika, mat
bacili/diplokoki	negativno/pozitivno	Jedna kolonija, žuta, sitna, mat, uzdignutog nepravilnog oblika
streptobacili	pozitivno	Jedna kolonija, mutnobijela, mat, velika, nepravilnog oblika, ravne hrapave površine
tetrade	negativno	Jedna kolonija srednje veličine, nepravilnog oblika, mutnobijela, mat, ravna
Opisane bakterijske kolonije drugog i trećeg ponavljanja		
Vrsta bakterije	Gram	Opis kolonije
koki	negativno	Mala, okrugla, bijela, svjetlucava, uzdignuta pravilna oblika, jednakve veličine
streptobacili	pozitivno	Sitna, okrugla, mutnobijela, mat, ravna, različitih veličina, nepravilnog oblika
bacili	pozitivno	Sitna, zvjezdasta, bijedožuta, mat, jednakih veličina
diplobacili	negativno	Sitna, okruglasta, bijeda, pravilnog oblika, različitih veličina

RASPRAVA

Moja prva hipoteza bila je potvrđena („... etanol ima najveći radius bez bakterija, pošto se dezinficijensi za ruke i antiseptički sapuni baziraju na alkoholu.“). Prema p-vrijednostima, postojala je značajna statistička razlika između alkohola i ostalih biocidnih sredstava.

Moja druga hipoteza bila je potvrđena („... i antibakterijski sapun i drogerijski dezinficijens imaju statistički sličan utjecaj na bakterije.“). Prema p-vrijednostima, između kupovnog dezinficijensa i antibakterijskog sapuna nema statistički značajne razlike.

Ima nekih stvari koje valja napomenuti. Svi uzorci nisu bili uzeti iz istog tramvaja, niti su svi bili istoga soja bakterija, što je dovelo do značajne razlike u utjecaju biocida na njih, no svi uzorci su bili promatrani tri dana nakon prikupljanja te su se sve bakterije razvijale u istim uvjetima unutar digestora u školskome laboratoriju, ne bi li uvjeti bili kontrolirani. Ovaj eksperiment je bio proveden prije pandemije novog korona virusa te bi, ukoliko bi se provodio u trenutačnim okolnostima, rezultati zasigurno bili drugačiji, radi mjera sigurnosti koje uključuju stalno čišćenje i dezinficiranje vozila javnog prijevoza.

Učinkovitost različitih vrsta antiseptičkih sredstava već je testirana (Patel, 2019), no u ovome radu sam željela pomnije istražiti usporedbu iste s 70%-tним medicinskim alkoholom koji, unatoč većoj



učinkovitosti, možda nije idealno koristiti svaki dan, pošto nema nikakve spojeve dodane za zaštitu kože te ju lako može iziritirati tijekom dugotrajne upotrebe (de Haan i sur., 1996).

Vidljivo je da je u prvom ponavljanju bilo prisutno više vrsti bakterija nego u drugom i trećem. To je mogući razlog zašto je razlika mnogo veća u učinkovitosti korištenog alkohola i kupovnih sredstava (slika 4.). Alkohol očito djeluje negativno na širi spektar bakterijskih kolonija. U drugom i trčem ponavljanju moguće nisu bile prisutne kolonije koje bi bile otpronije na djelovanje kupovnih sredstava za dezinfekciju (slike 5 i 6). Ipak, kad se uzmu sva tri ponavljanja zajedno, alkohol se pokazao djelotvornijim na što je ukazao statistički test.

Trenutačno nije sigurno kako bi se ovaj eksperiment ponovio s obzirom na sadašnje mjere sigurnosti, no ukoliko bi u skoroj budućnosti bilo ponavljanja, predlažem nekoliko poboljšanja. Za početak, smatram da bi bilo dobro, ukoliko bi postojala mogućnost, identificirati bakterije, za razliku od samo testiranja po Gramu. Također, pomoglo bi ukoliko bi svi uzorci bili uzeti iz istog tramvaja, da se smanje varijacije. Bilo bi zanimljivo testirati različite koncentracije biocida, ne bi li se utvrdilo koja je optimalna za ubijanje bakterija.

ZAKLJUČCI

70%-tni medicinski alkohol djelotvorniji je od kupovnih dezinfekcijskih sredstava i antibakterijskih sapuna pri istoj korištenoj količini pri dezinfekciji. Korištena kupovna sredstva za dezinfekciju ne prikazuju statistički značajnu razliku u učinkovitosti pri dezinfekciji.

LITERATURA

- de Haan P., Meester H.H.M., Bruynzeel D.P. 1996. Irritancy of alcohols. U: Van der Valk P., Maibach H (eds). The irritant contact dermatitis syndrome. CRC Press, New York, NY; str. 65–70.
- Dolanec Z., Rusak G. 2013. Značenje bakterija za čovjeka i prirodu. U: T. Mezga (ur.), Živi svijet 2 – udžbenik biologije za drugi razred gimnazije, Profil, Zagreb, str. 40.
- Enciklopedija.hr. 2019. Hranjiva podloga, <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=26314>, pristupljeno: 14. 12. 2019.
- McDonner G., Denver Russell A. 1999. Antiseptics and disinfectants: Activity, action and resistance, 1999., <https://cmr.asm.org/content/cmr/12/1/147.full.pdf>, pristupljeno: 14. 12. 2019.
- Patel S. 2019. The efficacy of alcohol-based hand disinfectant products, <https://cdn.ps.emap.com/wp-content/uploads/sites/3/2004/06/040608The-efficacy-of-alcohol-based-hand-disinfectant-products.pdf>, pristupljeno: 19. 12. 2019.
- Senior K. 2018.Typesofbacteria.co.uk, How do disinfectants and antiseptics work, <http://www.typesofbacteria.co.uk/how-do-disinfectants-antiseptics-work.html>, pristupljeno: 14. 12. 2019.
- Steward K. 2019. Technologynetworks.com, Gram positive vs Gram negative, <https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/gram-positive-vs-gram-negative-323007>, pristupljeno: 15. 12. 2019.
- Van Beek H. K. 2011. California State science fair, Plastic vs. Metal: Where do germs prefer to ride, <http://csef.usc.edu/History/2011/Projects/J1524.pdf>, pristupljeno: 15. 12. 2019.



UTJECAJ VITAMINSKIH DODATKA PREHRANI NA MITARENJE PAPIGICE TIGRICE

Matej Ivan Sjekavica, 7. razred

Osnovna škola Ive Andrića, Zagreb

Mentor: Vida Bilogrević Gatolin

SAŽETAK

Mitarenje papigica tigrice je proces odbacivanja starog perja i njegova zamjena novim, koji se odvija dva puta godišnje. Tijekom mitarenja, papigice tigrice uobičajeno budu lošijeg raspoloženja, povučenije su, manje su sklone socijalnoj interakciji i razdražljivije su. Takvo ponašanje povezano je sa neugodom koju mitarenje za papigicu predstavlja, prvenstveno stoga što izbijanje novog perja svrbi, a papigica si u tome teško može olakšati. Jedan od osnovnih regulatora ponašanja ptice svakako je njena prehrana, te danas na tržištu postoji velik broj vitaminsko-mineralnih dodataka prehrani, od kojih se pojedini preporučuju upravo za pomoć u periodu mitarenja te olakšavanje simptoma istoga. S ciljem testiranja utjecaja vitaminskih dodataka prehrani na simptome mitarenja papigice tigrice osmišljeno je istraživanje. Kako bi se ostvario taj cilj, mjerjen je broj otpalog perja, socijalne interakcije te vrijeme provedeno izvan kaveza na primjeru mog kućnog ljubimca, papigice tigrice Čičija, s i bez vitaminskih dodataka prehrani, u periodu od 14 dana. Čič je zdrav mužjak, starosti 5 godina, koji od svojeg trećeg mjeseca života živi s mojom obitelji. Pitom je, druželjubiv, razigran i rado provodi vrijeme s poznatim ljudima i igračkama van krletke. Mitari se najčešće u jesen i proljeće, pri čemu se u tom periodu više osamljuje, nerado leti ili igra. Rezultati provedenog istraživanja ukazuju na značajan pozitivan utjecaj vitaminskog dodatka prehrani promatranim elementima Čičijeva ponašanja. U prosjeku mu je otpalo 6 komada velikog perja manje, provodio bi 40 minuta dnevno više u socijalnoj interakciji i 76 minuta više van kaveza u periodu u kojem su mu dodavani vitaminski preparati. Ovo istraživanje doprinosi boljem razumijevanju prehrane papigica tigrica te procesa mitarenja, kao i boljem stanju mog kućnog ljubimca.

Ključne riječi: mitarenje; raspoloženje; papigica tigrica; perje; vitaminski dodaci

UVOD

Danas su ptice rado uzgajani i uzdržavani kućni ljubimci, što je praksa koja svoje korijene pronalazi u Egiptu, oko 2250. godine prije Krista (Strasser, 2007). Najveći broj ptica koje ljudi drže kao kućne ljubimce su papige, od tigrice do hijacintnih ara (Strasser, 2007). Papige tigrice su razigrane, vesele, znatiželjne, vole svoje gospodare, jednostavne su i zabavne. Iznimno su društvene papigice, mogu naučiti oponašati riječi, pjesme ili ponašanja (Feldman i sur., 2019). Ipak, ima jedno doba kada su loše volje i nervozni. To doba se zove mitarenje. Tijekom mitarenja papige odbacuju staro perje, te ga zamjenjuju novim. Vrijeme mitarenja je raznoliko i ovisi o vrsti, veličini, spolu, dobi, zdravstvenom stanju i uvjetima u kojima ptica živi. Ono je svakako sezonsko, često usklađeno s reproduktivnim ciklusima (Moslavac, 2017) i događa se najčešće dva puta godišnje. Postoji proljetno, popularno nazvano "svadbeno presvlačenje" i jesensko, toplinsko, mimikrijsko mitarenje, koje je mnogo uočljivije (Husadžić, 2016).

Ovo je period u kojem je poželjno korigirati prehranu tigrice, obzirom da je mitarenje jedna od varijabli koja utječe na definiranje adekvatne prehrane za ptice (uz vrstu, dob, spol, genetiku, sezonu, smještaj, razinu aktivnosti, polaganje jaja, podizanje mladih, operavak od operacije, bolesti ili stresa) (Katić, 2018), imajući na umu kako se tigrice hrane biljem, mahom sjemenkama (Vlašić, 2019). Razlog poželjne korekcije prehrane u mitarenju je što perje čini najveći dio proteinske mase ptica - 5,7% u tigrica, što je 28% ukupnog proteina organizma. Prehrana samo sjemenkama dovodi do nedostatka vitamina topljivih u mastima i glavnih minerala (Ca, P, Na, Mn, Zn, Fe, I, Se), sadrži veliku količinu masti i neuravnotežene aminokiseline (Katić, 2018) te je potrebno educirati vlasnike o štetnosti prehrane samo na sjemenkama (Orosz, 2014).



Cilj ovog rada je istražiti utjecaj vitaminskih dodataka prehrani tigrice na elemente mitarenja, konkretno - duljinu trajanja mitarenja, socijalnu interakciju, vrijeme provedeno izvan kaveza, te količinu otpalog perja.

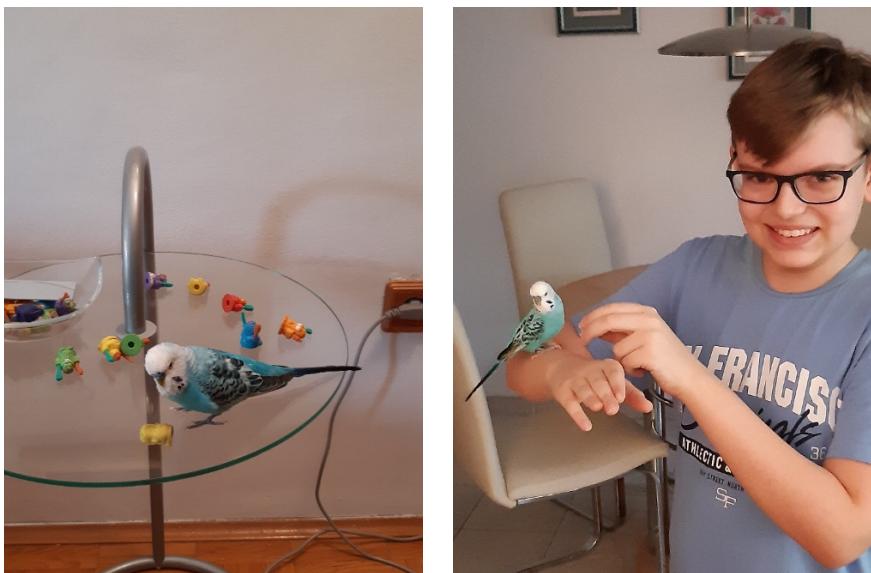
Hipoteze rada su sljedeće:

- ➊ Dodavanje vitaminskog dodatka u prehranu tigrica skratiti će vrijeme mitarenja.
- ➋ Dodavanje vitaminskog dodatka u prehranu tigrica smanjiti će količinu otpalog perja.
- ➌ Dodavanje vitaminskog dodatka u prehranu tigrica povećati će socijalnu interakciju u periodu mitarenja.
- ➍ Dodavanje vitaminskog dodatka u prehranu tigrica povećati će vrijeme provedeno izvan kaveza u periodu mitarenja.

Ovo istraživanje će pomoći boljem razumijevanju ponašanja tigrica i utjecaju dodataka prehrani na njihovo ponašanje u periodu mitarenja.

METODE

Postavljene hipoteze testirane su na uzorku mog kućnog ljubimca Čičija (slika 1). Čiči je mužjak, star 5 godina, koji od svojeg trećeg mjeseca života živi s mojom obitelji. U svom dosadašnjem životu nije patio od ozbiljnijih zdravstvenih problema. Pitom je, druželjubiv, znatiželjan i rado provodi vrijeme u igri izvan krletke. Mitari se najčešće u jesen i proljeće, pri čemu se u tom periodu više osamljuje, nerado leti ili igra. Mitari se dva puta godišnje – u proljeće i jesen.



Slika 1 Istraživački uzorak Čiči

Čičijevo mitarenje je praćeno u periodu od 1.5.2020. (početak mitarenja) do 15.5.2020. (zaključno s 14.5.2020.) u mom stanu u Zagrebu.

Za potrebe testiranja hipoteza mjerene su tri vrste podataka: broj otpalog, veličinom značajnijeg perja tokom dana; vrijeme provedeno u igri s ukućanima ili uobičajenim igračkama; vrijeme provedeno izvan kaveza.

Broj otpalog perja mjerjen je metodom vizualnog pregleda na kraju svakog dana, pri čemu je u obzir uzeto samo perje koje je veličinom i strukturom bilo značajnije, odnosno malena, mekana i iznimno lagana otpala paperja nisu ušla u proučavan broj. Vrijeme provedeno u igri (bilo s ukućanima ili



igračkama) mjereno je štopericom tijekom dana. Vrijeme je na razini svakog dana zbrojeno i prikazano u minutama interaktivno provedenog vremena. Vrijeme provedeno izvan kaveza mjereno je svakodnevno, štopericom, u periodu od 15 do 23 h. Naime, ovo je period u kojem je uzorku uvijek otvorena krletka, te ima slobodu odlučivanja želi li letjeti/igrati se van nje, ili provesti vrijeme pasivno, unutar krletke. Kao i vrijeme provedeno u igri, vrijeme provedeno van krletke je na razini svakog dana zbrojeno i prikazano u minutama aktivno provedenog vremena.

Prvih 7 dana podaci su mjereni bez dodavanja vitaminskih preparata u Čičijevu prehranu, a od 8. dana nadalje uzorku je dodavan multivitaminski dodatak ptičjoj prehrani Vitakraft, sve dok su postojali simptomi pojačanog opadanja perja. Vitakraft je dodavan prema preporučenoj dozi proizvođača za tigrice, po 3-4 kapi dnevno u 50ml vode za piće. 14. dan istraživanja bio je ujedno i zadnji dan, obzirom da taj dan nisu zabilježeni simptomi pojačanog opadanja perja.

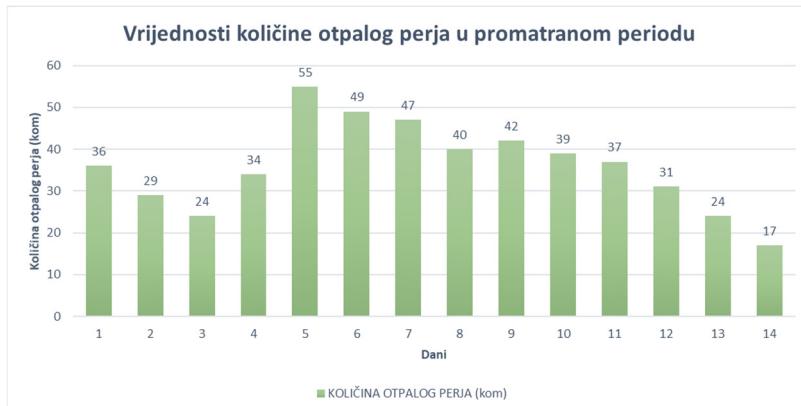
Prikupljeni podaci su potom sistematizirani u bazi podataka u Excel formatu, te je nad njima napravljena statistička analiza. Primjenjene su deskriptivne statistike (srednja vrijednost, minimum, maksimum, standardna devijacija).

REZULTATI

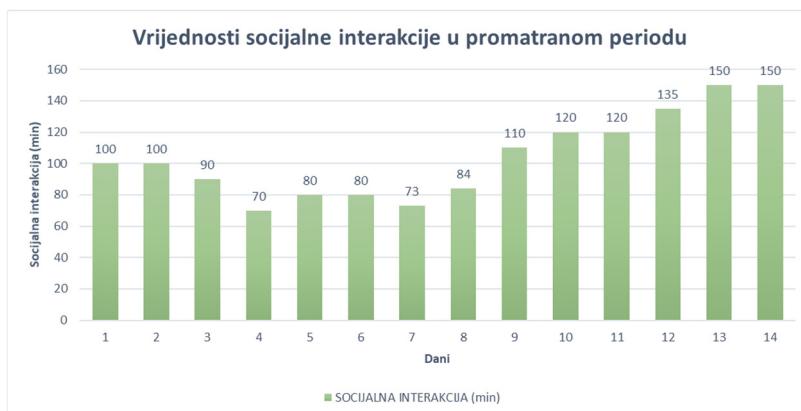
U nastavku su prikazani rezultati istraživanja. U tablici 1 su prikazane vrijednosti deskriptivnih statistika prikupljenih podataka u periodu istraživanja, a na slikama 2-4 su prikazana kretanja pojedinih varijabli u vremenu.

Tablica 1 Vrijednosti deskriptivnih statistika promatranih varijabli

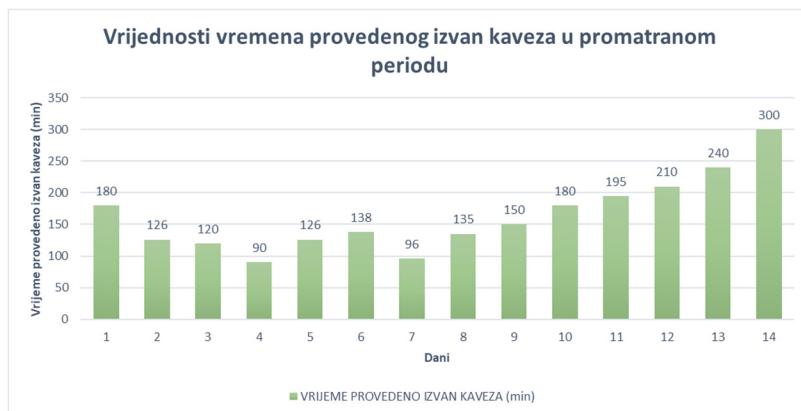
Varijabla	Količina otpalog perja (kom)	Socijalna interakcija (min)	Vrijeme provedeno izvan kaveza (min)
Aritmetička sredina	36,0000	104,4286	163,2857
Standardna pogreška	2,8128	7,2761	15,6351
Medijan	36,5000	100,0000	144,0000
Mod	24,0000	100,0000	180,0000
Standardna devijacija	10,5247	27,2247	58,5011
Varijanca uzorka	110,7692	741,1868	3422,3736
Kurtoza	-0,3501	-0,9608	0,8369
Iskrivljenost	-0,0074	0,5020	0,9977
Raspon	38,0000	80,0000	210,0000
Minimum	17,0000	70,0000	90,0000
Maksimum	55,0000	150,0000	300,0000
Zbroj	504,0000	1462,0000	2286,0000
Broj	14,0000	14,0000	14,0000
Nivo vjerojatnosti (95,0%)	6,0768	15,7191	33,7775



Slika 2 Količina otpalog perja u promatranom periodu



Slika 3 Socijalna interakcija u promatranom periodu



Slika 4 Vrijeme provedeno izvan kaveza u promatranom periodu

Prvenstveno je moguće ustanoviti kako se vrijeme mitarenja skratilo. Uobičajeno vrijeme mitarenja traje do mjesec dana, dok se uzorak do sada mitario u prosjeku oko 20 dana. Uvođenjem vitaminskih dodataka, to se vrijeme skratilo na 14 dana, kada više nije bilo primjetno značajno opadanje perja.

Vitaminski dodaci značajno su utjecali na pozitivne promjene svih promatralih elemenata. Uzroku je otpadalo manje perja od trenutka dodavanja vitaminskih dodataka prehrani, te je povećan njegov interes za socijalnom interakcijom i potreba za vremenom provedenim izvan kaveza. U prosjeku mu je otpalo 6 komada perja manje, provodio bi 40 minuta dnevno više u socijalnoj interakciji i 76 minuta



više van kaveza u periodu u kojem su mu dodavani vitaminski preparati, što čini smanjenje količine otpalog perja za 16%, povećanje interakcije za 47% te povećanje aktivnog vremena za 61% (tablica 2).

Tablica 2 Vrijednosti promatranih varijabli bez i s vitaminskim dodacima

	Količina otpalog perja (kom)	Socijalna interakcija (min)	Vrijeme provedeno izvan kaveza (min)
Bez vitaminskog dodatka	39,14	84,71	125,14
Sa vitaminskim dodatkom	32,86	124,14	201,43
Razlika	-6,29	39,43	76,29
Razlika (%)	-16%	47%	61%

RASPRAVA

Na temelju izloženih rezultata zaključeno je kako vitaminski dodaci pozitivno utječu na skraćenje vremena mitarenja i na sve promatrane elemente – količinu otpalog perja, socijalnu interakciju i aktivno provedeno vrijeme.

Iako je dodavanje multivitaminskih dodataka prehrani tigrica u periodu mitarenja generalno preporučljivo (Pet Network International, 2020; Tomašek, 2013), nije pronađen ni jedan rad na ovom području koji se bavio mjeranjem istovjetnih varijabli u tigrica, a s kojim bi se dobiveni rezultati mogli usporediti. Štoviše, da je iznimno teško, i u određenim slučajevima nemoguće, pronaći znanstvene recenzirane članke na temu utjecaja prehrane i ponašanja te razvoja određenih bolesti potvrđeno je i u istraživanju od Clark (2018).

Međutim, pronađena su istraživanja koja su pokazala porast nivoa cirkulacije i intenziteta boje novog perja pri dodavanju luteina u prehranu (Giraudieu i sur., 2013), vezu između produljenja vremena mitarenja i hormonalnog disbalansa (Cornelius i sur., 2011), te adekvatne prehrane i generalnog raspoloženja (Clark, 2018),

Iz danog presjeka literature moguće je zaključiti kako se radi o području koje tek valja temeljito istražiti ovakvim i sličnim istraživanjima.

Glavno ograničenje rada predstavlja činjenica da je istraživanje rađeno na uzorku od 1 papigice. Kako bi se hipoteze mogle potvrditi s većim stupnjem sigurnosti, bilo bi potrebno povećati uzorak.

Ovo istraživanje je doprinijelo boljem stanju mog kućnog ljubimca, kao i znanju na ovom području, ali i području prehrane papigica tigrica općenito.

ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata zaključeno je kako dodavanje vitaminskog dodatka prehrani papigice tigrice:

- skraćuje trajanje mitarenja
- smanjuje količinu otpalog perja za 16%
- povećaje socijalnu interakciju u periodu mitarenja za 47%
- povećaje vrijeme provedeno izvan kaveza u periodu mitarenja za 61%.

Daljnje istraživanja na području su potrebna radi stvaranja sveobuhvatnije baze podataka i boljeg razumijevanja utjecaja vitaminskih dodataka prehrani na mitarenje tigrica.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici, profesorici Vidi Bilogrević Gatolin na poticanju mog interesa za istraživački rad te svojoj dragoj sestri Marieli Sjekavici Klepo na vrijednim smjernicama pri njegovoj izradi.



LITERATURA

- Clark P. 2018. Diet and Behavior in Companion Parrots. IAABC Journal.
- Cornelius J. M., Perfito N., Zann R., Breuner C. W., Hahn T. P. 2011. Physiological Trade-Offs in Self-Maintenance: Plumage Molt and Stress Physiology in Birds, Journal of Experimental Biology 15 (214), 2768-77.
- Feldman A. K., Kim E., Sabuncu M. R., Goldberg J. H. 2019. Building a Basis for Budgie Behavior. A preprint.
- Giraudeau M., Sweazea K., Butler M. W., McGraw K. J. 2013. Effects of carotenoid and vitamin E supplementation on oxidative stress and plumage coloration in house finches (*Haemorhous mexicanus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 166(3), 406-413.
- Husadžić S. 2016. U koje vrijeme se ptice mitare? Međimurski list, <https://medjimirje.hr/magazin/zivotinje/mijenjanje-perja-kod-ptica-u-koje-vrijeme-se-ptice-mitare-11727/>, pristupljeno 1. 4. 2020.
- Katić R. 2018. Problematika prehrane insektivornih, granivornih i frugivornih ptica u zatočeništvu. Sveučilište u Zagrebu. Prirodoslovno-matematički fakultet.
- Moslavac S. 2017. Etogram žutokrestog (*Cacatua sulphurea citrinocristata* Fraser, 1844) i molučkog kakadua (*Cacatua moluccensis* Gmelin, 1788) u zatočeništvu. Sveučilište u Zagrebu. Prirodoslovno-matematički fakultet.
- Pet Network International. Poteškoće u mitarenju, <https://moj.pet-centar.hr/Pitajte-nase-veterinare-Ptice/Potesko%C4%87e-u-mitarenju-1913.html>, pristupljeno 1.4.2020.
- Pet Network International. Vitamini i minerali važni za zdravlje ptica i u periodu mitarenja, <https://moj.pet-centar.hr/Pitajte-nase-veterinare-Ptice/Vitamin-i-minerali-vazni-za-zdravlje-ptica-i-u-periodu-mitarenja-1408592.html>, pristupljeno 1. 4. 2020.
- Orosz S. E. 2014. Clinical Avian Nutrition. Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice 17(3) , 397 – 413.
- Strasser P. 2007. There are More Kinds of Birds than Simply Parrots. AFA Watchbird 34(3), 44-50.
- Tomašek M. 2013. Sve što treba znati o papigici tigrici kao kućnom ljubimcu, http://www.skole.hr/dobro-je-znati/rijec-strucnjaka?news_id=8506, pristupljeno 1.4.2020.
- Vlašić M. 2019. Morfološke osobitosti probavnog sustava u ptica s osvrtom na moguće bolesti. Sveučilište u Zagrebu. Veterinarski fakultet.