Hrvatsko biološko društvo
Societas biologorum croatica

Bioznalac

časopis učeničkih istraživanja iz biologije

2026.

Pokrovitelj:

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Biološki odsjek

ISSN 1849-837X

BIOZNALAC

časopis učeničkih istraživanja iz biologije

Izdavač

Hrvatsko biološko društvo

Rooseveltov trg 6 , 10000 Zagreb

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

E-mail: info@hbd-sbc.hr

SOCIETAS BIOLOGORUM CROATICA

Hrvatsko biološko društvo

ISSN 1849-837X

Uredništvo časopisa Bioznalac

Glavni urednik

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

Operativni urednik

Irena Labak, ilabak@biologija.unios.hr

Recenzenti

Mirela Sertić Perić

7. i 8. razred: *Vlatka Mičetić Stanković i Diana Vlahović*

1. i 2. razred: *Sandra Hudina i David Dianežević*

3. i 4. razred: *Ines Kovačić i Emina Pustijanac*

Web urednik

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

Ines Radanović

Bioznalac je elektronički časopis na web stranici HBD-a

i izlazi najmanje jednom godišnje

SADRŽAJ

Članak	Autori	Naslov rada	Razred	Mentor	Naziv škole	Stranice
1	*Bruno Domović* *Adam Duž*	**Utjecaj vodikovog peroksida na klijanje špinata i blitve**	7.	*Kaja Glavaš*	Osnovna škola Đure Deželića Ivanić-Grad, Ivanić-Grad	1 - 10
2	*Vito Majić* *Maja Ožanić*	**Proljetna flora urbanih i šumskih staništa našeg grada**	7.	*Nataša Kletečki*	OŠ Bogumila Tonija, Samobor	11 - 24
3	*Marija Perak*	**Ljekovite biljke – prijatelji ili neprijatelji povrtnim kulturama**	7.	*Tamara Banović*	Osnovna škola Josip Pupačić , Omiš	25 - 37
4	*Davor Sabol* *Andrija Tičinović*	**Utjecaj energetskih pića na rast i razvoj bakterije *Escherichia coli***	7.	*Martina Čiček*	Osnovna škola Augusta Šenoe, Zagreb	38 - 46
5	*Klara Šorša* *Lucija Lovrić*	**Utjecaj različitih količina mikroplastike na rast vodene leće (*Lemna minor* L.)**	7.	*Nikolina Konjuh Reljić*	Osnovna škola Tituša Brezovačkog, Zagreb	47 - 52
6	*Dorothy Ward*	**Utjecaj solnog stresa na količinu klorofila u listu graha**	7.	*Martina Sušjenka*	Osnovna škola Ljudevita Gaja, Osijek	53 - 61
7	*Dora Đurkan* *Marta Likić*	**Protukarijesni učinak žvakaćih guma sa ksilitolom i glukoznim šećerom na pH i količinu sline**	8.	*Sanja Irić Šironja*	Osnovna škola Augusta Cesarca, Zagreb	62 - 72
8	*Anastazija Gubina*	**Postoji li utjecaj gorenja plastike na zdravlje našeg okoliša**	8.	*Jasna Rebrina*	Osnovna škola Mladost, Osijek	73 - 85
9	*Nika Janković* *Greta Voldin*	**Zalogaj koji se pamti**	8.	*Ana Pilipović Klobučarić*	Osnovna škola Svete Ane u Osijeku, Osijek	86 - 93
10	*Dora Kern* *Kaja Perica*	**Deklaracija i kvaliteta kestenova meda**	8.	*Martina Čiček*	Osnovna škola Augusta Šenoe, Zagreb	94 - 104
11	*Marta Miketa*	**Bioplastika kao rješenje za održivu budućnost**	8.	*Đurđica Patafta*	OŠ Ljudevita Gaja, Zaprešić	105 - 114
12	*Leona Ralić*	**Utjecaj intenziteta svjetlosti na gustoću puči i razvoj listova zlatnog puzavca**	8.	*Sanja Kovačić*	OŠ Ljudevita Gaja, Zaprešić	115 - 123
13	*Patrik Zima*	**Alergijski potencijal urbane invazivne flore grada Požege**	8.	*Ana Perić*	OŠ Antuna Kanižlića, Požega	124 - 130
14	*Andrej Bartulin* *Antonio Matej Gverić*	**Ispitivanje genotoksičnosti i citotoksičnosti fotopolimerske smole**	2.	*Vesna Dobronić*	III. gimnazija, Split	131 - 142
15	*Lili Bračić* *Emilia Ćurapov*	**Utjecaj glikemijskog indeksa obroka na sitost i kognitivne sposobnosti učenika**	2.	*Romana Halapir Franković*	V. gimnazija, Zagreb	143 - 157
16	*Frano Lovrić*	***In vitro* utjecaj kofeina na kolonijalni rast odabranih sojeva probiotskih bakterija**	2.	*Gabrijela Dragičević Anokić*	EDukOS – privatna srednja škola s pravom javnosti, Osijek	158 - 167
17	*Vita Vadlja* *Eva Radiković*	**Može li nepravilno odlaganje lijekova imati negativan utjecaj na biljke?**	2.	*Denis Horvat*	Srednja škola Čakovec, Čakovec	168 - 178
18	*Nora Burić* *Dora Matejčić*	**Fiziološke reakcije na atraktivna lica**	3.	*Vesna Dobronić*	III. Gimnazija, Split	179 - 190
19	*Matko Celić*	**Utjecaj UV-zračenja na dostupnost peptidnih veza u kolagenu**	3.	*Ines Tovarović*	Gimnazija Petra Preradovića Virovitica, Virovitica	191 - 200
20	*Ava Grace Mandić Macneill* *Petar Vojković*	**Analiza fizikalno-kemijskih svojstava i mikrobiološkog sastava vode na otoku Visu**	3.	*Josipa Poduje*	Srednja škola Antun Matijašević Karamaneo, Vis	201 - 214
21	*Noa Petak* *Marko Tatarović*	**Utjecaj duhanskog dima na oralni mikrobiom**	3.	*Karlo Horvatin*	Prirodoslovna škola Vladimira Preloga, Zagreb	215 - 222
22	*Franka Atlija* *Kaja Cvitanović*	**Ispitivanje razlika u citotoksičnom i genotoksičnom djelovanju sintetičkih i prirodnih boja za kosu metodom *Allium*-testa**	4.	*Josipa Poduje*	Srednja škola Antun Matijašević Karamaneo, Vis	223 - 233
23	*Nika Baričić* *Marina Margetić*	**Utjecaj različitih frekvencija zvuka na rast i klijanje biljke graha**	4.	*Romana Halapir Franković*	V. gimnazija, Zagreb	234 - 240
24	*Anton Ladović*	**Usporedba redukcijske snage i bioloških učinaka biljnih ekstrakata u ROS-ovisnim procesima**	4.	*Borna Louvar*	Gimnazija Petra Preradovića Virovitica, Virovitica	241 - 254
25	*Sara Polašek*	**Mužjaci bez očeva i sinova: morfometrijska analiza asimetrije prednjih krila i glave papirnih osa roda *Polistes***	4.	*Gorica Grozdanić*	Prirodoslovna škola Vladimira Preloga, Zagreb	255 - 264

Članak	Autori	Naslov rada	Razred	Mentor	Naziv škole	Stranice
Državna smotra i natjecanje hrvatskih GLOBE škola 2026.						
26	*Josip Ćatipović* *Rina Knezović* *Tonka Stanić*	**Kvaliteta morske vode i školjkaša kao pokazatelj promjena morskog ekosustava u omiškoj gradskoj luci**	7. i 8.	*Tamara Banović*	Osnovna škola Josip Pupačić, Omiš	265 - 275
Državno natjecanje iz biologije 2025.						
27	*Nela Benjak* *Edna Kapetanović*	**U potrazi za zaštićenom florom**	7.	*Đurđica Patafta*	OŠ Ljudevita Gaja, Zaprešić	276 - 286
28	*Julia Berger* *Leona Ralić*	**Zelena baština bana Josipa Jelačića**	7.	*Đurđica Patafta*	OŠ Ljudevita Gaja, Zaprešić	287 - 295
29	*Greta Drakšić* *Elena Kiseljak*	**Analiza i usporedba sastojaka žirova dviju vrsta hrasta**	7.	*Đurđica Patafta*	OŠ Ljudevita Gaja, Zaprešić	296 - 302
30	*Mila Gržetić* *Ana Ivetić*	**Svilena krila**	7.	*Maja Curić*	OŠ Vladimira Nazora Pazin, Pazin	303 - 315
31	*Mia Sesar*	**Utjecaj broja gnijezda i ponašanje vrana na suživot s ljudima**	8.	*Jasna Rebrina*	Osnovna škola Mladost, Osijek	316- 323
32	*Sara Polašek*	**Istina ili mit: kućni pripravci za čišćenje i UV zaštitu**	3.	*Gorica Grozdanić*	Prirodoslovna škola Vladimira Preloga, Zagreb	324 - 333
Državno natjecanje iz biologije 2024.						
33	*Eva Čakanić* *Petra Ćurković*	**Utjecaj različitih čimbenika na klijavost i rast boba (*Vicia faba* L.)**	7.	*Nataša Kletečki*	Osnovna škola Bogumila Tonija, Samobor	334 - 342
34	*Karlo Kabalin*	**Koliki broj bakterija sadrže spužve i krpe za brisanje školske ploče?**	8.	*Nikolina Konjuh Reljić*	Osnovna škola Tituša Brezovačkog, Zagreb	343 - 349

Utjecaj vodikovog peroksida na klijanje špinata i blitve

Bruno Domović, 7. razred
Adam Duž, 7. razred

Osnovna škola Đure Deželića Ivanić-Grad, Ivanić-Grad
Mentor: *Kaja Glavaš*

SAŽETAK
Vodikov peroksid (H_2O_2) je reaktivna molekula koja ima dvostruku ulogu: sudjeluje u fiziološkim i razvojnim procesima biljaka te u otpornosti sjemena na stres. Hoće li vodikov peroksid imati pozitivan ili negativan učinak na biološki sustav ovisi o njegovoj koncentraciji, fiziološkim uvjetima i specifičnostima procesa na koje utječe. Dokazano je da tretiranje sjemena otopinom vodikovog peroksida prije sjetve poboljšava kvalitetu sjemena što rezultira boljom klijavošću i većom energijom klijanja, a djelomično uklanja i učinke starenja sjemena. Cilj istraživanja jest utvrditi kako vodikov peroksid utječe na klijanje sjemena i rast klice špinata i blitve. U istraživanju je korišteno sjeme špinata i blitve koje je namakano u otopinama vodikovog peroksida koncentracije 0,15; 0,30; 0,45; 0,60 i 0,75 mol/dm^3 (M) te su rezultati uspoređeni s kontrolnom skupinom sjemena koje je namakano u vodi. Istraživanje je provedeno u kontroliranim uvjetima temperature, vode i svjetlosti. Sjemenke su nakon namakanja isprane destiliranom vodom i stavljene u Petrijeve zdjelice (na navlažene blazinice) te odložene na tamno mjesto. Svakodnevno su praćene promjene i nakon pojave klica počelo se s mjerenjem duljine klica. Zaključeno je da sjeme špinata i blitve koje je prethodno namakano u otopini vodikovog peroksida koncentracije 0,45 M; 0,60 M i 0,75 M klija bolje od sjemena koje je bilo namakano u običnoj vodi, sjeme namakano u 0,15 M otopini vodikovog peroksida pokazalo je slabiju klijavost, dok je klijavost sjemena namakanog u 0,30 M otopini slabija kod blitve ali bolja kod špinata.

Ključne riječi: *sjeme; tama; klijanje; kisik*

UVOD

Zeleno voće i povrće podiže imunitet te ima pozitivan učinak na normalno funkcioniranje žlijezda, poboljšava rad probavnog sustava te smanjuje upalne procese u organizmu (Rastija, 2021). Hipokrat je 430 godina prije nove ere poznatom rečenicom „Sve što hranom unosimo u organizam gradi nas i mijenja, a o tome što smo unijeli ovisi naša snaga, naše zdravlje i naš život“ postavio temelje značaja pravilne prehrane u životu čovjeka (Alibabić i Majić, 2016). Znanost potvrđuje da su nepravilna prehrana, opasnosti koje dolaze iz hrane te način života rizični faktori kroničnih nezaraznih oboljenja koja su uzroci preko 65 % smrtnosti u svijetu. Zelena hrana je oduvijek bila osnova prehrane čovjeka, no danas ljudi sve manje jedu hranu zelene boje te ju zamjenjuju hranom koja je prerađena, rafinirana i puna pesticida. Pojam zelene hrane se odnosi na hranu koja sadrži visoke koncentracije klorofila. Klorofil sudjeluje u izgradnji hemoglobina, ubrzava procese izbacivanja toksina iz krvi, crijeva i jetre te ima mogućnost vezanja teških metala i izbacivanja istih iz organizma. Osim toga, zelena hrana sadrži aminokiseline koje su potrebne za obnavljanje stanica, tkiva i organa (Rastija, 2021). Upravo spoznaja da unosom zelene hrane u svoj organizam možemo osigurati zdraviji život i spriječiti brojne bolesti motivirala nas je na ovo istraživanje. Željeli smo istražiti možemo li ubrzati klijanje špinata i blitve kako bi skratili vrijeme potrebno za uzgoj ovog lisnatog povrća što bi bilo korisno u poljoprivredi jer bi osiguralo bržu dostupnost špinata i blitve tijekom cijele godine. Saznali smo da je uzgoj špinata i blitve jednostavan, da oba povrća imaju visoku nutritivnu vrijednost i nisku energetsku vrijednost te se mogu kontinuirano brati u vrtu. Proučavanjem literature saznali smo da su obje vrste otporne na hladnoću i prilagođene hrvatskoj klimi te da su idealne za početnike u vrtlarstvu (Jurišić, 2024).

Kako bi biljke preživjele nepovoljne uvjete razvile su mehanizam koji usporava ili sprječava klijanje sjemena u nepovoljnim uvjetima, a to je mirovanje sjemena ili dormancija. Razlikujemo dvije vrste mirovanja sjemena: egzogeno (fizičko) mirovanje koje nastaje zbog fizičkih ograničenja koje uzrokuje sjemena ljuska i endogeno (fiziološko) mirovanje koje je povezano s fiziološkim uvjetima unutar samog embrija (Črmelik i Perica, 2007). Jedan od najvažnijih čimbenika za klijanje sjemena je voda jer proces klijanja počinje unosom vode u suho sjeme i završava pucanjem sjemene ljuske i pojavom klice. Klijanje započinje osiguravanjem povoljnih uvjeta okoline, te se može podijeliti u četiri faze (Benko, 2024):

- upijanje vode i bubrenje sjemena (sjeme je hidrofilno i voda koja se apsorbira kroz sjemenu ljusku difundira u sva tkiva sjemena);
- stvaranje ili aktiviranje enzima koji povećavaju aktivnost metabolizma (tijekom ovog perioda stanice embrija oblikuju vakuole, dolazi do mobilizacije rezervi hrane u sjemenu);
- izduživanje stanica klicinog korijenka i probijanje korijenka kroz sjemenu ljusku (u pravilu korijen izbija prije pucanja sjemene ljuske omogućujući mu da uspostavi vezu s vlažnim tlom);
- nastavak rasta klice i klijanca (rast je moguć zbog rezervi hrane koja se skladišti u tkivima i postupno se smanjuje kako se rezerve crpe).

Sjeme niske kvalitete često sporije klija, što čini klice osjetljivijima na nepovoljne klimatske uvjete, smanjuje ukupnu klijavost i uzrokuje nepravilan rast klica. Sjemenke koje imaju tvrde, debele sjemene ljuske koje fizički sprečavaju prodiranje vode ili kisika u sjemenku nazivaju se sjemenkama u stanju fizičkog mirovanja. Fizičko mirovanje može se prekinuti prirodno (upijanjem vode) ili umjetno (suhom toplinom, upijanjem vruće vode, kiseline ili drugih kemikalija koje mogu otvoriti sjemenu ljusku i omogućiti sjemenu da apsorbira vodu i kisik potreban za klijanje) (Bakotić, 2019). Jedan od načina prekida fizičkog mirovanja je i namakanje u otopini vodikovog peroksida. Prethodnim istraživanjima dokazalo se da otopina vodikovog peroksida ima utjecaja na klijanje sjemena, no točan mehanizam djelovanja još uvijek je nepoznat (Wojtyla i sur., 2021).

Pozitivni učinci korištenja vodikovog peroksida u vrtlarstvu (Local Gardener, 2024):

- Prekida mirovanje sjemena. Čvrsta sjemena ljuska može odgoditi klijanje. Vodikov peroksid omekšava sjemenu ljusku i omogućava vodi i kisiku da brže dođu do embrija, što aktivira rast.
- Bori se protiv patogena. Vodikov peroksid je prirodno dezinfekcijsko sredstvo koje ubija bakterije, gljivice i mikroorganizme koji mogu ometati klijanje sjemena ili oštetiti sadnice.
- Omogućava bolju opskrbu kisikom. Vodikov peroksid tijekom raspada oslobađa kisik te stvara okruženje bogato kisikom a to potiče brže i zdravije klijanje.
- Djeluje kao signalna molekula. Niske koncentracije vodikovog peroksida komuniciraju s mrežom hormona sjemena (apscizinska kiselina, giberelini, auksin, jasmonati i salicilna kiselina) te potiču prijelaz sjemena iz stanja mirovanja u aktivno klijanje.

Negativni učinci korištenja vodikovog peroksida u vrtlarstvu (Local Gardener, 2024):

- Oksidativna oštećenja stanica. Višak vodikovog peroksida stvara reaktivne vrste kisika (ROS) koje oštećuju staničnu membranu stanica, proteine i DNK.
- Inhibicija enzima. Visoki oksidativni stres inhibira enzime odgovorne za klijanje.
- Smanjena održivost sjemena.

Strategije za poboljšanje rasta i razvoja poljoprivrednih vrsta istražuju se već dugi niz godina. Ranija istraživanja dokazala su da vodikov peroksid može poboljšati klijanje sjemena kada se koriste otopine malih koncentracija (0,10 – 1 M) i kraće vrijeme namakanja (do 24 sata), dok veće koncentracije

otopina (> 1 M) ili duže vrijeme namakanja (više od 25 sati) djeluju fitotoksično na sjeme (Chu i sur., 2022). Katzman i sur. (2001) su utvrdili da sjeme špinata koje je bilo namakano 19 sati u 0,30 M otopini vodikovog peroksida klija brže od sjemena koje je bilo namakano u vodi. Prethodno namakanje sjemenki graška (24 sata) u otopini vodikovog peroksida potaknulo je klijanje sjemenki i snažniji rast sadnica graška što je u skladu sa signalnom ulogom vodikovog peroksida u ranom klijanju (Barba-Espín i sur., 2010). Sjemenke šećerne repe koje su namakane u 1 % otopini vodikovog peroksida sedam dana u tami imale su 70 % veću klijavost u odnosu na kontrolnu skupinu namakanu u vodi (Chu i sur., 2022). Također je uočena poboljšana klijavost i tolerancija na duboku sjetvu kod sjemenki pšenice koje su prethodno tretirane s vodikovim peroksidom (Centinel i sur., 2021).

Zrelo sjeme je prilično suho i treba velike količine vode. Potrebna količina vode ovisi o veličini sjemena i o njegovom kemijskom sastavu – sjeme koje posjeduje veći sadržaj bjelančevina upija više vode od sjemena koje sadrži veću količinu škroba. Apsorpcijom vode dolazi do aktiviranja hidrolitičkih enzima, razgrađuju se rezervne tvari u sjemenu što omogućava početni rast i razvoj embrija. U ovoj fazi povećava se intenzitet disanja, opaža se dioba stanica, sinteza proteina i nukleinskih kiselina. Temperatura također utječe na stanični metabolizam i brzinu rasta, djeluje na brzinu apsorpcije vode, brzinu difuzije respiratornih plinova i metaboličke reakcije u sjemenu. Većina sjemenki će proklijati na temperaturama od 16 do 24 °C, na niskim temperaturama klijavost je slaba. Neke sjemenke zahtijevaju prvotno izlaganje niskim temperaturama da se prekine mirovanje sjemena. Svjetlost kod nekih biljnih vrsta povoljno utječe na klijanje. Vrlo malo sjeme ima samo minimalne količine pohranjene za rani rast zametka te je za njih vrlo važno da što prije same proizvode hranu. Ako proklije duboko u tlu može doći do iscrpljivanja zaliha hrane prije nego biljka nikne iz tla. Svjetlo sprečava da se to dogodi i omogućava klijavost sjemena koje se nalazi blizu površine tla (Ishibashi i sur., 2008).

Špinat (*Spinacia oleracea* L.)

Jednogodišnja je zeljasta biljka podrijetlom iz zapadne Azije, a u Europi se prvi put spominje oko 1100 godine u Njemačkoj. Uzgaja se zbog listova, a više od trećine ukupne suhe tvari špinata čine bjelančevine koje sadrže sve esencijalne aminokiseline. Špinat je bogat mineralima, osobito željezom, fosforom i magnezijem, vitaminima B skupine te vitaminima C, E i K. Pospješuje izlučivanje vode iz organizma i tako olakšava rad srca i bubrega te snižava krvni tlak. Redovitom konzumacijom špinata smanjuje se rizik od raka jetre, mokraćnog mjehura, debelog crijeva, pluća, prostate, jajnika, mliječnih žlijezda, želuca, kože te raka dojke (Dragica, 2021). Dodatne prednosti konzumiranja špinata su i poboljšana funkcija mozga, regulirana razina šećera u krvi, pomoć u procesu mršavljenja i sprečavanje zatvora. Špinat najbrže raste pri temperaturi od 18 do 20 °C, dok je na temperaturama nižim od 10°C rast usporen. Niske temperature utječu na kvalitetu listova te su listovi sitniji, deblji i više naborani (Jurišić, 2024).

Blitva (*Beta vulgaris var cicla* L.)

Dvogodišnja je biljka koja u prvoj godini razvija dubok razgranat korijen, skraćenu stabljiku i rozetu lišća, a u drugoj razgranatu cvjetnu stabljiku, cvjetove i plodove. Uzgaja se zbog listova, bogata je vitaminima A, C i K te mineralima poput željeza i kalija. Pomaže u borbi protiv slabokrvnosti, prevenira šećernu bolest, štiti od osteoporoze, poboljšava probavu i štiti srce (Sedlak, 2023). Zbog velikih količina beta-karotena korisna je i za zdravlje očiju, prevenira Alzheimerovu bolest, povoljno utječe na zdravlje srca, pomaže pri mršavljenju i smanjuje rizik od raka (Rastija, 2021). Blitva je nezahtjevna, brzorastuća

i ekonomična biljka – što se listovi više beru, više novih raste. Otporna je i na blagi mraz. Minimalna temperatura klijanja je 5°C, a optimalna 16 do 24 °C (Jurišić, 2024).

Cilj ovog istraživanja jest utvrditi kako namakanje sjemenki u otopini vodikovog peroksida različitih koncentracija utječe na brzinu klijanja sjemenki i rast klice špinata i blitve.

Pretpostavke:

- sjemenke koje su namakane u otopini vodikovog peroksida koncentracije 0,15 M; 0,30 M i 0,45 M klijati će brže od sjemenki koje su namakane u vodi;
- sjemenke koje su namakane u otopini vodikovog peroksida koncentracije 0,60 M i 0,75 M klijati će sporije od sjemenki koje su namakane u vodi.

U istraživanju su praćene promjene varijabli:

- zavisna varijabla: brzina klijanja sjemena i duljina klice;
- nezavisna varijabla: sjeme špinata i blitve i koncentracija otopina vodikovog peroksida;
- kontrolirani uvjeti: temperatura, voda i svjetlost.

METODE RADA

Istraživanje utjecaja otopina vodikovog peroksida različitih koncentracija na brzinu klijanja sjemena i rasta klice špinata i blitve provedeno je u prosincu 2025. te siječnju i veljači 2026. godine (četiri ponavljanja kako bi rezultati bili točniji). Korišteni su sljedeći materijali: sjeme špinata i blitve (proizvođač: Green Garden, 6 x 15 sjemenki za obje vrste), otopina vodikovog peroksida (H_2O_2) koncentracije: 0,15 M; 0,30 M; 0,45 M; 0,60 M i 0,75 M, blazinice, Petrijeve zdjelice (12 komada), staklene čašice (12 komada), destilirana voda, mobitel (za fotografiranje), vodootporni marker, ravnalo, dnevnik za vođenje bilješki i šprice od 5 i 10 mL (za mjerenje volumena).

Pripremljeno je po 20 mL otopine vodikovog peroksida koncentracije: 0,15 M; 0,30 M; 0,45 M; 0,60 M i 0,75 M, u pripremljene staklene čašice stavljeno je po 15 sjemenki špinata (ili blitve) te je dodano po 10 mL pripremljene otopine prema rasporedu prikazanom u tablici 1.

Tablica 1 Sadržaj i koncentracije pripremljenih otopina u čašicama

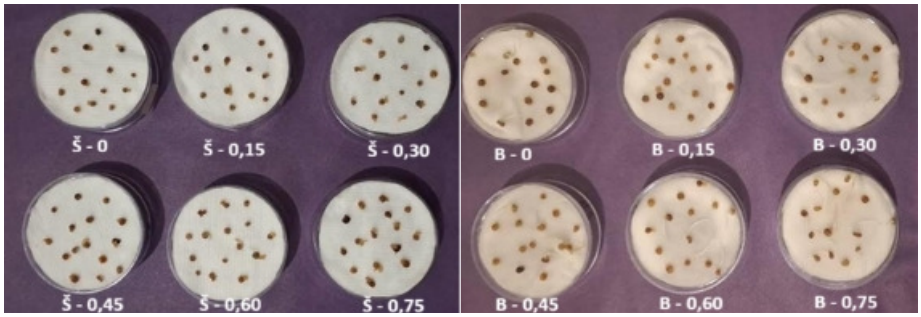
Broj čašice	Otopina	Koncentracija (mol/dm^3)
1 i 7	destilirana voda	0
2 i 8	vodikov peroksid	0,15
3 i 9	vodikov peroksid	0,30
4 i 10	vodikov peroksid	0,45
5 i 11	vodikov peroksid	0,60
6 i 12	vodikov peroksid	0,75

Sjemenke su namakane 18 sati u tamnom prostoru. U svaku od 12 pripremljenih Petrijevih zdjelica stavljene su pamučne blazinice i dodano je 10 mL vode. Petrijeve zdjelice označene su vodootpornim markerom prema slijedećem rasporedu. U kontrolnu Petrijevu zdjelicu sa blazinicom (Š-0) stavljeno je 15 sjemenki špinata i zdjelica je pohranjena na tamno mjesto (ormar). Sjemenke koje su bile namakane u otopini vodikovog peroksida temeljito su isprane destiliranom vodom tri puta sa 30 mL (svaka čašica je zasebno ispirana) kako bi se uklonio višak vodikovog peroksida te su nakon toga stavljene u odgovarajuće prethodno označene Petrijeve zdjelice (slika 1):

- (Š-0,15) – sjemenke tretirane 0,15 M otopinom vodikovog peroksida
- (Š-0,30) – sjemenke tretirane 0,30 M otopinom vodikovog peroksida
- (Š-0,45) – sjemenke tretirane 0,45 M otopinom vodikovog peroksida

- (Š-0,60) – sjemenke tretirane 0,60 M otopinom vodikovog peroksida
- (Š-0,75) – sjemenke tretirane 0,75 M otopinom vodikovog peroksida

Sve Petrijeve zdjelice su pohranjene u ormar. Isti postupak ponovljen je sa sjemenkama blitve. Temperatura u prostoriji tijekom izvođenja pokusa bila je 22 °C.



Slika 1 Petrijeve zdjelice s pripadajućim sjemenkama špinata (lijevo) i blitve (desno)

Petrijeve zdjelice sa sjemenkama promatrane su svakodnevno tijekom 14 dana. Praćen je početak klijanja sjemena i brzina rasta klice. Promjene su bilježene u dnevnik i fotografirane kamerom mobitela. Rast klice mjeren je pomoću ravnala te je zbog nejednolikog rasta izračunata prosječna duljina klice (za svaki dan i za svaku posudicu) prema formuli za aritmetičku sredinu.

$$D(\text{prosječna}) = (D1 + D2 + \ldots + Dn)/n$$

$D_{(prosječna)}$ – prosječna duljina klice
D_1, D_2, D_n – duljine pojedinih klica
n – ukupan broj klica

Uspoređeno je vrijeme potrebno za klijanje sjemena špinata i vrijeme potrebno za klijanje sjemena blitve te je izveden zaključak o vremenu potrebnom za klijanje obje vrste sjemena.

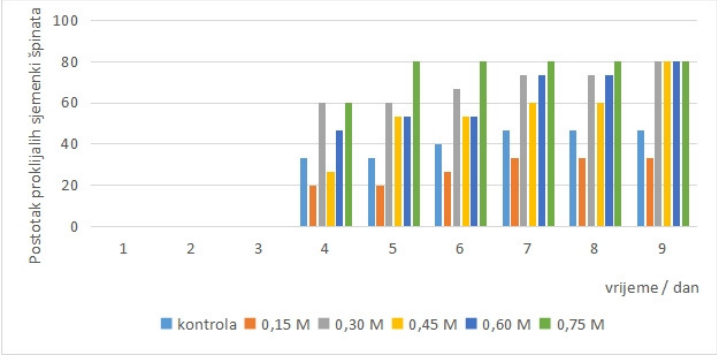
Klijavost sjemena za svaku od 12 Petrijevih zdjelica sa sjemenkama špinata i blitve izračunata je prema formuli:

$$\text{Klijavost sjemena} = (\text{broj proklijalih sjemenki} / \text{ukupan broj sjemenki}) \times 100\ \%$$

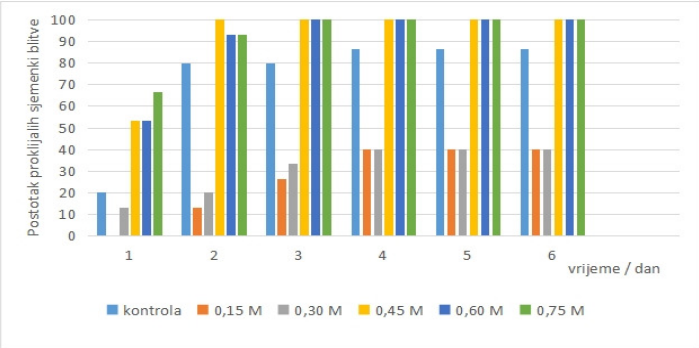
REZULTATI

Uočeno je da sjeme špinata klija puno sporije od sjemena blitve te da namakanje u otopini vodikovog peroksida različitih koncentracija utječe na brzinu klijanja sjemena. Klijavost sjemena špinata i blitve za kontrolnu skupinu i skupine sa sjemenom namakanim u otopinama vodikovog peroksida različitih koncentracija prikazane su tablično u prilogu 1. Iako je istraživanje trajalo četrnaest dana, nakon šestog dana nije uočeno pojavljivanje novih klica kod blitve te nakon desetog dana kod špinata te podaci za preostale dane nisu navedeni u tablici.

Na klijavost špinata povoljno je djelovalo namakanje u 0,30 M; 0,45 M; 0,60 M i 0,75 M otopini gdje je do desetog dana proklijalo 80 % sjemenki za razliku od kontrolnog uzorka u kojem je u istom razdoblju proklijalo samo 46,67 % sjemenki (slika 2). Klijavost sjemena blitve za sjeme namakano u otopinama vodikovog peroksida koncentracija: 0,45 M; 0,60 M i 0, 75 M je 100 % i sve sjemenke su proklijale već treći dan, dok je klijavost kontrolnog uzorka 86,67 % (slika 3).



Slika 2 Usporedba broja proklijalog sjemena špinata ovisno o koncentraciji vodikovog peroksida



Slika 3 Usporedba broja proklijalog sjemena blitve ovisno o koncentraciji vodikovog peroksida

S mjerenjem duljine klica započelo se već prvi dan za blitvu te četvrti dan za špinat. Klice blitve rasle su brzo i već sedmi dan pojavili su se prvi listovi u svim Petrijevim zdjelicama te je mjerenje prekinuto i rezultati nisu prikazani. Nasuprot tome, klice špinata rasle su jako sporo i mjerenje je nastavljeno još nekoliko dana. Nakon desetog dana nisu uočene veće promjene i klice su počele propadati te je mjerenje prekinuto. Rast klice kod obje vrste je bio neujednačen i u istoj posudici moglo se vidjeti klice različitih duljina. Osim toga prilikom klijanja blitve uočeno je izbijanje više klica iz sjemena budući su namakane sjemene kuglice koje u sebi sadrže više sjemenki (slika 4).

Slika 4 Izgled klice blitve (lijevo) i špinata (desno)

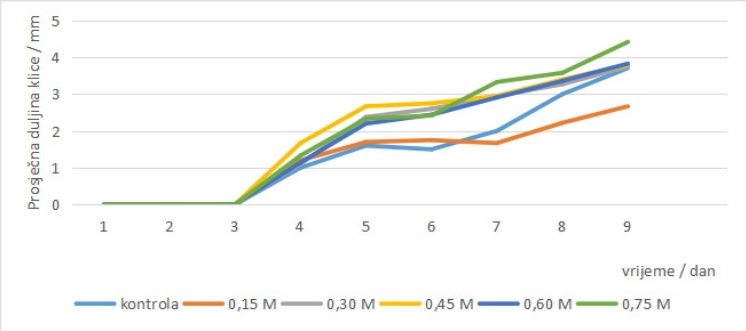
Prilikom mjerenja duljine klice blitve u obzir su uzimane duljine svih klica koje su se pojavile iz iste sjemene kuglice. Podaci o prosječnim duljinama klica špinata i blitve navedeni su u tablici 2.

Tablica 2 Prosječna duljina klice blitve i špinata po danima

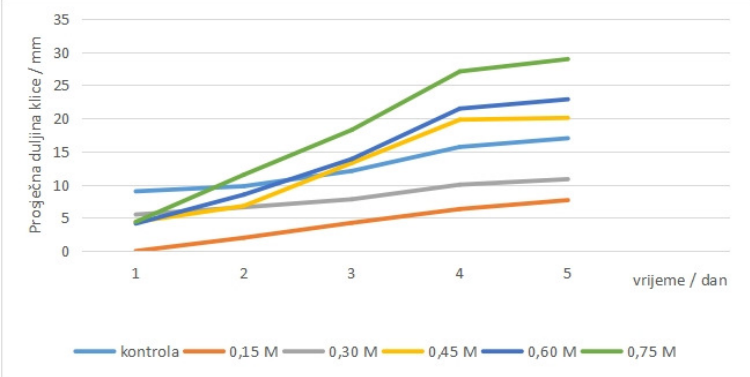
Konc. otopine vodikovog peroksida / mol/dm³	Prosječna duljina klice u mm								
	BLITVA								
	1.dan	2.dan	3.dan	4.dan	5.dan	6.dan	7. dan	8. dan	9. dan
0	9	9,77	12,07	15,69	17	17	17	17	17
0,15	0	2	4,25	6,33	7,67	7,67	7,67	7,67	7,67
0,30	5,50	6,60	7,80	10	10,83	10,83	10,83	10,83	10,83
0,45	4,38	6,8	13,27	19,80	20,07	20,07	20,07	20,07	20,07
0,60	4,14	8,5	13,87	21,47	22,87	22,87	22,87	22,87	22,87

0,75	4,4	11,5	18,26	27,07	28,93	28,93	28,93	28,93	28,93
	ŠPINAT								
	1.dan	2.dan	3.dan	4.dan	5.dan	6.dan	7. dan	8. dan	9. dan
0	0	0	0	1	1,6	1,5	2	2,57	3,71
0,15	0	0	0	1,67	2,67	2,75	2,60	3,40	3,80
0,30	0	0	0	1,10	2,78	2,20	2,55	3,27	3,75
0,45	0	0	0	1,50	2	1,75	1,67	2,22	2,67
0,60	0	0	0	1,14	2,22	2,44	2,91	3,36	3,83
0,75	0	0	0	1,33	2,33	2,42	3,33	3,58	4,42

Nakon izračuna prosječnih duljina klica grafički su prikazane brzine rasta klice špinata i blitve za sjeme koje je bilo namakano 18 sati u otopinama vodikovog peroksida koncentracija: 0,15 M; 0,30 M; 0,45 M; 0,60 M i 0,75 M (slike 5 i 6).



Slika 5 Ovisnost duljine klice špinata po danima, ovisno o koncentraciji otopine vodikovog peroksida



Slika 6 Ovisnost duljine klice blitve po danima, ovisno o koncentraciji otopine vodikovog peroksida

Na osnovu rezultata zaključeno je da namakanje u otopini vodikovog peroksida koncentracije 0,15 M usporava rast klice špinata. Namakanje u otopinama vodikovog peroksida koncentracije 0,30 M; 0,45 M i 0,60 M pokazalo je slične rezultate kao i namakanje u vodi dok je klica špinata brže rasla ako je bila namakana u otopini vodikovog peroksida koncentracije 0,75 M. Rast klice blitve usporen je kod namakanja u otopini vodikovog peroksida koncentracija 0,15 M i 0,30 M, dok je za veće koncentracije vodikovog peroksida (0,45 M, 0,60 M i 0,75 M) zabilježen proporcionalan rast klice s porastom koncentracije vodikovog peroksida.

RASPRAVA

Klijanje je ključna razvojna faza u životnom ciklusu biljke. Brojna istraživanja proučavala su utjecaj vodikovog peroksida na klijanje sjemena, rast korijena i rast sadnica biljaka. Barba-Espín i sur. (2010) su u svojim istraživanjima zaključili da prethodna obrada sjemenki graška s vodikovim peroksidom

povećava klijavost i potiče rast sadnica. Pretpostavili su da vodikov peroksid djeluje kao signalna molekula na početku klijanja sjemena što uključuje specifične promjene razine proteina i ravnotežu hormona kako bi se prekinulo mirovanje. Istraživanja su također potvrdila da vodikov peroksid može prekinuti i fizičko i fiziološko mirovanje sjemenki šećerne repe, te poboljšati klijanje sjemenki pšenice i suncokreta koje slabo klijaju u vodi (Chu i sur., 2022). Koncentraciju i vrijeme izloženosti vodikovom peroksidu treba optimizirati za svaku biljnu vrstu kako bi izbjegli oštećenje sjemena i mladih sadnica.

Brzina klijanja sjemena ovisi o povoljnim uvjetima okoline. Da bi sjemenka proklijala potrebna joj je voda, odgovarajuća temperatura i kisik, a u nekim slučajevima nužno je i prisustvo ili odsustvo svjetla. Kontrolna skupina u istraživanju nam je pokazala koliko vremena je potrebno da bi sjemenka proklijala u normalnim uvjetima. Praćenjem brzine klijanja blitve utvrđeno je da namakanje u otopinama vodikovog peroksida koncentracije 0,45 M; 0,60 M i 0,75 M povoljno utječe na klijanje sjemena. Na brzinu klijanja sjemena špinata pozitivan utjecaj imalo je namakanje u otopini vodikovog peroksida koncentracija 0,30 M; 0,45 M; 0,60 M i 0,75 M. Sjeme blitve namakano u otopini vodikovog peroksida koncentracije 0,15 M i 0,30 M pokazalo je slabiju klijavost od kontrolnog sjemena, dok je kod sjemena špinata koncentracija 0,15 M pokazala slabiju klijavost, a koncentracija 0,30 M bolju klijavost od kontrolnog sjemena.

Koncentracije vodikovog peroksida od 0,45 M, 0,60 M i 0,75 M pokazale su bolju klijavost od kontrolnog sjemena što možemo objasniti činjenicom da je vodikov peroksid vjerojatno malo otvorio sjemenu lupinu i dopustio ulazak vode i kisika što je dovelo do inhibiranja apscizinske kiseline i ubrzalo klijanje. Dokazano je da apscizinska kiselina (ABA) igra važnu ulogu u regulaciji sazrijevanja i klijanja sjemena. Tijekom sazrijevanja sjemena, sadržaj ABA se povećava i regulira mnoge ključne procese, uključujući klijanje i dormanciju (Ishibashi i sur., 2008). Vodikov peroksid djeluje tako da uklanja inhibitorni učinak ABA kako bi potaknuo klijanje i osigurao optimalne uvjete za klijanje. Studije su također potvrdile da etilen i vodikov peroksid potiču klijanje sjemena dok ABA inhibira klijanje sjemena (Chu i sur., 2022). Iz toga se zaključuje da je ABA primarni biljni hormon uključen u proces pokretanja, održavanja i prekida dormancije (Čmelik i Perica, 2007).

Sjeme špinata pokazalo je slabiju klijavost u odnosu na sjeme blitve a razlog tomu je tvrda i debela sjemena ljuska kod sjemena špinata koja fizički sprečava prodiranje vode i kisika u sjeme. Klijanje sjemena blitve puno je brže od klijanja sjemena špinata (Benko, 2024) što je i potvrđeno istraživanjem, jer je blitva počela klijati već prvi dan, dok je špinat počeo klijati tek četvrti dan. Brže klijanje sjemena blitve možemo povezati sa tanjom sjemenom ljuskom i bržim upijanjem vode i kisika. Ovim istraživanjem dokazali smo da prethodno tretiranje sjemena otopinom vodikovog peroksida određenih koncentracija može ubrzati klijanje sjemena i rast klice špinata i blitve.

Slabija klijavost špinata i blitve nakon namakanja u 0,15 M otopini vodikovog peroksida može biti posljedica oštećenja sjemena, jer su Chu i sur. (2022) u svom radu naveli da samo kritični raspon koncentracija vodikovog peroksida ublažava dormantost dok razine iznad ili ispod kritičnog raspona oštećuju sjeme. Drugi mogući razlog za slabiju klijavost špinata može biti i temperatura jer je optimalna temperatura za klijanje između 18 i 20 °C a naš pokus je provođen na 22 °C.

Dobiveni rezultati nisu potvrdili pretpostavku da će sjeme namakano u otopini vodikovog peroksida koncentracije 0,60 M i 0,75 M klijati sporije od sjemena namakanog u vodi jer su rezultati pokazali bolju klijavost, za obje otopine vodikovog peroksida i obje vrste sjemena, u usporedbi s kontrolnom

skupinom. Djelomično je potvrđena druga pretpostavka da će sjeme namakano u otopini vodikovog peroksida koncentracije 0,15 M; 0,30 M i 0,45 M klijati brže od sjemena namakanog u vodi, jer je za obje skupine bolju klijavost pokazala samo otopina vodikovog peroksida koncentracije 0,45 M, koncentracija otopine 0,15 M pokazala je slabiju klijavost sjemena u odnosu na kontrolno sjeme a koncentracija otopine 0,30 M pokazala je slabiju klijavost kod blitve a bolju klijavost kod špinata.

Rast klice brži je kod sjemena koje je bilo namakano u otopinama vodikovog peroksida većih koncentracija. Najbrže su rasle klice koje su namakane u 0,75 M otopini vodikovog peroksida što je vjerojatno povezano sa signalnom ulogom vodikovog peroksida i boljom opskrbom kisikom čime su osigurani optimalni uvjeti za klijanje i rast klice.

Ovo istraživanje pokazalo je da prethodno namakanje sjemenki špinata i blitve u otopinama vodikovog peroksida koncentracije 0,45 M; 0,60 M i 0,75 M na sobnoj temperaturi u mraku povećava postotak klijanja za obje vrste sjemena. Klijanje sjemena špinata povećano je i pri koncentraciji vodikovog peroksida od 0,30 M.

Za utvrđivanje razlika u duljinama klica između kontrolne i tretiranih skupina korišten je *t*-test za nezavisne uzorke. Statistička značajnost testirana je na razini pouzdanosti od 95 %, a obrada podataka izvršena je u softverskom paketu MIcrosoft Excel, a rezultati testa prikazani su u tablici 3.

Tablica 3 Rezultati t-testa za duljinu klice špinata i blitve

konc. otopine vodikovog peroksida / mol/dm³	ŠPINAT		
	Prosjek (*M*)	*t* vrijednost	*p* vrijednost
0	14,61		
0,15	5,68	5,35	**< 0,001***
0,30	9,34	3,22	**0,0007***
0,45	16,07	-1,02	0,33
0,60	18,04	-1,64	0,128
0,75	22,88	-2,81	**0,019***
	BLITVA		
0	1,25		
0,15	1,16	-1,68	0,11
0,30	1,78	-2,52	**0,024***
0,45	1,76	-2,49	**0,026***
0,60	1,92	-2,71	**0,017***
0,75	1,93	-2,57	**0,023***

*statistički značajno uz p < 0,05

Kada bi ponavljali istraživački rad, u istraživanje bi uključili i sjeme drugog lisnatog zelenog povrća (kelj, raštika, rukola) te bi radili ispitivanja s različitom vremenom izloženosti vodikovom peroksidu i proučili bi utjecaj svjetlosti na brzinu klijanja kod vrsti koje imaju sitnije sjeme.

Preporučili bi svim ljudima korištenje više zelenog lisnatog povrća u prehrani jer takvo povrće im može osigurati dug i zdrav život.

ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata istraživanja donijeli smo slijedeće zaključke:

- Namakanje sjemena u otopini vodikovog peroksida koncentracije 0,15 M usporava klijanje sjemena i rasta klice;
- Namakanje sjemena u otopini vodikovog peroksida koncentracije 0,30 M doprinosi bržem klijanju sjemena špinata dok se klijanje sjemena blitve usporava;

- Namakanje sjemena u otopini vodikovog peroksida koncentracije 0,45 M; 0,60 M i 0,75 M doprinosi bržem klijanju sjemena i bržem rastu klice;
- Klice najbrže rastu ako se sjeme namače u 0,75 M otopini vodikovog peroksida.

LITERATURA

Alibabić V., Majić I. 2016. Pravilna prehrana i zdravlje. Veleučilište u Rijeci, Rijeka.

Bakotić Ž. 2019. Provjera klijavosti sjemena vrste *Hypericum olympicum* L.. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko - biokemijski fakultet, Zagreb.

Barba-Espín G., Hernandez J. A., Diaz-Vivancos P. 2012. Role of H_2O_2 in pea seed germination. Plant Signaling & Behavior7(2): 193–195.

Benko B. 2024. O čemu sve ovisi klijavost sjemena povrća? Gospodarski list, https://gospodarski.hr/rubrike/povrcarstvo-rubrike/o-cemu-sve-ovisi-klijavost-sjemena-povrca/, pristupljeno 11. 12. 2025.

Centinel A. H. S., Yalcinkaya T., Akyol T. Y., Gokce A., Turkan I. 2021. Pretreatment of seeds with hydrogen peroxide improves deep-sowing tolerance of wheat seedlings. Plant Physiology and Biochemistry 167: 321–325.

Chu C., Poore R. C., Bolton M. D., Fugate K. K. 2022. Mechanism of sugarbeet seed germination enhanced by hydrogen peroxide. Frontiers in Plant Science 13: 2–5.

Čmelik Z., Perica S. 2007. Dormantnost sjemenki voćaka. Sjemenarstvo 24: 51–54.

Dragica I. 2021. Najzdravije namirnice svijeta: Špinat, Alternativa za vas, https://alternativa-zavas.com/index.php/clanak/article/spinat, pristupljeno 11.12. 2025.

Ishibashi Y., Yamamoto K., Tawaratsumida T., Yuasa T., Iwaya_Inoue M. 2008. Hydrogen peroxide scavenging regulates germination ability during wheat (*Triticum aestivum* L.) seed maturation. Plant Signaling & Behavior 3(3): 183–184.

Jurišić M. 2024. Špinat. Agroklub, https://www.agroklub.com/sortna-lista/povrce/spinat-183/, pristupljeno 5.12. 2025.

Jurišić M. 2024. Blitva lisnata. Agroklub, https://www.agroklub.com/sortna-lista/povrce/blitva-lisnata-134/, pristupljeno 5.12. 2025.

Katzman L. S., Taylor A. G., Langhans R.W. 2001. Seed Enhancements to improve spinach germination. HortScience 36: 979–981.

Local Gardener. 2024. Boosting Seed Germination with Hydrogen Peroxide, https://localgardener.org/boostingseed-germination-with-hydrogen-peroxide/, pristupljeno 1.12. 2025.

Rastija M. 2021. Važnost zelenih namirnica u prehrani djece mlađe školske dobi, Diplomski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Fakultet za odgojne i obrazovne znanosti, Osijek.

Sedlak J. 2023. Blitva: povrtnica koja će vas oduševiti obiljem i nezahtjevnošću. Novi list, https://www.novilist.hr/life/blitva-povrtnica-koja-ce-vas-odusevljavati-obiljem-i-nezahtjevnoscu/, pristupljeno 5.12. 2025.

Wojtyla L., Lechowska K., Kubala S., Garnczarska M. 2016. Different modes of hydrogen action during seed germination. Frontiers in Plant Science 7: 1–3.

Prilog 1 Klijavost sjemena blitve i špinata po danima

otopina vodikovog peroksida / mol/dm³	POSTOTAK PROKLIJALIH SJEMENKI									
	BLITVA									
	1.dan	2.dan	3.dan	4.dan	5.dan	6.dan	7. dan	8. dan	9. dan	10.dan
0	0	20	80	80	86.67	86.67	86.67	86.67	86.67	86.67
0,15	0	0	13,33	26,27	40	40	40	40	40	40
0,30	0	13,33	20	33,33	40	40	40	40	40	40
0,45	0	53,33	100	100	100	100	100	100	100	100
0,60	0	53,33	93,33	100	100	100	100	100	100	100
0,75	0	66,67	93,33	100	100	100	100	100	100	100
	ŠPINAT									
	1.dan	2.dan	3.dan	4.dan	5.dan	6.dan	7. dan	8. dan	9. dan	10.dan
0	0	0	0	0	33,33	33,33	40	46,67	46,67	46,67
0,15	0	0	0	0	20	20	26,27	33,33	33,33	33,33
0,30	0	0	0	0	60	60	66,67	73,33	73,33	80
0,45	0	0	0	0	26,27	53,34	53,34	60	60	80
0,60	0	0	0	0	46,67	53,33	53,33	73,33	73,33	80
0,75	0	0	0	0	60	80	80	80	80	80

Proljetna flora urbanih i šumskih staništa našeg grada

Vito Majić, 7. razred
Maja Ožanić, 7. razred

OŠ Bogumila Tonija
Mentor: Nataša Kletečki

SAŽETAK
Ovaj se rad bavi komparativnom analizom bioraznolikosti, ekoloških značajki i ugroženosti proljetne flore. Istraživanje proljetnica urbanih i šumskih staništa Samobora provedeno je od siječnja do ožujka 2025. i 2026. godine. Proljetnice su bilježene na pet lokaliteta. Ciljevi istraživanja bili su: zabilježiti proljetnica, procijeniti njihovu učestalost, gustoću i pokrovnost na određenom staništu/lokalitetu, provesti analizu sličnosti između staništa/lokaliteta; provesti analizu životnih oblika zabilježenih proljetnica i analizu zabilježenih proljetnica prema riziku od nestajanja i zakonskoj zaštiti, provesti anketu među učenicima o poznavanju proljetnica i njihovih staništa. Istraživanje je evidentirano 9 vrsta proljetnica, od kojih je jedna strogo zaštićena. Većina ih pripada razredu dvosupnica i geofiti su. Pokrovnost, učestalost i gustoća mijenjaju se na istraživanom prostoru tijekom istraživanog perioda. Analizom sličnosti najveća je sličnost 2025. godine utvrđena između parka oko Muzeja i park šume Tepec-Palačnik-Stražnik i iznosi 80 %. Najmanja je sličnost utvrđena između parka oko naše škole i šume hrasta lužnjaka u Domaslovcu i iznosi 0 %. Iz rezultata u 2026. godini vidljivo je kako ne postoji sličnost između parka oko naše škole i ostalih staništa. Najveća sličnost uočena je između park šume Tepec-Palačnik-Stražnik i parka uz kuću Wagner-Bilokapić, 100 %. Učenici slabo poznaju proljetnice i njihova staništa.

Ključne riječi: *bioraznolikost; proljetnice; životni oblici; sličnost staništa*

UVOD

U ovom je radu prikazano istraživanje flore proljetnica Samobora i njegove okolice. Ovo je područje dobro floristički istraženo. Feletar (2004) navodi kako nema istaknutijeg hrvatskog botaničara koji nije posjetio samoborski kraj i svojim istraživanjem pridonio poznavanju njegove flore i vegetacije. Prva sistematska istraživanja flore Samoborskog gorja provodi i objavljuje Rossi 1924. godine (Šugar, 1972), a njegov cjelokupni biljni svijet obrađuje Šugar 1972. godine. Šugar bilježi 890 vrsta livadne i šumske vegetacije, te oko 35 biljnih zajednica. Medvedović 1994. godine u *Park šumi Tepec-Palačnik-Stražnik* pronalazi, evidentira i determinira 62 biljne vrste. Na 1 m^2 utvrđuje prosječno 45,6 biljaka u šumi hrasta kitnjaka i 15,7 biljaka u bukovoj šumi. Vitko (2021) terenskim istraživanjem provedenim na području grada Samobora i bliže okolice bilježi 136 biljnih svojti iz 51 porodice od kojih po brojnosti prednjače *Asteraceae* i *Ranunculaceae*. Međutim, dosadašnja istraživanja imaju i nedostatke: nejednolika istraženost (većina istraživanja usmjerena je samo na područje Samoborskog gorja), zastarjelost podataka (posljedica sve manjeg broja osoba koje sakupljaju nove informacije na terenu), loša kvaliteta sakupljenih podataka (npr. pogrešne determinacije vrsta od strane istraživača). Svi navedeni istraživači zabilježili su proljetnice na šumskim i livadnim staništima i navode sljedeće vrste: *Hacquetia epipactis* (Scop.) DC., *Primula vulgaris* Huds., *Anemone nemorosa* L., *Anemone ranunculoides* L., *Caltha palustris* L., *Helleborus multifidus* Vis., *Hepatica nobilis* Schreb., *Ranunculus ficaria* L., *Viola odorata* L., *Galanthus nivalis* L., *Leucojum vernum* L., *Scilla bifolia* L., *Crocus vernus* (L.) Hill, *Erythronium dens-canis* L. Tijekom svojih istraživanja nisu istraživali isključivo proljetnu floru niti floru urbanih dijelova Samobora. Stoga naše istraživanje ima svoju pravdanost.

Proljetnice su biljke koje cvatu u rano proljeće prije svih ostalih biljaka. Ne predstavljaju posebnu skupinu međusobno srodnih biljaka. U vrijeme cvatnje predstavljaju jedini izvor nektara i peluda kukcima koji ih posjećuju i oprašuju. Gotovo su sve proljetnice višegodišnje zeljaste (visibaba,

drijemovac, šumarica, kockavica, žabnjaci) ili drvenaste (likovci) biljke. Nepovoljni dio godine većina preživljavaju u obliku podzemnih organa (gomolja, lukovice, podanka), osim drvenastih vrsta (Boršić i Posavec-Vukelić, 2018). Najčešće nastanjuju svijetle, kontinentalne listopadne šume, no nije isključen i neki drugi tip staništa. Tako npr. kockavicu nalazimo na vlažnim travnjacima kontinentalnog dijela Hrvatske, žabnjake na nizinskim i/ili planinskim pašnjacima, dok je kukurijek indikator dolomitne podloge (Boršić i Posavec-Vukelić, 2018). Većina je proljetnica ugrožena čovjekovim djelovanjem. Razlozi su: pretjerano sakupljanje, uništavanje staništa, nestanak oprašivača, zarastanje travnjaka zbog prestanka košnje i ispaše. Zbog toga su neke proljetnice zaštićene ili strogo zaštićene (Narodne novine, 2016). Za sakupljanje zaštićenih proljetnica potrebno je dopuštenje Ministarstva zaštite okoliša i zelene tranzicije koje se izdaje na temelju *Pravilnika o sakupljanju zaštićenih samoniklih biljaka u svrhu prerade i trgovine* (Narodne novine, 2008). Prema *Zakonu o zaštiti prirode*, sakupljanje proljetnica bez dopuštenja Ministarstva zaštite okoliša i zelene tranzicije, kažnjava se novčanom kaznom (Boršić i Posavec-Vukelić, 2018).

Istraživanja su pokazala (Garašić i sur., 2012) kako su na dnu ljestvice interesa naših učenika teme o biljkama, o ekološkoj ili modernoj poljoprivredi, o proizvodnji i preradi hrane te o ekologiji i održivom razvoju. Iz tog smo razloga sastavili popis proljetnica našeg grada i kroz edukaciju ostalih učenika dali svoj prilog njihovoj zaštiti, ali i poticanju interesa za botaniku.
Za formiranje međusobno povezanih hipoteza ovog istraživanja poslužili su nam literaturni podaci:

1. na različitim staništima/lokalitetima nalazimo različite vrste proljetnica koje se pojavljuju u različitom periodu i s različitom učestalošću, gustoćom i pokrovnošću, što se može povezati sa ekološkim uvjetima na staništu (temperatura zraka, nadmorska visina) ili tipom staništa (urbana ili šumska staništa) (Zejnić, 2017);
2. uvjeti na staništu povezani su s biologijom vrste proljetnica i rizikom od nestajanja (Boršić i Posavec-Vukelić, 2018);
3. učenici slabo poznaju proljetnice jer pokazuju slabiji interes za botaničke sadržaje (Garašić, 2012).

S obzirom na polazne hipoteze glavni ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. odrediti vrste proljetnica tj., provesti taksonomsku analizu zabilježenih proljetnica, procijeniti njihovu učestalost, gustoću i pokrovnost na određenom staništu/lokalitetu, te provesti analizu sličnosti između staništa/lokaliteta;
2. provesti analizu životnih oblika zabilježenih proljetnica i analizu zabilježenih proljetnica prema riziku od nestajanja i zakonskoj zaštiti;
3. prezentirati učenicima 5. razreda rezultate svojih istraživanja i provesti anketu među učenicima o poznavanju proljetnica i njihovih staništa.

METODE RADA

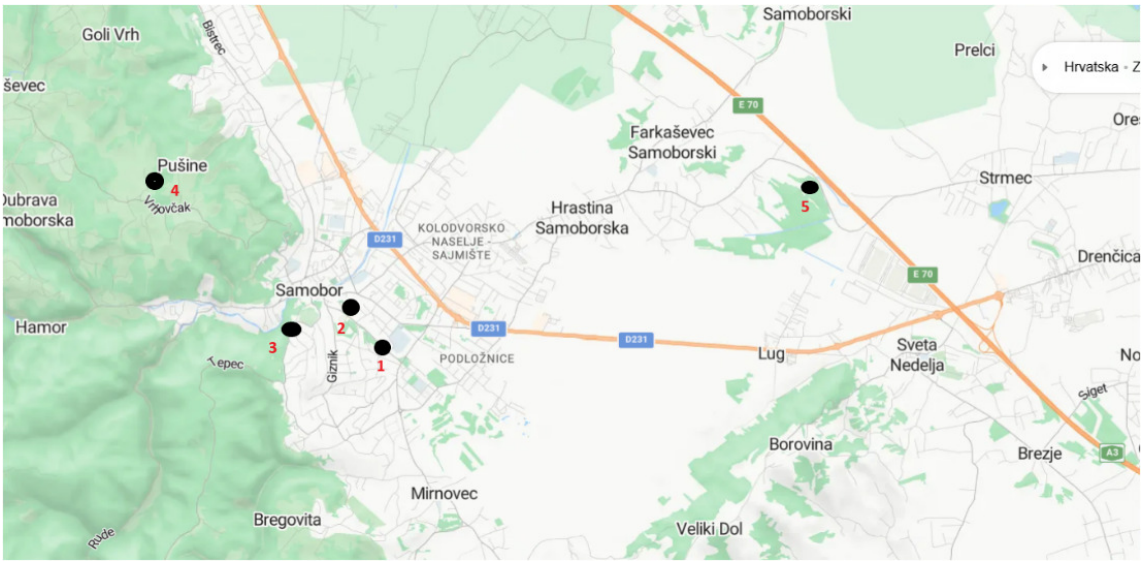
Istraživanje je provođeno od siječanja do ožujka 2025. te od siječnja do ožujka 2026. godine.

Područje istraživanja

Grad Samobor dio je Zagrebačke županije. Omeđen je rijekom Savom na istoku, granicom Republike Slovenije na sjeveru i gradom Zagrebom na jugu (Blažević Cindrić, 2019). Površina grada iznosi 249,75 km^2, od čega se najveći dio odnosi na Samoborsko gorje dok površina samoga grada obuhvaća oko 3 km^2. U geomorfološkom smislu Samobor se smjestio u zoni dodira tri megageomorfološke cjeline:

Panonske zavale, Alpa i Dinarida. Prema Köppenovoj klasifikaciji klima, područje Samobora i njegove okolice se nalazi u zoni ''Cfwbx'' klime, odnosno umjereno tople kišne klime (Buzjak i sur., 2011). Samobor pripada šumovitim predjelima Hrvatske. Od ukupne površine grada pod šumom se nalazi približno 44 %, pod poljoprivrednim površinama 51 %, a na neplodne površine otpada približno 5 % (Buzjak i sur., 2011).

U šumama su od drveća zastupljene sljedeće vrste: hrast lužnjak (*Quercus robur* L.), hrast kitnjak (*Quercus petraea* (Mattuschka) Liebl.), hrast medunac (*Quercus pubescens* Willd.), pitomi kesten (*Castanea sativa* L.), bukva (*Fagus silvatica* L.) i mnoge druge vrste (Dujmović, 2007; Buzjak i sur., 2011).



Slika 1 Područje istraživanja
Izvor slike: Karta Hrvatske, 2026

Popis lokaliteta (slika 1):

1 - park oko naše škole - površina parka iznosi 1 ha, redovito se održava;
2 - park uz kuću Wagner-Bilokapić, nalazi se u središtu grada, nastao je 1878. godine. prevladava drveće i grmlje, površina parka iznosi 0.6 ha, ne održava se;
3 - park oko Muzeja - perivoj pejzažnog karaktera, uređen potkraj 19. st., okružuje Muzej, površina parka iznosi 0.5 ha, održava se;
4 - park šuma Tepec-Palačnik-Stražnik, područje Stražnik, šuma hrasta kitnjaka s pitomim kestenom uz sastojine crnog bora, obične smreke, obične jele i europskog ariša, umjetno podignute pošumljavanjem;
5 - šuma hrasta lužnjaka, Domaslovec, na istraživanom je području u proteklih nekoliko mjeseci provođena sječa.

Terenski rad

Na svakom od istraživanih staništa/lokaliteta (slika 1) određena je trajna ploha veličine 5x5 m (slika 2) na kojoj su GPS-om određene koordinate, nadmorska visina i ekspozicija. Tijekom svakog izlaska na teren termometrom je određena temperaturu zraka.

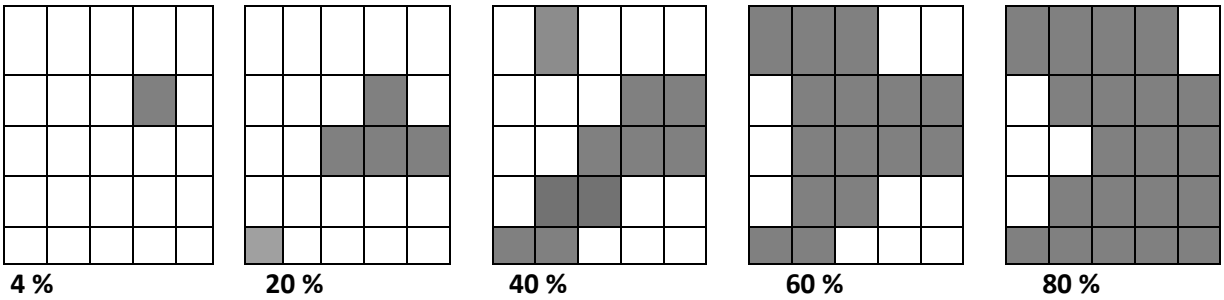
Slika 2 Trajna ploha pored naše škole

Na terenu je određivana:

1. Pokrovnost (P) svojti proljetnica primjenjujući ljestvicu za procjenu pokrovnosti prema Braun-Blanquetu (1964) (slika 3).

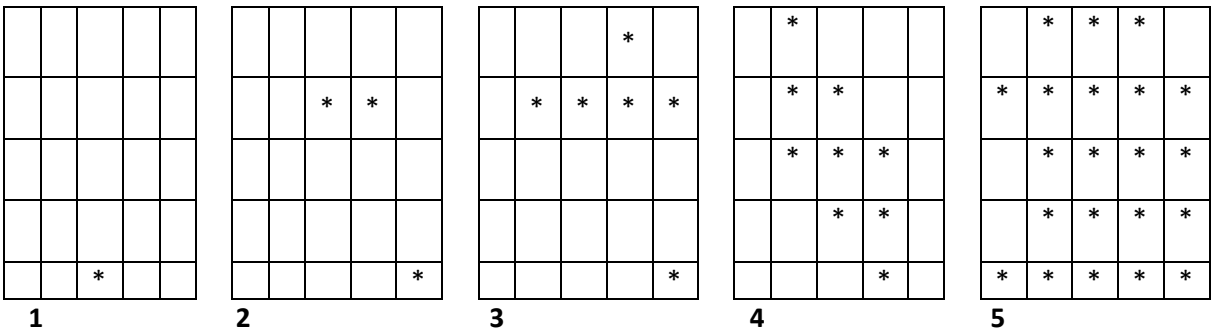
Slika 3 Okvirna vizualizacija petostupanjske ljestvice za procjenu pokrovnosti prema Braun-Blanquetu (1964)
Izvor slike: Nikolić, 2006

2. Učestalost (U) svojti proljetnica. Učestalost je udio ploha na kojima je prisutna neka svojta u usporedbi sa svim promatranim plohama iskazuje se u % u odnosu na ukupnu promatranu površinu. Za određivanje učestalosti korištena je okvirna vizualizacija učestalosti (slika 4).



Slika 4 Okvirna vizualizacija učestalosti (postotak površine na kojoj je svojta prisutna)
Izvor slike: Nikolić, 2006

3. Gustoća populacije (G) svojti proljetnica je izmjereni ili procijenjen broj jedinki na jedinici površine. Mjerenje gustoće provedeno je prebrojavanjem svih jedinki neke svojte na određenoj površini. Koristila se ljestvica prema Braun-Blanquetu s pet stupnjeva (1964) (slika 5).



Slika 5 Okvirna vizualizacija petostupanjske ljestvice za procjenu brojnosti jedinki prema Braun-Blanquetu (1964)
Izvor slike: Nikolić, 2006

Pri determinaciji proljetnica koristila se slijedeća literatura: Javorka i Csapody (1975) i Domac (1994).

Obrada podataka

Tijekom obrade podataka su:

- ucrtani lokaliteti na geografsku kartu;
- taksonomski analizirane zabilježene proljetnice prema Flora Croatica Database (Nikolić, 2025);
- analizirana pripadnost zabilježenih proljetnica određenom staništu/lokalitetu (procjena učestalosti, gustoće i pokrovnosti);
- analizirani životni oblici zabilježenih proljetnica (Ellenberg, 1978) i uz svaku zabilježenu vrstu navedena kratica pripadajućeg životnog oblika:
  - Ch (Chamaephyta) - pupovi prezimljavaju većinom iznad tla, te su zaštićeni snijegom, zeljaste biljke bez odrvenjelih dijelova;
  - G (Geophyta) - nepovoljno doba prežive podzemno u obliku lukovice, gomolja, podanka, rizoma ili podzemnih vriježa;
  - H (Hemicryptophyta) - trajne biljke s pupovima neposredno pri samoj površini tla, skrivenim odnosno poluskrivenim u suhom lišću, prizemnim rozetama ili busenima;
  - T (Therophyta) - jednogodišnje biljke koje nepovoljno doba godine prežive u obliku sjemenke ili spore;
- provedene analize zabilježenih proljetnica prema riziku od nestajanja na prirodnim staništima i zakonskoj zaštiti;
- analizirane sličnosti između lokaliteta pomoću Sőrensenovog koeficijenta sličnosti (Štamol, 1985):

$$S = \frac{2c}{a+b} \times 100$$

c – broj zajedničkih vrsta na dva staništa
a – ukupni broj vrsta na prvom staništu
b – ukupni broj vrsta na drugom staništu

Podaci o ugroženim svojtama preuzeti su iz Nikolić i Topić (2005), a status zakonske zaštite na području Hrvatske iz Pravilnika o strogo zaštićenim vrstama (Narodne novine, 2013, 2016). Podaci su nadopunjeni prema novijoj dopunjenoj online verziji Flora Croatica - Crvena knjiga (Nikolić, 2025). Uz naziv vrste u popisu vrsta naveden je njezin trenutni status prema IUCN kategoriji: CR – kritično ugrožena, EN – ugrožena, VU – osjetljiva, NT – gotovo ugrožena, LC – najmanje zabrinjavajuća, DD – nedovoljno poznata, NE – neobrađena i/ili prema zakonskoj kategoriji: SZ– zakonom strogo zaštićena svojta, E – endem.

REZULTATI

Provedena je taksonomska analiza prikupljenih vrsta te je analizirana pripadnost zabilježenih proljetnica određenom staništu/lokalitetu, životni oblici zabilježenih proljetnica, rizik od nestajanja na prirodnim staništima i poznavanje učenika o proljetnicama i njihovim staništima.

Taksonomska analiza

Taksonomska analiza prikupljenih vrsta izrađena je prema *Flora Croatica Database* (Nikolić, 2025). Uz prikupljenu vrstu naveden je i njezin lokalitet/stanište, status prema IUCN kategoriji (LC), status prema zakonskoj kategoriji (SZ, E) i životni oblik (H i G).

ODJELJAK – SJEMENJAČE

razred: DVOSUPNICE

porodica: LAMIACEAE (USNJAČE)

1) *Lamium maculatum* L., mrtva kopriva

životni oblik – H
lokalitet/stanište: 2
status prema IUCN kategoriji: /
status prema zakonskoj kategoriji: /
porodica: PRIMULACEAE (JAGLACI)
2) *Primula vulgaris* Huds, obični jaglac
životni oblik – H
lokalitet/stanište: 1, 2, 3, 4
status prema IUCN kategoriji: /
status prema zakonskoj kategoriji: /
porodica: RANUNCULACEAE (ŽABNJACI)
3) *Helleborus atrorubens* Waldst. et Kit., crnocrveni kukurijek
životni oblik – H
lokalitet/stanište: 5
status prema IUCN kategoriji: VU
status prema zakonskoj kategoriji: SZV/E
4) *Isopyrum thalictroides* L., šumska pužarka
životni oblik – G
lokalitet/stanište: 2
status prema IUCN kategoriji: /
status prema zakonskoj kategoriji: /
5) *Ranunculus ficaria* L., živorodni žabnjak
životni oblik – G
lokalitet/stanište: 5
status prema IUCN kategoriji: LC
status prema zakonskoj kategoriji: /
porodica: VIOLACEAE (LJUBIČICE)
6) *Viola odorata* L., mirisava ljubica
životni oblik - H
lokalitet/stanište: 1, 2, 3
status prema IUCN kategoriji: /
status prema zakonskoj kategoriji: /

razred: JEDNOSUPNICE
porodica: AMARYLLIDACEAE (SUNOVRATI)
7) *Leucojum vernum* L., proljetni drijemovac
životni oblik - G
lokalitet/stanište 5
status prema IUCN kategoriji: LC
status prema zakonskoj kategoriji: /
8) *Galanthus nivalis* L., visibaba
životni oblik - G
lokalitet/stanište 2, 3
status prema IUCN kategoriji: LC
status prema zakonskoj kategoriji: /
porodica: IRIDACEAE (PERUNIKE)
9) *Crocus vernus* (L.) Hill, šafran
životni oblik - G

lokalitet/stanište 2, 3, 4, 5
status prema IUCN kategoriji: /
status prema zakonskoj kategoriji: /

Taksonomska je analiza pokazala kako šest vrsta pripada razredu dvosupnica, a tri vrste razredu jednosupnica. Zabilježene vrste pripadaju porodicama: usnjača, jaglaca, žabnjaka, ljubičica, sunovrata i perunika. Tri vrste pripadaju porodicama žabljaka i dvije vrste porodici sunovrata, a ostalim porodicama pripada po jedna vrsta.

Analizirana pripadnost zabilježenih proljetnica određenom staništu/lokalitetu

Iz tablice 1 vidljivo je kako je najveći[1] broj vrsta 2025. zabilježen na lokalitetu 2 park uz kuću Wagner-Bilokapić, a najmanji broj oko naše škole i u park šumi Tepec-Palačnik-Stražnik, područje Stražnik.

Tablica 1 Pripadnost zabilježenih proljetnica određenom staništu/lokalitetu 2025. godine

Datum	Temperature zraka / 13 h	Park oko naše škole (1)	Park uz kuću Wagner-Bilokapić (2)	Park oko Muzeja (3)	Park šuma Tepec-Palačnik-Stražnik (4)	Šuma hrasta lužnjaka, Domaslovec (5)
nadmorska visina		150 m	200 m	180 m	250 m	70 m
broj zabilježenih vrsta po staništu/lokalitetu						
25.1.2025.	7°C	0	0	0	0	0
1.2.2025.	6°C	0	2	2	1	2
8.2.2025.	3°C	0	2	2	1	2
15.2.2025.	0 °C snijeg	0	-	-	-	0
22.2.2025.	2°C	0	3	2	1	3
1.3.2025.	5°C	**2**	**5**	3	**2**	3

Iz tablice 2 vidljivo je kako je najveći broj vrsta 2026. zabilježen na lokalitetu 5 šuma hrasta lužnjaka Domaslovec, a najmanji na lokatitet 2 park uz kuću Wagner-Bilokapić i lokalitetu 4 u park šumi Tepec-Palačnik-Stražnik. Na početku našeg istraživanja 2025. i 2026., krajem siječnja, na istraživanim lokalitetina/staništima nisu zabilježene proljetnice. Proljetnice nisu zabilježene niti 15.2.2025. jer je snijeg prekrio istraživane lokalitete/staništa (tablica 1).

Tablica 2 Pripadnost zabilježenih proljetnica određenom staništu/lokalitetu 2026. godine

Datum	Temperature zraka / 13 h	Park oko naše škole (1)	Park uz kuću Wagner – Bilokapić (2)	Park oko Muzeja (3)	Park šuma Tepec-Palačnik-Stražnik (4)	Šuma hrasta lužnjaka, Domaslovec (5)
nadmorska visina		150 m	200 m	180 m	250 m	70 m
broj zabilježenih vrsta po staništu/lokalitetu						
31. 1. 2026.	4°C	0	0	0	0	0
7. 2. 2026.	6°C	0	1	0	0	1
14. 2. 2026.	5°C	1	1	2	1	3
21. 2. 2026.	3°C	**1**	1	2	1	**4**
26. 2. 2026.	2°C	0	3	2	**1**	**4**

[1] najveći je broj vrsta u tablicama 1 i 2 označen je crvenom, a najmanji broj vrsta plavom bojom.

Rezultati pokrovnosti, učestalosti i gustoće na odabranim lokalitetima prikazani su u tablicama 3 - 12. Iz tablice 3 vidljivo je kako su proljetnice na lokalitetu 1 zabilježene tek 1.3.2025., a svojom pokrovnošću, učestalošću i gustoćom ističe se mirisava ljubica (tablica 3).

Tablica 3 Određivanje pokrovnosti, učestalosti i gustoće na lokalitetu 1 park oko naše škole 2025. godine

Vrsta	Datum	Pokrovnost	Učestalost	Gustoća
Primula vulgaris Huds, obični jaglac	1.3. 2025.	2	20 %	3
Viola odorata L., mirisava ljubica	1.3. 2025.	3	40 %	4

Tijekom 2026., proljetnice se ranije pojavljuju na lokalitetu 1 – obični jaglac je zabilježen već 14.2.2026., dok se mirisava ljubica pojavljuje kasnije. Svojom pokrovnošću, učestalošću i gustoćom ističe obični jaglac, čija se populacija tijekom promatranja povećava (tablica 4).

Tablica 4 Određivanje pokrovnosti, učestalosti i gustoće na lokalitetu 1 park oko naše škole 2026. godine

Vrsta	Datum	Pokrovnost	Učestalost	Gustoća
Primula vulgaris Huds, obični jaglac	14.2.2026.	1	20 %	2
	21.2.2026.	2	20 %	2
	26.2.2026.	3	40 %	3
Viola odorata L., mirisava ljubica	26.2.2026.	1	20 %	2

Na lokalitetu 2 zabilježeno je najviše vrsta 2025. godine. Šafran se prvi pojavljuje na staništu. Pokrovnost, učestalost i gustoća povećavaju se od početka prema kraju veljače. Krajem veljače pojavljuje se šumska pužarka, mrtava kopriva, obični jaglac i mirisava ljubica. Najmanju pokrovnost, učestalost i gustoću ima mirisava ljubica koja se prvi put pojavljuje 1.3.2025. (tablica 5).

Tablica 5 Određivanje pokrovnosti, učestalosti i gustoće na lokalitetu 2 park uz kuću Wagner – Bilokapić 2025. godine

Vrsta	Datum	Pokrovnost	Učestalost	Gustoća
Crocus vernus (L.) Hill, šafran	1. 2. 2025.	1	4 %	2
	8. 2. 2025.	2	20 %	2
	22. 2. 2025.	3	40 %	4
	1. 3. 2025.	4	60 %	4
Isopyrum thalictroides L., šumska pužarka	1. 3. 2025.	2	4 %	2
Lamium maculatum L., mrtva kopriva	1. 3. 2025.	2	20 %	2
Primula vulgaris Huds, obični jaglac	22. 2. 2025.	2	20 %	2
	1. 3. 2025.	2	20 %	2
Viola odorata L., mirisava ljubica	1. 3. 2025.	1	4 %	1

Na istom je lokalitetu u 2026. zabilježen samo šafran koji se pojavljuje kasnije nego prethodne godine (tablica 6).

Tablica 6 Određivanje pokrovnosti, učestalosti i gustoće na lokalitetu 2 park uz kuću Wagner-Bilokapić 2026. godine

Vrsta	Datum	Pokrovnost	Učestalost	Gustoća
Crocus vernus (L.) Hill, šafran	7. 2. 2026.	2	20 %	2
	14.2.2026.	5	80 %	5
	21.2.2026.	5	80 %	5
	26.2.2026.	4	60 %	4

Pokrovnost, učestalost i gustoća populacije šafrana maksimalna je u razdoblju od 14. – 21.2.2026., nakon čega se smanjuje (tablica 6).

Na lokalitetu 3 tijekom 2025. svojom se pokrovnošću, učestalošću i gustoćom također se ističe šafran čija populacija opada početkom ožujka. Sredinom veljače na staništu se pojavljuje visibaba, a početkom ožujka jaglac (tablica 7).

Tablica 7 Određivanje pokrovnosti, učestalosti i gustoće na lokalitetu 3 park oko Muzeja 2025. godine

Vrsta	Datum	Pokrovnost	Učestalost	Gustoća
Crocus vernus (L.) Hill, šafran	1. 2. 2025.	1	4 %	2
	8. 2. 2025.	2	20 %	3
	22. 2. 2025.	3	40 %	4
	1. 3. 2025.	2	20 %	3
Galanthus nivalis L., visibaba	22. 2. 2025.	2	40 %	4
	1. 3. 2025.	2	40 %	4
Primula vulgaris Huds, jaglac	1. 3. 2025.	1	4 %	2

Tijekm 2026., na lokalitetu 3 pojavljuju se šafran i visibaba. Veću pokrovnost, učestalost i gustoću na početku istraživanja ima visibaba (tablica 8), no krajem veljače populacija joj se smanjuje.

Tablica 8 Određivanje pokrovnosti, učestalosti i gustoće na lokalitetu 3 park oko Muzeja 2026. godine

Vrsta	Datum	Pokrovnost	Učestalost	Gustoća
Crocus vernus (L.) Hill, šafran	7. 2. 2026.	1	4 %	2
	14. 2. 2026.	2	20 %	3
	21. 2. 2026.	3	40 %	3
	26. 2. 2026.	3	40 %	3
Galanthus nivalis L., visibaba	7. 2. 2026.	1	4 %	2
	14. 2. 2026.	3	40 %	4
	21. 2. 2026.	3	40 %	3
	26. 2. 2026.	2	20 %	2

Samo dvije vrste proljetnica zabilježene su na lokalitetu 4 u 2025. godini. Učestalost i gustoća šafrana od 8. 2. do 1. 3. 2025. se ne mijenja, dok se pokrovnost promijenila s 2 na 3. Početkom ožujka pojavljuje se jaglac (tablica 9).

Tablica 9 Određivanje pokrovnosti, učestalosti i gustoće na lokalitetu 4 park šuma Tepec-Palačnik-Stražnik 2025. godine

Vrsta	Datum	Pokrovnost	Učestalost	Gustoća
Crocus vernus (L.) Hill, šafran	1.2.2025.	1	4 %	2
	8.2.2025.	2	20 %	3
	22.2.2025.	3	20 %	3
	1.3.2025.	3	20 %	3
Primula vulgaris Huds, obični jaglac	1.3.2025.	1	4 %	2

U 2026., na lokalitetu 4 zabilježen je samo šafran. Pojavljuje se početkom veljače, a pokrovnost se tijekom istraživanog perioda vrlo malo mijenja (tablica 10).

Tablica 10 Određivanje pokrovnosti, učestalosti i gustoće na lokalitetu 4 park šuma Tepec-Palačnik-Stražnik 2026. godine

Vrsta	Datum	Pokrovnost	Učestalost	Gustoća
Crocus vernus (L.) Hill, šafran	7.2.2026.	1	4 %	2
	14.2.2026.	2	20 %	2
	21.2.2026.	2	20 %	3
	26.2.2026.	2	20 %	3

U šumi hrasta lužnjaka u Domaslovcu (lokalitet 5) od tri zabilježene vrste u 2025. dvije se ne pojavljuju na drugim staništima. Pokrovnošću, učestalošću i gustoćom ističu se šafran i proljetni drijemovac (tablica 11).

Tablica 11 Određivanje pokrovnosti, učestalosti i gustoće na lokalitetu 5 šuma hrasta lužnjaka, Domaslovec

Vrsta	Datum	Pokrovnost	Učestalost	Gustoća
Crocus vernus (L.) Hill, šafran	1.2.2025.	1	4 %	2
	8.2.2025.	2	20 %	3
	22.2.2025.	3	40 %	4
	1.3.2025.	4	60 %	4
Leucojum vernum L., proljetni drijemovac	8.2.2025.	1	4 %	2
	22.2.2025.	2	20 %	3
	1.3.2025.	3	40 %	4
Helleborus atrorubens Waldst. et Kit., crnocrveni kukurijek	22.2.2025.	1	4 %	1
	1.3.2025.	2	20 %	2

U 2026., na lokalitetu 5 zabilježene su četiri vrste, a pokrovnošću, učestalošću i gustoćom ističe se proljetni drijemovac (tablica 12).

Tablica 12 Određivanje pokrovnosti, učestalosti i gustoće na lokalitetu 5 šuma hrasta lužnjaka, Domaslovec, 2026. godine

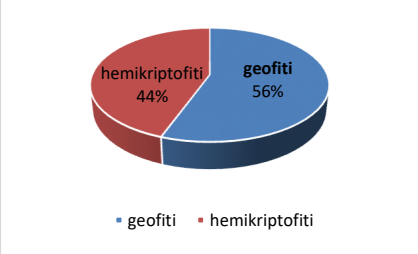
Vrsta	Datum	Pokrovnost	Učestalost	Gustoća
Crocus vernus (L.) Hill, šafran	7.2.2026.	1	4 %	2
	14.2.2026.	2	20 %	2
	21.2.2026.	3	20 %	3
	26.2.2026.	3	20 %	3
Leucojum vernum L., proljetni drijemovac	14.2.2026.	3	40 %	4
	21.2.2026.	3	40 %	4
	26.2.2026.	3	40 %	4
Ranunculus ficaria L., živorodni žabnjak	21.2.2026.	1	4 %	1
	26.2.2026.	2	20 %	2
Helleborus atrorubens Waldst. et Kit., crnocrveni kukurijek	14.2.2026.	1	4 %	1
	21.2.2026.	1	4 %	1
	26.2.2026.	1	4 %	1

Analizirani životni oblici zabilježenih proljetnica

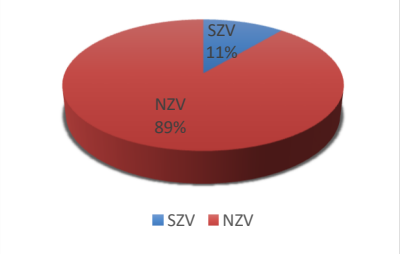
Analizom životnih oblika proljetnica utvrđeno je kako 44 % vrsta pripada hemikriptofitima, a 56 % geofitima (slika 6).

Analiza zabilježenih proljetnica prema riziku od nestajanja na prirodnim staništima i zakonskoj zaštiti

Analizom zabilježenih proljetnica prema riziku od nestajanja na prirodnim staništima i zakonskoj zaštiti utvrđeno je kako samo *Helleborus atrorubens* Waldst. et Kit., crnocrveni kukurijek, pripada kategoriji strogo zaštićenih vrsta, što u postotcima iznosi 11 % (slika 7) od ukupno zabilježenih vrsta. Navedena je vrsta i endem. Vrste *Galanthus nivalis* L., visibaba; *Ranunculus ficaria* L., živorodni žabnjak i *Leucojum vernum* L., proljetni drijemovac, prema IUCN kategoriji imaju status LC (najmanje zabrinjavajuće vrste), a *Helleborus atrorubens* Waldst. et Kit., crnocrveni kukurijek, status VU (osjetljiva vrsta).



Slika 6 Životni oblici zabilježenih proljetnica



Slika 7 Udio zaštićenih vrsta u ukupnom broju vrsta

Analizirana sličnost između lokaliteta pomoću Sőrensenovog koeficijenta[2] sličnosti

Analizom sličnosti najveća je sličnost utvrđena između između parka oko naše škole i parka oko Muzeja, te oko parka oko Muzeja i park šume Tepec-Palačnik-Stražnik i iznosi 40 %. Najmanja je sličnost utvrđena između parka oko naše škole i šume hrasta lužnjaka u Domaslovcu i iznosi 0 %. Iz rezultata u 2026. vidljivo je kako ne postoji sličnost između parka oko naše škole i ostalih staništa. Najveća sličnost uočena je između park šume Tepec-Palačnik-Stražnik i parka uz kuću Wagner-Bilokapić, 100 % (tablica 13).

Tablica 13 Sličnost između istraživanih lokaliteta

	Park oko naše škole	Park uz kuću Wagner-Bilokapić		Park oko Muzeja		Park šuma Tepec-Palačnik-Stražnik		Šuma hrasta lužnjaka, Domaslovec	
Park oko naše škole	-	28,57 %	0 %	40 %	0 %	25 %	0 %	0 %	0 %
Park uz kuću Wagner- Bilokapić		-		25 %	66 %	28,57 %	100 %	12,5 %	40 %
Park oko Muzeja				-		40 %	66 %	16,67 %	33,33 %
Park šuma Tepec-Palačnik-Stražnik						-		20 %	40 %
Šuma hrasta lužnjaka, Domaslovec								-	

Analiza ankete o poznavanju proljetnica i njihovih staništa

Anketirana su dva 5. razreda, a uzorak je činilo 38 učenika, 26 dječaka i 12 djevojčica. Na početku ankete pitali smo ih zanimaju li ih biljke i 10 učenika je potvrdno odgovorilo (3 djevojčice i 7 dječaka). U prirodi je od 2.2.2026. do 22.2.2026. proljetnice vidio 21 učenik/učenica i to najčešće na travnjaku ili u šumi. Učenici navode kako u prirodi mogu prepoznati jaglac, šafran, visibabu.

RASPRAVA

Istraživanjem proljetne flore urbanih i šumskih staništa Samobora tijekom 2025. i 2026. evidentirano je 9 biljnih vrsta. Šest vrsta pripada razredu dvosupnica, a tri jednosupnica. U istraživanju provedenom 2025. evidentirano je osam, a 2026. sedam vrsta. Živorodni žabnjak je zabilježen samo 2026., a mrtva kopriva i šumska pužarka samo 2025. Najveći broj vrsta 2025. zabilježen je u parku uz kuću Wagner-Bilokapić, a 2026. u šumi hrasta lužnjaka u Domaslovcu. Tijekom istraživanja u parku uz kuću Wagner-Bilokapić uočili smo da su obavljani građevinski radovi što je moglo utjecati na populaciju proljetnica.

[2] Zelenom su bojom u tablici označeni rezultati iz 2025., a narančastom iz 2026. godine

Razlozi ugroženosti i nestanka proljetnica mogu biti razni. Neki od njih su: pretjerano sabiranje, direktno uništavanje staništa, nestanak oprašivača, prirodna vegetacijska sukcesija uslijed prestanka košnje i ispaše, te velika prisutnost stranih invazivnih vrsta. Ovakav negativni trend u brojnosti i raznolikosti proljetnica može se zaustaviti edukacijom stanovnika (Zejnić, 2017).

Većina zabilježenih vrsta pripada 56 % geofitima dok hemikriptofitima pripada 44 % vrsta. Zastupljenost pojedinih životnih oblika nekog područja ukazuje na klimatska obilježja tog područja te su u skladu s tim i utvrđeni udjeli životnih oblika u flori Samobora i okolice. Visoki je udio hemikriptofita (48 %) prema Raunkiaeru najzastupljeniji u području umjerene klime (Vitko, 2021). Relativno mali broj vrsta može se povezati sa kratkim periodom istraživanja, no istraživanje je pokazalo različitu dinamiku pojavnosti proljetnica tijekom 2025. i 2026. Proljeće kalendarski počinje tek krajem ožujka, no prve se proljetnice pojavljuju puno ranije, ponekad već u siječnju. Sezonske promjene na staništu bitno se razlikuju ovisno o tipu staništa (Boršić i Posavec-Vukelić, 2018). Zabilježene vrste odgovaraju literaturnim podacima. Boršić i Posavec (2018) kao najpoznatije proljetnice navodi visibabe, jaglace, šumarice i drijemovace koji nastanjuju svijetle, kontinentalne listopadne šume. Proljetni drijemovac nastanjuje nizinske, poplavne šumame hrasta lužnjaka (Boršić i Posavec-Vukelić, 2018) što odgovara i našim podacima. Od evidentiranih vrsta proljetnica prvi se na staništu pojavljuje šafran. Njegova se brojnost, učestalost i gustoća povećavaju od prvog nalaza prema svakom slijedećem. Isti trend može se primijetiti i kod ostalih vrsta. Crnocrveni kukurijek jedina je strogo zaštićena vrsta i endem, no nije u neposrednoj opasnosti od izumiranja. Vrste *Galanthus nivalis* L., visibaba; *Ranunculus ficaria* L., živorodni žabnjak i *Leucojum vernum* L., proljetni drijemovac, prema IUCN kategoriji imaju status LC (najmanje zabrinjavajuće), *Helleborus atrorubens* Waldst. et Kit., crnocrveni kukurijek status VU (osjetljiva vrsta).

IUCN kategorije ugroženosti imaju ulogu osigurati da sustav procjene ugroženosti svojti mogu provoditi različite osobe, od ljubitelja prirode do stručnjaka i time poboljšati objektivnost jasnim i nedvosmislenim kriterijima procjene različitih čimbenika koji utječu na rizik nestajanja svojte te osigurati sustav koji može olakšati usporedbu ugroženosti različitih svojta (Nikolić i Topić, 2005).

Analizom sličnosti među staništima u 2025. najveća je sličnost uočena između parka oko naše škole i parka oko Muzeja, te parka oko Muzeja i park šuma Tepec-Palačnik-Stražnik i iznosei 40 %.

Iz rezultata u 2026. vidljivo je kako ne postoji sličnost između parka oko naše škole i ostalih staništa. Najveća sličnost uočena je između park šume Tepec-Palačnik-Stražnik i parka uz kuću Wagner-Bilokapić, 100 %. Sva navedena staništa redovito se održavaju. Nešto je drugačije stanište park šuma Tepec-Palačnik-Stražnik jer je većim dijelom prekriven šumom. Nema sličnosti između parka oko naše škole i šuma hrasta lužnjaka u Domaslovcu. Šuma u Domaslovcu poplavna je šuma na nižoj nadmorskoj visini djelomično izložena nekontroliranoj sječi koja može utjecati i na brojnost proljetnica.

Nismo uočili bitnu razliku s obzirom na nadmorsku visinu. U literaturi pronašli podatke o proljetnicama u parkovima našeg grada. Anketa koju smo proveli među učenicima pokazala je kako većina učenika ne pokazuje interes za biljke, a mali broj učenika prepoznaje proljetnica. Nezainteresiranost učenika prema nastavnim temama u kojima se govori o biljkama potvrđuju i druga istraživanja (Lukša, 2013).

ZAKLJUČCI

Temeljem rezultata dobivenih ovim istraživanjem doneseni su sljedeći zaključci:

- potvrđena je hipoteza da na različitim staništima/lokalitetima nalazimo različite vrste proljetnica koje se pojavljuju u različitom periodu i s različitom učestalošću, gustoćom i pokrovnošću što se može povezati sa ekološkim uvjetima na staništu (temperatura zraka, nadmorska visina) ili tipom staništa (urbana ili šumska staništa);
- djelomično su potvrđene hipoteze koje govore o povezanosti ekoloških uvjeta na staništu sa biologijom vrste proljetnica i rizikom od nestajanja. Za potvrđivanje ove hipoteze potrebno je provesti dugotrajnije istraživanje;
- potvrđena je hipoteza da učenici slabo poznaju proljetnice jer pokazuju slabiji interes za botaničke sadržaje.

LITERATURA

Blažević Cindrić I. 2019. Analiza ugroženosti krajobrazne raznolikosti Samobora. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, https://urn.nsk.hr/ urn: nbn:hr: 204:799392, pristupljeno 12.1.2026.

Boršić I., Posavec-Vukelić V. 2018. Proljetnice u Hrvatskoj. Hrvatska agencija za okoliš i prirodu, Zagreb.

Buzjak N., Dujmović I., Feletar P., Feletar D., Petrić H., Ibrišević R., Sijerković M. 2011. Samobor zemljopisno-povijesna monografija. Meridijani, Samobor.

Domac R. 1994. Flora Hrvatske: priručnik za određivanje bilja. Školska knjiga, Zagreb.

Dujmović I. 2007. Fizičko-geografske značajke Samoborskog gorja i Plješivičkog prigorja. Meridijani, Samobor.

Ellenberg H. 1988. Vegetation Ecology of Central Europe (4th Edition). Cambridge University Press, Cambridge.

Feletar D. 2004. Samobor: U povodu 762. obljetnice grada Samobora. Meridijani, Samobor.

Garašić D. 2012. Primjerenost biološkog obrazovanja tijekom osnovnog i gimnazijskog školovanja. Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.

Javorka S., Csapodi V. 1991. Iconographia florae partis Austro-orientalis akademiai kiado, Budapest.

Karta Hrvatske. 2026. Karta Samobora, https://www.karta.com.hr/samobor/samobor-karta/ #google_vignette, pristupljeno, 15.1.2026.

Narodne novine. 2016. Pravilnik o izmjenama i dopunama pravilnika o strogo zaštićenim vrstama, Narodne novine 73/2016, https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2016_08_73_1745.html, pristupljeno 15.1.2026.

Narodne novine. 2008. Pravilnik o sakupljanju zaštićenih samoniklih biljaka u svrhu prerade i trgovine. Narodne novine 154/08, https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008_12_154_4197.html, pristupljeno 15.1.2026.

Narodne novine. 2013. Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama. Narodne novine 144/13, https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_12_144_3086.html, pristupljeno 15.1.2026.

Nikolić T. ur. 2025. Flora Croatica Database, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, http://hirc.botanic.hr/fcd, pristupljeno 15.1.2026.

Nikolić T. 2006. Priručnik za inventarizaciju i praćenje stanja. Vaskularna flora. Državni zavod za zaštitu prirode Republike Hrvatske, Zagreb.

Nikolić T., Topić J. (ur.) 2005. Crvena knjiga vaskularne flore Hrvatske. Red Data Book of Vascular Flora of Croatia. Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.

Štamol V. 1985. Cenološka istraživanja puževa (Gastropoda) u šumskim fitocenozama Medvednice. Magistarski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, str. 15–17.

Šugar I. 1972. Biljni svijet Samoborskog gorja. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.

Vitko S. 2021. Inventarizacija samonikle flore grada Samobora i okolice. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb.

Zejnić B. 2017. Proljetna travnjačka flora područja Ljubljanica (Odransko polje). Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb.

Prilog 1. Anketa: Praćenje proljetnica u gradu Samoboru

Provodimo praćenje stanja (monitoring) proljetnica u gradu Samoboru. Željeli bismo saznati nešto više i o ugroženosti njihovih populacija. Molimo vas da ispunite ovaj anketni listić. Upišite samo odgovore za koje ste sigurni da su točni. Unaprijed hvala!

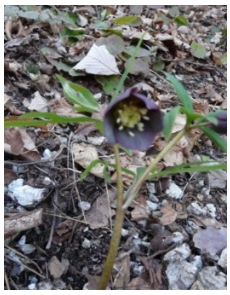
1. Spol: M Ž
2. Da li si ove godine primijetio/la proljetnice u svojoj okolici? DA NE
3. Zanimaju me me biljke? DA NE

Ako ste na 2. pitanju zaokružili DA odgovorite i na sljedeća pitanja.

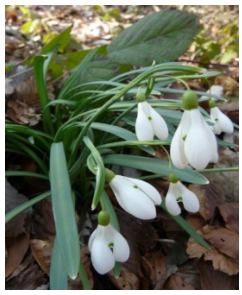
4. Navedi naziv ulice, naselja ili trga gdje si primijetio/la proljetnice.
   _____
5. Upiši datum, odnosno mjesec i godinu kada si primijetio/la te biljke.
   _____
6. Odaberi tip staništa gdje rastu ili dopuni ako je drugačije stanište:
   a) travnjak b) vrt c) šuma d) voćnjak e) park f) _____
7. Koje si djelatnosti čovjeka uočio/la na tom staništu? (zaokruži slova ispred odabranih odgovora)
   a) trava se kosi redovito b) trava se ne kosi c) nedavno je uređena ulica
   d) već godinama nije uređivana ulica e) grade se stambeni i poslovni prostori u blizini
   f) uređuje se prometnica g) brojna vozila prolaze ulicom h) ljudi beru i presađuju proljetnice
8. Zaokruži tvrdnju koja se odnosi na proljetnice u tvojem vrtu ili dvorištu:
   a) presađene su b) same su iznikle
9. Na praznu crtu upiši nazive svih proljetnica koje si uočio/la ovog proljeća i uz njih upiši da li su cvale ili ne, koje je boje bio cvijet i da li miriše (npr. visibaba, cvate, bijeli cvijet, ne miriše).
   _____

Najčešće proljetnice našeg kraja

obični jaglac


crnocrveni kukurijek

mirisava ljubica


visibaba

šafran

kukurijek-snježnica

dvolisni procjepak

proljetni drijemovac

volujsko oko

šumarica

Ljekovite biljke – prijatelji ili neprijatelji povrtnim kulturama

Marija Perak, 7. razred

Osnovna škola Josip Pupačić, Omiš
Mentor: *Tamara Banović*

SAŽETAK
Ovaj rad istražuje alelopatski učinak ružmarina, koprive i lovora, na klijavost i rani rast povrtnih kultura: graha, rotkvice i rajčice. Cilj istraživanja bio je utvrditi utječu li vodeni ekstrakti ružmarina i koprive različitih koncentracija na klijavost i rast povrtnih kultura te ispitati klijavost i rast navedenih povrtnica u zemlji koja je tretirana pripravcima ružmarina, koprive i listova lovora. Također, cilj je bio analizirati mikroskopske promjene sjemenki graha tijekom klijanja. U Petrijevim zdjelicama sjemenke su tretirane vodom te 25 %, 50 % i 100 %-tnim vodenim ekstraktima ružmarina i koprive. Najbolja klijavost graha i rajčice zabilježena je u vodi, dok je u višim koncentracijama ekstrakata (50 % i 100 %) klijanje bilo potpuno inhibirano. Rotkvica je pokazala veću otpornost te je klijala u svim uvjetima, a najveći postotak klijavosti zabilježen je u 25 %-tnoj otopini koprive, što upućuje na mogući stimulativni učinak toga pripravka u nižim koncentracijama. Prosječna duljina klica svih ispitanih biljnih vrsta bila je najveća u vodi, dok su više koncentracije ekstrakata značajno smanjile rast klice. Mikroskopskom analizom sjemenki graha uočene su degenerativne promjene parenhimskih stanica i smanjenje rezervnih tvari, osobito u uzorcima s vodom gdje je zabilježeno intenzivnije klijanje. Tijekom praćenja klijanja i rasta u zemlji sve su vrste proklijale, pri čemu su grah i rajčica pokazali veću klijavost u prisutnosti listova lovora, a rotkvica bilježi najbolju klijavost u posudama koje su zalijevane vodom. Najveći prirast stabljike graha zabilježen je u posudi zalijevanoj ružmarinom, a najmanji u posudi zalijevanoj vodom. Iako su jedinke rotkvice imale najveću klijavost, petnaestog dana od početka istraživanja, stabljike su se osušile i propale. Rezultati potvrđuju da učinak ljekovitih biljaka ovisi o koncentraciji ekstrakta i razvojnoj fazi biljke te ukazuju na njihov potencijal u ekološkoj poljoprivredi kao prirodnih regulatora rasta.

Ključne riječi: *alelopatija; klijanje; rast biljaka*

UVOD

Još u nižim razredima osnovne škole iz prirode smo učili o ljekovitim učincima mediteranskih biljaka poput lavande, kamilice i ružmarina, a ja sam vidjela svoju baku kako zaljeva neke dijelove svoga vrta vodenim pripravcima koprive, ružmarina i bijelog luka protiv korova. Nije mi bilo jasno kako to mogu biti ljekovite biljke ako se koriste protiv korova. S tim pitanjem sam došla svojoj nastavnici te je tako nastala ideja o ovom istraživačkom radu u kojem se istražuje alelopatski učinak biljaka. Alelopatija je biološki fenomen u kojem jedan organizam izlučuje biokemijske tvari koje utječu na rast, opstanak i reprodukciju drugog organizma. Te biokemijske tvari znane kao alelokemikalije mogu imati pozitivan (stimulativni) i negativan (inhibitorni) utjecaj na druge organizme (Azizi i Fujii, 2006). Austrijski botaničar Molish prvi je upotrijebio pojam alelopatije davne 1937. godine u svojoj knjizi *Der Einfluss einer Pflanze uf die andere-Allelopathie*, kako bi opisao utjecaj jedne biljke, putem biokemijskih reakcija, na rast susjedne biljke (Molish, 1938). Međunarodno alelopatsko društvo je 1996. definiralo alelopatiju kao svaki postupak koji uključuje sekundarne metabolite proizvedene od biljaka i raznih mikroorganizama koji utječu na rast i razvoj poljoprivrednih i bioloških sustava (osim životinja), uključujući pozitivne i negativne učinke (Sisodia i Siddiqui, 2010). Alelokemikalije su pohranjene u stanicama u obliku vodotopivih glikozida, polimera, uključujući tanine, lignine i soli. Te kemikalije mogu biti oslobođene isparavanjem, ispiranjem s lišća ili stabljika, izlučevinama korijena i razgradnjom biljnih ostataka (Putnam, 1985). Pojedine biljke proizvode korisne spojeve koji potiču klijanje i rast drugih biljaka poboljšanjem apsorpcije hranjivih tvari ili povećanjem otpornosti na štetnike i bolesti, dok druge

inhibiraju rast ili su toksične za druge vrste, a neke mogu čak negativno utjecati na vlastitu vrstu ako se više puta uzgajaju u istom tlu zbog nakupljanja autoinhibitornih spojeva (Sanchez, 2025).

Biljke na različite načine nastoje opstati u svom okolišu, a oslobađanjem kemijskih spojeva međusobno komuniciraju podržavajući ili odbijajući jedne druge te tako pridonose opstanku svoje ili druge vrste. Danas se u poljoprivredi potiče ekološka proizvodnja i upotreba bioloških metoda nastojeći pri tom smanjiti upotrebu kemijskih sredstava i tako očuvati zdravlje i bioraznolikost tla.

U ovom radu korištene su tri vrste povrtnih biljaka: grah, rajčica i rotkvica te je na njima ispitan alelopatski učinak ružmarina, lovora i koprive.

Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) vazdazeleni je grm iz porodice usnača (Lamiaceae) koji je prepoznatljiv po igličastim listovima i svijetloplavim cvjetovima. Ružmarin ima intenzivan miris, ali i okus. Može se pronaći diljem Europe, no ima ga i u Sjevernoj Americi (Sasikumar, 2012). Upotrebljava se svježi ili sušeni kao začin, koristi se u kozmetici i liječenju nekih zdravstvenih problema (Kreni zdravo, 2011). Ekstrakti i ostaci listova ružmarina pokazali su negativne učinke na klijanje i rast biljaka poput salate i raznih korova. Ovi učinci uključuju smanjeno klijanje sjemenki, usporen rast korijena i izbojaka. Ružmarin može imati i poticajan učinak na rast i klijanje nekih biljaka. Tako niske koncentracije ekstrakta ili eteričnog ulja ružmarina mogu povećati klijanje i rani razvoj kod nekih biljaka, poput riže (Elghobashy i sur., 2024).

Lovor (*Laurus nobilis* L.) je biljka mediteranskog podrijetla iz porodice Lauraceae, koja ponekad uspijeva i na području s blagom kontinentalnom klimom. To je vazdazeleno grmoliko bilje koje cvjeta u proljeće, a ima snažan miris i gorak okus. Plod lovora su male bobice. Lovorov list se koristi kao začin, ali i kao lijek (Knezović Žuna, 2018). Istraživanja potvrđuju da vodeni ekstrakti lovora mogu inhibirati klijanje i rast različitih usjeva i korova u laboratorijskim uvjetima (Sekine i sur., 2020; Hamad i sur., 2023).

Kopriva je zeljasta biljka iz porodice kopriva (Urticaceae) s približno 80 vrsta raširenih u umjerenim područjima. Njezini stabljika i listovi pokriveni su krhkim jednostaničnim dlakama žarnicama. Pri dodiru, vršak dlake se lomi, a žarnica poput injekcijske igle prodire u kožu, kamo se izlije njezin sadržaj koji izaziva bol, crvenilo i mjehure na koži. U Hrvatskoj je prisutno šest vrsta kopriva, a sve su nitrofilne (rastu na tlu s puno dušika). Znanstvena istraživanja pokazuju da ekstrakti koprive mogu negativno utjecati na klijanje i rani rast mnogih korovnih biljaka, ali i usjeva i povrća. Ekstrakti koprive vrste *Urtica dioica* L. smanjuju klijanje i rast izbojaka i korijena usjeva i drugih biljaka poput pšenice, ječma i špinata, osobito pri višim koncentracijama ekstrakta u tlu ili kulturi (Bojović i sur., 2018). Neka istraživanja, uključujući laboratorijske pokuse s vodenim ekstraktima biljaka, pokazuju da nižim koncentracijama ekstrakata koprive može doći do poticanja rasta ili klijanja nekih biljaka (Balenović, 2020).

Istraživačka pitanja koja su me potakla na ovo istraživanje su sljedeća. Utječu li vodeni pripravci herbicidnih biljaka na klijavost sjemenki i rast biljaka koje koristimo u prehrani? Ovisi li klijavost sjemenki graha, rotkvice i rajčice o koncentraciji vodenih pripravaka koprive i ružmarina? Što se događa sa sjemenkama na mikroskopskoj razini u ovisnosti u kakvom mediju se događa klijanje?

Ciljevi ovoga rada su sljedeći:

1. utvrditi razlike klijavosti sjemenki graha, rotkvice i rajčice tretiranih vodom, vodenim ekstraktom ružmarina i vodenim ekstraktom koprive te usporediti klijavost sjemenki graha, rotkvice i rajčice ovisno o koncentraciji vodenih ekstrakta koprive i ružmarina;

2. analizirati mikroskopske promjene na sjemenkama graha tretirane vodom, vodenim ekstraktom ružmarina i vodenim ekstraktom koprive;
3. ispitati utjecaj vode, vodenih ekstrakta ružmarina i koprive te listova lovora na klijavost sjemenki graha, rotkvice i rajčice uzgojenih u zemlji te odrediti razlike utjecaja vodenog ekstrakta ružmarina, vodenog ekstrakta koprive i listova lovora na rast stabljike graha, rotkvice i rajčice.

Na temelju svega navedenoga, postavljene su sljedeće hipoteze:

1. klijavost sjemenki graha, rotkvice i rajčice bit će veća ako ih tretiramo vodom, nego vodenim ekstraktima ružmarina i koprive;
2. klijavost sjemenki graha, rotkvice i rajčice razlikovat će se ovisno o koncentraciji vodenih ekstrakata koprive i ružmarina, što je koncentracija ekstrakata veća bit će manja klijavost;
3. klijavost sjemenki i rast stabljike graha, rotkvice i rajčice u tlu bit će veća ako ih tretiramo vodom, nego vodenim ekstraktom ružmarina, vodenim ekstraktom koprive i listovima lovora;
4. sjemenke graha tretirane vodom će imati manje zalihe škroba i proteina u odnosu na sjemenke tretirane ekstraktima ružmarina i koprive.

METODE RADA

Istraživanje je provedeno u školskom laboratoriju tijekom studenoga i prosinca 2025. godine. Nakon nabavke biljnih materijala pripremljeni su vodeni ekstrakti koprive i ružmarina u različitim koncentracijama te su njima tretirane sjemenke graha, rotkvice i ružmarina.

Biljni materijal

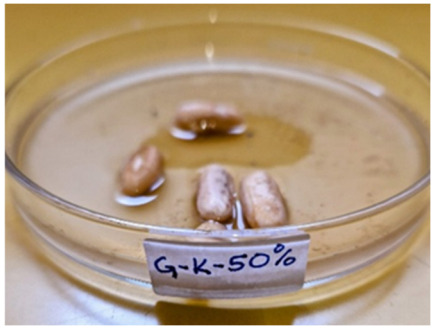
Od biljnog materijala u istraživanju su korištene sjemenke graha, rajčice i rotkvice te usitnjeni listovi koprive, ružmarina i lovora. Sjemenke graha i rotkvice nabavljene su iz organskog uzgoja u poljoprivrednoj apoteci. Sjemenke rajčice proizvođača *Impex* nabavljene su komercijalno, kao i usitnjeni listići koprive proizvođača *Pampa*. Listovi ružmarina ubrani su u školskom vrtu.

Priprava vodenih ekstrakata

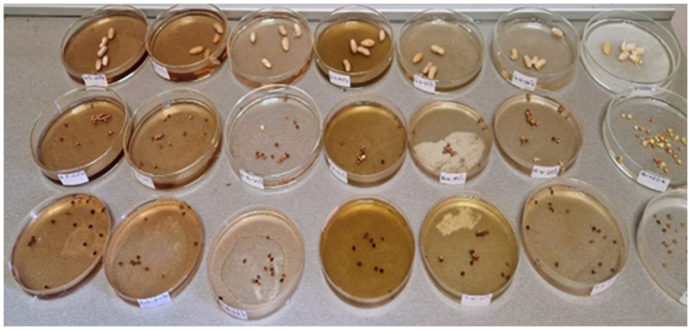
Vodeni ekstrakti koprive pripremljen je tako da je 500 g usitnjenih listića potopljeno u 5 L vode, miješano i ostavljeno na sobnoj temperaturi tijekom 24 sata (Markić, 2023). Nakon 24 sata pripravak je filtriran kroz žičano cjedilo i spremljen u čistu posudu. Na taj način dobiven je vodeni ekstrakt koprive koji je označen kao 100 %-tni. 1,5 L tako pripremljene otopine razrijeđeno je s jednakim volumenom vode i dobivena je 50 %-tni vodeni ekstrakt, a potom se 1 L te otopine razrijedi s dodatnom 1 L vode. Tako je dobiven 25 %-tni pripravak. Na isti način pripremljeni su vodeni ekstrakti ružmarina.

Klijanje u Petrijevim zdjelicama

U prvom dijelu istraživanja praćena je klijavost sjemenki graha, rajčice i rotkvice tretiranih običnom vodom te pripravcima vodenih ekstrakata koprive i ružmarina različitih koncentracija. Na dno sterilnih Petrijevih zdjelica postavljen je filter papir, Petrijeve zdjelice su označene tako da se u svakom trenutku može vidjeti koje sjemenke se nalaze u pojedinoj posudi i čime se uzorci zalijevaju tijekom klijanja (slika 1 i slika 2). Prije postavljanja sjemenki na filter papir, aplicirano je po 5 ml ekstrakata koprive i ružmarina određenih koncentracija i 5 mL vode. Petrijeve zdjelice su zatim poklopljene i ostavljene na sobnoj temperaturi od 22 ± 2 °C i svakodnevno tijekom sedam dana zalijevale su se s dodatna 2 mL točno određene tekućine, prema oznaci na Petrijevoj zdjelici (slika 1, tablica 1).



Slika 1 Oznaka Petrijevih zdjelica u kojima se prati klijanje sjemenki



Slika 2 Praćenje klijavosti sjemenki graha, rotkvice i rajčice u vodi i vodenim ekstraktima koprive i ružmarina

U tablici 1 prikazani su svi uzorci i pridružene oznake koje su korištene u ovom dijelu istraživanja.

Tablica 1 Popis uzoraka korištenih tijekom istraživanja klijanja u Petrijevim zdjelicama

Oznaka	Biljna vrsta	Broj sjemenki	Otopina za zalijevanje
G - V	grah	5	voda
G – K – 25 %	grah	5	25 % kopriva
G – K – 50 %			50 % kopriva
G – K – 100 %			100 % kopriva
G – R – 25 %	grah	5	25 % ružmarin
G – R – 50 %			50 % ružmarin
G – R – 100 %			100 % ružmarin
Ro - V	rotkvica	20	voda
Ro – K – 25 %	rotkvica	20	25 % kopriva
Ro – K – 50 %			50 % kopriva
Ro – K – 100 %			100 % kopriva
Ro – R – 25 %	rotkvica	20	25 % ružmarin
Ro – R – 50 %			50 % ružmarin
Ro – R – 100 %			100 % ružmarin
Ra - V	rajčica	20	voda
Ra – K – 25 %	rajčica	20	25 % kopriva
Ra – K – 50 %			50 % kopriva
Ra – K – 100 %			100 % kopriva
Ra – R – 25 %	rajčica	20	25 % ružmarin
Ra – R – 50 %			50 % ružmarin
Ra – R – 100 %			100 % ružmarin

Sedmoga dana od početka istraživanja prebrojan je broj proklijalih sjemenki u pojedinim Petrijevim zdjelicama te je izračunat postotak klijavosti prema formuli: Klijavost (%) = (broj proklijanih sjemenki / ukupan broj sjemenki) × 100.

Ravnalom je izmjerena duljina korjenčića klice svih proklijalih sjemenki u svakoj posudi i izračunata je srednja vrijednost njihova rasta u mm te su rezultati prikazani grafički.

Mikroskopska analiza sjemenke graha tijekom klijanja u različitim vodenim ekstraktima

Proklijale sjemenke graha pripremljene su za mikroskopsku analizu na Zavodu za patologiju Kliničkog bolničkog centra Split.

Nakon rezanja sjemenke graha skalpelom, dobiveni uzorci se stavljaju u posebne kazetice i uranjaju u formalin na 24 h. Nakon toga preparat se prebacuje u aparat (histokinet) gdje se uzorak obrađuje. Po izlasku iz aparata u kazetice se ulijeva tekući parafin koji se nakon toga hladi do pola sata i uzorak se vadi iz kazetice u obliku parafinske kocke. Potom slijedi bojanje po Mayeru: Hemalaun-Eozin (Glavina

Durdov, 2023). Preparati su promatrani svjetlosnim mikroskopom pri povećanjima do 1000 x radi analize promjena parenhimskih stanica supki i sadržaja rezervnih tvari.

Klijanje i rast biljaka u zemlji

U drugom dijelu istraživanja pratila se klijavost i rast stabljike graha, rotkvice i rajčice čije su sjemenke posijane u zemlji. Površina svih posuda je jednaka i iznosi 416 cm2, duljina spremnika je 32 cm, a širina 13 cm. U svaku od pripremljenih posuda, stavljen je jednak volumen (1,2 L) zemlje za cvijeće proizvođača Florabella. Za ovaj dio istraživanja je bilo potrebno 12 posuda i zemlja, za svaku vrstu sjemenki bile su potrebne četiri posude jer se jedna zalijevala s vodom, druga s 50 %-tnim vodenim ekstraktom koprive, treća s 50 %-tnim vodenim ekstraktom ružmarina, a u četvrtu je stavljeno po 5 usitnjenih listova lovora i tijekom istraživanja zalijevano vodom. Iako je prvotna ideja da se za zalijevanje zemlje koriste 100 %-tni pripravci, korištene su 50 %-tne otopine jer su rezultati klijanja u 100 %-tnim otopinama u Petrijevim zdjelicama bili jako loši, odnosno u tako koncentriranim otopinama nisu proklijale sjemenke svih biljaka korištenih u radu. U četiri spremnika za cvijeće posloženo je po 15, u vodi prethodno nabubrenih sjemenki graha koje su prekrivene zemljom tako da se nalaze oko 2 cm ispod površine (Bendelja i sur., 2015). U po četiri spremnika posijane su sjemenke rotkvice i rajčice gdje je u svaki od spremnika poredano 100 ne pregusto raspoređenih sjemenki. Prema uputama proizvođača, sjemenke rotkvice i rajčice su sijane jako plitko, bez prethodnog bubrenja.

U tablici 2 prikazani su svi uzorci i pridružene oznake koje su korištene u ovom dijelu istraživanja.

Tablica 2 Popis uzoraka korištenih tijekom istraživanja klijanja i rasta biljaka u zemlji

Oznaka	Biljna vrsta	Broj sjemenki	Otopina za zalijevanje
G – V	grah	15	voda
G – K			50 % kopriva
G – R			50 % ružmarin
G – L			voda preko listova lovora na zemlji
Ro – V	rotkvica	100	voda
Ro – K			50 % kopriva
Ro – R			50 % ružmarin
Ro – L			voda preko listova lovora na zemlji
Ra – V	rajčica	100	voda
Ra – K			50 % kopriva
Ra – R			50 % ružmarin
Ra – L			voda preko listova lovora na zemlji

Posude s uzorcima izložene su jednakim uvjetima (slika 3). Postavljene su na osvijetljenom mjestu učionice pri sobnoj temperaturi te su zalijevane jednakom količinom vode, odnosno pripremljenim vodenim ekstraktima koprive i ružmarina.

Slika 3 Posude za cvijeće korištene u istraživanju

U svim posudama bilježio se početak klijanja kao trenutak kada je iz zemlje proklijala i postala vidljiva prva biljka. Bilježio se broj proklijalih sjemenki u svakoj posudi i izračunao postotak klijavosti za svaku

od biljnih vrsta u pojedinim uvjetima. Potom se pratio rast stabljika proklijalih biljaka u cm, koji se mjerio ravnalom od površine zemlje do vrška stabljike. Mjerenje visine stabljike započelo je deseti dan od dana sijanja. Sve biljke graha su označene, numerirane i mjerene svako peti dan, te je izračunata srednja vrijednost visine stabljike biljaka u svakom uzorku za dnevno mjerenje. Zbog velikog broja jedinki u svakom od uzoraka sa sjemenkama rotkvice i rajčice te nemogućnosti mjerenja visine svake jedinke, označilo se i numeriralo po deset jedinki u svakom uzorku te se izračunala srednja vrijednost koja se prikazala grafički.

REZULTATI

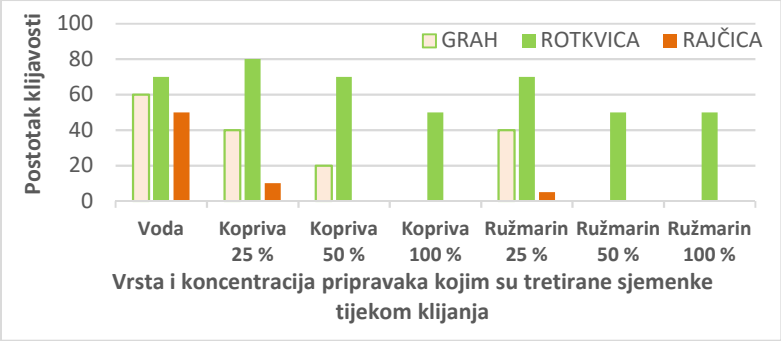
Klijavost sjemenki graha, rotkvice i rajčice u vodi i vodenim ekstraktima različitih koncentracija koprive i ružmarina u Petrijevim zdjelicama

Proklijale sjemenke graha, rotkvice i rajčice u Petrijevim zdjelicama prebrojane su sedmog dana od početka istraživanja. Postotci klijavosti navedenih sjemenki prikazani su grafikonom na slici 4.

Najbolja klijavost graha bila je u uzorku zalijevanom vodom, gdje su proklijale tri od pet sjemenki te je klijavost 60 %, dok u 100 %-tnim vodenim ekstraktima ružmarina i koprive te u 50 %-tnom vodenom ekstraktu ružmarina nije proklijala niti jedna sjemenka graha. U 25 %-tnim i 50 %-tnim vodenim ekstraktima koprive, grah je također proklijao, ali u manjem postotku u odnosu na uzorak zalijevan običnom vodom.

Iz grafikona je također vidljivo da su sjemenke rotkvice proklijale u svim uzorcima bez obzira čime su zalijevane. Tako je najveća klijavost sjemenki rotkvice od 80 % bila u 25 %-tnom vodenom ekstraktu koprive, potom u vodi, 25 %-tnom vodenom ekstraktu ružmarina i 50 %-tnom vodenom ekstraktu koprive u kojima je udio proklijalih sjemenki bio 70 %. Klijavost od 50 % bila je u preostale tri otopine, 100 %-tnim vodenim ekstraktima koprive i ružmarina te u 50 %-tnom vodenom ekstraktu ružmarina.

Klijavost rajčice bila je najbolja u vodi i iznosila je 50 % te u manjem postotku u posudama koje su zalijevane 25 %-tnim vodenim ekstraktima koprive i ružmarina, dok u otopinama s većim postotkom ružmarina i koprive u potpunosti izostaje klijanje rajčice. Usporedni rezultati broja proklijalih sjemenki i postotka klijavosti sjemenki graha, rotkvice i rajčice u vodi i vodenim ekstraktima ružmarina i koprive prikazani su u prilogu 1.

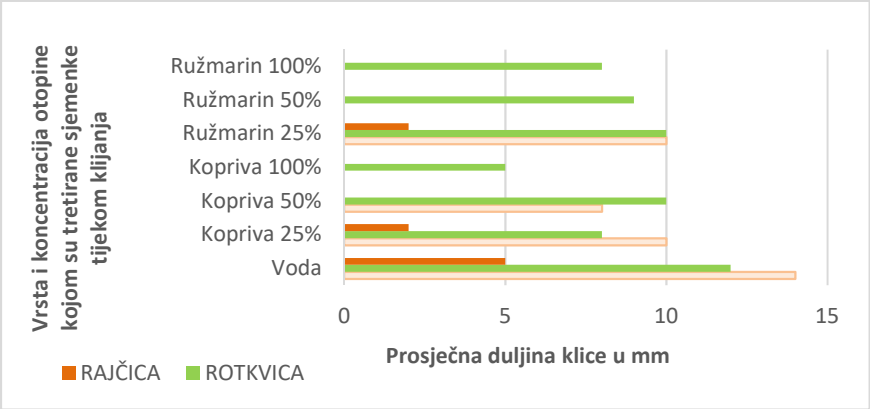


Slika 4 Klijavost sjemenki graha, rotkvice i rajčice zalijevanih vodom i vodenim ekstraktima koprive i ružmarina različitih koncentracija

Prosječna duljina klica sjemenki graha, rotkvice i rajčice tretiranih vodom i različitim koncentracijama vodenih ekstrakta ružmarina i koprive u Petrijevim zdjelicama

Desetoga dana od početka istraživanja, klijavost je bila jednaka zabilježenoj klijavosti sedmoga dana. Desetoga dana ravnalom su izmjerene duljine klica svih proklijalih sjemenki u pojedinim posudicama

te je izračunata srednja vrijednost duljine klice u mm. Odnos duljina klica tretiranih vodom i vodenim pripravcima različitih koncentracija ružmarina i koprive prikazan je grafikonom na slici 5.



Slika 5 Prosječna duljina klica sjemenki graha, rotkvice i rajčice tretiranih vodom i različitim koncentracijama vodenih ekstrakata ružmarina i koprive u Petrijevim zdjelicama

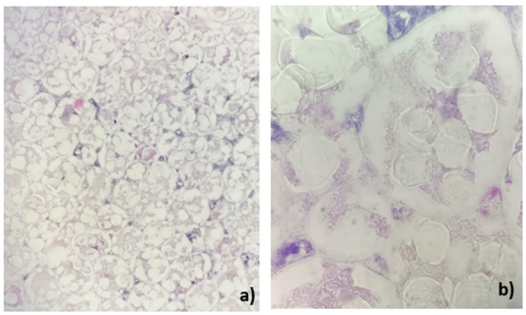
Najveća prosječna duljina klica sjemenki graha izmjerena je u vodi potom u 25 %-tnim vodenim ekstraktima ružmarina i koprive. Kako sjemenke graha nisu proklijale u 100 %-tnim pripravcima vodenih ekstrakata ružmarina i koprive i 50 %-tnom vodenom ekstraktu koprive, prosječna duljina klica sjemenki graha nije se mogla izmjeriti.

Najveća prosječna duljina klice rotkvice izmjerena je u vodi te s malom razlikom u 25 %-tnim vodenim ekstraktima ružmarina i koprive.

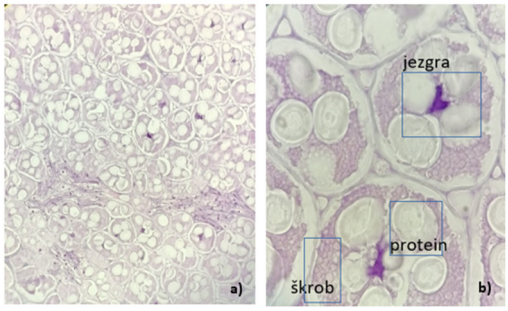
Prosječna duljina klice rajčice najveća je u vodi dok joj je u 100 % i 50 %-tnim vodenim ekstraktima ružmarina i koprive potpuno inhibiran rast te se duljina nije mogla izmjeriti.

Analiza mikroskopskih preparata sjemenki graha zalijevanih vodom, vodenim ekstraktom ružmarina i koprive

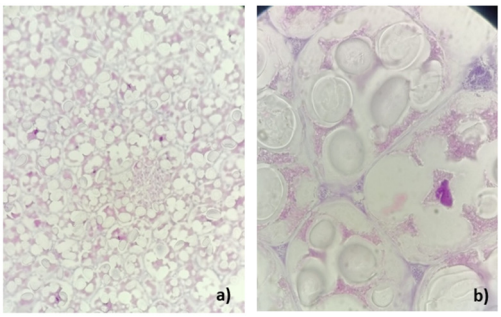
Na mikroskopskim preparatima sjemenki graha uočavaju se degenerativne promjene na parenhimskim stanicama kotiledona u kojima se može uočiti smanjen sadržaj škroba i proteina. Slika 6 prikazuje fotografije mikroskopskog preparata sjemenke graha koja je zalijevana vodom, slika 7 fotografije sjemenke graha tretirane 25 %-nim vodenim ekstraktom ružmarina, a slika 8 fotografije sjemenke graha tretirane 25 %-nim vodenim ekstraktom koprive.



Slika 6 Mikroskopski preparat sjemenke graha koje su zalijevane vodom pod povećanjem 20 x (a) i 1000 x (b)



Slika 7 Mikroskopski preparat sjemenke graha koje su zalijevane vodenim ekstraktom ružmarina pod povećanjem 20 x (a) i 1000 x (b)

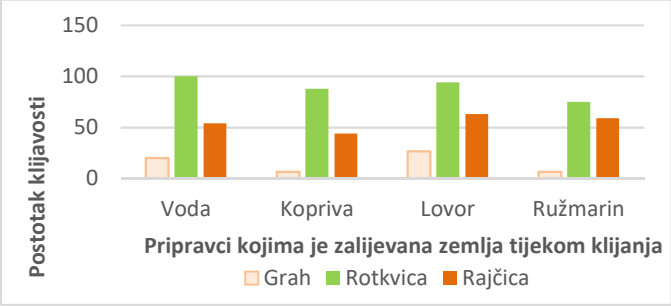


Slika 8 Mikroskopski preparat sjemenke graha koje su zalijevane vodenim ekstraktom koprive pod povećanjem 20 x (a) i 1000 x (b)

U uzorku sjemenki graha zalijevanih vodom na mikroskopskom preparatu se uočavaju izražene degenerativne promjene parenhima, nešto manji sadržaj škroba i brojnije nakupine plavo-ljubičasto obojenih bakterija (slika 6) u odnosu na sjemenke graha koje su zalijevane vodenim ekstraktima ružmarina (slika 7) i koprive (slika 8).

Klijavost sjemenki graha, rotkvice i rajčice uzgojenih u zemlji tretiranih vodom, vodenim ekstraktima ružmarina i koprive te listovima lovora

Proklijale sjemenke graha, rotkvice i rajčice u posudama sa zemljom prebrojane su sedmoga dana od početka istraživanja. Na slici 9 grafički je prikazan postotak klijavosti navedenih sjemenki ovisno o tome je li zemlja zalijevana vodom, 50 %-tnim vodenim ekstraktom ružmarina, 50 %-tnim vodenim ekstraktom koprive ili se na površini zemlje nalaze listovi lovora, a zemlja je zalijevana vodom preko njih.



Slika 9 Ovisnost klijavosti sjemenki graha, rotkvice i rajčice u zemlji o pripravcima kojima se zalijevaju

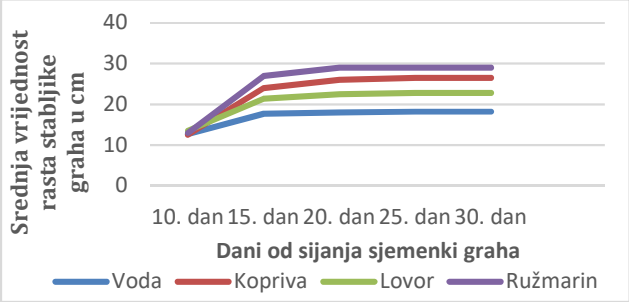
Iz grafičkog prikaza na slici 9 vidljivo je da su sjemenke proklijale u svim posudama. Najmanji postotak klijavosti u svim uvjetima imale su sjemenke graha dok je najveći postotak klijavosti u svim uvjetima uočen kod sjemenki rotkvice. Sjemenke graha i rajčice imaju najveći postotak klijavosti u posudama sa zemljom koja je prekrivena lišćem lovora, dok je najviše sjemenki rotkvice proklijalo u posudama koje

su zalijevane vodom i to njih 100 %. Usporedni rezultati broja proklijalih sjemenki i postotka klijavosti sjemenki graha, rotkvice i rajčice u tlu koji se zalijevao vodom, 50 %-tnim vodenim ekstraktima ružmarina i koprive ili vodom preko listova lovora prikazani su u prilogu 2.

Rast stabljika graha, rotkvice i rajčice uzgojenih u zemlji tretiranih vodom, vodenim ekstraktima ružmarina i koprive te listovima lovora

Desetog dana od sijanja sjemenki započelo se s praćenjem rasta stabljika graha, rotkvice i rajčice koje su zalijevane različitim pripravcima. Pratila se visina stabljike u cm, mjereći ravnalom počevši od površine tla do najviše točke stabljike.

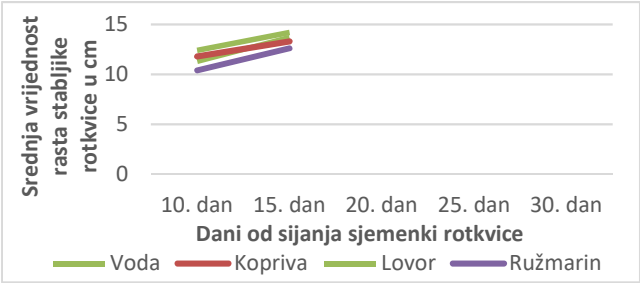
Sve biljke graha koje su proklijale su označene, numerirane i mjerene svako peti dan te je izračunata srednja vrijednost visine stabljike biljaka za uzorke u kojima je niknulo više od jedne sjemenke, dok je u uzorcima samo s jednom poraslom biljkom mjerena visina te biljke. Rezultat rasta stabljike graha u različitim uvjetima prikazan je grafikonom na slici 10.



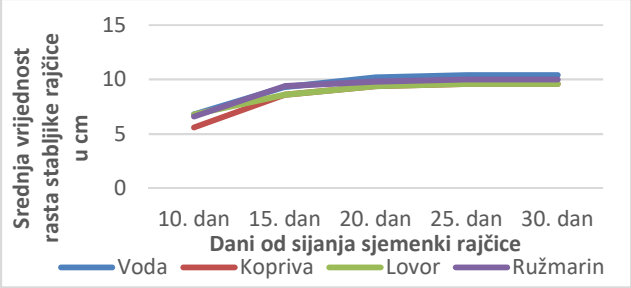
Slika 10 Rast stabljike graha u zemlji tretiranih vodom, vodenim ekstraktima ružmarina i koprive te listovima lovora

Najveća prosječna duljina stabljike graha bila je u posudi koja je zalijevana vodenim ekstraktom ružmarina. Tijekom tridesetog dana od početka istraživanja, duljina stabljike bila je 29 cm dok je najmanji prirast bio u vodi gdje je prosječna vrijednost bila 18,2 cm.

Zbog velikog broja jedinki u svakom od uzoraka tla sa sjemenkama rotkvice i rajčice te nemogućnosti mjerenja visine svake jedinke, označilo se i numeriralo po deset jedinki u svakoj posudi za cvijeće te se izračunala srednja vrijednost koja se prikazala grafički (slika 11 i slika 12).



Slika 11 Rast stabljike rotkvice u zemlji tretiranih vodom, vodenim ekstraktima ružmarina i koprive te listovima lovora



Slika 12 Rast stabljike rajčice u zemlji tretiranih vodom, vodenim ekstraktima ružmarina i koprive te listovima lovora

Prosječne duljine stabljika rotkvice i rajčice nisu pokazale značajniju razliku ovisno o tome jesu li zalijevane vodom, vodenim ekstraktima ružmarina i koprive ili su se u zemlji nalazili listići lovora. Na slici 11 vidljivo je da su prosječne duljine rasta stabljike rotkvice poprilično ujednačene, ali isto tako vidljivo je da nakon petnaestog dana od klijanja nisu uneseni podaci, a razlog tome je što su se biljke propale. Iz grafičkog prikaza na slici 12 primjećuje se da je prosječna vrijednost duljine stabljike rajčice od petnaestog dana od klijanja u potpunosti jednaka za jedinke koje su zalijevane otopinom koprive i one koje su bile u zemlji na kojoj su dodani usitnjeni listovi lovora. Najveći rast zabilježen je u posudi koja je zalijevana vodom.

RASPRAVA

Rezultati provedenog istraživanja potvrđuju da vodeni ekstrakti ružmarina i koprive te usitnjeni listovi lovora imaju izražen, ali različit utjecaj na klijavost sjemenki i rani rast biljaka graha, rotkvice i rajčice. Dobiveni podaci ukazuju na to da intenzitet i smjer djelovanja ovise o koncentraciji ekstrakta, biljnoj vrsti te razvojnoj fazi biljke, što je u skladu s općim postavkama o alelopatiji koje navode Azizi i Fujii (2006) te Sisodia i Siddiqui (2010).

U laboratorijskim uvjetima, praćeno je klijanje sjemenki graha, rotkvice i rajčice u Petrijevim zdjelicama kako bi se utvrdila prosječna duljina korjenčića klice proklijalih biljaka što u zemlji ne bi bilo moguće vidjeti. Klijavost graha i rajčice bila je najveća u vodi, dok su više koncentracije (50 % i 100 %) vodenih ekstrakata ružmarina i koprive pokazale snažan inhibitorni učinak, a u pojedinim slučajevima i potpunu inhibiciju klijanja. Ovakvi rezultati podudaraju se s nalazima Elghobashya i sur. (2024), koji navode da viši udjeli vodenih ekstrakata i eteričnih ulja ružmarina značajno smanjuju klijavost i rani rast osjetljivih vrsta. Inhibicijski učinak ružmarina povezuje se s prisutnošću fenolnih spojeva, uključujući rosmarinsku kiselinu, te hlapivih komponenti eteričnog ulja (Rice, 1984).

Sličan učinak zabilježen je i kod koprive, koja sadrži flavonoide i organske kiseline s mogućim inhibitornim djelovanjem (Erhatić, 2023). Za razliku od graha i rajčice, rotkvica je pokazala veću otpornost te je klijala u svim ispitivanim uvjetima. Najveći postotak klijavosti zabilježen je u 25 %-tnom vodenu ekstraktu koprive, što upućuje da niske koncentracije potencijalno toksičnih spojeva mogu stimulirati fiziološke procese. Sličan stimulativni učinak niskih koncentracija biljnih ekstrakata navodi Balenović (2020) u istraživanju klijavosti kupusa.

Prosječna duljina klice kod sve tri biljne vrste bila je najveća u vodi, dok su više koncentracije ekstrakata značajno smanjile rast ili ga potpuno inhibirale. Ovi rezultati sukladni su navodima Putnama i sur. (1985) da alelokemikalije u višim koncentracijama ometaju diobu i elongaciju stanica korijena, čime se smanjuje ukupna duljina klice.

Analizom mikroskopskih preparata sjemenki graha utvrđene su degenerativne promjene parenhimskih stanica kotiledona i smanjen sadržaj rezervnih tvari, osobito u uzorcima tretiranima vodom, gdje je klijanje bilo intenzivnije. Ovaj nalaz u skladu je s fiziologijom klijanja opisanom u literaturi prema kojoj dolazi do razgradnje škroba i proteina radi osiguravanja energije za rast klice (Taiz i sur., 2015). Zanimljivo je opažanje veće prisutnosti bakterija u uzorcima tretiranima vodom u odnosu na one tretirane ekstraktima ružmarina i koprive. To može upućivati na potencijalno antimikrobno djelovanje ružmarina, što je u skladu s poznatim antiseptičkim svojstvima ove biljke (Sasikumar, 2012). Iako ovo istraživanje nije kvantitativno analiziralo mikrobiološki sastav, opažanje otvara mogućnost daljnjih istraživanja o dvojakoj ulozi biljnih ekstrakata, kao alelopatskih i antimikrobnih sredstava.

Za razliku od dijela istraživanja u Petrijevim zdjelicama, tijekom praćenja klijanja sjemenki graha, rotkvice i rajčice u zemlji došlo je do klijanja u svim uvjetima. Grah i rajčica pokazali su veću klijavost u prisutnosti listova lovora, dok je rotkvica imala najbolju klijavost u posudi zalijevanoj vodom. Ovi rezultati djelomično odstupaju od nalaza Hamada i sur. (2023), koji su utvrdili izražen inhibitorni učinak lovora na klijavost nekih usjeva u laboratorijskim uvjetima. Mogući razlog odstupanja klijavosti je razlika uvjeta klijanja u zemlji ili bez nje. U tlu dolazi do razgradnje i adsorpcije alelokemikalija na čestice tla, čime se smanjuje njihova dostupnost i toksičnost. Također, mikroorganizmi tla mogu razgrađivati bioaktivne spojeve, ublažavajući njihov inhibitorni učinak (Nishanth i sur., 2008). Stoga su rezultati u tlu realističniji prikaz poljoprivrednih uvjeta nego oni u sterilnim Petrijevim zdjelicama.

Zanimljiv je nalaz da je najveći prosječni rast stabljike graha zabilježen u posudi zalijevanoj 50 %-tnim ekstraktom ružmarina iako je u fazi klijanja ružmarin imao inhibitorni učinak. To potvrđuje da su klijanje i vegetativni rast različite fiziološke faze s različitom osjetljivošću na alelokemikalije. Moguće je da niže koncentracije spojeva nakon klijanja potiču obrambene mehanizme biljke ili djeluju kao blagi stresni čimbenik koji stimulira rast.

Kod rotkvice je uočeno propadanje biljaka petnaestog dana, bez obzira na tretman. Vjerojatan uzrok je prenapučenost i kompeticija za svjetlost, vodu i hranjive tvari, što predstavlja metodološko ograničenje ovoga rada. Time se pokazuje da alelopatski učinak nije jedini čimbenik koji utječe na klijanje i rast biljaka.

Rezultati ovoga rada potvrđuju da učinak ljekovitih biljaka na povrtne kulture nije jednoznačno pozitivan ili negativan, već ovisi o koncentraciji, vrsti biljke i njenoj razvojnoj fazi. U laboratorijskim uvjetima u Petrijevim zdjelicama dominira inhibitorni učinak viših koncentracija ekstrakata herbicidnih biljaka, dok u zemlji dolazi do ublažavanja tog učinka i mogućeg stimulativnog djelovanja.

Ovo istraživanje doprinosi razumijevanju alelopatskog potencijala ružmarina, koprive i lovora u kontekstu ekološke poljoprivrede. Rezultati sugeriraju da bi se razrijeđeni biljni ekstrakti mogli koristiti kao prirodni regulatori rasta ili sredstva za suzbijanje korova, ali uz pažljivo određivanje koncentracije i primjene. Daljnja istraživanja s većim brojem ponavljanja, kemijskom analizom ekstrakata i statističkom obradom podataka potrebna su kako bi se dobiveni nalazi dodatno potvrdili i preciznije objasnili alelopatsko djelovanje biljaka.

ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata provedenog istraživanja doneseni su sljedeći zaključci:

- postotak klijavosti sjemenki graha i rajčice najveći je u vodi, dok je klijavost rotkvice najveća u 25 %-tnom vodenom ekstraktu koprive, a potom u vodi i 50 %-tnim vodenim ekstraktima koprive i ružmarina;
- postotak klijavosti sjemenki graha, rotkvice i rajčice razlikuje se ovisno o koncentraciji vodenih ekstrakta koprive i ružmarina; za grah i rajčicu je potvrđeno da veća koncentracija ekstrakata znači manji postotak klijavosti sjemenki, dok je klijavost rotkvice u 50 % i 100 % pripravku jednaka;
- prosječna duljina rasta korjenčića klice najveća je za sve povrtne kulture koje su u Petrijevim zdjelicama zalijevane vodom, vodeni ekstrakti imaju inhibitorni učinak na prosječni rast korjenčića klice sjemenki graha, rotkvice i rajčice;
- klijavost sjemenki posijanih u zemlji, veća je u posudama zalijevanim vodom samo kod rotkvice, dok su rajčica i grah najviše proklijali u posudi s listovima lovora preko kojih se zalijevano vodom;

- prosječni rast stabljike graha najveći u posudi zalijevanoj vodenim ekstraktom ružmarina, a najmanji prosječni rast zabilježen je vodi te se može zaključiti da vodeni ekstrakt ružmarina ima stimulativni učinak na rast stabljike graha;
- iako su sjemenke rotkvice imale najveći postotak klijavosti u zemlji, biljke su se petnaestog dana od sijanja počele sušiti i propadati; razlog bi mogao biti velika brojnost proklijalih jedinki na malom prostoru;
- razlika u rastu stabljike rajčice ovisno čime se zalijeva je jako mala te se ne može zaključiti da otopina kojom se zalijeva utječe na rast biljaka;
- zbog boljeg rasta klice, na mikroskopskom preparatu supki graha koje klijaju u vodi uočavaju se izražene degenerativne promjene parenhima, manji sadržaj škroba i proteina te veću brojnost nakupina bakterija u odnosu na sjemenke graha zalijevane vodenim ekstraktima ružmarina i koprive;
- budući da se među parenhimskim stanicama supki u Petrijevim zdjelicama s grahom koji je zalijevan ružmarinom ne nalaze bakterije, moguće je zaključiti da ekstrakti ružmarina imaju baktericidno djelovanje.

LITERATURA

Azizi M., Fujii Y. 2006. Allelopathic effect of some medicinal plant substances on seed germination of *Amaranthus retroflexus* and *Portulaca oleraceae*. Acta Horticulturae 699: 61–68.

Balenović M. 2020. Utjecaj vodenih ekstrakata samoniklog bilja na klijanje sjemena kupusa (*Brassica oleracea var. Capitata* L.). Završni rad, Sveučilište u Zadru, Odjel za ekologiju, agronomiju i akvakulturu, https://repozitorij.unizd.hr/theses/unizd%3A4878/show-file/0?utm_source=chatgpt.com, pristupljeno 6.1.2026.

Bendelja D., Gudić M., Operta E. 2015. Priroda 5 - radna bilježnica za prirodu u petom razredu osnovne škole. Školska knjiga, Zagreb.

Bojović B., Jakovljević Z. D., Stanković M. 2018. Phytotoxic potential of common nettle (*Urtica dioica* L.) on germination and early growth of cereals and vegetables. Allelopathy Journal 43(2): 175–186.

Elghobashy R. M., El-Darier S. M., Atia A. M., Zakaria M. 2024. Allelopathic potential of aqueous extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus vulgaris* L. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 24:700–715.

Erhatić R., Horvat D., Zorić Z., Repajić M., Jović T., Herceg M., Habuš M., Srečec S. 2023. Aqueous extrects of four medical plants and their allelopatic effects on germination and seedings: their morphometric characteristics of three horticultural plant species. Applied Scinences 13(4): 2258.

Glavina Durodov M. 2023. Laboratorijske histopatološke tehnike – priručnik za zdravstvene studije. Redak, Split.

Hamad S. W., Rasul S. A., Naby K. Y., Dhahir I. M., Abdulrahman M. D., Bapir S. H. 2023. Allelopathic actions of *Laurus nobilis* on seed germination and growth of some crop and weed species. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/1252/1/012043, pristupljeno 6.1.2026.

Knezović Žuna K. 2018. Lovorov list - ljekovitost, uzgoj, primjena i cijena. Kreni zdravo, https://krenizdravo.dnevnik.hr/prehrana/samoniklo-bilje/lovorov-list-ljekovitost-uzgoj-primjena-i-cijena, pristupljeno 3.1.2026.

Kreni zdravo. 2011. Čaj od ružmarina kao lijek - koristi i nuspojave, https://krenizdravo.dnevnik.hr/prehrana/cajevi/caj-od-ruzmarina, pristupljeno 6.1.2026.

Markić Ž. 2023. Priručnik za uzgoj povrća i začinskog bilja na balkonu ili terasi. Gradsko društvo Crvenog križa, Županja.

Molisch H. 1938. Der Einfluß einer Pflanze auf die andere. Allelopathie. Protoplasma 29: 472–473.

Nishanth T., Prasanta C. B., Baoshan X. 2008. Bioavailability of allelochemicals as affected by companion compounds in soil matrices. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56 (10): 3706–3713.

Putnam A. R. 1985. Allelopathic research in agriculture: Past highlights and potential. The Chemistry of Allelopathy Biochemical Interactions Among Plants, American Chemical Society Symposium 268: 1–8.

Rice E. L. 1984. Allelopathy (Second ed.). Academic Press, Orlando.

Sanchez M. 2025. Biljna alelopatija: što je to, vrste primjeri i primjena u organskoj poljoprivredi. JardineriaOn, https://hr.jardineriaon.com/%C5%A1to-je-biljna-alelopatija.html, pristupljeno 3.1.2026.

Sasikumar B. 2012. Rosemary. U: Peter, K. V., Handbook of Herbs and Spices, Woodhead Publishing in Food Science and Technology, Oxford i Cambridge, str. 243-252.

Sekine T., Appiah K. S. , Azizi M., Fujii Y. 2020. Plant growth inhibitory activities and volatile active compounds of 53 spices and herbs. Plants 9: 264–277.

Sisodia S., Siddiqui M. B. 2010. Allelopathic effect by aqueous extracts of different parts of *Croton bonplandianum* Baill. on some crop and weed plants. Journal of Agricultural Extension and Rural Development 2: 22–28.

Taiz L., Zeiger E., Møller I. M., Murphy A. 2015. Plant physiology and development. Sinauer Associates, https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=1752778 , pristupljeno 13.2.2026.

PRILOZI

Prilog 1 Tablica klijavosti sjemenki graha, rotkvice i rajčice tretiranih vodom, različitim koncentracijama vodenih ekstrakta ružmarina i koprive u Petrijevim zdjelicama

Pripravak za zalijevanje	Ružmarin 100 %			Ružmarin 50 %			Ružmarin 25 %			Kopriva 100 %			Kopriva 50 %			Kopriva 25 %			Voda		
Biljna vrsta	Gr	Ro	Ra	Gr	Ro	Ra	Gr	Ro	Ra	Gr	Ro	Ra	Gr	Ro	Ra	Gr	Ro	Ra	Gr	Ro	Ra
Broj proklijalih sjemenki	0	10	0	0	10	0	2	14	1	0	10	0	1	14	0	2	16	2	3	14	10
Klijavost (%)	0	50	0	0	50	0	40	70	5	0	50	0	20	70	0	40	80	10	60	70	50

Prilog 2 Tablica klijavosti sjemenki graha, rotkvice i rajčice u tlu koje je zalijevano vodom, 50 %-tnim vodeni ekstraktima ružmarina i koprive ili je prekriveno listićima lovora i zalijevano vodom

Pripravak za zalijevanje	Voda			Kopriva			Lovor			Ružmarin		
Biljna vrsta	Gr	Ro	Ra	Gr	Ro	Ra	Gr	Ro	Ra	Gr	Ro	Ra
Broj proklijalih sjemenki	3	100	54	1	88	44	4	94	63	1	75	59
Klijavost (%)	20	100	54	6,7	88	44	26,7	94	63	6,7	75	59

Utjecaj energetskih pića na rast i razvoj bakterije *Escherichia coli*

Davor Sabol, 7. razred
Andrija Tičinović, 7. razred

Osnovna škola Augusta Šenoe, Zagreb
Mentor: *Martina Čiček*

SAŽETAK
Energetska pića sadrže kofein, šećer te različite dodatke poput taurina, ginsenga, guarane i vitamina B, a njihova pretjerana konzumacija može imati negativne učinke na zdravlje. U ovom istraživanju ispitivan je utjecaj četiri komercijalna energetska pića (Hell, Red Bull, Uragan i Kong Strong) na rast i razvoj bakterije *Escherichia coli* u školskom kabinetu i laboratorijskim uvjetima. Pretpostavka istraživanja bila je da će prisutnost šećera u energetskim pićima potaknuti rast bakterije *E. coli* na hranjivim podlogama obogaćenima tim pićima. Eksperimentalni rezultati pokazali su da je rast bakterije bio potaknut jedino na hranjivim podlogama s dodatkom saharoze, pri čemu je optimalan rast zabilježen pri temperaturi od 37 °C. Suprotno početnoj hipotezi, podloge s dodatkom energetskih pića Hell, Uragan, Red Bull i Kong Strong nisu omogućile rast bakterija, neovisno o temperaturi držanja. Negativna kontrola s dodatkom antibiotika je očekivano spriječila rast bakterija. Izmjerene pH vrijednosti energetskih pića kretale su se između 4,4 i 5, što ukazuje na njihovu kiselost, no sama kiselost nije bila jedini čimbenik koji je mogao utjecati na sprječavanje rasta. Dobiveni rezultati upućuju na to da, unatoč prisutnosti šećera, određeni sastojci energetskih pića imaju učinak koji sprečava rast i razvoj bakterije *E. coli* u kontroliranim uvjetima.

Ključne riječi: bakterijski rast; pH vrijednost; broj kolonija

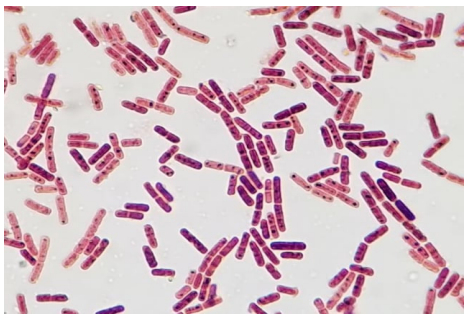
UVOD

Energetska pića predstavljaju skupinu bezalkoholnih napitaka koji sadrže visoke koncentracije metilksantina, ponajprije kofeina, te značajne količine šećera, najčešće saharoze, uz dodatke poput taurina, ginsenga, guarane i vitamina B. Uobičajeni udio kofeina u jednoj limenci kreće se od 80 do 300 mg, dok prosječna količina šećera iznosi oko 27 g u 250 mL, što odgovara više od pet žličica šećera. Energetska pića ubrajaju se među najbrže rastuće proizvode u industriji pića, a reklamiraju se kao napici koji povećavaju energiju, budnost i koncentraciju (HZJZ, 2023). U ovom istraživanju korištena su četiri komercijalna energetska pića: Hell, Red Bull, Uragan i Kong Strong (slika 1).

S porastom njihove popularnosti raste i zabrinutost zbog mogućih štetnih učinaka na zdravlje djece i adolescenata. Pretjerana konzumacija kofeina može uzrokovati povišen broj otkucaja srca, povišeni krvni tlak, mučninu, povraćanje, poremećaje spavanja, nemir, tjeskobu ili uznemirenost, a u ekstremnim slučajevima i smrt. Dugoročne posljedice povezane su s prekomjernim unosom šećera, pretilošću, razvojem šećerne bolesti i karijesa. Tijekom tjelesne aktivnosti konzumacija energetskih pića nije preporučljiva zbog kombiniranog učinka znojenja i diuretskog djelovanja kofeina, što može dovesti do dehidracije (HZJZ, 2023).

Jedan od mikroorganizama koji može biti pogođen sastojcima energetskih pića je *Escherichia coli*, bakterija koja prirodno nastanjuje ljudska crijeva kao dio fiziološke flore. Ima važnu ulogu u probavi vlakana i složenih šećera, sintezi vitamina i održavanju ravnoteže crijevne mikroflore. *E. coli* pripada skupini štapićastih bakterija (bacila) i često se koristi kao modelni organizam u mikrobiološkim istraživanjima zbog jednostavnog uzgoja i brzog razmnožavanja. Vrijeme generacije pri optimalnoj temperaturi od 37 °C iznosi 10 do 20 minuta (Volner, 2014). Na krutim hranjivim podlogama kolonije *E. coli* vidljive su kao blijedo mliječne, okrugle nakupine glatkih rubova (slika 2).

Slika 1 Vrste energetskih pića korištenih u istraživačkom radu
Autori: Sabol D., Tičinović A., 2025.



Slika 2 *Escherichia coli* promatrana mikroskopom
Izvor: Reddit, 2018

Ideja za ovo istraživanje proizašla je iz opažanja u školi, gdje učenici viših razreda povremeno ostavljaju prazne limenke energetskih pića u učionicama. To je potaknulo pitanje mogu li sastojci energetskih pića utjecati na rast bakterija koje se često koriste u različitim vježbama i istraživanjima.

Ranija istraživanja ukazuju na različite učinke sastojaka energetskih pića na mikroorganizme. McConnell i Bakermans (2023) utvrdili su negativnu povezanost između koncentracije kofeina i stope rasta *E. coli*, zaključivši da kofein može djelovati kao antimikrobno sredstvo. Vinson i sur. (2017) pokazali su da jedno energetsko piće (Starbucks Doubleshot Espresso Energy) potiče rast bakterije *Streptococcus mutans*, dok većina ostalih energetskih pića značajno inhibira rast. Aljaloud (2016) je analizirala mikrobiološku sigurnost energetskih pića te utvrdila da zbog kiselosti i/ili kofeina ona nisu pogodno okruženje za rast *E. coli*.
Ciljevi ovoga istraživanja su:

1. utvrditi utjecaj različitih energetskih pića na rast i razvoj bakterije *E. coli* na hranjivim podlogama;
2. usporediti rast bakterija na podlogama s energetskim pićima s pozitivnom i negativnom kontrolom;
3. ispitati postoji li razlika u rastu bakterija ovisno o vrsti energetskog pića.

Pretpostavke su:

- dodatak energetskih pića hranjivoj podlozi utjecat će na rast i razvoj bakterije *E. coli* u odnosu na podlogu bez energetskog pića;
- rast *E. coli* na podlogama s energetskim pićima razlikovat će se od rasta na pozitivnoj kontroli (saharoza) i negativnoj kontroli (antibiotik ampicilin);
- različite vrste energetskih pića uzrokovat će razlike u rastu *E. coli* na hranjivim podlogama.

METODE RADA

Istraživanje je provedeno u dva navrata. Prvi dio, koji je uključivao pripremu hranjivih podloga, nasađivanje bakterija i brojanje kolonija E. coli, odrađen je u kabinetu biologije 6. svibnja 2025. godine. Drugi dio istraživanja, koji je obuhvaćao ponovnu pripremu podloga, zasijavanje i inkubaciju u kontroliranim uvjetima, proveden je u laboratoriju 5. lipnja 2025. godine. Pojmovi korišteni u opisu metoda (npr. Bunsenov plamenik, krute podloge, zasijavanje) preuzeti su iz Perković i sur. (2023).

U istraživanju je korišten komercijalni laboratorijski soj *E. coli* DH5α (Thermo Fisher Scientific, #18265017), koji nije patogen niti infektivan za ljude. Upotrijebljen je čisti soj bakterije kako bi

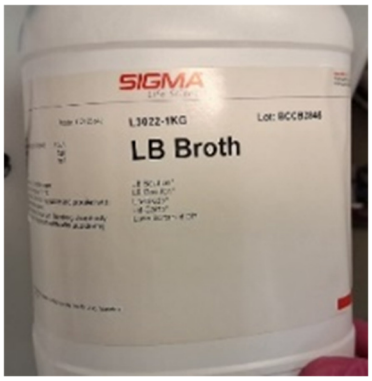
identifikacija i brojanje kolonija bili jednostavniji i pouzdaniji. Tijekom oba dijela istraživanja korištene su jednokratne rukavice, a u laboratoriju i zaštitna kuta. Energetska pića korištena u pokusu kupljena su u dvije različite trgovine. Budući da je korištena samo jedna vrsta bakterije uzgajana na čvrstoj podlozi kao čista kultura, brojanje kolonija bilo je jednostavno i jasno izvedivo.

Prije opisa pojedinih koraka, važno je naglasiti da su sve radne površine, pribor u laboratoriju kao i same limenke energetskih pića bili dezinficirani 70 %-tnim etanolom, dok dezinfekcija u kabinetu biologije nije bila provedena. U laboratoriju je tijekom pripreme podloga bio upaljen Bunsenov plamenik kako bi se spriječilo mikrobno onečišćenje, dok u kabinetu nije korišten.

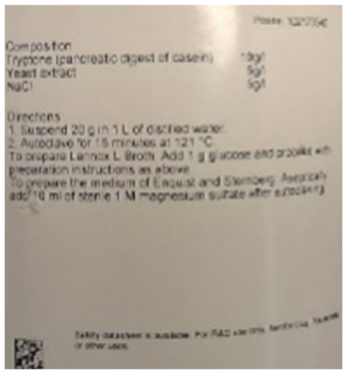
Priprema i otapanje agara

LB agar pripremljen je prema uputama proizvođača. U 1 L destilirane vode otopljeno je 25 g LB Broth praha (slika 3 i 4) i 12 g agara, nakon čega je otopina sterilizirana autoklaviranjem na 121 °C tijekom 30 minuta. Dobivena otopina (u daljnjem tekstu: agar) skrutnula se hlađenjem na sobnu temperaturu te ju je prije izlijevanja u Petrijeve zdjelice bilo potrebno ponovno otopiti.

U kabinetu biologije agar je otapan u staklenoj boci od 400 mL u vodenoj kupelji na električnom kuhalu tijekom 40 minuta (slika 5). U laboratoriju je agar otapan u mikrovalnoj pećnici 5 minuta na 800 W.



Slika 3 Pakiranje LB Broth prah
Autori: Sabol D., Tičinović A., 2025.



Slika 4 Upute na pakiranju LB Broth praha
Autori: Sabol D., Tičinović A., 2025.

Slika 5 Otapanje agara u vodenoj kupelji
Autori: Sabol D., Tičinović A., 2025.

Priprema krutih podloga za nasađivanje bakterija

Ukupno je pripremljena 21 plastična Petrijeva zdjelica, raspoređena po tri replike u okomitom nizu. Sve zdjelice označene su vodootpornim flomasterom s donje strane. Za svaku vrstu podloge (u daljnjem tekstu: uvjet, tablica 1) pripremljene su tri Petrijeve zdjelice.

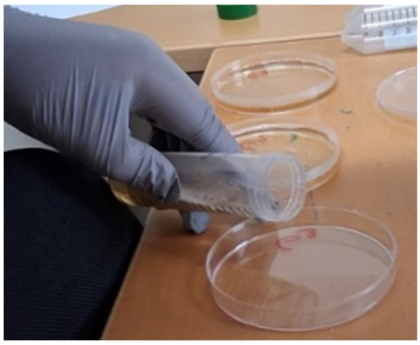
Tablica 1 Uvjeti, sastav podloge, količina agara te dodatci

Uvjet	Sastav podloge	Količina agara (mL)	Dodatak (mL / µL)	Ukupni volumen (mL)
agar (bez dodataka)	LB agar	50	–	50
saharoza (pozitivna kontrola)	LB agar + otopina saharoze	40	10 mL otopine saharoze	50
Hell	LB agar + energetsko piće Hell	40	10 mL Hell	50
Uragan	LB agar + energetsko piće Uragan	40	10 mL Uragan	50
Red Bull	LB agar + energetsko piće Red Bull	40	10 mL Red Bull	50
Kong Strong	LB agar + energetsko piće Kong Strong	40	10 mL Kong Strong	50
antibiotik (negativna kontrola)	LB agar + antibiotik ampicilin	50	50 µL ampicilina (100 µg/mL)	50

Kako bi podaci bili pregledniji, u tablici 1 prikazani su uvjeti, sastav i količina hranjivih podloga koje su pripremljene u plastičnim graduiranim epruvetama (Falcon) (slika 6). Sve otopine ručno su protresene i odmah izlijevane u Petrijeve zdjelice promjera 10 cm, u količini od približno 15 mL po zdjelici. Zdjelice su ostavljene 10 minuta da se podloga skrutne (slike 7 i 8).

Slika 6 Plastična graduirana epruveta od 50 mL
Autori: Sabol D., Tičinović A., 2025.

Slika 7 Uzimanje uzorka energetskog pića pomoću pipete
Autori: Sabol D., Tičinović A., 2025.

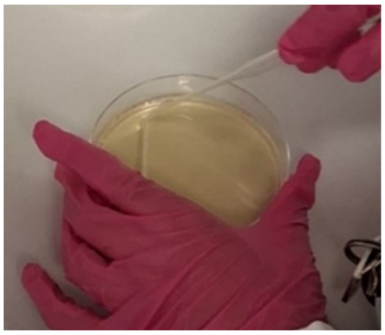


Slika 8 Ulijevanje tekućeg agara u Petrijevu zdjelicu
Autori: Sabol D., Tičinović A., 2025.

Zasijavanje uzoraka

Bakterije *E. coli* nalazile su se u tekućem mediju u ependorf epruveti te su prije upotrebe nekoliko puta ručno protresene kako bi se spriječilo taloženje stanica. Sterilnim nastavkom mikropipete uvučeno je 50 µL suspenzije bakterija, koje su izlijevane na sredinu svake Petrijeve zdjelice (slika 9). Bakterije su zatim ravnomjerno razmazane po površini podloge sterilnim staklenim štapićem (slika 10), prethodno dezinficiranim uranjanjem u 70 %-tni etanol i provlačenjem kroz plamen (u laboratoriju).

Slika 9 Izlijevanje bakterija na hranjive podloge pomoću mikropipete
Autori: Sabol D., Tičinović A., 2025.



Slika 10 Nasađivanje hranjive podloge *E. coli* u Petrijevoj zdjelici pomoću staklenog štapića
Autori: Sabol D., Tičinović A., 2025.

Broj zasijanih bakterija nije bio posebno definiran, jer je korišten protokol proizvođača koji preporučuje 50 µL suspenzije stanica za optimalne rezultate (Thermo Fisher bacteria protocol). Nakon zasijavanja zdjelice su poklopljene i okrenute naopako (agar prema gore) kako bi se spriječilo kapanje kondenzirane vode na kolonije. Sav korišteni pribor nakon upotrebe ispran je 70 %-tnim etanolom, a ruke su oprane sapunom unatoč nošenju rukavica.

Praćenje rasta bakterija

Petrijeve zdjelice pripremljene u kabinetu biologije držane su na sobnoj temperaturi (od 19 do 21 °C) i brojane nakon dva dana. Zdjelice pripremljene u laboratoriju inkubirane su pri 37 °C i brojane sljedeći

dan, 6. lipnja 2025. godine (slika 11). Brojanje kolonija izvedeno je označavanjem svake vidljive kolonije vodootpornim flomasterom s donje strane Petrijeve zdjelice (slika 12).

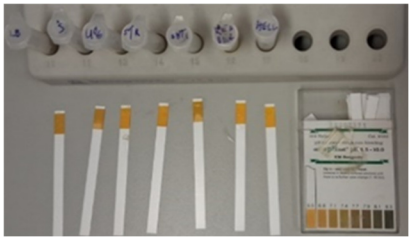
Slika 11 Inkubator za bakterije
Autori: Sabol D., Tičinović A., 2025.

Slika 12 Brojanje kolonija *E. coli*
Autori: Sabol D., Tičinović A., 2025.

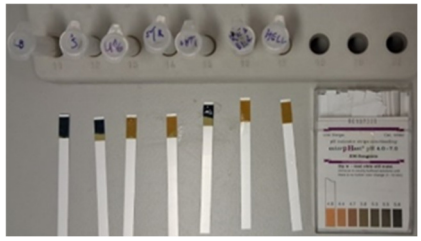
Određivanje pH vrijednosti krutih podloga

Nakon brojanja kolonija određena je pH vrijednost hranjivih podloga u svim uvjetima. Sa svake Petrijeve zdjelice sterilnom metalnom žličicom uzet je mali komadić podloge bez kolonija te prebačen u plastične epruvete volumena 1,5 mL (Eppendorf). Uzorci su zatim zagrijani u mikrovalnoj pećnici 1 do 2 minute na 800 W kako bi se podloga otopila.

U otopljenu podlogu uronjeni su indikatorski papirići. Za svaki uzorak korištene su dvije trakice: jedna raspona pH 6,5 do 8,3 (neutralno do lužnato; slika 13) i druga raspona pH 4,0 do 6,0 (kiselo do neutralno; slika 14). Usporedbom boje indikatorskih trakica s priloženim skalama određena je pH vrijednost svakog uzorka.



Slika 13 Indikatori za lužnatost
Autori: Sabol D., Tičinović A., 2025.



Slika 14 Indikatori za kiselost
Autori: Sabol D., Tičinović A., 2025.

U ovom istraživanju svi prikupljeni podaci obrađeni su pomoću programa Microsoft Excel. U Excelu su provedeni svi potrebni izračuni, uključujući određivanje prosječnih vrijednosti te standardne devijacije za svaki skup rezultata. Dobiveni statistički pokazatelji korišteni su za usporedbu replika i procjenu pouzdanosti mjerenja. Standardna devijacija je statistička mjera koja pokazuje koliko se pojedinačne vrijednosti u skupu podataka razlikuju od svoje prosječne vrijednosti. Ako je standardna devijacija mala, to znači da su rezultati međusobno slični i stabilni. Ako je standardna devijacija velika, to ukazuje na veliku raspršenost podataka i veće razlike među rezultatima (LZMK, 2024).

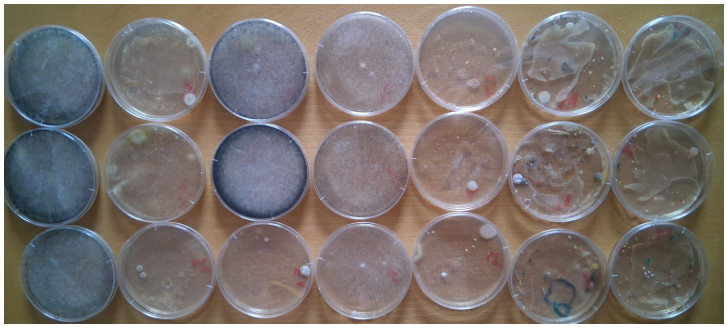
REZULTATI

U tablici 2 prikazani su nazivi energetskih pića te sastav tvari koje svako od korištenih napitaka sadrži. Ako je određena tvar prisutna, ali joj nije navedena količina, označena je znakom plus (+), dok su za tvari s navedenom količinom ili udjelom ti podaci posebno upisani.

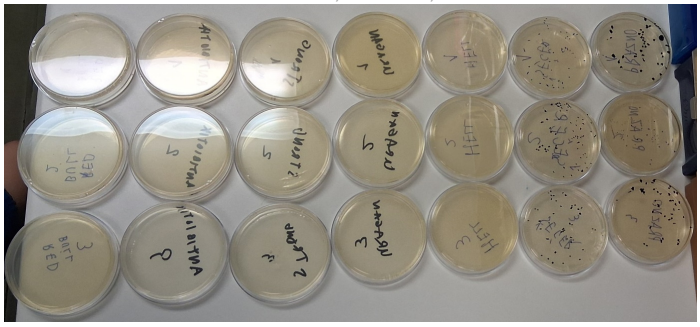
Tablica 2 Naziv energetskih pića i sastav s deklaracije proizvoda

	Naziv proizvoda/ značajke proizvoda	HELL classic	RED BULL	URAGAN clssic	KONG STRONG classic
Okus	tutti-frutti	+	-	voća	više vrsta voća
Sastojci	voda	+	+	+	+
	šećer	+	saharoza, glukoza	+	+
	limunska kiselina	+	+	+	+
	ugljični dioksid	min. 0,3%	-	+	+
	regulator kiselosti (natrijevi citrati)	+	natrijevi karbonati, magnezijevi karbonati	+	+
	kofein	(0,03%) 32mg/100mL	(0,03%) 32mg/100mL	(0,03%) 32mg/100mL	30mg/100mL
	aroma	+	+	+	+
	bojilo (amonijačni karamel)	+	obični karamel	+	obični karamel
	vitamini (niacin-vitamin B3 nikotinamid)	8,0mg	8,0mg	8,0mg	7,9mg
	pantotenska kiselina-vitamin B5 (kalcijev D-pantotenat)	2,0mg	2,0mg	2,0mg	2,0mg
	vitamin B6 (piridoksin-hidroklorid)	0,8mg	2,0mg	2,0mg	2,0mg
	vitamin B2 (riboflavin)	0,6mg	+	0,6mg	
	vitamin B12 (cijanokobalimin)	0,2µg	2,0µg	2,0µg	2,0µg
	glukuronolakton	+	-	+	+
	inozitol	+	-	+	-
	sol	0,20g	0,1g	0,20g	0,23g
	bjelančevine	0g	0g	<0,5g	0g
	ugljikohidrati/šećeri	11g	11g	11g	9g
	masti	0g	0g	<0,5g	0g
Prosječna hranjiva vrijednost/100 mL		194kJ (46kcal)	195kJ/ 46kcal	194kJ (46kcal)	162kJ (38kcal)

Slika 15 prikazuje hranjive podloge s bakterijama *E. coli* koje su zasijane u školi, dok slika 16 prikazuje hranjive podloge s bakterijama *E. coli* zasijane u laboratoriju.

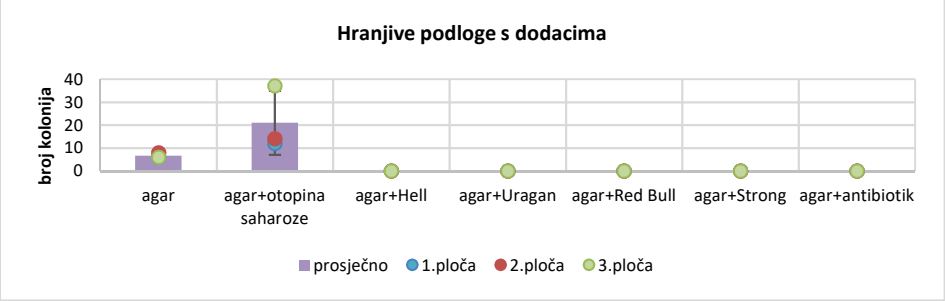


Slika 15 Hranjive podloge s bakterijama E.coli koje su nasađivane u školi
Autori: Sabol D., Tičinović A., 2025.



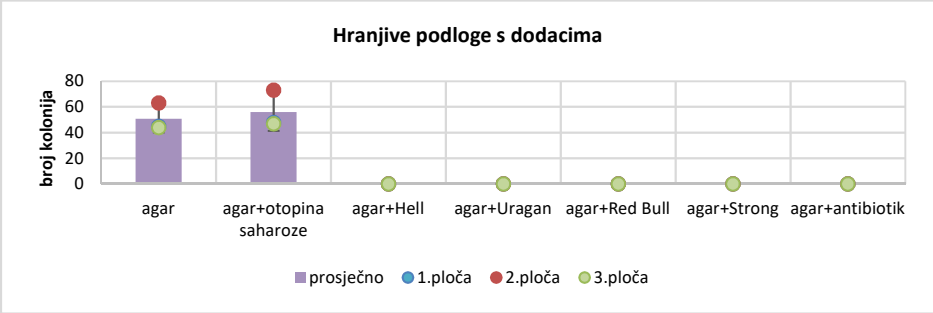
Slika 16 Hranjive podloge s bakterijama E.coli koje su nasađivane u laboratoriju
Autori: Sabol D., Tičinović A., 2025.

Slika 17 prikazuje broj kolonija bakterije *E. coli* u različitim eksperimentalnim uvjetima. Na horizontalnoj osi (x-os) nalazi se sedam uvjeta: hranjiva podloga bez dodataka, podloga s dodatkom saharoze kao pozitivna kontrola, četiri podloge s dodatkom različitih energetskih pića (Hell, Uragan, Red Bull i Kong Strong) te negativna kontrola koja sadrži antibiotik ampicilin. Na vertikalnoj osi (y-os) prikazan je broj formiranih kolonija. Bakterije *E. coli* zasijane su i brojane u školi, u kabinetu biologije, 12. svibnja 2025. godine pri temperaturi od 19 °C.



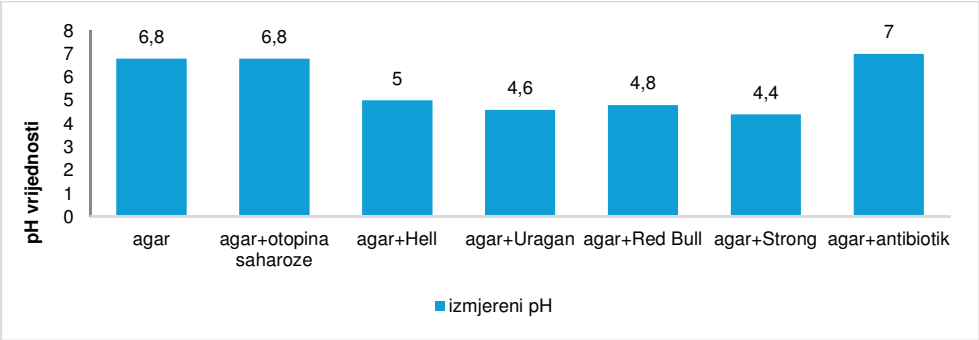
Slika 17 Broj kolonija bakterija *E.coli* u različitim uvjetima (nasađivano i brojano u školi)

Slika 18 prikazuje broj kolonija bakterije *E. coli* u različitim eksperimentalnim uvjetima. Na horizontalnoj osi (x-os) nalazi se sedam uvjeta: hranjiva podloga bez dodataka, podloga s dodatkom saharoze kao pozitivna kontrola, četiri podloge s dodatkom različitih energetskih pića (Hell, Uragan, Red Bull i Kong Strong) te negativna kontrola koja sadrži antibiotik ampicilin. Na vertikalnoj osi (y-os) prikazan je broj formiranih kolonija. Bakterije *E. coli* zasijane su i brojane u laboratoriju 6. lipnja 2025. godine pri temperaturi od 37 °C.



Slika 18 Broj kolonija bakterija *E.coli* u različitim uvjetima (nasađivano i brojano u laboratoriju)

Rezultati pH vrijednosti u različitim eksperimentalnim uvjetima prikazani su na Slici 19. Na horizontalnoj osi (x-os) nalazi se sedam hranjivih podloga: podloga bez dodataka, podloga s dodatkom saharoze kao pozitivna kontrola, četiri podloge s dodatkom različitih energetskih pića (Hell, Uragan, Red Bull i Kong Strong) te negativna kontrola koja sadrži antibiotik ampicilin. Na vertikalnoj osi (y-os) prikazana je izmjerena pH vrijednost svake hranjive podloge.



Slika 19 Izmjerene pH vrijednosti u različitim uvjetima

RASPRAVA

U ovom istraživanju želja je bila saznati kako energetska pića utječu na rast bakterije *Escherichia coli*. Očekivanje je bilo da će se bakterije bolje razvijati jer energetska pića sadrže puno šećera, a poznato je da *E. coli* koristi šećer kao izvor energije. Pretpostavka je bila da će se rast pojaviti i na podlogama s energetskim pićima, ali u manjoj količini nego na saharozi.

Tijekom prvog dijela istraživanja, koji je proveden u školi u nesterilnim uvjetima, na hranjivim podlogama razvile su se i druge bakterije i plijesni. To se vjerojatno dogodilo jer limenke energetskih pića nisu bile dezinficirane, pa su se na podloge prenijeli mikroorganizmi iz okoline. Zbog toga je istraživanje ponovljeno u laboratoriju, gdje su uvjeti bili puno čišći i kontroliraniji. Ipak, rezultati iz škole i laboratorija bili vrlo slični.

U oba okruženja najveći broj kolonija razvio se na podlozi sa saharozom. U školi je prosjek bio 21 kolonija, a u laboratoriju 56 kolonija, što pokazuje da viša temperatura (37 °C) potiče brži rast *E. coli*, što je u skladu s literaturom (Volner, 2014). Na čistom agaru također su uočene razlike: u školi je izbrojano 7 kolonija, a u laboratoriju 50. Ovi rezultati pokazuju da su saharoza i viša temperatura najvažniji čimbenici koji potiču rast bakterija.

Suprotno očekivanom, na podlogama s energetskim pićima nije se razvila niti jedna kolonija *E. coli*, ni u školi ni u laboratoriju. To znači da energetska pića nisu samo smanjila rast, nego su ga potpuno zaustavila. Ovakav rezultat slaže se s istraživanjem McConnella i Bakermansa (2023), gdje je opisano da kofein može usporiti ili potpuno zaustaviti rast *E. coli*. Budući da sva ispitivana energetska pića sadrže oko 30 mg kofeina na 100 , može se pretpostaviti da je kofein jedan od glavnih razloga zašto rast nije bio moguć.

Osim kofeina, važnu ulogu mogla je imati i kiselost energetskih pića. Izmjerene pH vrijednosti kretale su se od 4,4 do 5,0, što znači da su pića dosta kisela. *E. coli* najbolje raste u neutralnim uvjetima, oko pH 7. U literaturi (Aljaloud, 2016) navodi se da energetska pića zbog svoje kiselosti nisu dobro okruženje za rast ove bakterije. Dobiveni rezultati pokazuju da je upravo kombinacija kofeina, kiselosti i drugih dodataka (npr. limunske kiseline, aroma i vitamina) mogla potpuno zaustaviti rast.

Pretpostavka da će različite vrste energetskih pića imati različite učinke također nije potvrđena. Sva četiri pića (Hell, Uragan, Red Bull i Kong Strong) pokazala su isti rezultat – potpuna inhibicija rasta. To znači da su zajednički sastojci, poput kofeina i kiselina, vjerojatno najvažniji u sprječavanju rasta *E. coli*.

Negativna kontrola s ampicilinom također nije pokazala rast, što potvrđuje da je eksperiment bio pravilno izveden.

Dobiveni rezultati otvaraju i pitanje mogućeg utjecaja energetskih pića na korisne bakterije u crijevima. Iako su uvjeti u laboratoriju drugačiji od uvjeta u ljudskom tijelu, može se pretpostaviti da bi energetska pića mogla negativno djelovati na crijevnu mikrofloru, što je posebno važno za djecu i adolescente. Na to upozorava i HZJZ (2023), koji navodi da energetska pića nisu prikladna za mlade.

ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja o utjecaju energetskih pića na rast i razvoj bakterija E. coli doneseni su sljedeći zaključci:

- energetska pića (Hell, Uragan, Red Bull, Kong Strong) spriječila su rast bakterije *E. coli* u svim uvjetima istraživanja;
- najveći broj kolonija razvio se na podlozi sa saharozom, što potvrđuje da šećer potiče rast *E. coli* kada nema drugih tvari koje ga ometaju;
- negativna kontrola s ampicilinom očekivano je zaustavila rast, što potvrđuje ispravnost eksperimentalnog postupka;
- viša temperatura (37–40 °C) dovela je do značajno bržeg rasta bakterija na podlogama bez dodataka;
- pH vrijednosti energetskih pića (4,4–5,0) pokazuju da kiselost može pridonijeti sprječavanju rasta bakterija;
- rezultati su u skladu s ranijim istraživanjima koja navode da kofein i kiselost mogu nepovoljno djelovati na bakterije;
- obje pretpostavke istraživanja nisu potvrđene: šećer u energetskim pićima nije potaknuo rast, a rast nije bio samo smanjen, nego potpuno zaustavljen;
- dobiveni nalazi upućuju na mogućnost da energetska pića negativno utječu na korisne crijevne bakterije, što može imati posljedice za djecu i adolescente koji ih konzumiraju.

LITERATURA

Aljaloud O. S. 2016. Microbiological quality and safety of energy drink available in the local markets in Saudi Arabia. CORE, https://core.ac.uk/download/pdf/144733036.pdf, pristupljeno 20.5.2025.

HZJZ. 2023. Energetska pića nisu za mlada bića – promotivno edukativni materijali. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Služba za školsku medicinu, mentalno zdravlje i prevenciju ovisnosti.

Reddit. 2018. *E. coli* gram stained by my students. Reddit – MicroFans, https://www.reddit.com/r/MicroFans/comments/8osbh4/e_coli_gram_stained_by_my_students/, pristupljeno 20.5.2025.

LZMK. 2024. Standardna devijacija. Hrvatska enciklopedija, https://enciklopedija.hr/clanak/standardna-devijacija, pristupljeno 20.5.2025.

McConnell N. M., Bakermans C. 2023. Nutrijenti posreduju u inhibiciji *Escherichia coli* s kofeinom. PubMed Central, https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10472513/, pristupljeno 20.5.2025.

Perković D. i sur. 2013. Priručnik za vježbe: Medicinska bakteriologija i virologija. Zdravstveno veleučilište, Zagreb.

Thermo Fisher Scientific. 2004–2006. Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells (#18265017). Invitrogen Corporation, www.invitrogen.com, pristupljeno 20.5.2025.

Vinson L. A., Goodlett K. A., Huang R., Eckert G. J., Gregory L. R. 2017. *In vitro* učinci sporta i energetskih pića na stvaranje biofilma i metaboličku aktivnost Streptococcus mutans. PubMed, https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29282165/, pristupljeno 20.5.2025.

Volner Z. 2014. Medicinska bakteriologija, virologija i parazitologija. Školska knjiga, Zagreb.

Utjecaj različitih količina mikroplastike na rast vodene leće (*Lemna minor* L.)

Klara Šorša, 7. razred
Lucija Lovrić, 7. razred

Osnovna škola Tituša Brezovačkog, Zagreb
Mentor: *Nikolina Konjuh Reljić*

SAŽETAK

Onečišćenje vodenih ekosustava postaje sve veći problem u suvremenom okolišu zbog povećane prisutnosti sitnih plastičnih čestica. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati kako različite količine mikroplastike utječu na rast vodene leće, mjerenjem broja listića i površine koju biljke prekrivaju. Istraživanje je provedeno tijekom 14 dana u kontroliranim uvjetima, pri čemu su korištene četiri skupine: kontrolna skupina bez dodataka te tri skupine s različitim količinama mikroplastike (0,5 g, 1 g i 2 g). Tijekom istraživanja svakodnevno su bilježeni broj listića i prekrivena površina, a svi ostali uvjeti bili su jednaki za sve skupine. Rezultati su pokazali da kontrolna skupina ostvaruje najveći rast, dok se s povećanjem količine mikroplastike rast postupno smanjuje. Zaključeno je da prisutnost mikroplastike negativno utječe na rast vodene leće, što može imati šire posljedice za stabilnost i funkcioniranje vodenih ekosustava.

Ključne riječi: *onečišćenje voda; sitne plastične čestice; vodene biljke; biljni rast; ekološki utjecaj*

UVOD

Mikroplastika su sitne plastične čestice promjera manjeg od 5 mm koje nastaju raspadanjem većih plastičnih predmeta ili se namjerno proizvode za kozmetičke i industrijske proizvode. Mikroplastika predstavlja ozbiljan problem u vodenim ekosustavima (Andrady, 2011). Zbog svoje male veličine lako dospijevaju u vodene ekosustave, gdje se dugo zadržavaju i mogu nepovoljno djelovati na žive organizme. Mikroplastika je prepoznata kao globalni problem (GESAMP, 2015) i njen negativan utjecaj na organizme potvrđen je u brojnim istraživanjima (Wright i sur., 2013).

Vodene biljke imaju važnu ulogu u ekosustavu jer provode fotosintezu, proizvode kisik i predstavljaju hranu i stanište mnogim organizmima. Za njihov normalan rast potrebni su voda, svjetlost i hranjive tvari. Ako su u vodi prisutne onečišćujuće tvari poput mikroplastike, ti se procesi mogu poremetiti. Istraživanja pokazuju da mikroplastika može mijenjati fizikalna i kemijska svojstva okoliša te utjecati na rast biljaka (Rillig, 2012), a može i ometati upijanje hranjivih tvari te smanjiti rast biljaka (de Souza Machado i sur., 2018). Kod vodenih organizama mikroplastika se može taložiti na njihovim površinama, smanjiti dostupnost svjetlosti i time negativno utjecati na fotosintezu (Wright i sur., 2013; Horton i sur., 2017). To upućuje na moguću povezanost između količine mikroplastike u vodi i rasta vodenih biljaka.

Vodena leća mala je plutajuća biljka koja brzo raste i vrlo je osjetljiva na promjene u okolišu, zbog čega se često koristi kao bioindikator kakvoće vode (OECD, 2006). Zbog jednostavnog uzgoja i brzog razmnožavanja pogodna je za školska istraživanja.

Ciljevi ovog istraživanja su:

- ispitati utjecaj različitih količina mikroplastike u vodi na rast vodene leće;
- usporediti broj listića vodene leće u kontrolnoj skupini i u skupinama s dodanom mikroplastikom;
- usporediti površinu vode koju vodena leća prekriva pri različitim količinama mikroplastike.

Pretpostavlja se da će s povećanjem količine mikroplastike u vodi doći do smanjenja rasta vodene leće, što će se očitovati manjim brojem listića i manjom površinom koju biljke prekrivaju. Ova se hipoteza temelji na dosadašnjim znanstvenim spoznajama o negativnom utjecaju mikroplastike na fotosintezu i dostupnost hranjivih tvari biljkama te je izravno povezana s postavljenim ciljevima istraživanja. U ovom

radu količina mikroplastike predstavlja neovisnu varijablu, dok su broj listića i prekrivena površina vode zavisne varijable, a ostali uvjeti poput svjetlosti, temperature, količine vode i trajanja istraživanja bit će jednaki za sve skupine.

Tema je odabrana jer je onečišćenje mikroplastikom sve veći problem u okolišu, a njegov utjecaj na vodene biljke još uvijek nije dovoljno istražen u školskim uvjetima. Istraživanje omogućuje povezivanje nastavnih sadržaja o fotosintezi, ekosustavima i zaštiti okoliša s praktičnim radom te pomaže učenicima razumjeti kako ljudska djelatnost može narušiti prirodnu ravnotežu. Tema i cilj istraživanja primjereni su uzrastu učenika 7. razreda jer je metoda jednostavna, sigurna i omogućuje jasno uočavanje promjena u rastu biljaka.

METODE RADA

Istraživanje je provedeno u kontroliranim uvjetima u učionici biologije s ciljem ispitivanja utjecaja mikroplastike na rast vodene leće. Primijenjena metoda temelji se na standardiziranom testu rasta vodene leće koji se koristi za procjenu kakvoće vode, a u ovom je radu pojednostavljena i prilagođena školskim uvjetima.

U istraživanju je korištena vodena leća. Prema planu, listići su trebali biti prikupljeni s jezera Jarun, ali su ipak kupljeni u trgovini za akvaristiku. Razlog je bio osiguranje čistoće i uniformnosti uzorka, kako bi mikroplastika bila jedini čimbenik koji utječe na rast biljaka. Odabrani su zdravi, zeleni i približno jednako veliki listići. Za istraživanje je pripremljeno ukupno 40 listića, po 10 za svaku skupinu.

Istraživanje je postavljeno u četiri prozirne plastične posude zapremnine 300 mL. U svaku posudu uliveno je 200 mL vode iz vodovoda koja je prethodno odstajala 24 sata kako bi se uklonio klor. U svaku posudu dodano je po 10 listića vodene leće. Jedna posuda predstavljala je kontrolnu skupinu i nije sadržavala mikroplastiku, dok su u preostale tri posude dodane različite količine mikroplastike: 0,5 g, 1 g i 2 g.

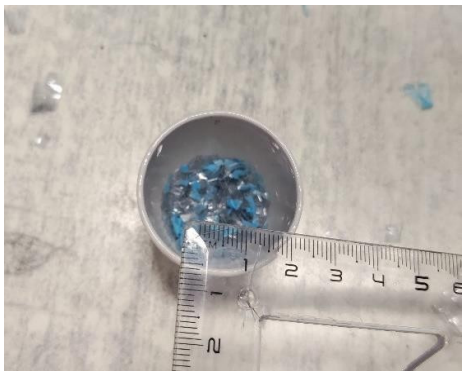
Svaka skupina imala je tri posude (ponavljanja), a u svakoj posudi bilo je deset listića vodene leće. Za usporedbu rasta listića između skupina korištena je jednofaktorska analiza varijance (ANOVA), koja omogućuje provjeru postoji li statistički značajna razlika između srednjih vrijednosti više skupina. Za detaljnije utvrđivanje razlika između pojedinih skupina primijenjen je Tukeyjev post-hoc test. Ovaj pristup omogućuje kvantitativnu potvrdu učinka mikroplastike na rast vodene leće i statističko uspoređivanje rezultata između kontrolne skupine i skupina s različitim udjelima mikroplastike.

Mikroplastika je pripremljena usitnjavanjem čiste plastične boce i plastične vrećice škarama na sitne komadiće veličine približno 1–2 mm (slika 1). Komadići su izvagani digitalnom vagom (slika 2) prije dodavanja u vodu. Nakon dodavanja mikroplastike, sadržaj posuda lagano je promiješan kako bi se čestice ravnomjerno rasporedile po površini vode.

Sve posude postavljene su na isto mjesto u učionici, blizu prozora, kako bi imale jednake uvjete svjetlosti (slika 3). Temperatura prostorije bila je približno 22 °C tijekom cijelog istraživanja. Posude nisu premještane, kako bi se izbjegle razlike u uvjetima. Količina vode nadoknađivala se po potrebi dodavanjem male količine iste vode kako bi se održala početna razina.

Istraživanje je trajalo 14 dana. Svakoga dana u približno isto vrijeme prebrojani su svi vidljivi listići vodene leće u svakoj posudi. Osim broja listića, mjerena je i površina vode koju biljke prekrivaju. Posuda je postavljena na papir s nacrtanom mrežom kvadrata veličine 1 × 1 cm te je prebrojan broj kvadrata

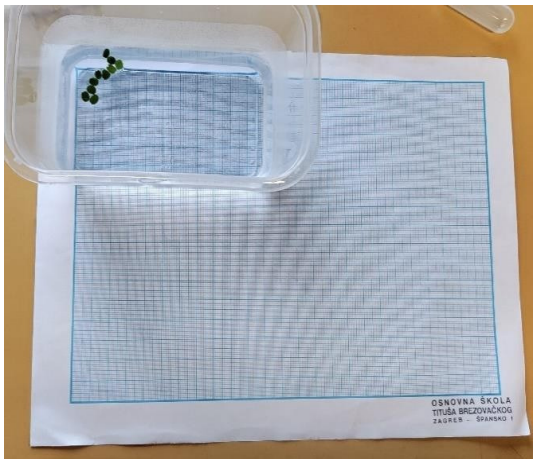
koje biljke pokrivaju više od polovice svoje površine (slika 4). Dobiveni podaci, od prvog do 14. dana istraživanja (slika 5) zapisivani su u tablicu.



Slika 1 Priprava mikroplastike – usitnjavanje boce na komadiće mikroplastike

Slika 2 Vaganje mikroplastike – precizno vaganje komadića mikroplastike (usitnjene boce) prije dodavanja u posudicu

Slika 3 Vodena leća u posudama s mikroplastike (1. dan istraživanja)



Slika 4 Vodena leća na milimetarskom papiru – prikazuje raspored za mjerenje površine vode koju prekrivaju listići biljke

Slika 5 Vodena leća u posudama s mikroplastikom (14. dan istraživanja)

Neovisna varijabla u istraživanju bila je količina mikroplastike u vodi, dok su zavisne varijable bile broj listića vodene leće i površina vode prekrivene listićima vodene leće. Ostali čimbenici, poput količine vode, svjetlosti, temperature i trajanja istraživanja, održavani su jednakima za sve skupine. Kontrolna skupina omogućila je usporedbu prirodnog rasta biljaka s rastom u prisutnosti mikroplastike. Istraživanje je vremenski unaprijed planirano, a mjerenja su provođena svakodnevno, kako bi se dobili pouzdani podaci. Sve korištene metode bile su jednostavne, sigurne i primjerene uzrastu učenika te su ih učenici mogli provesti samostalno uz nadzor učitelja.

REZULTATI

Tijekom 14 dana praćene su promjene u rastu vodene leće u kontrolnoj skupini i trima skupinama s različitim količinama mikroplastike (0,5 g, 1 g i 2 g). Tijekom prvih šest dana nije uočen značajan porast broja listića niti povećanje prekrivene površine vode ni u jednoj skupini.

Od sedmog dana započinje vidljiv rast u svim skupinama. Kontrolna skupina pokazala je najveći porast broja listića i najveću prekrivenu površinu. Skupine izložene mikroplastici rasle su sporije, a s povećanjem količine mikroplastike smanjivao se broj novih listića i ukupna površina koju biljke prekrivaju.

Tijekom prvih šest dana istraživanja nije zabilježena vidljiva promjena u broju listića niti u prekrivenoj površini, što pokazuje da vodena leća zahtijeva određeno vrijeme na prilagodbu novim uvjetima. Od 7. dana počeo je vidljiv rast: kontrolna skupina rasla je najbrže, dok su skupine s mikroplastikom pokazale sporiji rast. Veća količina mikroplastike uzrokovala je manji broj novih listića i manju pokrivenost površine.

Tablica 1 Prosječan broj listića vodene leće na početku i na kraju istraživanja (14. dan).

Skupina	Početni broj listića	Završni broj listića
Kontrolna (0 g)	10	44
0,5 g mikroplastike	10	31
1 g mikroplastike	10	23
2 g mikroplastike	10	16

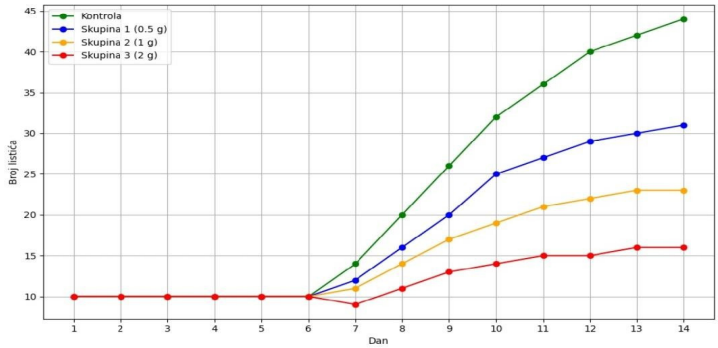
Iz tablice 1 vidljivo je da je najveći porast broja listića imala kontrolna skupina. S povećanjem količine mikroplastike završni broj listića postupno se smanjivao, pri čemu je najslabiji rast zabilježen u skupini s 2 g mikroplastike.

Osim broja listića, praćena je i površina vode koju su biljke prekrivale pomoću mreže kvadratića 1 × 1 cm postavljene ispod posuda. Podaci iz tablice 2, koji se odnose na površinu vode prekrivenu listićima vodene leće, pokazuju isti trend kao i broj listića. U kontrolnoj skupini listiću su prekrili najveću površinu, dok su u skupini s najvećom količinom mikroplastike listići prekrili najmanju površinu vode.

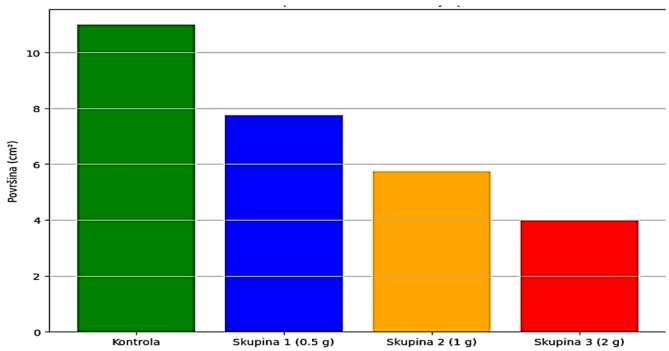
Radi lakšeg uočavanja razlika, podaci su prikazani i grafički (slike 6 i 7).

Tablica 2 Površina vode prekrivena vodenom lećom na kraju istraživanja (izražena u broju kvadratića vodene površine dimenzija 1 x 1 cm).

Skupina	Broj prekrivenih kvadratića vodene površine dimenzija 1 x 1 cm
Kontrolna (0 g)	11
0,5 g mikroplastike	7,75
1 g mikroplastike	5,75
2 g mikroplastike	4



Slika 6 Promjena broja listića vodene leće ovisno o količini mikroplastike u vodi tijekom 14 dana istraživanja



Slika 7 Promjena površine vode (cm^2) prekrivene vodenom lećom ovisno o količini mikroplastike nakon 14 dana

Za statističku potvrdu razlika između skupina korištena je jednofaktorska analiza varijance (ANOVA). Rezultati su pokazali statistički značajne razlike između skupina ($p < 0,05$). Tukeyjev post-hoc test je pokazao da se sve skupine značajno razlikuju od kontrole, a veća količina mikroplastike dovodi do značajno manjeg rasta listića.

RASPRAVA

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da kontrolna skupina, koja nije bila izložena mikroplastici, ima najveći porast broja listića, dok su sve eksperimentalne skupine s mikroplastikom pokazale slabiji rast proporcionalno količini dodane mikroplastike (Tablica 1). Najmanji rast zabilježen je u skupini s 2 g mikroplastike. Ovi podaci ukazuju na negativan utjecaj mikroplastike na rast vodene leće.

Znanstvene studije pokazuju da mikroplastika može utjecati na rast i fiziološke funkcije vodenih biljaka. Basu i sur. (2025) ističu da mikroplastika utječe na gotovo sve oblike vodenih biljaka, uzrokujući promjene u rastu, fotosintezi i metabolizmu biljaka u vodenim ekosustavima.

Studija Ceschin i sur. (2023) jasno pokazuje da se mikroplastika može adsorbirati na površinu biljaka, negativno utječući na njihov rast i sadržaj klorofila, što implicira da mikroplastika može fizički ometati metaboličke procese vitalne za rast biljaka, poput fotosinteze. Basu i sur. (2025) navode da se osnovni metabolički procesi, uključujući fotosintezu i prijenos hranjivih tvari, mogu narušiti zbog blokade svjetla i fizičkog poremećaja tkiva uzrokovanog mikroplastikom.

Također, Rozman i Kalčíková (2022) pokazali su da se mikroplastika može vezati za biljnu biomasu, odnosno da se čestice mikroplastike mogu vezati na vodenu leću adhezijom, što ukazuje da plutajuće biljke imaju potencijal reagirati na prisutnost mikroplastike u vodi, iako primarni učinci mogu biti različiti ovisno o vrsti čestica.

U ekološkom kontekstu, smanjeni rast vodene leće može imati značajne posljedice za ekosustav. Vodene biljke poput vodene leće igraju ključnu ulogu u vodenim okolišima — proizvode kisik, filtriraju vodu i pružaju stanište za druge organizme. Smanjenje rasta i pokrivenosti površine može dovesti do narušavanja ove ravnoteže i utjecati na funkcioniranje cijelog ekosustava (Basu i sur., 2025).

Vrijedi napomenuti da su mnoge studije provedene u kontroliranim laboratorijskim uvjetima, a učinci mikroplastike u prirodnim sustavima mogu biti složeniji zbog interakcija s drugim čimbenicima okoliša. Unatoč tome, naše opažanje da mikroplastika negativno utječe na rast vodene leće potkrepljeno je dostupnim literaturnim dokazima (Ceschin i sur., 2023; Rozman i Kalčíková, 2022; Basu i sur., 2025).

Unatoč ograničenjima ovoga istraživanja, naši rezultati imaju važan ekološki značaj jer ukazuju da mikroplastika u vodi može imati negativne učinke na vodene biljke, što može poremetiti ravnotežu

vodenih ekosustava i njihove funkcije poput proizvodnje kisika, pročišćavanja vode i pružanja staništa za druge organizme (Basu i sur., 2025).

ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti da mikroplastika ima negativan učinak na rast vodene leće. Kontrolna skupina, koja nije bila izložena mikroplastici, rasla je najbrže i prekrivala najveću površinu, dok su skupine izložene mikroplastici pokazale postupno smanjenje rasta i pokrivene površine proporcionalno količini dodane mikroplastike. Ovi nalazi potvrđuju postavljenu hipotezu da prisutnost mikroplastike usporava širenje vodene leće i pokazuje da čak male količine mikroplastike mogu imati vidljiv učinak na vodene biljke.

Rezultati istraživanja ukazuju na važnost razumijevanja utjecaja mikroplastike u vodenim ekosustavima. Smanjen rast i pokrivenost listića može imati šire posljedice na ekološku ravnotežu, jer vodene biljke igraju ključnu ulogu u održavanju kvalitete vode, osiguravanju hrane i staništa za druge organizme te proizvodnji kisika.

Iako je istraživanje provedeno u kontroliranim laboratorijskim uvjetima i na ograničenom broju uzoraka, rezultati su dovoljno jasni da ukazuju na prisutnost negativnog učinka mikroplastike. Ograničenja istraživanja uključuju mali broj uzoraka, kratko trajanje istraživanja i laboratorijske uvjete koji se razlikuju od prirodnog okoliša.

Buduća istraživanja mogla bi uključivati veći broj uzoraka, različite vrste mikroplastike i duže trajanje istraživanja kako bi se detaljnije procijenio dugoročni učinak na rast i razvoj vodene leće. Također bi bilo korisno istražiti interakciju mikroplastike s drugim okolišnim čimbenicima, poput svjetlosti, temperature i hranjivih tvari, kako bi se bolje razumio stvarni utjecaj u prirodi.

Zaključno, ovo istraživanje uspješno povezuje postavljene ciljeve i hipotezu s opaženim trendovima. Dobiveni zaključci temelje se isključivo na vlastitim rezultatima i pružaju jasne smjernice za daljnje istraživanje utjecaja mikroplastike na vodene biljke i ekosustave, naglašavajući potrebu za očuvanjem vodenih staništa i smanjenjem zagađenja mikroplastikom.

LITERATURA

Anduady A. L. 2011. Microplastics in the marine environment. Marine Pollution Bulletin 62(8): 1596–1605.

Ge J., Li H., Liu P., Zhang Z., Ouyang Z., Guo X. 2021. Review of the toxic effect of microplastics on terrestrial and aquatic plants. Science of The Total Environment 791: 148333.

Basu A. G., Paul R. S., Wang F., Roy S. 2025. Impact of microplastic on aquatic flora: Recent status, mechanisms of their toxicity and bioremediation strategies. Chemosphere 370: 143983.

Ceschin S., Mariani F., Di Lernia D., Venditti I., Pelella E., Iannelli M. A. 2023. Effects of microplastic contamination on the aquatic plant *Lemna minuta*. Plants 12(1): 207.

GESAMP. 2015. Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment. International Maritime Organization, London.

Horton A. A., Walton A., Spurgeon D. J., Lahive E., Svendsen C. 2017. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify knowledge gaps and future research priorities. Science of the Total Environment 586: 127–141.

OECD. 2006. Test No. 221: *Lemna* sp. growth inhibition test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Rilling M. C. 2012. Microplastic in terrestrial ecosystems and the soil. Enviromental Science & Technology 46(12): 6453–6454.

Rozman U., Kalčíková G. 2022. The response of duckweed *Lemna minor* to microplastics and its potential use as a bioindicator of microplastic pollution. Plants 11(21): 2953.

Souza Machado A. A., Kloas W., Zarfl C., Hempel S., Rillig M. C. 2018. Microplastics as an emerging threat to terrestrial ecosystems. Global Change Biology 24(4): 1405–1416.

Wight I., Thompson R. C., Galloway R. S. 2013. The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. Environmental Pollution 178: 483–492.

Utjecaj solnog stresa na količinu klorofila u listu graha

Dorothy Ward, 7. razred

Osnovna škola Ljudevita Gaja, Osijek
Mentor: *Martina Sušjenka*

SAŽETAK
Stresni uvjeti za rast biljaka poput zaslanjenosti tla, opskrbe biljaka vodom, ekstremnih temperatura i poremećaja u mineralnoj ishrani biljaka postaju sve veći problem u proizvodnji biljaka u svijetu. Usko povezani s klimatskim promjenama i onečišćenjem okoliša, nameću potrebu ciljanih istraživanja u pravcu boljeg poznavanja genetskog potencijala otpornosti na stres kod biljaka i poboljšanja tehnologije uzgoja kod osjetljivih biljnih vrsta. Grah (*Phaseolus vulgaris* L.) pripada grupi glikofita, biljnih vrsta koje su vrlo osjetljive na solni stres, stoga su u ovom istraživanju bile uključene dvije sorte graha, Cranberry i Canelinni. Mlade biljke graha su uzgojene u perlitu iz sjemena te su u fazi prvog para listova uronjene korijenom u 12 otopina različitih anorganskih soli koncentracije 0,2 %, tijekom 48 h u kontroliranim uvjetima svjetla, vlage zraka i temperature u fitotronu. Kontrolna varijanta su bile biljke u demineraliziranoj vodi, a tretmani solnog stresa su obuhvaćali otopine različitih vodotopljivih klorida, sulfata i nitrata. Nakon tretmana u listovima je analiziran relativan sadržaj klorofila (SPAD) nedestruktivnom metodom pomoću klorofilmetra. Analizom varijance i LSD testom je potvrđena značajnost utjecaja sorte odnosno tretmana solnim stresom. Najnegativniji utjecaj na biljke je imala otopina litij klorida te zbog uvelosti lišća u toj varijanti nije bilo moguće pouzdano izmjeriti SPAD vrijednost klorofilmetrom. Ostale varijante solnog stresa su smanjile sadržaj klorofila u odnosu na kontrolne biljke različitim intenzitetom, ovisno o sorti, pri čemu je najmanji sadržaj klorofila kod obje sorte dobiven u varijanti s kalij sulfatom. Sorta Canelinni je pokazala veću varijabilnost u reakciji na pojedine vrste soli u odnosu na sortu Cranberry. Dobiveni rezultati pokazuju da je klorofilmetar dobar instrument za procjenu solnog stresa kod biljaka te upućuju na potrebu analize sadržaja soli u tlu i izbor tolerantnih biljnih genotipova.

Ključne riječi: *ekofiziologija bilja; fotosintetski pigmenti; okolišni stres; glikofite; Phaseouls vulgaris* L.

UVOD

Poljoprivredna proizvodnja je ugrožena zbog povećane zaslanjenosti tla što je posljedica prekomjernih gnojidbi i klimatskih promjena (Nouri i sur., 2017). Prirodna zaslanjenost tla je uzrokovana prirodnim procesima poput trošenja stijena i nakupljanja soli dospjelih u tlo kišom, a podrijetlom iz mora (Tester i Davenport, 2003; Reynolds i sur., 2005). Negativan utjecaj zaslanjenosti na razvoj i metabolizam biljaka dovodi do fizioloških i morfoloških promjena uglavnom zbog visoke koncentracije iona u tkivima te smanjenja usvajanja vode i hraniva (Raggi i sur., 2024). Autori ističu da solni stres dovodi do smanjenja sadržaja suhe tvari u korijenu i izdanku, čak i pri niskim koncentracijama soli. Ovaj problem pogađa otprilike 20 % poljoprivrednih površina (Qadir i sur., 2014). Zaslanjenost tla dovodi do pojave solnog stresa u biljkama. Solni stres je složen proces koji uključuje osmotski stres, učinak specifičnih elemenata i nedostatak pojedinih hraniva, stoga utječe na brojne fiziološke i biokemijske mehanizme povezane s rastom i razvojem biljke (Sairam i sur., 2002). Uslijed osmotskog stresa dolazi do manje pristupačnosti vode biljci zbog većih kocentracija soli u tlu, supstratu ili hranjivoj otopini. Učinak specifičnih elemenata, odnosno njihovih iona, predstavlja nakupljanje iona u tkivu biljaka što može imati toksično djelovanje, odnosno može poremetiti usvajanje drugih elemenata (Stanisavljević i sur., 2009).

Fotosinteza je jedan od najvažnijih procesa u biljkama te je on kod mladih biljaka vrlo osjetljiv na okolišni stres (Mlinarić, 2013). Proces fotosinteze u zelenim dijelovima biljaka u stresnim uvjetima može biti značajno smanjen, što je vidljivo usporavanjem rasta, uvenućem i smanjenjem sadržaja fotosintetskih pigmenata. Među njima su klorofil a i b najvažniji jer omogućavaju pretvorbu svjetlosne

energije u kemijsku energiju hrane, odnosno ugljikohidrata (Bendelja i sur., 2024). Prema Rao i sur. (2001), fotosinteza u listovima je povezana sa sadržajem klorofila po jedinici površine lista te autori smatraju da je SPAD klorofilmetar korisno sredstvo za ocjenu genetskih razlika u kapacitetu fotosinteze.

Mineralne tvari koje biljka usvaja iz okoliša, a potrebne su za njen rast i razvoj (biljna hranjiva), imaju različit značaj za biljke te se ovisno o količini koje biljka treba tijekom svog života te se dijele na makro i mikroelemente. Dušik (N), fosfor (P), kalij (K), sumpor (S), kalcij (Ca) i magnezij (Mg) se nazivaju makroelementima (makrohranjiva, makronutrijenti) jer ih biljka zahtijeva u velikim količinama te je njihov udio u kemijskom sastavu biljaka veći od 0,1 %. Dušik, fosfor, sumpor i kalij se u biljnoj proizvodnji često dodaju gnojidbom jer su potrebe biljaka za tim elementima uglavnom veće od količina pristupačnih u tlu. Uz navedene makroelemente, uočeno je da biljke imaju sposobnost upijati i druge elemente poput litija. Litij se koristi za proizvodnju različitih elektroničkih uređaja (litij-ionske baterije) te se naziva „bijelim zlatom“ ili „naftom 21. stoljeća“ zbog sve veće proizvodnje električnih automobila (Shahzad i sur., 2016). U istraživanju Behr i Zorb (2023) na primjeru šećerne repe dokazano je kako postoji mala tolerancija na litij te da poveći sadržaj litija dovodi do truljenja listova. Autori smatraju da bi u bliskoj budućnosti onečišćenje tla litijem moglo postati ozbiljan ekološki problem za biljnu proizvodnju. Prema Garcia-Daga i sur. (2025), mehanizmi kretanja litijevih kationa od korijena do nadzemnih dijelova biljaka poput listova i sjemena još uvijek nisu detaljno istraženi.

Alkalijski metal natrij (Na) može imati i koristan i štetan utjecaj na rast biljaka, ovisno o koncentraciji i toleranciji biljne vrste, a kalij (K) je jedan od esencijalnih nutrijenata i biljke ga uglavnom trebaju u velikim količinama. Kao i natrij, kalij pripada alkalijskim metalima (1. skupina periodnog sustava elemenata), a u tlu i biljkama se nalazi kao jednovalentni kation K^+. Aktivator je oko 60 enzima u biljkama te je uključen u sinteze proteina, ugljikohidrata, lipida i nukleinskih kiselina. Također utječe na vodni potencijal biljnih stanica i otpornost biljaka na nedostatak vode i niske temperature. Nenormalno visok omjer natrijevih i kalijevih kationa i visoka ukupna koncentracija soli inaktivira enzime i inhibira sintezu proteina (Pevalek-Kozlina, 2003).

Kalcij (Ca) i magnezij (Mg) su zemnoalkalijski metali iz 2. grupe periodnog sustava. Kalcij je slabo pokretljiv u biljkama ali ima puno fizioloških funkcija. Nasuprot kalciju, pokretljivost magnezija u biljkama je velika, sudjeluje u građi klorofila i aktivaciji velikog broja enzima (> 300) kao njihov kofaktor. Na djelovanje navedenih zemnoalkalijskih metala utječe i odnos njihove koncentracije prema kaliju. Kalcijevi i magnezijevi kationi te sulfatni anion u nekim područjima pridonose salinitetu tla (Pevalek-Kozlina, 2003).

Klor (Cl) ima koncentraciju u suhoj tvari biljaka manju od 0,1 % što ga čini mikroelementom, iako ga mnoge biljke usvajaju u 10–100 puta većim količinama (Colmenero-Flores i sur., 2019). Klor je nemetal iz 17. skupine periodnog sustava elemenata (halogeni elementi), čija uloga u biljkama još uvijek nije dovoljno poznata. Ono što se zna jest da visoke koncentracije kloridnih iona (Cl^-) u supstratu mogu biti vrlo štetne za biljku. Višak kloridnih iona smanjuje usvajanje drugih neophodnih aniona (nitrata, fosfata, sulfata i dr.), sprječava diobu stanica i često izaziva klorozu listova.

Mahajan i Tuteja (2005) smatraju solni stres glavnim okolišnim stresom i značajnom prijetnjom biljnoj proizvodnji. Kao naročito osjetljive biljne vrste, poznate kao glikofite, autori navode rižu, kukuruz, soju i grah. Grah (*Phaseolus vulgaris* L.) je namirnica s visokom nutritivnom vrijednosti, ali i ljekovitim svojstvima, stoga ima važno mjesto u ljudskoj prehrani. Osim što je vrlo važna za čovjeka, upotrebljava

se i kao stočna hrana i sirovina u industriji. Grah je jednogodišnja zeljasta biljka čije se sorte odlikuju značajnim morfološkim razlikama u tipu rasta i obilježjima sjemena (veličina, oblik, boja), te vremenu sazrijevanja (duljina vegetacije od 65 do 140 dana). Nutritivna vrijednost graha ovisi o čimbenicima kao što su podrijetlo, genotip i uvjeti okoliša tijekom vegetacije. Optimalne temperature za uzgoj graha su 18–25 °C, a za sjetvu temperatura tla treba biti viša od 15 °C (Carović-Stanko i sur., 2022).

Sve veća povezanost klimatskih poremećaja i zaslanjivanja tla s pojavom solnog stresa u biljkama nas je motivirala da istražimo mogući utjecaj različitih soli na klorofile u biljkama graha kao pokazatelje poremećaja u procesu fotosinteze.

Ciljevi ovog istraživanja su:

- utvrditi postoje li razlike u reakciji pojedinih sorti graha na primijenjene tretmane solnog stresa;
- ocijeniti reakciju biljke na solni stres putem mjerenja relativnog sadržaja klorofila u listovima.

Polazi se od hipoteze da će se utvrditi značajne razlike između sorata u reakciji na primijenjene solne tretmane. Također, u odnosu na netretirane biljke, očekuje se značajan negativan utjecaj pojedinih vrsta soli na sadržaj klorofila u listu mladih biljaka graha. Pretpostavlja se da sadržaj klorofila i njegovo mjerenje klorofilmetrom može biti pouzdan pokazatelj stresa u biljkama, u zadanim eksperimentalnim uvjetima. Varijanta solnog tretmana i sorta su bile nezavisne varijable a izmjereni sadržaj klorofila je bio zavisna varijabla.

METODE RADA

Ovo istraživanje je provedeno jednim dijelom u suradnji s vanjskom ustanovom, čiji su analitički kapaciteti kao i pomoć stručnih laboratorijskih djelatnika značajno doprinijeli u provođenju istraživanja.

U prvoj fazi istraživanja odabrane su dvije sitnozrne sorte graha – Cranberry (šareno zrno) i Canelinni (bijelo zrno) (slika 1), čije je sjeme kratko dezinficirano alkoholom (etanol 70 %), isprano i složeno na filter papir namočen destiliranom vodom. Ukupno je od svakog kultivara pripremljeno 5 filter papira sa po 50 sjemenki. Zasijani filter papir je zamotan u tuljak, stavljen u okomitom položaju u prozirnu plastičnu vrećicu s oznakom sorte te je tako pripremljeno sjeme držano u komori za uzgoj biljaka („walk-in“ fitotron), na naklijavanje u trajanju 7 dana, uz 16 h svjetla i 8 h tame dnevno, na temperaturama 16 °C (u tami) i 24 °C (pod svjetlom). Nakon toga utvrđen je broj normalnih klijanaca prema kriterijima opisanim u Pravilniku o metodama uzorkovanja i ispitivanja kvalitete sjemena (Narodne novine, 2025) i obzirom da je klijavost bila veća od 50 %, sjeme se moglo koristiti za uzgoj biljaka potrebnih za pokus sa solnim stresom.

Za istraživanje utjecaja solnog stresa sorta je određena kao faktor A - Cranberry (A1) i Canelinni (A2), te je iz mase sjemena izdvojeno po 250 neoštećenih zrna od svake sorte. Sjeme je nakon kratke sterilizacije s 30 % etanolom složeno u redove na naklijavanje u sobnim uvjetima u plastičnim posudama (volumen 8 L) s perlitom i navlaženo demineraliziranom vodom. Sjeme je nakon toga prekriveno tankim slojem perlita (oko 1 cm). Tijekom faze naklijavanja voda je svakodnevno dodavana prskanjem po površini a osim dnevnog svjetla nije korišteno dodatno osvjetljenje, uz prosječnu temperaturu 16 °C (+/- 4 °C). Nakon pojave klicinih listića na površini perlita, korišteno je dodatno osvjetljenje stolnom svjetiljkom sa žaruljom od 100 W.

Slika 1 Cranberry (šareno zrno) - lijevo, Canelinni (bijelo zrno) - desno

U fazi razvijenog prvog para listova (16 – 18 dana od sjetve u perlit), potpuno zdrave i normalno razvijene biljke su uz pomoć tekuće vode cijele pažljivo izvađene iz perlita i korijenom uronjene u plastične kivete volumena 50 mL, u 40 mL demineralizirane vode (kontrola) odnosno 12 otopina (faktor B) različitih anorganskih soli (kloridi: NaCl, KCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, LiCl; sulfati: Na_2SO_4, K_2SO_4, $MgSO_4x7H_2O$; nitrati: $NaNO_3$, KNO_3, $Mg(NO_3)_2x6H_2O$, $Ca(NO_3)_2$), iste početne masene koncentracije 2 g/L (0,2 %) (tablica 1). Navedene soli su odabrane zbog dobre topljivosti u vodi (Habuš i sur., 2018).

Tablica 1 Kemijska i fizikalna svojstva primjenjenih otopina soli (tretmani, faktor B; EC – električna provodljivost otopine ili konduktivitet)

Tretman (faktor B)	Kemijska formula soli	Molekulska masa	Molaritet (mM/L)	EC (mS/cm)
B1	NaCl	58,44	34	3,80
B2	KCl	74,55	27	3,60
B3	$MgCl_2$	95,21	21	4,05
B4	$CaCl_2$	110,98	18	3,44
B5	LiCl	42,39	47	3,54
B6	Na_2SO_4	142,04	14	2,87
B7	K_2SO_4	174,26	11	3,13
B8	$MgSO_4x7H_2O$	246,47	8	1,31
B9	$NaNO_3$	84,99	23	2,54
B10	KNO_3	101,11	20	2,59
B11	$Mg(NO_3)_2x6\ H_2O$	256,40	8	1,63
B12	$Ca(NO_3)_2$	164,10	12	1,85

Sve varijante tretmana otopinama soli kao i kontrola su postavljene u tri ponavljanja (kivete), s tri biljke u svakoj kiveti. Tako pripremljene biljke su ostavljene 48 h u fitotronu, uz maksimalno svjetlo 16 h i 8 h tame dnevno. Temperatura uz svjetlo je zadana na 24 °C, a u mraku 16 °C, uz održavanje vlage zraka na 75 %. Nakon 48 h tretmana, mjeren je relativni sadržaj klorofila pomoću klorofilmetra Konica Minolta SPAD-502Plus (slika 2), u svakom listu po ponavljanju (6 listova po kiveti), čiji prosjek je rezultat mjerenja za pojedino ponavljanje. Klorofilmetar je prijenosni instrument za neinvazivno mjerenje relativnog sadržaja klorofila u listu na principu razlike u optičkoj gustoći pri dvije valne duljine svjetlosti (650 i 940 nm; Süß i sur., 2015), s rasponom očitanja SPAD vrijednosti od 0 do 99,9.

Slika 2 Klorofilmetar

Prosjeci SPAD očitanja za svaki tretman i sortu su prikazani grafikonom, a značajnost utjecaja sorte i varijante soli je ocjenjena analizom varijance i F testom („one-way“ i „two-way“ ANOVA), koristeći LSD test za ocjenu značajnosti razlika između prosječnih vrijednosti sorti odnosno tretmana, uz prag značajnosti $p < 0{,}05$. Varijanta solnog tretmana i sorta su bile nezavisne varijable, a izmjereni sadržaj klorofila je bio zavisna varijabla.

REZULTATI

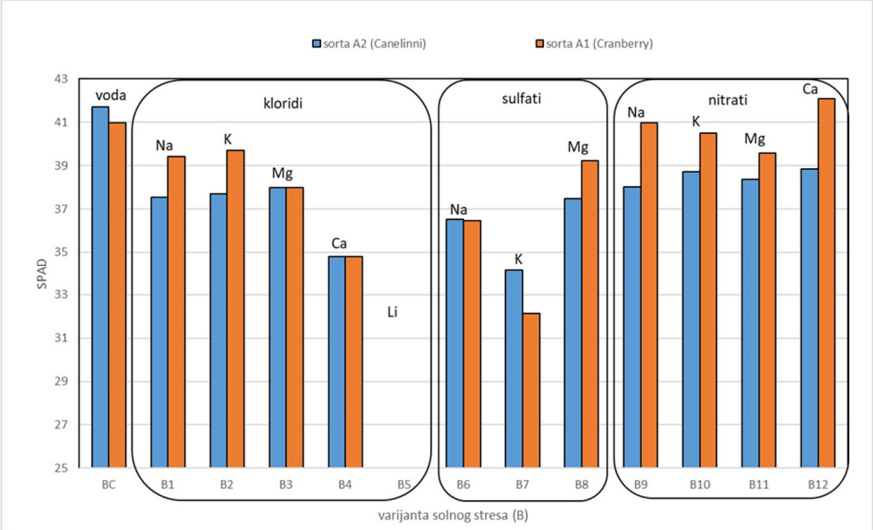
Nakon 48 h u fitotronu, biljke graha su izvađene iz kiveta s otopinama soli te je pomoću klorofilmetra analiziran relativni sadržaj klorofila (SPAD). Biljke u varijanti s otopinom litijeva klorida (B5) su bile skoro potpuno dehidrirane (slika 3) te u njihovim listovima nije bilo moguće precizno izmjeriti SPAD vrijednost. Prema rezultatima statističke obrade podataka, utvrđena je značajna razlika u sadržaju klorofila u prosjeku za sve ostale tretmane između sorte A1 (Cranberry) i A2 (Canelinni), pri čemu je prosječna vrijednost SPAD kod sorte Cranberry (A1; 38,7) bila značajno veća nego kod sorte Canelinni (A2; 37,7). U grupi kloridnih soli, NaCl i KCl su kod sorte Canelinni imali jači negativan učinak na sadržaj klorofila u usporedbi sa sortom Cranberry (slika 4). Sortne razlike kod magnezijeva i kalcijeva klorida (B3 i B4) nisu utvrđene tj. kod obje sorte je jači negativan učinak bio u varijanti B4. Kod sulfatnih soli, tretman B6 (Na_2SO_4) je podjednako snizio sadržaj klorofila kod obje sorte, dok su razlike između sorata bile izraženije kod B7 (K_2SO_4) i B8 ($MgSO_4x7H_2O$). U grupi nitratnih soli, prosječne SPAD vrijednosti su bile niže u svim varijantama kod sorte Canelinni, u odnosu na sortu Cranberry, kao i na kontrolne biljke.

Sorta Cranberry je imala najmanju vrijednost SPAD u tretmanu B7 (K_2SO_4; slika 4), a najveću u tretmanu B12 ($Ca(NO_3)_2$). Najmanji sadržaj klorofila u listu sorte Canelinni je utvrđen također u tretmanu B7, a najveći u kontroli (BC). Prema LSD testu (tablica 2), SPAD vrijednost je bila značajno manja u tretmanima B4 ($CaCl_2$), B6 (Na_2SO_4) i B7 (K_2SO_4), u odnosu na netretirane biljke, kod sorte Cranberry. Pad sadržaja klorofila u ostalim varijantama solnog stresa kod ove sorte nije bio statistički značajan. Kod sorte Canelinni, sadržaj klorofila je bio značajno manji nego u kontroli kod većine otopina soli, s izuzetkom tretmana B10 (KNO_3) i B12 ($Ca(NO_3)_2$).

Tablica 2 Značajnost razlika između prosjeka pojedinih varijanti solnog stresa u sadržaju klorofila u listu dvije sorte graha (LSD test – *least significant difference*, razina značajnosti $p < 0,05$.; tretmani označeni različitim slovima se međusobno značajno razlikuju)

Varijanta solnog stresa (B)	Sorta (A)	
	Cranberry (A1)	Canelinni (A2)
BC -kontrola	AB	A
B1 - NaCl	ABC	BC
B2 - KCl	ABC	BC
B3 - $MgCl_2$	BC	B
B4 - $CaCl_2$	C	CD
B5 - LiCl	-	-
B6 - Na_2SO_4	C	BCD
B7 - K_2SO_4	D	D
B8 - $MgSO_4$ x7H_2O	ABC	BC
B9 - $NaNO_3$	AB	B
B10 - KNO_3	AB	AB
B11 - $Mg(NO_3)_2$x6H_2O	ABC	BC
B12 - $Ca(NO_3)_2$	A	AB

Slika 3 Izgled biljaka nakon 48 h izlaganja solnom stresu – lijevo kontrola u vodi (BC), desno tretman otopinom LiCl (B5)
Autor: Ward D., 2025.



Slika 4 Relativni sadržaj klorofila (SPAD) u listu dvije sorte graha (A1- Cranberry, A2 - Canelinni) ovisno o varijanti solnog stresa (BC – kontrola, voda; B1- NaCl; B2 – KCl; B3 - $MgCl_2$; B4 - $CaCl_2$; B5 – LiCl; B6 - Na_2SO_4; B7 - K_2SO_4; B8 - $MgSO_4$x7H_2O; B9 - $NaNO_3$; B10 - KNO_3; B11 - $Mg(NO_3)_2$x6H_2O; B12 - $Ca(NO_3)_2$)

RASPRAVA

Prema rezultatima brojnih radova u kojima je analiziran relativni sadržaj klorofila u različitim biljnim vrstama, primjena klorofilmetra za neinvazivnu analizu sadržaja klorofila, prikladan je način procjene sadržaja suhe tvari i koncentracije dušika u biljkama (Teklić i sur., 2009; Xiong i sur., 2015). Štoviše,

Yamamoto i sur. (2002) smatraju da je mjerenje sadržaja klorofila u listovima pomoću klorofilmetra prikladnije od ekstraktivnih metoda, za istraživanja u području fotosinteze ili starenja biljaka. Izmjerene vrijednosti SPAD u fazi prvog para listova graha, bile su značajno niže u većini primijenjenih solnih tretmana u odnosu na kontrolne biljke. Vidljiva dehidracija biljaka u tretmanu s LiCl (B5) pojavila se već nakon 24 h od početka tretmana, te je nakon planiranih 48 h tretmana bilo nemoguće izmjeriti pouzdane SPAD vrijednosti u tim biljkama (slike 4 i 5). To upućuje na vrlo štetno djelovanje primjenjene koncentracije Li^+, jer u ostalim otopinama kloridnih soli nije bilo tako izraženog venuća. Simptomi venuća vjerojatno nastaju zbog osmotskog efekta solnog stresa, odnosno biljka zaostaje u rastu i dehidrira zbog manje količine slobodnih molekula vode u otopini soli, slabijeg upijanja vode korijenom te transporta vode provodnim tkivom u nadzemne dijelove biljke, kod kojih gubitak vode procesom transpiracije doprinosi venjenju. Također, prema Kaymakanovoj i sur. (2008), poremećeni osmotski procesi kod mladih biljaka graha se mogu povezati s toksičnim efektima Cl^-, SO_4^{2-} i Na^+. U istraživanju Gama i sur. (2021), kod svih 5 korištenih sorti graha, fotosinteza, intenzitet transpiracije i provodljivost puči su smanjeni pod utjecajem solnog stresa izazvanog s NaCl. Prema Herak Čustić i sur. (2025), toksični učinci Li kod biljaka se očituju zastojem u rastu jer litij negativno utječe na različite fiziološke procese. Buendía-Valverde i sur. (2024) zaključuju da na usvajanje i nakupljanje Li u biljkama utječu različiti činitelji, uključujući koncentraciju iona u mediju rasta biljaka, kemijski oblik Li, biljnu vrstu i starost biljke, kao i način primjene i trajanje izloženosti biljke.

U cjelini, svi kloridi su smanjili relativan sadržaj klorofila u odnosu na netretirane biljke (BC), kod obje sorte (slika 4). Isto tako u varijantama sulfatnih soli utvrđen je značajan pad sadržaja klorofila, s najmanjim vrijednostima kod obje sorte u tretmanu s K_2SO_4 (B7). Obzirom da su K i S makroelementi koje biljke trebaju u količinama koje nisu biljkama dostupne u svim tipovima tla, pripadaju hranivima koja se u intenzivnoj biljnoj proizvodnji dodaju u tlo gnojidbom. Solni stres može biti posljedica njihovog nakupljanja u tlu kod prevelike primjene gnojiva ili u uvjetima slabe opskrbe biljaka vodom, što povećava osmotsku vrijednost vodene faze tla. U istraživanju Kaymakanove i sur. (2008), simptomi dehidracije kod biljaka graha su bili izraženiji u tretmanu sa Na_2SO_4 u usporedbi s tretmanom NaCl. Autori pretpostavljaju da je dobiveni efekt dehidracije posljedica više koncentracije Na^+ kod tretmana s Na_2SO_4. U ovom istraživanju, NaCl je bio štetniji za klorofile kod sorte A2 u usporedbi sa sortom A1, dok je štetan utjecaj Na_2SO_4 otopine bio jači u odnosu na NaCl, bez značajne razlike između sorata. Varijanta B8 ($MgSO_4x7H_2O$) rezultirala je značajno manjim sadržajem klorofila u usporedbi s kontrolom jedino kod sorte Canellini (A2). Obzirom da je Mg sastavna komponenta klorofila, iznenađuje manji sadržaj klorofila kod svih Mg soli u odnosu na kontrolu, kod sorte Canellini. Također, ova sorta je pokazala značajno manji sadržaj klorofila i u otopinama nitratnih soli, bez značajnih razlika između nitratnih varijanata (B9 - B12), što je neočekivano jer su sadržaj N i klorofila u listu uobičajeno u pozitivnom međuodnosu. Upravo zbog takvih spoznaja, klorofilmetar se preporučuje kao instrument za brzu i jednostavnu procjenu sadržaja N u biljci radi prihrane biljaka dušikom u biljnoj proizvodnji, međutim kod takve namjene klorofilmetra treba uzeti u obzir svojstva građe listova kod različitih biljnih vrsta, kao i okolišne uvjete koji mogu utjecati na mjerenje SPAD (Xiong i sur. 2015). Kod sorte Cranberry, u nitratnim otopinama su SPAD vrijednosti bile značajno veće u odnosu na sortu Canelinni, bez statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu, što potvrđuje značaj sorte odnosno genetske osnove, u reakciji graha na solni stres. U cjelini, utvrđen relativni sadržaj klorofila u listu mladih biljaka graha u ovom istraživanju je bio najveći kod sorte Cranberry u varijanti otopine B12 - $Ca(NO_3)_2$, uz izmjerenu SPAD vrijednost 42,1.

ZAKLJUČCI

Dobiveni rezultati u ovom istraživanju upućuju na sljedeće zaključke:

- genotipovi graha se mogu značajno razlikovati u toleranciji solnog stresa čiji intenzitet ovisi o vrsti soli i koncentraciji otopine
- obje ispitivane sorte pokazale su značajnu varijabilnost u sadržaju klorofila pri tretmanima korištenih soli u odnosu na netretirane biljke, međutim kod sorte Cranberry su razlike između pojedinih vrsta soli bile manje izražene u usporedbi sa sortom Canellini;
- fiziološki poremećaji u biljkama u uvjetima zaslanjenosti supstrata u zoni korijena se mogu detektirati različitim analitičkim postupcima, a mjerenje relativnog sadržaja klorofilmetra je u ovom istraživanju bilo pouzdan način provjere je li pojedina vrsta soli štetna za mlade biljke graha
- najintenzivniji stres i najmanja tolerancija soli je utvrđena u varijanti s LiCl gdje su nakon 48h obje sorte izgledale potpuno uvenulo tako da se sadržaj klorofila nije mogao pouzdano izmjeriti;
- kod ostalih primijenjenih otopina soli najveći negativni utjecaj soli na sadržaj klorofila u listu kod obje sorte imale su otopine sulfatnih soli;
- prije sjetve graha na nekom tlu bilo bi preporučljivo analizom tla provjeriti ukupan sadržaj i pristupačnost navedenih soli biljkama te, u slučaju povišenog sadržaja u tlu, uzgajati tolerantne sorte.

ZAHVALA

Zahvaljujem se Fakultetu agrobiotehničkih znanosti i sturčnom vodstvu Katedre za fiziologiju i ishranu bilja za pomoć prilikom izrade praktičnog dijela rada te sve komentare, prijedloge i ideje tijekom pisanja rada.

LITERATURA

Bakhat H. F., Rasul K., Farooq A. B. U., Hammad H. M., Afzal S., Abbas S., Shah G. M., Rabbani F., Fahad S., Ondrasek G., Rashid M. I. 2025. Soil lithium affects carrot growth by changing cations concentrations and physiological attributes. Plant Soil Environment 71: 259–268.

Behr J. H., Zörb C. 2023. Interactive effect of lithium on concentration of alkali cations in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) under saline conditions. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 186: 38–49.

Bendelja D., Domjanović Horvat D., Garašić D., Lukša Ž., Budić I., Culjak Đ., Gudić M. 2024. Zaštita od hladnoće. U: Ćorić Grgić S. i Povalec M., Priroda 6. Školska knjiga, Zagreb, str. 52–69.

Bimurzayev N., Sari H., Kurunc A., Doganay K. H., Asmamaw M. 2021. Efects of diferent salt sources and salinity levels on emergence and seedling growth of faba bean genotypes. Scientific Reports 11: 18198.

Buendía-Valverde M. d. l. L., Gómez-Merino F. C., Fernández-Pavía Y. L., Mateos-Nava R. A., Trejo-Téllez L. I. 2024. Lithium: An element with potential for biostimulation and biofortification approaches in plants. Horticulturae 10: 1022.

Carović-Stanko K., Lazarević B., Gunjača J., Vidak M. 2022. Čarobni grah. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Znanstveni centar izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv). 123 str.

Colmenero-Flores J. M., Franco-Navarro J. D., Cubero-Font P., Peinado-Torrubia P., Rosales M. A. 2019. Chloride as a beneficial macronutrient in higher plants: new roles and regulation. International Journal of Molecular Sciences 20(19): 4686.

Gama P. B. S., Inanaga S., Tanaka K., Nakazawa R. 2021. Physiological response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings to salinity stress. International Journal of Anatomy and Physiology 10 (4): 001–010.

Garcia-Daga S., Fischer S., Gilliham M. 2025. Lithium in plants. New Phytologist 248: 1639–1654.

Habuš D., Stričević D., Liber S. 2018. Opća kemija 2 udžbenik kemije za drugi razred gimnazije. Školska knjiga, Zagreb.

Herak Čustić M., Petek M., Palčić I., Herak-Kramberger C. M. 2025. Ishrana bilja u hortikulturi, krajobrazu i kvaliteti hrane. Školska knjiga, Zagreb.

Kaymakanova M., Stoeva N., Mincheva, T. 2008. Salinity and its effects on the physiological response of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of Central European Agriculture 9: 749–755.

Kranner I., Seal C. E. 2013. Salt stress, signalling and redox control in seeds. Functional Plant Biology 40(9): 848–859.

Mahajan S., Tuteja N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. Archives of Biochemistry and Biophysics 444(2): 139–158.

Mlinarić S. 2013. Fotosintetska učinkovitost i antioksidativni odgovor mladih i razvijenih listova smokve (*Ficus carica* L.) u uvjetima svjetlosnog stresa. Doktorski rad, Osijek.
Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell and Environment 25(2): 239–250.
Narodne novine. 2025. Pravilnik o metodama uzorkovanja i ispitivanja kvalitete sjemena. Narodne novine 76: 15–46. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2025_05_76_992.html, pristupljeno 2.2.2026.
Nouri M. Z., Toorchi M., Komatsu S. 2011. Proteomics approach for identifying abiotic stress responsive proteins in soybean. U: Sudarić A., Soybean - Molecular Aspects of Breeding. InTech, Rijeka, str. 187–214.
Pevalek-Kozlina B. 2003. Fiziologija bilja. Profil, Zagreb.
Raggi L., Caproni L., Ciancaleoni S., D'Amato R., Businelli D., Negri V. 2024. Investigating the genetic basis of salt-tolerance in common bean: a genome-wide association study at the early vegetative stage. Scientific Reports 14: 5315.
Rao R. C., Talwar H. S., Wright G. C. 2001. Rapid assessment of specific leaf area and leaf nitrogen in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using a chlorophyll meter. Journal of Agronomy and Crop Science 186: 175–182.
Reynolds M. P., Mujeeb-Kazi A., Sawkins M. 2005. Prospects for utilising plant-adaptive mechanisms to improve wheat and other crops in drought- and salinity-prone environments. Annals of Applied Biology 146(2): 239–259.
Sairam R. K., Veerabhadara Rao K., Srivastava G. C. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Science 163(5): 1037–1046.
Shahzad B., Tanveer M., Hassan W., Shah A. N., Anjum S. A., Cheema S. A., Ali I. 2016. Lithium toxicity in plants: Reasons, mechanisms and remediation possibilities - A review. Plant Physiology and Biochemistry 107: 104–115.
Singh H., Bruce D. 2016. Electrical conductivity and pH guide for hydroponics. https://extension.okstate.edu/fact-sheets/electrical-conductivity-and-ph-guide-for-hydroponics.html, pristupljeno 4.2.2026.
Stanisavljević A., Lisjak M., Vinković T., Špoljarević M., Karakaš M., Teklić T., Ćosić T. 2009. Prolin u listu jagode kao indikator solnog stresa. U: Lončarić Z. i Marić S., Zbornik radova 44. Hrvatskog & 4. međunarodnog simpozija o poljoprivredi. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek, str. 94–98.
Süß A., Danner M., Obster C., Locherer M., Hank T., Richter K. 2015. Measuring leaf chlorophyll content with the Konica Minolta SPAD-502Plus – Theory, measurement, problems, interpretation. EnMAP Field Guides Technical Report, GFZ Data Services.
Špoljarević M. 2016. Fiziološki odgovor kultivara soje na abiotski stres. Disertacija. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Fakultet agrobiotehničkih znanosti, Osijek.
Teklić T., Vratarić M., Sudarić A., Kovačević V., Vukadinović V., Bertić B. 2009. Relationships among chloroplast pigments concentration and chlorophyllmeter readings in soybean under influence of foliar magnesium application. Communications in Soil Science and Plant Analysis 40 (1-6): 706–725.
Tester M., Davenport R. 2003. Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. Annals of Botany 91(5): 503–527.
Tobe K., Li X., Omasa K. 2004. Effects of five different salts on seed germination and seedling growth of *Haloxilon ammodendron* (Chenopodiaceae). Seed Science Research 14: 345–353.
Vavetić L. 2016. Makroelementi u tlu i biljci. Završni rad (sveučilišni), Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti, Zavod za biljnu proizvodnju i biotehnologiju, Osijek.
Xiong D., Chen J., Yu T., Gao W., Ling X., Li Y., Peng S., Huang J. 2015. SPAD-based leaf nitrogen estimation is impacted by environmental factors and crop leaf characteristics. Scientific Reports 5: 13389.
Yamamoto A., Nakamura T., Adu-Gyamfi J., Saigusa M. 2002. Relationship between chlorophyll content in sorghum and pigeonpea determined by extraction method and by chlorophyll meter (SPAD-502). Journal of Plant Nutrition 25(10): 2295–2301.

Protukarijesni učinak žvakaćih guma sa ksilitolom i glukoznim šećerom na pH i količinu sline

Dora Đurkan, 8. razred
Marta Likić, 8. razred

Osnovna škola Augusta Cesarca, Zagreb
Mentor: *Sanja Irić Široonja*

SAŽETAK
Slina je bistra tekućina koju proizvode žlijezde slinovnice pod kontrolom živčanog sustava. Slina ima brojne uloge koje su ključne za zdravlje i normalnu funkciju usne šupljine. Nestimulirana slina je ona koja se stalno stvara u usnoj šupljini bez podražaja žvakanjem, mehanički ili kemijski nekom hranom odnosno pićem. Slina je ključna u borbi protiv karijesa jer štiti caklinu, neutralizira kiseline koje proizvode bakterije, ispire ostatke hrane i sadrži antibakterijska sredstva za ubijanje štetnih bakterija, čime štiti zube od propadanja. Nedostatak sline znatno povećava rizik od karijesa. Ciljevi ovog istraživačkog rada su ispitati količinu i pH nestimulirane sline u ovisnosti o spolu ispitanika, usporediti količinu i pH nestimulirane sline i sline stimulirane žvakaćom gumom s ksilitolom, žvakaćom gumom s glukoznim šećerom te voskom i utvrditi razlike u ovisnosti o spolu ispitanika te ispitati promjenu pH vrijednosti stimulirane sline tijekom 15 minuta stimulacije. Istraživanje je pokazalo kako su količina nestimulirane sline kao i njen pH veći kod ispitanika ženskog spola, a sve vrste stimulacije povećavaju ukupnu količinu izlučene sline dok god je stimulacija prisutna. Stimulacija žvakaćom gumom sa šećerom značajno snižava pH vrijednost sline, dok je pH vrijednost sline stimulirane voskom i žvakaćom gumom sa ksilitolom približno slična i ostaje u neutralnom i blago lužnatom području. Najveća količina stimulirane sline izlučuje se kod ispitanika ženskog spola nakon stimulacije žvakaćom gumom sa šećerom te ne postoje značajne razlike u pH vrijednosti stimuliranih slina između spolova. Najveći, najbrži i konstantan pad pH do kiselih vrijednosti javlja se kod sline stimulirane žvakaćom gumom sa šećerom, a pH sline pri žvakanju žvakaćih guma sa ksilitolom se kreće u rasponu od 9,15-7,05. Iz navedenih rezultata možemo zaključiti kako žvakaća guma sa ksilitolom može pomoći u sprječavaju nastanka karijesa.

Ključne riječi: *slina; žvakaća guma; šećer; ksilitol; pH*

UVOD

Slina je bistra tekućina koju proizvode žlijezde slinovnice pod kontrolom živčanog sustava. Žlijezde slinovnice dijele se na tri glavna para velikih žlijezda. To su doušne, podjezične i podčeljusne, a osim njih postoji i velik broj malih žlijezda raspoređenih po cijeloj sluznici usne šupljine. Slina se sastoji od oko 99 % vode i 1 % čvrstih tvari. Čvrstu tvar čine različiti ioni (kalijevi, hidrogenkarbonatni, natrijevi, kloridni ioni) i bjelančevine od kojih se ističu ptijalin, alfa - amilaza, mucin, lizozim i aglutinin (Carpenter, 2013).

U slini razlikujemo serozni i mukozni sekret koji u različitoj količini izlučuju pojedine žlijezde slinovnice. Serozni sekret sadrži ptijalin, enzim za razgradnju škroba. Mukozni sekret sadrži mucin. Mucin je složena bjelančevina velike viskoznosti koja podmazuje oralnu sluznicu olakšavajući žvakanje, gutanje i govor. Doušne žlijezde isključivo su serozne, a podčeljusne i podjezične luče i serozni i mukozni sekret. Prosječna količina izlučene sline u jednom danu može biti od 1 do 1,5 litre, a pH vrijednost mijenja se tijekom dana te varira od 5,3 do 7,8 no prosječna je pH vrijednost od 6 do 7 (Par i Vučićević-Boras, 2009).

Slina ima brojne uloge koje su ključne za zdravlje i normalnu funkciju usne šupljine, kao što su puferska aktivnost, podmazivanje i zaštita, izravna antibakterijska aktivnost, oblikovanje zalogaja hrane i izravno sudjelovanje u probavi (ptijalin), prijenos okusa, ispiranje bakterija i čestica hrane te zaštita cakline zuba (Humphrey i Williamson, 2001).

Razlikujemo stimuliranu slinu i nestimuliranu slinu. Nestimulirana slina je ona koja se stalno stvara u usnoj šupljini bez podražaja žvakanjem, mehanički ili kemijski nekom hranom odnosno pićem. Protok nestimulirane sline kreće se od 0,25 do 0,35 mL/min, a protok stimulirane varira od 1 do 3 mL/min (Skvorcov i Vuletić, 2021). Dječaci imaju viši nesimulirani protok sline od djevojčica, a pH i pufer kapacitet usko su povezani s protokom sline u cjelokupnoj populaciji (Forcella i Filippi, 2018).

Nakon konzumiranja ugljikohidrata, pH sline se smanjuje na vrijednosti 6 ili niže zbog metabolizma bakterija. Bakterije se koriste ugljikohidratima i stvaraju mliječnu kiselinu kao nusprodukt (Fejerskov i Kidd, 2011). Slina ima sposobnost vratiti taj sniženi pH u normalu. To se naziva puferski kapacitet sline. Time se sprječava demineralizacijsko djelovanje kiselina i rast bakterijskih kolonija.

Demineralizacija je proces otapanja kristala cakline, što dovodi do njenog oštećenja, dok je remineralizacija proces obnavljanja kristala tijekom kojega se ioni kalcija, fosfata, fluorida i drugi pohranjuju iz sline unutar demineralizirane cakline te se zatim rekristaliziraju. Prirodni proces remineralizacije važan je za smanjenje nastanka karijesa, jer mijenja, usporava ili prekida demineralizaciju i nadomješta izgubljenu mineralnu masu cakline nastalu zbog procesa demineralizacije. Oba se procesa neprestano izmjenjuju i nadopunjuju (Fejerskov i Kidd, 2011).

Slina je ključna u borbi protiv karijesa jer ponovo obnavlja caklinu, neutralizira kiseline koje proizvode bakterije, ispire ostatke hrane i sadrži antibakterijska sredstva za ubijanje štetnih bakterija, čime štiti zube od propadanja. Nedostatak sline znatno povećava rizik od karijesa.

Karijes je propadanje tvrdih zubnih tkiva uzrokovano kiselinama koje proizvode bakterije u zubnom plaku (Šegović i Miletić Karlović, 2006). Ujedno je i najraširenija kronična bolest današnjice te je važno osvijestiti ljude, pogotovo mlade, o tom problemu. Djeca su posebno podložna oralnim zdravstvenim problemima zbog navika prehrane, pretjerane upotrebe šećera i nedostatka svijesti o važnosti oralne higijene koju je potrebno približiti i roditeljima. Što se tiče stanja oralnog zdravlja u Republici Hrvatskoj, postoji jako puno prostora za napredak i edukaciju o samom zdravlju usne šupljine. Ono se prikazuje kroz KEP indeks koji se izračunava zbrajanjem broja zuba zahvaćenih karijesom, izvađenih zuba i zuba s ispunom. Od zemalja EU, jedino Bugarska ima višu vrijednost KEP indeksa koja iznosi 4,4. Prosječni KEP indeks dvanaestogodišnjaka u RH iznosi 4,18. Hrvatska je druga po redu od članica EU sa najzastupljenijim karijesom u populaciji (Radić i sur., 2015). Uz standardne metode održavanja oralne higijene kao što su četkanje, korištenje zubnog konca, otopina za ispiranje i pravilne prehrane, žvakaće gume su široko prihvaćene kao dodatno sredstvo oralne higijene. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, žvakaće gume bez glukoznog šećera imaju višestruke prednosti za zdravlje zubi. Neke od njih su mehaničko uklanjanje ostataka hrane, poticanje protoka sline što poboljšava puferski kapacitet i povećava pH sline. Na taj način žvakaće gume pomažu u procesu dinamike demineralizacije i remineralizacije i imaju protukarijesni učinak. U Hrvatskoj se nažalost, još mogu kupiti žvakaće gume s glukoznim šećerom. Štetnost žvakaćih guma sa šećerom leži u tome što šećer hrani bakterije u usnoj šupljini dovodeći do povećanog rizika od karijesa.

Štetni šećeri u žvakaćim gumama danas su zamijenjeni umjetnim šećerima kao što su: eritrol, sorbitol, maltitol i ksilitol. Od svih navedenih ksilitol se pokazao kao najbolji jer ima i protukarijesni učinak. Znanstveno je dokazano kako smanjuje koncentraciju bakterije *Streptococcus mutans* koja je najčešći uzročnik karijesa, a ujedno time smanjuje i razinu mliječne kiseline koju te bakterije stvaraju. Razlog tome je što bakterije ne mogu metabolizirati ksilitol pa ne proizvode kiselinu koja oštećuje zubnu

caklinu. Također se odlaže na površinu zuba i stvara zaštitni sloj štiteći ih od demineralizacije (Jain i sur., 2022).

Na ovo istraživanje potaknula nas je primijećena učestala konzumacija žvakaćih guma među učenicima osmih razreda. Učenici često žvaču žvakaće gume tijekom odmora, ali i za vrijeme nastave, pri čemu se najčešće koriste žvakaće gume koje sadrže šećer. Iako je žvakanje žvakaćih guma vrlo raširena navika, malo se razmišlja o njihovu utjecaju na zdravlje usne šupljine. Svrha ovog istraživanja je kroz promjene količine i pH sline utvrditi kako žvakaće gume s ksilitolom i žvakaće gume s glukoznim šećerom djeluju na zdravlje zubi u pubertetskoj populaciji. Rezultati ovog istraživanja mogli bi pridonijeti boljem razumijevanju utjecaja svakodnevnih navika učenika na oralno zdravlje te potaknuti učenike na kritičko razmišljanje prema svojim prehrambenim odabirima.

Ciljevi ovog istraživačkog rada su:

- ispitati količinu i pH nestimulirane sline u ovisnosti o spolu ispitanika;
- usporediti količinu i pH nestimulirane sline i sline stimulirane žvakaćom gumom s ksilitolom, žvakaćom gumom s glukoznim šećerom te voskom;
- usporediti količinu i pH nestimulirane sline i sline stimulirane žvakaćom gumom s ksilitolom, žvakaćom gumom s glukoznim šećerom te voskom u ovisnosti o spolu ispitanika;
- ispitati promjenu pH vrijednosti stimulirane sline tijekom 15 minuta stimulacije.

S obzirom na dosadašnja istraživanja pretpostavka je kako će dječaci proizvesti veću količinu nestimulirane sline veće pH vrijednosti. Količina stimulirane sline bit će veća od količine nestimulirane, ali bez značajnije razlike između ispitivanih skupina. Slina stimulirana žvakaćom gumom s ksilitolom imat će najvišu pH vrijednost, a slina stimulirana žvakaćom gumom s glukoznim šećerom najnižu te neće biti značajnije razlike u pH vrijednosti i količini nestimulirane i stimulirane sline u ovisnosti o spolu ispitanika. PH vrijednost sline kod skupine koja je žvakala žvakaću guma s glukoznim šećerom dodatno će se smanjiti tijekom 15 minuta stimulacije.

METODE RADA

Istraživanje je trajalo ukupno četiri dana, sve metode rada su samostalno osmišljene, zapažanja bilježena tijekom provedbe istraživanja, a analiza dobivenih rezultata provedena je na kraju istraživanja.

Uzorak

U istraživanju je sudjelovalo trideset učenika osmih razrednih odjela, petnaest dječaka i petnaest djevojčica u dobi od 13–15 godina. Svi ispitanici u vrijeme provođenja istraživanja bili su dobrog zdravstvenog stanja. Isključeni su ispitanici sa sistemskim bolestima (dijabetes, celijakija) te ispitanici koji nose fiksni aparat za zube. Treba napomenuti kako se razredni odjeli unutar naše škole sastoje od manjeg broja učenika stoga nakon eliminacije svih onih ispitanika koji nisu mogli sudjelovati u istraživanju nije bilo moguće formirati veći istraživački uzorak.

Ispitanici su podijeljeni u tri skupine tako da svaka broji po deset ispitanika. Unutar skupina napravljena je jednaka podjela prema spolu tako da se svaka skupina sastoji od pet djevojčica i pet dječaka.

Dvije su skupine bile testne i jedna kontrolna. Prva testna skupina žvakala je žvakaću gumu sa ksilitolom okusa jagode; Miradent Xilytol jagoda, Hager& Werken GmbH (slika 1), a druga testna skupina žvakaću gumu s glukoznim šećerom, također okusa jagode; Hubba Bubba jagoda, Wrigley GmbH (slika 2).

Odabrane su žvakaće gume istog okusa kako razlika u okusima ne bi utjecala na rezultate. Treća, kontrolna skupina žvakala je pločicu dentalnog voska (slika 3). Žvakaće gume i pločice voska bile su približno jednake veličine.

Slika 1 Žvakaća guma za testnu skupinu 1

Slika 2 Žvakaća guma za testnu skupinu 2

Slika 3 Dentalni vosak za kontrolnu skupinu

Tijek istraživanja

Dan prije istraživanja svim ispitanicima dane su upute kako sat vremena prije mjerenja ne smiju jesti, piti niti žvakati žvakaće gume. Sve dane istraživanja mjerenja su odrađena u isto vrijeme (9.45 – 10.30) tijekom jednog sata biologije. pH sline mjeren je uređajima *PH-010 pen type pH meter* koji su prije korištenja kalibrirani (slika 4). Slina je prikupljana u laboratorijske čaše s plavom graduacijom od 50 mL (slika 5).

Slika 4 pH-010 pen type ph meter

Slika 5 Laboratorijska čaša za prikupljanje sline

Prvog dana istraživanja svim ispitanicima izmjerena je količina i pH nestimulirane sline stvorene u pet minuta prikupljanja. Prije početka, ispitanicima su dane detaljne upute kako moraju sjediti uspravno s blago nagnutom glavom prema naprijed. Nakon 5 minuta svu nestimuliranu slinu koja se stvori unutar usne šupljine trebaju nježno ispljunuti u mjernu čašu, a potom u nju uroniti pH metar. Kod svakog je ispitanika očitana količina nestimulirane sline i njena pH vrijednost te su podaci zabilježeni u prethodno pripremljene tablice. Drugi dan istraživanja mjerila se količina i pH stimulirane sline prve testne skupine (žvakaća guma sa ksilitolom okusa jagode), treći dan druge testne skupine (žvakaća guma s glukoznim šećerom okusa jagode), a četvrti dan kontrolne skupine (pločica voska). Prije početka, ponovljene su detaljne upute kako pravilno prikupljati slinu. Svi ispitanici žvakali su žvakaću gumu (s ksilitolom, sa šećerom) ili vosak točno 15 min. Svu slinu stvorenu tijekom tog vremena prikupljali su u mjerne čaše (slika 6). U prethodno pripremljene tablice zabilježena je očitana količina sline i njena pH vrijednost nakon 5, 10 i 15 minuta prikupljanja. Između svakog mjerenja pH sline, pH metri su isprani u posebnim čašama s destiliranom vodom. Nakon prikupljanja svih rezultata provedena je njihova statistička obrada u programu Microsoft Excell for Windows (Microsoft Office 2023). Podaci su analizirani izračunom aritmetičkih sredina, a dobivene vrijednosti međusobno su uspoređene radi utvrđivanja razlika između ispitivanih skupina.

Slika 6 Uzorak sline tijekom istraživanja

REZULTATI

Prvi dan istraživanja

Prosječna pH vrijednost nestimulirane sline u muških ispitanika iznosila je 7,89, dok je u ženskih iznosila 8,02. Prosječna količina nestimulirane sline u muških ispitanika iznosila je 5,67 mL/5 min, a u ženskih 6,00 mL/5 min (tablica 1). Prosječna pH vrijednost nestimulirane sline svih ispitanika iznosila je 7,96, a prosječna količina 5,84 mL, odnosno 1,16 mL/min.

Tablica 1 pH vrijednost i količina nestimulirane sline

Nestimulirana slina muški	pH vrijednost / 5 min	Količina sline (mL/5 min)	Nestimulirana slina ženski	pH vrijednost / 5 min	Količina sline (mL/5 min)
1	8,20	8,00	1	7,80	5,00
2	7,80	5,00	2	8,10	5,00
3	7,40	3,00	3	8,20	7,00
4	7,50	2,00	4	9,10	5,00
5	7,60	9,00	5	7,50	5,00
6	8,00	5,00	6	10,10	5,00
7	8,40	5,00	7	8,10	3,00
8	7,70	5,00	8	7,90	10,00
9	7,80	6,00	9	7,60	8,00
10	8,10	9,00	10	8,00	7,00
11	7,60	4,00	11	7,70	5,00
12	7,90	3,00	12	8,20	5,00
13	8,30	6,00	13	7,30	7,00
14	8,20	6,00	14	7,20	9,00
15	7,90	9,00	15	7,50	4,00
Srednja vrijednost	7,89	5,67		8,02	6,00

Drugi dan istraživanja

Prosječna pH vrijednost sline stimulirane žvakaćom gumom sa ksilitolom u prvoj testnoj skupini blago se smanjivala tijekom 15 minuta stimulacije. Ukupno smanjenje pH vrijednosti u muških ispitanika iznosilo je 0,92 pH, dok je u ženskih ispitanika iznosilo 2,16 pH. Istovremeno, prosječna količina sline stimulirane žvakaćom gumom sa ksilitolom kontinuirano se povećavala, za 4,8 mL ukupno u muških ispitanika te za 5,4 mL u ženskih ispitanika (tablica 2).

Tablica 2 pH vrijednost i količina sline prve testne skupine (žvakaća guma sa ksilitolom)

Testna skupina 1 muški	pH vrijednost / 5 min	pH vrijednost / 10 min	pH vrijednost / 15 min
1	7,10	6,50	6,60
2	6,60	6,30	6,20
3	8,70	7,30	6,90
4	8,40	8,20	8,00
5	8,10	7,30	6,60
Srednja vrijednost	7,78	7,12	6,86
	količina sline (mL/5 min)	količina sline (mL/10 min)	količina sline (mL/15 min)
1	10,00	15,00	20,00
2	10,00	13,00	14,00
3	9,00	10,00	13,00
4	9,00	9,00	10,00
5	10,00	12,00	15,00
Srednja vrijednost	9,60	11,80	14,40
Testna skupina 1 ženski	pH vrijednost / 5 min	pH vrijednost / 10 min	pH vrijednost / 15 min
1	8,50	7,40	6,50
2	9,20	7,50	6,00
3	8,10	7,20	6,60
4	9,00	8,20	7,10
5	12,20	10,40	10,00
Srednja vrijednost	9,40	8,14	7,24
	količina sline (mL/5 min)	količina sline (mL/10 min)	količina sline (mL/15 min)
1	9,00	12,00	14,00
2	4,00	7,00	11,00
3	8,00	10,00	12,00
4	5,00	8,00	10,00
5	10,00	12,00	16,00
Srednja vrijednost	7,20	9,80	12,60

Treći dan istraživanja

Prosječna pH vrijednost sline stimulirane žvakaćom gumom sa šećerom u drugoj testnoj skupini također se kontinuirano smanjivala tijekom 15 minuta stimulacije. Ukupno smanjenje u muških ispitanika iznosilo je 0,38 pH, dok je u ženskih iznosilo 0,46 pH. Iako je ukupno smanjenje prosječne pH vrijednosti nešto manje nego li u prvoj testnoj skupini, sama pH vrijednost sline svih ispitanika unutar ove skupine puno je niža. Istovremeno, prosječna količina sline stimulirane žvakaćom gumom sa šećerom kontinuirano se povećavala, za 6 mL ukupno u muških ispitanika te za 8 mL u ženskih ispitanika (tablica 3).

Tablica 3 pH vrijednost i količina sline druge testne skupine (žvakaća guma sa šećerom)

Testna skupina 2 muški	pH vrijednost / 5 min	pH vrijednost / 10 min	pH vrijednost / 15 min
1	4,30	4,60	4,60
2	4,30	4,40	4,00
3	6,70	6,40	6,00
4	6,40	5,90	5,70
5	6,50	6,30	6,00
Srednja vrijednost	5,64	5,52	5,26
	Količina sline (mL/5 min)	Količina sline (mL/10 min)	Količina sline (mL/15 min)
1	9,00	11,00	13,00
2	12,00	14,00	16,00
3	10,00	13,00	18,00
4	8,00	10,00	15,00
5	10,00	12,00	17,00
Srednja vrijednost	9,80	12,00	15,80
Testna skupina 2 ženski	pH vrijednost / 5 min	pH vrijednost / 10 min	pH vrijednost / 15 min
1	6,00	5,20	5,60
2	5,50	5,50	5,10
3	5,10	5,00	4,80
4	6,50	6,40	6,00
5	5,70	5,30	5,00
Srednja vrijednost	5,76	5,48	5,30
	Količina sline (mL/5 min)	Količina sline (mL/10 min)	Količina sline (mL/15 min)
1	10,00	12,00	19,00
2	11,00	15,00	20,00
3	20,00	23,00	30,00
4	10,00	15,00	20,00
5	18,00	19,00	20,00
Srednja vrijednost	13,80	16,80	21,80

Četvrti dan istraživanja

Prosječna pH vrijednost sline stimulirane voskom u kontrolnoj skupini smanjivala se tijekom prvih 10 minuta stimulacije, nakon čega joj se vrijednost ustabilila te nije bilo značajnije razlike nakon 10. i 15. minute stimulacije. Ukupno smanjenje u muških ispitanika iznosilo je 1,06 pH, dok je u ženskih iznosilo 1,9 pH. Istovremeno, prosječna količina sline stimulirane voskom kontinuirano se povećavala, za 7,2 mL ukupno u muških ispitanika te za 7,6 mL u ženskih ispitanika (tablica 4).

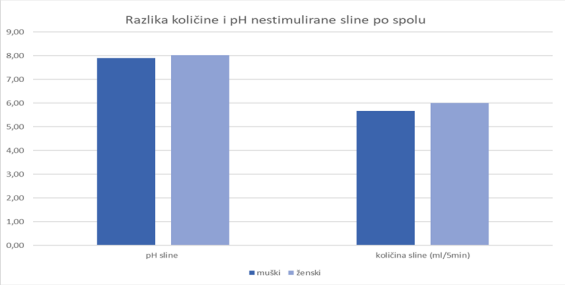
Tablica 4 pH vrijednost i količina sline kontrolne skupine (vosak)

Kontrolna skupina muški	pH vrijednost / 5 min	pH vrijednost / 10 min	pH vrijednost / 15 min
1	9,40	7,30	7,00
2	7,00	7,10	6,90
3	7,20	7,00	7,00
4	10,50	8,40	8,20
5	7,20	6,80	6,90
Srednja vrijednost	8,26	7,32	7,20
	Količina sline (mL/5 min)	Količina sline (mL/10 min)	Količina sline (mL/15 min)
1	10,00	15,00	20,00
2	10,00	20,00	25,00
3	9,00	10,00	12,00
4	10,00	12,00	15,00
5	10,00	12,00	13,00
Srednja vrijednost	9,80	13,80	17,00
Kontrolna skupina ženski	pH vrijednost / 5 min	pH vrijednost / 10 min	pH vrijednost / 15 min
1	8,70	7,50	7,10
2	7,50	9,40	7,90
3	10,90	8,40	6,80

Kontrolna skupina ženski	pH vrijednost / 5 min	pH vrijednost / 10 min	pH vrijednost / 15 min
4	9,80	7,00	7,00
5	8,40	7,50	7,00
Srednja vrijednost	9,06	7,96	7,16
	Količina sline (mL/5 min)	Količina sline (mL/10 min)	Količina sline (mL/15 min)
1	10,00	11,00	12,00
2	10,00	12,00	13,00
3	10,00	11,00	20,00
4	5,00	10,00	20,00
5	10,00	15,00	18,00
Srednja vrijednost	9,00	11,80	16,60

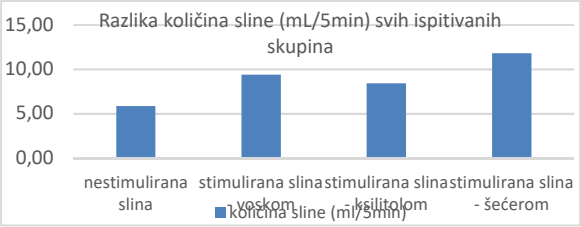
Usporedba rezultata

Prosječne vrijednosti količine i pH nestimulirane sline u svih ispitanika vrlo su slične te nema značajnije razlike između spolova. Prosječna količina nestimulirane sline veća je kod djevojčica za 0,33 mL u pet minuta, kao i pH za 0,13 (slika 7). Prosječne pH vrijednosti nestimulirane sline kod oba spola neutralne su do blago lužnate.



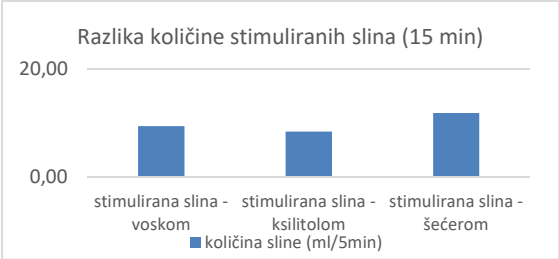
Slika 7 Razlika količine i pH nestimulirane sline po spolu

Sve vrste stimulacije značajno povećavaju količinu izlučene sline. Najveći je porast zabilježen kod ispitanika druge testne skupine koji su žvakali žvakaće gume sa šećerom, zatim slijede ispitanici kontrolne skupine koji su žvakali vosak te potom ispitanici prve testne skupine koji su žvakali žvakaću gumu sa ksilitolom (slika 8).



Slika 8 Razlika količine sline nakon 5min kod svih ispitanika

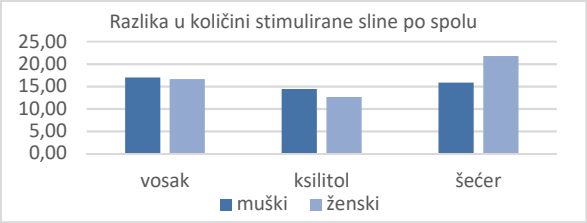
Sve vrste stimulacije održavaju pojačano lučenje sline i nakon 15 minuta. Količina izlučene sline u stimuliranim skupinama najveća je kod ispitanika druge testne skupine koji su žvakali žvakaće gume sa šećerom, dok su količine unutar kontrolne i prve testne skupine približno slične (slika 9).



Slika 9 Razlika količine stimuliranih slina nakon 15 min

Najveća je količina stimulirane sline prisutna u drugoj testnoj skupini (žvakaće gume sa šećerom) kod ispitanika ženskog spola, dok je količinski najmanje sline izlučeno u prvoj testnoj skupini (žvakaće

gume sa ksilitolom) također kod ispitanika ženskog spola. Unutar kontrolne i prve testne skupine muški ispitanici imaju nešto veću količinu stimulirane sline (slika 10).

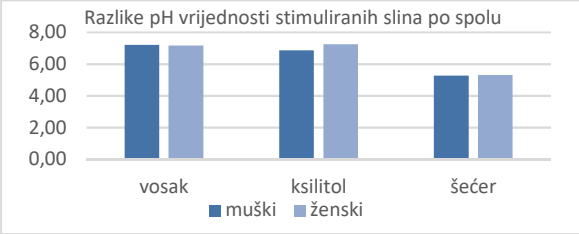


Slika 10 Razlika u količini stimulirane sline u svim skupinama prema spolu

Prva testna skupina (žvakaće gume sa ksilitolom) i kontrolna skupina imaju sličan pH sline tijekom cijele stimulacije. Ističe se jedino druga testna skupina sa svojim niskim pH-om sline (slika 11).

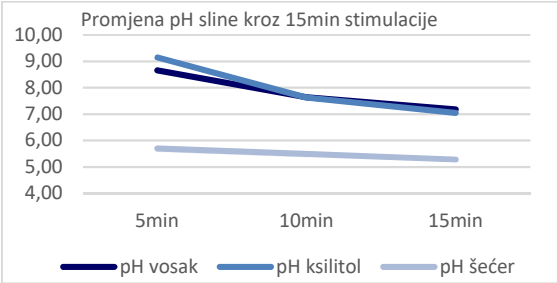
Slika 11 Razlika pH stimuliranih slina

Ne uočavaju se značajne razlike pH vrijednosti stimuliranih slina između spolova unutar svih ispitivanih skupina (slika 12).



Slika 12 Razlike pH vrijednosti stimuliranih slina u svim skupinama prema spolu

pH vrijednost stimulirane sline opada tijekom perioda od 15 minuta stimulacije kod sve tri ispitivane skupine, ali je pad različitog intenziteta. Najveći pad pH vrijednosti stimulirane sline zabilježen je kod ispitanika druge testne skupine koji su žvakali žvakaće gume sa šećerom. Taj pad dogodio se već u prvih 5 minuta i nastavio je svoj silazni trend, dok smo kod kontrolne i prve testne skupine u prvih 5 minuta imali porast pH koji je s vremenom onda lagano počeo padati do neutralnih vrijednosti. Najveći porast pH vrijednosti zabilježen je u prvoj testnoj skupini koja je žvakala žvakaće gume sa ksilitolom i dosegao je vrijednost od 9,15, a kasnije se spustio na 7,05. Kontrolna skupina koja je žvakala vosak također je imala porast pH vrijednosti do 8,66, a zatim pad do 7,18. Druga testna skupina koja je žvakala žvakaće gume sa šećerom jedina je imala pad pH vrijednosti sline od 5,70 te je tijekom svih 15 minuta stimulacije pH i dalje nastavio padati do 5,28 (slika 13).



Slika 13 Promjena ph sline kroz 15min stimulacije

RASPRAVA

Prema rezultatima ovog istraživanja prosječan pH nestimulirane sline kod svih ispitanika iznosi 7,96, a prosječna količina 5,84 mL, odnosno 1,16 mL/min. Prema Rotteveel i Jongerinus (2004) količina nestimulirane sline kod djece u pubertetu može biti u rasponu od 0,5 do 1,11 mL/min i veća je nego kod odraslih što se može objasniti dobrom funkcijom žlijezda slinovnica i jačim djelovanjem autonomnog živčanog sustava koji potiče osnovno (bazalno) lučenje sline. Brzina lučenja sline kod djece povećava se s povećanjem dobi ispitanika. Starija školska djeca, posebno adolescenti često imaju više vrijednosti nestimuliranog protoka u usporedbi s mlađom djecom.

Količina nestimulirane sline u ovom istraživanju veća je kod djevojčica za 0,33 mL u pet minuta, kao i pH za 0,13. U istraživanju Forcella i Filippi (2018) dječaci proizvode veću količinu nestimulirane sline no spolne razlike u osnovnom (bazalnom) lučenju sline su često male i pod utjecajem individualnih čimbenika poput tjelesne mase, hormonskog statusa i volumena žlijezda slinovnica, dok pH sline raste s porastom brzine protoka sline zbog povećane koncentracije bikarbonata, koji djeluje kao pufer.

I prema Rotteveel i Jongerinus (2004) kao i prema Forcella i Filippi (2018) nestimulirana (mirujuća) slina se prikuplja isključivo tijekom 5 minuta jer je to dovoljno dug period da se dobije pouzdana količina za mjerenje protoka i pH, a istovremeno se izbjegava preveliko opterećenje ispitanika i promjena u sastavu sline koje duže prikupljanje može uzrokovati.

U kliničkim protokolima za ocjenu lučenja sline preporučuje se ograničiti prikupljanje nestimulirane sline na najviše 5 minuta, jer duže vrijeme može utjecati na svojstva uzorka i sposobnost ispitanika da prikuplja slinu bez dodatnih pokreta odnosno suvišne stimulacije (Kristina Đurkan, *pers. comm*.). S obzirom na to da žvakanje i drugi stimulansi uzrokuju postepeno povećanje lučenja sline, stimulirana slina prikuplja se u kraćim ili dužim vremenskim intervalima kako bi se mogao pratiti tijek promjene volumena i pH vrijednosti kroz vrijeme (Kristina Đurkan, *pers. comm*.).

Zabilježena je značajna razlika između količine nestimulirane i stimulirane sline u svim vremenskim intervalima, pri čemu druga testna skupina, ona koja je žvakala žvakaće gume sa šećerom, ima najveću količinu izlučene sline. Humphrey i Williamson (2001) navode kako okusna stimulacija (posebno slatki okus) dodatno pojačava refleks slinjenja aktivacijom okusnih receptora, čime se kombiniraju mehanički i kemijski podražaj. Prema Vukičević-Boras i Topić (1999) ksilitol stimulira proizvodnju sline prvenstveno mehanički i blago okusno, ali bez fermentacije i bez dodatne stimulacije bakterijske aktivnosti. Stoga je lučenje sline prisutno, ali može biti nešto slabije u usporedbi s običnim šećerom. Na dalje, Vukičević-Boras i Topić (1999) naglašavaju da je mehanički podražaj sam po sebi dovoljan za značajno povećanje lučenja sline, neovisno o kemijskom sastavu podražaja. Prema Humphrey i Williamson (2001) stimulirani protok može ostati povišen sve dok je podražaj prisutan. Muškarci u prosjeku imaju veće žlijezde slinovnice i veći apsolutni volumen sline, a izraženiji odgovor kod ispitanica najvjerojatnije je posljedica veće osjetljivosti okusnih receptora ili individualnih razlika u percepciji slatkog okusa.

Korištenjem žvakaćih guma sa šećerom pH sline drastično pada i zadržava se na niskim vrijednostima kroz svih petnaest minuta testiranja. Rezultati pokazuju kako se vrijednost pH sline u ovoj testnoj skupini kreće u rasponu od 5,7 – 5,28. Kritična razina pH sline koja dovodi do demineralizacije (otapanja) cakline obično je u rasponu od 5,2 – 5,5 (Fejerskov i Kidd, 2021). Jurić i Čuković-Bagić (2011) ističu da konzumacija šećera u djece povećava rizik od karijesa zbog brzog stvaranja kiseline od strane

bakterija u usnoj šupljini. Niski pH sline štetno djeluje na površinu zubne cakline i omogućuje povoljne uvjete bakterijama, čime povećava rizik od nastanka karijesa.

Nakon žvakanja žvakaće gume sa ksilitolom pH sline se kreće u rasponu od 9,15 – 7,05 te je mnogo viši nego pH sline stimulirane žvakaćom gumom sa šećerom koji iznosi 5,7 – 5,28. Ksilitol sprječava razmnožavanje, širenje i vezanje bakterije Streptococcus mutans na površinu zuba, čime smanjuje produkciju kiselina i razvoj plaka, a povećava remineralizaciju. Kada sastavni dio žvakaće gume čini ksilitol, karijes se reducira u 30 – 65 % slučajeva (Vukičević- Boras i Topić, 1999).

ZAKLJUČCI

Nakon provedenog istraživanja i analize dobivenih rezultata može se utvrditi kako su pretpostavke iznesene na početku istraživanja djelomično točne.

Na temelju dobivenih rezultata izvedeni su sljedeći zaključci:

- količina nestimulirane sline kao i njen pH veći su kod ispitanika ženskog spola; prosječna količina nestimulirane sline veća je kod djevojčica za 0,33 mL u pet minuta, kao i pH za 0,13;
- sve vrste stimulacije povećavaju ukupnu količinu izlučene sline; nakon stimulacije žvakaćom gumom sa šećerom izlučena je najveća količina sline, zatim slijedi količina sline izlučena stimulacijom voskom te stimulacijom žvakaćom gumom sa ksilitolom;
- sve vrste stimulacije održavaju pojačano lučenje sline tijekom vremena dok god je stimulacija prisutna; količina izlučene sline najveća je kod ispitanika koji su žvakali žvakali žvakaće gume sa šećerom, zatim slijedi količina sline izlučena stimulacijom voskom te stimulacijom žvakaćom gumom sa ksilitolom;
- stimulacija žvakaćom gumom sa šećerom značajno snižava pH vrijednost sline, dok je pH vrijednost sline stimulirane voskom i žvakaćom gumom sa ksilitolom približno slična i ostaje u neutralnom i blago lužnatom području;
- najveća količina stimulirane sline izlučuje se kod ispitanika ženskog spola nakon stimulacije žvakaćom gumom sa šećerom, kao i najmanja količina nakon stimulacije žvakaćom gumom sa ksilitolom. Nakon stimulacije žvakanjem voska i žvakaćom gumom sa ksilitolom izlučuje se veća količina sline kod ispitanika muškog spola;
- ne postoje značajne razlike u pH vrijednosti stimuliranih slina između spolova unutar svih ispitivanih skupina;
- pH vrijednost stimulirane sline opada tijekom perioda od 15 minuta stimulacije, ali različitim intenzitetom; najveći, najbrži i konstantan pad pH do kiselih vrijednosti javlja se kod sline stimulirane žvakaćom gumom sa šećerom;
- ksilitol i vosak najprije povisuju pH vrijednost sline, nakon čega slijedi blagi pad do neutralnih vrijednosti; pH sline pri žvakanju žvakaćih guma sa ksilitolom se kreće u rasponu od 9,15-7,05 što povoljno utječe na površinu zubne cakline pa žvakaća guma sa ksilitolom može pomoći u sprječavaju nastanka karijesa.

LITERATURA

Carpenter G. 2013. The secretion, components, and properties of saliva. Annual Review of Food Science and Technology 4: 267–276.

Fejerskov O., Kidd E. 2011. Zubni karijes: bolest i klinički postupci. Anić I, urednik hrvatskog izdanja. Naklada Slap, Jastrebarsko.

Forcella L., Filippi C., 2018. Measurement of unstimulated salivary flow rate in healthy children aged 6 to 15 years. Swiss Dental Journal 128(5): 394–401.

Humphrey S. P., Williamson R. T. 2001. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. Journal of Prosthetic Dentistry 85(2): 162–169.

Jain R. L., Tandon S., Rai T. S., Mathur R., Soni K. K., Rawat M. 2022. A comparative evaluation of xylitol chewing gum and a combination of IgY + xylitol chewable tablet on salivary *Streptococcus mutans* count in children: a double-blind randomized controlled trial. International Journal of Clinical Pediatric Dentistry 15(2): S212–S220.

Jurić H., Čuković-Bagić I. 2011. Djelotvornost različitih preventivnih postupaka u kontroli kariogenih rizičnih čimbenika u djece. Paediatria Croatica 55(1): 1–6.

Par M., Vučićević-Boras V. 2009. Slina kao ogledalo sistemnog zdravlja. Sonda 19(3): 42–46.

Radić M., Benjak T., Dečković Vukres V., Rotim Ž., Filipović Zore I. 2015. Prikaz kretanja KEP indeksa u Hrvatskoj i Europi. Acta Stomatologica Croatica 49(4): 275–284.

Rotteveel L. J. C., Jongerinus P. H. 2004. Salivation in healthy schoolchildren. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 68(6): 739–744.

Skvorcov I., Vuletić L. 2021. Slinovnice i ravnoteža vode u tijelu. Sonda 21(3940): 17–21.

Šegović S., Miletić Karlović I. 2006. Dijagnostika karijesnih lezija. Hrvatski stomatološki vjesnik 13(2): 17–19.

Vučićević-Boras V., Topić B. 1999. Stimulacija sline u fiziološkim uvjetima C-vitaminom i žvakaćom gumom. Zavod za bolesti usta Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Postoji li utjecaj gorenja plastike na zdravlje našeg okoliša

Anastazija Gubina, 8. razred

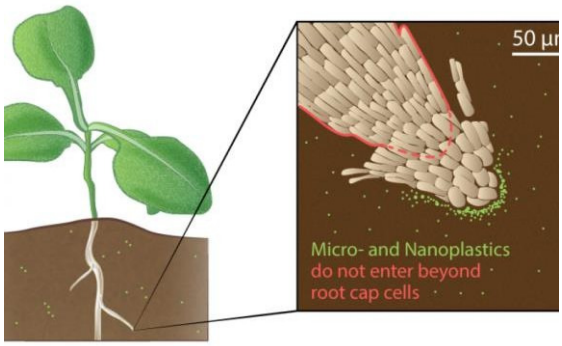
Osnovna škola Mladost, Osijek
Mentor: *Jasna Rebrina*

SAŽETAK
Cilj je ovog istraživanja bio utvrditi postoje li dugoročni utjecaji požara plastičnog otpada na zdravlje okoliša u okolici Antunovca. Utjecaj je procijenjen analizom kvalitete tla prikupljenog na različitim udaljenostima od požarišta (200 m, 2 km i 6 km), uz usporedbu s kontrolnim uzorkom humusnog tla iz školskog dvorišta. Uzorcima tla odrađena je filtracija kako bi se utvrdila pH vrijednost tla. Pšenici za rast i razvoj pogoduje neutralnije tlo. Zdravlje tla procijenjeno je primjenom bioloških pokazatelja. Aktivnost gujavica korištena je kao pokazatelj biološke aktivnosti i pogodnosti tla za život organizama. Brzina razgradnje organske tvari određena je praćenjem razgradnje listova salate, a klijavost i početni rast božićne pšenice te brzina rasta korijena korišteni su kao pokazatelji fitotoksičnosti tla. Rezultati su pokazali smanjenu biološku aktivnost tla u uzorcima bližima požarištu (200 m, 2 km), sporiju razgradnju organske tvari te nižu klijavost i slabiji rast pšenice u odnosu na udaljenije (6 km) i kontrolno humusno tlo. Rezultati ankete ukazali su na prisutnu zabrinutost stanovnika Antunovca zbog mogućeg negativnog utjecaja požara na zdravlje i kvalitetu okoliša. Dobiveni rezultati upućuju na mogući negativan utjecaj gorenja plastike na biološku kvalitetu tla i zdravlje okoliša, osobito u neposrednoj blizini požarišta. Istraživanje naglašava važnost pravilnog gospodarenja plastičnim otpadom te potrebu za daljnjim praćenjem dugoročnih posljedica takvih događaja.

Ključne riječi: *gorenje plastike; kvaliteta tla; bioindikatori; klijavost; okoliš; Antunovac*

UVOD

Nezapamćen požar plastike dogodio se prije tri godine (3. listopada 2023.), u dvorištu tvrtke *Drava International d.o.o.*, u blizini Antunovca. Gorenjem plastike oslobodila se velika količina dima i otrovnih plinova koje je nosio jak vjetar toga dana. Požar je prouzročio veliku štetu, no najveća je opasnost prijetnja zdravlju građana. Plastika je skupina sintetskih polimera koji se zbog svoje trajnosti i široke primjene sve više nakupljaju u okolišu. Zbog svoje kemijske stabilnosti plastika se razgrađuje vrlo sporo, a pod utjecajem sunčeva zračenja, temperature i mehaničkih utjecaja raspada se na sitnije čestice – mikroplastiku (manju od 5 mm) i nanoplastiku (manju od 1 µm) (slika 1).



Slika1 Prisutnost i nakupljanje mikroplastičnih čestica u tlu i na korijenu

Ove čestice, poput dioksina i furana, onečišćuju zrak te se taloženjem mogu prenijeti u tlo, mijenjati njegova fizikalna i kemijska svojstva te utjecati na organizme u tlu i rast biljaka (UNEP, 2021; European Environment Agency, 2022). Prethodnim istraživanjem (Tomić, 2024) provedenim neposredno nakon požara ispitivan je utjecaj gorenja plastike na klijavost i rast pšenice te aktivnost gujavica u tlu uzorkovanom na udaljenosti 200 m, 2 km, 6 km od gorišta. Dobiveni rezultati ukazali su na razlike u

biološkim svojstvima tla. Najsporije je iznikla pšenica posađena u tlu, koje je uzeto 200 m od gorišta te ima najmanji broj isklijanog sjemenja (Tomić, 2024.). Ovisno o udaljenosti od izvora onečišćenja (Tomić, 2024) utvrđeno je da tlo najbliže gorištu imalo negativan utjecaj na aktivnost i razmnožavanje gujavica u puno većoj mjeri nego tlo s udaljenijih područja od gorišta. Biljke su dobri bioindikatori stanja okoliša jer brzo reagiraju na promjene, kao što su gujavice dobri bioindikatori kvalitete tla te se često koriste kao bioindikatori onečićenja otrovnih tvari u tlu (ISO 11268; Poletti,1999).

Budući da se onečišćenje tla može zadržati kroz dulje vremensko razdoblje, važno je ispitati postoje li dugoročne posljedice gorenja plastike na tlo i organizme u njemu. Utjecaj nanoplastike na pšenicu sličan je utjecaju mikroplastike na tu biljnu vrstu (slika1), jer dovodi do produljenja korijena i pada omjera biomase izdanka i korijena (Campanale i sur., 2022).

U ovom istraživanju uzeti su uzorci zemlje sa 200 m, 2 km i 6 km od požarišta, a kao kontrola uzeto je humusno tlo iz školskog dvorišta. Istraživanjem se želi saznati postoje li dugoročne posljedice gorenja plastike ili se okoliš djelomično oporavio. Dodatnim istraživanjem brzine razgradnje organske tvari zelene salate u uzorcima humusnog tla 200 m, 2 km i 6 km od zgarišta praćena je biološka aktivnost tla. Anketiranjem mještana Antunovca saznala sam koliko su svjesni posljedica gorenja plastike nakon velikog požara. Cilj je istraživanja utvrditi utječe li udaljenost gorenja plastike na klijavost i rast božićne pšenice i njenog korijena te biološku aktivnost tla izraženu kroz brzinu razgradnje organske tvari i aktivnost gujavica. Pretpostavka je ovog istraživanja da će klijavost i rast božićne pšenice bit slabija u tlu bliže požarištu kao i brzina rasta korijena, a bolja u uzorcima s većih udaljenosti i humusu; očekuje se da će razgradnja listova salate biti sporija u tlu bliže požarištu, a brža u udaljenijim uzorcima i humusu; očekuje se da će aktivnost gujavica biti manja u tlu bliže požarištu, a veća u uzorcima udaljenijim od požarišta i humusu te da će mještani Antunovca dvije godine nakon gorenja plastike navoditi negativne posljedice na okoliš i zdravlje. Ovaj rad istražuje moguće posljedice onečišćenja tla povezanog s izgaranjem plastike.

METODE RADA

Istraživanje je provedeno na uzorcima tla udaljenim 200 m (broj 1, 1a), 2 km(broj 2, 2a) i 6 km (broj 3, 3a) od gorišta te u humusnom tlu (broj 4, 4a) uzetom iz školskog dvorišta, kao kontrola. U istraživanju je korištena božićna pšenica marke *Green Garden* (slika 2).

Slika 2 Božićna pšenica

U svaku teglicu stavljeno je 300 g uzorka tla s navedenih lokacija, što čini ukupno 8 teglica u kojih je zasijano 30 sjemenki božićne pšenice, 3. prosinca 2025 (slika 3).

Slika 3 Posijano sjeme pšenice

U uzorcima tla obavljena je filtracija (slika 4) te je utvrđena njihova pH vrijednost pomoću Pen type pehametra (slika 5) jer pšenica uspijeva na neutralnijim tlima. Svaki uzorak prošao je dvostruku filtraciju: kroz cjediljku krupnijih rupica te kroz filtar papir manjih rupica.

Slika 4 Filtracija

Slika 5 Pen type pH meter

Kroz četiri tjedna, odnosno dva ciklusa, pratili su se: broj izniknulih klica pšenice (brojao se svaki dan; slika 6), brzina rasta pšenice (visina mjerena svaka tri dana; slika 7), brzina rasta korijena (svaki dan mjerila se duljina). Rezultati su prikazani grafički. Praćenje se odvijalo svaki dan tijekom dva tjedna do ponavljanja cijelog postupka, sveukupno četiri tjedna. Pšenica je zalijevana svaka 2 do 3 dana s 20 mL vode.

Slika 6 Klijanje pšenice

Slika 7 Brzina rasta pšenice

Biološka razgradnja organske tvari praćena je vizualnim i opisnim opažanjima razgradnje lista zelene salate (*Lactuca sativa*). List salate približno iste mase stavljen je u 4 posude (slika 8) sa zemljom uzete iz područja udaljenog 200 m, 2 km i 6 km od požarišta te u humusno tlo (kao kontrola). Listovi salate zatrpani su u 2000 g tla na 3–4 cm dubine, u istim kontroliranim uvjetima (slika 9).

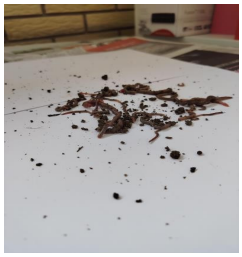
Slika 8 Listovi salate u uzorcima tla

Slika 9 Struktura tla sa uzorkovanih lokacija

Stupanj razgradnje procjenjivan je vizualno prema sljedećoj skali: 0 – bez promjena; 1 – blage promjene boje i omekšavanje; 2 – početna razgradnja, manja oštećenja; 3 – djelomična razgradnja, list gubi strukturu; 4 – izražena razgradnja; 5 – potpuno razgrađen. Tijekom dva tjedna, ciklus se ponavlja. Prilikom promatranja razgradnje, list se nije vadio iz uzorkovane zemlje, kako se ne bi poremetio proces razgradnje. Vizualna opažanja bilježena su u tablicu, a rezultati su analizirani opisno, usporedbom promjena kroz vrijeme.

Biološka aktivnost tla praćena je kroz brojnost i aktivnost gujavica (Lumbricidae) u uzorcima tla uzetih sa udaljenosti 200 m, 2 km, 6 km od požarišta te u humusu kao kontrolnom tlu. U svaku staklenu kadicu izvagano je 500 g zemlje i u njih stavljeno 6 gujavica (slika 10) koje su praćene u istim kontroliranim uvjetima (slika 11). Aktivnost i brojnost gujavica pratila se opisno svaka tri dana prema sljedećoj skali: 0 –

nema gujavica, tlo zbijeno; 1 – rijetke gujavice, malo hodnika; 2 – umjerena aktivnost; 3 – puno gujavica, puno hodnika. Rezultati su prikazani tablično i analizirani opisno tijekom dvaju ciklusa vizualnog opažanja.



Slika 10 Gujavice iz školskog komposta

Slika 11 Gujavice u uzorcima tla

Da bi se dobio cjelovitiji uvid o mogućim dugoročnim posljedicama ovog ekološkog problema, provedena je anonimna anketa mještana Antunovca (n = 30 ispitanika) o posljedicama gorenja plastike nakon požara (prilog 1). Ciljano su anketirani stanovnici Antunovca starije životne dobi s duljim životnim iskustvom. Dobiveni odgovori obrađeni su grafički dijagramom i analizirani opisno.

REZULTATI

Odrađena je pH-vrijednost tla (slika 5) 200 m, 2 km, 6 km od gorišta te humusnog tla. Tlo 200 m od gorišta (pšenica 1 i 1a) imala je pH-vrijednost 6,5 (kiselo), tlo 2 km od gorišta 6,5 (kiselo, pšenica 2 i 2a), 6 km od gorišta (3 i 3a) imala je pH 6,9 (kiselo) te humusno tlo 7,1 (neutralno, pšenica 4 i 4a).

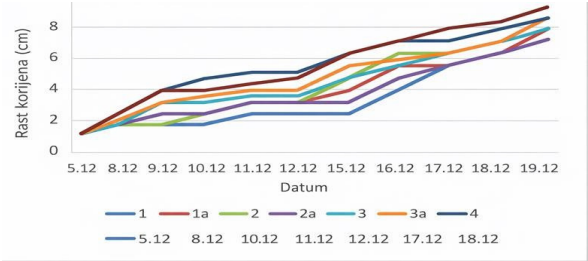
Tablica 1 Vizualna procjena razgradnje lista zelene salate i aktivnosti gujavica nakon 4 tjedna (2 ciklusa)

Datum:	Uzorak tla	Stupanj razgradnje lista*	Opis stanja lista	Aktivnost gujavica	Opažanja tla
6.12	Kontrola - humusno tlo (školsko dvorište)	2	List gotovo potpuno razgrađen, vidljivi samo manji ostaci	3	Tlo rahlo, mnogo hodnika, prisutno više gujavica
9.12.		2		3	
12.12.		3		3	
15.12		4		2	
18.12		5		0	
12.1.		1		3	
15.1.		3		3	
19.1.		4		2	
22.1.		4		2	
26.1.		5		0	
6.12.	6 km od požarišta	1	List znatno razgrađen,mek i djelomično raspadnut	3	Umjeren broj hodnika, tlo relativno rahlo, prisutne gujavice
9.12.		2		2	
12.12		3		2	
15.12.		4		2	
18.12.		5		1	
12.1.		2		0	
15.1.		3		3	
19.1.		4		3	
22.1.		4		2	
26.1.		5		0	
6.12.	2 km od požariša	1	List djelomično razgrađen, list gubi strukturu	2	Malo hodnika, manji broj gujavica, tlo djelomično zbijeno
9.12.		1		2	
12.12		2		1	
15.12.		3		0	
18.12.		4		0	
12.1.		1		2	
15.1.		2		2	
19.1.		3		2	
22.1.		3		1	
26.1.		3		0	
6.12.	200 m od požarišta	1	Početna razgradnja, manja oštećenja	2	Tlo zbijeno, bez ili vrlo malo hodnika, gujavice rijetke ili odsutne
9.12.		1		2	
12.12		2		1	
15.12.		3		0	
18.12		3		0	
12.1.		1		2	
15.1.		2		1	
19.1.		2		0	
22.1.		3		0	
26.1.		3		0	

U (tablici 1) prikazani rezultati dobiveni su vizualnom procjenom aktivnosti gujavica (skala od 0–3) u uzorcima tla prikupljenim sa 200 m, 2 km, 6 km od zgarišta te iz humusa radi usporedbe. Iz tablice je vidljivo da je u humusnom tlu aktivnost gujavica najveća (skala 3) što je povezano s većim brojem hodnika, prisutno više preživjelih gujavica, tlo je rahlo. Slični rezultati dobiveni su u tlu udaljenom 6 km od zgarišta (skala 2), umjeren broj hodnika ukazuju na prisutnost gujavica i rahlo tlo. Manji broj gujavica povezan je s malo hodnika što čini tlo djelomično zbijenim na udaljenosti 2 km od zgarišta (skala 1). Očekivani rezultati ukazuju da je na najbližoj udaljenosti od zgarišta (200 m) tlo zbijeno s vrlo malo hodnika (skala 0) jer gujavice brzo ugibaju.

U (tablici 1) prikazana je i vizualna procjena razgradnje lista zelene salate prema (na skali od 1–5) tijekom četiri tjedna, kroz dva ciklusa. Najsporije se razgradio list salete u uzorku tla sa 200 m udaljenosti od zgarišta (skala procjene 1) s blagim promjenama boje i omekšavanjem strukture lista. U uzorku tla s 2 km udaljenosti od zgarišta list pokazuje gubitak strukture i djelomičnu razgradnju (skala 2). Razgradnja lista u uzorku tla s udaljenosti 6 km od požarišta pokazuje da je proces razgradnje vidljiviji i brži (skala 4), odnosno da je struktura lista gotovo raspadnuta. U humusnom tlu list se potpuno razgradio u oba ciklusa što je vidljivo po bržem mekšanju strukture, bržoj promjeni boje lista (skala 5). Rezultati ukazuju na povećanje brzine razgradnje s povećanjem udaljenosti od mjesta požara što omogućuje veću aktivnost razlagača i bržu razgradnju biljnog materijala, što potvrđuje povezanost između faune tla i procesa razgradnje.

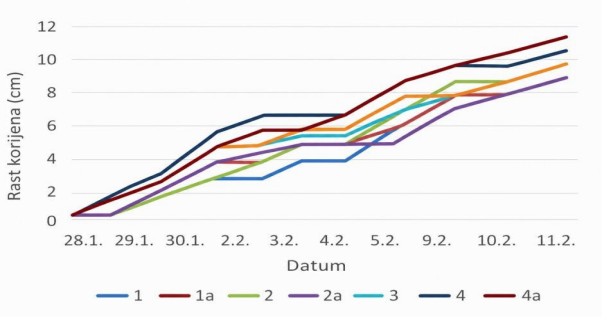
Tijekom prvog ciklusa od 5.12. do 19.12. (slika 12) vidljiva je razlika u brzini rasta korijena kroz duljinu rasta.



Slika 12 Brzina rasta korijena u ciklusu 1

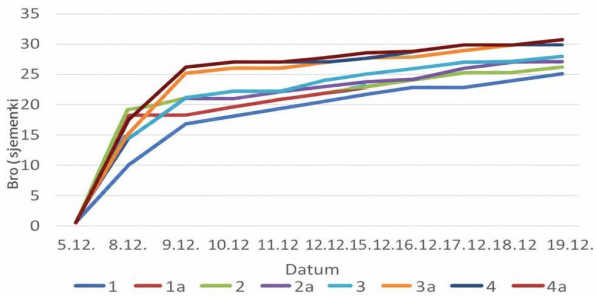
Najveću duljinu korijena ima pšenica u uzorku tla 4a (humus) 11 cm, visok rast korijena zabilježen je u uzorku 2 i 4 (10 cm), umjeren rast korijena u tlu 1a i 3 (9 cm), a najslabiji rast korijena u uzorku 1 (8 cm), što upućuje na moguću povezanost s blizinom gorišta plastike.

U drugom je ciklusu od 28.1. do 11.2. (slika 13) stabilan i najbrži rast korijena zabilježen u uzorku tla 4a (približno 11 cm), visok rast zabilježen je u uzorku 4 (10 cm), umjeren rast u uzorku tla 3a (9 cm). Sporiji rast korijena je uzorku tla 2 (oko 8 cm) a najsporiji je 1a (7 cm), što možemo povezati s blizinom požara plastike kao i u prvom ciklusu.



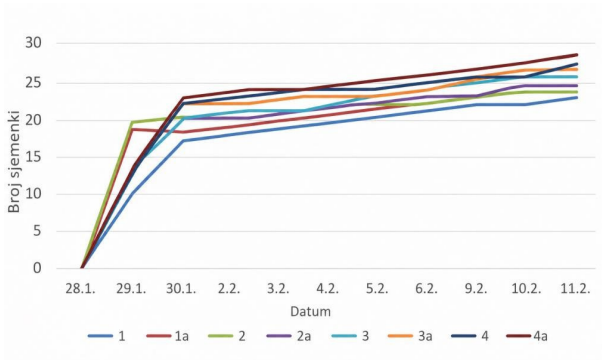
Slika 13 Brzina rasta korijena u ciklusu 2

U prvom ciklusu (slika 14) od 5.12. do 19.12. u uzorcima tla (1, 1a, 2, 2a, 3, 3a, 4, 4a) najveći broj isklijalih sjemenki zabilježen je u uzorku tla 4a (30/30) te u 3a (28/30), što upućuje na uspješniju klijavost na većoj udaljenosti od požarišta. Najmanji broj isklijalih sjemenki zabilježen je u uzorku tla 1, 1a, 2 (18, 19, 20/30). Razlika u broju klica između uzorkovanih tla u oba ciklusa ukazuje na vidljiv utjecaj blizine gorišta plastike.



Slika 14 Broj izniknulih pšenica u ciklusu 1

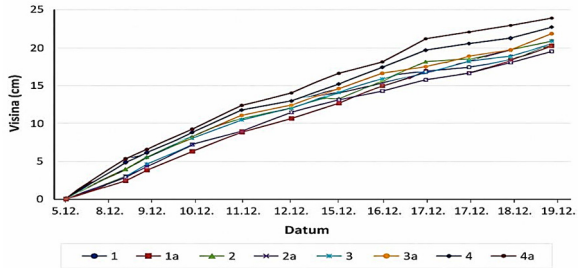
U drugom ciklusu (slika 15) rezultati pokazuju promjenu broja izniknulih pšenica (klijanje) u razdoblju od 28.1. do 11.2.



Slika 15 Broj izniknulih pšenica u ciklusu 2

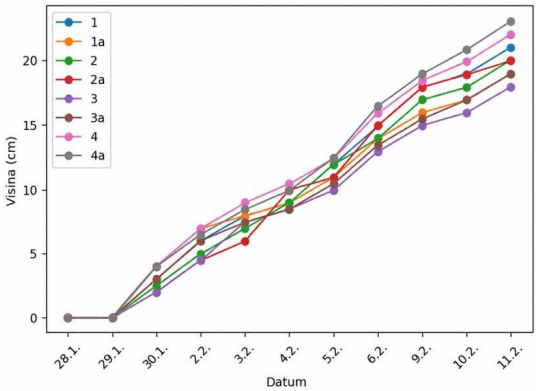
U uzorcima tla (1, 1a, 2, 2a, 3, 3a, 4, 4a) nagli porast broja klijanja sjemenja javlja se 30. 1. kada kod većine uzorka doseže (oko 10–20) klica. Najbolji početni rezultat pokazuje uzorak tla 2 (oko 20/30 klica) sa udaljenosti 2 km od zgarišta, dok uzorak 1 (200 m od zgarišta) ima nešto sporiji početak klijanja. Uzorak tla 4a (humus) ima najveći broj izniknulih klica (30/30), zatim 4 i 3a (28–29/30) dok uzorci 2, 2a, 3 imaju srednje vrijednosti (oko 25–27/30) klica. Najmanji broj izniknulih klica ima tlo 1 (s udaljenosti 200 m od zgarišta), oko 24/30 klica. Razlika u broju klica (oko 5–6) između uzorkovanih tla ukazuje na vidljiv utjecaj blizine gorišta plastike.

Brzina rasta pšenice u prvome ciklusu (slika 16) pokazuje da je najveću visinu, odnosno brzinu rasta, imala pšenica u uzorku tla 4a i 4 (oko 25 i 24 cm), dok je u tlu 3 i 3a zabilježena visina oko 23 i 22 cm. Nešto sporiji rast pokazuje 1 a i 2 (oko 18 i 19 cm), a najsporiji i najniži rast pokazuje tlo 2a i 1 (oko 15 i 15 cm).



Slika 16 Brzina rasta pšenice u ciklusu 1

Rezultati pokazuju postupnu promjenu visine (brzine rasta) pšenice (slika 17) u razdoblju od 28.1. do 11.2. za sve uzorke tla (1, 1a, 2, 2a, 3, 3a, 4, 4a). Najveću briznu rasta i najveću visinu postiže tlo 4 (humus), oko 23 cm, uzorci tla 4 i 2a, oko 20–21 cm, dok uzorci tla 1, 1a, 2 i 3a dosežu visinu oko 19–20 cm. Najmanju visinu, odnosno brzinu rasta, pokazuje uzorak tla 3 (oko 18 cm). Razlike u brzini rasta pokazuju da tlo udaljenije od požarišta doseže veću visinu i brži rast. Najbolju brzinu rasta u oba ciklusa pokazalo je humusno tlo.

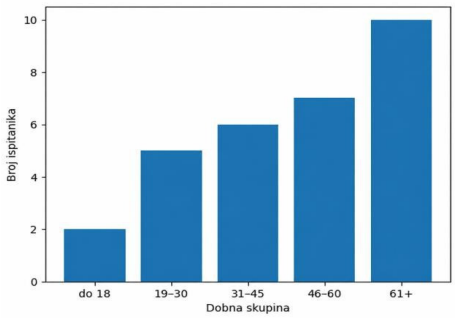


Slika 17 Brzina rasta pšenice u ciklusu 2

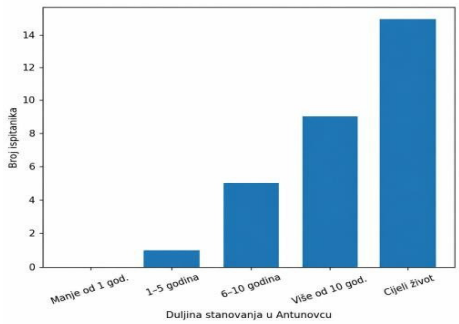
Rezultati ankete

Rezultati provedene ankete (prilog 1) pokazuju potrebu mještana za dodatnim praćenjem zdravstvenog stanja i informiranjem stanovništva o mogućim zdravstvenim posljedicama izloženosti dimu i zagađenju nakon požara (slike 18 – 31).

Ciljano su anketirani mještani Antunovca s dužim životnim iskustvom. Broj ispitanika do 18 godina je 2, od 19–30 je 5, od 31–45 je 6, od 46–50 je 7 i od 61+ 10 (slika 18). Najveći broj ispitanika živi dugi niz godina u Antunovcu, cijeli život 15 ispitanika, više od 10 godina 9 ispitanika, 6-10 godina 5 ispitanika, od 1–5 godina 1 ispitanik (slika 19).



Slika 18 Dob ispitanika u Antunovcu



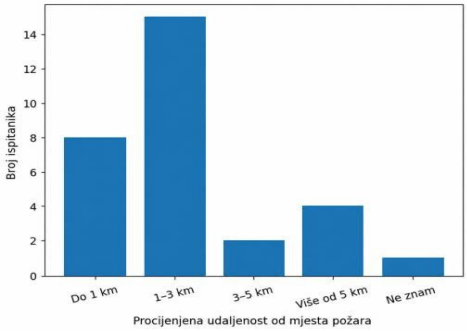
Slika 19 Duljina stanovanja ispitanika u Antunovcu

Najveći broj ispitanika, 15, procjenjuje da živi na udaljenosti od 1–3 km od požarišta. Njih 8 ispitanika bilo je unutar 1 km, a najmanji broj ispitanika procjenjuje da živi na 3–5 km od požarišta. Na udaljenosti više od 5 km procjenjuje da živi 4 ispitanika, a jedan ispitanik nije znao procijeniti udaljenost od mjesta požara (slika 20). Najveći broj ispitanika, ukupno 25, osjetilo je jako i vrlo jako dim tijekom požara, manji broj osjetio je malo ili srednje, ukupno 5. Svi stanovnici osjetili su dim prilikom izgaranja plastike (slika 21).

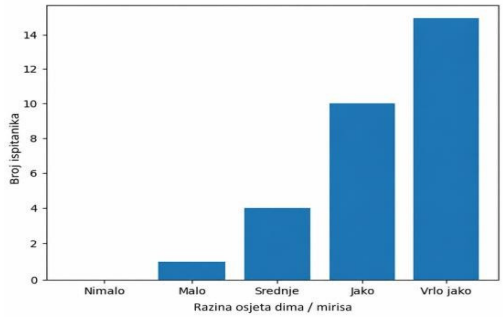
Najveći broj ispitanika, 27, odgovorilo je da se kvaliteta zraka pogoršala nakon požara, nitko nije odgovorio da nije, djelomično 2 ispitanika i 1 ispitanik odgovara da ne zna. Rezultati upućuju da većina

stanovnika uočava promjene u kvaliteti zraka (slika 22).

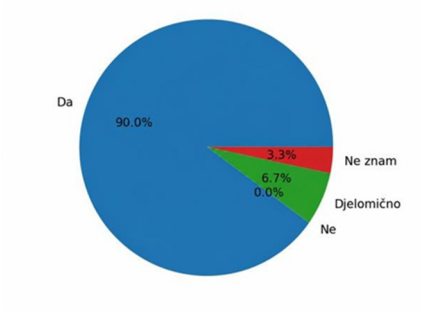
Na pitanje osjećaju li povremeno neugodan miris zraka, veći broj ispitanika, ukupno 13, odgovorilo je potvrdno (često), 10 povremeno, 5 ne, a 2 ispitanika odgovorilo je „ne znam“ (slika 23).



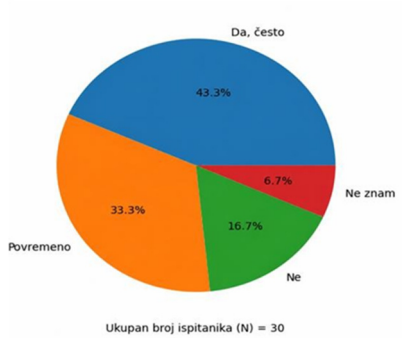
Slika 20 Procjena udaljenosti stanovanja ispitanika od požarišta



Slika 21 Odgovori ispitanika na anketno pitanje: Koliko ste osjetili dim?



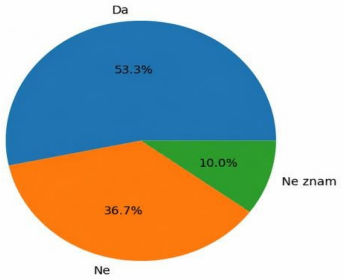
Slika 22 Odgovori ispitanika na anketno pitanje: Smatrate li da se kvaliteta zraka u Antunovcu pogoršala?



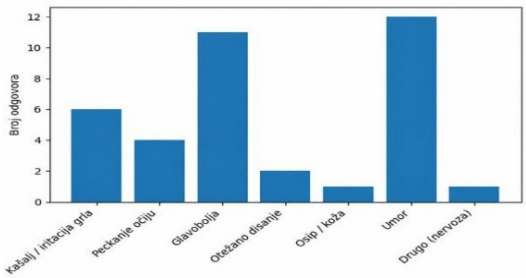
Slika 23 Odgovori ispitanika na anketno pitanje: Osjećate li danas povremeno neugodan miris zraka?

Više od polovice ispitanika (53,3 %) navodi da su nakon požara primijetili zdravstvene tegobe kod sebe ili ukućana (slika 24). To upućuje na značajan mogući utjecaj požara na zdravlje stanovništva. S druge strane, 36,7 % ispitanika nije primijetilo nikakve tegobe, dok 10,0 % nije sigurno, što može ukazivati na blaže ili nespecifične simptome koje je teško povezati s događajem. Rezultati sugeriraju potrebu za dodatnim praćenjem zdravstvenog stanja i informiranjem stanovništva o mogućim zdravstvenim posljedicama izloženosti dimu i zagađenju nakon požara.

Prema rezultatima ankete, ispitanici su najčešće navodili umor (12 odgovora) i glavobolju (11 odgovora) kao prisutne tegobe. U nešto manjoj mjeri pojavljuju se kašalj ili iritacija grla (6 ispitanika) te peckanje očiju (4 ispitanika). Rjeđe su zabilježeni otežano disanje (2 ispitanika) i kožne promjene ili osip (1 ispitanik. Jedan ispitanik naveo je i dodatni simptom – nervozu (slika 26). Rezultati pokazuju da među ispitanicima prevladavaju opći simptomi poput umora i glavobolje, dok su specifičnije respiratorne i kožne tegobe znatno rjeđe prisutne.

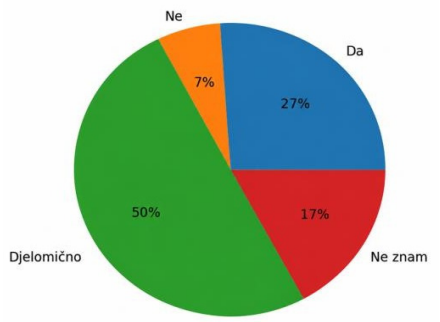


Slika 24 Odgovori ispitanika na anketno pitanje: Jeste li nakon požara primijetili zdravstvene tegobe kod sebe ili ukućana?



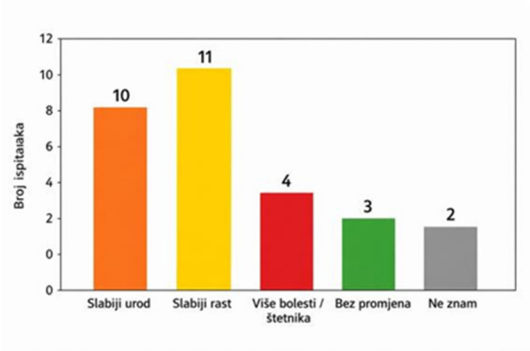
Slika 25 Zdravstvene tegobe prema iskazima ispitanika

Rezultati pokazuju da polovica ispitanika (50 %) smatra da su njihove zdravstvene tegobe djelomično povezane s požarom plastike (slika 26). 27 % ispitanika vjeruje da postoji izravna povezanost između požara i pojave tegoba. S druge strane, manji dio ispitanika nije siguran u postojanje povezanosti (17 %,) dok samo 7 % smatra da tegobe nisu povezane s požarom (slika 26). Ovi rezultati ukazuju na to da većina ispitanika u određenoj mjeri povezuje pojavu zdravstvenih problema s događajem požara, iako kod dijela njih postoji nesigurnost ili nedostatak jasnog stava o uzročno-posljedičnoj vezi.

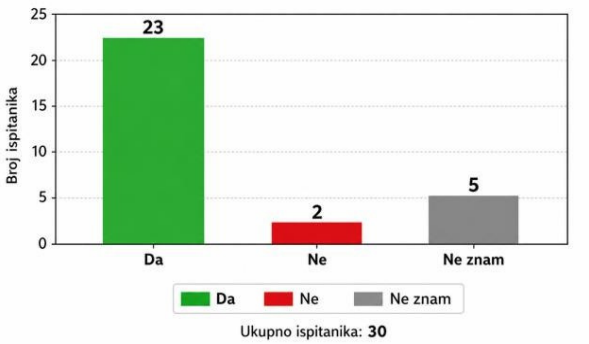


Slika 26 Tegobe ispitatnika povezane s požarom

Svi ispitanici (100 %) izjavili su da imaju vrt ili se bave poljoprivredom, što pokazuje da uzorak čine osobe koje su u potpunosti povezane s uzgojem biljaka i potencijalno izložene utjecaju okolišnih čimbenika. Na pitanje jesu li primijetili promjene u rastu/urodu nakon požara, većina ispitanika primijetila je negativne posljedice požara na rast i urod (slika 27). Najveći broj ispitanika (11) naveo je slabiji rast, dok je vrlo sličan broj (10) istaknuo slabiji urod. Ovi podaci upućuju na to da požar ima značajan utjecaj na vegetativni razvoj biljaka, što se posljedično odražava i na količinu prinosa. Manji broj ispitanika (4) primijetio je povećanu pojavu bolesti i štetnika, što može ukazivati na narušenu ravnotežu ekosustava i oslabljenu otpornost biljaka nakon požara. Samo 3 ispitanika navela su da nije bilo promjena, dok su 2 ispitanika odgovorila „ne znam“ (slika 27), što pokazuje da je vrlo mali udio ispitanika bez jasne percepcije negativnih posljedica. Rezultati jasno ukazuju da većina ispitanika percipira požar kao čimbenik koji negativno utječe na poljoprivrednu proizvodnju, prvenstveno kroz smanjenje rasta i uroda, a u manjoj mjeri kroz povećanu pojavnost bolesti i štetnika.



Slika 27 Promjene u rastu / urodu nakon požara prema iskazima ispitanika

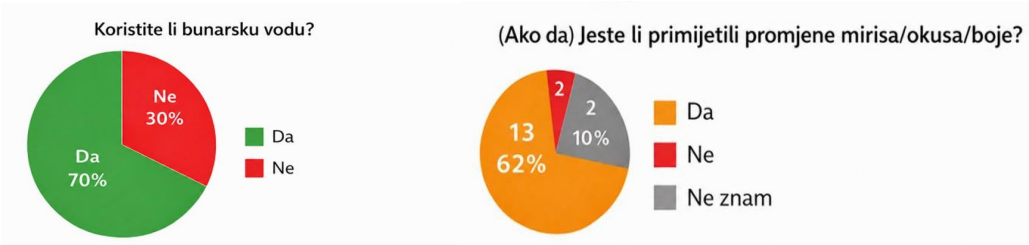


Slika 28 Odgovori ispitanika na anketno pitanje: Smatrate li da je tlo u okolici potencijalno onečišćeno?

Na pitanje smatraju li da je tlo u okolici potencijalno onečišćeno, rezultati ankete pokazuju da velika većina ispitanika smatra kako je tlo u okolici potencijalno onečišćeno (slika 28). Čak 23 od ukupno 30 ispitanika odgovorilo je „da“, što upućuje na izraženu zabrinutost vezanu uz stanje tla nakon požara.

Samo 2 ispitanika smatraju da tlo nije onečišćeno, dok je 5 ispitanika odgovorilo „ne znam“, što ukazuje na manji stupanj nesigurnosti ili nedostatka informacija. Rezultati sugeriraju prevladavajuću percepciju potencijalne ekološke ugroženosti tla među ispitanicima.

Rezultati ankete nadalje ukazuju da značajan dio korisnika bunarske vode primjećuje promjene u njezinim svojstvima što može upućivati na potencijalne probleme s kvalitetom vode i potrebu za dodatnim ispitivanjima. Rezultati pokazuju da većina ispitanika (21 od ukupno 30 ispitanika; 70 %) koristi bunarsku vodu, dok 9 ispitanika (30 %) ne koristi (slika 29).

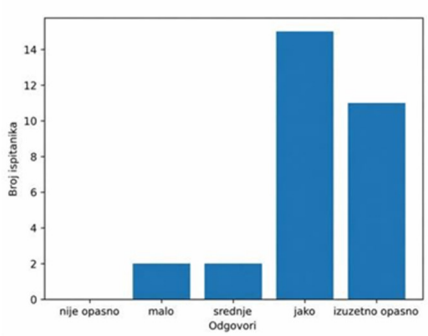


Slika 29 Usporedba korištenja bunarske vode s promjenama mirisa/ okusa/ boje prema iskazima ispitanika

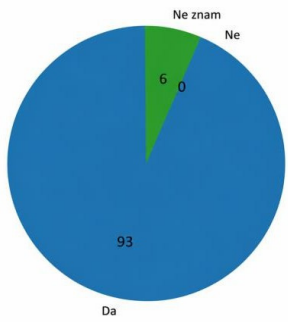
Od onih koji koriste bunarsku vodu (n = 21), njih 13 (62 %) primijetilo je promjene u mirisu, okusu ili boji vode, što upućuje na moguću promjenu kvalitete vode. Samo 2 ispitanika (10 %) nisu primijetila promjene, a 6 je ispitanika (28 %) nesigurno (slika 29).

Rezultati pokazuju da ispitanici u velikoj većini smatraju izgaranje plastike opasnim za zdravlje (slika 30). Najveći broj odgovora nalazi se u kategorijama „jako opasno” (15 ispitanika) i „izuzetno opasno” (11 ispitanika), dok je manji broj ispitanika procijenio opasnost kao srednju (2) ili malu (2). Nitko od ispitanika ne smatra da izgaranje plastike nije opasno (slika 30). Dobiveni rezultati ukazuju na visoku razinu svijesti ispitanika o potencijalnim zdravstvenim rizicima povezanima s izgaranjem plastike.

Većina ispitanika (27 od 29, odnosno 93 %) smatra da su institucije trebale provesti više mjerenja zraka, tla i vode. Nitko ne smatra da dodatna mjerenja nisu potrebna, a 2 ispitanika (7 %) nisu sigurna (slika 31). Rezultati jasno pokazuju visok stupanj zabrinutosti među ispitanicima glede praćenja okolišnih parametara nakon požara.



Slika 30 Odgovori ispitanika na anketno pitanje: Koliko je po vašem mišljenju izgaranje plastike opasno za zdravlje?



Slika 31 Odgovori ispitanika na anketno pitanje: Smatrate li da su institucije trebale provesti više mjerenja zraka/tla/vode?

RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da se brzina razgradnje lista zelene salate i aktivnost gujavica povećavaju s udaljenošću od lokacije požarišta plastike. Najveći stupanj razgradnje i najveća aktivnost gujavica zabilježeni su u kontrolnom humusnom tlu, a najmanje vrijednosti uočene su u uzorku tla

udaljenom 200 m od požarišta. To upućuje na smanjenu biološku aktivnost tla u blizini izvora mogućeg onečišćenja. Razgradnja organske tvari u tlu ovisi o aktivnosti mikroorganizama i faune tla, osobito gujavica koje imaju važnu ulogu u usitnjavanju biljnog materijala, miješanju tla i poticanju mikrobne aktivnosti (Edwards i Bohlen, 1996). Gujavice se smatraju ključnim organizmima u procesima kruženja tvari i stvaranja humusa (Lavelle i sur., 2006; Hrvatska enciklopedija, 2026). U ovom istraživanju uočena je povezanost između veće aktivnosti gujavica i brže razgradnje lista, što je u skladu s navedenim spoznajama. Smanjena brojnost i aktivnost gujavica u uzorcima bliže požarištu može upućivati na negativan utjecaj štetnih tvari nastalih izgaranjem plastike, poput teških metala, policikličkih aromatskih ugljikovodika i dioksina, koji mogu smanjiti biološku aktivnost tla i usporiti procese razgradnje. Slične rezultate navode i hrvatski autori koji ističu da onečišćenje tla dovodi do smanjenja aktivnosti organizama tla i usporavanja razgradnje organske tvari (Škorić, 1986; Husnjak, 2014). Prema Husnjaku (2014), biološka aktivnost tla jedan je od najosjetljivijih pokazatelja promjena u kvaliteti tla uzrokovanih utjecajima čovjeka, poput požara.

Dobiveni rezultati upućuju na mogući negativan utjecaj požara plastike na biološku kvalitetu tla u neposrednoj blizini lokacije, što se očituje smanjenom aktivnošću gujavica i sporijom razgradnjom organske tvari, lista salate. Istraživanjem Qi i sur. (2018) dobiveni su slični rezultati u kojima se navodi kako će dodavanje Bio-makroplastike i Bio-mikroplastike znatno utjecati na visinu, klijavost i rast pšenice. Iako su opažanja provedena vizualnom metodom, pokazuju povezanost između udaljenosti od izvora onečišćenja i biološke aktivnosti tla.

Cilj je ovog istraživanja bio utvrditi postoji li utjecaj požara u blizini naselja Antunovac, povezanog s tvrtkom *Drava International*, na biološka svojstva tla i rast biljaka. Kao bioindikatori korišteni su brzina rasta korijena, klijanje i rast božićne pšenice, razgradnja organske tvari (list zelene salate) te aktivnost gujavica. Percepcija stanovništva analizirana je anketnim upitnikom. Dobiveni rezultati pokazali su određene razlike između uzoraka tla ovisno o udaljenosti od mjesta požara. Klijavost i brzina rasta pšenice bili su pokazatelji osjetljivosti biljaka na moguće promjene u kemijskom sastavu tla. U uzorcima tla bližima mjestu požara (200 m ,2 km) uočene su slabije vrijednosti pojedinih parametara u odnosu na kontrolni uzorak humusnog tla, što se poklapa sa istraživanjima na istim lokacijama (Tomić, 2024). To može upućivati na prisutnost nepovoljnih čimbenika poput onečišćujućih tvari, promjena pH vrijednosti ili smanjene dostupnosti hranjivih tvari. Biljke su poznati bioindikatori jer brzo reagiraju na promjene u okolišu, pa dobiveni rezultati imaju značaj u procjeni kvalitete tla. Rezultati ankete pokazali su da stanovnici Antunovca u određenoj mjeri primjećuju ili pretpostavljaju dugoročne posljedice požara na okoliš i zdravlje. Takva percepcija može biti povezana s vidljivim promjenama u okolišu, medijskim informacijama ili osobnim iskustvima, ali također naglašava važnost informiranja javnosti i provođenja dodatnih znanstvenih istraživanja.

Važno je istaknuti i ograničenja istraživanja. Uzorci tla prikupljeni su s ograničenog broja lokacija i tijekom relativno kratkog vremenskog razdoblja što može utjecati na opću primjenjivost rezultata. Također, nisu provedene kemijske analize tla koje bi mogle preciznije potvrditi prisutnost onečišćujućih tvari. Unatoč tome, biološki pokazatelji korišteni u ovom istraživanju pružaju vrijedne informacije o stanju tla jer odražavaju stvarne uvjete za život organizama.

Za potpunije razumijevanje utjecaja požara na okoliš bilo bi korisno provesti dugoročnija istraživanja koja bi uključivala veći broj uzoraka kemijske analize tla i praćenje tijekom različitih godišnjih doba. Time bi se mogla dobiti jasnija slika o stvarnom opsegu utjecaja na ekosustav i potencijalnim rizicima za zdravlje

ljudi.

ZAKLJUČCI

Dobiveni rezultati poklapaju se s pretpostavkama na početku istraživanja.

Požar plastičnog otpada negativno je utjecao na kvalitetu tla u blizini požarišta, a učinak se smanjuje s povećanjem udaljenosti.

Na temelju istraživanja može se zaključiti:

- aktivnost gujavica je manja u tlu bliže požarištu, a veća u uzorcima udaljenijima od požarišta i u humusu;
- razgradnja listova salate sporija je u tlu bliže požarištu, a brža u udaljenijim uzorcima i kontrolnom tlu;
- brzina rasta korijena, klijavost i rast božićne pšenice je slabija u tlu bliže požarištu, a bolji u uzorcima s većih udaljenosti i u humusu;
- stanovnici Antunovca primijetili su negativne promjene u okolišu nakon požara (zabrinutost za tlo, biljke i zdravlje).

LITERATURA

Campanale C., Galafassi S., Savino I., Massarelli C., Ancona V., Volta P., Uricchio V. F. 2022. Microplastics pollution in the terrestrial environments: Poorly known diffuse sources and implications for plants. Science of the Total Environment 805: 150431.

Edwards C. A., Bohlen P. J. 1996. Biology and ecology of earthworms. Chapman & Hall, London.

Hrvatska enciklopedija. 2026. Humus. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, https://www.enciklopedija.hr/clanak/humus, pristupljeno 14.1.2026.

Husnjak S. 2018. Utjecaj onečišćenja tla na klijavost pšenice. Poljoprivreda 24(2): 45–52.

ISO 11268. Earthworm tests for soil quality. ISO, https://www.iso.org/standard/53528.html, pristupljeno 2.1.2026.

Lavelle P., Decaëns T., Aubert M., Barot S., Blouin M., Bureau F., Margerie P., Mora P., Rossi J.-P. 2006. Soil invertebrates and ecosystem services. European Journal of Soil Biology 42(1): S3-S15.

Paoletti M. G. 1999. The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. Agriculture, Ecosystems & Environment 74(1–3): 137–155.

Škorić A. 1986. Priručnik za pedološka istraživanja. Fakultet poljoprivrednih znanosti Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Špoljar, A., & Husnjak, S. (2023). Degradacija tla u svijetu i Hrvatskoj. *Hrčak – znanstveni časopis,* pristupljeno 14.1.2026.

Tomić, E. (2025). Utjecaj gorenja plastike na klijavost i rast pšenice te aktivnost gujavica u tlu. *Bioznalac*, 11, str. 1–10. pristupljeno 30.1.2025.

Verma, R., Vinoda, K. S., Papireddy, M., & Gowda, A. N. S. (2016). Toxic pollutants from plastic waste – A review. *Procedia Environmental Sciences*, 35, 701–708. pristupljeno 3.2.2026.

World Health Organization (2024). Air quality and health. Dostupno na: https://www.who.int. pristupljeno 5.12.2025.

Izvori fotografija:

Slika1. Prisutnost i nakupljanje mikroplastičnih čestica u tlu i na korijenu biljaka(izvor:znanstvena ilustracija i mikroskopski prikaz)

Slika 2.Božična pšenica(izvor:autor ovog rada)

Slika3.Posijano sjeme pšenice(izvor:autor ovog rada)

Slika4.Filtriranje(izvor:autor ovog rada)

Slika5 Pen type pH meter(izvor:autor ovog rada) Slika 6.Klijanje pšenice(izvor:autor ovog rada)

Slika 7.Brzina rasta pšenice (izvor:autor ovog rada) Slika8.Listovi salate u uzorcima tla (izvor:autor ovog rada))

Slika 9.Struktura tla sa uzokovanih lokacija (izvor:autor ovog rada) Slika10. Gujavice iz školskog komposta (izvor:autor ovog rada) Slika11.Gujavice u uzorcima tla(izvor:autor ovog rada) Slika12.Brzina rasta korijena u ciklusu 1(izvor:autor ovog rada) Slika13. Brzina rasta korijena u ciklusu2 (izvor:autor ovog rada)

Slika 14. Broj izniknulih pšenica u ciklusu 1 (izvor :autor ovog rada) Slika 15.Broj izniknulih pšenica u ciklusu 2(izvor:autor ovog rada) Slika16.Brzina rasta pšenice u ciklusu 1(izvor:autor ovog rada)

Slika 17.Brzina rasta pšenice u ciklusu 2(izvor:autor ovog rada)

PRILOZI

Prilog 1 Anketa za mještane Antunovca

Anketa za mještane Antunovca
Tema: Posljedice požara plastike (Drava International)
Napomena: Anketa je anonimna i služi u svrhu istraživanja.

A) Osnovni podaci

1. Dob:
   ☐ do 18 ☐ 19–30 ☐ 31–45 ☐ 46–60 ☐ 61+
2. Koliko dugo živite u Antunovcu?
   ☐ <1 god ☐ 1–5 god ☐ 6–10 god ☐ >10 god ☐ cijeli život
3. Udaljenost od mjesta požara (procjena):
   ☐ do 1 km ☐ 1–3 km ☐ 3–5 km ☐ >5 km ☐ ne znam

B) Zrak i opći dojam

4. Koliko ste osjetili dim/miris tijekom požara?
   ☐ nimalo ☐ malo ☐ srednje ☐ jako ☐ vrlo jako
5. Smatrate li da se kvaliteta zraka u Antunovcu pogoršala nakon požara?
   ☐ Da ☐ Ne ☐ Djelomično ☐ Ne znam
6. Osjećate li i danas povremeno neugodan miris/zrak?
   ☐ Da, često ☐ Povremeno ☐ Ne ☐ Ne znam

C) Zdravlje (samoprocjena)

7. Jeste li nakon požara primijetili zdravstvene tegobe kod sebe ili ukućana?
   ☐ Da ☐ Ne ☐ Ne znam
8. Ako da, koje? (može više odgovora)
   ☐ kašalj/iritacija grla ☐ peckanje očiju ☐ glavobolja
   ☐ otežano disanje ☐ osip/koža ☐ umor ☐ drugo: _____
9. Smatrate li da su te tegobe povezane s požarom plastike?
   ☐ Da ☐ Ne ☐ Djelomično ☐ Ne znam

D) Tlo, voda i poljoprivreda

10. Imate li vrt/poljoprivredu?
    ☐ Da ☐ Ne
11. Ako da: jeste li primijetili promjene u rastu/urodu nakon požara?
    ☐ slabiji urod ☐ slabiji rast ☐ više bolesti/štetnika ☐ bez promjena ☐ ne znam
12. Smatrate li da je tlo u okolici potencijalno onečišćeno?
    ☐ Da ☐ Ne ☐ Ne znam
13. Koristite li bunarsku vodu?
    ☐ Da ☐ Ne
    (Ako da) Jeste li primijetili promjene mirisa/okusa/boje?
    ☐ Da ☐ Ne ☐ Ne znam

E) Svijest i informiranost

14. Koliko je po vašem mišljenju izgaranje plastike opasno za zdravlje?
    ☐ nije opasno ☐ malo ☐ srednje ☐ jako ☐ izuzetno opasno
15. Smatrate li da su institucije trebale provesti više mjerenja zraka/tla/vode?
    ☐ Da ☐ Ne ☐ Ne znam

Zalogaj koji se pamti

Nika Janković, 8. razred
Greta Voldin, 8. razred

Osnovna škola Svete Ane u Osijeku, Osijek
Mentor: *Ana Pilipović Klobučarić*

SAŽETAK
Pravilna i uravnotežena prehrana podrazumijeva zadovoljavanje potreba našeg organizma za energijom i hranjivim tvarima koje su nužne za rast, održavanje fizioloških funkcija organizma i očuvanje zdravlja. Različite vrste namirnica mogu imati drugačiji učinak na kognitivne sposobnosti ljudi. Pamćenje se definira kao sposobnost usvajanja, korištenja i zadržavanja podataka. Tri vrste pamćenja su: senzorno, kratkoročno i dugoročno pamćenje. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utječu li različite namirnice (jabuka, čokolada, čips i žvakaća guma) na kratkoročno pamćenje učenika šestog, sedmog i osmog razreda te koje vrste namirnica imaju najučinkovitiji utjecaj na pamćenje. Istraživanje je provedeno tijekom četiri školska sata kroz četiri ciklusa testiranja. Ukupno je sudjelovalo 58 učenika. Svako je testiranje uključivalo tri tipa zadataka. Prvi zadatak je zapamtiti pravilan redoslijed rečenica u nizu, drugi zadatak je zapamtiti redoslijed zvukova u zvučnom zapisu, dok je treći zadatak uključivao pamćenje niza brojeva. Zadatke su ispitanici (učenici) rješavali prije konzumiranja namirnica (kontrola) i nakon konzumacije namirnica. Dobiveni rezultati su pokazali da vrsta namirnice nije statistički značajno utjecala na pamćenje redoslijeda rečenica. Kod pamćenja zvukova utvrđena je statistički značajna razlika na razini ukupne analize, no post hoc analize nisu pokazale statistički značajne razlike između pojedinih namirnica. Kod pamćenja brojeva dobivene su statistički značajne razlike između ispitanika, pri čemu su značajne razlike uočene između čokolade i jabuke, čokolade i čipsa te čokolade i žvakaće gume. Najbolja uspješnost uočena je u zadatku pamćenja brojeva, dok su razlike u prva dva zadatka bile male ili nejasne. Budući da je istraživanje provedeno u školskim uvjetima i na relativno malom uzorku, moguće je da su na rezultate utjecali i čimbenici poput umora i koncentracije.

Ključne riječi: *kratkoročno pamćenje; prehrana; koncentracija*

UVOD

Pamćenje se definira kao sposobnost usvajanja, korištenja i zadržavanja podataka. Također, pamćenje se može definirati i kao mogućnost pronalaženja pohranjenih informacija koje bi se potom mogle upotrijebiti u nekom danom trenutku (Sternberg, 2004). Prema duljini zadržavanja informacija, razlikuje se kratkoročno, dugoročno i senzorno pamćenje (Zarevski, 2007). Senzorno pamćenje je najkraći oblik pamćenja. Ono pohranjuje informacije koje su dobivene osjetilima (vid, sluh, dodir i slično) (Goldstein, 2015). Informacije koje se pamte više dana, tjedana, mjeseci, godina ili čak i trajno pripadaju dugoročnom pamćenju. Znanja, iskustva i vještine pripadaju dugoročnom pamćenju (Schacter i sur., 2011). Kod kratkoročnog pamćenja se informacije zadržavaju od nekoliko sekundi do nekoliko minuta (tablica 1). Takve informacije će se vjerojatno zaboraviti, ali se njihovim učestalim ponavljanjem i korištenjem, može postići dugoročno ponašanje (Munivrana, 2006).

Uravnotežena i pravilna prehrana uvelike može utjecati na razinu i vrstu pamćenja pa tako i na kratkoročno pamćenje. Pravilna i uravnotežena prehrana podrazumijeva zadovoljavanje potreba našeg organizma za energijom i hranjivim tvarima koje su nužne za rast, održavanje fizioloških funkcija organizma, očuvanje zdravlja i sprječavanje nastanka bolesti (Capak i sur., 2017). Dosadašnja istraživanja su pokazala kako određene namirnice mogu utjecati na poboljšanje kognitivne funkcije. Najbolji rezultati postižu se prehranom bogatom antioksidansima, zdravim masnoćama i nutrijentima koji štite mozak od oksidativnog stresa i upala (Puri i sur., 2023).

Tablica 1 Model triju sustava pamćenja (senzorno, kratkoročno i dugoročno pamćenje) (Atkinson i Shiffrin, 1968)

Vrste pamćenja	Trajanje	Kapacitet	Primjer
Senzorno	< 2 sekunde	vrlo velik	vizualni trag
Kratkoročno	15–30 sekundi	7±2 elemenata	broj telefona
Dugoročno	sati-život	praktički neograničen	znanje, iskustva

Voće, povrće i orašasti plodovi samo su neke od namirnica koje sadrže nutrijente koji pospješuju pamćenje (Arshad i sur., 2025). Khor i sur. (2004) su istraživanjem potvrdili kako voće koje sadrži i flavonoide pozitivno djeluje na kratkoročno pamćenje kod djece. Konzumacija jabuke pozitivno utječe na kognitivne sposobnosti zahvaljujući visokom udjelu antioksidansa, posebice flavonoida, koji štite mozak od oksidativnog stresa. Kao dio uravnotežene prehrane, poželjno je konzumirati jabuku s korom jer se veliki dio korisnih spojeva nalazi upravo u kori jabuke (Chan i sur., 2006). Pozitivan utjecaj na kratkoročno pamćenje je vidljivo i kod konzumacije čokolade. Čokolada s povećanim udjelom kakaa može poboljšati kognitivne sposobnosti mladih (Shateri i sur., 2023). Messerli (2012) je istraživanjem potvrdio kako tamna čokolada ima pozitivan, kratkoročan utjecaj na pamćenje i kognitivne sposobnosti te da poboljšanje može nastupiti već sat do dva sata nakon konzumacije.

Osim što čips i slične namirnice bogate mastima i uljima dovode do pretilosti, visokog kolesterola, dijabetesa i sličnih bolesti, takve namirnice također nemaju dobar učinak na kratkoročno pamćenje (Jamar i sur., 2020). Često se poboljšanje kognitivnih sposobnosti povezuje sa žvakaćim gumama. Istraživanja pokazuju kako žvakaće gume mogu imati i pozitivan i negativan učinak na pamćenje. Žvakanje djeluje kao „prirodni mehanizam za suočavanje sa stresom“, što može smanjiti anksioznost i poboljšati fokus. Gandhi i Siddiqui (2003) su provedenim istraživanjem potvrdili kako je žvakanje žvakaće gume od paprene metvice potaknulo bolju koncentraciju (fokus) studenata, no nije dokazana promjena i poboljšanje kratkoročnog pamćenja ili vremena reakcije kod običnih žvakaćih guma. Mnogi znanstvenici povezuju miris/okus sa informacijama. Tako je dokazana da mozak povezuje specifičan okus (npr. mentol) s informacijama koje učimo. Kada isti okus osjetimo tijekom ispita, to može „osvježiti“ pamćenje i olakšati izvlačenje naučenog (Miles i Johnson, 2006). Istraživanje Lindqvista (2012) nije potvrdilo povezanost žvakaćih guma i pamćenja.

Koja je hrana zdrava za naš mozak, trebamo li često konzumirati čokoladu i s razlogom imati opravdanje za njezinu konzumaciju, može li nam hrana poboljšati koncentraciju na nastavi, poboljšati učenje, pitanja su koja su nas potaknula i motivirala za daljnje istraživanje ove teme. Navedena pitanja potaknula su i cilj našeg istraživanja.

Cilj istraživanja bio je utvrditi:

- utječu li različite namirnice (jabuka, čokolada, čips i žvakaća guma) na kratkoročno pamćenje;
- koje vrste namirnica imaju najučinkovitiji utjecaj na pamćenje.

Obzirom na ranija istraživanja i proučavajući dostupnu literaturu, pretpostavka je:

- da će jabuka i čokolada imati veći utjecaj na pamćenje jer su to namirnice koje sadrže spojeve koji utječu na smanjenje oksidativnog stresa;
- da će čips i žvakaća guma imati manji utjecaj na pamćenje.

METODE RADA

Istraživanje je provedeno u školi tijekom četiri sata biologije. Uzorak je uključivao tri skupine učenika, jedan šesti, jedan sedmi i jedan osmi razred naše škole. Zbog izostanaka učenika u danima testiranja, svaki krug istraživanja nije imao jednak broj ispitanika. Kako nisu svi ispitanici (učenici) bili u mogućnosti pristupiti svim fazama istraživanja, u obzir su uzeti rezultati onih ispitanika koji su sudjelovali u svim

fazama istraživanja. Stoga je ukupan broj ispitanika bio 58, a očekivani broj učenika koji su trebali sudjelovati u ovom istraživanju jest 65.

Priprema zadataka, provođenje testiranja i analiza podataka predstavljaju faze istraživanja. Prije početka istraživanja, učenici su upoznati s postupkom i ciljem istraživanja te su podijeljene suglasnosti za pristanak skrbnika na provedbu ispitivanja kako bi se podatci mogli koristiti u istraživanju. Ispitanici su anketne listiće ispunjavali anonimno, bez navođenja osobnih podataka. Istraživanje je uključivalo četiri testiranja različitih namirnica. Tijekom provođenja istraživanja, u obzir nije uzeta masa svakog ispitanika (učenika) jer su ispitanici pokazali nelagodu i nesigurnost prilikom spominjanja tjelesne mase kao potreban podatak u istraživanju.

Prije početka provođenja testiranja, uzeta je testna skupina koja je poslužila kao procjena funkcionalnosti, odnosno prikupljanju povratnih informacija vezanih za provođenje istraživanja. Naime, testna skupina je sastavljena od učenika uz pomoć kojih je izabran vremenski period za rješavanje zadataka te je skupina također poslužila i za odabir vrsta namirnica. Prije testiranja s namirnicama, napravljeno je testiranje bez konzumiranja namirnica koje je predstavljalo kontrolu (prilog 1). Svako testiranje je uključivalo tri istovrsna zadatka, ali se niti u jednom zadatku nisu ponavljali pojmovi iz prethodnih ili nadolazećih zadataka. Kod zvučnog zapisa, redoslijed zvukova u svakom zadatku bio je različit.

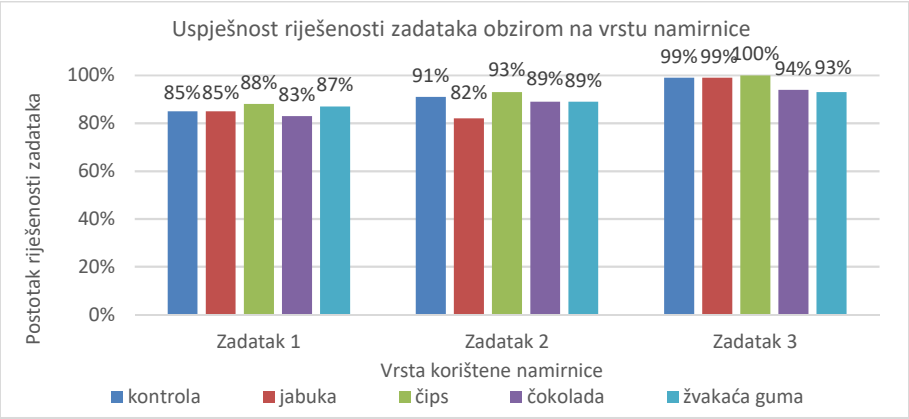
Tijekom istraživanja, ispitanici su morali zapamtiti redoslijed pet rečenica navedenih na papiru u vremenskom periodu od 12 sekundi. Po isteku vremena, zadatak je bio pravilnim redoslijedom rasporediti rečenice. Sljedeći zadatak je bio poslušati zvučni zapis te zapamtiti redoslijed zvukova koji se javljaju tijekom zvučnog zapisa. Za rješavanje ovog zadatka, ispitanici su imali dvanaest sekundi. Treći zadatak bio je zapamtiti niz od pet brojeva. Za rješavanje ovog zadatka na raspolaganju je bilo osam sekundi.

Konzumacija jabuka predstavlja prvo testiranje (konzumirana zelena jabuka zlatni delišes koja se dobiva za užinu u školi) (prilog 2). Svakom ispitaniku dodijeljena su dva komadića jabuke. Drugo testiranje provedeno je konzumiranjem slanog čipsa (prilog 3). Za ovo testiranje korišteno je 15 g čipsa po ispitaniku. Tamna čokolada (udio kakaa-minimalno 50 %) predstavlja treće testiranje (prilog 4) te je svaki ispitanik konzumirao dvije „kockice“ tamne čokolade. Za četvrto testiranje korištene su Orbit Peppermint žvakaće gume (prilog 5). Za testiranje je korištena jedna žvakaća guma po ispitaniku. Nakon konzumacije namirnica, period čekanja do rješavanja zadatka bio je oko 10 minuta. Treća faza istraživanja predstavlja analizu prikupljenih podataka. Svaki točno i u potpunosti riješen zadatak donosi jedan bod, dok netočni i nepotpuni odgovori ne donose bodove. Ukupan broj bodova po svakom testiranju iznosi petnaest bodova. Numerički podaci opisani su pomoću srednje vrijednosti i standardne devijacije. Na temelju bodova, određena je srednja vrijednost točno riješenih zadataka za svaki zadatak i vrstu namirnice te je prikazana u obliku postotka i dijagrama. Tijekom istraživanja, korištene su više od dvije nezavisne varijable (kontrola i različite vrste namirnica) te su numeričke varijable testirane analizom varijance (ANOVA). Razina značajnosti je postavljena na $p= 0,05$. Za statističku analizu je korišten statistički program JASP 0.19.3.

REZULTATI

Uspješnost riješenosti prvog zadatka pamćenja redoslijeda rečenica bila je tek neznatno povećana kod čipsa (88 %) i žvakaće gume (87 %) u odnosu na kontrolu (85 %). Prilikom konzumacija jabuke postignuti

su isti rezultati kao i kod kontrole (85 %), dok je konzumacija tamne čokolade dovela do pada postotka riješenosti zadataka (83 %). Sve navedene uočene razlike su iznimno neznatne u odnosu na kontrolnu skupinu. Postotak riješenosti drugog zadatka gdje su učenici trebali zapamtiti niz zvukova pokazuje neznatno povećanje rezultata nakon konzumacije čipsa (93 %) u odnosu na kontrolu (91 %). Kod pamćenja brojeva, uočeno je neznatno smanjenje postotka riješenosti zadatka nakon konzumacije čokolade (94 %) i žvakaće gume (93 %) u odnosu na kontrolnu skupinu (99 %) (slika 1).



Slika 1 Uspješnost riješenosti zadataka obzirom na vrstu namirnice. Prvi zadatak predstavlja redoslijed rečenica, drugi zadatak pamćenje zvučnog zapisa, a treći zadatak predstavlja pamćenje brojeva

Na temelju provedene analize varijance (ANOVA) za prvi zadatak je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika u pamćenju niza rečenica tijekom konzumacije različitih namirnica, odnosno rezultati su pokazali kako vrsta konzumirane namirnice nema značajan utjecaj na broj postignutih bodova kod prvog zadatka ($F = 0{,}261$; $p = 0{,}903$). Kod drugog zadatka, provedenom analizom varijance je utvrđeno kako postoji statistički značajna razlika između skupina obzirom na konzumaciju određene hrane i pamćenje zvukova ($F = 2{,}796$; $p = 0{,}028$). Obzirom da rezultati pokazuju kako su varijance uzoraka heterogene, korišten je Games-Hovell post hoc test za utvrđivanje statističke značajnosti razlika u prosječnom pamćenju zvučnog zapisa između različitih namirnica. U konačnici, Games- Howell post hoc komparativni test je pokazao da nijedna pojedinačna usporedba između skupina nije bila statistički značajna ($p > 0{,}05$).

Jednofaktorska analiza varijanci pokazala je statistički značajne razlike između konzumacije hrane i pamćenja brojeva ($F = 3{,}48$; $p = 0{,}009$). Zbog utvrđivanja razlika između pojedinih skupina proveden je post hoc test (Games - Hovell post hoc komparativni test). Rezultati su pokazali statistički značajne razlike između sljedećih skupina: skupine koja je konzumirala jabuku i skupine koja je konzumirala čokoladu ($p < 0{,}05$), skupine koja je konzumirala čips i skupine koja je konzumirala čokoladu ($p < 0{,}05$), skupine koja je konzumirala žvakaću gumu i skupine koja je konzumirala čokoladu ($p < 0{,}05$). Između ostalih skupina nisu pronađene statistički značajne razlike ($p > 0{,}05$).

Provedenim istraživanjem i analizom dobivenih rezultata, uočeno je kako konzumacija namirnica (jabuka, čips, čokolada i žvakaća guma) različito utječe na kratkoročno pamćenje (redoslijed rečenica, pamćenje zvučnog zapisa i pamćenje niza brojeva). Rezultati prvog zadatka (redoslijed rečenica) su pokazali da vrsta hrane nema statistički značajan utjecaj na broj postignutih bodova. Prosječni rezultati između ispitanika vrlo su slični, a razlike među njima male. Iako postoje minimalne razlike u srednjim vrijednostima, one nisu dovoljno velike da bi se mogle smatrati statistički značajnima (prosječne vrijednosti kretale su se između $M = 4{,}155$ ($SD = 1{,}461$) i $M = 4{,}397$ ($SD = 1{,}363$). Drugim riječima, ispitanici su postizali sličan broj bodova bez obzira na vrstu hrane koju su konzumirali.

RASPRAVA

Analizom dobivenih rezultata, pretpostavka istraživanja djelomično je potvrđena. Može se pretpostaviti da je uspjeh ispitanika ovisio i drugim čimbenicima (na primjer uloženom trudu, znanju, koncentraciji i slično). Prema dosadašnjim istraživanjima, hrana koja sadrži ugljikohidrate (npr. jabuka, čokolada) utječe na razinu glukoze u krvi, što osigurava energiju mozgu, dok kratkoročne fluktuacije glukoze u normalnim uvjetima ne moraju značajno poboljšati ili pogoršati jednostavan memorijski zadatak (Arshad i sur., 2025). Istraživanje Kozlov i sur. (2012) dokazuje kako žvakaća guma ometa pamćenje redoslijeda informacija kod kratkoročnog pamćenja. Rezultati statističke analize u drugom zadatku su pokazali da postoji statistički značajna razlika između ispitanika obzirom na vrstu namirnice i uspješnost pamćenja zvukova. Međutim, dodatne post-hoc analize nisu pokazale statistički značajne razlike između različitih namirnica. Nakon provedene analize rezultata, nije moguće sa sigurnošću utvrditi između kojih se točno namirnica te razlike pojavljuju, odnosno razlike u prosječnim rezultatima postoje na razini svih skupina zajedno, ali pojedinačne usporedbe između skupina nisu bile dovoljno velike da bi dosegnule statističku značajnost. Razlog tome može biti mali uzorak ispitanika (u ovom istraživanju 58 ispitanika). Također, razlog ovakvih rezultata može biti koncentriranost učenika tijekom provođenja istraživanja. Naime, istraživanje je provedeno tijekom zadnjih školskih sati što može uzrokovati pad koncentracije ispitanika. Sievertsen i sur. (2016) testirali su učenike u danskim školama te zaključili da su učenici zadnjih sati nastave imali lošije rezultate nego ranije tijekom dana. Tijekom dana se akumulira mentalni umor, što znači da se kognitivni resursi iscrpljuju — mozak teže održava pažnju, obradu informacija i rješavanje zadataka kako sati prolaze. Baddeley i Hitch (1974) su razvili model radnog pamćenja te se, prema njemu, verbalne i zvučne informacije obrađuju u takozvanoj fonološkoj petlji, koja ima ograničen kapacitet (oko 2–3 sekunde zvučnog zapisa). Obzirom da se u provedenom istraživanju zvučni zapis sastojao od pet različitih zvukova, može se pretpostaviti da je ispitanicima zvučni zapis bio predug ili je sadržavao previše informacija. Iz svega navedenog, dolazi se do zaključka kako postoji mogućnost da su ispitanici premašili kapacitet kratkoročnog pamćenja te je to razlog zašto su dobiveni prikazani rezultati.

Zadatak pamćenja niza od pet brojeva pokazuje statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistička značajnost u rezultatima uočena je između čokolade i jabuke, čokolade i čipsa te između čokolade i žvakaće gume. Rezultati pokazuju kako su učenici koji su konzumirali čokoladu imali nešto drugačije rezultate u usporedbi s ostalima. Uočeno je da su jabuka, čips i žvakaća guma imale gotovo maksimalne rezultate, dok je konzumacija čokolade uzrokovala nešto niži prosjek i veću razliku među učenicima. Rezultati dosadašnjih istraživanja ukazuju na to da žvakanje može kratkotrajno pomoći pažnji i budnosti, što može utjecati na izvedbu u zadacima (Allen, 2015). Čips se ubraja u visokoprerađenu hranu bogatu zasićenim mastima i jednostavnim ugljikohidratima. Istraživanja Murray i sur. (2009) pokazuju da prehrana bogata zasićenim mastima može utjecati na funkciju hipokampusa, dijela mozga ključnog za učenje i pamćenje. Dugotrajnija konzumacija prehrane bogate zasićenim mastima povezana je sa slabijim rezultatima na testovima pamćenja. Međutim, većina ovih učinaka je uočena kod duže konzumacije, a ne nakon kraće konzumacije ili manje količine.

Što se tiče čokolade, istraživanja o kakao-flavanolima navode da bi mogli postojati pozitivni učinci na neke kognitivne funkcije, ali ti su učinci često opisani kao ovisni o dozi, vremenu i populaciji (Socci i sur., 2017). Također, postoje i radovi koji pokazuju da jednokratna konzumacija kakaa ne mora nužno dovesti do brze promjene u rezultatima na kognitivnim zadacima (npr. kod mladih i odraslih), što znači da učinak može biti slab ili ga uopće nema u nekim situacijama (Altinok i sur., 2025). Jabuke su bogate

antioksidansima i prirodnim šećerima te neka istraživanja ukazuju na pozitivan učinak na kratkoročno pamćenje (Pinilla, 2008). Za razliku od rafiniranih slatkiša, jabuka sadrži vlakna koja usporavaju apsorpciju šećera. To znači da ne dolazi do naglog pada glukoze, što smanjuje rizik od pada koncentracije. Zbog toga jabuka teoretski može imati neutralan ili blago pozitivan učinak, ali je malo vjerojatno da će jednokratna konzumacija značajno promijeniti rezultate kratkog zadatka pamćenja kod zdravih učenika (Jenkins i sur., 1981).

Niz različitih faktora je imalo utjecaj na provedeno istraživanje. Istraživanje je provedeno u školskom okruženju gdje je teško kontrolirati brojne faktore koji mogu ometati provođenje istraživanja kao što su umor, motivacija, tjelesna masa ispitanika, konzumacija hrane prije samog istraživanja i slično. Također, broj učenika koji sudjeluje (58) je realan za školsku praksu, ali relativno malen za složeniju statistiku što je moglo utjecati na rezultate istraživanja. Zbog toga bi u budućim istraživanjima bilo korisno standardizirati uvjete (isto vrijeme provođenja istraživanja, ista količina hrane, odnos tjelesne mase i količine hrane, isto vrijeme čekanja prije testiranja).

ZAKLJUČCI

Nakon provedenog istraživanja, utvrđeni su sljedeći zaključci te su postavljene pretpostavke djelomično potvrđene:

- Vrsta konzumirane namirnice ima utjecaj na kratkoročno pamćenje, ali uspješnost pamćenja ovisi o vrsti namirnice i tipu zadatka;
- Najmanji učinak na kratkoročno pamćenje uočeno je nakon konzumacije tamne čokolade;
- Za bolje rezultate trebalo bi se uzeti u obzir vrijeme provođenja istraživanja, veći vremenski razmak nakon konzumacije te drugi čimbenici koji utječu na ispitanike.

LITERATURA

Allen A. P., Smith A. P. 2015. Chewing gum: cognitive performance, mood, well-being, and associated physiology. BioMed Research International 2015: 654806.

Altinok A., Moruzzi M., Akyürek E. G. 2025. Acute effects of cocoa flavanols on cognitive control and response inhibition. Nutrition. 139: 112860.

Arshad M. T., Maqsood S., Altalhi R., Shamlan G., Mohamed Ahmed I. A., Ikram A., Abdullahi M. A. 2025. Role of dietary carbohydrates in cognitive function: a review. Food Science & Nutrition 13(7): e70516.

Atkinson R. C., Shiffrin R. M. 1968. Human memory: A proposed system and its control processes. Psychology of Learning and Motivation 2: 89–185.

Baddeley A. D., Hitch, G. 1974. Working memory. Psychology of Learning and Motivation 8: 47–89.

Capak K., Barišin A., Petrović G., Jeličić P. 2017. Tri ključa za zdravlje danas i sutra. A.G. Matoš d.d., Samobor.

Chan A., Graves V., Shea T. B. 2006. Apple juice concentrate maintains acetylcholine levels following dietary compromise. Journal of Alzheimer's Disease 9(3): 287–291.

Games P. A., Howell J. F. 1976. Pairwise multiple comparison procedures with unequal n's and/or variances. Journal of Educational Statistics 1(2): 113–125.

Gandhi P. P., Siddiqui R. A. 2003. Effects of peppermint, chewing gum on memory, cognition, alertness, reaction time, arithmetic skills and athletic performance during laboratory induced stress in undergraduate medical students. International Journal of Basic & Clinical Pharmacology 8(6): 1254.

Goldstein E. B. 2007. Cognitive psychology: connecting mind, research and everyday experience. Wadsworth, Cengage Learning, Belmont.

Jamar G., Ribeiro D. A., Pisani L. P. 2020. High-fat or high-sugar diets as trigger inflammation in the microbiota-gut-brain axis. Critical reviews in food science and nutrition 61(5): 836–854.

Jenkins D. J. A, Wolever T. M. S., Taylor R. H., Barker H., Fielden H., Baldwin J. M., Bowling A. C., Newman H. C., Jenkins A. L., Goff D. V. 1981. Glycemic index of foods: A physiological basis for carbohydrate exchange. The American Journal of Clinical Nutrition 34(3): 362–366.

Khor K. L., Kumarasuriar V., Tan K. W., Ooi P. B., Chia Y. C. 2024. Effects of fruit and vegetable intake on memory and attention: A systematic review of randomized controlled trials. Systematic Reviews, 13(1): 151.

Kozlov M. D., Hughes R. W., Jones D. M. 2012. Gummed-up memory: chewing gum impairs short-term recall. The Quarterly Journal of Experimental Psychology 65(3): 501–513.

Lindqvist D. 2012. Does chewing gum affect short-term memory?, http://lup.lub.lu.se/student-papers/record/3403412/file/3459398.pdf, pristupljeno 15.1.2026.
Messerli F. H.2012. Chocolate consumption, cognitive function, and Nobel laureates. The New England Journal of Medicine 367(16): 1562–1564.
Miles C., Johnson A. J. 2006. Chewing gum and context-dependent memory effects: a re-examination. Appetite 48(2): 154–158.
Munivrana B. 2006. Utjecaj kratkoročnog ili radnog pamćenja na usvajanje govora kod djece oštećena sluha. https://dabar.srce.hr/en/object/suvag:308, pristupljeno 13.1.2026.
Murray A. J., Knight N. S., Cochlin L. E., McAleese S., Deacon R. M., Rawlins J. N., Clarke K. 2009. Deterioration of physical performance and cognitive function in rats with short-term high-fat feeding. FASEB Journal 23(12): 4353–4360.
Pinilla F. G.2008. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. Nature Reviews Neuroscience 9: 568–578.
Puri S., Shaheen M., Gorver B. 2023. Nutrition and cognitive health: A life course approach. Frontiers in Public Health 11: 1023907.
Schacter D. L., Gilbert D. T., Wegner D. M. 2011. Psychology. Worth Publishers, New York.
Shateri Z., Kooshki A., Hormoznejad R., Hosseini S. A., Mousavi R., Foroumandi E. 2023. Effects of chocolate on cognitive function in healthy adults: A systematic review and meta-analysis on clinical trials. Phytotherapy Research 37(9): 3688–3697.
Sievertsen H. H., Gino F., Piovesan M. 2016. Cognitive fatigue influences students' performance on standardized tests. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 113(10): 2621–2624.
Socci V., Tempesta D., Desideri G., De Gennaro L., Ferrara, M. 2017. Enhancing human cognition with cocoa flavonoids. Frontiers in Nutrition 4:19.
Sternberg R. J. 2004. North American Approaches to Intelligence. International handbook of intelligence. Cambridge University Press, New York.
Zarevski P. 2007. Psihologija pamćenja i učenja. Naklada Slap, Zagreb.

PRILOZI

Prilog 1

Kontrola
1. ZADATAK
___ Stari hrast u školskom dvorištu pruža duboki hlad.
___ Mali robot tiho istražuje daleku površinu crvenog planeta.
___ Na drvenom stolu stoji otvorena knjiga punih stranica.
___ Zlatna ribica polako pliva kroz prozirnu vodu akvarija.
___ Planine su zimi prekrivene debelim slojem bijelog snijega.
2. ZADATAK- zvučni zapis
___ pjesma
___ klavir
___ mačka
___ motor
___ pas
3. ZADATAK – niz brojeva
___ ___ ___ ___ ___

Prilog 2

JABUKA
1. ZADATAK
___ Gusti oblaci sakrili su vrhove visokih planinskih lanaca.
___ Svemirski brod putuje prema najsjajnijoj zvijezdi na nebu.
___ Veliki plavi kit polako izranja na površinu oceana.
___ Srebrni ključ otključava teška vrata stare kamene kule.
___ U dubokoj šumi raste rijetko cvijeće neobičnih boja.
2. ZADATAK – zvučni zapis
___ zvono
___ klavir
___ kiša
___ motor
___ ptica
3. ZADATAK - niz brojeva
___ ___ ___ ___ ___

Prilog 3

ČIPS
1. ZADATAK
___ Crveni sportski automobil brzo prolazi kroz uski tunel.
___ Sunce polako zalazi iza mirne linije dalekog mora.

___ U košari na podu spava malo sivo mače.
___ Novi mobitel ima ekran koji reagira na dodir.
___ Snažan vjetar neprestano njiše grane mladog drveća u parku.
2. ZADATAK – zvučni zapis
___ ptica
___ pjesma
___ mačka
___ motor
___ kucanje
3. ZADATAK - niz brojeva
___ ___ ___ ___ ___

Prilog 4

TAMNA ČOKOLADA
1. ZADATAK
___ Zelena trava miriše svježe nakon prve proljetne kiše.
___ U starom dvorcu skriveni su hodnici puni tajni.
___ Ptice selice svake jeseni lete prema toplijim južnim krajevima.
___ Učenici marljivo pišu zadaću u svojim novim bilježnicama.
___ Mjesec baca blijedu svjetlost na mirnu površinu jezera.
2. ZADATAK – zvučni zapis
___ kiša
___ pjesma
___ ptica
___ zvono
___ klavir
3. ZADATAK - niz brojeva
___ ___ ___ ___ ___

Prilog 5

ŽVAKAĆA GUMA
1.ZADATAK
___ Hladna rijeka teče kroz duboki kanjon prema jugu.
___ U školskoj torbi nalaze se nove knjige i bilježnice.
___ Zeleni gušter brzo se sakrio ispod velikog kamena.
___ Noćno nebo puno je sjajnih i dalekih zvijezda.
___ Na prozoru stoji vaza s ljubičastim poljskim cvijećem.
2.ZADATAK – zvučni zapis
___ ptica
___ kucanje
___ kiša
___ pas
___ mačka
3.ZADATAK- niz brojeva
___ ___ ___ ___ ___

Deklaracija i kvaliteta kestenova meda

Dora Kern, 8. razred
Kaja Perica, 8. razred

Osnovna škola Augusta Šenoe, Zagreb
Mentor: *Martina Čiček*

SAŽETAK
Kestenov med jedna je od najpoznatijih vrsta meda u Hrvatskoj, a njegova kvaliteta i točnost podataka na deklaraciji važni su za potrošače. Budući da se u javnosti često govori o mogućim nepravilnostima u označavanju meda, cilj ovog istraživanja bio je provjeriti odgovaraju li uzorci meda deklarirani kao kestenov med propisima iz Pravilnika o kakvoći meda. U istraživanju su analizirani uzorci kupljeni u trgovinama i na obiteljskim gospodarstvima. Botaničko podrijetlo određeno je peludnom analizom, dok su udio vode i električna provodnost mjereni jednostavnim laboratorijskim postupcima. Peludna analiza provedena je u dva ponavljanja kako bi se provjerila pouzdanost dobivenih rezultata. Peludna analiza pokazala je da dio uzoraka ne sadrži dovoljno peludi kestena da bi se mogli smatrati kestenovim medom, iako su tako označeni. Udio vode u svim uzorcima bio je u granicama propisanima Pravilnikom, dok je električna provodnost u nekoliko uzoraka bila niža od vrijednosti koje se očekuju za kestenov med. Pregled deklaracija pokazao je da mnogi proizvodi nemaju sve obvezne podatke, poput datuma proizvodnje, imena proizvođača ili neto mase. Dobiveni rezultati pokazuju da se dio analiziranih uzoraka ne može u potpunosti svrstati u kestenov med te da deklaracije često nisu potpuno usklađene s propisima. Istraživanje pokazuje da je nužno provoditi strožu i sustavniju kontrolu kvalitete meda i točnosti deklaracija, budući da pojedini proizvodi samo djelomično udovoljavaju zakonskim propisima.

Ključne riječi: *kvaliteta kestenova meda; botaničko podrijetlo meda; fizikalno-kemijska analiza*

UVOD

Pčele su vrlo važne životinje jer oprašuju velik broj biljaka, uključujući i one koje ljudi koriste za hranu. Bez njih bi se smanjila bioraznolikost, a mnoge biljke ne bi mogle stvarati plodove i sjemenke (Nikolić, 2017). U pčelinjoj zajednici najviše poslova obavljaju radilice. One skupljaju nektar i pelud, donose ih u košnicu i pretvaraju nektar u med u mednom želudcu, obogaćuju enzimima, rasporede u saće i mašu krilima dok se ne zgusne (Lažec, 2025). Osim što imaju važnu ulogu u prirodi, pčele proizvode med, vosak, propolis i druge tvari koje se koriste u prehrani i svakodnevnom životu. Med je posebno cijenjen u prehrani zbog svojeg okusa, hranjivosti i blagotvornih učinaka na zdravlje (Lažec, 2025).

Pčelarstvo ima vrlo dugu povijest. Još su stari Egipćani prikazivali pčelarenje na svojim reljefima, što pokazuje da su ljudi već tada skupljali med i brinuli se o pčelama (Lažec, 2025). U početku se med uzimao iz divljih gnijezda, no kasnije su ljudi počeli izrađivati košnice i razvijati načine kako pčelama pružiti bolje uvjete. Tako se pčelarstvo postupno razvilo u važnu poljoprivrednu djelatnost (Lažec, 2025).

Pitomi kesten (*Castanea sativa* Mill.) je listopadno drvo koje raste u mnogim dijelovima Hrvatske i poznato je kao važna medonosna biljka. Tijekom cvatnje proizvodi velike količine nektara, zbog čega pčele rado posjećuju njegove cvjetove. Upravo zbog toga kestenov med ima prepoznatljiva svojstva i lako se razlikuje od drugih vrsta meda (Hosking i Press, 1992). Kestenov med poznat je po tamnoj boji, posebnom mirisu i blago gorkastom okusu.

Prema Pravilniku o kakvoći meda, kestenov med mora zadovoljiti određene uvjete, kao što su dovoljan udio peludi kestena, odgovarajući udio vode i određena električna provodnost (NN, 2000).

Botaničko podrijetlo meda određuje se metodom koja se zove peludna analiza, a temelji se na prebrojavanju peludnih zrnaca u sedimentu meda. Ako u uzorku prevladava pelud kestena (85 % i više), može se zaključiti da je med doista kestenov. Udio vode važan je pokazatelj kvalitete jer utječe na gustoću i trajnost meda (prema Pravilniku udio vode treba biti ispod 20 %). Električna provodnost pokazuje koliko dobro med provodi slabu električnu struju, što ovisi o količini mineralnih tvari. Kestenov med prirodno ima veću provodnost od mnogih drugih vrsta meda (prema Pravilniku viša od 0,80 m S/cm) pa se taj podatak koristi kao jedan od načina provjere njegove vrste (NN, 2000).

Tijekom 2012. godine, u istraživanju Hrge i sur. (2013), od ukupno 98 analiziranih uzoraka meda čak 19 uzoraka nije odgovaralo deklaraciji prema Pravilniku. U istom istraživanju analizirano je i 28 uzoraka kestenova meda. Svi su bili proizvedeni samo od jedne vrste nektara, a udio peludi kestena kretao se između 86 % i 99 %. U istraživanju Bekavac (2021) pod nazivom *Parametri kvalitete meda od bagrema, lipe i kestena, sezona 2020. godina* analizirano je 20 uzoraka kestenova meda poznatog podrijetla s područja Republike Hrvatske. Rezultati analiza, koje su uključivale udio vode i električnu provodnost, pokazali su da svi uzorci odgovaraju kestenovu medu. U Rubinićevu (2020) istraživanju analizirano je 18 uzoraka kestenova meda podrijetlom iz Republike Hrvatske, prikupljenih na međunarodnom natjecanju *Zzzagimed 2019*. Rezultati su pokazali da jedan uzorak ima viši udio vode od dopuštenih 20 % (20,6 %), dok su četiri uzorka imala vrijednosti električne provodnosti niže od 0,8 m S/cm.

Motivacija za ovo istraživanje pojavila se nakon razgovora u razredu o tome kako se na tržištu ponekad može pronaći med koji nije u potpunosti prirodan ili nije ispravno označen. Budući da se kvaliteta meda ne može procijeniti samo prema njegovu izgledu, javila se želja da se provjeri koliko su uzorci kestenova meda doista u skladu s Pravilnikom o kakvoći meda. To je potaknulo ideju da se analiziraju uzorci meda i provjeri njihovo botaničko podrijetlo te osnovna svojstva, kako bi se dobili pouzdani i usporedivi rezultati.

Ciljevi istraživanja bili su:

1. provjeriti botaničko podrijetlo uzoraka meda metodom peludne analize i utvrditi mogu li se doista svrstati u kestenov med prema Pravilniku;
2. izmjeriti osnovna svojstva meda, kao što su udio vode i električna provodnost te ih usporediti s propisanim vrijednostima;
3. Pregledati podatke na deklaracijama i provjeriti jesu li potpuni i točni.

Postavljene su sljedeće pretpostavke:

- svi uzorci sadržavat će dovoljan udio peludi kestena propisanima Pravilnikom;
- udio vode u svim uzorcima bit će u granicama propisanima Pravilnikom;
- električna provodnost svih uzoraka bit će u skladu s vrijednostima za kestenov med;
- podaci na deklaracijama biti će potpuni i točni.

METODE RADA

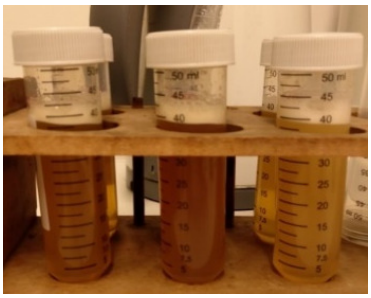
U istraživanju je korišteno trinaest nasumično kupljenih uzoraka kestenovih medova iz trgovačkih centara, specijaliziranih trgovina koje prodaju „bio proizvode“ te s obiteljskih poljoprivrednih gospodarstva. Uzorci su prikupljeni tijekom travnja 2024. i travnja 2025. godine (slika 1). Zbog zakona o provedbi Opće uredbe o zaštiti podataka, u ovom istraživanju nisu navedeni nazivi pčelarstava, obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava niti imena i prezimena vlasnika proizvoda (OU, 2018).

Slika 1 Uzorci kestenova meda korišteni u istraživanju
Autori: Kern D., Perica K., 2025.

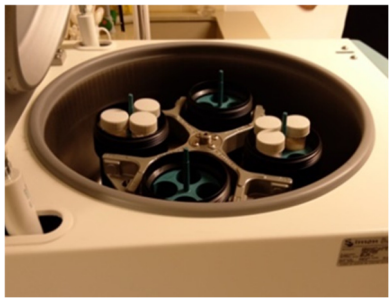
Peludna analiza, odnosno brojanje peludnih zrnaca u sedimentu, odrađena je u školi tijekom rujna i listopada 2024. te rujna i listopada 2025. godine. Priprema za peludnu analizu, mjerenje udjela vode i određivanje električne provodnosti provedeni su u laboratoriju 24. svibnja 2024. i 11. lipnja 2025. godine, u prostoru opremljenom svim potrebnim uređajima za ispitivanje kvalitete meda. Izdvojene su i prilagođene one metode koje učenik 8. razreda osnovne škole može samostalno provesti. U svim analizama korišteni su uzorci kestenova meda u tekućem stanju.

Peludna analiza – priprema uzoraka za mikroskopiranje

Staklenke s uzorcima kestenova meda i plastične epruvete od 50 mL označene su oznakama od uzorka 1 do uzorka 13. U svaku epruvetu stavljeno je po 5 mL jednog uzorka kestenova meda te dodano 35 mL tople vode. Sadržaj epruvete dobro je promućkan trešnjom rukama kako bi se dobila ujednačena smjesa (slika 2). Nakon toga epruvete su stavljene u uređaj za centrifugiranje na 20 minuta pri 3 500 okretaja (slika 3).



Slika 2 Vodene otopine kestenova meda
Autori: Kern D., Perica K., 2025.



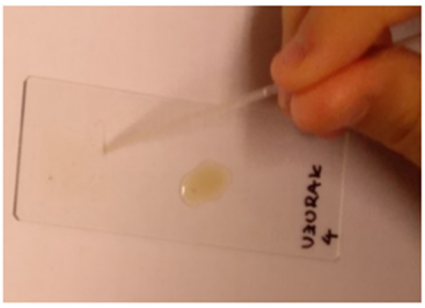
Slika 3 Epruvete u uređaju za centrifugiranje
Autori: Kern D., Perica K., 2025.

Kada je centrifugiranje završilo, tekući dio je odliven, a sediment (talog) prenesen je mikropipetom na označeno predmetno stakalce. Sediment je ravnomjerno razmazan na površinu oblika pravokutnika približne veličine 15 × 20 mm u dvama mjerenjima (primjercima). Preparat je ostavljen da se osuši na sobnoj temperaturi, zatim uklopljen u glicerin-želatinu i pokriven pokrovnim stakalcem. Tako pripremljeni uzorci ostavljeni su još neko vrijeme na sušenju (slika 4).

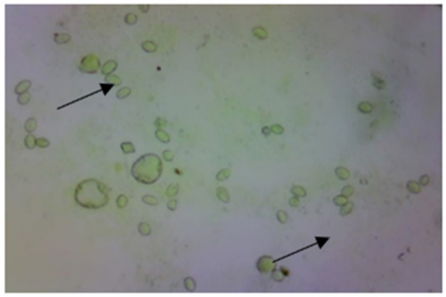
Mikroskopiranje peludi i njihovo prebrojavanje odrađeno je u školi na povećanju svjetlosnog mikroskopa od 100 puta. Promatrano je onoliko vidnih polja koliko je bilo potrebno da se prebroji ukupno 300 ili nešto više od 300 peludnih zrnaca. Pazilo se na smjer pomicanja preparata kako se ne bi ponavljala ista vidna polja. Budući da je svaki uzorak imao dva mjerenja, svaki se uzorak prebrojavao dvaput, što je ukupno više od 600 peludnih zrnaca po uzorku.

Iz ukupnog broja peludnih zrnaca za svaki uzorak i svako mjerenje izdvojen je broj peludnih zrnaca kestena. Pelud biljne vrste određuje se prema obliku, veličini, građi i boji vanjske stijenke te prema

obliku i broju pora klijanja. Pelud kestena prepoznaje se po tome što su zrnca okrugla do blago ovalna, s jasno vidljivom porom po sredini (slika 5). Upravo taj izgled omogućuje razlikovanje peludi kestena od peludi drugih biljaka.



Slika 4 Centrifugirani sediment uzoraka kestenova meda prenesen mikropipetom na predmetno stakalce
Autori: Kern D., Perica K., 2025.



Slika 5 Pelud kestena u medu (označena strelicama) pod povećanjem mikroskopa 100 puta
Autori: Kern D., Perica K., 2025.

Određivanje udjela vode u uzorcima kestenova meda

Metoda se temelji na refraktometrijskom određivanju udjela vode, za što je potreban uređaj refraktometar. Indeks refrakcije uzorka određuje se pri stalnoj temperaturi od 20 °C (temperatura se namješta na radnoj površini uređaja). Na temelju izmjerenog indeksa refrakcije izračunava se udio vode (%) pomoću tablice navedene u Pravilniku (slika 6).

Na sredinu prizme refraktometra pažljivo se stavlja po jedna kap svakog uzorka kestenova meda, nakon čega se uređaj zatvara i prikazuje vrijednost udjela vode (slika 7). Prije sljedećeg mjerenja potrebno je ukloniti prethodni uzorak papirnatim ubrusom namočenim destiliranom vodom, a zatim osušiti suhim ubrusom. Isti postupak ponavlja se za svaki uzorak. Prema Pravilniku, udio vode u medu mora biti manji od 20 %.

Indeks refrakcije (20°C)	Udio vode (%)	Indeks refrakcije (20°C)	Udio vode (%)	Indeks refrakcije (20°C)	Udio vode (%)
1,5044	13,0	1,4935	17,2	1,4830	21,4
1,5038	13,2	1,4930	17,4	1,4825	21,6
1,5033	13,4	1,4925	17,6	1,4820	21,8
1,5028	13,6	1,4920	17,8	1,4815	22,0
1,5023	13,8	1,4915	18,0	1,4810	22,2
1,5018	14,0	1,4910	18,2	1,4805	22,4
1,5012	14,2	1,4905	18,4	1,4800	22,6
1,5007	14,4	1,4900	18,6	1,4795	22,8
1,5002	14,6	1,4895	18,8	1,4790	23,0
1,4997	14,8	1,4890	19,0	1,4785	23,2
1,4992	15,0	1,4885	19,2	1,4780	23,4
1,4987	15,2	1,4880	19,4	1,4775	23,6
1,4982	15,4	1,4875	19,6	1,4770	23,8
1,4976	15,6	1,4870	19,8	1,4765	24,0
1,4971	15,8	1,4865	20,0	1,4760	24,2
1,4966	16,0	1,4860	20,2	1,4755	24,4
1,4961	16,2	1,4855	20,4	1,4750	24,6
1,4956	16,4	1,4850	20,6	1,4745	24,8
1,4951	16,6	1,4845	20,8	1,4740	25,0
1,4946	16,8	1,4840	21,0		
1,4940	17,0	1,4835	21,2		

Slika 6 Tablica proračuna za izračun udjela vode
Izvor: NN, 2000

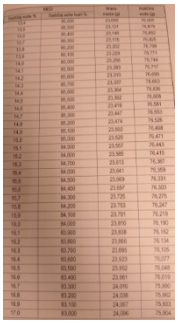
Slika 7 Stavljanje kapljice uzorka meda na prizmu refraktometra
Autori: Kern D., Perica K., 2025.

Određivanje električne provodnosti uzoraka kestenova meda

Za mjerenje električne provodnosti korišten je konduktometar. Na temelju podatka o udjelu vode u svakom uzorku, iz posebne tablice (slika 8) određena je masa uzorka meda. Ta masa izmjerena je

digitalnom vagom, a zatim je svaki uzorak zasebno stavljen u reagens boce. Destilirana voda dodana je pomoću štrcaljke do ukupne mase od 100 g.

Smjesa meda i destilirane vode dobro je promiješana žlicom kako ne bi ostalo meda na stijenkama posude (slika 9). U pripremljenu otopinu uronjena je sonda konduktometra te je očitana električna provodnost (slika 10). Vrijednost električne provodnosti za kestenov med mora biti viša od 0,80 m S/cm jer kestenov med sadrži više mineralnih tvari od drugih vrsta meda.



Slika 8 Tablica potrebne količine meda i destilirane vode za pripremu uzorka za određivanje električne provodnosti
Izvor: NN, 2000

Slika 9 Mjerenje mase uzorka kestenova meda i destilirane vode do 100 g
Autori: Kern D., Perica K., 2025.

Slika 10 Mjerenje električne provodnosti kestenova meda konduktometrom
Autori: Kern D., Perica K., 2025.

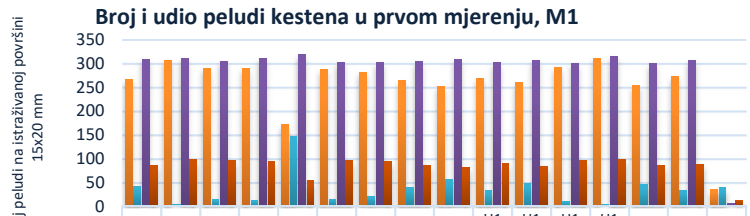
Rezultati istraživanja prikazani su stupčastim grafovima izrađenima u programu Microsoft Excel, u kojem su napravljeni i svi potrebni izračuni. Standardna devijacija (SCRIBD, 2025) pokazuje koliko se pojedine vrijednosti razlikuju od prosjeka: mala standardna devijacija znači da su rezultati slični, a velika da su jako raspršeni. Za usporedbu dviju skupina podataka korišten je t-test, koji provjerava postoji li stvarna razlika između njihovih prosječnih vrijednosti. Značajnost razlike procijenjena je pomoću p-vrijednosti, koja pokazuje kolika je vjerojatnost da su rezultati nastali slučajno; što je p-vrijednost manja, to je veća sigurnost da je razlika stvarna, a najčešće se kao granica koristi $p < 0,05$ (SCRIBD, 2025).

REZULTATI

Uzorci kestenova meda označeni su slovom i brojem: U1, U2, U3 … U13. Svaki uzorak ima prvo i drugo mjerenje, označeno kao M1 i M2. Oznaka „P“ u svim grafovima prikazuje kriterije propisane Pravilnikom, odnosno vrijednosti koje uzorak mora zadovoljiti da bi se mogao deklarirati kao kestenov med. Oznaka „pros.“ označava dobivenu prosječnu vrijednost (aritmetičku sredinu), dok „SD“ označava vrijednost standardne devijacije.

Rezultati peludne analize

Nakon provedenog istraživanja, peludnom analizom i prebrojavanjem peludnih zrnaca dobiveni su podaci prikazani na slici 11 i 12 za sve uzorke kestenova meda u dvama mjerenjima (prvo i drugo mjerenje, M1 i M2). U tablici 1 (prvo mjerenje, M1) vidljivo je da uzorak 2 i uzorak 13 imaju najveći udio peludi kestena, dok je udio ostale peludi najmanji. U uzorku 5 mjerenjem je potvrđeno da ne postoji velika razlika između udjela peludi kestena i ostale peludi. Prosječna vrijednost broja peludnih zrnaca kestena u svim uzorcima iznosi 273,2 dok standardna devijacija iznosi 35,29.

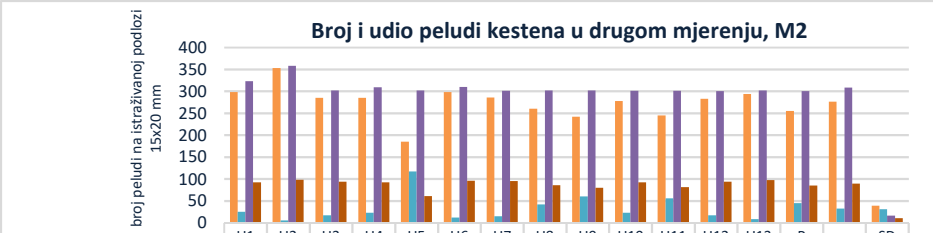


	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8	U9	U10	U11	U12	U13	P	pros.	SD
kesten M1	268	308	291	291	172	288	282	264	253	270	260	292	312	255	273	35,3
ostalo M1	42	4	14	11	148	15	20	40	56	32	48	9	3	45	34	38,5
ukupno M1	310	312	305	311	320	303	302	304	309	302	308	301	315	300	308	5,73
udio peludi kestena (%)	86	98	95	93	53	95	93	86	81	89	84	97	99	85	88,4	12,1

*U1,U2…U13- uzorci meda, **P- kriteriji propisani Pravilnikom, ***pros.-prosječna vrijednost, ****SD-standardna devijacija

Slika 11 Broj i udio peludi kestena u svim uzorcima meda (prvo mjerenje, M1)

Slično kao na slici 11 i u grafu na slici 12 (drugo mjerenje, M2) vidljivo je da uzorak 2 i uzorak 13 imaju najveći udio peludi kestena. U uzorku 5 zabilježen je visok udio ostale peludi u odnosu na kestenovu pelud. Prosječna vrijednost broja peludnih zrnaca kestena u svim uzorcima iznosi 276,3, dok standardna devijacija iznosi 38,93.

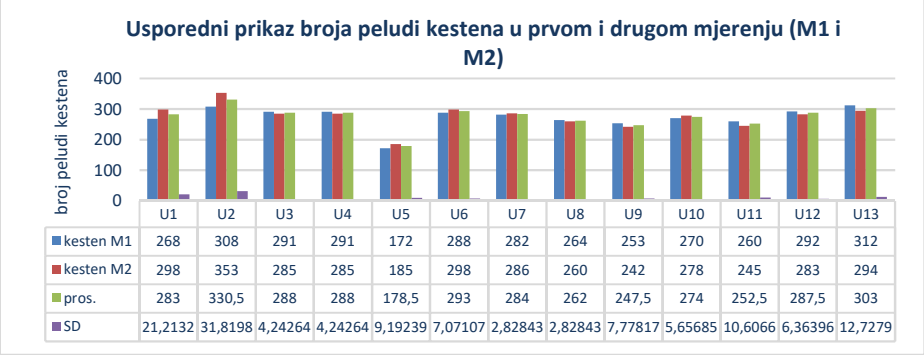


	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8	U9	U10	U11	U12	U13	P	pros.	SD
kesten M2	298	353	285	285	185	298	286	260	242	278	245	283	294	255	276,31	38,932
ostalo M2	25	5	17	23	117	12	15	42	60	23	56	17	8	45	32,308	30,739
ukupno M2	323	358	302	309	302	310	301	302	302	301	301	300	302	300	308,69	16,111
udio peludi kestena (%)	92	98	94	92	61	96	95	86	80	92	81	94	97	85	89,077	10,185

*U1,U2…U13- uzorci meda, **P- kriteriji propisani Pravilnikom, ***pros.-prosječna vrijednost, ****SD-standardna devijacija

Slika 12 Broj i udio peludi kestena u svim uzorcima meda (drugo mjerenje, M2)

Usporedni prikaz broja prebrojanih peludnih zrnaca kestena u svim uzorcima prikazan je na slici 13. Svi uzorci istraživanog meda imaju približno jednak udio peludi kestena u oba mjerenja (prvo i drugo mjerenje, M1 i M2), osim uzorka 5 koji pokazuje niži udio. Prosječna vrijednost udjela peludi kestena u svim uzorcima iznosi 88,38 i 89,08, dok standardna devijacija iznosi 12,07 i 10,19.



	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8	U9	U10	U11	U12	U13
kesten M1	268	308	291	291	172	288	282	264	253	270	260	292	312
kesten M2	298	353	285	285	185	298	286	260	242	278	245	283	294
pros.	283	330,5	288	288	178,5	293	284	262	247,5	274	252,5	287,5	303
SD	21,2132	31,8198	4,24264	4,24264	9,19239	7,07107	2,82843	2,82843	7,77817	5,65685	10,6066	6,36396	12,7279

*U1,U2…U13- uzorci meda, **pros.-prosječna vrijednost, ***SD-standardna devijacija

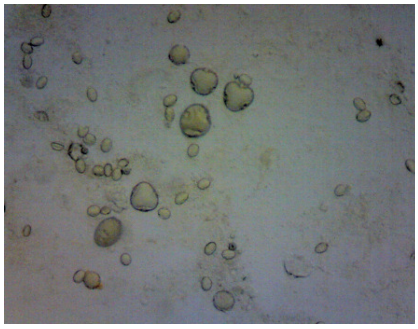
Slika 13 Usporedni prikaz broja peludi kestena u prvom i drugom mjerenju (M1 i M2)

U tablici 1 prikazane su izračunate p-vrijednosti i rezultati t-testova za mjerenja M1 i M2.

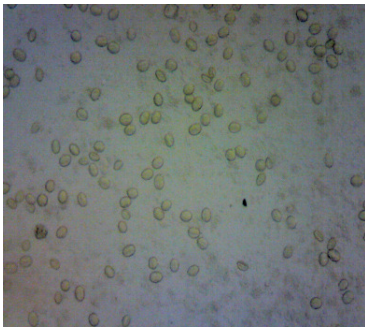
Tablica 1 p-vrijednost i t-test (pojedinačni i zajednički)

p-vrijednost/ t-testovi	IZRAČUNATA VRIJEDNOST	OBJAŠNJENJE	STATISTIČKA ZNAČAJNOST
p-vrijednost	0,544239	p < 0,05- statistički značajna razlika p ≥ 0,05 nema statistički značajne razlike	NE
pojedinačni t- test	12.706	t>12.706 statistički značajna razlika	NE
zajednički t- test	−1.03		NE

Razlika u udjelu peludi i njihovu broju u uzorcima 1, 2 i 3 (prvo mjerenje, M1) prikazana je na slikama 14, 15 i 16 pod povećanjem mikroskopa 100 puta.



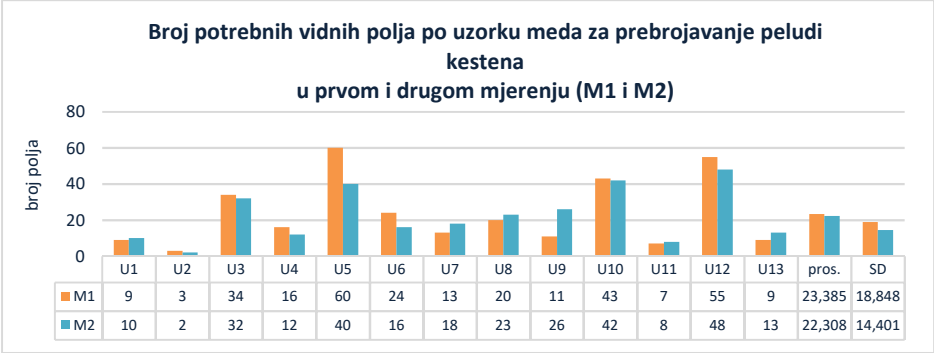
Slika 14 Vidno polje uzorka 1 pod povećanjem mikroskopa 100 puta
Autori: Kern D., Perica K., 2025.



Slika 15 Vidno polje uzorka 2 pod povećanjem mikroskopa 100 puta
Autori: Kern D., Perica K., 2025.

Slika 16 Vidno polje uzorka 3 pod povećanjem mikroskopa 100 puta
Autori: Kern D., Perica K., 2025.

S obzirom na to da se uzorci pri mikroskopiranju i prebrojavanju peludi značajno razlikuju u broju peludnih zrnaca, provedena je usporedba broja vidnih polja potrebnih za svaki uzorak meda kako bi se dosegnuo minimalni potrebni broj od 300 peludnih zrnaca. Broj potrebnih vidnih polja (slika 17) za prebrojavanje 300 peludnih zrnaca razlikovao se među uzorcima, što je vidljivo u usporedbi mjerenja M1 i M2. Najveći broj vidnih polja u oba mjerenja (M1 i M2) zabilježen je u uzorku 5 i uzorku 12, dok je najmanji u uzorku 2. Prosječne vrijednosti broja potrebnih vidnih polja iznose 23,38 i 22,31, uz standardne devijacije od 18,85 i 14,4.



	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8	U9	U10	U11	U12	U13	pros.	SD
M1	9	3	34	16	60	24	13	20	11	43	7	55	9	23,385	18,848
M2	10	2	32	12	40	16	18	23	26	42	8	48	13	22,308	14,401

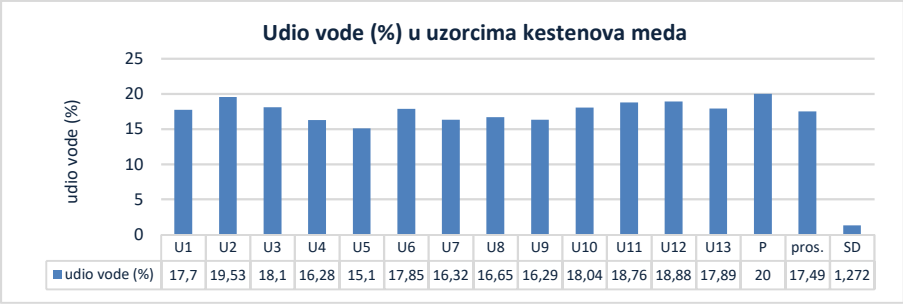
*U1,U2…U13- uzorci meda, **pros.-prosječna vrijednost, ***SD-standardna devijacija

Slika 17 Broj potrebnih vidnih polja po uzorku meda za prebrojavanje peludi kestena (prvo i drugo mjerenje, M1 i M2)

Rezultati udjela vode

Rezultati mjerenja udjela vode u uzorcima kestenova meda prikazan je na slici 18. Prema Pravilniku, udio vode treba biti niži od 20 %, a svi ispitivani uzorci kestenova meda zadovoljavaju taj uvjet. Najviši

udio vode, 19,53 %, zabilježen je u uzorku 2, dok najniži udio, 15,1 %, ima uzorak 5. Prosječna vrijednost udjela vode u svim uzorcima iznosi 17,89, dok standardna devijacija iznosi 1,272.

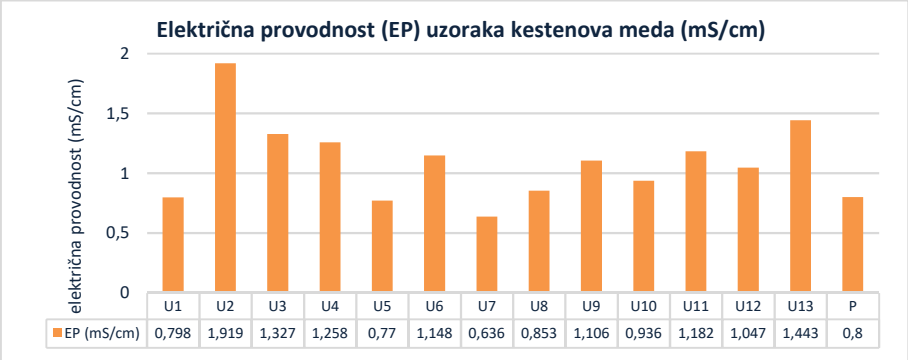


*U1,U2…U13- uzorci meda, **P- kriteriji propisani Pravilnikom, ***pros.-prosječna vrijednost, ****SD-standardna devijacija

Slika 18 Udio vode (%) u uzorcima kestenova meda

Rezultati električne provodnosti

Rezultati mjerenja električne provodnosti uzoraka kestenova meda prikazani su na slici 19. Uzorak 2 ima najveću izmjerenu električnu provodnost, dok uzorak 5 pokazuje vrijednost od 0,77 mS/cm, što je niže od propisane minimalne vrijednosti prema Pravilniku za kestenov med (više od 0,8 mS/cm). Prosječna vrijednost električne provodnosti iznosi 1,109, dok standardna devijacija iznosi 0,339.



*U1,U2…U13- uzorci meda, **P- kriteriji propisani Pravilnikom

Slika 19 Električna provodnost (EP) uzoraka kestenova meda (mS/cm)

Rezultati analize deklaracija

Tablica 2 prikazuje podatke navedene na deklaracijama uzoraka kestenova meda korištenih u ovom istraživanju. Prema Pravilniku, deklaracija treba sadržavati naziv proizvoda i njegovo propisano ime, naziv tvrtke (ime, prezime i adresu proizvođača), veterinarski kontrolni broj, datum proizvodnje, rok trajanja (upotrebljivo do), neto količinu/masu, zemlju podrijetla te druge potrebne podatke. Oznaka „x“ i/ili žuto istaknuti tekst, označava da traženi podatak nije pronađen i/ili nešto nedostaje na deklaraciji proizvoda.

Tablica 2 Podaci s deklaracija uzoraka kestenova meda

UZORAK	1	2	3	4	5	6
Naziv proizvoda i njegovo ime namijenjeno tržištu.	MED KESTEN paša …	Med Kesten	DOBRA VIBRA KESTENOV MED	Kvalitetan vrcani MED KESTEN	KESTEN MED 100 % NATURAL	MED KESTEN
Naziv tvrtke (ime, prezime, adresa proizvođača)	Nedostaje ime, navedeno prezime (ostalo navedeno te broj mobitela).	Ima sve te mail adresu.	Ima sve.	d.o.o. (društvo s ograničenom odgovornošću) Sve nedostaje.	Ima sve te broj mobitela i mail adresu.	Nedostaje ime I prezime, (ostalo navedeno, broj telefona i mobitela)
Veterinarski kontrolni broj	MIBPG 2174..	L0643..	L0490..	L1611..	R-74..	R-52..
Datum proizvodnje	15. 07. 2023.	x	x	x	x	lipanj 2022.
Rok trajanja (upotrebljivo do)	15. 07. 2025.	13. 12. 2025.	18. 10. 2025.	16. 11. 2027.	01 .06. 2025.	lipanj 2024.
Neto količina/masa	450 g	450 g	450 g	250 g	900 g	x
Zemlja podrijetla	Hrvatska	Hrvatska/ Regija: Banija, Kordun	Hrvatska	Hrvatska	Hrvatska	x
Drugi podatci	Med hrvatskih pčelinjaka I 269855	Čuvati na suhom mjestu na sobnoj temperaturi. Med se prije ili kasnije kristalizira, to je njegova prirodna osobina. Da bi se vratio u tekuće stanje, treba ga zagrijati do 40 °C. Slikovni prikaz odlaganje otpada u kantu. HR 1257 EU, Kod za skaniranje, Recikliranje: 22PAP,40FE, 70GL	Med se prije ili kasnije kristalizira, to je njegova prirodna osobina. Da bi se vratio u tekuće stanje treba ga zagrijati do 40°C. Vjerovali ili ne, pčele plešu! Tako si prenose bitne informacije, a pogotovo gdje se može naći dobar nektar. Dobra vibra slavi taj ples jer bez njega ne bi bilo ni meda. Kod za skaniranje Recikliranje: 22PAP, 40FE, 70GL, HR 1257 EU	Kod za skaniranje. HR 3919 EU ,40FE, 70GL Slikovni prikaz oznake za jelo (čaša i vilica) i odlaganje otpada u kantu.	Kristalizacija je prirodno svojstvo meda. Ovisi o vrsti meda i ne utječe na kvalitetu.	Prirodni med se kristalizira.

Tablica 2 nastavak Podaci s deklaracija uzoraka kestenova meda

UZORAK	7	8	9	10	11	12	13
Naziv proizvoda i njegovo ime namijenjeno tržištu.	MED KESTENOV	MED KESTEN	KESTENOV MED	MED KESTEN	MED IZ VLASTITOG PČELINJAKA KESTEN	MED KESTEN	MED KESTEN
Naziv tvrtke (ime, prezime, adresa proizvođača)	…, OBITELJSKA TRADICIJA OD 1994., Nema imena vlasnika niti prezimena, ima adresa.	Nema imena vlasnika niti prezimena, ima adresa.	Ima sve te web stranicu.	Ima sve te broj mobitela.	Ima sve te broj mobitela.	Ima sve te broj mobitela i OIB.	Nema ime i prezime vlasnika, ima adresa.
Veterinarski kontrolni broj	L7-2-23	x	L04401	x	R-4631	R-0261	R-0060
Datum proizvodnje	x	x	1.6.-30.6.2024.	x	x	18.5.2025.	x
Rok trajanja (upotrebljivo do)	2.8.2026.	26.7.2027.	5.mjesec 2027.	x	1.1.2027.	Najbolje upotrijebiti u roku 2 godine.	1.4.2027.
Neto količina/masa	450g	250g	450g	450g	900g	900g	900g
Zemlja podrijetla	Hrvatska	Hrvatska	Hrvatska	Hrvatska	Hrvatska	Hrvatska	Hrvatska
Drugi podatci	MED kristalizira, vrcani kestenov med, 20 godina tradicije, navedene prosječne vrijednosti na 100 g (energija, masti, ugljikohidrati, bjelančevina i sol)	Da bi se med vratio u tekuće stanje zagrijete ga do 40°C. Recikliranje: FE40, GL70, AMBALAŽA ZA RECIKLIRANJE	Čuvati na sobnoj temperaturi. Kestenova šuma Samoborskog gorja.	100% organski med. Navedene prosječne vrijednosti na 100 g (energija, masti, ugljikohidrati, bjelančevina i vlakno)	Kristalizacija je prirodno svojstvo meda, a zagrijavanjem do 40°C vračamo ga u prvobitno stanje.	Sastav: vrcani cvjetni med. Prirodni med kristalizira.	Klistalizirani med vraća se u tekuće stanje, zagrijavanjem do 40°C čuvati na sobnoj temperature.

RASPRAVA

U ovom istraživanju analizirano je trinaest uzoraka kestenova meda kako bi se provjerilo odgovaraju li Pravilniku o kakvoći meda. Prema Pravilniku, kestenov med mora sadržavati najmanje 85 % peludi kestena, a u uzorku 5 izmjereno je samo 53 % u prvom mjerenju (M1) i 61 % u drugom (M2), što daje prosjek od 57 %. Peludna analiza pokazala je da tri uzorka (U5, U9 i U11) zapravo ne pripadaju kestenovu medu, iako su tako deklarirani. Ostali uzorci koji zadovoljavaju uvjet imali su udjele peludi kestena između 86 % i 99 %, što se poklapa s rezultatima istraživanja Hrge i sur. (2013). U istraživanju Hrge i sur. (2013) svi uzorci kestenova meda bili su dobiveni samo iz nektara kestena i svi su odgovarali Pravilniku, dok su odstupanja pronađena samo kod meda drugih biljnih vrsta.

Zanimljivo je da je uzorak 2 u samo tri vidna polja imao više od 300 peludi kestena. Razlozi za to nisu posebno istraživani, ali moguće je da pitomi kesten na području Banije i Korduna stvara više peludi ili da pčelar koristi tehniku vrcanja koja u med unosi veće količine peludi.

Udio vode u svim uzorcima bio je ispod 20 %, što je u skladu s Pravilnikom. Najniži udio vode imao je uzorak 5 (15,1 %), a najviši uzorak 2 (19,53 %). U istraživanju Rubinić (2020) samo je jedan uzorak imao više od 20 % vode, dok su u istraživanju Bekavac (2021) svi uzorci bili unutar dopuštenih vrijednosti.

Električna provodnost, koja je važna za prepoznavanje vrsta meda, bila je granična u uzorku 1 (0,798 mS/cm) i preniska u uzorku 5 (0,77 mS/cm), što je ispod vrijednosti propisanih Pravilnikom. U istraživanju Bekavac (2021) svi uzorci imali su provodnost iznad 0,8 mS/cm, dok je u istraživanju Rubinić (2020) nekoliko uzoraka imalo niže vrijednosti.

Osim kemijskih i peludnih analiza, pregledane su i deklaracije. Niti jedna od trinaest deklaracija nije bila potpuno ispravna. Najčešći problem bio je izostanak datuma ili mjeseca proizvodnje (kod devet uzoraka). Na šest deklaracija nije bilo navedenog imena i prezimena proizvođača, a na jednoj nije bila navedena masa ni zemlja podrijetla. Zbog toga se početna pretpostavka da će deklaracije biti ispravne i da će med označen kao kestenov zaista biti kestenov nije potvrdila.

Statistička analiza pokazala je da su prosječne vrijednosti dvaju mjerenja (M1 i M2) uglavnom slične, što znači da su uzorci većinom ujednačeni. Standardna devijacija potvrdila je da su mjerenja u većini slučajeva pouzdana. Neki uzorci (U3, U4, U7, U8, U10 i U12) imali su nisku standardnu devijaciju (od 2,8 do 7,1), što znači da su oba mjerenja bila vrlo slična. Uzorak 5 jako odskače jer je razlika između prvog i drugog mjerenja velika (172 naspram 285), pa je standardna devijacija iznosila čak 79,5. To može upućivati na miješano podrijetlo meda ili pogrešku u brojanju.

Iako su neki uzorci imali visoke standardne devijacije, t-test nije pokazao statistički značajnu razliku između dvaju mjerenja. Razlog je taj što je broj ponavljanja vrlo mali (n = 2), pa t-test može otkriti samo jako velike razlike. Zato se odstupanja vidljiva u standardnoj devijaciji, posebno kod uzorka 5, ne mogu statistički potvrditi. Ipak, u procjeni kvalitete meda takva odstupanja su važna jer mogu ukazivati na neujednačenost uzorka, nepravilnosti u deklariranju ili miješano botaničko podrijetlo. Rezultati ukazuju na potrebu strože kontrole deklariranja i dodatnog podučavanja proizvođača kako bi informacije za potrošače bile jasnije i sigurnije.

ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Botaničko podrijetlo uzoraka meda:

- većina uzoraka prema peludnoj analizi zadovoljava kriterije Pravilnika za kestenov med;
- u većini uzoraka prevladava pelud kestena, što potvrđuje deklarirano botaničko podrijetlo;
- pojedini uzorci odstupaju od propisanog minimuma udjela peludi kestena, a u nekima je zabilježena veća prisutnost peludi drugih biljnih vrsta, što može upućivati na miješano podrijetlo.

2. Fizikalno-kemijska svojstva i usklađenost s Pravilnikom:

- svi uzorci imali su udio vode u granicama propisanima Pravilnikom za kestenov med;
- većina uzoraka imala je električnu provodnost u skladu s propisanim vrijednostima;

- nekoliko uzoraka odstupalo je od očekivanih vrijednosti električne provodnosti, što može biti posljedica tehnoloških nedostataka, nepravilnog skladištenja ili mogućeg miješanja s drugim vrstama meda.

3. Valjanost i pravilnost deklariranja:

- uočena su odstupanja između deklariranog i stvarnog botaničkog podrijetla kod dijela uzoraka;
- određeni broj deklaracija ne sadrži sve propisane podatke prema Pravilniku.

LITERATURA

Bekavac K. 2021. Parametri kvalitete meda od bagrema, lipe i kestena. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:629950, pristupljeno 23.3.2024.

Hosking D., Press B. 1992. Trees of Britain and Europe. Photographic Field Guides, Connaught UK, London.

Hrga I., Stjepanović B. 2013. Melisopalinološke karakteristike najvažnijih vrsta meda u Republici Hrvatskoj. Prilog sa skupa u zborniku, https://www.croris.hr/crosbi/publikacija/prilog-skup/595841, pristupljeno 23.3.2024.

Lažec K. 2025. Uspješno pčelarenje: Od košnice do medene kuhinje. Gospodarski list, Zagreb.

Nikolić T. 2017. Morfologija biljaka: Razvoj, građa i uloga biljnih tkiva, organa i organskih sustava. Alfa, Zagreb, str. 364–408.

NN. 2000. Pravilnik o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda. Narodne novine, https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2000_02_20_280.html, pristupljeno 10.2.2024.

OU. 2018. Zakon o provedbi Opće uredbe o zaštiti podataka. Narodne novine, https://narodnenovine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2018_05_42_805.html, pristupljeno 17.2.2025.

Rubinić V. 2020. Određivanje nekih fizikalno-kemijskih parametara kvalitete bagremovog i kestenovog meda, sezona 2019. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, https://repozitorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf%3A3828, pristupljeno 23.3.2024.

SCRIBD (2025). Uvod u statistiku. Scribd, https://www.scribd.com/document/519329860/1-Uvod-u-statistiku, pristupljeno 17.2.2025.

Bioplastika kao rješenje za održivu budućnost

Marta Miketa, 8. razred

Ljudevita Gaja, Zaprešić
Mentor: *Đurđica Patafta*

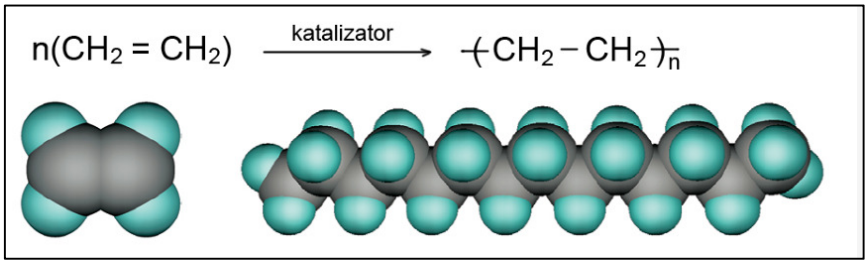
SAŽETAK

U ovom istraživanju ispitivana je mogućnost izrade bioplastike iz lako dostupnih materijala (kukuruzni škrob, voda, glicerol i ocat) te njezina primjena kao ekološki prihvatljive alternative polietenskoj (PE) plastici. Bioplastika je sintetizirana postupkom želatinizacije škroba, uz dodatak plastifikatora i stabilizatora, nakon čega su izrađeni jednostavni odljevi. Ispitana su fizikalna svojstva dobivene bioplastike, uključujući čvrstoću, fleksibilnost, stabilnost u vodi i stabilnost na povišenoj temperaturi te su uspoređena s PE-plastikom. Rezultati pokazuju da bioplastika ima zadovoljavajuću fleksibilnost, ali manju otpornost na vodu i toplinu u odnosu na PE-plastiku. Najznačajniji dio istraživanja odnosi se na biorazgradivost: bioplastika se u tlu razgradila znatno brže od PE-plastike, pri čemu je u vrtnoj zemlji potpuno nestala već nakon nekoliko dana, dok PE-plastika nije pokazala nikakve promjene. Ovi rezultati potvrđuju da škrobna bioplastika ima velik potencijal kao održiva zamjena za dio jednokratnih plastičnih proizvoda te može doprinijeti smanjenju plastičnog otpada i zaštiti okoliša.

Ključne riječi: *škrob; biorazgradnja; polietilen; okoliš; održivost*

UVOD

Plastika je neobnovljiv izvor energije, a njena uporaba rezultira dugotrajnim onečišćenjem okoliša. Zbog toga znanstvenici istražuju nove materijale koji bi mogli biti zamjena plastici dobivenoj iz nafte i njenih derivata (Kumar i sur., 2025). Kumar i sur. (2025) u svom istraživanju opisuju važnost plastike kao dijela suvremenog društva. Pojavljuje se u građevinarstvu, ambalaži, elektrotehnici, automobilskoj industriji, namještaju, poljoprivredi i kućanstvu. Plastika je po kemijskom sastavu polimerna molekula, a sama riječ polimer potječe od grčkih riječi poly, što znači mnogo, i meros što znači dijelovi. Svaka molekula koja sudjeluje u izgradnji polimera je monomer, a proces povezivanja molekula naziva se polimerizacija (Vladušić i sur., 2013). Polimeri se dijele na prirodne i umjetne. Umjetni polimeri uglavnom se proizvode iz ugljikovodika dobivenih frakcijskom destilacijom sirove nafte kao što je prikazano na slici 1. Najjednostavniji je umjetni polimer polieten (kratica PE) koji se dobiva polimerizacijom molekula etena. Vrećice za voće i povrće su upravo izrađene na taj način. Molekule su male gustoće (kratica LDPE), a svaka sadrži oko 500 monomernih jedinica. Takve su vrećice mekane, rastezljive i nisu osobito čvrste. Postoje različite vrsta umjetnih polimera, kao što su još npr. polivinil-klorid, polipropen, polistiren i dr. (Vladušić i sur., 2013).



Slika 1 Polimerizacija etena
Autori: Sikirica M. i Holenda K., 2013

Masovna proizvodnja i spora razgradnja doveli su do ozbiljnih ekoloških problema, uključujući onečišćenje tla, oceana i prehrambenih lanaca. Ghate i sur. (2020) istražili su da je biološka razgradnja polietenske plastike (kratica PE-plastika) u tlu vrlo ograničena. Mikroorganizmi mogu promijeniti samo površinsku strukturu u obliku oksidacijskih i mehaničkih oštećenja. S druge strane, spaljivanjem plastike proizvodi se ugljikov(IV) oksid, metan i druge štetne tvari koji utječu na klimatske promjene

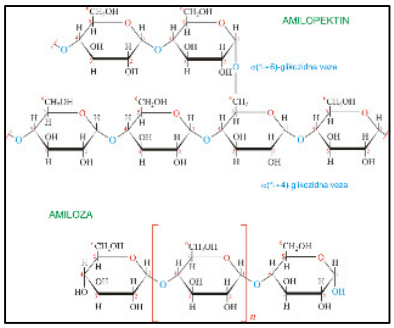
(Kumar i sur., 2025). Kumar i sur. (2025) navode da je bioplastika dobivena iz prirodnih izvora ekološki prihvatljiva zbog svoje brze biorazgradivosti. Može se proizvesti djelovanjem mikroorganizama, iz biljaka (kao što je kukuruzni škrob, celuloza, voćni otpad i sl.), iz morskih algi i morskih trava, mlijeka, otpadnih novina, pilećeg perja, poljoprivrednog otpada i dr. Danas znanstvenici sve više istražuju njeno dobivanje od prirodnih, obnovljivih materijala, a u posljednjih desetak godina objavljena su različita istraživanja koja pokazuju kako je bioplastika dobra zamjena za običnu plastiku.

Vukelić (2020) u svom radu istražuje biopolimere koji se dobivaju od biljaka i životinja. Najzastupljeniji na tržištu dobiveni su iz celuloze, škroba, proteina sirutke, kazeina, proteina soje i dr. Navodi da se biopolimeri u prirodi nalaze u dijelovima tkiva životinja i biljaka, a njihove se strukture sastoje od nekoliko tisuća do nekoliko stotina tisuća monomera povezanih u lance. Neki od njih mogu se vidjeti na slikama 2 i 3. Nisu svi biorazgradivi pa se treba i o njima voditi briga kako ih reciklirati. Vukelić (2020) također navodi da su nove generacije ambalaže od škroba 100 % razgradive i da se od nje izrađuju vreće koje zamjenjuju običnu plastiku.

Slika 2 Primjeri proizvoda iz biorazgradive plastike
Izvor: Pekin Chem, 2021

Slika 3 Biorazgradivi kukuruzni škrob
Izvor: YI FU, 2007

Posebno su zanimljivi postupci dobivanja bioplastike za koje su potrebni lako dostupni sastojci koje imamo u kućanstvima ili se mogu izvoditi u školskim uvjetima. Jedan od jednostavnijih postupaka opisan je u istraživanju Wadea i sur. (2018), koji su eksperimentalno dobili bioplastični film korištenjem škroba, glicerola i octa. Na slici 4 prikazan je kemijski sastav škroba, opće formule $(C_6H_{10}O_5)n$, koji je zapravo smjesa dvaju polisaharida (amiloze i amilopektina) (Generalić, 2024).



Slika 4 Struktura škroba
Izvor: Kemijski riječnik, 2023

Wadea, Choudharija i Punvantwara (2018) upotrebljavali su npr. kukuruzni škrob ili škrob ekstrahiran iz povrća za dobivanje bioplastike. Škrob se miješa s vodom te zagrijava kako bi se potaknulo njegovo bubrenje. Molekule vode ulaze u škrob, prekidaju veze između lanaca amiloze i amilopektina, javlja se povećanje volumena tj. dolazi do bubrenja i nastaje škrobno ljepilo ili gel. Dalje se dodaje glicerol, koji djeluje kao plastifikator i ocat (etanska kiselina), koji pomaže u stabilizaciji strukture, vezanju škrobnih lanaca i poboljšavanju homogenost filma. Smjesa se zagrijava i miješa dok ne postane prozirna i

viskozna. Kada se postigne željena gustoća, ulijeva se u ravnu posudu ili kalup. Površina se poravna kako bi se dobio ujednačen sloj.

Gurunathan i sur. (2025) istraživali su biorazgradivost bioplastike iz kukuruznog škroba u tlu i kompostu tako da su zakopali uzorke u kompost i vrtno tlo, pratili promjene boje i mehanička svojstva plastike tijekom 30 dana. Potvrdili su da se bioplastika izrađena iz kukuruznog škroba značajno razgrađuje u tlu i kompostu, pri čemu se struktura filma postupno raspada djelovanjem mikroorganizama. U kompostu je razgradnja bila najbrža, zbog više temperature, vlage i bogate mikrobiološke aktivnosti. U običnom tlu razgradnja je bila sporija nego u kompostu, ali i dalje jasno vidljiva. U vodi je razgradnja bila minimalna jer nedostaje mikroorganizama. Uzorci su nabubrili, ali nisu pokazali značajan gubitak mase. Zaključili su da škrobna bioplastika ima veliki potencijal kao ekološki prihvatljiv materijal, posebno za jednokratnu ambalažu i proizvode kratkog vijeka trajanja.

S obzirom kako je problem plastičnog otpada jedan od najvećih ekoloških izazova današnjice, ovaj rad ima veliko značenje. Bioplastika je zanimljiva jer se može izraditi od jednostavnih sastojaka koji se nalaze u kućanstvu, a pritom je biorazgradiva. Ovim radom razvija se svijest o zaštiti okoliša, a potiče se inovativna ideja da se u kućanstvima i školama mogu dobiti proizvodi koji bi zamijenili neke plastične potrepštine.

Ciljevi istraživanja su:
1. Eksperimentalno sintetizirati škrobnu bioplastiku korištenjem lako dostupnih materijala (kukuruzni škrob, voda, glicerol i ocat) te opisati proces njezina dobivanja.
2. Proizvesti jednostavne proizvode od bioplastike koji bi se mogli koristiti u kućanstvu ili školi (vrećica, čaša, žlica).
3. Odrediti fizikalna svojstva dobivene bioplastike, uključujući čvrstoću, fleksibilnost i stabilnost, u slučaju njezine uporabe te ju usporediti s plastikom od polietena dobivenog iz plastične vrećice (PE-plastike).
4. Usporediti brzinu biorazgradnje škrobne bioplastike i PE-plastike u humusnom tlu, vrtnoj zemlji i vodi te utvrditi utjecaj mikroorganizama na razgradnju materijala.

Pretpostavke istraživanja su:

- bioplastika se može izraditi od lako dostupnih sastojaka te se može koristiti u kućanstvima za izradu jednostavnih vrećica, čaša, žlica i sl.;
- bioplastika zakopana u humusno tlo ili vrtnu zemlju brže će se razgraditi, a PE-plastika se neće promijeniti;
- bioplastika zakopana u zemlji (humusu) pokazat će vidljive znakove razgradnje (omekšavanje, pucanje, raspadanje), dok PE-plastika u istom razdoblju neće pokazati značajne promjene;
- bioplastika iz škroba bit će podložna djelovanju mikroorganizama u tlu, za razliku od PE-plastike;
- bioplastika brže će se raspadati u vodi, za razliku od PE-plastike.

METODE RADA

Istraživanje je provedeno u kućanstvu tijekom siječnja i veljače 2026. godine.

Izrada bioplastike

Postupak izrade bioplastike eksperimentalno je proveden kao u istraživanjima Wadea i sur. (2018).

Pribor i materijal za dobivanje bioplastike

Potreban pribor sastojao se od: metalne posude od 1 L za zagrijavanje, kuhinjske žlice, menzure od 100 mL, plastične kapaljke, kućne vage (slika 5). Kemikalije potrebne za istraživanje bile su: kukuruzni škrob (Dolcela proizvođača Podravka), alkoholni ocat, glicerin (nabavljen u ljekarni), obična vodovodna voda, prehrambena boja Aromar d.o.o. za bojanje bioplastike. Na slici 5 prikazan je kratak postupak dobivanja.

Slika 5 Pribor i materijal za dobivanje bioplastike te kratki prikaz postupka dobivanja bioplastike

Priprema škrobne smjese

Pomoću menzure je bilo odmjereno 50 mL vodovodne vode koja je prelivena u metalnu posudu za zagrijavanje. U vodu je dodano 10 g kukuruznog škroba i smjesa se miješala žlicom, dok se nije dobila homogena smjesa bez grudica. Voda je omogućila bubrenje škrobnih granula tijekom zagrijavanja.

Dodavanje plastifikatora (glicerina), octa (etanske kiseline) i boje po želji

U smjesu je bilo dodano 5 mL glicerina koji djeluje kao plastifikator, a to znači da povećava savitljivost buduće bioplastike i omogućuje bolju obradivost materijala. Dodalo se i 5 - 6 kapi octa, koji pomaže stabilizirati strukturu škrobne želatine, poboljšava homogenost i doprinosi stvaranju čvršće polimerne mreže. U smjesu se prema želji dodalo i nekoliko kapi prehrambene boje. Ovaj postupak nije naveden u istraživanju Wadea i sur. (2018), već je inovativni dodatak.

Zagrijavanje i početak želatinizacije

Smjesa se zagrijavala uz stalno miješanje. Kako je temperatura rasla, škrobne granule počele su apsorbirati vodu i bubriti. Ovaj proces je vrlo važan za stvaranje bioplastike. Smjesa se zagrijavala dok nije nastala viskozna i prozirna smjesa.

Lijevanje smjese u kalup

Kada se postigla željena gustoća, smjesa se ulila u ravnu posudu ili kalup i rasporedila po površini. Površina se poravnala kako bi se dobio ujednačen sloj. Ovaj korak određuje debljinu i ravnomjernost bioplastičnog filma. Za dobivanje željenih oblika (npr. čaše, posude za cvijeće ili olovaka) koristi se željeni kalup.

Sušenje bioplastike

Kalup se ostavio sušiti na sobnoj temperaturi 24 – 48 sati. Tijekom sušenja voda isparava, a polimerna mreža škroba, glicerina i octa se stabilizira. Nakon potpunog sušenja dobivena bioplastika se mogla pažljivo odvojiti od podloge.

Ispitivanje fizikalnih svojstava dobivene bioplastike

Ispitivanje se provelo kao i kod istraživanja Wadea i sur. (2018). Pripremio se po jedan uzorak bioplastike i plastike PE (dio plastične vrećice za dućan) jednake veličinom. PE-plastika je predstavljala kontrolnu skupinu s kojom su se uspoređivala svojstva dobivene bioplastike. Čvrstoća (tvrdoća i

otpornost na lom) i savitljivost oba uzorka ispitao se metodom savijanja – pri tome se uzorak bioplastike i obične plastike trebaju saviti pod kutom od 90° i zabilježiti ako pucaju. Stabilnost u vodi ispitala se stavljanjem oba uzorka u čašu s vodom tijekom 24 sata, nakon čega su se zabilježile promjene kao što su bubrenje, omekšavanje, raspadanje. Stabilnost na temperaturi ispitala se tako da su se uzorci ostavili na sobnoj temperaturi, a zatim na 50 °C (npr. u pećnici) te se promatrala pojava deformacije ili omekšivanja tijekom 2 sata. Dobiveni podaci sa svim opažanjima unijeti su u tablice za svako pojedino ispitivano svojstvo (tablica 1). U svakoj tablici bilježilo se vrijeme, opis uzoraka i uspoređivala su se svojstva bioplastike s PE-plastikom.

Tablica 1 Fizikalna svojstva bioplastike i polietenske plastike koji se prate u istraživanju

Svojstvo	Metoda ispitivanja
Čvrstoća i fleksibilnost	Savijanje pod kutom 90° bez pucanja
Stabilnost na vodi	Uroniti u vodu 24 h
Stabilnost na toplini	Izlaganje na 50 °C (pećnica)

Na temelju dobivenih rezultata o svojstvima bioplastike i PE-plastike izvedeni su odgovarajući zaključci o čvrstoći, stabilnosti u vodi i na toplini.

Ispitivanje biorazgradivosti dobivene bioplastike

Istraživanje je provedeno na sličan način kao što su ga proveli Gurunathan i sur. (2025). Pripremljeni su jednaki komadići prethodno pripravljene bioplastike te komadići PE-plastike (izrezani dio plastične vrećice). Kao medij za razgradnju koristila se vrtna zemlja, zemlja iz lončanice proizvođača *Florafin* te vodovodna voda.

Za provedbu je bilo potrebno 6 staklenki, vodovodna voda za održavanje vlažnosti tla, žlica, marker za označavanje posudica te bilježnica za sustavno praćenje promjena. Staklenke su bile raspoređene u 3 skupine kao što je prikazano na slici 6.

Slika 6 Pribor za ispitivanje biorazgradivosti bioplastike

U svaku staklenku dodana je jednaka količina vrtne zemlje namijenjene za lončanice kupljene u dućanu. U po jednu staklenku od svake skupine zakopao se uzorak bioplastike, a u drugu uzorak obične plastike. Uzorci zemlje lagano su se navlažili vodom, kako bi se osigurali uvjeti pogodni za razmnožavanje mikroorganizama. Staklenke su se označile markerom (bioplastika i PE-plastika) i ostavile na sobnoj temperaturi kao na slici 6. Tijekom 30 dana bilježe se promjene na svim uzorcima. Prati se pojava omekšavanja plastike, pucanja, promjene boje i sl. Rezultati praćenja brzine razgradnje bioplastike i PE-plastike prate se zasebno fotografiranjem i opisivanjem promjena za svaku vrstu plastike.

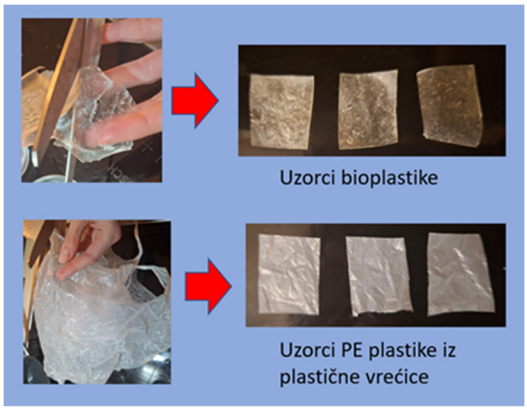
REZULTATI

Dobiveni odljevi od bioplastike

Prema gore opisanom postupku izrađeni su odljevi bioplastike u tankom i debljem sloju kao na slici 7. Najlakše se izrađuju tanki premazi za npr. vrećice, dok deblji lakše pucaju. Tanki slojevi bioplastike po opipu i izgledu sliče PE-plastici (slika 7).

Za ispitivanje fizikalnih svojstava, iz obične PE-plastične vrećice i uzorka dobivene bioplastike izrezana su po tri jednaka komada plastike (slika 8), koji su se koristili u daljnjem istraživanju.

Slika 7 Posušeni tanji i deblji oblici bioplastike



Slika 8 Pripremljeni uzorci za ispitivanje fizikalnih i bioloških svojstava bioplastike i PE plastike

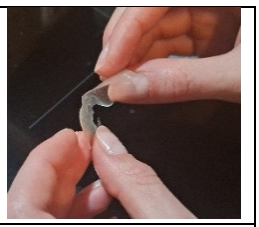
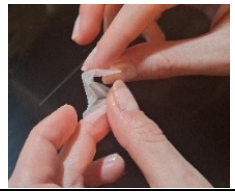
Na slici 9 vide se obojeni odljevi bioplastike dobiveni dodavanjem željene prehrambene boje.

Slika 9 Obojena bioplastika

Ispitivanje fizikalnih svojstva dobivene bioplastike

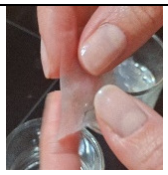
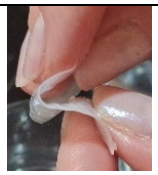
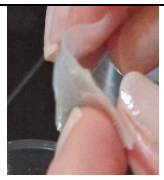
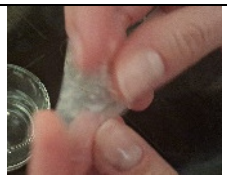
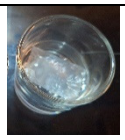
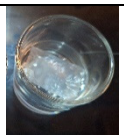
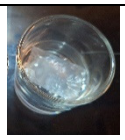
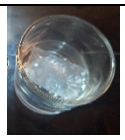
Metodom savijanja pod kutom od 90° bez pucanja obje plastike su se savijale i vraćale u početno stanje (tablica 2).

Tablica 2 Ispitivanje čvrstoće i fleksibilnosti bioplastike u odnosu na PE plastiku

Bioplastika (opažanje) Uzorak bioplastike savija se pod kutom od 90° i vraća se u početno stanje. 			
PE-plastika (opažanje) Uzorak PE plastike savija se pod kutom od 90° i vraća se u početno stanje. 			

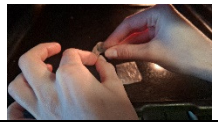
Uzorci bioplastike izložene u vodi tijekom prvih 10 sati pokazali su dobru otpornost, ali njihovo početno svojstvo dosta se izgubilo tijekom 24 sata. Omekšala je, malo odebljala i raspadala se se. PE-plastika je ostala nepromijenjena (tablica 3).

Tablica 3 Ispitivanje stabilnosti bioplastike u vodi

Vrijeme promatranja	Nakon 1 sata	Nakon 5 sata	Nakon 10 sati	Nakon 16 sati	Nakon 24 sata
Bioplastika (opažanje) Uzorak bioplastike pada na dno čaše.	 Ostala je ista, savija se. Debljina je 0,65 mm.	 Ostala je ista, savija se. Debljina 0,72 mm.	 Sličnog je opipa kao i nakon 5 sati. Debljine 0,85 mm.	 Sličnog je opipa i nakon 10 sati, ali je lagano omekšala. 0,91 mm.	 Sličnog je opipa i nakon 16 sati. Mekanija je. Debljine 1,02 mm.
PE-plastika (opažanje) pluta na površini vode	 Ne mijenja se	 Ne mijenja se	 Ne mijenja se	 Ne mijenja se	 Ne mijenja se

Uzorci bioplastike izloženi toplini u pećnici na 50° tijekom 2 sata pokazali su dobru stabilnost na toplinu (tablica 4).

Tablica 4 Ispitivanje stabilnosti bioplastike na toplini

Vrijeme promatranja	Nakon 30 minuta	Nakon 1 sata	Nakon 1,5 sati	Nakon 2 sata
Bioplastika (opažanje) 	Ostala je ista, savija se. 	Ostala je ista, savija se i malo se smanjila u odnosu na PE plastiku. 	Sličnog je opipa i debljine kao i nakon 1 sata, savija se, osjeti se da se lagano stvrdnula. 	Sličnog je opipa i debljine kao i nakon 1,5 sati, i dalje je lagano stvrdnuta. Vraćanjem na sobnu temperaturu ponovno je omekšala. 
PE-plastika (opažanje)	 Ne mijenja se	 Ne mijenja se	 Ne mijenja se	 Ne mijenja se

Rezultati biorazgradivosti bioplastike

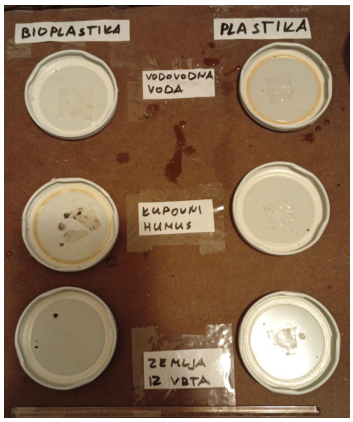
Istraživanje biorazgradivosti plastike postavljeno je 21.1. Nakon 3 dana (24.1.) na PE-plastici nije bilo vidljivih promjena. Bioplastika je omekšala i stanjila se u kupovnom humusu. U vrtnoj zemlji bioplastika se već vidljivo raspadala – primijetila se crna boja na površini (slika 10).

Slika 10 Rezultati biorazgradnje nakon 3 dana praćenja

Nakon 8 dana (29.1.) bioplastika se u vodi počela vidno raspadati. Na bioplastici u kupovnom humusu vidjele su se rupice i bioplastika je bila znatno savitljivija. U vrtnoj se zemlji bioplastika potpuno razgradila i više je nije bilo, dok na PE-plastici nije bilo vidljivih promjena (slika 11).

Slika 11 Rezultati biorazgradnje nakon 3 dana praćenja

Nakon 13 dana (2.2.) PE-plastika nije se promijenila. Bioplastika u vodi raspala se na dva dijela i postala je sluzava na dodir. U kupovnom humusu bioplastika se raspala na više manjih djelića, također je bila savitljiva i sluzava (slika 12).



Slika 12 Rezultati biorazgradnje nakon 12 dana praćenja

Nakon 20 dana (10.2.), u vodovodnoj vodi nije opažena velika promjena bioplastike. I dalje je bila sluzava i savitljiva. U kupovnom humusu vidjeli su se raspadnuti dijelovi bioplastike (slika 13).

Slika 13 Rezultati biorazgradnje nakon 20 dana praćenja

RASPRAVA

Na temelju istraživanja vidi se da je bioplastika dobivena iz kukuruznog škroba primjenjiva u kućanstvu i funkcionalna. Zbog jednostavne izrade i dostupnosti sastojaka bioplastika se može izlijevati u različitim debljinama, što dodatno potiče kreativnost i ekološku osviještenost. Rezultati pokazuju da se bioplastika lakše raspuca u debljem sloju. Zato je ovaj recept primjenjiviji u izradi vrećica za kućanstva što je u skladu s rezultatima Kumar i sur. (2025). To je posljedica njezine strukture jer se škrobna bioplastika sastoji od polisaharidnih lanaca koji nisu međusobno tako snažno povezani kao polietenski lanci u PE-plastici. Za funkcionalniju uporabu treba raditi na recepturi kako izraditi neki kućanski pribor (čvršći ili savitljiviji).

Metodom savijanja pod kutom od 90° utvrđeno je da se i bioplastika i PE-plastika savijaju bez pucanja. Ovaj rezultat pokazuje da dodatak glicerina kao plastifikatora učinkovito povećava fleksibilnost bioplastike, a to je u skladu s istraživanjem Wadea i sur. (2018), koji navode da glicerin smanjuje krutost škrobnih dijelova plastike i omogućuje elastičnost. Rezultati istraživanja pokazuju da se bioplastika ponašala slično PE-plastici, što potvrđuje da je škrobna bioplastika pogodna za izradu tankih, savitljivih predmeta poput vrećica ili tankih folija. Iako je savitljivost zadovoljavajuća, čvrstoća bioplastike ipak je manja od čvrstoće PE-plastike što se vidjelo djelovanjem vode i topline, gdje bioplastika gubi strukturu, dok PE-plastika ostaje nepromijenjena. To je očekivano jer PE-plastika je nerazgradiva i kemijski vrlo stabilna, dok je bioplastika građena od polisaharida koji lako upijaju vodu.

Rezultati bioplastike u vodi pokazuju da tijekom prvih 10 sati zadržava oblik, ali nakon 24 sata postaje mekana i zadebljana. PE-plastika ostaje potpuno nepromijenjena. To dokazuje da je škrob polisaharid koji snažno veže vodu, a njegova struktura lako bubri i tako gubi mehaničku stabilnost. Gurunathan i sur. (2025) također navode da je razgradnja u vodi minimalna, ali dolazi do bubrenja i gubitka mase, što se poklapa s dobivenim rezultatima. Bioplastika se nije potpuno raspala, ali je postala sluzava i mekana, što potvrđuje da voda narušava njezinu polimernu mrežu.

Što se tiče stabilnosti bioplastike na toplinu, pri izlaganju temperaturi od 50 °C pokazala je blage promjene jer se lagano stvrdnula i smanjila, ali nije se raspala. Nakon hlađenja ponovno je omekšala. PE-plastika nije pokazala nikakve promjene što je u skladu s istraživanjem Gurunathan i sur. (2025). Ovakvo ponašanje može se objasniti što škrobna bioplastika ima nižu stabilnost na toplinu od PE-plastike. Glicerol dodatno smanjuje toplinsku otpornost jer povećava pokretljivost molekula. Iako se bioplastika nije rastopila, vidljivo je da toplina utječe na njezinu strukturu, što ograničava njezinu primjenu u toplijim uvjetima.

Iz rezultata biorazgradivosti vidljivo je da se bioplastika najbrže razgradila u vrtnoj zemlji. Već nakon 8 dana gotovo je potpuno nestala. U kupovnom humusu razgradnja je sporija, ali vidljiva (rupice, omekšavanje, raspadanje). Iz rezultata može se zaključiti da u vrtnoj zemlji ima više mikroorganizama koji su brže razgradili uzorak bioplastike. U vodi nije primijećena razgradnja u pravom smislu, već dolazi do sluzavosti, ali ostaje savitljivost. PE-plastika se u svim uvjetima nije promijenila, što potvrđuje njezinu iznimnu otpornost i ekološki problem s kojim se svakodnevno susrećemo. Ovi rezultati u potpunosti se podudaraju s istraživanjem Gurunathana i sur. (2025), koji su također utvrdili da je razgradnja najbrža u kompostu zbog visoke mikrobiološke aktivnosti, a najsporija u vodi. Pojava crne boje, sluzavost i raspadanje ukazuju na aktivnost mikroorganizama koji razgrađuju polisaharidne strukture škroba. Ovo potvrđuje početnu pretpostavku da će se bioplastika brže razgraditi od PE-plastike te da je podložna djelovanju mikroorganizama.

Sve su pretpostavke istraživanja potvrđene. Rezultati potvrđuju da je bioplastika održiva zamjena za kratkotrajne proizvode. U skorijoj budućnosti nerazgardiva plastika na bazi naftnih derivata mogla bi se smanjiti i tako značajno smanjiti onečišćenje okoliša.

ZAKLJUČCI

Provedeno istraživanje pokazalo je sljedeće:

- bioplastika dobivena iz kukuruznog škroba jednostavna je za izradu, ekološki prihvatljiva i biorazgradiva, što je čini dobrom alternativom za jednokratne proizvode;
- u usporedbi s polietenskom plastikom, bioplastika ima manju čvrstoću, slabiju otpornost na vodu i toplinu, ali se zato znatno brže razgrađuje u tlu, osobito u vrtnoj zemlji bogatoj mikroorganizmima;
- PE- plastika tijekom cijelog istraživanja nije pokazala nikakve promjene, što potvrđuje njezinu iznimnu postojanost i objašnjava zašto predstavlja veliki ekološki problem; s druge strane, bioplastika se u svim uvjetima postupno raspadala, a u tlu se potpuno razgradila u vrlo kratkom vremenu.

Dobiveni rezultati potvrđuju sve početne pretpostavke istraživanja i pokazuju da bioplastika ima velik potencijal kao održiva zamjena za dio plastičnih proizvoda, posebno onih kratkog vijeka trajanja. Iako ne može u potpunosti zamijeniti PE-plastiku zbog slabijih fizikalnih svojstava, njezina biorazgradivost čini je važnim materijalom za smanjenje plastičnog otpada i zaštitu okoliša.

LITERATURA

Generalić E. 2024. Škrob – ilustracija. Glossary.periodni.com, https://glossary.periodni.com/preuzimanje_slike.php?name=skrob.png&source=škrob, pristupljeno: 12.1.2026.

Ghatge S., Yang Y., Ahn J.-H., Hur H.-G. 2020. Biodegradation of polyethylene. Applied Biological Chemistry 63: 27.

Gurunathan M. K., Navasingh R. J. H., Selvam J. D. R., Čep R. 2025. Development and characterization of starch bioplastics as a sustainable alternative for packaging. Scientific Reports 15: 221.

Kemijski riječnik. 2023. https://glossary.periodni.com/preuzimanje_slike.php?name=skrob.png&source=škrob, pristupljeno: 12.1.2026.

Kumar A., Kumar V., Kumar V., Kumar R., Rawat D. 2025. Production of bioplastics from biological materials. International Journal of Biology Sciences 7(7): 58–63.

Pekin Chem. 2021.Uvod U PBAT biorazgradive plastike. https://hr.pinjinchemical.com/info/introduction-to-biodegradable-plastics-pbat-55570689.html, pristupljeno: 12.1.2026.

Vukelić T. 2020. Biopolimerni materijali: utjecaj na okoliš i spremnost na korištenje. Diplomski rad. Grafički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Wade R. R., Choudhari A. D., Punvantwar S. 2018. Manufacturing of bioplastic from waste vegetables. International Journal of Trend in Scientific Research and Development 2(3): 112–115.

YI FU. 2007. Biorazgradivi kukuruzni škrob PLA prozirna plastična folija za hranu, pakiranje cvijeća. https://ba.watersoluble-bag.com/biodegradable-bags/biodegradable-bagfilm-for-packaging-flowers/biodegradable-corn-starch-pla-transparent.html, pristupljeno: 12.1.2026.

Utjecaj intenziteta svjetlosti na gustoću puči i razvoj listova zlatnog puzavca

Leona Ralić, 8. razred

OŠ Ljudevita Gaja, Zaprešić
Mentor: *Sanja Kovačić*

SAŽETAK
U ovom istraživanju ispitan je utjecaj različitog intenziteta svjetlosti na gustoću puči i razvoj listova zlatnog puzavca (*Epipremnum aureum* (Linden & André) G.S. Bunting). Šest biljaka podijeljeno je u dvije skupine: tri su uzgajane pri dnevnom svjetlu, a tri u polutami tijekom šest tjedana. Gustoća puči određena je metodom otiska epiderme pomoću prozirnog laka za nokte i mikroskopske analize. Uz gustoću puči praćeni su i broj novonastalih listova, površina listova te intenzitet zelene boje (G vrijednost RGB sustava) analiziran pomoću aplikacije Color Picker. Rezultati su pokazali da su biljke uzgojene na svjetlosti razvile statistički značajno veću gustoću puči u odnosu na biljke u polutami. Zabilježen je veći broj novonastalih listova u skupini uzgojenoj na svjetlosti. Razlika u površini novonastalih listova između skupina je mala, kao i razlika u intenzitetu zelene boje. Dobiveni rezultati potvrđuju da svjetlost ima značajan učinak na gustoću puči i dinamiku rasta zlatnog puzavca, ali neznatan na površinu lista i intenzitet zelene boje.

Ključne riječi: *stomatalni razvoj; površina lista; morfološke prilagodbe*

UVOD

Biljke su tijekom evolucije razvile brojne prilagodbe koje im omogućuju preživljavanje u različitim uvjetima okoliša. Uspješnost rasta i razvoja biljaka ovisi o nizu abiotičkih čimbenika, među kojima se posebno ističu dostupnost vode, temperatura, količina hranjivih tvari u tlu te svjetlost. Svjetlost je jedan od najvažnijih čimbenika jer predstavlja osnovni izvor energije za fotosintezu. Fotosintezom se sunčeva energija pretvara u kemijsku energiju pohranjenu u organskim tvarima, čime se biljkama omogućuje rast, razvoj i stvaranje novih organskih struktura. Bez odgovarajuće količine svjetlosti smanjuje se intenzitet fotosinteze, usporava se rast biljke te se mijenja način razvoja pojedinih biljnih organa, osobito listova (Taiz i Zeiger, 2010; Raven i sur., 2013). Povećana dostupnost svjetlosti, koja omogućuje višu stopu fotosinteze, često dovodi do intenzivnijeg vegetativnog rasta, uključujući brže formiranje novih listova (Taiz i Zeiger, 2010).

List je organ specijaliziran za hvatanje svjetlosti i provođenje fotosinteze. Njegova građa omogućuje učinkovito upijanje svjetlosne energije, ali i izmjenu plinova s okolišem. Tijekom fotosinteze biljci je potreban ugljikov dioksid, dok se kao produkt oslobađa kisik. Istodobno, iz lista se gubi vodena para procesom transpiracije. Stoga se u listu mora održavati ravnoteža između unosa ugljikova dioksida i ograničavanja gubitka vode. Transpiracija je pritom važna i za transport vode i mineralnih tvari te hlađenje biljnih tkiva (Taiz i Zeiger, 2010; Raven i sur., 2013).

Za izmjenu plinova i regulaciju transpiracije ključnu ulogu imaju puči (stome). Puči su mikroskopski otvori na epidermi lista, najčešće smješteni na donjoj strani lista, čime se smanjuje izravna izloženost suncu i pretjerani gubitak vode. Građa epiderme i položaj puči predstavljaju važnu anatomsko-funkcionalnu prilagodbu biljke (Fahn, 1990). Otvaranje i zatvaranje puči ovisi o intenzitetu svjetlosti, temperaturi, koncentraciji ugljikova dioksida, vlažnosti zraka te opskrbljenosti biljke vodom. Poznato je da svjetlost, osobito plavi dio spektra, potiče aktivaciju ionskih pumpi u zapornim stanicama, što dovodi do povećanja turgora i otvaranja puči (Taiz i Zeiger, 2010). U uvjetima tame puči se zatvaraju kako bi se smanjio gubitak vode (Raven i sur., 2013). Ove promjene predstavljaju kratkoročni fiziološki odgovor (Pevalek-Kozlina, 2003).

Osim kratkoročnih promjena u otvorenosti puči, postoje i dugoročne prilagodbe koje se odnose na njihov razvoj i raspored tijekom formiranja lista. Gustoća puči definira se kao broj puči po jedinici

površine (najčešće po mm²) i određuje se tijekom razvoja lista. Ona ovisi o genetskim čimbenicima, ali i o uvjetima okoliša, osobito dostupnosti svjetlosti (Fahn, 1990; Raven i sur., 2013).

Razlike u građi listova razvijenih pri različitim svjetlosnim uvjetima često se opisuju kao razlika između „sunčanih" i „sjenovitih" listova. Sunčani listovi razvijaju se pri jačem osvjetljenju te su često deblji i prilagođeni intenzivnoj fotosintezi, dok su sjenoviti listovi tanji i imaju veću površinu kako bi učinkovitije hvatali svjetlost. U sklopu tih prilagodbi mogu se pojaviti i razlike u gustoći puči. Istraživanja su pokazala da listovi razvijeni pri jačem osvjetljenju često imaju veću gustoću puči (Idris i sur., 2019).

Gay i Hurd (1975) istaknuli su da intenzitet svjetlosti može utjecati na gustoću puči kroz odnos između stvaranja novih puči i širenja lisne plojke. Ako se list brže širi, gustoća puči može se smanjiti unatoč povećanju njihova ukupnog broja. Zato broj puči pokazuje kako se biljka prilagođava svjetlu i drugim uvjetima okoliša.

U novijim istraživanjima istaknuto je da stomatalni razvoj može biti reguliran svjetlošću, no odgovor biljke može biti složen i varirati među vrstama, pa čak i među pojedinim listovima iste biljke. Vráblová i suradnici (2018) pokazali su da intenzitet svjetlosti može utjecati na razvoj puči, ali da promjene ne moraju biti jednake u svim generacijama listova niti na svim dijelovima lista. Takvi rezultati upućuju na složenost utjecaja svjetlosti na stomatalni razvoj te naglašavaju važnost istraživanja u kontroliranim uvjetima, gdje se može jasno usporediti djelovanje različitih svjetlosnih tretmana.

Gustoća puči ima važno biološko značenje jer je izravno povezana s izmjenom plinova i transpiracijom. Veća gustoća puči može omogućiti brži unos ugljikova dioksida i višu stopu fotosinteze, osobito pri jakom osvjetljenju. Međutim, povećan broj puči može dovesti i do većeg gubitka vode, što može biti nepovoljno u sušnim uvjetima. S druge strane, manja gustoća puči može smanjiti transpiraciju, ali istodobno ograničiti unos ugljikova dioksida i usporiti fotosintezu. Stoga se gustoća puči može promatrati kao važna prilagodba biljke na okolišne uvjete i kao mehanizam održavanja ravnoteže između učinkovitosti fotosinteze i očuvanja vode (Taiz i Zeiger, 2010; Raven i sur., 2013).

Osim promjena u gustoći puči, različiti svjetlosni uvjeti mogu utjecati i na građu te izgled listova. U jačem svjetlu listovi se često razvijaju deblji i prilagođeni intenzivnijoj fotosintezi, dok su listovi razvijeni u slabijem svjetlu tanji i često veće površine kako bi povećali učinkovitost hvatanja svjetlosti. Fan i suradnici (2013) istaknuli su da intenzitet svjetlosti može utjecati na debljinu lista te na određena stomatalna obilježja. Promjene u svjetlosnim uvjetima mogu biti povezane i s promjenama u sadržaju biljnih pigmenata. Rezai i suradnici (2018) navode da smanjenje intenziteta svjetlosti može dovesti do promjena u količini klorofila i karotenoida, što se može odraziti na vizualnu boju lista. Zbog toga je, uz gustoću puči, opravdano pratiti i dodatne pokazatelje razvoja listova, poput veličine listova i intenziteta zelene boje.

U ovom istraživanju proučavan je utjecaj različitog intenziteta svjetlosti na gustoću puči novonastalih listova zlatnog puzavca (*Epipremnum aureum*). Zlatni puzavac je česta sobna biljka poznata po otpornosti i sposobnosti prilagodbe različitim svjetlosnim uvjetima, uključujući svjetlo i polusjenu (Hessayon, 2008). Relativno veliki, čvrsti i glatki listovi ove vrste olakšavaju izradu otisaka epiderme, a jasno vidljive puči na povećaju 100 x omogućuju jednostavnu mikroskopsku analizu i pouzdano brojanje puči. Navedene karakteristike predstavljaju razloge zbog kojih je zlatni puzavac odabran za ovo istraživanje. Metoda izrade otisaka pomoću prozirnog laka za nokte i ljepljive trake predstavlja jednostavan i pristupačan postupak prikladan za provedbu u školskim uvjetima. Time je omogućeno promatranje i prebrojavanje puči pod svjetlosnim mikroskopom te dobivanje brojčanih podataka pogodnih za usporedbu.

Ispitivanjem utjecaja svjetlosnih uvjeta na razvoj puči tijekom formiranja novih listova može se doprinijeti razumijevanju biljnih prilagodbi na okolišne čimbenike. Uz gustoću puči, praćeni su i veličina listova, intenzitet zelene boje te broj novonastalih listova kako bi se dobila cjelovitija slika razvoja biljke u različitim uvjetima osvjetljenja.

Ciljevi istraživanja:

- ispitati utjecaj različitog intenziteta svjetlosti na gustoću puči novonastalih listova zlatnog puzavca
- ispitati utjecaj svjetlosnih uvjeta na veličinu novonastalih listova
- ispitati utjecaj svjetlosnih uvjeta na broj i boju novonastalih listova tijekom šest tjedana.

Pretpostavke istraživanja su:

- Novonastali listovi razvijeni u polutami imat će manju gustoću puči (puči/mm²) u odnosu na novonastale listove razvijene pri dnevnom svjetlu.
- Gustoća puči na novonastalim listovima nakon tretmana polutame i svjetla bit će različita u odnosu na početno (kontrolno) mjerenje.
- Novonastali listovi razvijeni u polutami imat će manju površinu lisne plojke u odnosu na listove razvijene pri dnevnom svjetlu.
- Novonastali listovi razvijeni u polutami imat će nižu G vrijednost (svjetliju nijansu zelene boje) u odnosu na listove razvijene pri dnevnom svjetlu.
- Biljke uzgajane pri dnevnom svjetlu tijekom šest tjedana razvit će veći broj novonastalih listova u odnosu na biljke uzgajane u polutami.

METODE RADA

U istraživanju je korišteno šest biljaka zlatnog puzavca (*Epipremnum aureum* (Linden & André) G.S.Bunting) uzgojenih u jednakim posudama (slika 1). Biljke su nabavljene iz komercijalnog vrtnog centra te su prije početka pokusa smještene u jednake uvjete unutarnjeg prostora. Početno mjerenje gustoće puči provedeno je prije početka svjetlosnog tretmana kako bi se provjerila usporedivost skupina. Kao materijal i pribor korišteni su: jednake posude i supstrat, prozirni lak za nokte, prozirna ljepljiva traka, predmetna stakalca, svjetlosni mikroskop (ukupno povećanje 100×), papirnati ručnici te tablica za bilježenje podataka.

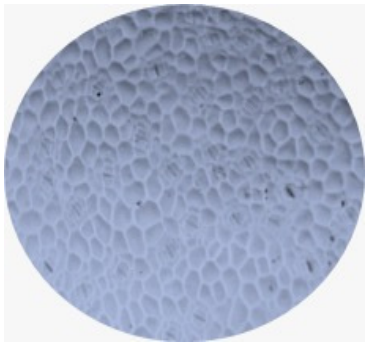
Slika 1 Biljke zlatnog puzavca korištene u istraživanju

Na početku istraživanja uzeti su otisci epiderme postojećih listova kako bi se odredilo početno stanje gustoće puči (slika 2). Za svaku biljku analizirana su tri postojeća lista slične veličine radi dobivanja pouzdanijeg prosjeka.

Otisci epiderme dobiveni su nanošenjem tankog sloja prozirnog laka za nokte na središnji dio donje strane plojke lista. Nakon sušenja laka (oko 5 minuta), preko osušenog sloja zalijepljena je prozirna ljepljiva traka, koja je zatim pažljivo uklonjena kako bi se dobio otisak epiderme s pučima. Traka s otiskom zalijepljena je na predmetno stakalce.

Slika 2 Početno brojanje puči

Preparati su promatrani svjetlosnim mikroskopom pri ukupnom povećanju 100× (objektiv 10×, okular 10×) (slika 3).



Slika 3 Puči zlatnog puzavca promatrane svjetlosnim mikroskopom pri povećanju 100×

Na svakom otisku prebrojan je broj puči u deset vidnih polja koja se nisu međusobno preklapala. Promjer vidnog polja (FOV) izračunan je prema formuli:

FOV (mm) = FN (mm) / povećanje objektiva

Kao FN (Field Number) korišteno je 18 mm (DIN/18), a objektiv povećanja 10×. Dobiven je promjer vidnog polja od 1,8 mm. Površina vidnog polja izračunana je prema formuli za površinu kruga:

$P = \pi \cdot (D/2)^2$

Dobivena površina iznosila je približno 2,54 mm². Gustoća puči izražena je kao broj puči po mm² i izračunata prema formuli:

gustoća puči = broj puči / 2,54 mm²

Nezavisna varijabla u istraživanju bili su svjetlosni uvjeti (svjetlost i polutama), dok je zavisna varijabla bila gustoća puči na novonastalim listovima (broj puči po mm²). Kontrolirane varijable uključivale su vrstu biljke, broj biljaka u skupinama, trajanje pokusa (6 tjedana), temperaturu, količinu vode, jednake posude i supstrat te jednak postupak izrade otisaka i brojanja puči.

Nakon početnog mjerenja biljke su podijeljene u dvije skupine i izložene različitim svjetlosnim uvjetima tijekom šest tjedana. Prvu skupinu činile su tri biljke uzgajane pri dnevnom svjetlu, a drugu skupinu tri biljke uzgajane u polutami. Temperatura i količina vode bile su jednake za obje skupine.

Nakon tretmana analizirana su dva novonastala, potpuno razvijena list po biljci (ukupno dvanaest listova). Otisci su uzimani s donje strane listova (donja epiderma). Broj puči prebrojan je u deset vidnih polja na svakom otisku.

Nakon tretmana izmjerene su duljina i širina novonastalih lista sa svake biljke. Mjerena je isključivo lisna plojka (bez peteljke). Površina plojke procijenjena je prema empirijskoj formuli koja se koristi u botaničkim procjenama površine lista:

$P \approx 0{,}785 \times \text{duljina} \times \text{širina}$

Faktor 0,785 predstavlja približnu vrijednost $\pi/4$ i proizlazi iz formule za površinu elipse, budući da plojka lista približno odgovara eliptičnom obliku.

Intenzitet zelene boje određen je analizom G vrijednosti (zelena komponenta RGB sustava) pomoću aplikacije Color Picker. Listovi su fotografirani mobitelom pod istim uvjetima dnevnog osvjetljenja uz istu bijelu pozadinu. Na svakom listu provedeno je sedam mjerenja na središnjim dijelovima plojke, a za analizu je korištena prosječna G vrijednost po listu.

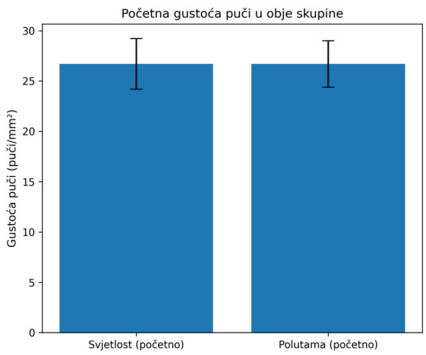
Izračunate su prosječne vrijednosti gustoće puči po biljci i po skupini te je provedena usporedba između skupina i u odnosu na početno stanje. Rezultati su prikazani tablično i grafički.

Za usporedbu prosječnih vrijednostii između skupina korišten je Studentov t-test za nezavisne uzorke. Razina statističke značajnosti postavljena je na $p < 0{,}05$.

REZULTATI

Prije početka tretmana izmjerena je gustoća puči na listovima svih šest biljaka kako bi se usporedile dvije skupine. Dobiveni rezultati pokazali su da između biljaka predviđenih za uzgoj na svjetlosti i biljaka za uzgoj u polutami nije postojala razlika u početnoj gustoći puči.

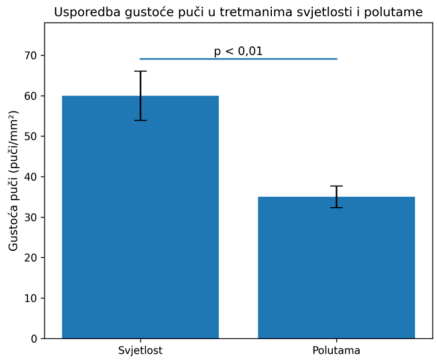
Prosječna vrijednost u obje skupine iznosila je 26,7 puči po vidnom polju. Kao što je prikazano na slici 4, početne vrijednosti gotovo su jednake. Standardna devijacija u obje skupine bila je niska (svjetlost: ± 2,52; polutama: ± 2,31).



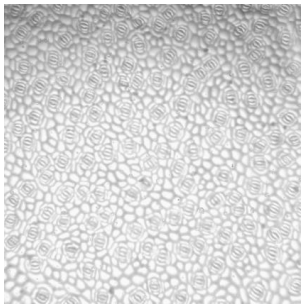
Slika 4 Početna gustoća puči u skupini biljaka predviđenih za uzgoj na svjetlosti i u polutami

Nakon razdoblja tretmana, biljke uzgojene na svjetlosti imale su prosječnu gustoću puči od 60 ± 6,08 puči/mm², dok je u skupini uzgajanoj u polutami prosječna vrijednost iznosila 35 ± 2,65 puči/mm² (slika

5). Razlika između skupina bila je statistički značajna ($t = 6,53$; $p < 0,01$). U odnosu na početno mjerenje (26,7 puči po vidnom polju), gustoća puči povećala se u obje skupine, no povećanje je bilo znatno izraženije u tretmanu svjetlosti. Gustoća puči biljke koja je izložena tretmanu svjetlosti prikazan je na slici 6.



Slika 5 Prosječna gustoća puči na novonastalim listovima biljaka uzgojenih na svjetlosti i u polutami nakon tretmana



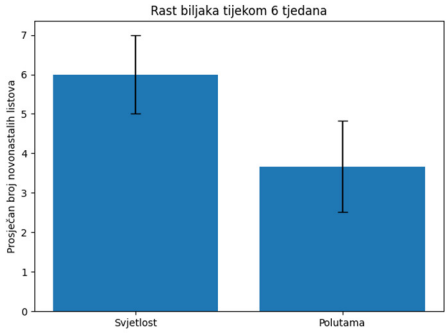
Slika 6 Gustoća puči na novonastalim listovima biljake uzgojene na svjetlosti

Tijekom šest tjedana praćen je broj novonastalih listova kod svih biljaka. Podaci su prikazani u tablici 1. Biljke izložene svjetlosti razvile su u prosjeku 6 novih listova, dok su biljke u polutami razvile prosječno 3,7 novih listova.

Tablica 1 Broj novonastalih listova tijekom šest tjedana

Biljka	Svjetlosni uvjeti	Broj listova
1	svjetlost	7
2	svjetlost	5
3	svjetlost	6
4	polutama	3
5	polutama	5
6	polutama	3

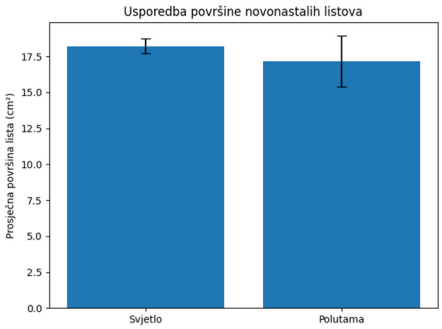
Kao što je prikazano na slici 7, rast je bio izraženiji u skupini izloženoj svjetlosti.



Slika 7 Prosječan broj novonastalih listova u skupini biljaka uzgojenih na svjetlosti i u polutami tijekom šest tjedana (prikazane su srednje vrijednosti ± SD)

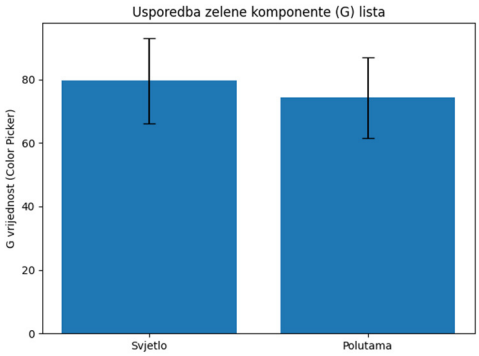
U skupini biljaka izloženih svjetlu prosječna površina novonastalih listova iznosila je 18,21 cm². Pojedinačne vrijednosti po biljkama bile su 17,8 cm², 18,04 cm² i 18,8 cm². U skupini biljaka uzgojenih u polutami prosječna površina novonastalih listova iznosila je 17,15 cm², pri čemu su pojedinačne vrijednosti bile 15,25 cm², 18,75 cm² i 17,47 cm².

Razlika između skupina iznosila je 1,06 cm² u korist biljaka izloženih svjetlosti (slika 8). t-testom za nezavisne uzorke nije utvrđena statistički značajna razlika u površini listova između skupina (t = 0,99; p = 0,41).



Slika 8 Prosječna površina novonastalih listova biljaka uzgojenih na svjetlu i u polutami. Prikazane su srednje vrijednosti ± SD.

Tijekom istraživanja izmjerena je i G vrijednost (zelena komponenta RGB sustava) kao pokazatelj intenziteta zelene boje listova. Za svaki list provedeno je sedam mjerenja u središnjem dijelu plojke, izračunat je prosjek po listu, a zatim prosjek po skupini (n = 3 biljke). Prosječna G vrijednost listova biljaka uzgojenih na svjetlu iznosila je 79,6 ± 13,5 (SD), dok je u polutami iznosila 74,23 ± 12,7 (SD). t-testom za nezavisne uzorke nije utvrđena statistički značajna razlika između skupina (t = 0,50; p = 0,646) (slika 9). Vizualna usporedba boje listova biljaka uzgojenih na svjetlu i biljaka uzgojenih u polutami prikazana je na slici 10.



Slika 9 Prosječna G vrijednost (intenzitet zelene boje) listova biljaka uzgojenih na svjetlosti i u polutami. Prikazane su srednje vrijednosti ± SD

Slika 10 Usporedba boje listova biljaka uzgojenih na svjetlu i polutami

RASPRAVA

Rezultati su pokazali statistički značajnu razliku u gustoći puči između tretmana svjetlosti i polutame. Ovakav rezultat u skladu je s navodima Raven i sur. (2013) te Taiz i Zeiger (2010), koji ističu da se gustoća puči određuje tijekom razvoja lista i da može biti pod utjecajem okolišnih čimbenika, osobito intenziteta svjetlosti. Dobiveni podaci potvrđuju da svjetlost ne utječe samo na kratkoročno otvaranje puči, već i na njihovu raspodjelu tijekom formiranja lista.

U odnosu na početno mjerenje, povećanje gustoće puči zabilježeno je u obje skupine. Budući da su analizirani novonastali listovi, takav je rezultat očekivan jer se tijekom razvoja lista prirodno formiraju nove puči. Međutim, porast je bio znatno izraženiji u skupini uzgojenoj na svjetlosti, što upućuje na razvojnu prilagodbu lista uvjetima pojačanog osvjetljenja. Povećana gustoća puči u uvjetima jačeg svjetla može se protumačiti kao prilagodba biljke na veću potrebu za izmjenom plinova u uvjetima intenzivnije fotosinteze, što je u skladu s rezultatima Idris i sur. (2019) te Gay i Hurd (1975).

Gustoća puči predstavlja broj puči po jedinici površine lista, pa ovisi ne samo o stvaranju novih puči, već i o širenju lisne plojke. U ovom istraživanju prosječna površina novonastalih listova bila je nešto veća u skupini uzgojenoj na svjetlosti (18,21 cm^2) u odnosu na polutamu (17,15 cm^2), no ta razlika nije bila statistički značajna ($p = 0,41$). Time se može zaključiti da veći broj puči nije povezan s veličinom lista nego s utjecajem svjetlosti na njihov rast što potvrđuje rezultate Gay i Hurd (1975) da intenzitet svjetlosti može izravno utjecati na razvoj puči, neovisno o ukupnoj veličini lista.

Uz promjene u gustoći puči, biljke uzgojene na svjetlosti razvile su veći broj novih listova tijekom šest tjedana, što upućuje na intenzivniji rast u uvjetima veće dostupnosti svjetlosti. Takav rezultat u skladu je s općim fiziološkim načelima prema kojima povećana količina svjetlosti omogućuje veću fotosintetsku aktivnost i potiče rast biljke (Taiz i Zeiger, 2010).

Analiza intenziteta zelene boje listova (G vrijednost) također nije pokazala statistički značajnu razliku između skupina ($p = 0,646$) premda se vizualno primjećuje blago tamnija boja novonastalih listova kod biljaka izloženih svjetlosti. Iako su u literaturi opisane promjene u sadržaju pigmenata pod različitim svjetlosnim uvjetima (Rezai i sur., 2018), u ovom istraživanju takve razlike su djelomično potvrđene korištenom metodom mjerenja. Na rezultat mogu utjecati i tehnički čimbenici, poput osvjetljenja pri fotografiranju ili položaja lista. Vráblová i sur. (2018) ističu da odgovor stomatalnog razvoja i listnih svojstava na svjetlost može biti složen i ovisan o vrsti, što može objasniti izostanak jasne promjene boje u ovom pokusu.

Dobiveni rezultati pokazali su povećanje gustoće puči u tretmanu svjetlosti i polutame u odnosu na početnu mjerenje, što upućuje na to da su biljke prije tretmana bile u umjerenim ili slabijim svjetlosnim uvjetima. Time se potvrđuje da promjena intenziteta svjetlosti tijekom pokusa ima snažan razvojni učinak na formiranje puči.

Ograničenje istraživanja predstavlja mali broj uzoraka ($n = 3$ po skupini) te činjenica da je intenzitet zelene boje određen mobilnom aplikacijom, što ne može u potpunosti zamijeniti laboratorijske metode određivanja sadržaja klorofila. Unatoč tome, rezultati jasno potvrđuju da svjetlost ima značajan utjecaj na razvoj puči, dok su promjene u veličini lista i intenzitetu zelene boje bile manje izražene i statistički neznačajne kod vrste *Epipremnum aureum.*

Promatrani rezultati pokazuju da se prilagodba zlatnog puzavca povećanom intenzitetu svjetlosti prvenstveno očituje kroz anatomske promjene (povećanje gustoće puči) i ubrzani vegetativni rast (veći broj novonastalih listova), dok morfološka obilježja pojedinog lista, poput njegove površine i intenziteta zelene boje, u uvjetima ovog istraživanja, nisu pokazala statistički značajne promjene. Time

se može zaključiti da svjetlost u ovom istraživanju snažnije utječe na razvojne i anatomske prilagodbe lista nego na promjene njegove ukupne veličine ili boje.

ZAKLJUČCI

Rezultati istraživanja pokazali su da intenzitet svjetlosti statistički značajno utječe na gustoću puči kod zlatnog puzavca (*Epipremnum aureum*). Biljke uzgojene na svjetlosti razvile su znatno veću gustoću puči u usporedbi s biljkama uzgojenima u polutami. U odnosu na početno mjerenje, povećanje gustoće puči zabilježeno je u obje skupine, no porast je bio izraženiji u tretmanu svjetlosti, što pokazuje da ječe svjetlo potiče stvaranje većeg broja puči.

U odnosu na postavljene pretpostavke, potvrđena je pretpostavka da će novonastali listovi razvijeni u polutami imati manju gustoću puči u odnosu na listove razvijene pri dnevnom svjetlu. Također je potvrđena pretpostavka da će biljke uzgajane pri dnevnom svjetlu razviti veći broj novih listova tijekom šest tjedana, što upućuje na intenzivniji rast u uvjetima veće dostupnosti svjetlosti.

Pretpostavke vezane uz promjene u veličini listova i intenzitetu zelene boje su djelomično potvrđene. Iako su listovi biljaka uzgojenih na svjetlosti u prosjeku bili malo veći, razlika nije statistički značajna. Također, analiza G vrijednosti (intenzitet zelene boje) nije pokazala statistički značajnu razliku između tretmana. Time se može zaključiti da je svjetlost u uvjetima ovog pokusa imala neznatan utjecaj na površinu lista i na intenzitet zelene komponente boje.

Potvrđena je pretpostavka prema kojoj će gustoća puči u tretmanu polutame i svjetla bit različita nego u početnom mjerenju, budući da je zabilježeno povećanje gustoće puči u oba tretmana. To ukazuje na to da se tijekom razvoja novih listova prirodno formiraju nove puči, dok intenzitet svjetlosti utječe na opseg tog povećanja.

Zaključno, rezultati potvrđuju da svjetlost ima snažan razvojni učinak na anatomska svojstva lista, osobito na formiranje puči, dok su promjene u morfološkim svojstvima (površina lista) i intenzitetu zelene boje bile manje izražene i statistički neznačajne u uvjetima ovog istraživanja.

LITERATURA

Fan X. X., Xu Z. G., Liu X. Y., Tang C. M., Wang L. W., Han X. L. 2013. Effects of light intensity on the growth and leaf development of young tomato plants grown under a combination of red and blue light. Scientia Horticulturae 153: 50–55.

Fahn A. 1990. Plant Anatomy. Pergamon Press, Oxford, New York.

Gay A. P., Hurd R. G. 1975. The influence of light on stomatal density in the tomato. New Phytologist 75: 37–46.

Hessayon D. G. 2008. The House Plant Expert. Sterling Publishing Company, Inc., New York.

Idris A., Linatoc A. C., Bakar M. F. B. A. 2019. Effect of light intensity on the photosynthesis and stomatal density of selected plant species of Gunung Ledang, Johor. Malaysian Applied Biology 48(3): 133–140.

Pevalek-Kozlina B. 2003. Fiziologija bilja. Sveučilište u Zagrebu, Profil, Zagreb.

Raven P. H., Evert R. F., Eichhorn S. E. 2013. Biology of Plants. W.H. Freeman and Company, New York.

Rezai S., Etemadi N., Nikbakht A., Yousefi M., Majidi M. M. 2018. Effect of light intensity on leaf morphology, photosynthetic capacity and chlorophyll content in sage (*Salvia officinalis* L.). Horticulture Science and Technology 36: 46–57.

Taiz L., Zeiger E. 2010. Plant Physiology. Sinauer Associates, Sunderland.

Vráblová M., Hronková M., Šantrůček J. 2018. Light intensity-regulated stomatal development in three generations of *Lepidium sativum*. Environmental and Experimental Botany 156: 316–324.

Alergijski potencijal urbane invazivne flore grada Požege

Patrik Zima, 8. razred

OŠ Antuna Kanižlića, Požega
Mentor: *Ana Perić*

SAŽETAK
Pod pojmom invazivne biljke misli se na unesene, strane invazivne biljke koje su se naturalizirale, prilagodile novom staništu i pokazuju izrazitu sposobnost širenja. Šire se namjerno ili kao slučajni pratitelji različitih ljudskih aktivnosti. Mogu uzrokovati znatne štete u okolišu te ugrožavati zdravlje ljudi. Velik broj invazivnih biljaka nalazi se u urbanim područjima i pri tome su i alergene. Kako bi se pokušao procijeniti alergijski potencijal biljaka urbanog područja predložen je alergijski indeks. Ciljevi istraživanja bili su utvrditi brojnost invazivnih biljnih vrsta na pojedinim lokalitetima u gradu Požegi, izračunati alergijski potencijal zabilježenih biljnih vrsta te utvrditi potencijalni utjecaj alergijskih invazivnih biljaka na čovjeka. Tijekom 2025. godine provedena su terenska istraživanja na četiri lokaliteta u gradu Požegi s ciljem utvrđivanja procjene brojnosti i pokrovnosti invazivnih biljnih vrsta i određivanja njihova alergijskog potencijala. Alergijski potencijal invazivnih biljka u Požegi izračunat je prema formuli koju je prvi primijenio Hruska, 2003. Na četiri lokaliteta ukupno je zabilježena 21 invazivna biljna vrsta. Nakon izračuna alergijskog indeksa za sve invazivne vrste s istraživanih lokaliteta proizlazi da šest invazivnih vrsta ima visok alergijski potencijal, trinaest vrsta je svrstano u kategoriju s umjerenim alergijskim potencijalom, a dvije vrste imaju mali alergijski potencijal. Vrste s najvišim alergijskim potencijalom su: *Sorghum halepense* (L.) Pers., *Reynoutria japonica* Houtt, *Robinia pseudoacacia* L., *Ambrosia artemisiifolia* L., *Solidago canadensis* L. i *Phytolacca americana* L.

Ključne riječi: *alergijski indeks; invazivne biljke; alergenost; Slavonija*

UVOD

Pod invazivnim vrstama podrazumijevaju se one vrste koje potječu iz drugih florno geografskih područja te potiskuju autohtone vrste. Najčešće se šire kao slučajan pratitelj različitih ljudskih aktivnosti (Richardson i Pyšek, 2006). Zauzimaju urbana i ruralna staništa, a potom se šire i u prirodna staništa. Invazivne vrste mogu uzrokovati niz problema kao što su štete u poljoprivredi, u ribnjacima, ali što je najvažnije i ugrožavati zdravlje ljudi. Prema Bukvić i sur. (2021) u Europu je uneseno 28 biljnih vrsta koje imaju negativan učinak na zdravlje ljudi. Utjecaj na ljudsko zdravlje najčešće se očituje u izazivanju različitih alergija.

U Požeškoj kotlini do sada je utvrđeno 1 588 biljnih svojti (Tomašević, 2016), a od ukupnog broja 43 vrste navode se kao invazivne (Samardžić i Galić, 2019). Određivanje biljnih vrsta obavlja se na terenu pomoću „ključeva za određivanje“ koji mogu biti slikovni ili tekstualni, a u novije vrijeme za određivanje vrsta služe i digitalne tehnologije. Neke invazivne biljne vrste mogu uzrokovati alergije kod ljudi. Alergije su često burne reakcije imunološkog sustava na inače bezopasne tvari iz okoliša koje se nazivaju alergeni. Alergeni mogu biti pelud, životinjske dlake ili neke vrste hrane. O biljnim vrstama uzročnicama peludnih alergija u Požegi i okolici pisali su Petrić i Tomašević (2003). Sve veći broj ljudi koji imaju problema sa alergijama doveo je do porasta znanstvenih istraživanja alergijskog potencijala biljaka pa tako i invazivnih biljka koje se nalaze u gradovima ili u područjima neposredno uz gradove. Alergijski indeks je prvi put predložen 2003. godine kako bi se pokušao procijeniti alergijski potencijal biljaka urbanog područja u gradu Jesi u Italiji (Hruska, 2003). Za izračun alergijskog indeksa pojedine biljne svojte zastupljene na istraživanom području, korišteni su sljedeći pokazatelji: životni ciklus biljaka (jednogodišnje, dvogodišnje svojte ili trajnice), duljina cvjetanja, križna reakcija (prisutna ili odsutna) i zastupljenost svojte na istraživanom području. Slična istraživanja i dalje su vrlo rijetka i malobrojna

(Ciferri i sur., 2006; Petrović i sur., 2025). Praćenje pojavnosti alergene peludi u urbanim sredinama dio je javnozdravstvenog ekološko - preventivnog sustava (Petrović i sur., 2025). U posljednjih nekoliko godina veliki značaj pridaje se istraživanjima alergene flore i alergijskog potencijala urbanih zelenih i javnih površina. Alergije ne izazivaju sve vrste peludi, a da bi se izazvali simptomi alergije neophodno je da peludna zrnca dođu do respiratorne sluznice čovjeka. Pelud visoke alergenosti najčešće proizvode drvenaste vrste i trave (Vucić, 2021). Budući da peludne alergije uzrokuju brojne zdravstvene poteškoće i smanjuju kvalitetu života, ovim istraživanjem odredit će se broj vrsta i brojnost invazivnih biljaka na području Požege i procijeniti njihovu alergenost prema metodi koju je prvi predložio Hruska (2003). Vucić (2021) navodi da je alergijski potencijal pojedine biljne vrste sposobnost njezinog peluda da izazove alergijsku reakciju kod dijela stanovništva te da alergija obuhvaća širok spektar bolesti, od kojih su mnoge vrlo česte, poput alergijskog rinitisa, alergijske astme, atopijskog dermatitisa, urtikarije i kontaktnih alergija. Danas se smatra da su alergije postale najčešća kronična bolest u Europskoj uniji.

Ciljevi istraživanja su:

- istražiti brojnost invazivnih biljnih vrsta na pojedinim lokalitetima u gradu Požegi;
- izračunati alergijski potencijal zabilježenih biljnih vrsta;
- utvrditi potencijalni utjecaj alergijskih invazivnih biljaka na čovjeka.

Pretpostavke su:

- brojnost invazivnih biljaka u gradu Požegi velika je i ovisi o lokalitetima;
- invazivne biljke urbanog područja Požege imaju visok alergijski potencijal.

METODE RADA

Terenska istraživanja provedena su na području grada Požege u vegetacijskoj sezoni tijekom 2025. godine s ciljem utvrđivanja procjene brojnosti i pokrovnosti invazivnih biljnih vrsta. Terenska istraživanja izvršena su pet puta tijekom vegetacijske sezone i to: 20. travnja, 18 svibnja., 21. lipnja, 19.srpnja i 23. kolovoza. Tijekom rada korištene su standardne metode u floristici kao što je proučavanje literature o prethodno zabilježenim invazivnim biljnim vrstama te njihovo fotografiranje. Determinacija biljnih vrsta obavljena je pomoću literature o invazivnim i alergijskim biljnim vrstama (Petrić i Tomašević, 2003; Nikolić i sur. 2014; Samardžić i Galić, 2019). Prema navedenoj literaturi određena je i duljina životnog ciklusa i duljina cvjetanja. Procjena brojnosti i pokrovnosti vrsta invazivnih biljaka na istraživanom području provedena je subjektivnom procjenom putem Braun-Blanquet-ove skale (Braun- Blanquet, 1964), a procjena se odnosi na sve lokalitete zajedno. Procjena alergijskog potencijala biljaka dobivena je zbrajanjem određenih vrijednosti životnog ciklusa, duljine cvjetanja, mogućnosti križne reakcije te brojnosti i pokrovnosti pojedine vrste temeljem formule koju je prvi upotrijebio Hruska (2003). Pri izračunu alergijskog indeksa životni ciklus određen je na način da su jednogodišnje biljke ocijenjene sa 1, dvogodišnje sa 2, a višegodišnje sa 3. Ako im je duljina cvatnje kraća od jednog mjeseca dobivale su vrijednost 0,5, ako je duljina cvatnje dulja od jednog mjeseca dobivale su vrijednost 2. Biljke koje pokazuju križnu reakciju dobile su vrijednost 1, a one biljke kod kojih križna reakcija nije prisutna vrijednost 0 (tablica 1). Pri procjeni brojnosti i pokrovnosti rijetke biljke (< 1) ocijenjene su sa 0,5. Ako pokrivaju 1–25 % dobile su ocjenu 1. Ako pokrivaju 25–50 % dobile su ocjenu 2, one koje pokrivaju 50–75 % ocjenu 3, a one koje pokrivaju 75–100 % ocjenu 4 (tablica 2).

U konačnici izračunat je alergijski indeks koji pokazuje koliko je pojedina invazivna biljna vrsta na području Požege potencijalno opasna kao alergena za stanovnike grada i okolice. Alergijski potencijal je izračunat na način da su se zbrojile sve vrijednosti za pojedinu biljku. Ako je ukupni zbroj manji od 3, vrste imaju mali alergijski potencijal, ako je ukupni zbroj 4–6 vrste su s umjerenim alergijskim potencijalom. Vrste s velikim alergijskim potencijalom predstavljaju one čiji je zbroj 7–10 (tablica 3).

Tablica 1 Brojčane vrijednosti parametara korištenih u procjeni alergenosti pojedinačnih biljaka

Životni ciklus	Duljina cvatnje	Križna reakcija	abundancija
jednogodišnja=1 dvogodišnja=2 višegodišnja=3	manje od jednog mjeseca = 0,5 više od jednog mjeseca =2	nije prisutna = 0 prisutna = 1	rijetka = 0,5 prisutna = 1 uobičajena = 2 brojna = 3 vrlo brojna = 4

Tablica 2 Procjena brojnosti iskazana postotkom pokrovnosti i brojčanom vrijednošću

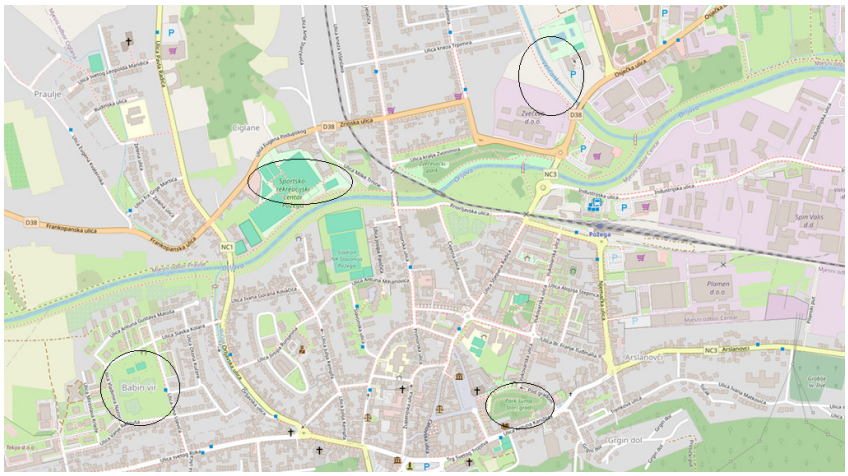
Vrsta	Pokrovnost / %	Brojčana vrijednost
Rijetka	< 1	0,5
Prisutna	1–25	1
Uobičajena	25–50	2
Brojna	50–75	3
Vrlo brojna	75–100	4

Tablica 3 Alergijski potencijal i karakteristike

Izračunati alergijski potencijal	Karakteristike
< 3	vrste s blago alergijskim potencijalom
4–6	vrste s umjerenim alergijskim potencijalom
7–10	vrste s jakim alergijskim potencijalom

Terensko istraživanje provedeno je na četiri lokacije u gradu Požegi i to: 1. stambeno naselje Babin vir, 2. sportsko rekreacijski centar, 3. park Stari grad i 4. šetnica uz potok Veličanku (slika 1).

Za lokaciju 1. svojstveno je da se između stambenih zgrada nalaze djelomično uređene površine (bašće), a ostali dio površine je zapušten i rijetko se kosi. U istraživanje lokacije 2. obuhvaćeni su i rubni dijelovi centra koji uključuju ruderalna staništa. Za lokaciju 4. obuhvaćen je i zapadni i istočni dio uz nasip što uključuje površine uz potok kao i površine s druge strane šetnice. Navedene lokacije stanovnici grada često posjećuju, a pretpostavljeno je da bi se invazivne biljne vrste na tim lokacijama mogle pojaviti u većoj brojnosti.



Slika 1 Prikaz istraživanih lokaliteta u gradu Požegi
Izvor: https://www.kartahr.com/mapa-pozega/

REZULTATI

Na četiri lokaliteta ukupno je pronađena 21 invazivna biljna vrsta. Najveći broj invazivnih biljnih vrsta pronađen je na lokalitetu šetnica uz potok Veličanka (ukupno 15 vrsta). Na lokalitetu stambeno naselje Babin vir ukupno je zabilježeno 11 invazivnih biljnih vrsta, a na lokalitetu park Stari grad njih 10. Najmanji broj invazivnih biljnih vrsta zabilježeno je na lokalitetu Sportsko rekreacijski centar (5 invazivnih biljnih vrsta) (tablica 4).

Tablica 4 Popis invazivnih biljnih vrsta na izabranim lokalitetima

Vrsta	Stambeno naselje Babin vir	Sportsko rekreacijski centar	Park Stari grad	Šetnica uz potok Veličanku
negundovac (*Acer negundo* L.)	-	-	+	-
žljezdasti pajasen (*Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle)	-	-	+	-
oštrodlakavi šćir (*Amaranthus retroflexus* L.)	+	-	-	+
ambrozija (*Ambrosia artemisiifolia* L.)	+	+	+	+
amorfa (*Amorpha fruticosa* L.)	-	-	-	+
mirisni pelin (*Artemisia annua* L.)	+	+	-	+
žuta kamilica (*Chamomilla suaveolens* (Pursh)Rydb.)	+	+	-	-
kanadska hudoljetnica (*Conyza canadensis* (L.) Cronquist)	+	+	+	+
kužnjak (*Datura stramonium* L.)	-	+	-	-
divlji krastavac (*Echinocystis lobata* (Michx.) Torr. Et Gray)	-	-	+	+
eleuzina (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.)	+	-	-	+
krasolika (*Erigeron annuus* (L.) Pers.)	+	-	+	+
čičoka (*Helianthus tuberosus* L.)	+	-	-	-
vlasasto proso (*Panicum capillare* L.)	-	-	-	+
lozika (*Parthenocissus quinqueifolia* (L.))	-	-	+	+
vinobojka (*Phytolacca americana* L.)	+	-	+	-
japanski dvornik (*Reynoutria japonica* Houtt.)	-	-	+	+
bagrem (*Robinia pseudoacacia* L.)	-	-	+	+
gustocvjetna zlatnica (*Solidago canadensis*L)	+	-	-	+
sirak (*Sorghum halepense* (L.) Pers.)	+	-	-	+
obalna dikica (*Xanthium strumarium L.* ssp. *italicum (Moretti) D. Löve*.)	-	-	-	+
Ukupno	**11**	**5**	**10**	**15**

Iz tablice 4 vidljivo je da su na svim lokalitetima zabilježene *Ambrosia artemisiifolia* L. i *Conyza canadensis* (L.) Cronquist. Na tri lokaliteta zabilježene su *Artemisia annua* L. i *Erigeron annuus* (L.) Pers. Na dva lokaliteta zabilježene su *Amaranthus retroflexus* L., *Chamomilla suaveolens* (Pursh)Rydb., *Echinocystis lobata* (Michx.) Torr. Et Gray, *Eleusine indica* (L.) Gaertn., *Parthenocissus quinqueifolia* (L.), *Phytolacca americana* L., *Reynoutria japonica* Houtt., *Robinia pseudoacacia* L., *Solidago canadensis* L. i *Sorghum halepense* (L.) Pers.. Na samo jednom lokalitetu zabilježene su: *Acer negundo* L., *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle, *Amorpha fruticosa* L., *Datura stramonium* L., *Panicum capillare* L. i *Xanthium strumarium* L. ssp. *italicum* (Moretti) D. Löve.

Nakon izračuna alergijskog indeksa proizlazi da šest invazivnih vrsta ima veliki alergijski potencijal. To su vrste *Sorghum halepense* (L.) Pers. (slika 2), Phytolacca americana L. (slika 3), *Reynoutria japonica* Houtt. (slika 4), *Solidago canadensis* L. (slika 5), *Robinia pseudoacacia* L. (slika 6) i *Ambrosia artemisiifolia* L. (slika 7). Trinaest vrsta je u kategoriji s umjerenim alergijskim potencijalom na području grada Požege. Od ovih vrsta najznačajnije su: *Parthenocissus quinqueifolia* (L.), *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle , *Artemisia annua* L. , *Erigeron annuus* (L.) Pers., *Conyza canadensis* (L.) Cronquist. Samo dvije vrste imaju mali alergijski potencijal ili je on bez utvrđenog učinka. To su *Datura stramonium* L. i *Eleusine indica* (L.) Gaertn (tablica 5, slika 8).

Tablica 5 Popis zabilježenih vrsta na lokalitetima i njihov alergijski potencijal

Vrsta	ŽIVOTNI CIKLUS	DULJINA CVJETANJA	KRIŽNA REAKCIJA	BROJNOST	ALERGIJSKI POTENCIJAL
Sorghum halepense (L.) Pers.	3	2	1	3	9,0
Reynoutria japonica Houtt.	3	2	1	2	8,0
Robinia pseudoacacia L.	3	2	1	2	8,0
Ambrosia artemisiifolia L.	1	2	1	3	7,0
Solidago canadensis L.	3	2	1	1	7,0
Phytolacca americana L.	3	2	1	1	7,0
Acer negundo L.	3	2	1	0,5	6,5
Parthenocissus quinqueifolia (L.)	3	2	0	1	6,0
Ailanthus altissima (Mill.) Swingle	3	0,5	1	1	5,5
Amorpha fruticosa L.	3	2	0	0,5	5,5
Helianthus tuberosus L.	3	2	0	0,5	5,5
Amaranthus retroflexus L.	1	2	1	1	5,0
Artemisia annua L.	1	2	1	1	5,0
Chamomilla suaveolens (Pursh)Rydb.	1	2	1	1	5,0
Erigeron annuus (L.) Pers.	1	2	1	1	5,0
Echinocystis lobata (Michx.) Torr. Et Gray	1	2	1	0,5	4,5
Xanthium strumarium L. ssp. *italicum (Moretti) D. Löve*.	1	2	1	0,5	4,5
Panicum capillare L.	1	2	1	0,5	4,5
Conyza canadensis (L.) Cronquist	1	2	0	1	4,0
Datura stramonium L.	1	2	0	0,5	3,5
Eleusine indica (L.) Gaertn.	1	0,5	0	0,5	2,0

Slika 2 *Sorghum halepense* (L.) Pers.

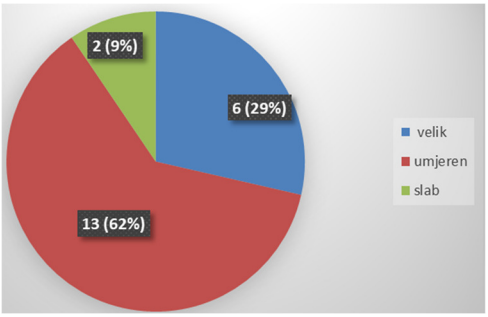
Slika 3 *Phytolacca americana* L.

Slika 4 *Reynoutria japonica* Houtt.

Slika 5 *Solidago canadensis* L

Slika 6 *Robinia pseudoacacia* L.

Slika 7 *Ambrosia artemisiifolia* L



Slika 8 Broj vrsta s visokim, umjerenim i malim alergijskim potencijalom

RASPRAVA

Belmonte i Vila (2004) u svom su istraživanju dokazali da 20 % peludi svih biljnih vrsta koje uzrokuju peludne alergije u Kataloniji pripada alohtonim vrstama. U određenim godinama, ove vrste mogu proizvesti jednaku količinu peludi u zraku kao i autohtona vegetacija.

Lazzaro i sur. (2018) u svom istraživanju ukazali su na utjecaj invazivnih biljnih vrsta na ljudsko zdravlje i naveli 37 invazivnih biljnih vrsta koje su alergene, otrovne ili uzrokuju dermatitis kod ljudi. U novije vrijeme u velikoj se mjeri istražuju načini suzbijanja biljnih vrsta s posebnim osvrtom na invazivne biljne vrste (Plank i sur., 2016). Dujmović Purgar i sur. (2021) navode da je u Hrvatskoj osim velikog bogatstva autohtonih biljnih vrsta, uočena i izrazita rasprostranjenost alohtone vegetacije te da prema najnovijim podacima u hrvatskoj flori danas postoji 77 invazivnih biljnih svojti. U florističkim istraživanjima Samardžić i Galić (2019) navode 43 biljne vrste koje su invazivne na području Požege i okolnog gorja. Urbana područja predstavljaju spoj velike gustoće ljudske populacije i bioraznolikosti pa su iz tog razloga najizloženija prodoru invazivnih vrsta (Pyšek, 1998).

Invazivne vrste u urbanim sredinama stvaraju mnogobrojne direktne i indirektne štete, stoga se inventarizaciji invazivnih biljnih vrsta urbanih područja posvećuje sve više pažnje. Invazivna flora urbanih područja novije se vrijeme sve više proučava, ali još uvijek nema detaljnih istraživanja o invazivnim biljkama koje su ujedno i uzročnice peludnih alergija. Najviše istraživanja usmjereno je na alergijski učinak ambrozije kao poznate invazivne vrste dok za druge vrste nema puno podataka. Za očekivati je bilo da je veliki broj invazivnih biljnih vrsta ujedno i alergeno što je ovim istraživanjem i potvrđeno. Veliki broj alergijskih invazivnih vrsta u gradu Požegi nalazi se na rubovima površina tj. na ruderalnim staništima ili na površinama koje se neredovito održavaju.

Samardžić i Galić (2019) su za područje Požeške kotline naveli 43 invazivne biljne vrste, a Petrić i Tomašević (2003) su naveli gotovo 100 biljnih vrsta koje uzrokuju alergije. Alergijski potencijal peludi koju emitira urbana flora jedan je od učinaka kojemu je potrebno posvetiti posebnu pažnju u budućnosti zbog velikog utjecaja na kvalitetu zraka i zdravlje građana. Obzirom na vrlo veliku rasprostranjenost invazivnih biljaka posebice se moraju poznavati invazivne biljke u našem okolišu. Koliko je bitno poznavati alergenost biljnih vrsta pokazuje i činjenica da u izboru biljaka za sadnju u gradovima moramo sagledati i alergološko - aerobiološki kontekst jer urbano zelenilo osim dobrobiti ima i štetnu ulogu, odnosno oslobađa alergenu pelud koja negativno utječe na zdravlje. Alergena pelud, u kombinaciji s onečišćenjem zraka i drugim uzročnicima, poput spora gljivica, može inicirati upalu dišnih putova, potaknuti alergijske bolesti dišnog sustava i povećati osjetljivost na respiratorne virusne infekcije. Stoga su zdravstveni rizici povezani s peludom drveća važni javnozdravstveni aspekti upravljanja urbanim zelenim površinama. Poznavanje, odabir i sadnja biljaka s niskim alergijskim

učinkom na javnim i privatnim površinama stoga sve više postaje preventivno-zdravstvena i moralna obaveza, a ne samo odabir radi poboljšanja zdravlja i kvalitete života u gradovima. Jedna od smjernica za oblikovanje zelenih površina s niskim alergijskim učinkom koja se navodi jest i kontrola invazivnih vrsta (Nastavni zavod za javno zdravstvo Andrija Štampar, 2026).

ZAKLJUČCI

Uz invazivne biljke urbanog područja Požege može se zaključiti:

- brojnost invazivnih alergijskih biljaka razlikuje se na različitim lokacijama u gradu Požegi;
- najviše invazivnih biljnih vrsta nalazi se na zapuštenim ili djelomično zapuštenim, ruderalnim, područjima;
- invazivne biljke urbanog područja Požege posjeduju visok alergijski potencijal;
- na temelju brojčanih vrijednosti alergijskog potencijala mogu se razlikovati tri skupine biljaka, među kojima su najbrojnije one koje imaju umjeren alergijski potencijal;
- dobiveni rezultati ukazuju na važnost praćenja invazivnih biljaka, a posebno vrsta koje su jaki alergeni;
- podizanje razine znanja o urbanoj invazivnoj i alergenoj flori može doprinijeti poboljšanju kvalitete života i zdravlja ljudi.

LITERATURA

Belmonte J., Vila M. 2004. Atmosferic invasion of non-native pollen in the Mediterranean region. American Journal of Botany 91(8): 1243–1250.

Braun-Blanquet J. 1964. Pflanzensoziologie. Grund züge der Vegetationskunde. 3. Auflage, Springer, Wien-New York.

Bukvić R., Hima V., Ibrahimpašic J., Jogic V., Kiš A., Kus Veenvliet J., Sukic T., Szabados K., Tratnik A., Vasic I., Vukadinovic J. 2021. Sava TIES – Očuvanje staništa sliva rijeke Save kroz međunarodno upravljanje invazivnim vrstama, Samobor, završna publikacija projekta Sava TIES. Javna ustanova Zeleni prsten Zagrebačke županije, https://zeleni-prsten.hr/portal/publikacije/, pristupljeno: 24.4.2024.

Ciferri E., Torrisi M., Staffolani L., Hruska K. 2006. Ecological study of the urban allergenic flora of central Italy. Journal of Mediterranean Ecology 7: 15–21.

Dujmović Purgar D., Maršić V., Židovec V., Bogdanović S., Karlović K., Svečnjak Z. 2021. Inventarizacija i potencijalna uporabna vrijednost invazivne flore na području grada Velike Gorice. 56. Hrvatski i 16. međunarodni simpozij agronoma Vodice, Zbornik radova: 388–391.

Hruska K. 2003. Assessment of urban allergophytes using an allergen indeks. Aerobiologia 19: 107–111.

Lazzaro L., Essl F., Lugliè A., Padedda B. M., Pyšek P., Brundu G. 2018. Invasive alien plant impacts on human health and well-being. Invasive species and human health: 16–33.

Nastavni zavod za javno zdravstvo Andrija Štampar. 2026. Razumijevanje pravila 3-30-300: Urbano ozelenjivanje s nisko alergijskim učinkom, https://www.stampar.hr/hr/novosti/razumijevanje-pravila-3-30-300-urbano-ozelenjivanje-s-nisko-alergijskim-ucinkom, pristupljeno 10.1.2026.

Nikolić T., Mitić B., Boršić I. 2014. Flora Hrvatske-invazivne biljke. Alfa d.d., Zagreb.

Petrić P., Tomašević M. 2003. Biljne vrste uzročnice peludnih alergija. Spin Valis, Požega.

Petrović D., Brekalo H., Musa A., Ivanković A., Boškailo A., Ostojić I. 2025. Alergijski potencijal korovne flore grada Mostara, Glasnik zaštite bilja 4: 22–29.

Plank L., Zak D., Getzner M., Follak S., Essl F., Dullinger S., Kleinbauer I., Moser D., Gattringer A. 2016. Benefits and costs of controlling three allergenic alien species under climate change and dispersal scenarios in Central Europe. Environmental Science and Ploicy 56: 9–21.

Pyšek P. 1998. Alien and native species in Central European urban floras: a quantitative comparison. Journal of Biogeography 25: 155–163.

Richardson D. M., Pyšek, P. 2006. Plant invasions: merging the concept of species invasiveness and community Invasibility. Progress in Physical Geography 30(3): 409–431.

Samardžić I., Galić I. 2019. Invazivne biljne vrste Požeške kotline i Slavonskog gorja, Javna ustanova za upravljanje zaštićenim područjem Požeško slavonske županije, Požega.

Tomašević M. 2016. Flora požeške kotline i slavonskog gorja, Zagreb-Požega.

Vucić A. 2021. Alergijski indeks urbane flore Zadra. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.

Ispitivanje genotoksičnosti i citotoksičnosti fotopolimerske smole

Andrej Bartulin, 2. razred
Antonio Matej Gverić, 2. razred

III. gimnazija, Split
Mentor: *Vesna Dobronić*

SAŽETAK
Proizvodi nastali stereolitografijom korištenjem fotopolimerske smole postaju sve zastupljeniji, a o njihovoj toksičnosti nema dovoljno istraženih podataka. Cilj istraživanja je bio utvrditi učinak (toksičnost) tih proizvoda kroz različite faze procesa (ispis, ispiranje izopropilnim alkoholom, izlaganje UV svjetlu) koristeći *Allium cepa* test. Na lukovicama vrste *A. cepa* izloženih proizvodima nastalim stereolitografijom istraživana je duljina korjenčića, morfološke promjene korjenčića, mitotski indeks, udio stanica s interfaznim vakuolama te udio stanica s kromosomskim aberacijama (anafazni mostovi, lomovi kromosoma, c-mitoza, slijepljeni kromosomi). Rezultati su pokazali da neobrađena i poluobrađena smola uzrokuju inhibiciju rasta korjenčića. Jedino je neobrađena smola uzrokovala morfološke promjene na korjenčićima. Iako je zabilježen povećan mitotski indeks među svim tretmanima smolom, nije zabilježeno statistički značajno odstupanje. Zabilježeni povećani udio stanica s kromosomskim aberacijama u skupinama obrađene smole nije statistički značajno odstupao. Najveći udio stanica s interfaznim vakuolama u skupinama poluobrađene smole nije statistički značajno odstupao. Ovo istraživanje potvrđuje da neobrađena fotopolimerska smola pokazuje citotoksični i genotoksični utjecaj, dok poluobrađena smola pokazuje samo citotoksični utjecaj, a potpuno obrađena smola samo genotoksični utjecaj.

Ključne riječi: *aditivna proizvodnja; fotopolimerska smola; Allium cepa test; mitotski indeks; mutacije*

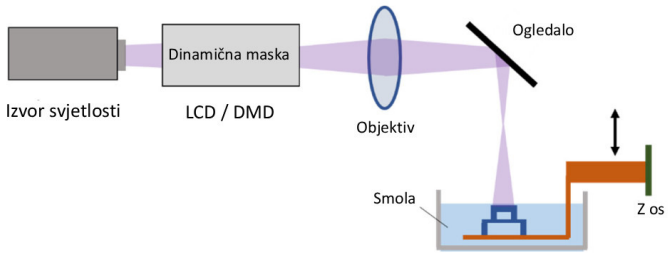
UVOD

Zbog svoje visoke fleksibilnosti, mogućnosti proizvodnje kompleksnih geometrija, brzine izrade i biokompatibilnosti aditivna proizvodnja postaje sve zastupljenija, pogotovo u proizvodnji laganih strojeva, prototipiranju, arhitekturi, medicini i umjetnosti (Wong i Hernandez, 2012).

Aditivna proizvodnja je dio proizvodnog strojarstva koji se bavi izradom predmeta nanošenjem čestica u tankim slojevima (Hrvatska enciklopedija, 2013). 3D model u CAD (engl. *Computer Aided Design*) formatu datoteke se pretvara u format koji predstavlja mrežu trokuta (Wong i Hernandez, 2012). U procesu pretvorbe kontinuirane površine se aproksimiraju mrežom trokuta. Zatim, datoteka se pretvara u format za rezanje (engl. *slicing*) koji sadržava sve potrebne upute stroju i dijeli objekt u slojeve (engl. *layers*) (Satyanarayana i Prakash, 2015).

Od sedam metoda aditivne proizvodnje, najzastupljenije su taložno srašćivanje (engl. *Fused Deposition Modeling*) i stereolitografija (Zhang i sur., 2022). Stereolitografija je tehnika aditivne proizvodnje koja izrađuje 3D objekte selektivnim skrućivanjem smole putem fotopolimerizacije pokrenute apsorpcijom svjetlosti. Jedna od glavnih prednosti stereolitografije je visoka preciznost ispisa. Trenutno postoje četiri vrste stereolitografije: stereolitografija laserskog skeniranja, projekcijska, kontinuirana i volumetrična stereolitografija. Kod projekcijske stereolitografije UV svjetlost iz izvora prolazi kroz LCD (engl. *Liquid Crystal Display*) ili DMD (engl. *Digital Micromirror Device*) zaslon, koji djeluje kao dinamična maska i oblikuje presjek pojedinog sloja 3D modela. Oblikovana svjetlost se putem leća i ogledala usmjerava na površinu fotopolimerske smole u spremniku, gdje dolazi do očvršćivanja osvijetljenih područja (slika 1). Nakon polimerizacije sloja, platforma za ispis pomiče se za debljinu

sloja, omogućujući formiranje sljedećeg sloja. Postupak se ponavlja dok se ne izradi cijeli objekt. (Huang i sur., 2020).



Slika 1 Shematski prikaz projekcijske stereolitografije
Autor: Huang i sur., 2020

Fotopolimerska smola se sastoji od: monomera, oligomera, fotoincijalizatora i aditiva. Monomeri i oligomeri, čiji se tekući sastav kreće oko 40 %, se fotopolimerizacijom spajaju u polimere čime se smola stvrdnjava. Metakrilati i akrilati su jedna od najčešće korištenih skupina za monomere i oligomere. 10 % otpada na fotoincijalizatore, koji primanjem UV ili vidljive svjetlosti (obično do 420 nm) otpuštaju slobodne radikale ili katione čime dolazi do križne polimerizacije. Ostatak otpada na vezivna sredstva te aditive koji poboljšavaju mehanička svojstva i mijenjaju boju (Baguley i sur., 2025).

Dosadašnja istraživanja, kojih je malo, ukazuju na toksičnost fotopolimerskih smola. Kreß i sur. (2020) utvrdili su da je većina komercijalnih smola za stereolitografiju citotoksična za mezenhimalne matične stanice, uključujući i one s certifikatom biokompatibilnosti. Štetni učinci se, međutim, mogu uspješno spriječiti premazivanjem ispisanih predmeta parilenom. Brooks i Yadavalli (2025) su pokazali da dvostruko ispiranje izopropilnim alkoholom učinkovito smanjuje citotoksičnost smole. Macdonald i sur. (2016) u svojoj su studiji utvrdili da su komercijalne smole djelovale toksično na embrije zebrica, ali se njihova toksičnost može značajno smanjiti postprocesnim fazama.

Istraživanja su također pokazala povišene koncetracije hlapljivih organskih spojeva (engl. *Volatile Organic Compounds*, VOC) te da su koncetracije u postprocesnim fazama, ispiranje izopropilnim alkoholom i izlaganje UV svjetlu više u odnosu na fazu samog ispisa (Baguley i sur., 2025). Zbog manjka istraživanja na temu VOC spojeva prouzrokovanim stereolitografijom i njihovog utjecaja na zdravlje ljudi i okolinu, preporučuje se oprez, nošenje zaštitne maske, rukavica te dobra ventilacija prostora (Zhang i sur., 2022).

Allium cepa L., odnosno crveni luk, je dvogodišnja zeljasta biljka iz porodice sunovrata (Amaryllidaceae). Podrijetlom je iz zapadne Azije (Umeljić, 2004). Među biljnim vrstama, *A. cepa* je korišten za procjenu kromosomskih aberacija i poremećaja u mitotskom ciklusu. Danas se koristi za procjenu velikog broja genotoksičnih/antigenotoksičnih agenasa, što pridonosi sve većoj primjeni u praćenju stanja okoliša (Khanna i Sharma, 2013). Ovaj organizam je dobar bioindikator za procjenu potencijalne štete, zahvaljujući visokoj osjetljivosti ne samo na kemikalije, već i na zračenje (Feretti i sur., 2007; Xavier i sur., 2021; Bolsunovsky i sur., 2022). *A. cepa* test dokazani je pokazatelj genotoksičnih učinaka na okoliš i ljudsko zdravlje, s odgovorom u rasponu od 71 % do 91 % dosljednosti sa stanicama sisavaca (Leme i Marin-Morales, 2009; Tedesco i Laughinghouse, 2012).

U *A. cepa* testu citotoksični i genotoksični učinci ispitivanih tvari procjenjuju se analizom makroskopskih i mikroskopskih parametara u meristemskim stanicama korijena. Citotoksičnost, svojstvo tvari da bude štetno i otrovno za neku stanicu, se određuje praćenjem duljine korjenčića, kao pokazatelja inhibicije rasta, mitotskog indeksa, koji odražava razinu mitotske aktivnosti, te pojavom interfaznih vakuola u meristemskim stanicama, koje upućuju na stanični stres i degenerativne promjene. Genotoksičnost, svojstvo tvari da naruši genetski materijal nekog organizma, se procjenjuje analizom udjela kromosomskih aberacija, koje uključuju strukturne i numeričke promjene kromosoma tijekom mitoza (Hrvatski opći leksikon, 2012; Fiskesjö, 1988).

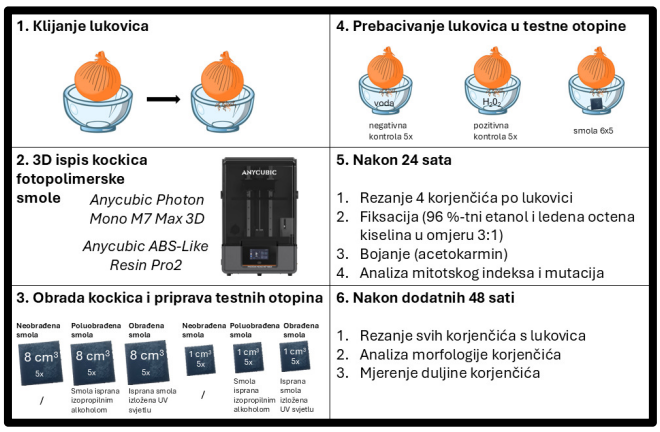
Cilj našeg istraživačkog rada je istražiti toksičnost gotovih proizvoda nastalih stereolitografijom na zdravlje ljudi i okoliš, uključujući toksičnost različitih faza procesa (ispis, ispiranje izopropilnim alkoholom, izlaganje UV svjetlu) kako bi se naglasila važnost pridržavanja i posljedice nepridržavanja uputa tijekom procesa.

Planiranim istraživanjem testirana je točnost sljedećih hipoteza:

- H1- Na korjenčićima luka izloženih fotopolimerskoj smoli bit će uočljive makroskopske promjene (smanjenje duljine korjenčića, promjena boje i oblika) u usporedbi s negativnom kontrolnom skupinom;
- H2- Meristemske stanice korjenčića luka izložene fotopolimerskoj smoli će imati manji mitotski indeks i povećan broj interfaznih vakuola u usporedbi s negativnom kontrolnom skupinom;
- H3- Na meristemskim stanicama korjenčića luka izloženih fotopolimerskoj smoli bit će izraženije mikroskopske promjene (kromosomske aberacije) u usporedbi s negativnom kontrolnom skupinom;
- H4- Najizraženije promjene na meristemskim stanicama korjenčića luka će izazvati neobrađena fotopolimerska smola, manje izražene smola isprana izopropilnim alkoholom, a najmanje izražene isprana smola izložena UV svjetlu u usporedbi s negativnom kontrolnom skupinom.

METODE RADA

U istraživanju je korišteno 40 lukovica *Allium cepa* L. kojima su skalpelom odstranjeni suhi korjenčići. Svaka je lukovica stavljena na vrh zasebne plastične čašice (volumena 360 mL) te bazom uronjena do pola flaširanom izvorskom vodom (*Cetina*). Lukovice su postavljene na tamno mjesto. Praćen je rast korjenčića dok nisu postigli duljinu od otprilike 2 cm (slika 2).



Slika 2 Shematski prikaz osnovnih koraka u ispitivanju genotoksičnosti i citotoksičnosti fotopolimerske smole

Petnaest kockica fotopolimerske smole volumena 1 cm^3 te petnaest kockica volumena 8 cm^3 (tablica 1) dizajniranih u programu SketchUp su isprintane na Anycubic Photon Mono M7 Max 3D pisaču koristeći Anycubic ABS-Like Resin Pro2 smolu. Ispis je obavljen u tvrtki Make Idea d.o.o. Nakon ispisa, sve kockice su obrisane ubrus papirom te podijeljene u šest skupina (tablica 1).

Tablica 1 Uzorci fotopolimerske smole korištenih u istraživanju i kontrole

Naziv i oznaka uzorka	Obrada uzorka	Kockica 1 cm^3 oznaka uzorka i broj	Kockica 8 cm^3 oznaka uzorka i broj
neobrađena smola V (1 i 2)	Bez daljnje obrade	**V1** - 5 kockica	**V2** - 5 kockica
poluobrađena smola A (1 i 2)	Isprano 95 %-tnim izopropilnim alkoholom	**A1** - 5 kockica	**A2** - 5 kockica
obrađena smola U (1 i 2)	Isprano 95 %-tnim izopropilnim alkoholom te izloženo pod UV svjetlom 5 minuta (V = 1 cm^3) ili 10 minuta (V = 8 cm^3) lampom AOREAM	**U1** - 5 kockica	**U2** - 5 kockica
(+) KONTROLA	Otopina H_2O_2 (300 mM), bez smole	/	/
(-) KONTROLA	Izvorska voda Cetina, bez smole	/	/

Za vrijeme obrade kockica i pripravljanja testnih otopina korištene su zaštitne rukavice i zaštitna maska.

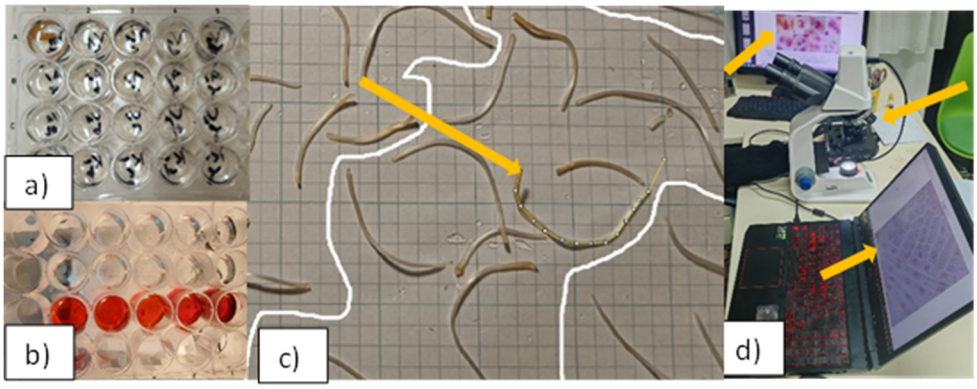
Testne otopine pripremljene su dodavanjem svakog pojedinog uzorka u 100 mL destilirane vode. Zbog slabe topljivosti fotopolimerske smole, smjese su odstajale 24 sata uz povremeno miješanje kako bi se omogućila ekstrakcija zaostalih molekula. Kockice su ostale u testnim otopinama tijekom pokusa.

U svaku od 30 čašica s pripremljenim testnim otopinama prebačena je lukovica. Time je dobiveno 6 skupina (tablica 1) po 5 lukovica. 5 lukovica je prebačeno u čašice s izvorskom vodom kao negativnom kontrolom te 5 lukovica je prebačeno u čašice s 300 mM vodikovog peroksida kao pozitivnom kontrolom (Radić i sur. (2010) su se njime služili za genotoksičnost otpadnih voda). Ukupno 8 skupina po 5 lukovica.

Inhibicija rasta korjenčića luka praćena je nakon ukupno 72 sata izlaganja testnim otopinama. Duljina korjenčića (5 lukovica za pojedinu skupinu) izmjerena je u milimetrima (mm) u programu ImageJ nakon što su korjenčići odrezani pri bazi lukovice te je izračunata prosječna vrijednost duljine korjenčića po skupini.

Usporedno s mjerenjem rasta korjenčića, nakon 24 sata korjenčići su isprani pod tekućom vodom te su sa svake lukovice izrezana po četiri korjenčića za daljnju analizu, dok su preostali korjenčići na lukovicama nastavili rasti u testnim otopinama do isteka ukupnih 72 sata. Korjenčići su fiksirani u mješavini 96 %-tnog etanola i ledene octene kiseline u omjeru 3:1 (24 sata) kako bi se zaustavila dioba stanica. Nakon 24 sata fiksacije, korjenčići su izvađeni iz fiksativa i prebačeni u 70 %-tni etanol u kojem su čuvani na temperaturi od 4 °C do korištenja. Prije same analize korjenčići su omekšani u 1 M HCl (10 min), isprani destiliranom vodom te obojeni 1 %-tnom otopinom acetokarmina (20 min) (slika 3). Pri izradi preparata, otkinuti vršni dijelovi korjenčića (intezivno obojana zona primarnog meristema) stavljeni su na predmetno stakalce u kap aceto-karmina te macerirani staklenim štapićem. Macerirani korjenčići prekriveni su pokrovnicom i laganim pritiskom zgnječeni. Predmetna i pokrovna stakalca prethodno su očišćena u etanolu. Po dva vrška korjenčića sa svake lukovice korištena su za izradu jednog mikroskopskog preparata. Za mikroskopiranje i fotografiranje preparata korišten je digitalni binokularni mikroskop B-150D-BRPL s kamerom. Na svakom mikroskopskom preparatu prebrojano je

250 stanica, tj. 500 stanica po lukovici odnosno 2500 po tretmanu za kromosomske aberacije i mitotski indeks (slika 3).



Slika 3 Obrada materijala: a) fiksiranje korjenčića b) bojanje preparata c) mjerenje duljine korjenčića d) prebrojavanje stanica.
Autor: Bartulin A. i Gverić A. M., 2025

Mitotski indeks izražava se kao omjer između broja stanica u mitozi i ukupnog broja stanica. Moguće ga je izračunati prema izrazu:

$$Mitotski\ indeks = \frac{(P+M+A+T)}{N} \times 100\ \%$$

u kojem je (P+M+A+T) suma svih stanica u profazi (P), metafazi (M), anafazi (A) i telofazi (T), a N je ukupan broj stanica. Stanice su brojane pregledom cijelog vidnog polja mikroskopa pri povećanju 400 puta, pomicanjem preparata s lijeva na desno, pazeći pritom da ne dolazi do dvostrukog brojanja (Vareško, 2017).

Praćene mutacije obuhvaćale su kromosomske aberacije poput anafaznih mostova, lomova kromosoma, c-mitoze i ljepljivih kromosoma te prisutnost interfaznih vakuola. Aberacije i interfazne vakuole detektirani su analizom mikroskopskih preparata, a rezultati su izraženi kao postotak kromosomskih aberacija u odnosu na broj stanica u diobi (najmanje 100 stanica u diobi po lukovici) te postotak stanica s interfaznim vakuolama u ukupnom broju analiziranih stanica (2500 po tretmanu).

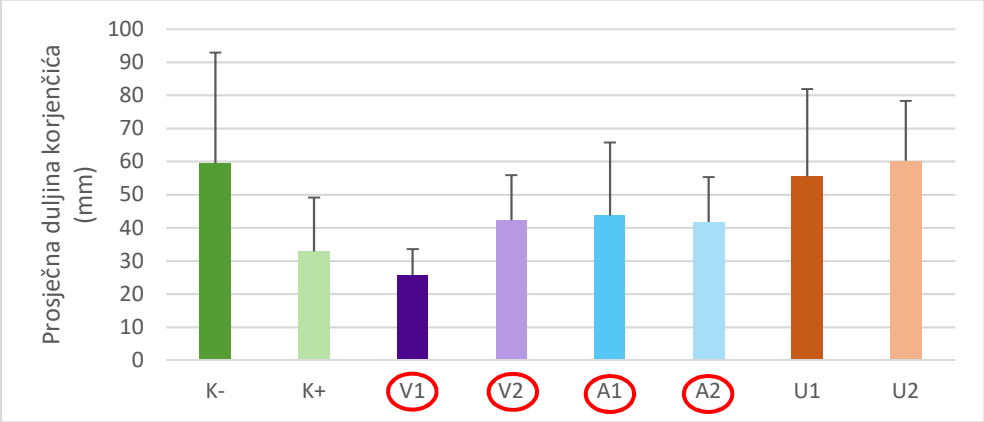
Istraživanje je uključivalo procjenu postojanja statistički značajnih razlika u duljini korjenčića, mitotskom indeksu, broju kromosomskih aberacija i broju interfaznih vakuola između skupina iz Tablice 1 te skupina negativne i pozitivne kontrole. Za statističku analizu korištene su standardne devijacije radi procjene varijabilnosti podataka, dok je ANOVA test primijenjen za utvrđivanje značajnosti rezultata. Za dodatnu analizu razlika između različitih skupina, primijenjen je Tukey-Kramer HSD post-hoc test. Ukoliko je *p*-vrijednost manja od 0,05, rezultat se smatra statistički značajnim, što ukazuje na manje od 5 % vjerojatnosti da je rezultat slučajan. Za *p*-vrijednosti veće od 0,05 rezultati nisu smatrani statistički značajnima (Cvitković i Tabak, 2025; Grubišić i Medić, 2023).

REZULTATI

Prosječna duljina korjenčića

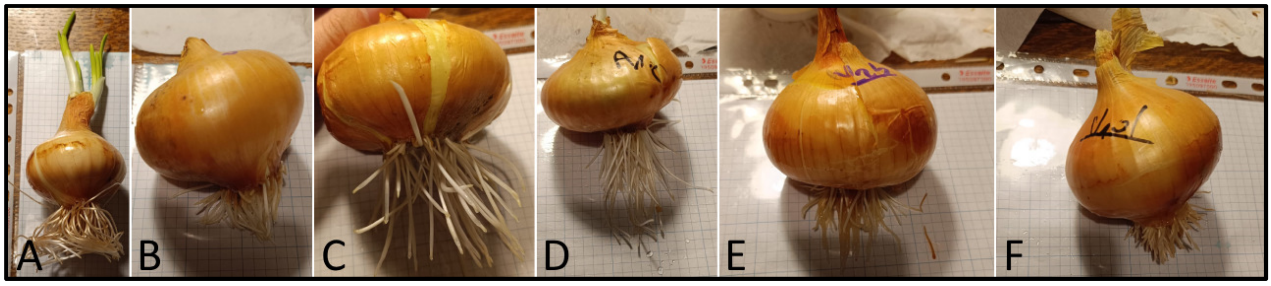
Slikom 4 prikazane su prosječne duljine korjenčića lukovica izmjerene nakon tretmana otopinama smole u trajanju od 72 sata. Zabilježeno je da su korjenčići lukovica koje su bile izložene otopinama neobrađene i poluobrađene smole imali manje duljine u odnosu na negativnu kontrolu i na potpuno

obrađenu smolu, ali veću u odnosu na pozitivnu kontrolu. Statistička značajnost između svakog od parova tretmana prikazana je u prilogu 1.



Slika 3 Prosječna duljina korjenčića (mm) nakon 72 h tretmana: K- (voda), K+ (vodikov peroksid), V (neobrađena smola), A (smola isprana izopropilnim alkoholom), U (isprana smola izložena UV svjetlu); 1 (volumen 1 cm³), 2 (volumen 8 cm³). Statistički značajni rezultati označeni su crvenim krugovima. Standardne devijacije su prikazane stupićima pogreške.

Razlike u duljini i izgledu korjenčića u otopinama smole u odnosu na pozitivnu i negativnu kontrolu prikazane su slikom 5.



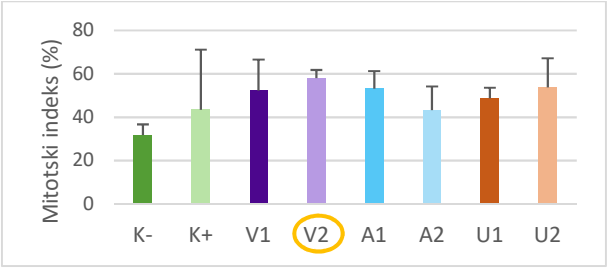
Slika 4: Usporedba duljine korjenčića i morfologije, A) K- – voda, B) K+ – vodikov peroksid, C) A2 – smola isprana izopropilnim alkoholom (8 cm³), D) A1 – smola isprana izopropilnim alkoholom (1 cm³), E) V2 – neobrađena smola (8 cm³), F) V1 – neobrađena smola (1 cm³)
Autor: Bartulin A., 2025

Neki korjenčići u tretmanima neobrađene smole pokazuju morfološke promjene u vidu stanjivanja te postaju sluzavi i prozirni (slika 6). Kod ostalih tretmana nisu uočene značajne promjene u morfologiji korjenčića.

Slika 5 Morfološke promjene na korjenčićima lukovice tretiranih neobrađenom smolom
Autor: Bartulin A., 2025

Mitotski indeks

Nakon prebrojavanja stanica na mikroskopskim preparatima utvrđen je dio stanica u mitozi u odnosu na ukupan broj stanica za različite tretmane te je izračunat mitotski indeks. Rezultati su prikazani slikom 7.

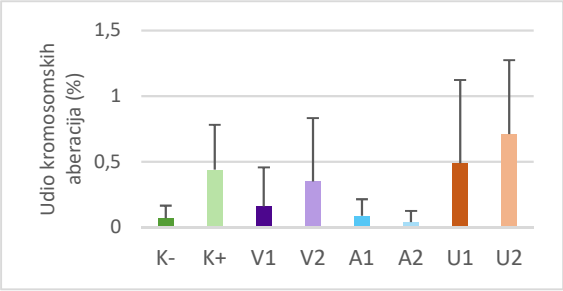


Slika 6: Mitotski indeks korjenčića nakon 24 h tretmana: K- (voda), K+ (vodikov peroksid), V (neobrađena smola), A (smola isprana izopropilnim alkoholom), U (isprana smola izložena UV svjetlu); 1 (volumen 1 cm^3), 2 (volumen 8 cm^3). Granično statistički značajan rezultat je označen narančastim krugom. Standardne devijacije su prikazane stupićima pogreške.

Svi tretmani smole imaju viši mitotski indeks u meristemskim stanicama u usporedbi s negativnom kontrolom i sličan u usporedbi s pozitivnom kontrolom. Granično statističko značajno odstupanje je zabilježeno između negativne kontrole i skupine V2 ($p = 0,05442$) (slika 7, prilog 1).

Kromosomske aberacije

Kromosomske aberacije (anafazni mostovi, lomovi kromosoma, c-mitoza, ljepljivi kromosomi) su prvo uočene pri povećanju mikroskopa 400×, a potom su promatrane pri povećanju 1000×. Rezultat je izražen kao udio stanica s mutacijama u odnosu na ukupan broj stanica (slika 8).

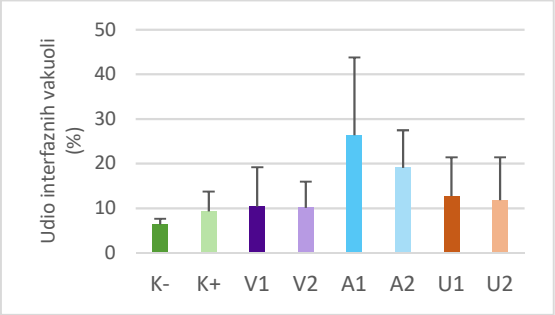


Slika 7: Udio kromosomskih aberacija izražen u postotcima: K- (voda), K+ (vodikov peroksid), V (neobrađena smola), A (smola isprana izopropilnim alkoholom), U (isprana smola izložena UV svjetlu); 1 (volumen 1 cm^3), 2 (volumen 8 cm^3). Standardne devijacije su prikazane stupićima pogreške.

Najmanje kromosomskih aberacija je zabilježeno u tretmanima poluobrađene smole. Najviše kromosomskih aberacija je zabilježeno u tretmanima obrađene smole, dok je u tretmanima neobrađene smole zabilježeno više kromosomskih aberacija u odnosu na tretmane poluobrađene smole, ali manje u odnosu na tretmane obrađene smole. Iako su zabilježene razlike u kromosomskim aberacijama, nije zabilježeno statistički značajno odstupanje.

Interfazne vakuole

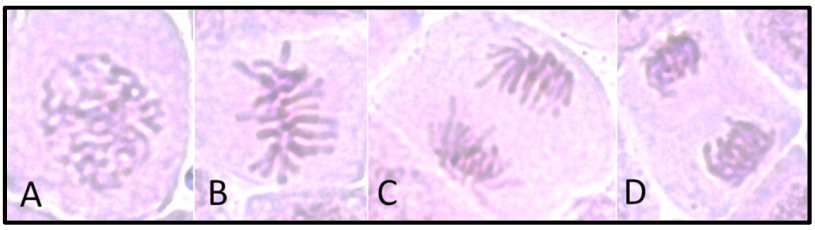
Interfazne vakuole su prvo uočene pri povećanju mikroskopa 400×, a potom su promatrane pri povećanju 1000×. Rezultat je izražen kao udio stanica s interfaznim vakuolama u odnosu na ukupan broj stanica (slika 9).



Slika 8: Udio interfaznih vakuola izražen u postotcima: K- (voda), K+ (vodikov peroksid), V (neobrađena smola), A (smola isprana izopropilnim alkoholom), U (isprana smola izložena UV svjetlu); 1 (volumen 1 cm^3), 2 (volumen 8 cm^3). Standardne devijacije su prikazane stupićima pogreške.

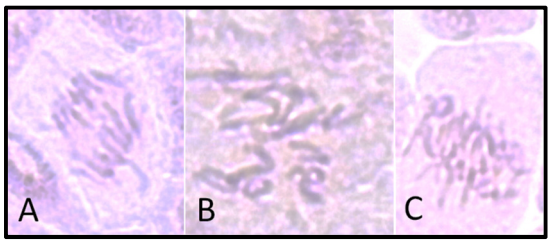
Najveći udio interfaznih vakuola je zabilježen u tretmanima poluobrađene smole. U ostalim tretmanima, zabilježen je sličan udio interfaznih vakuola u odnosu na kontrolne skupine. Nisu zabilježena statistički značajna odstupanja.

Fotografije tijeka mitotičke diobe uočenim u uzorcima prikazan je slikom 10.



Slika 9: Normalne faze diobe u uzorkovanim stanicama *A. cepa* L., A - profaza, B - metafaza, C - anafaza, D – telofaza (povećanje 400×).
Autor: Bartulin A., 2025

Mutacije uočene u uzorcima stanica *A. cepa* prikazane su na slici 11.



Slika 10: Mutacije u stanicama *A. cepa* L., A – anafazni most, fragmentirani kromosom, B – c-mitoza, C – slijepljeni kromosomi (povećanje 400×).
Autor: Gverić A. M., 2025

RASPRAVA

Cilj ovog istraživačkog projekta je bio utvrditi toksičnost fotopolimerske smole nakon 3D ispisa te utjecaj različitih faza obrade fotopolimerske smole. Motivacija za odabranu temu je sve veća zastupljenost aditivne proizvodnje, pogotovo u tehničkim i medicinskim strukama. Istraženost toksičnosti fotopolimerske smole još je uvijek relativno ograničena i nedostatna, osobito kada je riječ o dugoročnim učincima na zdravlje ljudi i okoliš. Većina dostupnih podataka temelji se na kratkoročnim ispitivanjima ili informacijama proizvođača, dok neovisnih i sustavnih studija ima vrlo malo.

Različiti tretmani smole rezultirali su u varijacijama u duljini korjenčića. Zabilježena su statistički značajna odstupanja (prilog 1). Prosječne duljine korjenčića 59,6 mm (slika 4) u negativnoj kontroli bile

su više od duljina izmjerenih u istraživačkom radu Vareško (2017) (oko 40 mm), Radić i sur. (2010) (53 mm) i Grubišić i Medić (2023) (10 mm). Prosječne duljine korjenčića u pozitivnoj kontroli (32,9 mm) također su veće u odnosu na one u istraživačkom radu Vareško (2017) (17 mm). Za razliku od rezultata u istraživačkom radu Grubišić i Medić (2023) gdje su testne otopine troske ubrzale rast korjenčića, testne otopine neobrađene i poluobrađene smole inhibirale su rast korjenčića luka. Obrađena smola je imala neutralan utjecaj na rast korjenčića luka u usporedbi s negativnom kontrolom. Također su zabilježene makroskopske promjene na nekim korjenčićima iz tretmana neobrađene smole u vidu stanjivanja te promjene boje. Time je potvrđena hipoteza 1.

Očekivano je da će meristemske stanice korjenčića izloženih smoli imati manji mitotski indeks u usporedbi s kontrolnom skupinom (hipoteza 2), što nije potvrđeno za nijednu skupinu (slika 7). Najveći mitotski indeks imala je skupina V2 koja je ujedno i granično statistički značajna ($p = 0,05442$). Kod ostalih skupina nije zabilježeno statistički značajno odstupanje u odnosu na negativnu kontrolu, ali je vrijednost mitotskog indeksa bila veća. Mitotski indeks u negativnoj kontroli (31,73 %) što je u skladu u rasponu što ga daju Sutan (2014) (13 %) i Sreeranjini i Siril (2011) (35 %). Mitotski indeks u pozitivnoj kontroli (43,39 %) je viši u odnosu na mitotski indeks u istraživačkom radu Vareško (2017) i Grubišić i Medić (2023). Hipotezom 4 bilo je očekivano da će najveće promjene u odnosu na negativnu kontrolu biti kod tretmana neobrađene smole, zatim kod tretmana poluobrađene smole, a najmanje promjene kod tretmana obrađene smole, što nije potvrđeno. Hipotezom 2 i 4 je također bio očekivan veći udio interfaznih vakuoli u odnosu na negativnu kontrolu, što nije potvrđeno. Najveći udio interfaznih vakuoli je zabilježen kod tretmana poluobrađene smole, zatim kod tretmana obrađene smole, a najmanji kod tretmana neobrađene smole. Nisu zabilježena statistički značajna odstupanja među niti jednom skupinom. Udio interfaznih vakuoli (6,38 %) u negativnoj kontroli je u razini s rezultatima u istraživačkom radu Vareško (2017) te Grubišić i Medić (2023). Udio interfaznih vakuoli (9,3 %) u pozitivnoj kontroli je manji u odnosu na istraživački rad Vareško (2017) te Grubišić i Medić (2023). Razlike mitotskog indeksa i udjela interfaznih vakuola među različitim istraživačkim radovima moguće proizlaze iz činjenice da su korištene lukovice različite starosti i različita dobavljača.

Hipotezom 3 i 4 bio je očekivan najveći udio kromosomskih aberacija kod tretmana neobrađene smole, zatim kod tretmana poluobrađene smole, a najmanji kod tretmana obrađene smole, što nije potvrđeno (slika 8). Najveći udio kromosomskih aberacija je zabilježen kod tretmana obrađene smole (U1 - 0,49 %, U2 – 0,71 %), zatim kod tretmana neobrađene smole (V1 – 0,16 % , V2 – 0,35 %), a najmanji kod tretmana poluobrađene smole (A1 – 0,09 %, A2- 0,04 %). Najčešća mutacija je bila c-mitoza. C-mitoza (slika 11) je mutacija u mitozi prepoznata po maksimalno kondenziranim kromosomima koji su porazbacani po stanici i nastaju kao posljedica štetnog djelovanja na diobeno vreteno (Radić i sur, 2010). Nakon c-mitoze, druga najzastupljenija mutacija su ljepljivi kromosomi. Ljepljivi kromosomi se prepoznaju u metafazi, to su nepravilno smotane i međusobno povezane strukture, znak su toksičnog učinka na organizaciju kromatina zbog utjecaja na histonske bjelančevine (Radić i sur, 2010). Dalje su zabilježeni fragmentirani kromosomi i anafazni mostovi. Fragmentirani kromosomi su mali dijelovi koji su odvojeni od ostatka kromosoma zbog prekida DNA molekule, a anafazni mostovi su jedna ili dvije kromosomske strukture koje povezuju dvije kromosomske skupine tijekom anafaznog razdvajanja zbog nepotpunog odvajanja kromatida od kromosoma (Cabaravdic, 2010). Udio mutacija na većini skupina je manji od onoga što su zabilježili radovi Vareško (2017) i Grubišić i Medić (2023).

Ovi rezultati pokazuju da je neobrađena fotopolimerska smola djelovala citotoksično i genotoksično na korjenčiće, poluobrađena je djelovala samo citotoksično, dok je potpuno obrađena smola djelovala genotoksično. Opovrgnuće hipoteze 4, gdje je umjesto najviše aberacija na neobrađenoj smoli, uočeno najviše na obrađenoj smoli, se može objasniti da je izlaganje UV-A zračenju lampe za nokte bilo pretjerano te je izazvalo razgrađivanje smole (Bouchareb i Doufnoune, 2025), lomove u spojevima polimera i mikrorupice na površini kockica (Pszczółkowski i Zaborowska, 2025) koje su pospješile difuziju spojeva u smoli (fotoinicijatori, amini, akrilati, metakrilati) te je destilirana voda u tim otopinama zbog tog razloga bila najbogatija u spojevima koji su uzrokovali već navedene aberacije u velikom broju. Nadovezujući se na preveliko izlaganje UV svjetlosti, preduga izloženost UV svjetlosti mogu izazvati fotolizu fotoinicijatora, spojeva koji apsorbiraju UV svjetlost te stvaraju radikale koji pokreću polimerizaciju smole, te na taj način se stvara višak slobodnih radikala koji reagiraju s proteinima, DNA i lipidima.

Iako je hipoteza 4 opovrgnuta, dokazalo se da je iznimno bitno pridržavati se uputa tijekom i nakon procesa ispisa fotopolimerskom smolom 3D pisačem, te da treba obratiti pažnju na vrijeme izlaganja UV zračenju pri obradi materijala. Izloženost UV zrakama rezultira strukturalnim promjenama oblika ispisanih modela povećavajući dodirnu površinu i omogućavajući pojačano otpuštanje molekula koje su nastale tim procesom, ali i postupnom razgradnjom smole. Stoga proizvodi fotopolimerske smole predstavljaju potencijalno negativan utjecaj na okoliš.

Iako se ovo istraživanje bavilo utjecajem gotovih proizvoda nastalih stereolitografijom i razlikom obrade nakon ispisa, buduća istraživanja bi se mogla baviti toksičnošću tekuće fotopolimerske smole. Uz toksičnost tekuće smole, veliki problem predstavljaju hlapljivi organski spojevi iz tekuće smole. Predmet daljnjih istraživanja mogao bi biti utjecaj tih spojeva na zdravlje ljudi i okoliš te dodatna istraživanja koja uspoređuju koncentraciju tih spojeva među svim fazama izrade predmeta. Također je potrebno daljnje istražiti optimalno vrijeme UV izlaganja i valnu duljinu svjetlosti kako bi se formirali polimeri od svih rezidualnih monomera, ali spriječilo razgrađivanje smole. Ovakva istraživanja pridonijela bi razvoju sigurnih fotopolimerskih smola.

ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja, zaključeno je sljedeće:

- Neobrađena i poluobrađena smola inhibiraju rast korjenčića;
- Potpuno obrađena smola nema ni pozitivan ni negativan utjecaj na rast korjenčića;
- Korjenčići u tretmanima neobrađene smole pokazuju morfološke promjene u vidu stanjivanja te postaju sluzavi i prozirni;
- Visoki mitotski indeks u većini tretmana ne pokazuje značajna statistička odstupanja u odnosu na kontrolu;
- Udio kromosomskih aberacija u tretmanima obrađene i neobrađene smole statistički značajno ne odstupa od kontrolne skupine;
- Udio interfaznih vakuola zabilježen u tretmanima poluobrađene smole statistički značajno ne odstupa od kontrolne skupine;
- Neobrađena fotopolimerska smola pokazuje citotoksični i genotoksični utjecaj, dok poluobrađena smola pokazuje samo citotoksični utjecaj, a potpuno obrađena smola samo genotoksični utjecaj;

- Utjecaj postupka obrade materija fotopolimerske smole nakon ispisa 3D pisačem ima utjecaj na zdravlje ljudi i okoliša;
- Neophodno je više posvetiti pažnju istraživanjima o utjecaju i obradi proizvoda stereolitografije na zdravlje ljudi i okoliša.

ZAHVALA
Zahvaljujemo se Viljemu Bezjaku koji nam je omogućio prototipiranje 3D pisačem, Lini Lončar na posudbi UV lampe te Josipu Žižiću, mag. ing. mech., vlasniku tvrtke Make Idea d.o.o. gdje smo vršili ispis 3D kockica.

LITERATURA

aditivna proizvodnja. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2013. – 2026. Pristupljeno 16.11.2025. <https://www.enciklopedija.hr/clanak/aditivna-proizvodnja>.
Baguley D. A., Evans G. S., Bard D., Monks P. S., Cordell R. L. 2025. Review of volatile organic compound (VOC) emissions from desktop 3D printers and associated health implications. Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology 36: 149–166.
Bolsunovsky A., Trofimova E., Zueva A., Dementyev D., Petrichenkov M. 2022. Effect of gamma radiation on cytogenetic and growth endpoints of *Allium cepa*. Doklady. Biochemistry and biophysics 503: 85–89.
Bouchareb S., Doufnoune R. 2025. Effect of UV post-curing on the mechanical properties of photopolymer resin in stereo-lithographic 3D printing. Materials Letters 394.
Brooks A.K., Yadavalli V.K. 2025. Post-print processing to minimize cytotoxicity of 3D-printed photopolymer resins for biomedical applications. Journal of Applied Polymer Science 142(9): e56545.
Cabaravdic M. 2010. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of cells to benzo(a)pyrene. Medicinski arhiv 64(4): 215–218.
citotoksičnost. Hrvatski opći leksikon (2012), mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2026. Pristupljeno 21.3.2026. <https://hol2.lzmk.hr/clanak/citotoksicnost>.
Cvitković P., Tabak K. 2025. Ispitivanje genotoksičnosti i citotoksičnosti zračenja UV lampi za nokte. Bioznalac 11: 64–78.
Feretti D., Zerbini I., Zani C., Ceretti E., Moretti M., Monarca S. 2007. *Allium cepa* chromosome aberration and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes. Food additives and contaminants 24: 561–572.
Fiskesjö G. 1988. The *Allium* test — an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 197: 243–260.
Grubišić T., Medić V. 2023. Ispitivanje toksičnosti troske iz Dugog Rata pomoću *Allium cepa* testa. Bioznalac 9: 72–83.
genotoksičnost. Hrvatski opći leksikon (2012), mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2026. Pristupljeno 21.3.2026. <https://hol2.lzmk.hr/clanak/genotoksicnost>.
Huang J., Qin Q., Wang J. 2020. A review of stereolithography: processes and systems. Processes 8: 1138.
Khanna N., Sharma S. 2013. *Allium cepa* root chromosomal aberration assay: a review. Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research 1: 105–119.
Kreß S., Schaller-Ammann R., Feiel J., Priedl J., Kasper C., Egger D. 2020. 3D printing of cell culture devices: assessment and prevention of the cytotoxicity of photopolymers for stereolithography. Materials 13(13): 3011.
Leme D. M., Marin-Morales M. A. 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. Mutation Research/Reviews in Mutation Research 682: 71–81.
Macdonald N. P., Zhu F., Hall C. J., Reboud J., Crosier P. S., Patton E. E., Wlodkowic D., Cooper J. M. 2016. Assessment of biocompatibility of 3D printed photopolymers using zebrafish embryo toxicity assays. Lab on a Chip 16(2): 291–297.
Pszczółkowski B, Zaborowska M. 2025. Effect of layer exposure time in SLA-LCD printing on surface topography, hardness and chemical structure of UV-cured photopolymer. Lubricants 13(9): 406.
Radić S., Stipaničev D., Vujcić V., Marijanović Rajcić M., Širac S., Pevalek-Kozlina B. 2010. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. The Science of the Total Environment 408: 1228–1233.
Satyanarayana B., Prakash K. J. 2015. Component replication using 3D printing technology. Procedia Materials Science 10: 263–269.
Sreeranjini S., Siril E. A. 2011. Evaluation of anti-genotoxicity of the leaf extracts. Plant Soil and Environment 57(5): 222–227.
Șuțan A. N., Popescu A., Mihăescu C., Soare L. C., Marinescu M. V., 2014. Evaluation of cytotoxic and genotoxic potential of the fungicide ridomil in *Allium cepa* L. Analele Ştiinţifice ale Universităţii „Al. I. Cuza" Iaşi s. II a. Biologie vegetală 60(1): 5–12.
Tedesco S., Laughinghouse IV H. 2012. Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test. doi: 10,5772/31371
Umeljić V. 2004. Crveni luk, U svijetu cvijeća i pčela: atlas medonosnog bilja. https://www.plantea.com.hr/crveni-luk/, pristupljeno: 16.11.2025.
Vareško A. 2017. Ispitivanje mutagenosti antiperspiranta i dezodoransa na korjenčićima luka. Bioznalac 3: 149–160.

Wong K. V., Hernandez A. 2012. A review of additive manufacturing. International Scholarly Research Notices. doi:10,5402/2012/208760

Xavier M., Pantaleão S., Scher R., Ciolini R., d'Errico F., Souza S. 2021. *Allium cepa* used as a dosimetry system in nuclear and radiological emergencies. European Physical Journal Plus 136: 682.

Zhang Q., Davis A. Y., Black M. S. 2022. Emissions and chemical exposure potentials from stereolithography vat polymerization 3D printing and post-processing units. ACS Chemical Health & Safety 29: 184–191.

PRILOZI

Prilog 1 Statistički značajne razlike po parovima tretmana (p-vrijednosti) određene su primjenom Tukey-Kramer HSD post-hoc testa: K- (voda), K+ (vodikov peroksid), V (neobrađena smola), A (smola isprana izopropilnim alkoholom), U (isprana smola izložena UV svjetlu); 1 (volumen 1 cm³), 2 (volumen 8 cm³).

Parovi tretmana	Statistički značajne razlike po parovima tretmana (p-vrijednosti)			
	Duljina korjenčića	Mitotski indeks	Kromosomske aberacije	Interfazne vakuole
K- vs K+	p < 0,000001	0,346585	0,948963	0,997045
K- vs V1	p < 0,000001	0,246530	0,999994	0,998155
K- vs A1	p < 0,000001	0,165762	1,000000	0,079779
K- vs U1	0,570775	0,483763	0,654370	0,978642
K- vs V2	p < 0,000001	0,054421	0,876234	0,992125
K- vs A2	p < 0,000001	0,716401	1,000000	0,459205
K- vs U2	0,999995	0,064450	0,373519	0,995971
K+ vs V1	0,299472	1,000000	0,987515	1,000000
K+ vs A1	0,002847	0,999993	0,962435	0,383681
K+ vs U1	p < 0,000001	0,999998	0,998502	0,999996
K+ vs V2	0,020777	0,993425	1,000000	1,000000
K+ vs A2	0,035207	0,996232	0,914048	0,903118
K+ vs U2	p < 0,000001	0,996347	0,974994	1,000000
V1 vs A1	p < 0,000001	0,999999	0,999999	0,270124
V1 vs U1	p < 0,000001	0,999985	0,801177	0,999959
V1 vs V2	p < 0,000001	0,994595	0,957938	1,000000
V1 vs A1	p < 0,000001	0,990668	0,999904	0,833417
V1 vs U2	p < 0,000001	0,997189	0,533844	1,000000
A1 vs U1	0,000002	0,999519	0,693734	0,545558
A1 vs V2	0,997431	0,999384	0,902093	0,352980
A1 vs A2	0,984571	0,964886	0,999999	0,973869
A1 vs U2	p < 0,000001	0,999775	0,411828	0,309946
U1 vs V2	p < 0,000001	0,969455	0,999628	0,999999
U1 vs A2	p < 0,000001	0,999731	0,575714	0,970758
U1 vs U2	0,675642	0,979536	0,999973	0,999993
V2 vs A2	0,999998	0,766447	0,816024	0,903137
V2 vs U2	p < 0,000001	1,000000	0,986471	1,000000
A2 vs U2	p < 0,000001	0,806765	0,304580	0,870976
Statistički značajno p < 0,05		Granično statistički značajno p ≈ 0,05		

Utjecaj glikemijskog indeksa obroka na sitost i kognitivne sposobnosti učenika

Lili Bračić, 2. razred
Emilia Ćurapov, 2. razred

V. gimnazija, Zagreb
Mentor: *Romana Halapir Franković*

SAŽETAK
Glukoza je osnovni izvor energije za mozak, a način na koji nakon obroka raste i pada u krvi može utjecati na osjećaj sitosti te na uspješnost održavanja pažnje tijekom nastave. Kako bi se ispitala ova tvrdnja, provedeno je istraživanje na učenicima trećih i četvrtih razreda srednje škole kojim se ispitivao utjecaj glikemijskog indeksa (GI) obroka na promjene razine glukoze u krvi, subjektivni osjećaj sitosti i kognitivne sposobnosti. Sudionici su podijeljeni u dvije početno ujednačene skupine: skupina A koja je konzumirala obrok visokog GI-a i skupinu B koja je konzumirala približno izokaloričan obrok niskog GI-a. Ciljevi istraživanja bili su usporediti promjene razine glukoze u više vremenskih intervala nakon konzumacije obroka različitog GI-a, utvrditi razlike u osjećaju sitosti između skupina te ispitati postoje li promjene u kognitivnim sposobnostima ovisno o vrsti obroka. Razina glukoze mjerena je glukometrom iz kapilarne krvi u više mjernih točaka nakon obroka, sitost je procjenjivana digitalnom vizualno-analognom skalom (VAS), a kognitivne sposobnosti procijenjene su testom koncentracije. Rezultati su potvrdili početnu hipotezu: obrok visokog GI-a uzrokovao je izraženiji porast glukoze u krvi i raniji povrat gladi u odnosu na obrok niskog GI-a, pri čemu su statistički značajne razlike u osjećaju sitosti zabilježene 30 i 90 minuta nakon obroka. U području kognitivnih sposobnosti nisu utvrđene statistički značajne razlike između skupina, što se može povezati s ograničenjima primijenjenog testa (kratko trajanje i učinak učenja). Rezultati dobiveni obradom podataka ukazuju na važnost sastava obroka u svrhu regulacije sitosti i održavanja pažnje te se naglašava potreba za edukacijom učenika srednje škole o prehrani koja pridonosi stabilnijoj koncentraciji glukoze u krvi te boljem osjećaju sitosti.

Ključne riječi: *prehrana; glukoza u krvi; glukometar; glad; koncentracija*

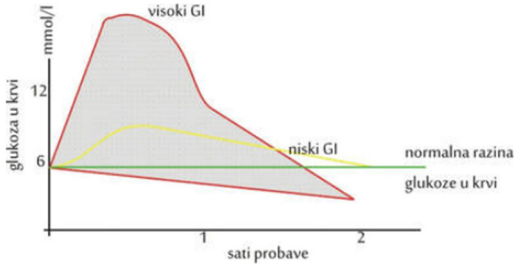
UVOD

Teorijska osnova i dosadašnje spoznaje

Prehrana ima temeljnu ulogu u održavanju energetske ravnoteže (homeostaze) potrebne za normalno funkcioniranje svih naših organa, posebice mozga, metabolički najaktivnijeg organa ljudskoga tijela. Iako čini tek 2 % ukupne tjelesne mase, mozak u mirovanju troši približno 20 % ukupne glukoze dostupne u krvotoku (Guyton i Hall, 2012). Budući da živčane stanice nemaju sposobnost skladištenja značajnih zaliha glikogena kao rezerve glukoze, kognitivne sposobnosti izravno ovise o stabilnoj razini šećera u krvi. Pod kognitivne sposobnosti podrazumijevaju se vještine uključene u obavljanje zadataka povezanih s opažanjem, učenjem, pamćenjem, razumijevanjem, sviješću, prosuđivanjem, prosudbom, intuicijom i jezikom (APA Rječnik psihologije, 2018). Razina glukoze u krvi regulira se djelovanjem dvaju hormona gušterače: inzulina i glukagona. Nakon obroka, kada glukoza u krvi poraste, luči se inzulin koji potiče ulazak glukoze u stanice te njezinu pohranu u jetri i mišićima u obliku glikogena. Između obroka, kada glukoza u krvi padne, luči se glukagon koji potiče otpuštanje glukoze iz jetre u krv, čime se razina glukoze vraća prema uobičajenim vrijednostima (Guyton i Hall, 2012; UCSF Diabetes Teaching Center, n.d.).

Metaboličke reakcije organizma nakon jela mijenjaju se ovisno o glikemijskom indeksu (*GI*) konzumirane hrane. GI je sustav rangiranja namirnica koji pokazuje koliko brzo i koliko snažno određena hrana podiže razinu glukoze u krvi nakon konzumacije u rasponu 0 – 100. Vrijednosti 0 – 55

smatraju se niskima, 56 – 69 srednjima, a više od 70 visokima (A good guide to good carbs: The glycemic index (HHP, 2025)). Namirnice visokog GI-a, poput industrijski prerađene hrane bogate jednostavnim šećerima i siromašne vlaknima (npr. bijeli kruh, peciva od lisnatog tijesta, grickalice, čokolada i zaslađeni sokovi), uzrokuju brži porast glukoze u krvi. Zbog toga što sadrže dodane šećere i/ili škrob iz rafiniranog brašna, te malo vlakana, razgradivi ugljikohidrati su probavnim enzimima lakše dostupni i brže se razgrađuju te potiču snažno lučenje inzulina (FAO/WHO, 1998). To može dovesti do bržeg pada glukoze nekoliko sati nakon obroka (slika 1), a kod osjetljivijih pojedinaca i do reaktivne hipoglikemije, odnosno naglog pada šećera u krvi uzrokovanim pretjeranim lučenjem inzulina (NHS, 2024). Takva brza kolebanja razine glukoze u krvi mogu biti povezana s privremenim padom koncentracije, smanjenom brzinom obrade informacija i povećanim mentalnim umorom (Benton, 2010; Hoyland i sur., 2009). Nasuprot tome, namirnice niskog GI-a, odnosno one bogate vlaknima, proteinima, složenim ugljikohidratima i mastima (npr. zobene pahuljice, mahunarke, orašasti plodovi, jogurt, većina svježeg voća), omogućuju postupno otpuštanje glukoze te umjereno lučenje inzulina, što doprinosi stabilnijoj razini glukoze u krvi te se često povezuje s produljenim osjećajem sitosti (Tolfrey i Zakrzewski, 2012). Vlakna mogu usporiti razgradnju i apsorpciju ugljikohidrata, a masti i bjelančevine u obroku dodatno usporavaju pražnjenje želuca, pa glukoza postupnije ulazi u krv i porast joj je umjereniji (FAO/WHO, 1998).



Slika 1 Ovisnost razine glukoze u krvi hrane visokog i niskog GI-a o vremenu probave
Izvor: Glikemijski index - da li je još aktualan? - Fitonutricionizam, pristupljeno 15.1.2026.

Budući da u stvarnom životu ne jedemo uvijek iste količine ugljikohidrata, uz GI se često koristi i glikemijsko opterećenje (*GL*), koje uzima u obzir i GI i količinu probavljivih ugljikohidrata u porciji (Brand-Miller i sur., 2002). Istraživanja provedena na djeci i adolescentima upućuju na to da obroci nižeg GI-a mogu produžiti sitost i smanjiti kasniji unos hrane u usporedbi s obrocima visokog GI-a. Ipak, autori naglašavaju da su potrebna dodatna istraživanja i dosljedno kontrolirani uvjeti kako bi se potvrdilo navedeno (Tolfrey i Zakrzewski, 2012).

Motivacija i odabir teme

Glavni poticaj za istraživanje proizašao je iz promatranja prehrambenih navika učenika tijekom velikog odmora. U sklopu naše škole ne postoji organizirana kantina, stoga su učenici usmjereni na najbrža i najjeftinija rješenja koja su postala svakodnevni standard, odnosno riječ je o proizvodima iz pekarnice, industrijski prerađenim grickalicama iz trgovine ili samoposlužnog automata. Pretpostavljamo da velik broj učenika i ostatak dana konzumira sličnu hranu.

Primarna istraživačka ideja bila je proučiti povezanost ljudske mikrobiote (bakterija u probavnom sustavu) i kognitivnih sposobnosti kroz os crijevo – mozak. Međutim, budući da takav pristup zahtijeva rad s osjetljivim biološkim uzorcima i opremu koju školski laboratorij ne posjeduje, tema je prilagođena našim mogućnostima.

Istraživanjem je ispitano kako obroci visokoga GI-a, poput industrijski prerađene hrane, utječu na sitost, koncentraciju i kognitivne sposobnosti tijekom nastave. Ovime rad dobiva i praktičnu vrijednost jer analizira stvarni problem s kojim se učenici u školskom okruženju suočavaju.

Na temelju navedenog postavljeni su sljedeći ciljevi:
1. Ispitati i usporediti utjecaj obroka različitog GI na promjene vrijednosti glukoze u krvi u učenika mjerenjem natašte te u određenim vremenskim točkama nakon konzumacije obroka (30, 90, 150 minuta nakon konzumacije obroka).
2. Usporediti trajanje i intenzitet osjećaja sitosti nakon konzumacije obroka visokog te obroka niskog GI-a tijekom 180 minuta.
3. Ispitati i usporediti razinu koncentracije i kognitivne točnosti primjenom standardiziranog kognitivnog testa (Test traženja simbola) u određenim vremenskim intervalima nakon konzumacije.
4. Na temelju dobivenih rezultata istraživanja, educirati učenike škole o utjecaju GI-a obroka na osjećaj sitosti, razinu koncentracije i mentalni umor, s ciljem poticanja informiranog odabira prehrane tijekom školskog dana.

Hipoteze:

- Pretpostavlja se da će ispitanici koji konzumiraju obrok višega GI-a imati veći porast glukoze u krvi 30 minuta nakon konzumacije obroka te izraženiji pad glukoze u kasnijim mjerenjima (90 i 150 minuta nakon konzumacije obroka) u odnosu na učenike koji konzumiraju obrok nižega GI-a;
- Pretpostavlja se da će ispitanici koji konzumiraju obrok niskog GI-a pokazati značajno sporiji pad osjećaja sitosti u usporedbi s onima koji konzumiraju obrok visokog GI-a;
- Pretpostavlja se da će obrok visokog GI-a uzrokovati pad točnosti i brzine rješavanja testova približno 170 minuta nakon konzumacije hrane uslijed očekivane reaktivne hipoglikemije (koja će biti provjerena glukometrom) dok će konzumacija obroka niskoga GI-a pokazati stabilnost rezultata.

METODE RADA

Sudionici, raspodjela u skupine i uvjeti provedbe

Istraživanje je provedeno pod nadzorom profesora u prostorijama škole gotovo svakog nastavnog dana u jutarnjoj smjeni u trajanju od deset dana. U istraživanju je sudjelovalo 110 učenika (59 mladića i 51 djevojka) trećih i četvrtih razreda srednje škole u dobi između 16 i 19 godina. 60 učenika konzumiralo je obrok visokog, a njih 50 obrok niskog GI-a.

Radi postizanja što veće usporedivosti skupina, dva tjedna prije početka eksperimentalnog dijela istraživanja provedeni su predtest i anketa na većem uzorku učenika u neutralnim uvjetima. Anketom provedenom putem *Google Forms*-a prikupljeni su podatci o uobičajenoj prehrani, broju obroka, tjelesnoj aktivnosti, snu tijekom školskog tjedna, razini stresa, navici konzumacije kofeina (kava/energetska pića) te mogućim zdravstvenim poteškoćama (prilog 1). Istodobno je proveden inicijalni kognitivni predtest na papiru u trajanju od približno pet minuta (prilog 2).

Rezultati ankete i predtesta iskorišteni su za raspodjelu ispitanika u dvije skupine (Skupina A – obrok visokog GI-a i Skupina B – obrok niskog GI-a) tako da su skupine međusobno ujednačene prema dobi, spolu, životnim navikama i početnim rezultatima obrade informacija.

Bilo je nužno da učenici dobrovoljno pristanu na sudjelovanje u istraživanju te prilože suglasnost roditelja u slučaju da su maloljetni. Učenici s alergijama ili intolerancijama na namirnice poput glutena, laktoze ili orašastih plodova bili su smješteni u skupine u skladu s njihovim prehrambenim ograničenjima. Nisu mogli sudjelovati oni učenici s poremećajima u regulaciji glukoze ili lučenju inzulina.

Provedba istraživanja

Dan uoči svakog mjerenja ispitanicima je održana kratka edukacija o provođenju eksperimenta i važnosti pridržavanja danih uputa kako bi eksperiment bio ispravan. Preporučena im je konzumacija uravnotežene večere niskog GI-a te osiguravanje 7 – 8 sati sna. Na dan mjerenja ispitanici su došli natašte, uz uputu da toga jutra ne konzumiraju kofeinske niti zaslađene napitke, već samo vodu.

Rast i pad glukoze u krvi u svakoj provedbi eksperimenta pratili su se tijekom 180 minuta; od početka eksperimenta kada su ispitanici bili natašte (TP) do pretpostavljene stabilizacije glukoze (T150). Odabrane su točke TP, T30, T90 i T150. Točka T30 odabrana je kao rana točka u kojoj se uobičajeno bilježi najveći porast glukoze nakon obroka, T90 odabrana je kao srednja točka u kojoj se očekuje početak pada, a T150 kao kasnija točka važna za praćenje mogućega naglijeg pada (reaktivne hipoglikemije) nakon obroka visokog GI-a, prikazanog i u teorijskom uvodu (slika 1).

Tijekom mjerenja, tjelesna aktivnost bila je ograničena kako bi se smanjila potrošnja glukoze u mišićima i time smanjio utjecaj tjelesne aktivnosti na rezultate (Derouich i Boutayeb, 2002).

U tablici 1 prikazan je detaljan plan provođenja eksperimenta.

Tablica 1 Tijek svakodnevne provedbe eksperimenta

Točka mjerenja	Vrijeme (sat)	Aktivnost	Svrha
TP (početno, natašte)	08:00 – 08:15	Prezentacija rada i plana, edukacija i uvod u istraživanje (prilog 3). **Nulto mjerenje:** • glukometar • (probni) test sitosti i koncentracije.	Sudionici su upoznati s planom provedbe eksperimenta te su im objašnjeni ključni teorijski pojmovi (GI, regulacija glukoze u krvi…). Izmjerena je razina glukoze u krvi natašte te je proveden **probni** kognitivni test radi pripreme za daljnja testiranja.
T0 OBROK	08:15 – 08:30	**Konzumacija obroka** • Skupina A- visoki GI • Skupina B- niski GI	Obroci su konzumirani u jednakim vremenskim intervalima i ujednačenim tempom.
T30 (30 minuta nakon jela)	09:00 – 09:10	**Prvo mjerenje:** • glukometar • test sitosti i koncentracije.	Izmjerena je razina glukoze u krvi u razdoblju očekivanog porasta šećera. Sudionici rješavaju test sitosti i koncentracije pri najvišoj izmjerenoj razini glukoze.
T90 (90 minuta nakon jela)	10:00 – 10:10	**Drugo mjerenje:** • glukometar • test sitosti i koncentracije.	Izmjerena je razina glukoze u krvi ispitanika u fazi očekivanog slabog pada šećera. Sudionici rješavaju test sitosti i koncentracije drugi put.
T150 (150 minuta nakon jela)	11:00 – 11:10	**Treće mjerenje:** • glukometar • test sitosti i koncentracije.	Izmjerena je razina glukoze u krvi ispitanika u fazi očekivanog pada razine šećera. Sudionici rješavaju test sitosti i koncentracije treći put.

Mjerenja i postupci

Glukoza u krvi mjerena je školskim Bionime Righttest 550 glukometrom u unaprijed određenim vremenskim točkama (TP, T30, T90, T150). Treće mjerenje (T150) bilo je poželjno provesti kod što većeg broja ispitanika kako bi kasniji tijek promjena mogao biti preciznije praćen, no zbog ograničene

količine školskog materijala (test-trakica glukometra) to nije bilo moguće učiniti kod svih ispitanika, već kod njih 44 (22 iz A te 22 iz B skupine). *Excel*-tablica sa svim rezultatima mjerenja glukoze u krvi nalazi se u prilogu (prilog 6).

Kao dodatna kontrola, eksperiment je ponovljen na uzorku od dvadeset ispitanika. Dio ispitanika konzumirao je isti obrok kao prethodnoga dana, dok je dio konzumirao drugačiji obrok. Ova je provjera provedena radi dodatne usporedbe rezultata i provjere njihove stabilnosti na manjem uzorku ispitanika. Zbog ograničenog broja ispitanika i dostupnih test-trakica, ova se kontrola smatra dopunom glavnim mjerenjima.

Tijekom cijelog postupka poštivani su higijenski i sigurnosni uvjeti (slika 2):

- korištene su zaštitne rukavice
- mjesto uboda bilo je dezinficirano medicinskim alkoholom
- za svakog učenika i za svako mjerenje korištena je nova, sterilna lanceta
- test-trakice za glukometar korištene su jednokratno i prema uputama proizvođača
- radna površina bila je uredna i pripremljena (stolovi sa papirnatim stolnjacima i ubrusima; pribor je bio organiziran na pladnju).

Postupak mjerenja glukoze (provedeno iz kapilarnog uzorka krvi):

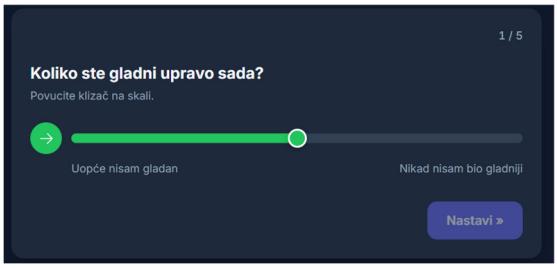
1. Učenik dobiva upute promasirati jagodicu prsta kako bi se potaknuo protok krvi.
2. Jagodica prsta dezinficirana je vaticom natopljenom 70-postotnim medicinskim alkoholom.
3. Jagodica prsta probodena je lancetarom u kojem se nalazi sterilna lanceta (slika 3)
4. U glukometar je umetnuta test-trakica koja zatim upija kap krvi.
5. Vrijednost glukoze prikazuje se na zaslonu glukometra unutar približno pet sekundi.

U slučaju da se na zaslonu glukometra pojavila poruka o pogrešci (Er1, Er3 ili Er4), mjerenje je ponovljeno s novom test-trakicom, a po potrebi i s novim ubodom, pri čemu su ponovno poštovani svi higijenski uvjeti.

Slika 2 Materijali za mjerenje glukoze u krvi
Autor: Bračić L., 2026

Slika 3 Uzimanje uzorka krvi u svrhu mjerenja glukoze
Autor: Bračić L., 2026

Za procjenu sitosti korištena je vlastita VAS-skala (vizualna analogna skala; slika 4), kojom je subjektivni osjećaj gladi i sitosti pretvoren u brojčanu vrijednost (Crichton, 2001). Sudionici su na mrežnoj stranici napravljenoj isključivo za provođenje istraživanja označavali svoj doživljaj gladi/sitosti povlačenjem klizača na ljestvici duljine 0 – 100 (slika 4). Upitnik je radi što veće preciznosti i usporedivosti podataka u statističkoj obradi sadržavao pet pitanja o gladi/sitosti ispitanika (prilog 4).



Slika 4 Primjer pitanja VAS-skale sitosti
Izvor: https://core-symbol-search.vercel.app/

Test koncentracije u trajanju od dvije minute proveden je putem iste mrežne stranice kao i VAS-skala sitosti (prilog 5). Proveden je u istim uvjetima za sve ispitanike. U svakom zadatku u gornjem dijelu zaslona bila su prikazana dva ciljna simbola, a u donjem dijelu pet ponuđenih simbola i oznaka „NEMA“, kao što je prikazano na slici 5. Zadatak ispitanika bio je što brže označiti simbol među ponuđenima koji se podudara s bilo kojim ciljnim simbolom. Ako se nijedan ciljni simbol nije pojavio među ponuđenima, označila se opcija „NEMA”.

Slika 5 Primjer zadatka testa koncentracije
Izvor: https://core-symbol-search.vercel.app/

Mrežna stranica koja je sadržavala VAS-skalu sitosti i test koncentracije bila je prikazana na projektoru pred svim ispitanicima u obliku QR-koda, a ispunjavanje je, uz probno mjerenje, provedeno ukupno tri puta u unaprijed određenim vremenskim točkama. Rezultati su nakon svakog ispunjavanja zabilježeni u obrascu za obradu podataka. Mrežna stranica s testom i uputama nalazi se u prilogu (prilog 4, 5).

Priprema obroka i izračuni (GI i GL)

Za pripremu obroka korišteni su komercijalno dostupni proizvodi radi preciznosti u izračunu nutritivnih vrijednosti (energetska vrijednost i udio šećera) određene hrane kupljene u trgovini. Obroci su bili približno izokalorični (400 kcal). Time je omogućena usporedivost obroka, uz kontrolu energetskog unosa kao mogućeg čimbenika koji utječe na sitost.

GI nije dovoljan pokazatelj učinka obroka jer prikazuje brzinu porasta glukoze u krvi nakon unosa namirnice, ali ne uzima u obzir količinu ugljikohidrata u uobičajenoj porciji. Zbog toga namirnice s jednakim ili sličnim GI-om mogu izazvati različit glikemijski odgovor, odnosno različitu promjenu (porast i kasniji pad) razine glukoze u krvi nakon jela, ako se u porciji razlikuju po količini ugljikohidrata (UIUC, 2025). Stoga je izračunato glikemijsko opterećenje (*GL*), jer objedinjuje GI i količinu probavljivih ugljikohidrata u porciji (ne-uključujući vlakna), pa preciznije opisuje očekivani učinak porcije. GL je izračunat prema formuli :

$$GL = \frac{GI \ \times gramaža\ probavljivih\ ugljikohidrata}{100}$$

Za miješani obrok ukupni *GL* dobiven je zbrajanjem *GL* vrijednosti svih sastavnica. Dobivene vrijednosti razvrstane su kao: nizak GL ≤ 10, umjeren GL 11–19, visok GL ≥ 20 (po porciji) (UIUC, 2025).

U većini hrvatskih komercijalnih proizvoda GI nije naveden na deklaraciji jer njegovo navođenje nije obvezno prema pravilima o informiranju potrošača o hrani Europske Unije (EU, 2011). Zbog toga za dio korištenih proizvoda nije bio dostupan izravno izmjeren GI, pa su pri izračunu upotrijebljene GI-vrijednosti najsličnijih namirnica iz standardnih tablica (Atkinson i sur., 2008), kao što je prikazano u tablicama 2 i 3.

Skupina A (Visoki GI):

Tablica 2 Namirnice visokog GI-a za obrok A skupine

Namirnica	Količina (masa)	Obilježje	Količina slobodnih šećera	Približna energetska vrijednost	Proizvođač	GI	GL
Bijeli tost kruh	50 g (dvije kriške)	proizvod pšeničnog podrijetla, rafinirano brašno	2,8 g	140 kcal	Zagrebačke pekarne KLARA d.d.	77	20,02
Lino Lada	30 g	čokoladni namaz	17,1 g	160 kcal	Podravka d.d.	33	5,35
Sok od naranče	200 ml	tetrapak, zaslađen	22,4 g	95 kcal	VINDIJA d.d.	54	12,09

- Ukupan udio šećera: približno 42,3 g
- Ukupan broj kilokalorija: približno 400 kcal

Slika 6 Korištene namirnice visokog GI-a: a) Toast 500 g (izvor: https://www.konzum.hr/web/products/toast-500-g-klara, pristupljeno 13. 1. 2026.), b) Lino Lada 700 g (izvor: https://www.konzum.hr/web/products/lino-lada-namaz-duo-700g-podravka, pristupljeno 13. 1. 2026.), c) Vindi premium naranča 1 l (izvor: https://www.konzum.hr/web/products/vindi-sok-100-naranca-1-l, pristupljeno 13. 1. 2026.)

Večer uoči eksperimenta (12 — 14 sati ranije) sendviči od tost-kruha (slika 6a) i čokoladnoga namaza (slika 6b) pripremljeni su i zapakirani u aluminijsku foliju (slika 7a) te odloženi u školski hladnjak do provedbe mjerenja (slika 7b). Sok (slika 6c) je poslužen uz obrok.

Slika 7 Priprema obroka visokog GI-a: a) Mazanje tost kruha čokoladnim namazom i pakiranje u aluminijsku foliju (Autor: Bračić L., 2026), b) Pohrana obroka visokog GI-a u hladnjaku do konzumacije (Autor: Ćurapov E., 2026)

Skupina B (Niski GI):

Budući da istraživanja o regulaciji apetita pokazuju da okusnost (palatabilnost) hrane može značajno utjecati na subjektivni doživljaj gladi i sitosti te potaknuti veći unos (Yeomans, 1998), u obrok Skupine

B dodano je 5 g eritritola radi poboljšanja okusnosti. Pritom eritritol ima *GI = 0* te zanemariv učinak na lučenje inzulina, pa mu je *GL = 0*, zbog čega ne mijenja ukupno glikemijsko opterećenje obroka (Livesey, 2003; Wölnerhanssen i sur., 2016).

Tablica 3 Namirnice niskog GI-a za obrok B skupine.

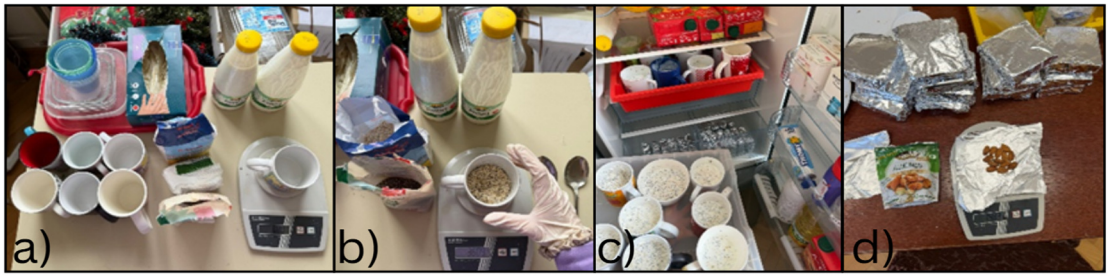
Namirnica	Količina (masa)	Obilježje	Količina slobodnih šećera	Približna energetska vrijednost	Proizvođač	GI	GL
Sitne zobene pahuljice	30 g	integralna žitarica	< 1 g	110 kcal	H. & J. Brüggen KG	14,61	8,47
Tekući jogurt	150 g	2,8 % m.m., prirodni izvor bjelančevina	7,5 g	95 kcal	Prehrambena industrija Vindija d.d.	7,65	1,3
Bademi	20 g	izvor polinezasićenih masnih kiselina	< 0,5 g	120 kcal	Garden Good	0	~ 0
Svježa jabuka	50 g	izvor pektina i dijetalnih vlakana	9 g	45 kcal	ARIVERA FRUIT d.o.o.	44	3,96
Chia sjemenke	7 g	izvor vlakna	0 g	35 kcal	Garden Good	0	~ 0
Eritrol	5 g	dobiven iz kukuruza	0 g	0	Biovega d.o.o.	0	0

- Ukupan udio šećera: otprilike 17 g (isključivo prirodnog podrijetla uz visok udio vlakana)
- Ukupan broj kilokalorija: približno 400 kcal

Slika 8 Korištene namirnice niskog GI-a: a) Jabuka Gala (izvor: https://www.konzum.hr/web/products/gala-jabuka, pristupljeno 15. 1. 2026.), b) Sitne zobene pahuljice od cijelog zrna (izvor: https://www.konzum.hr/web/products/bruggen-zobene-pahuljice-extra-500-g, pristupljeno 15. 1. 2026.), c) Tekući jogurt 2,8 % m.m. (izvor: https://www.konzum.hr/web/products/z-bregov-jogurt-2-8-m-m-1kg, pristupljeno 15. 1. 2026.), d) Chia sjemenke (izvor: https://www.konzum.hr/web/products/chia-sjemenke-garden-good-200g, pristupljeno 15. 1. 2026.), e) Jezgra badema (izvor: https://www.konzum.hr/web/products/garden-good-bademi-180-g, pristupljeno 15. 1. 2026.)

Priprema obroka provedena je večer uoči mjerenja (12 – 14 sati ranije). Chia-sjemenke (slika 8d), sitne zobene pahuljice (slika 8b) i tekući jogurt (slika 8c) bili su izmjereni školskom digitalnom vagom (slika 9a,b), zatim međusobno pomiješani te pohranjeni u školski hladnjak na temperaturi ≤ 4 °C (slika 9c). Iste večeri izmjerena je i porcija badema (slika 8e) nakon čega je bila zamotana u aluminijsku foliju do posluživanja (slika 9d).

Na dan mjerenja, sat vremena prije konzumacije, jabuke (slika 8a) su bile oprane te izrezane na kriške od približno 50 g (otprilike polovina jabuke). Uz obrok je poslužena čaša vode.



Slika 9 Priprema obroka niskog GI-a: a) Materijali za pravljenje obroka niskog GI-a; b) Vaganje i miješanje namirnica niskog GI-a; c) Pohrana obroka niskog GI-a u hladnjak do konzumacije; d) Vaganje i pakiranje badema
Autor: Ćurapov E., 2026

Obroci su sudionicima posluženi u jednakim higijenskim uvjetima, na unaprijed pripremljenim i dezinficiranim podlogama, uz korištenje čistog pribora i jednokratnih salveta, pri čemu je svaka osoba dobila vlastiti obrok i čašu, kako bi se osigurala urednost tijekom posluživanja (slika 10).

Slika 10 Svi potrebni materijali i pribor pripremljeni za dnevno provođenje istraživanja
Autor: Ćurapov E., 2026

Kontrola varijabli i statistička analiza

Rezultati mjerenja razine glukoze u krvi zabilježeni su u tablice i razvrstani prema skupini (A – viši GI; B – niži GI). Tablica sa svim izmjerenim vrijednostima glukoze nalazi se u prilogu (prilog 6). Rezultati su uspoređeni unutar iste skupine te između skupina A i B u svim vremenskim točkama kako bi se utvrdilo razlikuje li se tijek rasta i pada razine glukoze u krvi ovisno o GI-u obroka.

Podaci o glukozi u krvi po skupinama obrađeni su deskriptivnom statistikom i prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija uzorka te raspon (min – max). Razlike između skupina A i B u svim vremenskim točkama provjerene su inferencijalnom statistikom: pri približno normalnoj raspodjeli korišten je t-test za nezavisne uzorke, a pri odstupanju od normalnosti Mann-Whitneyjev U-test (MWU). U analizi je korištena razina značajnosti $p = 0{,}05$.

Formula standardne devijacije uzorka koja prikazuje raspršenost podataka oko aritmetičke sredine, pri čemu je s standardna devijacija uzorka, x pojedinačna vrijednost u uzorku, $\bar{x}$ aritmetička sredina uzorka, a n broj opažanja u uzorku, odnosno ukupan broj podataka koji su uključeni u izračun:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x-\bar{x})^2}{n-1}}$$

Graf kretanja glukoze izrađen je u Pythonu putem biblioteka Pandas, matplotlib, numpy i scipynumpy. Budući da su mjerenja provedena u četiri vremenske točke, za prikaz glatkog tijeka kroz vrijeme međutočke procijenjene su PCHIP interpolacijom (kubni Hermiteov interpolacijski polinom po dijelovima) odabranom radi dobrog očuvanja oblika krivulje bez nerealnih oscilacija pri obradi glikemijskih podataka. Korištena je Scipy implementacija PCHIP polinoma (SciPy Developers, 2025; MathWorks, 2026).

Rezultati osjećaja gladi i sitosti dobiveni VAS-upitnikom (prilog 4) pretvoreni su u brojčane vrijednosti 0 – 100, a zatim je izračunan složeni pokazatelj apetita (CAS, engl. composite appetite score) kao zbroj pet odgovora: tri odgovora koji izravno mjere glad/apetit zbrojeni su izravno, dok su se odgovori na pitanja o punini i sitosti prethodno preračunali oduzimanjem od 100 (tj. 100 minus dobivena vrijednost), kako bi veće vrijednosti u svim pitanjima dosljedno označavale izraženiji apetit.

Rezultati kognitivnih sposobnosti dobiveni testom koncentracije (prilog 5) obrađeni su tako da je u svakoj vremenskoj točki za svakog sudionika zabilježen broj točnih odgovora, nakon čega je za skupinu A i za skupinu B izračunata srednja vrijednost (prosjek) broja točnih odgovora. Tako dobivene srednje vrijednosti zatim su u svakoj vremenskoj točki statistički uspoređene između skupina A i B.

REZULTATI

Glukoza u krvi deskriptivnom statistikom

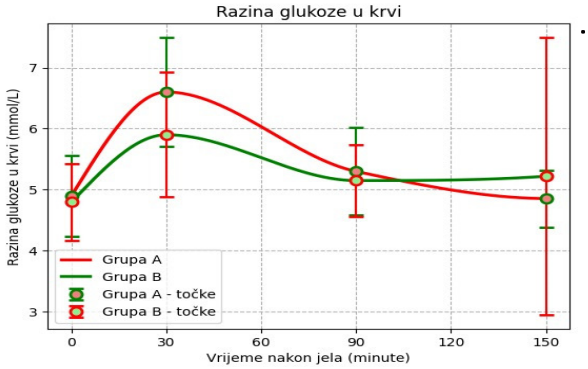
U početnom mjerenju (TP) pri kojemu su sudionici bili natašte prosječne vrijednosti glukoze bile su vrlo slične u obje skupine. Skupina A imala je srednju vrijednost glukoze u krvi u iznosu od 4,96 ± 0,66 mmol/L , a Skupina B 4,92 ± 0,63 mmol/L . Raspon vrijednosti glukoze u krvi natašte iznosio je 3,0 – 6,6 mmol/L u skupini A te 2,8 – 6,8 mmol/L u skupini B.

U prvom mjerenju nakon obroka (T30) u objema je skupinama zabilježen porast glukoze. Srednja vrijednost u skupini A iznosila je 6,80 ± 0,89 mmol/L, dok je u skupini B iznosila 6,23 ± 1,03 mmol/L. Raspon vrijednosti nakon obroka iznosio je 5,6 – 9,7 mmol/L u skupini A te 4,1 – 9,2 mmol/L u skupini B.

U mjerenju 90 minuta nakon obroka (T90) skupina A imala je srednju vrijednost 5,30 ± 0,57 mmol/L, uz raspon 3,9 – 6,7 mmol/L, dok je skupina B imala srednju vrijednost 5,19 ± 0,60 mmol/L, uz raspon 3,4 – 6,3 mmol/L.

Zbog ograničene količine školskog potrošnog materijala, mjerenje u točki T150, 150 minuta nakon obroka, provedeno je na manjem broju sudionika (ukupno n = 44; skupina A: n = 22; skupina B: n = 22). U skupini A srednja vrijednost iznosila je 4,86 ± 0,47 mmol/L (raspon 3,96 – 5,73 mmol/L), a u skupini B 5,05 ± 0,59 mmol/L (raspon 3,48 – 6,11 mmol/L).

Na slici 11 prikazano je kretanje srednjih vrijednosti glukoze u krvi u skupinama A i B kroz sve mjerne točke.



Slika 11 Kretanje prosječne razine glukoze u krvi u skupinama A i B prije obroka te 30, 90 i 150 minuta nakon obroka. Okomite crte prikazuju standardnu devijaciju, a točke označuju srednje vrijednosti skupina.

U podacima su zabilježene pojedinačne vrijednosti izvan uobičajenog raspona. Nakon obroka zabilježene su pojedinačno povišene vrijednosti glukoze do 9,7 mmol/L u skupini A i do 9,2 mmol/L u skupini B. U početnom mjerenju TP zabilježena je i pojedinačno niska vrijednost glukoze 2,8 mmol/L u skupini B.

Glukoza u krvi inferencijalnom statistikom

Usporedba vrijednosti glukoze u krvi između skupina A i B pokazala je da se skupine ne razlikuju statistički značajno u početnom mjerenju (0 minuta), dok je statistički značajna razlika utvrđena 30 minuta nakon obroka (tablica 4). U mjerenjima 90 i 150 minuta nakon obroka nije utvrđena statistički značajna razlika između skupina. Statistički značajni rezultati u tablicama označeni su zelenom bojom (tablice 4 i 5). Primijenjeni statistički testovi (t-test i MWU - Mann-Whitneyjev U-test) i pripadne p-vrijednosti po vremenskim točkama prikazani su u tablici 4.

Tablica 4 Statistička usporedba glukoze u krvi između skupina A i B po vremenskim točkama

Vrijeme nakon obroka	0 minuta	30 minuta	90 minuta	150 minuta
p-vrijednost	0,7292 (t-test)	0,000092 (MWU)	0,2447 (MWU)	0,0864 (MWU)

Sitost / apetit (CAS)

Usporedba složenog pokazatelja apetita (CAS) između skupina pokazala je da se skupine nisu statistički značajno razlikovale prije obroka (0 minuta), dok je statistički značajna razlika utvrđena 30 i 90 minuta nakon obroka. U tim vremenskim točkama skupina A imala je viši CAS od skupine B. U točki 150 minuta (T150) razlika između skupina nije bila statistički značajna. Primijenjeni statistički testovi (t-test i MWU-Mann-Whitneyjev U-test), aritmetičke sredine CAS-a skupina, i pripadne p-vrijednosti po vremenskim točkama prikazani su u tablici 5, pri čemu su statistički značajni rezultati označeni zelenom bojom.

Tablica 5 Statistička usporedba složenog pokazatelja apetita (CAS) između skupina A i B po vremenskim točkama

Vrijeme nakon obroka	0 minuta	30 minuta	90 minuta	150 minuta
Aritmetička sredina skupine A (CAS)	294	192	229	284
Aritmetička sredina skupine B (CAS)	289	143	189	236
p-vrijednost	0,7982 (t-test)	0,0061 (MWU)	0,0483 (t-test)	0,1202 (t-test)

Kognitivne sposobnosti

Analizom rezultata kognitivnog testiranja te statističkim testiranjem t-testom za nezavisne vrijednosti utvrđeno je da ni u jednoj točki mjerenja nije bilo statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između skupina A i B. Rezultati statističkih usporedbi po vremenskim točkama prikazani su u tablici 6.

Tablica 6 Statistička usporedba rezultata testa koncentracije između skupina A i B po vremenskim točkama

Vrijeme nakon obroka	0 minuta	30 minuta	90 minuta	150 minuta
Skupina A; srednja vrijednost	43,07	51,59	53,97	59,49
Skupina B; srednja vrijednost	40,60	50,23	53,24	58,33
p-vrijednost	0,161 (t-test)	0,411 (t-test)	0,705 (t-test)	0,600 (t-test)

Usporedba rezultata prema spolu

Usporedba rezultata između djevojaka i mladića provedena je t-testom za nezavisne uzorke te nije pokazala statistički značajne razlike u razini glukoze u krvi, sitosti (CAS) ni pokazateljima kognitivnih sposobnosti ($p > 0,05$), stoga rezultati prema spolu nisu zasebno prikazani.

RASPRAVA

Glikemijski indeks predstavlja mjeru brzine porasta koncentracije glukoze u krvi nakon konzumacije hrane koja sadrži ugljikohidrate te je važan pokazatelj metaboličkog odgovora organizma (FAO/WHO, 1998), a regulacija glukoze u krvi ključna je za energetsku ravnotežu, održavanje homeostaze i normalno funkcioniranje mozga (Guyton i Hall, 2012). Rezultati provedenog istraživanja djelomično su potvrdili postavljene hipoteze te ukazali na važnost sastava obroka u regulaciji sitosti i dinamike glikemije kod adolescenata.

Rezultati glukoze u krvi sudionika pokazali su da se skupine A i B nisu statistički značajno razlikovale u početnom mjerenju natašte, što potvrđuje njihovu početnu usporedivost. Statistički značajna razlika utvrđena je 30 minuta nakon obroka, pri čemu je skupina A, koja je konzumirala obrok višega GI-a, imala višu srednju vrijednost glukoze u krvi od skupine B. Takav je nalaz u skladu s dosadašnjim spoznajama prema kojima namirnice višega GI-a uzrokuju brži i izraženiji porast glukoze u krvi nakon obroka, dok namirnice nižega GI-a pridonose postupnijem porastu i stabilnijoj razini glukoze u krvi (FAO/WHO, 1998; Tolfrey i Zakrzewski, 2012). U mjerenjima 90 i 150 minuta nakon obroka između skupina nije utvrđena statistički značajna razlika, što upućuje na to da se razlika, izražena neposredno nakon obroka, kasnije smanjivala. Rezultat dobiven 150 minuta nakon obroka treba tumačiti s oprezom jer je to mjerenje provedeno na manjem broju sudionika.

Statističkom analizom utvrđena je značajna razlika u osjećaju sitosti između skupine koja je konzumirala obrok visokog i skupine s obrokom niskog GI-a 30 i 90 minuta nakon obroka. Skupina obroka visokog GI-a pokazivala je raniji porast složenog pokazatelja apetita (CAS), odnosno raniji povrat gladi od one niskog GI-a. Ovakav rezultat u skladu je s fiziološkim mehanizmima regulacije glukoze. Nagli porast glukoze potiče pojačano lučenje inzulina, što može dovesti do bržeg pada koncentracije glukoze i posljedičnog osjećaja gladi (Ludwig, 2002). S druge strane, obroci niskog GI-a uzrokuju sporiji i stabilniji porast glukoze, čime se produljuje osjećaj sitosti, što potvrđuju Brand-Miller i sur. (2002) te HHP (2025). Nadalje, dobiveni rezultati podudaraju se s istraživanjima koja naglašavaju važnost doručka niskog GI-a u adolescentskoj dobi (Tolfrey i Zakrzewski, 2012). Autori tvrde da namirnice niskog GI-a pridonose boljoj regulaciji apetita i unosu energije tijekom dana. Rezultati našega istraživanja time potvrđuju da GI ima mjerljiv utjecaj na subjektivni osjećaj sitosti kod adolescenata.

Kako bi se postigli ovi rezultati, mjerenje sitosti provedeno je pomoću vizualne analogne skale (VAS), koja se smatra pouzdanom metodom za procjenu subjektivnih osjećaja poput boli, gladi, umora i sličnog (Crichton, 2001). Međutim, zbog subjektivnosti procesa, ova metoda može biti neučinkovita zbog individualnog osjećaja gladi, jer je glad različita i subjektivna na psihološkoj i hormonalnoj osnovi ovisno o pojedincu.

Za razliku od rezultata vezanih uz sitost, nije potvrđena hipoteza o statistički značajnoj razlici u kognitivnim sposobnostima između skupina. Prema definiciji Američkog psihološkog udruženja, kognitivne sposobnosti obuhvaćaju procese poput koncentracije, pamćenja, brzine obrade informacija i rješavanja problema (APA, n.d.). Za razliku od Palmera i sur. (2006) koji su provodili seriju testova u trajanju od 30 – 100 minuta, u našem istraživanju korišten je kratak test koncentracije u obliku tražilice simbola u trajanju od dvije minute, zbog čega je vjerojatno smanjena osjetljivost mjerenja. Benton (2010) te Hoyland i sur. (2009) ističu da prehrambeni status može utjecati na mentalnu aktivnost, misaone procese, misaone produkte te kognitivne sposobnosti djece i adolescenata, ali su ti učinci često suptilni i ovise o vrsti zadatka, njegovom trajanju i vremenu testiranja. Moguće je da bi dulji i standardizirani testovi koji obuhvaćaju više domena kognitivnog funkcioniranja pokazali izraženije razlike. Također, ponavljanje istog tipa zadataka moglo je dovesti do učinka učenja simbola i uvježbavanja, čime se smanjila mogućnost detektiranja stvarnih razlika između skupina. Osim toga, jedan od važnih čimbenika jest i precizno određivanje vremena najvećeg pada glukoze u krvi. Guyton i Hall (2012) navode da dinamika lučenja inzulina i promjene glikemije variraju među pojedincima. Ako testiranje nije provedeno u trenutku najizraženijeg pada glukoze, razlike u kognitivnim sposobnostima mogle su ostati neopažene.

Uočene su i individualne razlike u vrijednostima glukoze u krvi i sitosti. Uzrok razlikama mogu biti različite prehrambene navike, trajanje sna, količina stresa, razina i učestalosti tjelesne aktivnosti i hormonalni status pojedinca. Tjelesna aktivnost povećava osjetljivost stanica na inzulin, što utječe na dinamiku glukoze (Derouich i Boutayeb, 2002), dok nedostatak sna povećava razine hormona gladi i potiče osjećaj gladi. Štoviše, hormonalne promjene tijekom puberteta mogu potaknuti regulaciju apetita i metabolizam. Razlike između spolova nisu statistički detaljno razmatrane, međutim, prepoznata su neka odstupanja u početnim vrijednostima. S obzirom na razlike u tjelesnom sastavu i hormonalnom statusu adolescenata, spol bi mogao igrati važnu ulogu moderatora, stoga bi trebao biti detaljnije proučen u daljnjim istraživanjima.

Pojedinačna odstupanja u vrijednostima glukoze mogu ukazivati na varijacije u inzulinskoj osjetljivosti. Iako se na temelju školskog istraživanja ne može postaviti dijagnoza, poznato je da učestale nagle oscilacije glukoze kasnije u životu mogu povećati rizik razvoja inzulinske rezistencije ili dijabetesa tipa 2 (Ludwig, 2002). Učenicima s neuobičajenim oscilacijama glukoze u krvi preporučen je liječnički pregled u zdravstvenom sustavu, stoga edukacija o GI-u ima i preventivnu vrijednost.

Metodološka ograničenja istraživanja uključuju nemogućnost potpune kontrole uvjeta – nije bilo moguće u potpunosti standardizirati večernji obrok, osigurati da svi ispitanici zaista dođu natašte i osiguraju 7—8 sati sna. Kapilarno mjerenje glukoze glukometrom također je manje precizno od laboratorijske analize venske krvi. Smatra se da bi stroža kontrola uvjeta (standardizirani večernji obrok, kontrola količine sna, testiranje u preciznijim vremenskim točkama, dulji i provjereni kognitivni testovi, veći uzorak ispitanika) povećala vjerojatnost potvrđivanja hipoteza i smanjila varijabilnost rezultata. No, unatoč ograničenjima, rezultati istraživanja potvrđuju da GI obroka ima značajan utjecaj na odnos regulacije glukoze u krvi i sitosti kod adolescenata. Iako kognitivni učinak nije statistički potvrđen, istraživanje je pridonijelo boljem razumijevanju povezanosti metaboličkih procesa kod mladih i koncentracije te naglasilo važnost pravilnog izbora ugljikohidrata u njihovoj svakodnevnoj prehrani.

Regulacija glukoze u krvi iznimno je bitna za dugoročno zdravlje metabolizma. FAO/WHO (1998) objašnjava važnost kvalitete ugljikohidrata u prehrani, dok proučena suvremena literatura ističe povezanost visokog glikemijskog opterećenja s povećanim rizikom pretilosti i poremećaja u regulaciji glukoze poput inzulinske rezistencije i dijabetesa tipa 2 (Brand-Miller i sur., 2002). Time istraživanje uzima u obzir pitanja izvan okvira školskog projekta i dobiva širi zdravstveni značaj; educira mlade o čimbenicima koji utječu na razinu glukoze u njihovoj krvi i doprinosi razvoju zdravih prehrambenih navika u njihovu okruženju.

ZAKLJUČCI

- Obrok visokog GI-a uzrokovao je brži i veći porast glukoze u krvi, ali i njezin nagliji pad u usporedbi s obrokom niskog GI-a. Obrok niskog GI-a doveo je do stabilnije i ravnomjernije regulacije glukoze.
- U razdoblju od 30 do 90 minuta nakon obroka visokog GI-a zabilježen je raniji povrat gladi, dok je obrok niskog GI-a osigurao dulji osjećaj sitosti.
- Razlike u sitosti između skupine A i skupine B bile su statistički značajne u vremenskim točkama 30 i 90 minuta nakon obroka, što potvrđuje da sastav obroka utječe na regulaciju apetita i trajanje sitosti.

- U području kognitivnih sposobnosti nisu utvrđene statistički značajne razlike između skupina. Razlog tomu vjerojatno su metodološka ograničenja, poput kratkog trajanja testa i nemogućnosti potpune kontrole uvjeta istraživanja.

LITERATURA

APA. 2018. Cognitive ability. APA Dictionary of Psychology, https://dictionary.apa.org/cognitive-ability, pristupljeno 15.1.2026.

Atkinson F. S., Foster-Powell K., Brand-Miller J. C. 2008. International tables of glycemic index and glycemic load values: 2008. Diabetes Care 31: 2281–2283.

Benton D. 2010. The influence of dietary status on the cognitive performance of children. Molecular Nutrition & Food Research 54: 457–470.

Brand-Miller J. C., Holt S. H. A., Pawlak D. B., McMillan J. 2002. Glycemic index and obesity. The American Journal of Clinical Nutrition 76: 281S–285S.

Crichton N. 2001. Visual analogue scale (VAS). Journal of Clinical Nursing 10: 706–706.

Derouich M., Boutayeb A. 2002. The effect of physical exercise on the dynamics of glucose and insulin. Journal of biomechanics 35: 911–917.

EU. 2011. Regulation (EU) No 1169/2011 on the provision of food information to consumers. EUR-Lex, https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32011R1169, pristupljeno 27.2.2026.

FAO/WHO. 1998. Carbohydrates in human nutrition: report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Fitonutricionizam. 2026. Glikemijski index – da li je još aktualan? Fitonutricionizam, https://www.fitonutricionizam.com/glikemijski-index---da-li-je-joscaron-aktualan.html, pristupljeno 15.1.2026.

Guyton A. C., Hall J. E. 2012. Medicinska fiziologija. Medicinska naklada, Zagreb.

HHP. 2025. A good guide to good carbs: The glycemic index. Harvard Health Publishing, https://www.health.harvard.edu/healthbeat/a-good-guide-to-good-carbs-the-glycemic-index, pristupljeno 14.2.2026.

Hoyland A., Dye L., Lawton C. L. 2009. A systematic review of the effect of breakfast on the cognitive performance of children and adolescents. Nutrition Research Reviews 22: 220–243.

Livesey G. 2003. Health potential of polyols as sugar replacers, with emphasis on low glycaemic properties. Proceedings of the Nutrition Society 62: 161–171.

Ludwig D. S. 2002. The glycemic index: physiological mechanisms relating to obesity. International Journal of Obesity 26: S33–S38.

MathWorks. 2026. Interpolation methods. MathWorks, https://www.mathworks.com/help/matlab/ref/pchip.html, pristupljeno 17.2.2026.

NHS. 2024. Diet advice for adults with reactive hypoglycaemia. Leicester's Hospitals, https://yourhealth.leicestershospitals.nhs.uk/library/csi/dietetics/3056-diet-advice-for-adults-with-reactive-hypoglycaemia/file, pristupljeno 10.2.2026.

Papanikolaou Y., Palmer H., Binns M. A., Jenkins D. J. A., Greenwood C. E. 2006. Better cognitive performance following a low-glycaemic-index compared with a high-glycaemic-index carbohydrate meal in adults with type 2 diabetes. Diabetologia 49: 855–862.

SciPy. 2025. PchipInterpolator — SciPy v1.17.0 Manual. SciPy, https://docs.scipy.org/doc/scipy/reference/generated/scipy.interpolate.PchipInterpolator.html, pristupljeno 27.2.2026.

Tolfrey K., Zakrzewski J. K. 2012. Breakfast, glycaemic index and health in young people. Journal of Sport and Health Science 1: 149–159.

UCSF. 1977. Blood Glucose Regulation in the Body. Diabetes Teaching Center, University of California San Francisco, https://diabetesteachingcenter.ucsf.edu/content/blood-glucose-regulation-in-the-body, pristupljeno 14.2.2026.

UIUC. 2025. Glycemic Load and Glycemic Index. University of Illinois Extension, https://extension.illinois.edu/diabetes/glycemic-load-and-glycemic-index, pristupljeno 27.2.2026.

Wölnerhanssen B. K., Cajacob L., Keller N., Doody A., Rehfeld J. F., Drewe J., Peterli R., Beglinger C., Meyer-Gerspach A. C. 2016. Gut hormone secretion, gastric emptying, and glycemic responses to erythritol and xylitol in lean and obese subjects. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism 310: E1053–E1061.

Yeomans M. R. 1998. Taste, palatability and the control of appetite. Proceedings of the Nutrition Society 57: 609–615.

PRILOG

Prilog 1 - Anketa o svakodnevnim životnim navikama
https://forms.gle/wvDVyNuzvMbNfMbG9

Slika 14 QR kod za anketu o svakodnevnim životnim navikama učenika
Izvor: https://forms.gle/wvDVyNuzvMbNfMbG9

Prilog 2 - Ispit kognitivnog premišljanja – predtest (na papiru)

Ispit kognitivnog premišljanja

1. Palica i loptica ukupno koštaju 1,10 dolara. Palica košta 1,00 dolar više od loptice. Koliko (u centima) košta loptica?
2. Ako 5 strojeva u 5 minuta napravi 5 proizvoda, koliko bi vremena (u minutama) trebalo da 100 strojeva napravi 100 proizvoda?
3. U jezeru se nalazi skupina lopoča. Svaki dan ta se skupina udvostruči. Ako je potrebno 48 dana da skupina prekrije cijelo jezero, koliko bi (dana) trebalo da prekrije polovicu jezera?

Slika 15 Ispit kognitivnog premišljanja (vlastiti izvor)

Prilog 3 - Početna prezentacija
ISTRAŽIVANJE GI INDEX PREZENTACIJA.pptx

Prilog 4 - Vizualno analogna skala sitosti (VAS)
https://core-symbol-search.vercel.app/

- po uzoru na *Vizualno Analognu Skalu (VAS)* (Crichton, 2001) - https://com-jax-emergency-pami.sites.medinfo.ufl.edu/files/2015/03/Visual-Analog-Scale-VAS-in-depth.pdf
  1. Koliko ste gladni upravo sada?
  2. Koliko se osjećate sitima/punima?
  3. Koliko se osjećate zadovoljeno?
  4. Kolika je Vaša želja za jelom?
  5. Što mislite, koliko biste hrane mogli pojesti upravo sada?

Prilog 5 - Test traženja simbola
https://core-symbol-search.vercel.app/

- po uzoru na *Sveobuhvatni Digitalni Ispit Logičkog Zaključivanja* (*Comprehensive Online Reasoning Exam)* - https://cognitivemetrics.com/test/CORE#test
  → Traženje Simbola https://cognitivemetrics.com/test/CORE/SS

Prilog 6 – *Excel*-tablica sa svim vrijednostima glukoze u krvi
vrijednosti glukoze u krvi.xlsx

In vitro utjecaj kofeina na kolonijalni rast odabranih sojeva probiotskih bakterija

Frano Lovrić, 2. razred

EDukOS – privatna srednja škola s pravom javnosti, Osijek
Mentor: *Dragičević Anokić Gabrijela*

SAŽETAK

Cilj istraživanja bio je ispitati antimikrobnu aktivnost kofeina protiv bakterija izoliranih iz starter-kulture jogurta. Metodologija je uključivala pripremu starter kulture fermentacijom mlijeka uz dodatak bifidum startera, izradu MRS agara te inokulaciju bakterijskih kultura. Bakterije *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* i *Bifidobacterium* spp. iz starter-kulture su inokulirane na MRS agar sterilnom ezom te su ostavljene na inkubaciji 24 sata na 37 °C. Vodene otopine kofeina izrađene su u slijedećim koncentracijama 1 g/L, 2 g/L, 4 g/L, 6 g/L, 8 g/L, 10 g/L, 15 g/L i 20 g/L. Bakterijska kultura prenesena je na MRS agar, a različite koncentracije otopina dodane su metodom disk-difuzije. Također, dodana je destilirana voda (negativna kontrola) te diskovi streptomicina, ciprofloksacina i amoksiklava (pozitivna kontrola) kako bi se pokazala vjerodostojnost inhibitornog učinka kofeina. Promjer zona inhibicije rasta mikroorganizama mjerio se u milimetrima nakon ponovna 24 sata inkubacije na 37 °C. Rezultati su pokazali inhibiciju rasta bakterija pri višim koncentracijama kofeina. Zaključeno je da kofein posjeduje slab do umjeren inhibitorni učinak u *in vitro* uvjetima. Antmikrobni učinak se povećava s povećanjem koncentracije kofeina.

Ključne riječi: *agar; zona inhibicije; inokulacija bakterija; kofein*

UVOD

Bakterije mliječne kiseline (LAB) gram-pozitivni su mikroorganizmi prirodno prisutni na supstratima bogatim hranjivim tvarima, kao što su mlijeko, meso, razgradivi biljni materijali te ljudski gastrointestinalni sustav. Obuhvaćaju oko 20 rodova, među kojima se ističu *Lactobacillus, Streptococcus* i *Bifidobacterium*. Zbog svojih povoljnih svojstava iznimno su važni mikroorganizmi u industriji, gdje se koriste kao starter kulture za proizvodnju različitih fermentiranih proizvoda. Kada se primjenjuju kao jedna ili više kultura živih mikroorganizama, djeluju kao probiotici, odnosno korisno utječu na domaćina poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore probavnog sustava. Pozitivni učinci na zdravlje uključuju poboljšanje metabolizma laktoze, stimulaciju imunološkog sustava, suzbijanje urogenitalnih i crijevnih infekcija te modifikaciju crijevne mikroflore (Pandžić, 2017).

Fermentaciju se općenito definira kao proces stvaranja biokemijskih promjena organskih sastojaka djelovanjem enzima mikroorganizama, uglavnom bez kisika, uz oslobađanje energije (Ljubičić, 2016). Najčešće se koristi u prehrambenoj industriji kako bi se namirnicama povećala kvaliteta i iskoristivost. Nadalje, fermentirana hrana obuhvaća hranu i napitke koji su dobiveni kontroliranim rastom mikroorganizama i konverzijom određenih komponenti enzimskim reakcijama (Dimidi i sur., 2019).

Među različitim fermentacijskim procesima posebnu ulogu ima mliječno-kisela fermentacija. Prema Toplek (2025) fermentacija laktoze u mliječnu kiselinu odvija se postupnom razgradnjom te stvaranjem mnogih međuprodukata i energije. Produkti metabolizma bakterija mliječne kiseline mogu biti različite vrste organskih kiselina, diacetil, amonijak, ugljikov dioksid, vodikov peroksid i mnogi drugi. S obzirom na količinu i vrstu produkata metabolizma mogu se podijeliti na homofermentativne i heterofermentativne bakterije (Makarova i sur., 2006).

Homofermentativnim bakterijama mliječne kiseline pripadaju *Lactobacillus acidophilus* i *Streptococcus thermophilus*. One nisu u mogućnosti koristiti laktozu izravno, već koriste enzim laktoza-permeazu kojim ju unose u stanicu. Unutar se stanice laktoza razgrađuje na glukozu i galaktozu uz pomoć enzima

β−galaktozidaze, odnosno laktaze. Zatim prevode heksoze pomoću Embden-Meyerhof-Parnas puta do mliječne kiseline koja je najzastupljeniji produkt metabolizma, odnosno tijekom glikolize specifični enzimi LAB provode fermentaciju glukoze preko raznih međuprodukata do pirogrožđane kiseline (piruvata). Redukcijom piruvata uz pomoć enzima laktatdehidrogenaze nastaje mliječna kiselina, tj. laktat (Makarova i sur., 2006; Toplek, 2025).

Osim mliječne kiseline, heterofermentativne bakterije prevode heksoze preko pentoza-fosfatnog puta do više vrsta produkata, kao što su ugljikov dioksid, octena kiselina i etanol (Makarova i sur., 2006).

Posebno mjesto zauzimaju fermentirani mliječni napitci proizvedeni uz pomoć selekcioniranih sojeva *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium bifidum*, čiji se odabrani sojevi odlikuju termofilnim svojstvima, osjetljivošću na kiselu sredinu, slabom proteolitičkom aktivnošću te sposobnošću sinteze sluzavih tvari koje doprinose povećanju viskoznosti proizvoda, kao i proizvodnjom inhibitornih spojeva s bakteriostatskim i baktericidnim djelovanjem (Pandžić, 2017).

Kako bi se fermentacijski procesi odvijali učinkovito, kontrolirano i s predvidivim ishodom, u praksi se primjenjuju starter-kulture koje imaju ključnu ulogu u usmjeravanju i stabilizaciji fermentacije (Petrovicky, 2016). Starter kulture se definiraju kao mikrobiološki pripravci koji sadrže barem jednu vrstu mikroorganizama, a koje dodatkom u sirovinu, ubrzavaju i upravljaju procesom fermentacije s ciljem proizvodnje fermentirane hrane (Živković, 2016). Njihovo djelovanje temelji se na fiziološkoj i metaboličkoj aktivnosti mikroorganizama, kojom se potiče fermentacija supstrata te stvaranje poželjnih metabolita zaslužnih za poboljšanje teksture, okusa i mirisa proizvoda (Petrovicky, 2016). Vrlo bitna uloga starter kultura je inaktivacija patogena i mikroorganizama kvarenja uslijed proizvodnje kiselina i bakteriocina (Živković, 2016). U odnosu na autohtonu mikrofloru, starter-kulture djeluju brže i dominantnije, što omogućuje predvidljivost i lakšu kontrolu procesa te skraćivanje vremena proizvodnje. Mogu se primjenjivati kao monokulture ili kao mješovite kulture, koje se najčešće koriste u fermentaciji hrane pri čemu je nužan sinergistički odnos među uključenim mikroorganizmima (Petrovicky, 2016).

U nastavku rada se kofein opisuje kao bioaktivni spoj s naglaskom na njegova fizikalno-kemijska svojstva i utjecaj na crijevnu mikrobiotu. Prema Bardić (2020) i Majić (2021), kofein je alkaloid biljnog podrijetla iz skupine metilksantina koji se prema IUPAC-ovoj nomenklaturi naziva 1,3,7-trimetilpurin-2,6-dion. Umjereno je topljiv u vodi pri sobnoj temperaturi (2 g/100 mL), dok se u kipućoj vodi njegova topljivost značajno povećava (66 g/100 mL). Istraživanje koje su proveli Chen i sur. (2023) na miševima, primjenom sekvenciranja rRNA gena, pokazalo je da kofein smanjuje relativnu zastupljenost rodova *Lactobacillus* i *Lactococcus*, dok povećava relativnu brojnost rodova *Dubosiella* i *Bifidobacterium*. Nadalje, Jang i sur. (2019) ispitivali su utjecaj kofeina na antimikrobnu aktivnost bakterije *Lactobacillus casei* protiv *Escherichia coli*. Rezultati su pokazali da koncentracija kofeina od 0,3 mg/mL povećava antimikrobnu aktivnost *L. casei*, što upućuje na mogućnost da kofein modulira sposobnost korisnih bakterija u suzbijanju patogenih mikroorganizama.

Razlog odabira ove teme leži u sve većoj konzumaciji kofeina među mladom populacijom, posebno putem energetskih napitaka i kave. Energetska pića predstavljaju skupinu proizvoda u tekućem obliku koja u pravilu sadrže kofein, uz mogućnost prisutnosti i drugih dodanih prehrambenih sastojaka (Alsunni 2015). Kako navodi Danjek (2024), energetska su pića sve popularnija bezalkoholna pića među studentskom populacijom. Prema Balordi (2020), kava, zahvaljujući bioaktivnim sastojcima (fenolni spojevi, vlakna i minerali), povoljno utječe na crijevnu mikrobiotu povećavajući korisne bakterije i

smanjujući potencijalno štetne, pri čemu se učinak povezuje s povećanjem motiliteta crijeva. Ali, Ćićerić (2024) navodi kako studija na bakteriji *Escherichia coli* pokazuje da kofein značajno inhibira rast bakterije, što upućuje na njegov potencijal kao antimikrobnog sredstva. S obzirom na navedene stavke i važnu ulogu crijevne mikrobiote u očuvanju zdravlja, zanimljivo je istražiti kako bioaktivne tvari iz prehrane, poput kofeina, mogu utjecati na rast korisnih bakterija. Također, tijekom posljednjeg desetljeća zabilježen je značajan porast interesa potrošača i zdravstvenih stručnjaka za hranu obogaćenu probiotičkim mikroorganizmima, što je rezultiralo ubrzanim razvojem tržišta probiotičkih proizvoda, pri čemu dominantan udio čine mliječni proizvodi, funkcionalni napitci te formule za dojenčad (Socool i sur., 2014.).

U ovom radu ispituje se *in vitro* utjecaj kofeina na kolonijalni rast odabranih sojeva probiotskih bakterija (*Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium* spp. i *Streptococcus thermophilus*), koje se široko primjenjuju u starter kulturama za proizvodnju fermentiranih mliječnih proizvoda i probiotskih pripravaka. Iako svi ispitivani sojevi nisu trajni članovi crijevne mikrobiote, njihova konzumacija može privremeno utjecati na sastav i ravnotežu crijevne mikrobiote. S obzirom na sve prethodno napisano, ciljevi su istraživanja: (1) ispitati inhibicijski utjecaj kofeina na rast odabranih probiotskih bakterija *in vitro*; (2) utvrditi koncentracije kofeina pri kojima se javlja najveći inhibicijski učinak.

Glavna je hipoteza da će inhibicijski učinak kofeina na odabrane probiotske bakterije (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. i *Streptococcus thermophilus*) biti proporcionalan njegovoj koncentraciji, odnosno da veće koncentracije kofeina izazivaju snažniji inhibitorni efekt na njihov rast.

METODE RADA

U ovom istraživanju primijenjene su standardne mikrobiološke metode za pripremu starter-kulture, hranjivih podloga, inokulaciju bakterija te ispitivanje antimikrobnog učinka kofeina. Starter-kultura dobivena je fermentacijom mlijeka uz dodatak Bifidum startera. Nakon fermentacije kultura je nanesena na BIOLIFE MRS Agar with Tween 80 koji je inkubiran na 37 °C tijekom 24 sata. Vodene otopine kofeina pripremljene su u osam različitih koncentracija. Utjecaj otopina kofeina ispitivan je disk-difuzija odnosno Kirby-Bauer metodom, koja je standardizirani mikrobiološki postupak za određivanje osjetljivosti bakterija (Hudzicki, 2009). Nakon inkubacije bakterijske kulture, uzgojene bakterije prenesene su na nove MRS agare. U jednu Petrijevu zdjelicu dodan je disk na koji je impregnirana destilirana voda (negativna kontrola istraživanja), a u drugu su dodani diskovi antibiotika (pozitivna kontrola istraživanja). U preostalih je osam Petrijevih zdjelica dodan po jedan disk impregniran vodenom otopinom kofeina. Ploče su ponovno inkubirane 24 sata pri 37 °C. Inhibicijsko djelovanje procijenjeno je mjerenjem promjera zona inhibicije u milimetrima.

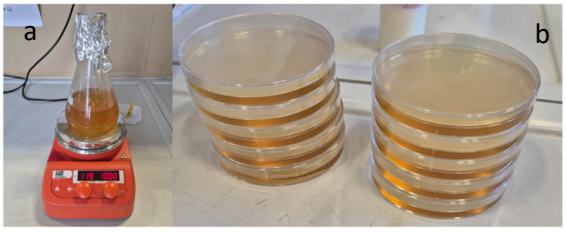
Istraživanje je djelomično provedeno na Odjelu za kemiju u Osijeku zbog dostupnosti potrebne laboratorijske opreme, kemikalija i odgovarajućih uvjeta za izvođenje eksperimentalnog dijela rada.

Priprema starter-kulture

Za pripremu starter-kulture se jedna litra mlijeka (pasterizirano kravlje s 3,2 % mliječne masti) najprije prokuha, a potom ohladi na 37 °C. Kada mlijeko postigne željenu temperaturu, dodaje se vrećica starter kulture (10 g Bifidum startera) i smjesa se temeljito promiješa mikserom. Tako se pripremljena smjesa ostavlja u termo posudi na temperaturi od 37 °C tijekom deset sati kako bi se provela fermentacija. Nakon završetka postupka, nastali se jogurt pohranjuje u hladnjak na temperaturi od 3 °C.

Postupak pripreme agara

Za pripremu BIOLIFE MRS Agar with Tween 80 (De Man, Rogosa i Sharpe, MRS) agara 70,2 g praškaste podloge suspendirano je u 1000 mL hladne destilirane vode te zagrijavano do vrenja uz stalno miješanje radi potpunog otapanja sastojaka pomoću magnetne miješalice s grijačem (slika 1a). Pripremljena otopina sterilizirana je autoklaviranjem 15 minuta pri 121 °C. Nakon sterilizacije medij je ohlađen na približno 48 °C, razliven u sterilne Petrijeve zdjelice i ostavljen da se stvrdne pri sobnoj temperaturi (slika 1b).



Slika 1 a) Miješanje i zagrijavanje agara do vrenja; b) očvrsnuti MRS agar u Petrijevim zdjelicama
Autor: Lovrić F., 2026

Nanošenje starter kulture na agar ploče

Nakon što je jogurt fermentiran, jednokratnim sterilnim plastičnim ezama nanesen je na MRS agar koji omogućuje bujan rast bakterija mliječne kiseline. Starter-kultura na agar ploče nanesena je tehnikom razmazivanja (engl. streak technique) tako da na svim dijelovima ploče bude jednaka zastupljenost bakterija. Nakon toga su agari stavljeni u inkubator na 37 °C tijekom 24 sata.

Priprema otopina različitih koncentracija kofeina

Određene su otopine slijedećih koncentracija kofeina ekstrakata: 1 g/L, 2 g/L, 4 g/L, 6 g/L, 8 g/L, 10 g/L, 15 g/L i 20 g/L.

Masene su koncentracije su izračunate pomoću sljedeće formule:

$$\delta(kofein, otopina) = \frac{m(kofein)[mg]}{V(otopina)[L]}$$

Epruvete su označene brojevima 1 – 8. U svaku epruvetu dodani su odgovarajući omjeri kofeina i destilirane vode (slika 2):

1. epruveta: 100 mg kofeina / 100 mL otopine
2. epruveta: 200 mg kofeina / 100 mL otopine
3. epruveta: 400 mg kofeina / 100 mL otopine
4. epruveta: 600 mg kofeina / 100 mL otopine
5. epruveta: 800 mg kofeina / 100 mL otopine
6. epruveta: 1000 mg kofeina / 100 mL otopine
7. epruveta: 1500 mg kofeina / 100 mL otopine
8. epruveta: 2000 mg kofeina / 100 mL otopine

Otopine su zatim dobro promućkane kako bi se homogenizirale.

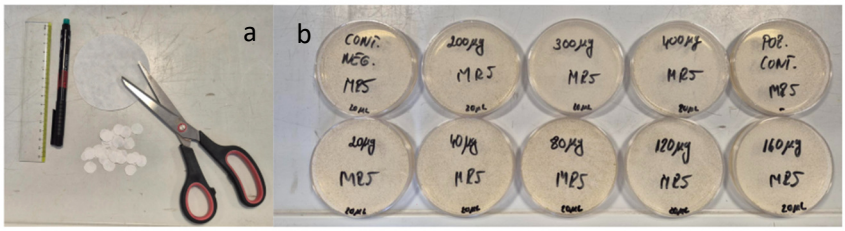
Slika 1 Pripremljene koncentracije vodenih otopina kofeina
Autor: Lovrić F., 2026

Subkultivacija bakterija i primjena otopina kofeina

Nakon inkubiranja bakterija na MRS agaru na 37 °C tijekom 24 sata bakterije su presađene u nove Petrijeve zdjelice s MRS agarom na koje je vodootpornim flomasterom naznačen sadržaj koji će se u njih staviti (slika 3b). Bakterije su presađivane sterilnim plastičnim ezama tehnikom razmazivanja (engl. streak technique). Diskovi na kojima se ispitivao utjecaj otopina kofeina dobiveni su izrezivanjem krugova promjera jedan centimetar od sterilnog filter papira (slika 3a). Na agare s presađenim bakterijama dodani su diskovi s različitim koncentracijama kofeina (20 µL otopine po disku). Otopine kofeina su na diskove dodavani mikropipetom. Kao negativna kontrola dodana je destilirana voda (20 µL destilirane vode). S druge strane kao pozitivna kontrola dodani su industrijski napravljeni diskovi streptomicina (10 mcg), ciprofloksacina (5 mcg) i amoksiklav (30 mcg) tvrtke HiMedia. Pri tome su primijenjene različite mase antibiotika po disku, budući da cilj nije bio ispitati ovisnost veličine zone inhibicije o koncentraciji antibiotika, već isključivo usporediti može li kofein ostvariti antimikrobni učinak približan onome koji postižu standardizirani, industrijski proizvedeni antibiotski diskovi. Razlog korištenja pozitivne i negativne kontrole standardizacija je inhibitornog učinak kofeina i mogućnost uspoređivanja s antibioticima za koje se zna da inhibiraju rast bakterija te destilirane vode za koju je poznato da nema nikakav učinak za inhibiciju odabranih bakterija. Petrijeve posude s gore navedenim komponentama stavljene su na inkubaciju na 37 °C tijekom 24 sata, te je zatim mjerena zona inhibicije.

Mjerenje zona inhibicije

Po završetku inkubacije osjetljivost bakterija procijenjena je određivanjem radijusa zone inhibicije rasta na svim Petrijevim zdjelicama. Kod pravilno je oblikovanih zona mjerena ravnalom udaljenost od ruba filtarskog diska do granice vidljivog rasta bakterija. Ako je zona inhibicije bila nepravilnog oblika, radijus je izračunan kao aritmetička sredina najveće i najmanje izmjerene vrijednosti. No, u slučaju da zona inhibicije nije bila prisutna, što je upućivalo na rezistenciju mikroorganizama prema ispitivanoj vodenoj otopini kofeina, rezultat je zabilježen vrijednošću 0.



Slika 3 a) Pribor za pripremu diskova koji će biti natopljeni otopinama kofeina različitih koncentracija; b) označene Petrijeve zdjelice inokulirane bakterijskom kulturom
Autor: Lovrić F., 2026

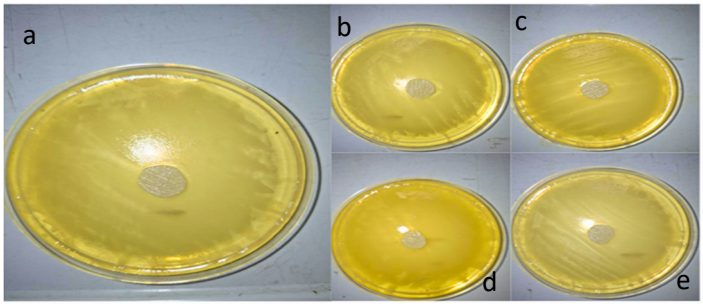
Veličina uzorka i statistička analiza podataka

Kako bi se ispitala statistička značajnost u ovom istraživanju pokus je ponovljen tri puta. Ispitivanje razlike različitih koncentracija ispitana je one-way ANOVA testom u programu Excel, uz razinu značajnosti (statistička vjerojatnost) $p < 0,05$. Nakon što je ANOVA test pokazao statistički značajnu razliku, korišten je Scheffé post hoc test kako bi se utvrdila statistička značajna razlika ($p < 0,05$) između svakog pojedinog uzorka.

REZULTATI

Dobiveni rezultati antimikrobne aktivnosti vodenih otopina kofeina prikazani su tablično, grafovima i fotografijama Petrijevih zdjelica s vidljivim zonama inhibicije.

Zona inhibicije nije zabilježena u Petrijevim zdjelicama s negativnom kontrolom i vodenim otopinama kofeina koncentracija od 1 g/L, 2 g/L, 4 g/L, 6 g/L (slika 4).

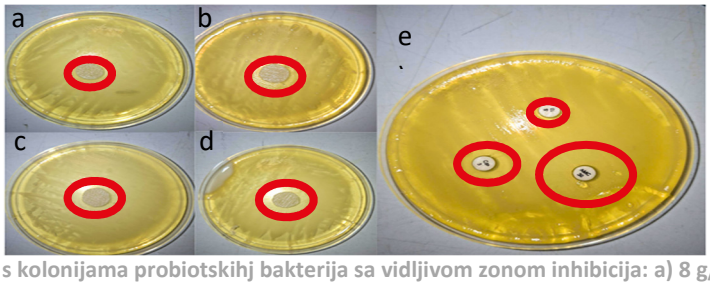


Slika 4 Petrijeve zdjelice s kolonijama probiotskih bakterija bez vidljivih zona inhibicije: a) negativna kontrola (destilirana voda); otopine kofeina: b) 1g/L; c) 2 g/L; d) 4 g/L; e) 6 g/L

Autor: Lovrić F., 2026

Međutim, pri koncentracijama kofeina od 8 g/L, 10 g/L, 15 g/L i 20 g/L te pozitivnom kontrolom došlo je do povećanja zone inhibicije (slika 5).

Učinjena je One-way ANOVA (jednosmjerna analiza varijanci). Pronađena je razlika u veličini zone inhibicije među podskupinama. Ukupno, vrijednost testa iznosila je F = 1475,71; statistička vjerojatnost $p < 0,001$. Scheffé testom za post hoc analizu utvrđena je razlika među uzorcima što je prikazano u tablici 1. Pokraj ispitivanih uzoraka različitih koncentracija kofeina i kontrola naveden je broj uzorka (od 1–12) te je u tablici 1 prikazano koje skupine pokazuju statistički značajnu razliku ($p < 0,05$).



Slika 5 Petrijeve zdjelice s kolonijama probiotskihj bakterija sa vidljivom zonom inhibicija: a) 8 g/L; b) 10 g/L; c) 15 g/L; d) 20 g/L; e) pozitivna kontrola

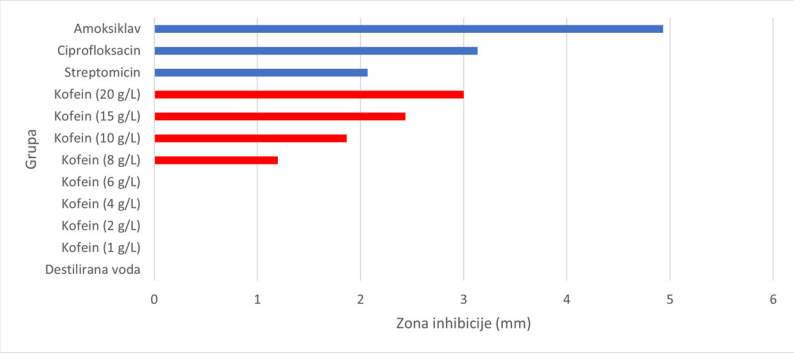
Autor: Lovrić F., 2026

Niže koncentracije kofeina (1–6 g/L) ne pokazuju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu niti međusobno ($p < 0,05$). Nasuprot tome, više koncentracije (≥ 8 g/L) pokazuju statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu, niže koncentracije kofeina te većinu ispitivanih antibiotika. Općenito, s porastom koncentracije kofeina uočava se izraženiji statistički značajan učinak (tablica 1).

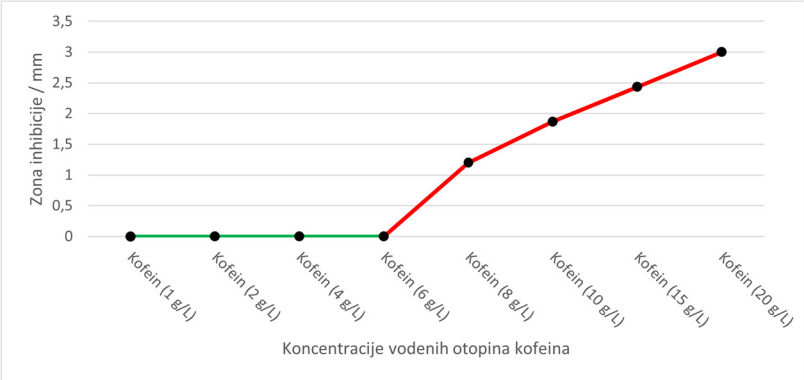
Tablica 1 Uzorci su označeni brojevima od 1-12 i primijenjen je Scheffé-ov test za post hoc analizu te je prikazana statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između svake skupine međusobno, ukoliko je dokazana testom.

Uzorci	Statistički značajno ($p < 0,05$) u odnosu na:
Destilirana voda (Negativna kontrola) (1)	6; 7; 8; 9; 10; 11; 12
Kofein (1 g/L) (2)	6; 7; 8; 9; 10; 11; 12
Kofein (2 g/L) (3)	6; 7; 8; 9; 10; 11; 12
Kofein (4 g/L) (4)	6; 7; 8; 9; 10; 11; 12
Kofein (6 g/L) (5)	6; 7; 8; 9; 10; 11; 12
Kofein (8 g/L) (6)	1; 2; 3; 4; 5; 7; 8; 9; 10; 11; 12
Kofein (10 g/L) (7)	1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 9; 11; 12
Kofein (15 g/L) (8)	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 9; 10; 11; 12
Kofein (20 g/L) (9)	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 10; 12
Streptomicin (10)	1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 9; 11; 12
Ciprofloksacin (11)	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 10; 12
Amoksiklav (12)	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11

Grafičkim prikazom je prikazana prosječna vrijednost izmjerene zone inhibicije za pojedine uzorke i pozitivnu i negativnu kontrolu (slika 6). Istaknut je porast antimikrobnog učinka otopina kofeina potkrepljen brojčanim vrijednostima (slika 7).



Slika 6 Srednje vrijednosti zona inhibicije su: 0 mm (destilirana voda, 1 g/L – 6 g/L), 1 mm (8 g/L), 2 mm (10 g/L), 2,5 mm (15 g/L), 3 mm (20 g/L), 2 mm (streptomicin), 3 mm (ciprofloksacin), 5 mm (amoksiklav)



Slika 7 Prikaz ovisnosti veličine zone inhibicije o koncentraciji kofeina: srednje vrijednosti iznose 0 mm (1–6 g/L), 1 mm (8 g/L), 2 mm (10 g/L), 2,5 mm (15 g/L) i 3 mm (20 g/L), uz vidljiv porast zone inhibicije s porastom koncentracije

RASPRAVA

Dobiveni rezultati ispitivanih uzoraka bakterija *Lactobacillus acidophilus, Streptococcus thermophilus i Bifidobacterium* spp. potvrđuju hipotezu da će veće koncentracije vodenih otopina kofeina imati inhibicijski učinak na njihov rast. Rezultati su također i opovrgnuli hipotezu te pokazali da niže koncentracije vodenih otopina kofeina ne utječu na rast bakterija *Lactobacillus acidophilus, Streptococcus thermophilus i Bifidobacterium* spp.

U mnogim istraživanjima dokazivan je utjecaj kave na crijevni mikrobiom gdje se konzumacija kave povezuje sa značajnim smanjenjem različitih znanstvenih rizika. Pvi se učinci pripisuju prisutnosti endogenih bioaktivnih komponenti kave, poput kofeina, klorogenskih kiselina i trigonelina (Ludwig i sur., 2014).

Stoga, u nastavku su prikazani radovi slične problematike. Chen i sur. (2023) su istraživanjem provedenim *in vivo* na miševima, primjenom sekvenciranja 16S rRNA gena, pokazali da kofein smanjuje relativnu brojnost rodova *Lactobacillus* i *Lactococcus*, dok povećava relativnu brojnost rodova *Dubosiella* i *Bifidobacterium*. Za razliku od navedenog istraživanja, koje je provedeno na životinjskom modelu, u ovom su radu prikazani rezultati vlastitog pokusa provedenog *in vitro*. U oba slučaja uočeno je da konzumacija, odnosno prisutnost kofeina, dovodi do smanjenja broja probiotičkih bakterija.

Međutim, metodološki pristup razlikuje se u pogledu identifikacije bakterija. U istraživanju Chen i sur. (2023) sastav mikrobiote određen je sekvenciranjem, dok u ovom istraživanju nije provedena dodatna identifikacija pojedinih vrsta bakterija zbog ograničenog pristupa naprednim molekularnim metodama, već se na temelju sastava korištene starter-kulture znalo da su bakterije *Lactobacillus acidophilus, Streptococcus thermophilus* i *Bifidobacterium* spp. prisutne.

Prema McConnell i Bakermans (2023), laboratorijsko istraživanje pokazalo je da kofein usporava rast bakterije *Escherichia coli* u aerobnim i anaerobnim uvjetima, pri čemu više koncentracije kofeina uzrokuju izraženiju inhibiciju rasta, što upućuje na njegov mogući antimikrobni učinak. Oba istraživanja provedena su *in vitro*, međutim ispitivane bakterije pripadaju različitim funkcionalnim skupinama. *E. coli* se često smatra oportunističkim patogenom, dok su *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* i *Bifidobacterium* spp. probiotičke bakterije s povoljnim učinkom na domaćina (Denamurl sur. 2021; Le Morvan de Sequeira i sur. 2022). U istraživanju McConnell i Bakermans (2023) nije precizno navedena hranjiva podloga na kojoj je uzgajana *E. coli*, dok je u ovom istraživanju korišten MRS agar, selektivna podloga pogodna za rast bakterija roda *Lactobacillus* i drugih bakterija mliječne kiseline. Unatoč razlikama u ispitivanim mikroorganizmima i primijenjenoj metodologiji, oba istraživanja potvrđuju hipotezu da kofein ima inhibitorno djelovanje na rast bakterija. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju mogu se usporediti s rezultatima koje su naveli Sales i sur.(2020), koji su zaključili da kofein nije imao značajan učinak na rast bakterija roda *Bifidobacterium* sp., ali je smanjivao rast bakterija roda *Lactobacillus* sp. Autori su zaključili da konzumacija kave može selektivno poticati rast određenih probiotskih bakterija, čime se postiže potencijalni prebiotički učinak, dok proces dekofeinizacije može utjecati na navedena svojstva kave. Također je utvrđeno da različiti bakterijski sojevi koriste različite komponente kave kao izvor hranjivih tvari za rast. Važno je istaknuti da su u oba istraživanja korišteni jednaki *in vitro* uvjeti, isti bakterijski sojevi te jednak tip agara, što omogućuje pouzdaniju usporedbu rezultata i smanjuje utjecaj metodoloških razlika na dobivene ishode.

Ovo istraživanje dalo je doprinos poznavanju djelovanja koncentracija kofeina na aktivnost i rast određenih sojeva probiotskih bakterija, no ipak postoji potreba za daljnjim istraživanjem. Runti i sur. (2015) pokazali su antimikrobni učinak običnog i dekofeiniziranog ekstrakta *Coffea arabica* na rast *Staphylococcus aureus* (MIC = 2 mg/mL; 0,2 % w v^{-1}), dok je za kofein utvrđen MIC (Minimalna inhibitorna koncentracija) ≤ 25 mg/mL, što upućuje na izostanak njegova antimikrobnog djelovanja. Razna istraživanja potvrđuju antimikrobna svojstva kave (Almeida i sur., 2006., Daglia i sur., 2007.), no odgovorne komponente i mehanizmi djelovanja još nisu u potpunosti razjašnjeni. Antimikrobni potencijal povezan je s postupkom i stupnjem prženja, pri čemu se produkti Maillardove reakcije, osobito melanoidini, smatraju ključnim nositeljima aktivnosti (Daglia i sur., 1994). Međutim, zbog njihove izrazito varijabilne kemijske strukture, nastale interakcijama ugljikohidrata, proteina, aminokiselina i fenolnih spojeva tijekom prženja, točan mehanizam antimikrobnog djelovanja ostaje nedovoljno razjašnjen (Bekedam i sur., 2008).

Primjenom većeg broja različitih koncentracija vodenih otopina kofeina te smanjenjem razlika između ispitivanih koncentracija omogućio bi se precizniji uvid u odgovor bakterija korištenih u ovom istraživanju na antimikrobno djelovanje kofeina. Dodatno, istraživanje bi se moglo unaprijediti preciznijim određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). Kao smjer budućih istraživanja predlaže se ispitivanje kumulativnog učinka kofeina na odabrane bakterijske sojeve, uz svakodnevno mjerenje zona inhibicije te njihovu usporedbu kroz vrijeme. Također, preporučuje se usporedna analiza djelovanja kofeina na rast probiotičkih bakterija i kvasca *Saccharomyces boulardii*. Nadalje, Sales i sur.

(2020.) pokazali su da ekstrakti vrsta *Coffea arabica* i *Coffea canephora* u koncentracijskom rasponu od 0,5 do 1,5 % značajno stimuliraju rast probiotičkih sojeva *Lactobacillus rhamnosus* i *Lactobacillus acidophilus*, uz istodobnu inhibiciju rasta bakterije *Escherichia coli*, što ukazuje na potencijalni prebiotički učinak kofeina i srodnih bioaktivnih spojeva na odabrane probiotičke mikroorganizme te predstavlja relevantnu osnovu za daljnja istraživanja u području funkcionalnih sastojaka hrane i povećanja ili inhibicije rasta probiotskih bakterija.

ZAKLJUČCI

U današnje vrijeme konzumacije sve veće količine kofeina, potreba za podizanjem svijesti o njegovim učincima na crijevni mikrobiom postala je ključna. Ovaj rad istražuje djelovanje različitih koncentracija kofeina na rast bakterije crijevne mikrobiote.

Tijekom istraživanja utvrđeni su sljedeći zaključci te se može reći kako je hipoteza djelomično potvrđena:

- Niže koncentracije vodenih otopina kofeina (1 g/L, 2 g/L, 4 g/L, 6 g/L) nisu imale nikakav utjecaj na rast probiotskih bakterija iz starter kulture za proizvodnju jogurta.
- Više koncentracije vodenih otopina kofeina pokazuju inhibitorna svojstva gdje su prosječne zone inhibicije 1 mm (8 g/L), 2 mm (10 g/L), 2,5 mm (15 g/L), 3 mm (20 g/L).
- Usporedbom kofeina sa standardnim antibioticima (streptomicin, ciprofloksacin i amoksiklav) pokazano je da više koncentracije vodenih otopina kofeina (≥ 10 g/L) u volumenu od 20 µL imaju inhibicijska svojstva.
- Kofein ima slab do umjeren antimikrobni učinak, ovisno o koncentraciji.

LITERATURA

Almeida A. A., Farah A., Silva D. A., Nunan E. A., Glória M. B. 2006. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 8738–8743.

Alsunni A. A. 2015. Energy drink consumption: beneficial and adverse health effects. The International Journal of Health Sciences 9 (4): 468–474.

Bardić L. 2020. Toksikološki i forenzični značaj kofeina – određivanje koncentracije kofeina u raznim napitcima. Fakultet za forenzičke znanosti bez pravne osobnosti, Split, diplomski rad, https://zir.nsk.hr/object/forenzikast:89, pristupljeno 1.1.2026.

Chen L., Wang X.-j., Chen J.-x., Yang J.-c., Lin L., Cai X.-B., Chen Y.-s. 2022. Caffeine ameliorates the metabolic syndrome in diet-induced obese mice through regulating the gut microbiota and serum metabolism. Diabetology & Metabolic Syndrome 15: 37.

Daglia M., Papetti A., Grisoli .P, Aceti C., Spini V., Dacarro C., Gazzani G. I2007. Isolation, identification and quantification of roasted coffee antibacterial compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 10208–10213.

Denamur E. i sur. 2021. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol. 19(1):37-54.

Dimidi E., Cox S. R., Rossi M., Whelan K. 2019. Fermented foods: definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease. Nutrients 11: 1806.

Hudzicki J. 2009. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. American Society for Microbiology, https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/kirby-bauer-disk-diffusion-, pristupljeno 8.4.2026.

Jang E., Park J. A., Kim Y. H., Kim H. 2019. Effect of caffeine on the antibacterial activity of *Lactobacillus casei*: caffeine and antibacterial activity of L. casei. Korean Journal of Agricultural Science, 46, 981–989.

Le Morvan de Sequeira C., Hengstberger C., Enck P., Mack I. 2022. Effect of probiotics on psychiatric symptoms and central nervous system functions in human health and disease: a systematic review and meta-analysis. Nutrients 14(3): 621.

Ludwig I. A., Clifford M. N., Lean M. E., Ashihara H., Crozier A. 2014. Cofee: biochemistry and potential impact on health. Food and Function 5(8): 1695–1717.

Ljubičić A. 2016. Mikroorganizmi koji sudjeluju u fermentaciji mlijeka. Poljoprivredni fakultet Osijek, završni rad, https://repozitorij.fazos.hr/object/pfos:867, pristupljeno 30.12.2025.

Majić A. 2021. Kofein-prirodni izvori, metabolizam i zdravstveni učinci. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, završni rad, https://repozitorij.pbf.unizg.hr/en/object/pbf:3944, pristupljeno 1.1.2026.

Makarova K., Slesarev A., Wolf Y., Sorokin A., Mirkin B., Koonin E., Pavlov A., Pavlova N., Karamychev V., Polouchine N., Shakhova V., Grigoriev I., Lou Y., Rohksar D., Lucas S., Huang K., Goodstein D. M., Hawkins T., Plengvidhya V., Welker D., Hughes J., Goh Y., Benson A., Baldwin K., Lee J. H., Díaz-Muñiz I., Dosti B., Smeianov V., Wechter W., Barabote R.,

Lorca G., Altermann E., Barrangou R., Ganesan B., Xie Y., Rawsthorne H., Tamir D., Parker C., Breidt F., Broadbent J., Hutkins R., O'Sullivan D., Steele J., Unlu G., Saier M., Klaenhammer T., Richardson P., Kozyavkin S., Weimer B., Mills D. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences 103(42): 15611–15616.

McConnell M. N., Bakermans C. 2023. Nutrients mediate caffeine inhibition of *Escherichia coli*. Environmental Microbiology Reports 15(5): 422–425.

Pandžić I. 2017. Korištenje bakterija mliječne kiseline u poljoprivrednoj proizvodnji. Poljoprivredni fakultet Osijek, diplomski rad, https://repozitorij.fazos.hr/object/pfos:1036, pristupljeno 30.12.2025.

Petrovicky B. 2016. Primjena starter kultura u prehrambenoj industriji. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, završni rad, https://repozitorij.unios.hr/object/ptfos:1107, pristupljeno 30.12.2025.

Runti G., Pacor S., Colomban S., Gennaro R., Navarini L., Scocchi M. 2015. Arabica cofee extraxt shows antibacterial activity against *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis* and low toxicity towarsd a human cell line. LWT - Food Science and Technology 62(1): 108–114.

Soccol C. R., Machado Prado M. R., Blandon Garcia L. M., Rodrigues C., Pedroni Medeiros A. B., Socco V. T. 2014. Current development in probiotics. Journal of Microbial and Biochemical Technology 7: 11–20.

Sales A. L. i sur. 2020. Effects of regular and decaffeinated roasted coffee (Coffea arabica and Coffea canephora) extracts and bioactive compounds on in vitro probiotic bacterial growth. Food and Function. 11(2), 1410-1424.

Toplek M. 2025. Utjecaj fermentiranih mliječnih proizvoda s probioticima na zdravlje ljudi. Odjel prehrambene tehnologije, Sveučilište Sjever, Koprivnica, završni rad, https://repozitorij.unin.hr/object/unin:8247, pristupljeno 30.12.2025.

Živković M. 2017. Određivanje optimalne temperature i pH vrijednosti bakterija mliječne kiseline izoliranih iz proizvoda akvakulture. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet., završni rad; https://repozitorij.pbf.unizg.hr/object/pbf:1701/FILE0 , pristupljeno 16.2.

Može li nepravilno odlaganje lijekova imati negativan utjecaj na biljke?

Vadlja Vita, 2. razred
Radiković Eva, 2. razred

Srednja škola Čakovec
Mentor: Horvat Denis

SAŽETAK

Nepravilno odlaganje lijekova iz kućanstava predstavlja potencijalni izvor onečišćenja okoliša jer aktivne farmaceutske tvari mogu dospjeti u tlo i negativno utjecati na žive organizme. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj dvaju često korištenih lijekova acetilsalicilne kiseline i ibuprofena, na klijanje i rani rast biljaka. Kao modelna biljka korištena je kres-salata (*Lepidium sativum* L.), pogodna za laboratorijska istraživanja zbog brzog klijanja i jednostavnog praćenja razvoja. Istraživanje je provedeno u kontroliranim uvjetima uz primjenu triju različitih koncentracija svakog lijeka te kontrolne skupine bez dodatka lijekova. Sjemenke su uzgajane na vlažnoj podlozi, a tijekom deset dana praćen je udio proklijalih sjemenki te duljina korijena i izdanka. Dobiveni rezultati statistički su analizirani i uspoređeni među skupinama. Rezultati su pokazali da između ispitivanih skupina nije utvrđena statistički značajna razlika u udjelu proklijalih sjemenki ($p > 0,05$). Međutim, jednosmjerna analiza varijance ukazala je na statistički značajne razlike u prosječnoj visini klijanaca ($p < 0,001$). Visoke koncentracije acetilsalicilne kiseline i ibuprofena uzrokovale su značajno smanjenje prosječne visine klijanaca u usporedbi s kontrolnom skupinom te niskim i srednjim koncentracijama. Između visokih koncentracija acetilsalicilne kiseline i ibuprofena nije utvrđena statistički značajna razlika. Zaključeno je da prisutnost farmaceutskih tvari u okolišu može utjecati na rani rast biljaka, osobito pri višim koncentracijama. Acetilsalicilna kiselina i ibuprofen pokazali su sličan inhibitorni učinak na rast klijanaca. Istraživanje naglašava važnost pravilnog zbrinjavanja lijekova kako bi se smanjio njihov potencijalno štetan utjecaj na biljni svijet i ekosustave.

Ključne riječi: *štetne tvari u okolišu, utjecaj lijekova, rast mladih biljaka*

UVOD

Lijekovi se razvijaju s ciljem postizanja terapijskih učinaka u ljudskom organizmu, no nakon uporabe dio aktivnih tvari ili njihovih metabolita može dospjeti u okoliš, gdje mogu predstavljati potencijalnu opasnost za vodene i kopnene ekosustave (Fent i sur., 2006). Njihova prisutnost u površinskim i pitkim vodama, tlu te hranidbenim lancima može imati negativne posljedice za organizme u okolišu, ali i za ljudsko zdravlje (Eggen i sur., 2011). Prema Miller i sur. (2018), farmaceutsko onečišćenje danas je globalni problem te je potrebno razvijati učinkovite pristupe upravljanju kako bi se smanjila izloženost okoliša lijekovima i njihov utjecaj na živi svijet.

Očekuje se da će se potrošnja lijekova u nadolazećim godinama dodatno povećavati zbog šire dostupnosti farmaceutskih proizvoda, uključujući generičke lijekove, kao i zbog starenja stanovništva (Gworek i sur., 2021). Porast proizvodnje, potrošnje i primjene lijekova posljedično povećava i količinu farmaceutskih tvari koje mogu završiti u okolišu. U Hrvatskoj se također bilježi kontinuirani rast potrošnje i propisivanja lijekova, što dodatno naglašava važnost pravilnog zbrinjavanja starih, neiskorištenih ili djelomično upotrijebljenih lijekova (Draganić i sur., 2025). Međutim, unatoč postojećim propisima, lijekovi se još uvijek često nepropisno odlažu u komunalni otpad ili ispuštaju u odvodne sustave, čime aktivne farmaceutske tvari dospijevaju u tlo i vode.

Farmaceutski otpad obuhvaća sve lijekove i tvari, uključujući njihovu primarnu ambalažu, koji su postali neupotrebljivi zbog isteka roka valjanosti, prolijevanja, rasipanja ili drugih razloga (Narodne novine, 2015a). Medicinski otpad vodi se pod brojem 18 u Katalogu otpada i obuhvaća otpad nastao u zaštiti zdravlja ljudi i životinja, uključujući farmaceutski otpad (Narodne novine, 2015b), a njegovo je

zbrinjavanje u Republici Hrvatskoj uređeno Zakonom o održivom gospodarenju otpadom (Narodne novine, 2013).

Farmaceutski spojevi danas se sve češće detektiraju u različitim sastavnicama okoliša. Ghazal (2023) navodi da su farmaceutski spojevi prisutni u vodenom okolišu u koncentracijama od ng/L do µg/L, dok su njihovi tragovi potvrđeni i u sedimentima, tlu te ispod velikih odlagališta otpada. Njihova prisutnost u okolišu povezana je s nepravilnim zbrinjavanjem farmaceutskog otpada (Nyagah i sur., 2020), ali i s ograničenom učinkovitošću sustava pročišćavanja otpadnih voda (Molnarova i sur., 2024). Istraživanje Jonjić i Vitale (2014) pokazalo je da su najviše koncentracije otpadnih farmaceutskih tvari zabilježene u otpadnim vodama, vodama u blizini velikih odlagališta otpada te u tlu ispod takvih odlagališta, što upućuje na povećani rizik za kopnene ekosustave.

Za razliku od brojnih istraživanja usmjerenih na prisutnost farmaceutika u vodi, manje je radova koji detaljno ispituju njihov utjecaj na biljke, osobito u ranim fazama razvoja. To predstavlja važnu istraživačku prazninu jer su biljke, uz mikroorganizme, među prvim organizmima izloženima farmaceutskim onečišćivalima prisutnima u tlu (Gworek i sur., 2021). Farmaceutske tvari u tlu mogu mijenjati biološke procese, utjecati na mikroorganizme te na rast i razvoj biljaka. Njihovo ponašanje u tlu ovisi o fizikalnim, kemijskim i biološkim svojstvima tla, kao i o svojstvima samih tvari. Nakon unosa u tlo, farmaceutski spojevi mogu se apsorbirati i akumulirati u različitim dijelovima biljaka, pri čemu su najveće vrijednosti akumulacije zabilježene u vegetativnim organima, osobito u korijenu (Zhang i sur., 2025).

Posebnu pozornost privlače nesteroidni protuupalni lijekovi, među kojima su ibuprofen i acetilsalicilna kiselina, jer se široko koriste u svakodnevnoj medicinskoj praksi i kućanstvima. Prema podacima NHSa (2026), oba lijeka pripadaju skupini nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAID) te se često primjenjuju za ublažavanje boli, snižavanje povišene tjelesne temperature i smanjenje upalnih procesa. Zbog njihove velike potrošnje ubrajaju se među najčešće detektirane farmaceutske tvari u okolišu. Njihova prisutnost potvrđena je u površinskim vodama (Institut za vode, 2023), sedimentima (Wijaya i sur., 2020; Agunbiade i Moodley, 2016) i tlu (Čogelja i sur., 2010). Iako su ti spojevi česti u okolišu, njihov utjecaj na klijanje i početni rast biljaka još uvijek nije dovoljno istražen, osobito u uvjetima koji mogu simulirati onečišćenje tla nastalo nepravilnim odlaganjem lijekova iz kućanstava. Upravo je zbog toga važno ispitati kako farmaceutske tvari djeluju na biljne organizme u osjetljivim, ranim fazama razvoja. Klijanje sjemena i početni rast klijanaca prikladni su pokazatelji jer omogućuju brzo uočavanje mogućih poticajnih ili inhibitornh učinaka različitih koncentracija onečišćivala na razvoj biljaka.

Svrha ovoga rada jest ispitati utjecaj ibuprofena i acetilsalicilne kiseline na klijanje sjemena i početni rast biljaka. Cilj istraživanja je utvrditi kako prisutnost ovih lijekova u tlu, pri različitim koncentracijama, utječe na rane faze biljnoga razvoja radi procjene njihova potencijalnog ekotoksičnog učinka i doprinosa boljem razumijevanju utjecaja farmaceutskog onečišćenja tla na biljni svijet. U istraživanju će se pratiti postotak klijavosti sjemena, duljina korijena i nadzemnih dijelova biljaka te eventualne vidljive morfološke promjene u odnosu na kontrolnu skupinu uzgojenu bez prisutnosti lijekova. Nezavisnu varijablu čine različite koncentracije ibuprofena i acetilsalicilne kiseline, dok su zavisne varijable klijavost sjemena i rast biljaka. Dobiveni rezultati omogućit će procjenu potencijalnog ekotoksičnog učinka ovih lijekova te doprinijeti razumijevanju utjecaja farmaceutskog onečišćenja tla na rane faze razvoja biljaka (Carlsson i sur., 2006).

Istraživačka pitanja kojima se vodi ovaj rad su sljedeća:

- Utječe li acetilsalicilna kiselina na klijavost sjemenki salate u odnosu na kontrolu?
- Postoji li razlika u učinku niskih i viših koncentracija acetilsalicilne kiseline na klijanje i rast?
- Kako ibuprofen utječe na klijavost i rani razvoj sjemenki salate?
- Je li utjecaj ibuprofena izraženiji u odnosu na acetilsalicilnu kiselinu pri istoj koncentraciji?

Postavljene hipoteze:

- očekuje se da će niske koncentracije acetilsalicilne kiseline imati neutralan ili blag stimulirajući učinak na klijavost i rast, dok će više koncentracije inhibirati
- ibuprofen će u svim testiranim koncentracijama negativno utjecati na klijavost i rast (posebno na duljinu korijena), s jačim učinkom pri višim koncentracijama
- postotak klijavosti će se smanjivati s porastom koncentracije oba lijeka, ali učinak će biti izraženiji kod ibuprofena
- ibuprofen će imati jači inhibirajući učinak na rani rast korijena i izdanaka nego acetilsalicilna kiselina pri istoj koncentraciji
- oba lijeka će jače utjecati na rast biljaka nego na samo klijanje.

METODE RADA

Istraživanje je provedeno u nekoliko faza: priprema sjemenki, priprema otopina lijekova, postavljanje pokusa i izlaganje sjemenki različitim koncentracijama otopina, praćenje klijanja i rasta te analiza i statistička brada podataka.

Priprema uzoraka

Istraživanje je provedeno u školskim uvjetima u kabinetu biologije. U istraživanju su korištene sjemenke vrste kres salate (*Lepidium sativum* L.) distribucijskog brenda Green Garden (slika 1), biljke koja je zbog brzog i ujednačenog klijanja pogodna za praćenje početnih faza rasta. Prije početka pokusa sjemenke su namakane u vodi 60 minuta, nakon čega su za daljnji rad odabrane one koje su potonule, budući da potonuće upućuje na veću vjerojatnost uspješnog klijanja. Priprema sjemenki uključivala je njihovo namakanje u vodi, odabir potonulih sjemenki te uklanjanje oštećenih ili neklijavih primjeraka.

a b

Slika 1 Biljni materijal za provedbu istraživanja: a) vrsta sjemenki b) priprema sjemenki za istraživanje (fotografije: Radiković E.)

Sjemenke su polagane na blazinice od vate smještene u plitke Petrijeve plastične zdjelice (slika 1b). Sve blazinice su jednake veličine i debljine kako bi se osigurali ujednačeni uvjeti vlažnosti u svim ispitivanim skupinama te omogućila pouzdana usporedba početnog razvoja biljaka.

Priprema otopina

Za simulaciju onečišćenja okoliša nepravilno odloženim lijekovima korištena su dva često primjenjivana farmaceutska pripravka: Bayer Aspirin® 500 mg (acetilsalicilna kiselina) i Brufen® Effect 400 mg (ibuprofen) (slika 2).

Slika 2 Lijekova korišteni u istraživanju: a) Brufen effect 400 mg, b) Aspirin 500 mg
Autor: Radiković E., 2026

Tablete su prethodno usitnjene i otopljene u vodi radi pripreme radnih otopina. Radna otopina acetilsalicilne kiseline pripremljena je otapanjem jedne tablete (500 mg) u destiliranoj vodi do ukupnog volumena od 500 mL, dok je radna otopina ibuprofena pripremljena otapanjem jedne tablete (400 mg) u destiliranoj vodi do ukupnog volumena od 400 mL. Na taj su način dobivene radne otopine jednake koncentracije, 1,0 mg/mL za oba lijeka (tablica 1). S obzirom na slabiju topljivost ibuprofena u vodi njegova otopina je blago zamućena, stoga je prije svake primjene pažljivo promućkana kako bi se osigurala homogena raspodjela djelatne tvari.

Tablica 1 Priprema početnih radnih otopina acetilsalicilne kiseline i ibuprofena

Vrsta lijeka	masa 1 tablete (mg)	Volumen otopine (mL)	Konačna koncentracija (mg/mL)
Aspirin	**500**	**500**	**1,0**
Brufen effect	**400**	**400**	**1,0**

Za svaki ispitivani lijek pripremljene su tri radne otopine različitih koncentracija: niska, srednja i visoka, dok je kontrolna skupina sadržavala isključivo vodovodnu vodu bez dodatka lijekova. Koncentracije su odabrane više od okolišnih kako bi se simulirale ekstremne situacije nepravilnog odlaganja i osigurali mjerljivi učinci u kratkom pokusu. Kao polazna osnova korištena je radna otopina koncentracije 1,0 mg/mL. Niska koncentracija (0,1 mg/mL) pripremljena je razrjeđivanjem 50 mL radne otopine s 450 mL destilirane vode do ukupnog volumena od 500 mL. Srednja koncentracija (0,5 mg/mL) dobivena je miješanjem 250 mL radne otopine s 250 mL destilirane vode, također do ukupnog volumena od 500 mL, dok je visoka koncentracija (1,0 mg/mL) primjenjivana bez dodatnog razrjeđivanja (tablice 1 i 2).

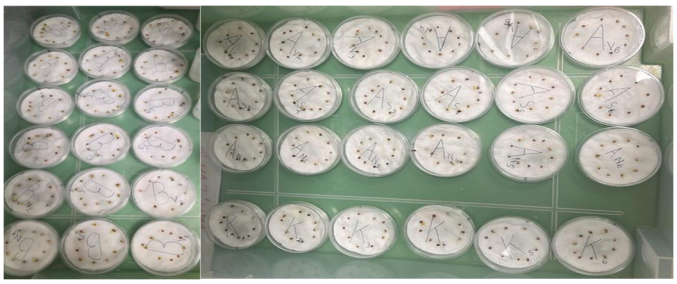
Tablica 2 Priprema radnih otopina različitih koncentracija acetilsalicilne kiseline i ibuprofena (niska, srednja i visoka)

koncentracija otopine (mg/mL)	volumen početne radne otopine (mL)	volumen destilirane vode (mL)	ukupni volumen (mL)
0,1	**50**	**450**	**500**
0,5	**250**	**250**	**500**
1,0	**500**	**0**	**500**

Napomena: Početna otopina koncentracije 1,0 mg/mL korištena za pripremu razrjeđenja.

Postavljanje pokusa i uvjeti uzgoja

Kako bi se isključio utjecaj varijabilnog sastava tla, klijanje sjemenki provedeno je na vati. U svaku označenu plastičnu Petrijevu zdjelicu postavljene su blazinice od vate koje su navlažene jednakim volumenom odgovarajuće radne otopine od 5 mL, nakon čega su na njih položene sjemenke. Na taj su način osigurani jednaki eksperimentalni uvjeti za sve ispitne skupine te je omogućena pouzdana usporedba učinka različitih koncentracija lijekova na klijanje i početni rast biljaka. U istraživanju je formirano ukupno sedam ispitnih skupina: kontrolna skupina bez dodatka lijekova, tri skupine tretirane acetilsalicilnom kiselinom te tri skupine tretirane ibuprofenom. Za svaku ispitnu skupinu provedeno je šest ponavljanja, što ukupno čini 42 pokusne posude. U svaku posudu postavljen je jednak broj sjemenki (10 sjemenki) pripremljenih na blazinicama od vate (slika 3).



a) ibuprofen (B) **b) Acetilsalicilna kiselina(A) i kontrola (K)**

Slika 3 Dio uzoraka Petrijevih zdjelica sa sjemenom raspoređenih u kontrolnoj i eksperimentalnim skupinama tijekom ispitivanja utjecaja lijekova na klijanje: a) skupina s ibuprofenom, b) skupina s acetilsalicilnom kiselinom i kontrola

Autor: Vadlja V., 2026

Sve zdjelice bile su smještene na istom mjestu i držane pri sobnoj temperaturi u rasponu od 20 do 24 °C, uz izloženost prirodnom dnevnom svjetlu, ali bez izravnog sunčevog zračenja. Vlažnost podloge održavana je kontroliranim dodavanjem odgovarajuće otopine pomoću pipete ili šprice, u malim i precizno odmjerenim količinama od 0,5 do 1,0 mL.

Praćenje i mjerenje parametara

Prije i nakon svakog dodavanja provjeravana je prisutnost slobodne tekućine na dnu posude, s ciljem održavanja vate ravnomjerno vlažnom, bez stvaranja prevelike količine vlage. U slučaju pojave viška tekućine, ona je uklonjena pipetom, a uklonjena količina zabilježena. Na taj način osigurani su ujednačeni uvjeti vlage, temperature i svjetlosti za sve ispitne skupine. Tretman je trajao ukupno 10 dana. Tijekom tog razdoblja svakodnevno je bilježen broj proklijalih sjemenki u svakoj posudi. Duljina korijena i izdanka mjerena je svakodnevno od trenutka nicanja pomoću ravnala s milimetarskom podjelom, a dobiveni rezultati bilježeni su u centimetrima.

Analiza i statistička obrada

Podaci prikupljeni tijekom istraživanja bilježeni su u dvije zasebne tablice. Prva tablica sadržavala je podatke o klijanju, uključujući broj sjemenki kod kojih je zabilježena pojava klice te vrijeme njezine pojave u odnosu na ukupan broj sjemenki u pojedinoj posudi. Druga tablica obuhvaćala je podatke o rastu biljaka, odnosno duljinu korijena i nadzemnog dijela od trenutka klijanja za svaku ispitnu skupinu. Za svaku skupinu izračunate su aritmetička sredina i standardna devijacija postotka klijanja te duljine korijena i izdanka. Također, određeni je i postotak proklijalih sjemenki. Statistička obrada podataka provedena je putem digitalnog programa Numiqo primjenom jednosmjerne analize varijance (*one-way* ANOVA) kako bi se utvrdile razlike između kontrolne skupine i ispitnih skupina tretiranih različitim koncentracijama acetilsalicilne kiseline i ibuprofena (numiqo Team, 2026). Budući da je ANOVA pokazala statistički značajne razlike u prosječnoj visini klijanaca, proveden je *post hoc* test (Bonferronijev test) radi utvrđivanja između kojih se konkretnih skupina razlika pojavljuje. Razina statističke značajnosti postavljena je na $p < 0,05$. Dobiveni rezultati prikazani su tablično i grafički. Rezultati su također dodatno interpretirani opisnom analizom. Provedenom obradom podataka omogućit će se objektivna procjena utjecaja ibuprofena i acetilsalicilne kiseline na rane faze biljnog razvoja te će se pridonijeti boljem razumijevanju utjecaja kućnog farmaceutskog otpada na biljke u uvjetima simuliranog onečišćenja tla (Mason, 2024)

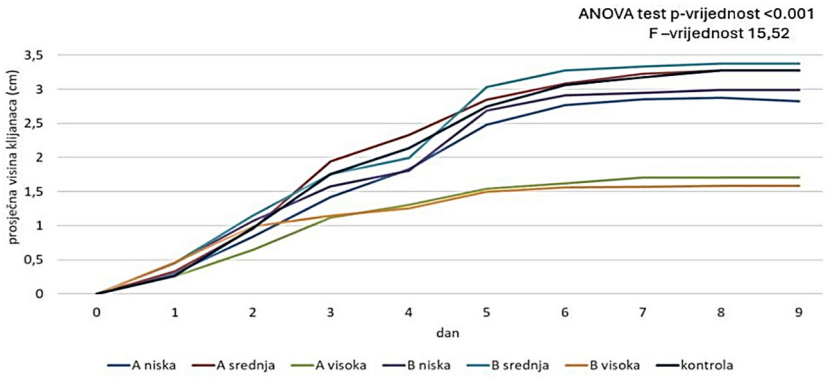
REZULTATI

Za potrebe istraživanja analizirani su podatci o klijavosti i prosječnoj visini klijanaca tijekom razdoblja od 10 dana za sedam ispitivanih skupina (kontrolna skupina, tri skupine tretirane acetilsalicilnom

kiselinom i tri skupine tretirane ibuprofenom). Ukupno je analizirano 420 mjerenja visine klijanaca (slika 4). Duljina korijena klijanaca nije uključena u daljnju analizu jer je već nakon drugog dana mjerenja utvrđeno da su svi korijeni postigli približno jednaku, maksimalnu duljinu, bez uočljivih razlika među ispitivanim skupinama. Tijekom daljnjeg praćenja nije zabilježena promjena duljine korijena.

Slika 4 Izgled najreprezentativnijih klijanaca u kontrolnoj (K) i pokusnim skupinama tretiranim acetilsalicilnom kiselinom (a) i ibuprofenom (b) nakon 10 dana uzgoja; koncentracije: v - visoka, s - srednja, n - niska
Autor: Vadlja V., 2026

Dinamika rasta klijanaca tijekom 10 dana za sve ispitivane skupine prikazana je na slici 5. Grafički prikaz pokazuje promjene prosječne visine klijanaca tijekom promatranog razdoblja u kontrolnoj skupini te skupinama tretiranim različitim koncentracijama acetilsalicilne kiseline i ibuprofena. U svim ispitivanim skupinama zabilježen je porast visine klijanaca tijekom vremena, pri čemu su se razlike među skupinama počele jasnije uočavati od četvrtog dana mjerenja. Najveće prosječne visine klijanaca zabilježene su u skupinama tretiranim niskim i srednjim koncentracijama ibuprofena i acetilsalicilne kiseline te kontrolnoj skupini dok su skupine tretirane visokim koncentracijama oba lijeka pokazivale niže vrijednosti prosječne visine klijanaca. U završnim danima mjerenja rast klijanaca u većini skupina pokazuje tendenciju stabilizacije.



Slika 5 Promjene prosječne visine klijanaca tijekom 10 dana u kontrolnoj skupini te skupinama tretiranim različitim koncentracijama A - acetilsalicilne kiseline i B - ibuprofena

Rezultati jednosmjerne analize varijance (ANOVA) za utvrđivanje razlika u prosječnoj visini klijanaca između ispitivanih skupina prikazani su u tablici 3.

Tablica 3 ANOVA za utvrđivanje razlike u prosječnoj visini klijanaca između različitih skupina

	suma kvadrata	stupnjevi slobode	sredina kvadrata	F - vrijednost	p - vrijednost
Skupina	68,88	6	11,48	15,52	<0,001
Odstupanje	305,49	413	0,74		
Ukupno	374,38	419			

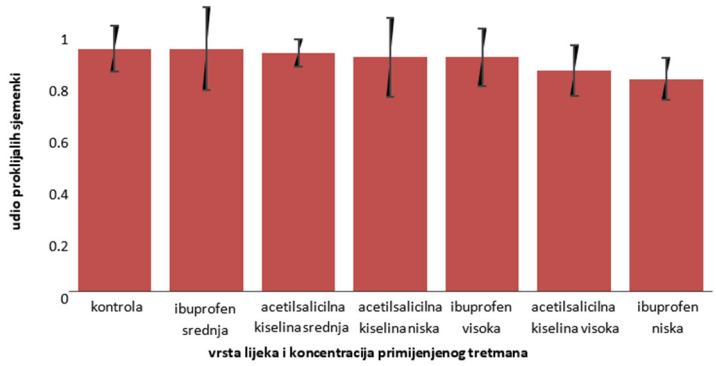
Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) pokazala je da postoje statistički značajne razlike u prosječnoj visini klijanaca između ispitivanih skupina (F = 15,52; p < 0,001), čime je odbačena nulta hipoteza o jednakosti srednjih vrijednosti (tablica 3). Kako bi se utvrdilo između kojih skupina postoje statistički značajne razlike, proveden je Bonferronijev post-hoc test (tablica 4). Rezultati post-hoc analize pokazali su da se skupine tretirane visokim koncentracijama acetilsalicilne kiseline i ibuprofena statistički značajno razlikuju od kontrolne skupine te od skupina tretiranih nižim koncentracijama lijekova. Između kontrolne skupine i skupina tretiranih niskim i srednjim koncentracijama acetilsalicilne kiseline i ibuprofena nisu utvrđene statistički značajne razlike. Grafički prikaz promjena prosječne visine klijanaca tijekom 10 dana (slika 6) dodatno prikazuje uočene razlike među ispitivanim skupinama.

Tablica 4 Bonferronijev post-hoc test

	Razlika sredina	Standardna pogreška	t-vrijednost	P-vrijednost	Donja granica 95 %-tnog intervala pouzdanosti	Gornja granica 95 %-tnog intervala pouzdanosti
AN1 - AS1	-0,31	0,16	-1,96	1	-0,79	0,17
AN1 - AV1	0,66	0,16	4,19	,001	0,18	1,14
AN1 - BN1	-0,12	0,16	-0,79	1	-0,60	0,36
AN1 - BS1	-0,36	0,16	-2,26	,509	-0,84	0,12
AN1 - BV1	0,65	0,16	4,17	,001	0,17	1,13
AN1 - K1	-0,25	0,16	-1,57	1	-0,73	0,23
AS1 - AV1	0,97	0,16	6,15	<.001	0,49	1,45
AS1 - BN1	0,18	0,16	1,17	1	-0,30	0,66
AS1 - BS1	-0,05	0,16	-0,30	1	-0,53	0,43
AS1 - BV1	0,96	0,16	6,13	<.001	0,48	1,44
AS1 - K1	0,06	0,16	0,39	1	-0,42	0,54
AV1 - BN1	-0,78	0,16	-4,99	<.001	-1,26	-0,30
AV1 - BS1	-1,01	0,16	-6,46	<.001	-1,49	-0,53
AV1 - BV1	-0,00	0,16	-0,02	1	-0,48	0,48
AV1 - K1	-0,90	0,16	-5,76	<.001	-1,38	-0,42
BN1 - BS1	-0,23	0,16	-1,47	1	-0,71	0,25
BN1 - BV1	0,78	0,16	4,96	<.001	0,30	1,26
BN1 - K1	-0,12	0,16	-0,77	1	-0,60	0,36
BS1 - BV1	1,01	0,16	6,43	<.001	0,53	1,49
BS1 - K1	0,11	0,16	0,70	1	-0,37	0,59
BV1 - K1	-0,90	0,16	-5,74	<.001	-1,38	-0,42

Legenda: A - acetilsalicilna kiselina, B - ibuprofen, v - visoka, s – srednja, n – niska; K - kontrola

Bonferronijev post-hoc test (tablica 4) pokazuju da se skupine s visokom koncentracijom lijeka (AV1 i BV1) statistički značajno razlikuju od većine ostalih skupina. Konkretno, acetilsalicilna kiselina visoke koncentracije (AV1) ima značajno manju prosječnu visinu klijanaca u odnosu na acetilsalicilnu kiselinu niske i srednje koncentracije (AN1 i AS1), ibuprofen niske i srednje koncentracije (BN1 i BS1) te kontrolnu skupinu (K1) (p < 0,001). Slično tome, ibuprofen visoke koncentracije (BV1) pokazuje statistički značajno manju visinu klijanaca u usporedbi s ibuprofenom niske i srednje koncentracije (BN1 i BS1), acetilsalicilnom kiselinom niske i srednje koncentracije (AN1 i AS1) te kontrolnom skupinom (p < 0,001). Suprotno tome, niske i srednje koncentracije istog lijeka međusobno se ne razlikuju statistički značajno niti se značajno razlikuju od kontrolne skupine (p > 0,05), što upućuje na to da pri tim koncentracijama nema izraženog inhibitornog učinka na rast klijanaca. Također, između skupina s visokom koncentracijom acetilsalicilne kiseline i ibuprofena (AV1 i BV1) nije utvrđena statistički značajna razlika, što sugerira da oba lijeka pri visokim koncentracijama imaju sličan negativan učinak na rast klijanaca.



Slika 6 Grafički prikaz udjela proklijalih sjemenki u kontrolnoj i pokusnim skupinama tretiranim različitim koncentracijama acetilsalicilne kiseline i ibuprofena. Gornje crte na stupcima prikazuju odstupanje rezultata unutar svake skupine

Slika 6 pokazuje da su najveće vrijednosti udjela klijavosti zabilježene u kontrolnoj skupini te u skupinama tretiranim srednjim koncentracijama acetilsalicilne kiseline i ibuprofena, dok su niže vrijednosti uočene u skupinama tretiranim visokim koncentracijama oba lijeka. Međutim, preklapanje intervala varijabilnosti (standardnih devijacija) između skupina upućuje na to da razlike u klijavosti nisu statistički značajne. Također, Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) pokazala je da ne postoji statistički značajna razlika u udjelu proklijalih sjemenki između ispitivanih tretmana ($F = 0,93$; $p = 0,489$), zbog čega nulta hipoteza o jednakosti srednjih vrijednosti nije odbačena. Unatoč uočenim razlikama u srednjim vrijednostima udjela klijavosti među skupinama, te razlike nisu bile dovoljno izražene da bi se smatrale statistički značajnima.

RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja jasno ukazuju na to da farmaceutske tvari, poput acetilsalicilne kiseline i ibuprofena, mogu utjecati na rane faze rasta biljaka, pri čemu je taj učinak snažnije izražen na rast klijanaca nego na samu klijavost sjemena. Visoke koncentracije oba lijeka uzrokovale su statistički značajno smanjenje prosječne visine klijanaca u usporedbi s kontrolnom skupinom te skupinama tretiranim nižim i srednjim koncentracijama, dok u udjelu proklijalih sjemenki nisu zabilježene statistički značajne razlike. Ovakvi rezultati upućuju na selektivan učinak farmaceutskih tvari na pojedine razvojne faze biljaka.

Prvom hipotezom pretpostavljeno je da će niske koncentracije acetilsalicilne kiseline imati neutralan ili blago poticajan učinak na klijanje i rani rast biljaka, dok će više koncentracije djelovati inhibitorno. Dobiveni rezultati djelomično potvrđuju ovu pretpostavku. Iako razlike u klijavosti nisu bile statistički značajne, u skupinama tretiranim niskim i srednjim koncentracijama acetilsalicilne kiseline zabilježene su veće prosječne visine klijanaca u odnosu na visoku koncentraciju. Takav se učinak može objasniti činjenicom da male količine određene tvari mogu blago potaknuti rast biljaka, dok veće količine djeluju suprotno i usporavaju njihov razvoj. Agathokleous i sur. (2018) navode da farmaceutske tvari, uključujući analgetike i antibiotike, mogu potaknuti rast u biljkama, pri čemu dolazi do privremenog poboljšanja rasta ili metabolizma pri niskim dozama.

Nadalje, kod viših koncentracija acetilsalicilne kiseline u ovom istraživanju zabilježen je značajan pad prosječne visine klijanaca, što upućuje na to da acetilsalicilna kiselina pri povišenim koncentracijama može djelovati kao stresor koji narušava normalne metaboličke procese. Poznato je da salicilati sudjeluju u regulaciji obrambenih mehanizama biljaka, ali njihova prekomjerna prisutnost može dovesti do poremećaja hormonske ravnoteže i usporavanja rasta (Li i sur., 2022; Janda i sur., 2020)

Drugom hipotezom pretpostavljeno je da će ibuprofen u svim testiranim koncentracijama negativno utjecati na klijavost i rast biljaka, pri čemu će učinak biti izraženiji pri višim koncentracijama. Rezultati ovog istraživanja djelomično potvrđuju tu hipotezu. Iako klijavost nije bila statistički značajno smanjena za nisku i srednju koncentraciju, visoka koncentracija ibuprofena imala je izražen inhibitorni učinak na rast klijanaca. Slične nalaze navode Wijaya i sur. (2020), koji ističu da biljke mogu razviti mehanizme prilagodbe na prisutnost ibuprofena u okolišu, osobito pri koncentracijama koje su bliske okolišno realnima.

Trećom hipotezom pretpostavljeno je da će se postotak klijavosti smanjivati s porastom koncentracije oba lijeka, uz izraženiji učinak kod ibuprofena. Ova hipoteza nije potvrđena. Jednosmjerna analiza varijance nije pokazala statistički značajne razlike u klijavosti među ispitivanim skupinama, što upućuje na to da proces klijanja nije bio osjetljiv na primijenjene koncentracije farmaceutskih tvari. Ovakav rezultat može se objasniti činjenicom da klijanje u velikoj mjeri ovisi o unutarnjim rezervama sjemena, koje omogućuju početni razvoj embrija neovisno o vanjskim kemijskim uvjetima. Özden i sur. (2025) navode da su rani stadiji klijanja regulirani složenim fiziološkim mehanizmima unutar sjemena koji pružaju određenu otpornost na vanjske stresore.

Značajno je istaknuti da su učinci farmaceutskih tvari u ovom istraživanju bili izraženiji na duljinu izdanka nego na klijavost, što potvrđuje da je rani rast osjetljiviji pokazatelj ekotoksičnog djelovanja od samog procesa klijanja. Ovakvi rezultati u skladu su s drugim istraživanjima koja naglašavaju važnost praćenja morfoloških i fizioloških parametara rasta pri procjeni utjecaja onečišćivača na biljni svijet.

Četvrtom hipotezom pretpostavljeno je da će ibuprofen imati jači inhibitorni učinak na rani rast biljaka u odnosu na acetilsalicilnu kiselinu pri istoj koncentraciji. Dobiveni rezultati ne potvrđuju ovu hipotezu, budući da između visokih koncentracija acetilsalicilne kiseline i ibuprofena nije utvrđena statistički značajna razlika u prosječnoj visini klijanaca. Ovakav ishod upućuje na to da oba lijeka, unatoč različitim mehanizmima djelovanja u ljudskom organizmu, mogu u biljkama inducirati slične stresne reakcije kada su prisutni u povišenim koncentracijama. Prema Wijaya i sur. (2020) ibuprofen može uzrokovati poremećaje u mineralnoj ravnoteži, sintezi klorofila i proteinskom sastavu biljaka, dok slični stresni mehanizmi mogu biti potaknuti i prisutnošću salicilata.

Hipoteza prema kojoj će oba lijeka imati snažniji učinak na rast biljaka nego na samu klijavost u potpunosti je potvrđena. Dok klijavost nije pokazala značajne promjene, visina klijanaca bila je značajno smanjena pri visokim koncentracijama oba lijeka. Ovaj rezultat dodatno naglašava važnost uključivanja parametara rasta u procjenu ekotoksičnih učinaka farmaceutskih tvari, budući da se isključivo praćenjem klijavosti mogu previdjeti suptilniji, ali ekološki relevantni učinci.

Međutim, istraživanje ima određena ograničenja koja treba uzeti u obzir pri tumačenju rezultata. Eksperiment je trajao relativno kratko i obuhvatio je samo rane faze razvoja biljaka, dok dugoročni učinci nisu ispitivani. Nadalje, istraživanje je provedeno u školskim uvjetima, koji se razlikuju od složenih prirodnih ekosustava u kojima djeluju brojni dodatni čimbenici, poput mikroorganizama u tlu, promjena vlažnosti i interakcija s drugim onečišćivačima. Također, ispitivana je samo jedna biljna vrsta, što ograničava mogućnost primjene rezultata i na ostale biljne vrste.

Korištene koncentracije acetilsalicilne kiseline i ibuprofena bile su više od onih koje se uobičajeno nalaze u okolišu, no odabrane su s ciljem simulacije ekstremnih situacija lokalnog onečišćenja uslijed nepravilnog odlaganja lijekova. Takav pristup omogućio je uočavanje jasnih učinaka u kratkom

vremenskom razdoblju te procjenu potencijalnog rizika za biljni svijet u uvjetima povišenih koncentracija farmaceutskih tvari.

ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata moguće je zaključiti sljedeće:

- Visoke koncentracije acetilsalicilne kiseline i ibuprofena imaju statistički značajan inhibitorni učinak na rani rast klijanaca kres-salate, dok niske i srednje koncentracije ne pokazuju značajan negativan učinak u odnosu na kontrolnu skupinu.
- Između visokih koncentracija acetilsalicilne kiseline i ibuprofena nije utvrđena statistički značajna razlika u učinku na rast klijanaca, što upućuje na to da oba lijeka pri povišenim koncentracijama djeluju slično inhibirajuće na rani razvoj biljaka.
- Postotak klijavosti sjemenki nije pokazao statistički značajne razlike između ispitivanih skupina, što sugerira da je proces klijanja manje osjetljiv na prisutnost farmaceutskih tvari u usporedbi s kasnijim fazama rasta.
- Rani rast biljaka, izražen kroz visinu klijanaca, pokazao se osjetljivijim pokazateljem ekotoksičnog učinka farmaceutskih tvari od same klijavosti sjemena.
- Dobiveni rezultati upućuju na to da nepravilno odlaganje lijekova može predstavljati potencijalni rizik za biljni svijet.

LITERATURA

Agathokleous E., Kitao M., Calabrese E.J. 2018. Human and veterinary antibiotics induce hormesis in plants: Scientific and regulatory issues and an environmental perspective. Environment International 120: 489–495.

Agunbiade F. O., Moodley B. 2016. Occurrence and distribution pattern of acidic pharmaceuticals in surface water, wastewater, and sediment of the Msunduzi River. Environmental Toxicology and Chemistry 35(1): 36–46.

Carlsson C., Johansson A. K., Alvan G., Bergman K., Kühler T. 2006. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. Science of the Total Environment 364(13): 67–87.

Čogelja Č., Osrečki G., Tomić S. 2010. Utjecaj lijekova na okoliš. Kemija u industriji 59 (7-8): 351–354.

Draganić P., Škribulja M., Šintić E., Matić S., Oštarčević S. 2025. Potrošnja lijekova u Hrvatskoj 2020. – 2024., Agencija za lijekove i medicinske proizvode – HALMED, https://www.halmed.hr/Novosti-i-edukacije/Publikacije-i_izvjesca/Publikacije/Potrosnja-lijekova-u-Hrvatskoj-od-2020-do-2024-godine/27?utm_source=chatgpt.com, pristupljeno 20.2.2026.

Eggen T., Asp T. N., Grave, K., Hormazabal V. 2011. Uptake and translocation of metformin, ciprofloxacin and narasin in forage- and crop plants. Chemosphere 85(1): 26–33.

Fent K., Weston A. A., Caminada D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquatic Toxicology 76(2): 122–159.

Ghazal H. 2023. Pharmaceuticals contamination in the environment. Environmental Toxicology and Pharmacology 103: 104251.

Gworek B., Kijeńska M., Wrzosek J. et al. 2021. Pharmaceuticals in the soil and plant environment: a review. Water, Air, & Soil Pollution 232: 145.

Institut za vode Josip Juraj Strossmayer. 2023. Farmaceutici u površinskim vodama. Institut za vode Josip Juraj Strossmayer, https://institutjjs.hr/farmaceutici-u-povrsinskim-vodama/, pristupljeno 20.3.2026.

Janda T., Szalai G., Pál M. et al. 2020. Salicylic acid signalling in plants. Plants 9(8): 1028.

Jonjić D., Vitale K. 2014. Issues around household pharmaceutiial waste disposal through community pharmacies in Croatia. International Journal of Clinical Pharmacy 36(3): 556–563.

Koshy S. 2013. Disposal of unwanted medications: throw, bury, burn or just ignore? International Journal of Pharmacy Practice 21(2): 131–134.

Li A. Zhang, J. Sun Y. et al., 2022. Action of salicylic acid on plant growth. Frontiers in Plant Science 13: 878076.

Li W. C. 2014. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. Environmental Pollution 187: 193–201.

Mason N. 2024. Statistics in biology. A comprehensive guide to data processing and statistical analysis for High School Science students. https://www.scribd.com/document/813571037/Statistics-in-Biology-2024, pristupljeno 18.2.2026.

Miller T. H., Nicolas R., Bury Stewart F., Owen James I., MacRae L. P. Barron A. 2018. Review of the pharmaceutical exposome in aquatic fauna. Environmental Pollution 239: 129–146.

Molnarova L., Halesova T., Tomesova D., Vaclavikova M., Bosakova Z. 2024. Monitoring pharmaceuticals and personal care products in healthcare effluent wastewater samples and the effectiveness of drug removal in wastewater treatment plants using the UHPLC-MS/MS method. Molecules 29(7): 1480.

Narodne novine 2013. Zakon o održivom gospodarenju otpadom. Narodne Novine 94/2013, https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_07_94_2123.html, pristupljeno 20.12.2025.

Narodne novine 2015a. Pravilnik o gospodarenju medicinskim otpadom. Narodne Novine 50/2015, https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2015_05_50_989.html, pristupljeno 20.12.2025.

Narodne novine 2015b. Pravilnik o katalogu otpada. Narodne Novine 90/2015, https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/2015_08_90_1757.html, pristupljeno 20.12.2025.

NHS 2026. NSAIDs. NHS, https://www.nhs.uk/medicines/nsaids/, pristupljeno 20.12.2025.

Nyagah D. M., Njagi A., Njoki Nyaga M. 2020. Pharmaceutical waste: overview, management and impact of improper disposal. Journal of PeerScientist 3(2): e1000028.

numiqo Team. 2026. numiqo: Online Statistics Calculator. numiqo e.U., https://numiqo.com, pristupljeno 20.2.2026.

Özden E., Ermiş S., Yildirim E., et al. 2025. Insights into seed germination – physiological and environmental mechanisms. IntechOpen, https://doi.org/10.5772/intechopen.1010636, pristupljeno 20.2.2026.

Pérez L. G., Navarro S. 2024. How pharmaceutical residues occur, behave, and affect the soil environment. Journal of Xenobiotics 14(4): 1343–1377.

Singh S. K., Verma D., Alok S. 2026. Review on environmental impact of improper drug disposal. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 9: 499–510.

Tomljenović A. 2016. Okolišne i zdravstvene posljedice upravljanja farmaceutskim otpadom. Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:238995, pristupljeno 20.12.2025.

Wijaya L., Alyemeni M. A., Ahmad P., Alfarhan A., Barceló D., El-Sheikh M. A., Picó Y. 2020. Ecotoxicological effects of ibuprofen on plant growth of *Vigna unguiculata* L. Plants 9(11): 1473.

Zhang C., Barron L. P., Stürzenbaum S. R. 2025. Pollution of soil by pharmaceuticals: implications for metazoan and environmental health. Annual Review Pharmacology and Toxicology 65: 547–565.

Fiziološke reakcije na atraktivna lica

Nora Burić, 3. razred
Dora Matejčić, 3. razred

III. Gimnazija, Split
Mentor: *Vesna Dobronić*

SAŽETAK
Ovaj istraživački rad bavi se ispitivanjem utjecaja biometrijskih karakteristika različitih lica na nesvjesne, fiziološke reakcije osobe koja ih gleda. Glavni cilj istraživanja bio je mjerenjem krvnog tlaka, pulsa i dilatacije zjenica utvrditi utjecaj različitih karakteristika lica na fiziološke promjene promatrača. Eksperimentalni dio projekta proveden je u kontroliranim školskim uvjetima. Uzorak ispitanika obuhvaća pedeset i jednog dobrovoljca srednjoškolskog uzrasta kojima je, u pravilnim intervalima od 20 sekundi i uz pauze između svake slike, mjeren puls, sistolički i dijastolički krvni tlak te snimana promjena u širini zjenica. Svi ispitanici su prije mjerenja ispunili anketu koja je bila potrebna za bolje razumijevanje uzorka ispitanika. Vizualni podražaji (4 standardizirana lica) generirani su digitalnim alatom *FaceGen*. Za mjerenje promjena u širini zjenica ispitanika korišten je alat *mEye.* Rezultati istraživanja pokazali su da biometrija lica zaista utječe na fiziološke promjene ispitanika koji ga promatra. Najviše mijenjanjem širine zjenica, dok je promjena krvnog tlaka sporija i pod većim utjecajem općeg fiziološkog stanja. Intenzitet fizioloških reakcija ispitanika većinom se mijenja sukladno s promjenom prikazivanog lica određenih biometrijskih karakteristika, ali je i pod utjecajem drugih (često unutarnjih) čimbenika, poput nervoze. Najvažniji zaključak projekta je da se način na koji ljudi percipiraju i reagiraju na različita lica ne manifestira samo psihološki već i fiziološki, konkretno u obliku promjene širine zjenica i promjene tlaka. Dobiveni rezultati mogu pridonijeti boljem razumijevanju ljudskog tijela i njegove povezanosti s umom te objašnjavanju pojedinih međuljudskih odnosa.

Ključne riječi: *biometrija lica; dilatacija zjenica; autonomni živčani sustav; fiziološke reakcije; privlačnost*

UVOD

Ljudsko tijelo stvara mišljenje o drugima već prije nego što to sami uspijemo osvijestiti. Mozak automatski i instinktivno analizira specifične značajke lica, koje potom povezuje s određenim osobinama ličnosti (Bruce i Young, 1986), dok se evolucijska privlačnost primarno interpretira kao izravan biološki signal općeg zdravlja i visoke genetske kvalitete jedinke (Darwin, 2008). Tako su Fink i Penton-Voak (2002) dokazali da su izražene crte lica, poput snažne vilice, povezane s višom razinom testosterona u tijelu.

Biometrijski podaci lica predstavljaju digitalno obrađene informacije o fizičkim karakteristikama koje omogućuju jedinstvenu identifikaciju osobe ili analizu njezinih reakcija. U ovome se istraživanju biometrija lica specifično koristi za kreiranje standardiziranih vizualnih podražaja (slika 1) s parametrima atraktivnosti koji su utemeljeni na proučenoj literaturi, kao što su bilateralna simetrija i pravilni proporcijski omjeri. Praćenjem tjelesnih reakcija na navedene vizualne podražaje nastoji se bolje razumjeti kako privlačna lica utječu na ljudski autonomni živčani sustav, odnosno na njegove reakcije koje nisu pod svjesnom kontrolom pojedinca.

Unutar navedenog sustava, širenje i skupljanje zjenica predstavlja relevantan fiziološki pokazatelj jer izravno prikazuju automatsku i nesvjesnu reakciju organizma povezanu s afektivnom aktivacijom (Janisse, 1974). Promjene u širini zjenica nastaju pod izravnim utjecajem simpatičkog dijela autonomnog živčanog sustava i nisu pod svjesnom kontrolom ispitanika, zbog čega se smatraju pouzdanim indikatorom emocionalne i kognitivne pobuđenosti.

Slika 1 Gradacija pouzdanosti lica
Izvor: Todorov i Oh, 2021 / https://www.sciencedirect.com/science/chapter/bookseries/abs/pii/S0065260120300290

Teorijska podloga ovog istraživanja temelji se na spoznajama iz evolucijske psihologije, kognitivne neuroznanosti i biologije. Polazi se od teorija koje objašnjavaju brzu i nesvjesnu analizu ljudskih lica. Model obrade lica autora Brucea i Younga (1986) opisuje kako se ta prva analiza odvija u vremenu kraćem od 200 milisekundi. S druge strane, uloga autonomnog živčanog sustava promatra se kroz ideju da se nesvjesne emocionalne i misaone reakcije mogu objektivno mjeriti. Za to se koriste fiziološki pokazatelji kao što su krvni tlak, brzina otkucaja srca i širenje zjenica (Tokić, 2016).

Prema evolucijskoj teoriji (Little i sur., 2011), privlačna lica znak su zdravlja i dobre genetske kvalitete. Ona automatski potiču pažnju i aktiviraju centre za nagradu u mozgu, što opravdava korištenje biometrijskih mjera za procjenu privlačnosti. Primjerice, Tokić (2016) koristi mjerenje rada srca kao pokazatelj rada autonomnog živčanog sustava. Fizička privlačnost se može znanstveno dokazati, ali ona ima i važnu ulogu u svakodnevnom životu. Ljudi koji se smatraju privlačnijima često lakše dobivaju pomoć, uspješniji su na poslu i jednostavnije se uklapaju u društvo.

Dosadašnja istraživanja pokazuju da određene crte lica spontano šalju poruke o nečijoj osobnosti i privlačnosti (Little i sur., 2011). Ipak, u postojećoj literaturi još uvijek nedostaju točna i objektivna mjerenja izravnih reakcija tijela na takve slike. Problem kojim se ovaj rad bavi upravo je taj nedostatak opipljivih, tjelesnih pokazatelja u objašnjavanju nesvjesnog doživljaja ljepote. Motivacija za odabir ove teme proizlazi iz želje da se znanstvenim putem dokaže koliko je biometrijska analiza važna u svakodnevnom životu, umjesto da se samo ponavljaju već poznate činjenice.

Svrha ovog istraživanja je ispitati kako biometrijske karakteristike generiranih lica utječu na nesvjesne fiziološke reakcije ispitanika i analizirati povezanost vizualne socijalne percepcije s autonomnim tjelesnim odgovorima. Tako bi se prepoznala nesvjesna selekcija koju ljudski mozak obavlja prije svjesnog formiranja stava. Pronalaženje karakteristika koje dokazano povećavaju atraktivnost osobe i analiziranje utjecaja koje mogu imati na druge ljude. Može imati primjenu u kozmetičkoj industriji i dobrobiti za same kupce. Prepoznavanjem i pronalaženjem “savršene” biometrije lica (učenjem kako ju što preciznije replicirati) kozmetički proizvodi dobivaju na učinkovitosti i isplativosti. Istraživanjem fizioloških reakcija na biometrijske indikatore može se pospješiti nečija šansa za učinkovitije ispunjavanje profesionalnih potencijala. Dosadašnja istraživanja pokazuju da određene facijalne značajke nesvjesno signaliziraju osobnost i privlačnost (Little et al., 2011). Međutim, nedostaju objektivna mjerenja reakcija tijela. U kontekstu ovog istraživanja, dilatacija zjenica promatra se kao objektivan pokazatelj nesvjesne selekcije i procjene lica prije svjesnog formiranja stava. Uz dilataciju zjenica, istodobno se prate promjene brzine otkucaja srca i krvnog tlaka kao pokazatelji aktivacije autonomnog živčanog sustava te smjera i trajanja pogleda kao indikatori razine pažnje.

Razumijevanje ovih mehanizama i primjena idealnih mjera lica mogu imati veliku u kozmetičkoj industriji gdje se, primjerice, može izravno primijeniti kako bi proizvodima rasla iskoristivost, kao i u

komunikaciji radi poboljšanja poslovnih mogućnosti pojedinca. U skladu s tim, predmet istraživanja su promjene u radu autonomnog živčanog sustava.

Cilj istraživanja bio je mjerenjem krvnog tlaka, pulsa i dilatacije zjenica utvrditi utjecaj karakteristika lica na fiziološke promjene kod ljudi.

Naše hipoteze su sljedeće:
H1 – Fiziološke reakcije (puls, krvni tlak, dilatacija zjenica) ispitanika na predočena lica bit će intenzivnija onda kad su im predočena atraktivnija lica tj. lica s karakteristikama povezanim uz pozitivne osobine;
H2 – Izlaganje nepouzdanim licima će povisiti sistolički tlak i ubrzati puls;
H3 – Dilatacija zjenica veća je kod lica s pozitivno ocijenjenim biometrijskim karakteristikama.

Atraktivnost lica (slika 2) je mjerljiva i znanstveno dokazana karakteristika (varijabla) kojom se može upravljati (Bashour, 2006). Zato su kod dokazivanja ovih hipoteza zavisne varijable – fiziološke reakcije ispitanika: promjena sistoličkog i dijastoličkog srčanog tlaka, brzina otkucaja srca i dilatacija zjenice. Nezavisne varijable su slike lica prikazane s osobinama koje su iskazane biometrijskim karakteristikama. Ta lica na sebi imaju točno određene privlačne ili neprivlačne karakteristike, a izrađena su u programu FaceGen (Bashour, 2006). Kontrolno mjerenje čine fiziološke vrijednosti ispitanika mjerene za vrijeme gledanja u prazan, crni ekran, prikazan prije prikazivanja vizualnog podražaja digitalno izrađenih fotografija lica.

METODE RADA

Istraživanje je osmišljeno kao eksperimentalno istraživanje u kojem se, u kontroliranim uvjetima, ispituju fiziološke reakcije ispitanika na standardizirane računalno generirane vizualne podražaje ljudskih lica s unaprijed definiranim varijacijama facijalnih karakteristika. Lica su oblikovana tako da se sustavno mijenjaju znanstveno definirane značajke privlačnosti, kao što su simetrija lica, izraženost vilice, položaj jagodica i proporcije lica (slika 1 i 2).

Uvjeti istraživanja

Eksperiment je proveden u praznoj školskoj učionici, izoliranoj od vanjskih utjecaja. Mjerenja su se odvijala u mirnom prostoru s konstantnom temperaturom od 25 °C i s jednoličnim, osvjetljenjem, bez prisutnosti buke i drugih ometajućih podražaja. Mjerenja su se provodila pojedinačno za svakog sudionika. Mjerenje, tlaka, pulsa i širina zjenica bilježe se dok ispitanici gledaju pripremljene slike (slika 3).

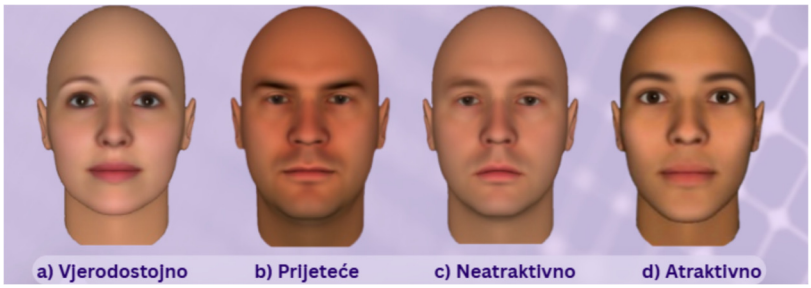
Uzorak

Uzorak u ovome istraživanju činio je 51 dobrovoljni ispitanik srednjoškolske dobi, u rasponu od 15 do 18 godina. Unutar formiranog uzorka sudjelovalo je 25 ispitanica ženskog spola i 26 ispitanika muškog spola. Svi sudionici su prije početka eksperimentalnog postupka pažljivo informirani o općim ciljevima te su dobrovoljno ispunili i potpisali odobreni obrazac informiranog pristanka i privole za anonimno sudjelovanje te obradu prikupljenih podataka.

Postupak istraživanja

Cjelokupno istraživanje strukturirano je i realizirano kroz tri uzastopne faze. U radu je primijenjena eksperimentalna psihofiziološka metoda u kojoj izlaganje podražajima služi kao nezavisna varijabla, dok se popratne somatske reakcije bilježe kao zavisne varijable, što je metodološki usklađeno s ranijim istraživanjima u ovome znanstvenom području (Cacioppo i Tassinary, 1990).

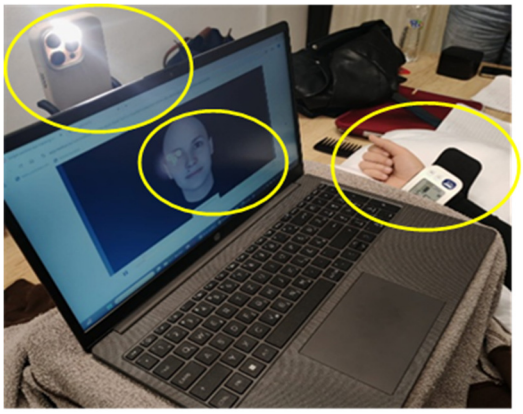
Prva faza istraživanja obuhvaća određivanje i biranje vizualnih podražaja, provjeru ispravnosti svih mjernih uređaja i upoznavanje s digitalnim alatima. U radu se primjenjuje psihofiziološka metoda u kojoj se ispitanici u kontroliranim uvjetima izlažu standardiziranim slikama, dok se istovremeno bilježe njihove tjelesne reakcije (Cacioppo i Tassinary, 1990). Prikazana lica podijeljena su u kategorije prema privlačnosti, dok su svi ostali detalji na slikama potpuno ujednačeni (slika 2).



Slika 2 Slike lica s biometrijskim karakteristikama (od a do d) korištene u eksperimentu

Druga faza rada odnosila se na samo provođenje pokusa i prikupljanje podataka. Slike lica ispitanicima su prikazivane na ekranu prijenosnog računala MacBook Air 13. Svi su ispitanici gledali slike s jednake udaljenosti, 35 cm od ekrana, a svaka je slika bila prikazana na 20 sekundi. Između slika određeno je vrijeme odmaranja od 5 sekundi, tijekom kojih su ispitanici ponovno gledali u prazan crni ekran. Kratke pauze omogućile su da se fiziološke vrijednosti ispitanika vrate na bazične.

Tijekom izlaganja vizualnom podražaju, bile su stalno praćene i bilježene tjelesne reakcije ispitanika. Fiziološki podaci, koji uključuju gornji (sistolički) i donji (dijastolički) krvni tlak te puls (broj otkucaja srca u minuti), mjereni su digitalnim tlakomjerom marke Omron. U isto vrijeme, promjene u širini zjenica (širenje i skupljanje) bile su praćene pomoću računalnog programa *mEye*.



Slika 3 Postav provedbe eksperimenta

Tablica 1 Obrazac za bilježenje mjerenih parametara tijekom istraživanja

Interval	Tlak (mmHg)	Broj otkucaja srca (b/min)	Širenje zjenice (%)	Fiksacija pogleda na određeni dio lica
Kontrola (crni ekran)				
Prva slika (mjerenje 20 sekundi)				
Pauza (5 sekundi)				
Druga slika (mjerenje 20 sekundi)				

Treća faza istraživanja obuhvaćala je pripremu, organizaciju i statističku obradu prikupljenih podataka u programu Microsoft Excel. Svi zabilježeni podaci pripremljeni su za daljnju analizu unutar tog

programa pomoću osnovnih statističkih mjera. Kako bi se lakše prikazala glavna obilježja prikupljenih podataka, iskorištena je i deskriptivna statistička analiza.

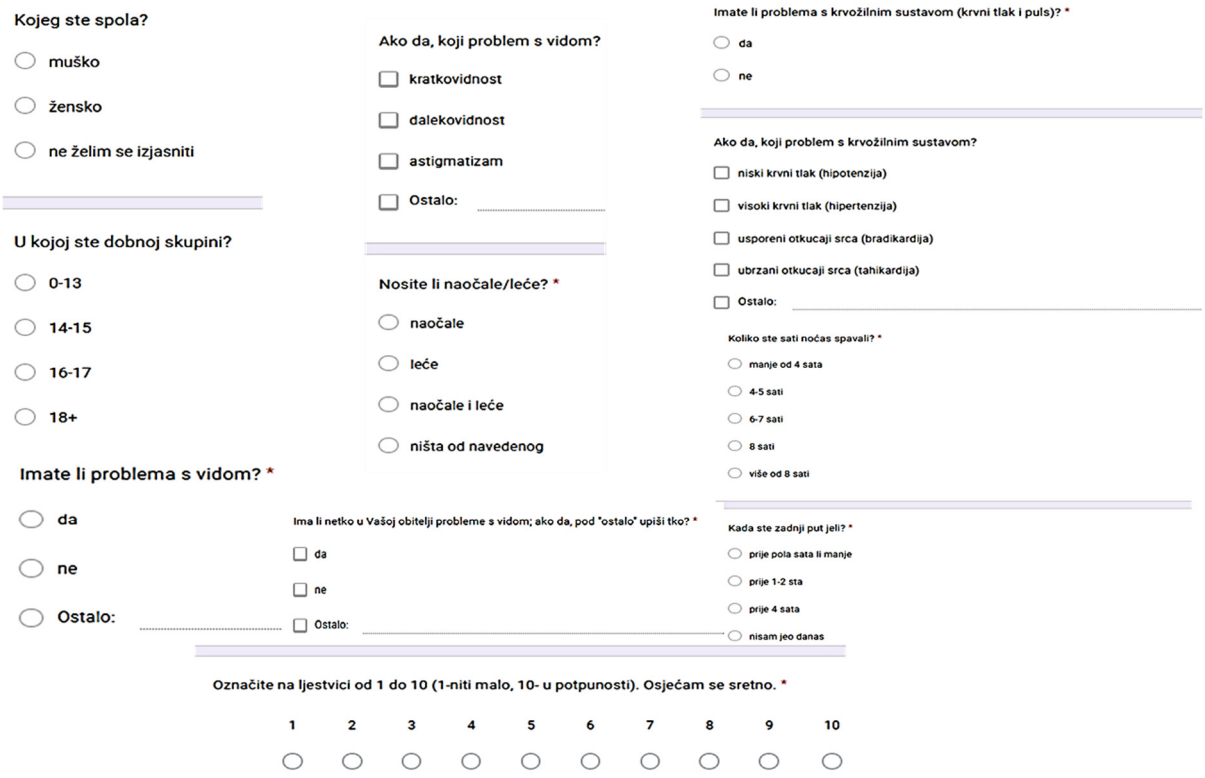
U sklopu analize za sve mjerene tjelesne reakcije (krvni tlak, puls i širinu zjenice) uspoređivane su vrijednosti mjerenja s podatcima iz ankete. Konačna analiza rezultata napravljena je izravnom usporedbom i utvrđivanjem razlika u jačini reakcija ispitanika na različite skupine prikazanih lica.

Ovim se postupkom u konačnici omogućuje precizno mjerenje i pouzdana usporedba fizioloških reakcija ispitanika na različite kategorije vizualnih podražaja.

REZULTATI

Demografska struktura i emocionalni status ispitanika

Prije samog provođenja mjerenja, anketnim upitnikom prikupljeni su podaci o dobi, spolu, zdravstvenom stanju i životnim navikama ispitanika (slika 4). To je učinjeno kako bi se objasnila moguća odstupanja pri mjerenju koja su mogla utjecati na rad autonomnog živčanog sustava ispitanika (slika 5).



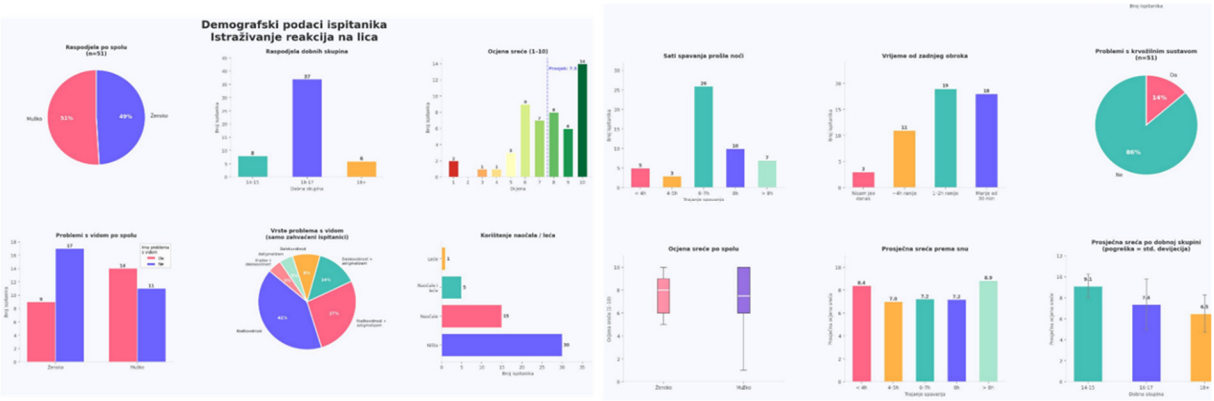
Slika 4 Pitanja u anketnom upitniku

Izvor: https://docs.google.com/forms/d/1B-d3aoVtKVbMWzbbnEUoYYgpc6TDw98C6JKDRGq0hds/edit?ts=6995c432

U uzorku je vidljiva ravnoteža između spolova, s 51 % sudionika muškog spola i 49 % ženskog spola. S obzirom na dob, skupina je prilično ujednačena. Svi ispitanici su srednjoškolske dobi, većina (37 ispitanika) ima 16 ili 17 godina, dok je manji broj onih od 14 do 15 godina (8 ispitanika) i 18 do 19 godina (6 ispitanika).

Osobna procjena sreće, koja se mjerila na ljestvici od 1 do 10, pokazuje da su ispitanici općenito u dobrom emocionalnom stanju, s visokim prosjekom od 7,8. Analiza odgovora otkriva da je najčešća ocjena bila čista desetka, koju je izabralo čak 14 ispitanika. Ispitanici unutar najmlađe skupine (14–15

godina) češće su označavali da su sretniji, dok su oni u starijim dobnim skupinama češće označavali niže vrijednosti subjektivne procjene sreće.



Slika 5 Rezultati ankete provedene prije svakog testiranja u svrhu utvrđivanja karakteristika uzorka

Budući da se metodologija istraživanja oslanja na vizualnu stimulaciju i precizno mjerenje promjena u širini zjenica, status vida ispitanika predstavljao je moguće značajnu varijablu. Rezultati pokazuju gotovo podjednaku distribuciju; 49 % ispitanika navodi određene poteškoće s vidom, dok ih 51 % nema. Među ispitanicima s poteškoćama dominira kratkovidnost (41 %) te kombinacija kratkovidnosti i astigmatizma (27 %). Unatoč tome, većina uzorka (30 ispitanika) ne koristi pomagala tijekom uobičajenih aktivnosti, dok se ostatak služi naočalama (15 ispitanika) ili kontaktnim lećama (5 ispitanika).

Kada je riječ o zdravlju krvožilnog sustava, samo je 14 % ispitanika navelo da ima povremene probleme. Ovaj je podatak važan je jer potvrđuje da se dobiveni rezultati mjerenja krvnog tlaka i pulsa tijekom pokusa mogu smatrati izravnom reakcijom na prikazana lica, a ne posljedicom određenih zdravstvenih stanja ispitanika.

Analiza životnih navika: san i prehrana

Čimbenici poput odmora i prehrane analizirani su jer oni mogu izravno utjecati na reakcije autonomnog živčanog sustava. Najveći broj ispitanika (26 osoba) spavao je između 6 i 7 sati, što je uobičajeno za mlade u ovoj dobi. Primijećen je i zanimljiv podatak pri usporedbi duljine sna i emocionalnog stanja. Naime, ispitanici koji su spavali jako kratko (manje od 4 sata) ili jako dugo (više od 8 sati) češće su navodili više ocjene sreće. S druge strane, skupina s umjerenim nedostatkom sna (4 do 5 sati) češće je označavala niže ocjene sreće.

Na kraju, analiza prehrambenih navika pokazuje da je većina ispitanika jela unutar dva sata prije samog testiranja. To je osiguralo stabilno stanje organizma i spriječilo da pad šećera u krvi utječe na promjene u radu srca i širinu zjenica tijekom mjerenja. Svi ovi prikupljeni podaci potvrđuju da je skupina ispitanika stabilna i prikladna za provođenje ovog istraživanja.

Analiza fizioloških mjerenja: odgovori krvožilnog sustava na podražaje

Nakon obrade podataka prikupljenih mjerenjem, utvrđene su promjene u radu srca i krvotoka ispitanika. Rezultati mjerenja sistoličkog tlaka, dijastoličkog tlaka i pulsa daju uvid u pobuđenost autonomnog živčanog sustava u izravnoj ovisnosti o karakteristikama prikazanih lica.

Većina izmjerenih vrijednosti gornjeg (sistoličkog) tlaka nalazila se u očekivanom rasponu od 100 do 140 mmHg. Iako su ti podaci uglavnom bili stabilni, zabilježeni su i nagli skokovi koji pokazuju trenutnu reakciju tijela na pojedinu sliku. Donji (dijastolički) tlak kod svih ispitanika pokazivao je veće promjene

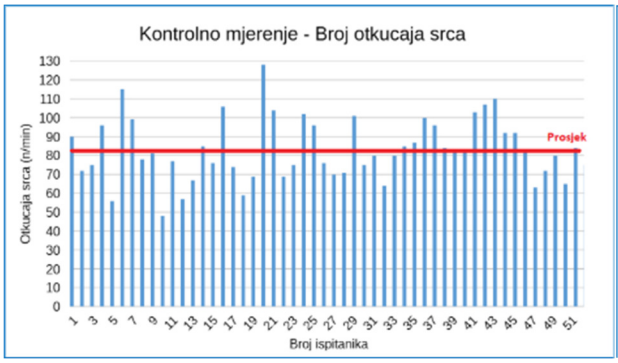
u usporedbi s gornjim tlakom, što pokazuje da je krvotok ispitanika dinamično reagirao na podražaj (različita lica).

Usporedba reakcija prema kategorijama podražaja (slika 2a – 2d)

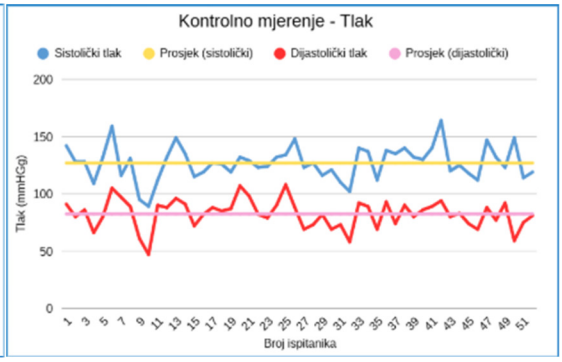
Usporedbom mjerenja dobivenih tijekom provođenja eksperimenta s kontrolnim vrijednostima (stanje mirovanja), uočena je jasna gradacija u intenzitetu fiziološkog odgovora ovisno o biometriji promatranog lica:

1. **Slika 2a (Vjerodostojno lice):** Ova je slika izazvala najjaču tjelesnu reakciju kod svih ispitanika prisutnih u ovom istraživanju. Vrijednosti gornjeg i donjeg tlaka gotovo su stalno bile više od početnih mjerenja te su zabilježile najviše prosječne i vršne rezultate. Zanimljivo je da je puls ispitanika kod ove slike bio malo niži (za 0,25 %) u odnosu na prosjek ostalih slika, što može ukazivati na stanje visoke mentalne usmjerenosti. Velike razlike u reakcijama na ovu sliku pokazuju da su ispitanici na vjerodostojno lice reagirali subjektivnije u odnosu na ostale slike.
2. **Slike 2b i 2c (Prijeteće i neatraktivno lice):** Rezultati za ove dvije skupine vrlo su slični i podaci se često preklapaju. Ove su slike izazvale umjeren i podjednak učinak na autonomni sustav, pa se po jačini reakcije nalaze odmah iza vjerodostojnog lica.
3. **Slika 2d (Atraktivno lice):** Gledanje atraktivnog lica izazvalo je najslabije reakcije srca i krvotoka. Izmjerene vrijednosti bile su najbliže početnim mjerenjima u mirovanju, a zabilježen je i trend niskog donjeg (dijastoličkog) tlaka. To upućuje na zaključak da ovakve karakteristike lica djeluju opuštajuće na krvožilni sustav ispitanika.

Prosjek rezultata mjerenja dijastoličkog tlaka, sistoličkog tlaka i pulsa svih ispitanika pri izlaganju pojedinom vizualnom podražaju prikazan je na slikama u nastavku (slika 6 – slika 16). Izračunat je uzimanjem rezultata mjerenja za svakog ispitanika i podijeljen s brojem ispitanika, na grafovima se tada jasno vidi koliko su vrijednosti mjerenja za svakog pojedinog ispitanika odstupale od prosječne reakcije svih ispitanika na isti podražaj.

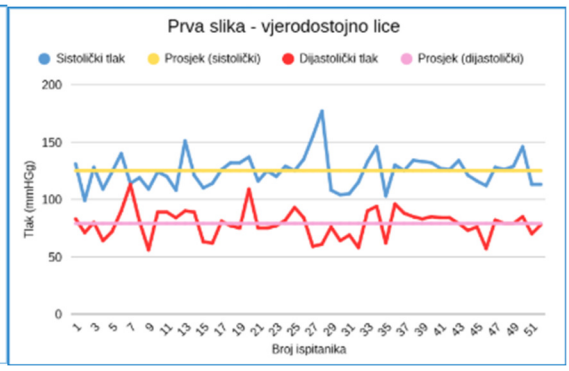


Slika 6 Kontrolno mjerenje pulsa



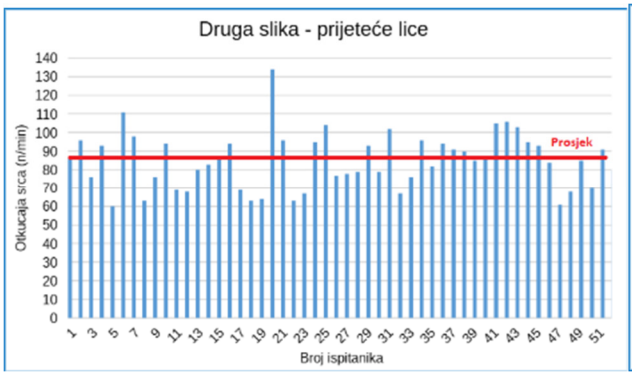
Slika 7 Kontrolno mjerenje krvnog tlaka

Slika 8 Promjene pulsa pri izlaganju vjerodostojnom licu

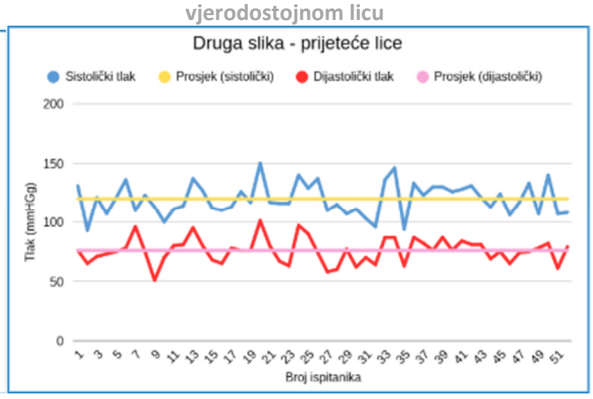


Slika 9 Promjene krvnog tlaka pri izlaganju

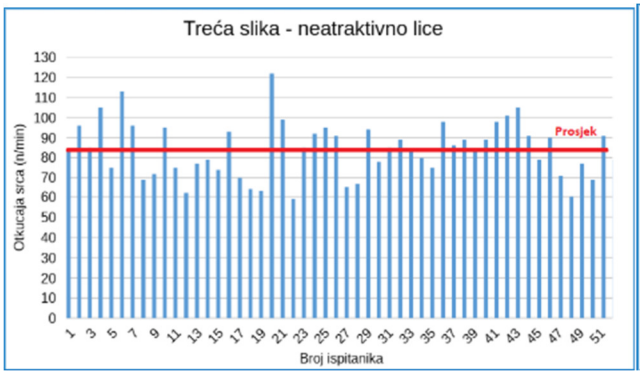
vjerodostojnom licu



Slika 10 Promjene pulsa pri izlaganju prijetećem licu

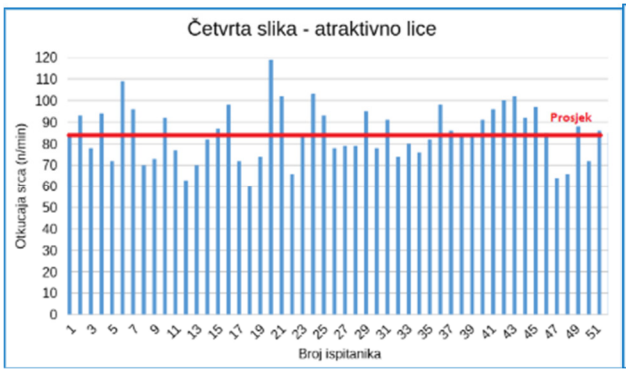


Slika 11 Promjene krvnog tlaka pri izlaganju prijetećem licu

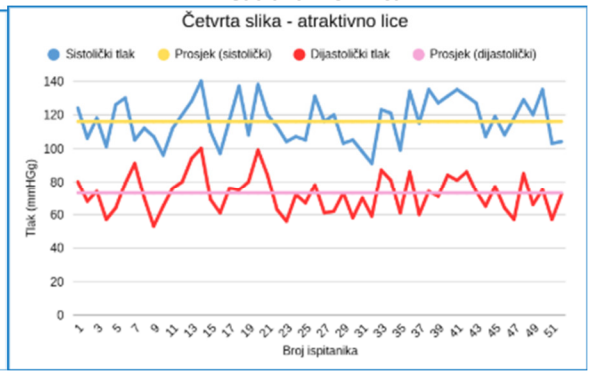


Slika 12 Promjene pulsa pri izlaganju neatraktivnom licu

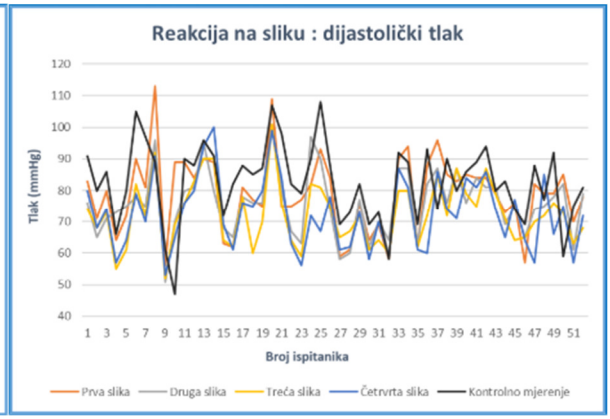
Slika 13 Promjene krvnog tlaka pri izlaganju neatraktivnom licu



Slika 14 Promjene pulsa pri izlaganju atraktivnom licu



Slika 15 Promjene krvnog tlaka pri izlaganju atraktivnom licu



Slika 16 Usporedba sistoličkih i dijastoličkih krvnih tlakova nakon gledanja u Slike lica 2a – 2d, s kontrolnim mjerenjem

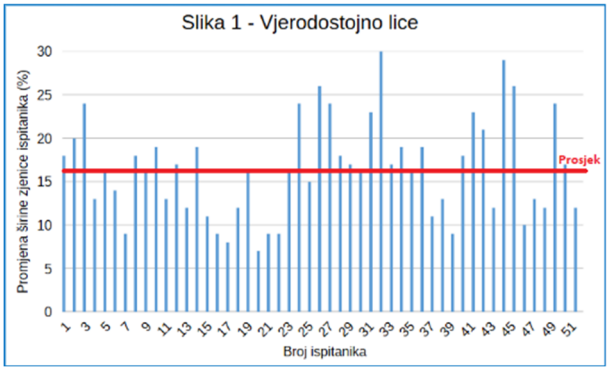
Analiza biometrije oka: dilatacija i konstrikcija zjenica

Ljudski mozak automatski obrađuje pozitivne i negativne podražaje, što se manifestira i kroz širenje ili sužavanje zjenica.

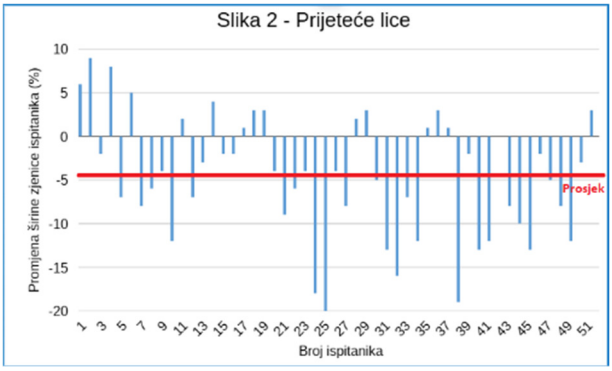
Nakon analize parametara krvožilnog sustava, provedena je obrada podataka dobivenih programom *mEye*, koji prati promjene u promjeru zjenica kao izravan odgovor na emocionalnu valenciju vizualnih podražaja.

Tijekom gledanja četiriju slika (slike 17 2a – 17 2d), promjene na zjenicama izmjerene su programom *mEye*. Taj program automatski mjeri širenje i skupljanje zjenica uz pomoć naprednih sustava umjetne inteligencije. Zahvaljujući tim modelima, program vrlo točno prepoznaje zjenicu oka čak i u nesavršenim uvjetima, kao što su materijali snimljeni HD kamerom (pametni telefon iPhone 16 Pro) umjesto profesionalnom kamerom specijaliziranom za pupilometriju, školska rasvjeta ili odsjaj svjetlosti na oku. Također, u program *mEye* ugrađen je sustav koji sam prepoznaje kada ispitanik trepne. U tom trenutku mjerenje se nakratko zaustavlja kako bi se automatski izbrisali netočni podaci i lažne nule koje nastaju zbog privremenog zatvaranja oka.

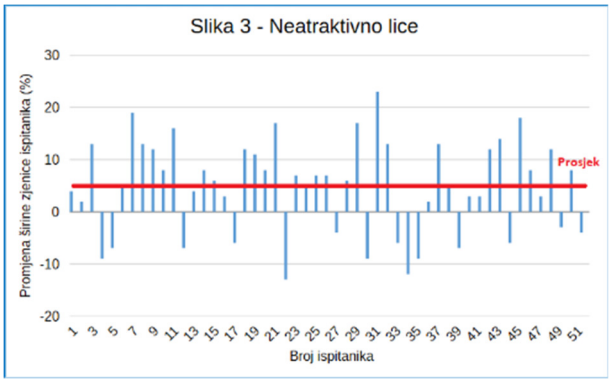
Podaci dobiveni za svakog ispitanika nakon toga su obrađeni računalnim programima u jeziku Python. Na temelju površine zjenice (koja se mjeri programom *mEye* u pikselima), a nakon što su uklonjeni svi treptaji, izračunata je postotna promjena širine zjenice za svaku od četiri slike. Ta je promjena dobivena izravnom usporedbom s početnim stanjem mirovanja sa samog početka mjerenja (slike 17 i 18).



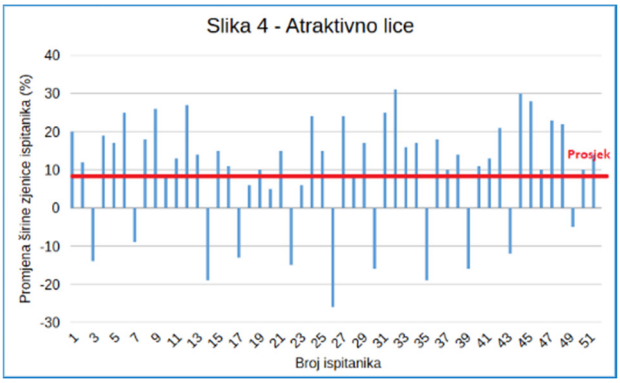
Slika 17 2a (Vjerodostojno lice): Kod svih ispitanika zabilježena je pozitivna reakcija, s prosječnim širenjem zjenica od 16,47 %.



Slika 17 2b (Prijeteće lice): Rezultati redovito prikazuju sužavanje zjenica kod velike većine ispitanika, s prosječnim smanjenjem od -4,51 %.

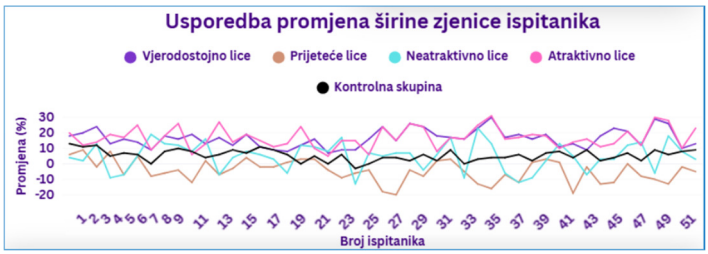


Slika 17 2c (Neatraktivno lice): Ova je skupina podražaja izazvala različite, izmiješane reakcije s puno neutralnih odgovora.



Slika 17 2d (Atraktivno lice): Ovaj je podražaj izazvao najjače, ali istovremeno i najrazličitije reakcije među ispitanicima. Iako je prosječno širenje zjenica iznosilo 9,85 %, zabilježen je širok raspon rezultata — od jakog sužavanja (-25 %) do jakog širenja zjenica (+31 %).

Slika 17 Reakcije zjenice nakon izlaganja vjerodostojnom, prijetećem, neatraktivnom i atraktivnom licu



Slika 18 Vizualni prikaz usporedbe promjene širina zjenica nakon gledanja u slike lica (slike 2a – 2d), s kontrolnim mjerenjem

RASPRAVA

Interpretacija dobivenih rezultata ukazuje na jasnu i mjerljivu poveznicu između karakteristika lica i nesvjesnih reakcija autonomnog živčanog sustava promatrača. Korištenjem kombinacije triju različitih vrsta podataka – mjerenja krvnog tlaka, pulsa te širine zjenica (pupilometrije) pomoću programa *mEye* – potvrđeno je da ljudski organizam provodi brzu i instinktivnu procjenu vizualnih podražaja znatno prije nego što se razvije svjesno mišljenje o nekom licu. Rezultati mjerenja rada srca i krvotoka otkrili su da slike koje šalju signale sigurnosti ili prijetnje izazivaju najburnije reakcije. Vjerodostojno lice (slika 2a) izazvalo je najjači ukupni učinak na povišenje sistoličkog i dijastoličkog tlaka. Ovakav nalaz pokazuje da prepoznavanje povjerenja nije pasivan proces, već stanje visoke mentalne i tjelesne budnosti. Zanimljivo je da je kod ove slike zabilježen blagi pad pulsa (za 0,25 %), što se u psihofiziologiji često tumači kao učinak usmjerene pažnje ili "orijentacijski odgovor", pri čemu tijelo usmjerava energiju na detaljnu analizu društveno važnog signala.

S druge strane, atraktivno lice (slika 2d) izazvalo je najslabije reakcije srca i krvotoka, pri čemu je uočeno da ono djeluje opuštajuće na krvne žile ispitanika. To se podudara s evolucijskim pretpostavkama da estetski ugodne crte lica šalju signal o niskoj razini opasnosti i dobroj genetskoj kvaliteti, što dovodi do smanjenja tjelesnog stresa. Prijeteća i neatraktivna lica (slike 2b i 2c) našla su se u sredini te su izazvala umjerene i međusobno vrlo slične reakcije krvnog tlaka.

Analiza pupilometrije

Rezultati dobiveni programom *mEye* pružaju uvid u emocionalnu obradu podataka. Zjenice su reagirale sukladno principu emocionalne valencije podražaja:

- Vjerodostojnost: Ovaj je čimbenik bio najstabilniji te je kod svih ispitanika uzrokovao značajno širenje zjenica (16,47 %). To potvrđuje da znakovi povjerenja djeluju općenito poticajno na ljudski organizam. Ovako visok i ujednačen postotak širenja pokazuje da osjećaj povjerenja i vjerodostojnosti ima vrlo snažan i poticajan utjecaj na rad autonomnog živčanog sustava.
- Neatraktivnost: Može se uočiti da neatraktivno lice potiče tek početnu, uobičajenu razinu pažnje i interesa bez nekog posebnog emocionalnog naboja. Zbog toga ono može služiti kao vrsta polazne točke i temelja za usporedbu s ostalim prikazanim licima.
- Atraktivnost je izazvala najrazličitije reakcije (raspon od -25 % do +31 %). Iako je prosjek pozitivan (9,85 %), primjetljiva varijabilnost pokazuje da je privlačnost prilično subjektivan faktor, podložan individualnim preferencijama promatrača. Ovako velike razlike pokazuju da je doživljaj privlačnosti podložan snažnom osobnom i individualnom utjecaju svakog pojedinca, za razliku od općeg i ujednačenog doživljaja vjerodostojnosti i povjerenja.
- Prijetnja je dovela do sustavnog sužavanja zjenica (-4,51 %). Ovaj rezultat je bitan jer potvrđuje obrambenu reakciju; sužavanje zjenica u ovom kontekstu služi kao fiziološki mehanizam koji otkriva averziju prema neugodnom ili prijetećem podražaju. Ovakav nalaz ukazuje na automatsku

obrambenu reakciju organizma i pojačan oprez, odnosno odbojnost (averziju) kao izravan odgovor na prijeteći izgled lica.

Korelacija emocionalne valencije i fiziološkog odgovora

Dobiveni podaci potvrđuju da slike koje potiču ugodne osjećaje (vjerodostojnost i privlačnost) dovode do širenja zjenica, dok neugodni podražaji (prijetnja) uzrokuju njihovo sužavanje. Zanimljivo je uočiti suprotnost u odnosu na prethodna mjerenja: dok je prva slika (vjerodostojno lice) izazvala najviši krvni tlak i najstabilnije širenje zjenica, četvrta slika (atraktivno lice) imala je potpuno drugačiji učinak. Ona je izazvala najslabiju reakciju na krvnom tlaku, ali je istovremeno pokrenula najburnije i najrazličitije promjene u širini zjenica kod ispitanika.

Rezultati slike usporedbe promjene širina zjenica nakon izloženosti vizualnim podražajima i kontrolnim mjerenjem (slika 18) podupiru hipotezu o nesvjesnoj i automatskoj obradi vizualnih signala, pri čemu zjenice služe kao pouzdan indikator emocionalnog stanja koji nije pod svjesnom kontrolom ispitanika.

Utjecaj životnih navika i demografskih faktora

Podaci prikupljeni anketom poslužili su kao potreban kontekst za razumijevanje odstupanja u mjerenjima. Iako je 49 % ispitanika prijavilo blage probleme s vidom (primarno kratkovidnost i astigmatizam), dosljednost u mjerenjima zjenica pokazuje da su reakcije ispitanika na podražaje instinktivne i neovisne o njihovoj oštrini vida. Homogenost uzorka (većina ispitanika je dobi od 16 do 17 godina) osigurala je stabilnost trendova, dok su specifični nalazi kod ankete o snu – gdje su ispitanici s značajnijim manjkom ili viškom sna prijavili najvišu razinu sreće – mogli pridonijeti vršnim vrijednostima zabilježenim kod emocionalno intenzivnijih slika (atraktivnost i povjerenje).

Sinteza i zaključna razmatranja rasprave

Usporedba svih praćenih vrijednosti ukazuje na to da promjene u radu srca i krvotoka (krvni tlak) mogu biti pokazatelji mentalnog napora ili procjene sigurnosti. Također vidimo da se mjerenje širine zjenica (pupilometrija) pokazalo kao točnije mjerilo za uspoređivanje načina na koji ljudi percipiraju različita lica zbog brzine u promjeni širine s obzirom da sam mozak o podražaju formira stav u djeliću sekunde.

Suprotnost između prve slike (visok tlak, stabilno širenje zjenica) i četvrte slike (nizak tlak, vrlo različite promjene na zjenicama) pokazuje da ljudski mozak na drugačije načine prepoznaje te obrađuje povjerljivost i ljepotu. Dok prepoznavanje povjerenja zahtijeva pokretanje tjelesnih sustava i detaljnu analizu, ljepota djeluje poput nagrade koja opušta i umiruje krvožilni sustav, istovremeno potičući centre za obradu osjećaja u mozgu.

ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i analize prikupljenih podataka, izvedeni su sljedeći ključni zaključci:

- Lica s pozitivnim karakteristikama uzrokuju jače širenje zjenica, te postižu krajnje (najviše i najniže) vrijednosti rezultata mjerenja za krvni tlak i puls.
- Izloženost podražaju prijetećeg lica ispitanicima ne povisuje značajno sistolički tlak i puls u odnosu na ostala lica.
- Širenje zjenica ispitanika je intenzivnije dok su izloženi licima s biometrijskim karakteristikama koje su socijalno pozitivno percipirane.
- Neatraktivno lice ne potiče značajne promjene u radu srca, krvotoka i širini zjenica jer mozak takav podražaj ne prepoznaje, to jest ne obrađuje kao posebno važnog.

- Kontrolno mjerenje kod većine sudionika pokazuje najviše vrijednosti gornjeg krvnog tlaka, što se može pripisati blagoj nervozi ili usmjerenosti pažnje na samom početku pokusa.
- Utjecaj crta lica na promatrača ne očituje se samo na psihološkoj već i na fiziološkoj razini, pri čemu su promjene u širini zjenica brze i izravne, dok je prilagodba krvnog tlaka sporija i podložnija općem trenutnom stanju organizma.

ZAHVALA

Zahvaljujemo našoj mentorici Vesni Dobronić na uloženoj potpori, vodstvu i strpljenju. Također se toplo zahvaljujemo svim kolegama i prijateljima (nekim novostečenim) koji su pristali prisustvovati u našem istraživanju, koje bez njih nebi bilo moguće ostvariti.

LITERATURA

Bashour M. 2006. An objective system for measuring facial attractiveness. Plastic and Reconstructive Surgery 118(3): 757–774.

Bruce V., Young A. 1986. Understanding face recognition. British Journal of Psychology 77 (3): 305–327.

Cacioppo J. T., Tassinary L. G. 1990. Principles of psychophysiology: physical, social, and inferential elements. Cambridge University Press.

Darwin C. 2008. Postanak vrsta prirodnim odabirom ili Očuvanje povlaštenih rasa u borbi za život. Školska knjiga, Zagreb.

Fink B., Penton-Voak I. 2002. Evolutionary psychology of facial attractiveness. Current Directions in Psychological Science 11(5): 154–158.

Janisse M. P. 1974. Pupil size, affect and exposure frequency. Social Behavior and Personality: an International Journal 2(2): 125–146.

Little A. C., Jones B. C., DeBruine L. M. 2011. Facial attractiveness: evolutionary based research. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 366(1571) : 1638–1659.

Todorov A., Oh D. 2021. The structure and perceptual basis of social judgments from faces. Advances in Experimental Social Psychology 63: 189–245.

Tokić A. 2016. Parametri varijabiliteta srčane aktivnosti kao pokazatelji funkcioniranja autonomnog živčanog sustava. Medica Jadertina 46(3–4): 73–84.

Utjecaj UV-zračenja na dostupnost peptidnih veza u kolagenu

Matko Celić, 3. razred

Gimnazija Petra Preradovića Virovitica, Virovitica
Mentor: *Ines Tovarović*

SAŽETAK

Cilj ovog istraživačkog rada bio je ispitati utjecaj UV-zračenja na strukturu polipeptidnih lanaca kolagena primjenom biuret-reakcije i analize promjene obojenja. Eksperiment je počeo pripremom 6 uzoraka otopina kolagena poznatih masenih koncentracija kojima se dodala 10 %-na otopina NaOH i razrijeđena vodena otopina $CuSO_4$. Reakcija tih spojeva poznata je i kao biuret-reakcija koja može pokazati dostupnost peptidnih veza u proteinu na temelju intenziteta ljubičaste obojenosti otopine. Pripremljene su i eksperimentalne skupine koje su bile izložene različitim vremenskim intervalima UV-zračenja. Nakon izlaganja UV-zračenju uzorcima je izmjeren intenzitet obojenosti otopine kolagena pomoću RGB vrijednosti dobivenih preko mobilne aplikacije. Te vrijednosti zatim su pretvorene u luminaciju iz koje je napravljen graf ovisnosti luminacije i masenog udjela te njegova linija trenda. Dobiveni rezultati i linija trenda pokazuju da UV-zračenje utječe na dostupnost peptidnih veza u kolagenu, tj. na promjenu u strukturi proteina povezanu s procesima fotostarenja. Uočen je nelinearan učinak UV-zračenja na luminaciju. Nakon kratkog izlaganja otopine kolagena UV-zračenju došlo je do smanjenja broja dostupnih peptidnih veza, pri izlaganju od 10 minuta zabilježeno je povećanje njihove dostupnosti, dok je pri duljem izlaganju (15 – 25 minuta) ponovno došlo do smanjenja obojenja otopine što se objašnjava kumulativnim smanjenjem dostupnosti peptidnih veza. Takvi rezultati mogu se objasniti istodobnim odvijanjem različitih procesa koji rezultiraju promjenama prostorne strukture molekule kolagena. Promjene povećanja intenziteta obojenosti nakon biuret-reakcije tumače se djelomičnim odmotavanjem triju polipetidnih lanaca koji izgrađuju molekulu kolagena, dok je smanjenje intenziteta obojenosti otopine nakon biuret-reakcije rezultat dodatnog uvijanja lanaca pri duljem izlaganju otopine UV-zračenju.

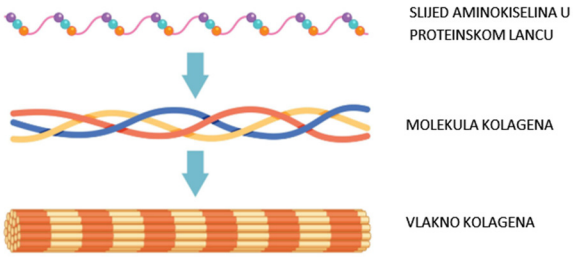
Ključne riječi: *protein; fotostarenje; RGB vrijednost; biuret-reakcija*

UVOD

Jedina univerzalna sudbina svih živih bića je starenje, koje predstavlja postupni gubitak fizioloških funkcija te smanjenu sposobnost regeneracije stanica, tkiva i organa (Guo i sur., 2022). Koža je najveći organ čovjeka i posebno je osjetljiva na promjene povezane sa starenjem, jer se one na njoj vide najjasnije. Na starenje kože utječu unutarnji čimbenici poput genetike i hormonalnih promjena te vanjski čimbenici, među kojima se ističu ultraljubičasto (UV) zračenje, zagađenje zraka, kronične upale i poremećaj mikrobioma (Lee i sur., 2021). Poseban značaj ima UV-zračenje, koje dovodi do fotostarenja. Prema Vierkötter i Krutmann (2012), fotostarenje je kumulativni degenerativni proces izazvan ponovljenim izlaganjem sunčevom svjetlu, a manifestira se pojavom bora, gubitkom elastičnosti i promjenama pigmentacije kože.

Koža se sastoji od tri osnovna sloja: površnog epidermisa, dubljeg dermisa i potkožnog masnog tkiva. Dermis sadrži najveću količinu kolagena, pri čemu su najvažniji tipovi I, III i V (Bar & Valiukevičienė, 2025). Kolagen je osnovni strukturni protein svih kralježnjaka, a osim u koži nalazi se i u kostima, tetivama te hrskavici, gdje osigurava mehaničku potporu i otpornost tkiva (Bar & Valiukevičienė, 2025). Svi tipovi kolagena građeni su od tri polipeptidna lanca koji se spiralno omataju u trostruku zavojnicu (slika 1), no razlikuju se u debljini i funkciji vlakana: kolagen tipa I gradi debela vlakna odgovorna za čvrstoću, tip III čini tanja i fleksibilnija vlakna koja pridonose elastičnosti, dok tip V stvara vrlo fina vlakna i regulira stvaranje ostalih kolagenskih vlakana (Ricard-Blum, 2011). Svaki polipeptidni lanac sastoji se od ponavljajućih aminokiselina, među kojima prevladavaju glicin, prolin i hidroksiprolin. Aminokiseline su povezane peptidnim vezama, a cijela struktura dodatno je stabilizirana vodikovim

vezama između lanaca, što kolagenima daje veliku čvrstoću i otpornost na rastezanje (Shoulders i Raines, 2009).



Slika 1 Razine organizacije kolagena
Izvor: https://www.freepik.com/free-vector/collagen-structure-formation-process_255947945.htm#fromView=search&page=1&position=0&uuid=4e62c0e8-768e-4eea-9bab-33a8cc9fb777&query=colagen+structure

Osim vodikovih veza, stabilnost i mehanička otpornost kolagena dodatno se osiguravaju kovalentnim unakrsnim vezama (*cross-links*) koje nastaju između molekula, a mogu nastati pomoću enzima, npr. djelovanjem lizil-oksidaze ili pomoću glikacije, tj. vezanja šećera na proteine (Shoulders i Raines, 2009). Kolagen se danas koristi i kao dodatak prehrani u obliku praha, najčešće dobivenog iz goveda ili ribe, a smatra se da može doprinijeti obnovi kolagena u koži i ublažiti učinke starenja (Bar i Valiukevičienė, 2025).

UV-zračenje dio je Sunčeva spektra i može imati i pozitivne i negativne učinke. U kontroliranim količinama UVB-zrake potiču sintezu vitamina D u koži, koji je ključan za zdravlje kostiju i imunološkog sustava (Holick, 2004). Međutim, prekomjerno izlaganje UV-zračenju ima štetne posljedice. Do Zemljine površine dopiru UVA (315 – 400 nm) i UVB (280 – 315 nm) zrake, dok je UVC (100 – 280 nm) u potpunosti zaustavljen ozonskim omotačem (Diffey, 2002; ICNIRP, 2004). UVA-zrake prodiru dublje u dermis, gdje potiču stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva koji mogu negativno utjecati na kolagen, dok UVB uglavnom djeluje na epidermis, uzrokujući oštećenja DNA i upalne procese (Kammeyer i Luiten, 2015). Prema Fisher i sur. (1997), izlaganje ljudske kože UV-zračenju dovodi do povećanja aktivnosti enzima matriksnih metaloproteinaza (MMPs), što rezultira ubrzanom razgradnjom postojećeg kolagena tipa I i smanjenom sintezom novog.

Osim Sunčeva zračenja, ljudi se izlažu i umjetnim izvorima UVA-zračenja, poput solarija i UV-lampi za učvršćivanje gel lakova. U solarijima prevladava UVA-zračenje, dok je udio UVB-zraka manji (ICNIRP, 2010). Nova istraživanja pokazala su da UV-lampe za nokte, koje emitiraju UV-zračenje u području 340 – 395 nm, mogu uzrokovati oksidativno oštećenje DNA, mutacije i poremećaje rada mitohondrija u ljudskim stanicama (Zhivagui i sur., 2023). Time se potvrđuje da i svakodnevni, kozmetički izvori UV-zračenja mogu pridonijeti fotostarenju kože.

Budući da se kolagen u koži nalazi u dermisu i nije izravno izložen UV-zračenju, dosadašnja istraživanja uglavnom su bila usmjerena na posredne učinke UV-zračenja putem aktivacije enzima matriksnih metaloproteinaza i njihove uloge u razgradnji kolagena (Fisher i sur., 1997). Svrha ovog istraživanja bila je ispitati kako UV-zračenje može utjecati na kolagen i time pridonijeti procesima starenja kože. Iz svrhe proizlazi i cilj ovog istraživačkog rada koji je ispitati izravan utjecaj UV-zračenja na kolagen. Provođenjem biuret reakcije i intenzitetom ljubičastog obojenja koje je nastalo nakon biuret reakcije u istraživanju se želi ispitati kako će UV-zračenje utjecati na promjene strukture kolagena. Predviđa se utjecaj UV-zračenja na međumolekulske interakcije između polipeptidnih lanaca koji izgrađuju

kolagen, na način da dolazi do njihovog razmicanja ili jačeg uvijanja. U radu je korišten otopljen hidrolizirani riblji kolagen u prahu tipa I i III. Kao izvor UVA-zračenja upotrijebljena je UV-lampa za nokte, koja s jedne strane predstavlja pojednostavljenu zamjenu za Sunčevo zračenje, a s druge realan izvor kojem su ljudi izloženi u kozmetičkim salonima. Upravo iz tih razloga motivacija ovog istraživanja bila je ispitati može li takvo zračenje izazvati promjene u strukturi kolagena koje upućuju na potencijalne procese fotostarenja.

Nezavisna varijabla ovog istraživanja je UV-zračenje, tj. vrijeme izloženosti otopine kolagena UV-zračenju, a zavisna varijabla je intenzitet obojenosti otopine kolagena nakon biuret-reakcije. Dobiveni rezultat govori o promjeni dostupnosti peptidnih veza u lancima kolagena nakon izlaganja otopine kolagena UV-zračenju. UV-zračenje važan je čimbenik starenja kože jer uzrokuje promjene u proteinima koji se nalaze u dermisu. Zbog toga se očekuju mjerljive promjene u strukturi kolagena nakon izlaganja njegove otopine UV-zračenju.

Kako bi se ispitalo može li UV-zračenje oštetiti peptidne veze u kolagenu i time utjecati na njegovu strukturu, korištena je biuret-reakcija kao pokazatelj promjena. Ova metoda temelji se na stvaranju kompleksa između Cu^{2+} iona i najmanje dviju peptidnih veza proteina, pri čemu nastaje ljubičasto obojenje otopine čiji se intenzitet uobičajeno mjeri spektrofotometrijski. Budući da u školi nije dostupan spektrofotometar, intenzitet obojenosti mjerio se pomoću aplikacije za analizu boje (RGB), pri čemu je on proporcionalan količini peptidnih veza koje sudjeluju u reakciji, odnosno očuvanosti proteinske strukture (Adnan, 2023).

Na temelju cilja istraživanja postavljene su sljedeće hipoteze:

1. Intenzitet ljubičastog obojenja otopine kolagena smanjivat će se proporcionalno s duljinom izlaganja UV-zračenju.
2. Kraće izlaganje UV-zračenju (5-10 minuta) neće značajno utjecati na promjenu dostupnosti peptidnih veza u proteinskom lancu i neće uzrokovati značajnu promjenu boje otopine kolagena.
3. Dulje izlaganje otopine kolagena UV-zračenju (15-25 minuta) dovest će do postupnog slabljenja ljubičastog obojenja uslijed kumulativnih promjena koje dovode do smanjenja dostupnosti peptidnih veza u proteinskim lancima.

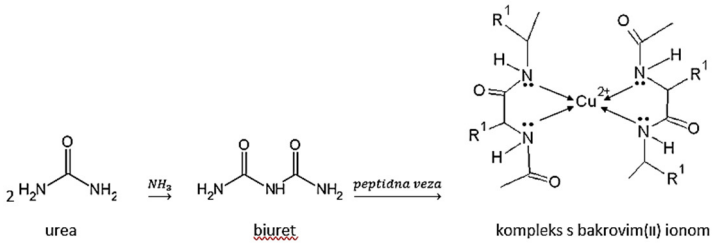
METODE RADA

Istraživanje je provedeno s ciljem ispitivanja utjecaja UV-zračenja na strukturu kolagena, jednog od najvažnijih strukturnih proteina u ljudskom tijelu. Kao izvor kolagena korišten je BioLife Collagen Premium – Pure Peptide, dodatak prehrani koji sadrži hidrolizirani riblji kolagen tipa I i III u obliku finog bijelog praha. Proizvod je 100 % čisti riblji kolagen, bez dodataka šećera i aroma, te je poslužio kao polazni materijal za pripremu uzoraka (slika 2).

Slika 2 Prikaz pakiranja ribljeg kolagena korištenog u istraživanju
Autor: Celić M., 2025

U kontrolnoj i eksperimentalnoj skupini provedena je biuret-reakcija. To je reakcija kojom se ispituje dostupnost peptidnih veza u proteinima. Tijekom reakcije nastaje ljubičasta obojenost otopine, čiji intenzitet ovisi o broju dostupnih peptidnih veza. Promjena boje nakon UV-zračenja ukazuje na promjene u strukturi kolagena zbog kojih dolazi do povećane ili smanjene dostupnosti peptidnih veza na koje se veže bakar.

Karakteristično obojenje nastaje zbog stvaranja kompleksa bakrovih(II) ionima s peptidnom vezom (slika 3).



Slika 3 Shematski prikaz stvaranja kompleksa u biuret-reakciji

Priprema uzoraka poznatih masenih koncentracija kolagena i kontrole

Pripremljeno je sedam različitih otopina kolagena koje su se razlikovale prema masenim koncentracijama (tablica 1). Svaka otopina pripremljena je u volumenu od 20 mL, a potrebna masa kolagena računata je prema sljedećoj formuli:

$$\gamma(\text{kolagena}) = \frac{m(\text{kolagena})}{V(\text{otopine})}$$

Masa kolagena vagana je na analitičkoj vagi marke KERN® s točnošću od 0,0001.

Tablica 1 Masene koncentracije otopina kolagena korištene za izradu kalibracijske krivulje

oznake pojedine epruvete	γ / g L^{-1}
Ep 1	45
Ep 2	40
Ep 3	35
Ep 4	30
Ep 5	22,5
Ep 6	15
Ep 7	7,5
K	0

Prema Sikirici (2018) po 6 mL svake otopine odmjereno je u tri epruvete te je mjerenje provedeno na tri uzorka kako bi se dobile što točnije vrijednosti mjerenja. Volumen otopine mjeren je pipetom. Zadnje tri epruvete sadržavale su samo vodu te su predstavljale kontrolnu skupinu.

Zatim je u svaku epruvetu stavljeno po 6 mL 10 %-tne otopine NaOH. Sadržaj epruvete je promućkan, a u dobivenu otopinu dodano je još 6 kapi razrijeđene otopine bakrovog(II)sulfata ($CuSO_4$). Nakon dodatka otopine bakrovog(II)sulfata sadržaj epruvete je ponovno promućkan nakon čega je došlo do obojenja otopine.

Za istraživanje su korištenje sve potpuno jednake epruvete da bi visina stupca otopine u epruveti bila jednaka i da promjer stupca otopine u epruveti ne bi utjecao na rezultate mjerenja.

Priprema eksperimentalnih skupina

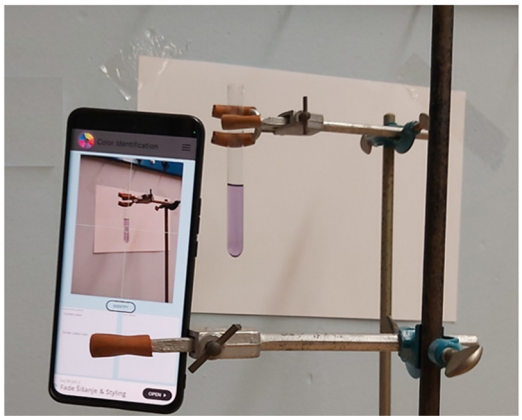
Eksperimentalna skupina pripremljena je od otopine kolagena masene koncentracije 30 g L^{-1}. Otopina te masene koncentracije odabrana je zato što je to bila prosječna koncentracija svih otopina uzoraka koji su služili za izradu kalibracijske krivulje. Zatim je po 6 mL svakog uzorka raspoređeno u 5 epruveta i u njih je dodano 6 mL 10 %-tne otopine NaOH i 6 kapi razrijeđene otopine $CuSO_4$.

Kao izvor UV-zračenja korištena je UV/LED lampa marke SUNmini, koja emitira svjetlost valne duljine između 100 i 400 nm i snage 6 W. Lampa sadrži 6 LED dioda koje omogućuju ravnomjerno izlaganje uzoraka UV-zračenju. Za svaki uzorak je po 30 mL otopine uliveno u Petrijevu zdjelicu i izlagano je UV-zračenju u trajanju od 5, 10, 15, 20 i 25 minuta. Nakon izlaganja, uzorci su pipetiranjem vraćeni u epruvete radi daljnje analize.

Kvantitativna analiza boje uzoraka

Intenzitet crvene, plave i zelene boje u svim uzorcima, kontrolnim i eksperimentalnim, mjerena je pomoću mobilne aplikacije Color Identification, koja registrira RGB vrijednosti (Red-Green-Blue) i omogućuje kvantitativno praćenje promjena u boji pri različitim koncentracijama kolagena kao i nakon izlaganja UV-svjetlosti.

Mjerenja su provedena mobilnim uređajem Honor Magic 6 Lite, učvršćenim na stativ na udaljenosti od 30 cm od uzorka (slika 4). Svaka epruveta fotografirana je ispred bijele pozadine, pri jednakom osvjetljenju i pod istim kutom snimanja, čime su osigurani ujednačeni uvjeti mjerenja.



Slika 4 Postupak mjerenja RGB vrijednosti otopina kolagena pomoću mobilne aplikacije
Autor: Celić M., 2025.

Budući da RGB sustav daje tri odvojene numeričke vrijednosti (R, G i B), za lakšu interpretaciju i usporedbu rezultata korištena je formula lume (*Y'*), koja predstavlja ukupnu svjetlinu slike. Luma odgovara aproksimaciji luminancije (*Y*), odnosno percipirane svjetline dobivene iz RGB vrijednosti prema standardnoj formuli (Telestream, 2017):

$$Y' = 0{,}299 \cdot R + 0{,}587 \cdot G + 0{,}114 \cdot B$$

Luma vrijednosti dobivene mjerenjem eksperimentalnih uzoraka uspoređene su s otopinama kolagena poznatih masenih koncentracija kako bi se utvrdila promjena u dostupnosti peptidnih veza nakon izlaganja uzoraka različitom trajanju UV-zračenja. Na temelju toga, procijenjen je stupanj promjene u strukturi proteina nakon izlaganja UV-zračenju.

Statistička obrada podataka

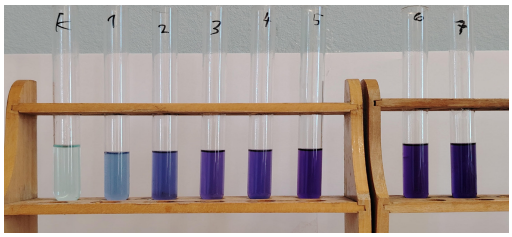
Podaci su obrađeni pomoću programa Microsoft Excel. Za svaku skupinu uzoraka izračunate su aritmetičke sredine dobivenih luma vrijednosti.

Kalibracijska krivulja izrađena je na temelju otopina kolagena poznatih masenih koncentracija te prikazuje ovisnost prosječne luma vrijednosti (Y') o masenoj koncentraciji kolagena.

Jednofaktorska ANOVA provedena je u Excelu za ispitivanje razlika između uzoraka izloženih različitim vremenima UV-zračenja.

REZULTATI

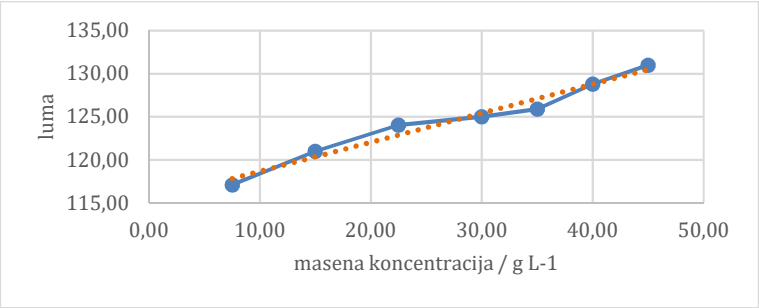
Nakon pripreme otopina poznatih masenih koncentracija kolagena i provođenja biuret-reakcije uočeno je različito obojenje svake pojedine otopine. Sve otopine osim kontrolnog uzorka (zadnja epruveta na slici 5 - plava otopina) bile su obojene u nijansama ljubičaste boje (slika 5).



Slika 5 Obojenost otopina poznatih masenih koncentracija kolagena nakon provođenja biuret-reakcije (s lijeva na desno kontrola, 7,5 g L^{-1}, 15 g L^{-1}, 22,5 g L^{-1}, 30 g L^{-1}, 35 g L^{-1}, 40 g L^{-1}, 45 g L^{-1})
Autor: Celić M., 2025.

Pripremljenim otopinama kolagena poznatih masenih koncentracija izmjerena je vrijednost intenziteta crvene (R), zelene (G) i plave (B) boje. Mjerenje je provedeno na 5 istovjetnih uzoraka (uzorci iste masene koncentracije) i ponovljeno je 5 puta. Tako je za svaki uzorak poznate masene koncentracije dobiveno ukupno po 25 vrijednosti jačine za svaku boju. Iz dobivenih vrijednosti najprije je izračunata prosječna vrijednosti svake pojedine boje, a zatim vrijednost lume za svaku izmjerenu otopinu. Konačno je izmjerena i prosječna vrijednost lume za svih 5 uzoraka iste masene koncentracije otopine kolagena. Na temelju dobivenih vrijednosti lume i masene koncentracije otopine kolagena u programu Excel izrađena je krivulja ovisnosti. Slika 5 prikazuje ovisnost vrijednosti lume o masenoj koncentraciji otopine kolagena.

Iz grafa na slici 6 može se vidjeti proporcionalna ovisnost lume o masenoj koncentraciji otopine kolagena. Što je koncentracija kolagena veća u otopini se nalazi više peptidnih veza koje reagiraju s biuretom i daju veći intenzitet obojenosti otopine. Što je jača obojenost otopine kolagena, veći je iznos lume.

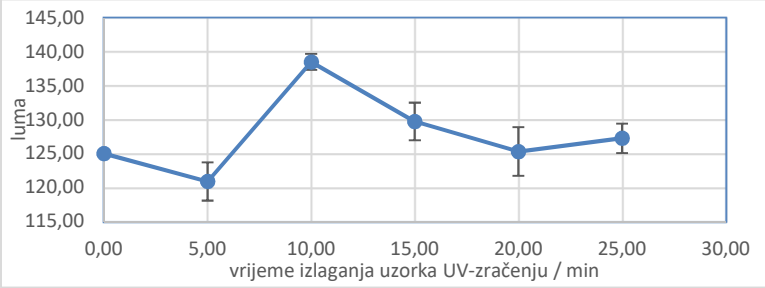


Slika 6 Ovisnosti izmjerene vrijednosti lume o masenoj koncentraciji otopine kolagena

Na slici 6 crvenom istočkanom linijom prikazana je linija trenda (linearna) ovisnosti lume o masenoj koncentraciji otopine kolagena i dostupnosti peptidnih veza u proteinskim lancima zbog koje se također mijenja intenzitet obojenja otopine kolagena, pa se zbog toga te dvije vrijednosti mogu se povezati.

Za ispitivanje utjecaja UV-zračenja na dostupnost peptidnih veza u kolagenu korištena je otopina masene koncentracije 30 g L^{-1}. Otopina kolagena izložena je različitom vremenu UV-zračenja. Svaka otopina raspodijeljena je u 5 epruveta i mjerena je RGB vrijednost. Svako mjerenje ponovljeno je 5 puta kao u slučaju otopina kolagena poznatih masenih koncentracija.

Izračunata je prosječna vrijednost lume za svaki uzorak, a ovisnost prosječne vrijednosti lume o trajanju izloženosti UV-zračenju prikazan je grafom (slika 7).



Slika 7 Ovisnost vrijednosti lume o vremenu izlaganja otopine UV-zračenju

Budući da masena koncentracija kolagena u eksperimentalnoj skupini nije bila mijenjana tijekom pokusa, promjene u vrijednosti lume tumače se kao posljedica promjena u strukturi polipeptidnih lanaca kolagena uzrokovanih UV-zračenjem. Ta promjena strukture očituje se u dostupnosti peptidnih veza na koje se mogao vezati bakrov(II) ion i stvarati biuret kompleks. Na slici 6 prikazana je ovisnost vrijednosti lume, kao pokazatelja intenziteta obojenosti nakon biuret reakcije, o vremenu izlaganja otopine kolagena UV-zračenju.

U otopini koja je bila najkraće izložena UV-zračenju zabilježeno je smanjenje vrijednosti lume u odnosu na početno stanje. Kod uzoraka izloženih UV-zračenju između 5 i 10 minuta zabilježen je porast vrijednosti lume. Pri daljnjem produljenju vremena izlaganja UV-zračenju vrijednost lume ponovno se smanjuje, ali manjim intenzitetom. Za vrijeme izlaganja duljem od 20 minuta ne uočavaju se značajne promjene vrijednosti lume.

Jednofaktorska ANOVA provedena na eksperimentalnim uzorcima nije pokazala statistički značajne razlike u srednjim vrijednostima lume između uzoraka izloženih različitim vremenima UV-zračenja ($p = 0,696$). Na grafu se vidi promjena, ali mjerenja u ponavljanjima nisu bila dovoljno ujednačena. Zbog toga test ne može sa sigurnošću reći da su razlike stvarne, a ne posljedica mjerenja.

RASPRAVA

Ovim istraživačkim radom ispitan je izravan utjecaj UV-zračenja na strukturu polipeptidnih lanaca kolagena s naglaskom na promjene u dostupnosti peptidnih veza. Iako se u fiziološkim uvjetima kolagen u koži ne nalazi izravno izložen UV-zračenju, već je smješten u dermisu, ovakav pojednostavljeni model omogućio je izolirano proučavanje samog proteina, neovisno o enzimskim i staničnim procesima. Time su ostvareni cilj i svrha rada navedeni u uvodu, gdje je istaknuta ključna

uloga kolagena u procesu starenja kože te važnost UV-zračenja kao glavnog vanjskog čimbenika fotostarenja.

Rezultati dobiveni biuret-reakcijom i analizom boje putem RGB vrijednosti pokazali su da intenzitet ljubičastog obojenja ovisi o masenoj koncentraciji otopine kolagena, što potvrđuje ispravnost korištenja ove metode za ispitivanje dostupnosti peptidnih veza u proteinskim lancima kolagena. Time je osigurana pouzdana osnova za usporedbu vrijednosti lume za uzorke poznate masene koncentracije kolagena i eksperimentalnih uzoraka, čime se ostvaruje metodološka povezanost između dijela „Materijali i metode“ i „Rezultata“.

U skladu s postavljenim hipotezama, rezultati su pokazali da izlaganje UV-zračenju može dovesti do promjena u dostupnosti peptidnih veza u kolagenu. U prvih 5 minuta izlaganja otopine UV-zračenju uočen je pad intenziteta obojenja u odnosu na kontrolni uzorak, što upućuje na početne strukturne promjene kolagena. Ovaj nalaz podudara se s navodima iz literature da UV-zračenje, osobito UVA, potiče stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva koji mogu uzrokovati oksidaciju aminokiselina i destabilizaciju proteinskih struktura (Kammeyer i Luiten, 2015). Time se potvrđuje da čak i relativno kratko izlaganje može imati mjerljiv učinak na strukturu proteina. U otopini koja je bila najkraće izložena UV-zračenju došlo je do smanjenja dostupnosti peptidnih veza u lancima kolagena zbog čega se obojenje otopine smanjilo i mjerene vrijednosti RGB dale si niže vrijednosti lume.

U otopini koja je bila izložena UV-zračenju više od 5, a manje od 10 min uočena je povećana dostupnosti peptidnih veza što se očitovalo višim RGB vrijednosti i većim luma vrijednostima.

Izloženost otopine kolagena UV-zračenju dulje od 10 minuta dovodi do smanjenja luma vrijednosti, što upućuje na manji intenzitet obojenosti nakon biuret-reakcije i smanjenu dostupnost peptidnih veza u lancima kolagena.

Daljnje produženje izlaganja na više od 15 minuta nije dovelo do značajnih promjena luma vrijednosti, što upućuje na minimalne ili izostale daljnje promjene u dostupnosti peptidnih veza.

Prva hipoteza nije u potpunosti potvrđena jer se intenzitet obojenosti otopine smanjuje u slučaju kratkotrajnih izlaganja otopine kolagena UV-zračenju (< 5 minuta) i dugih izlaganja otopine kolagena UV-zračenju (> 10 minuta). Otopini koja je bila izložena UV-zračenju dužem od 5 minuta povećao se intenzitet obojenosti nakon provedene biuret-reakcije.

Rezultat dobiven nakon 10 minuta izlaganja UV-zračenju, pri kojem je zabilježeno povećanje intenziteta obojenja nije u skladu s hipotezom o postupnom smanjenju dostupnosti peptidnih veza, ali se može objasniti djelomičnom denaturacijom kolagena. UV-zračenje moglo je uzrokovati djelomično razmicanje polipeptidnih lanaca i izlaganje peptidnih veza koje su u početnom stanju bile manje dostupne bakrovim(II) ionima. Slični učinci opisani su u istraživanjima proteina gdje blaga denaturacija dovodi do povećane kemijske reaktivnosti bez potpune razgradnje molekule (Ricard- Blum, 2011). Ovi rezultati upućuju da UV-zračenje ne djeluje isključivo destruktivno, već može uzrokovati i privremene strukturne promjene.

Kod duljih vremena izlaganja (15, 20 i 25 minuta) rezultati su pokazali postupno smanjenje intenziteta obojenja, što je u skladu s trećom hipotezom o kumulativnom smanjenju dostupnosti peptidnih veza. Ovi rezultati podupiru nalaze Fishera i sur. (1997), koji navode da dugotrajno UV-zračenje dovodi do razgradnje kolagena i smanjene sinteze novih kolagenskih vlakana u koži. Iako u ovom istraživanju nisu

bili prisutni enzimi matriksnih metaloproteinaza, rezultati upućuju na to da UV-zračenje može imati i izravan negativan učinak na strukturu proteina.

Kod izlaganja otopine kolagena vremenskim intervalima dužim od 15 minuta nije došlo do velikih dodatnih promjena u izmjerenim vrijednostima. Ovaj efekt zasićenja može značiti da je većina UV-osjetljivih peptidnih veza već zahvaćena promjenama ili da daljnje promjene nisu dovoljno velike da bi ih korištena metoda detektirala. To upućuje na ograničenja biuret-reakcije i RGB analize boje, ali i na stabilnost određenog dijela kolagenske strukture.

Druga hipoteza, prema kojoj kraće izlaganje UV-zračenju neće značajno utjecati na promjenu boje otopine, nije potvrđena. Najveća promjena obojenosti zabilježena je nakon 10 minuta izlaganja UV-zračenju. Ovaj rezultat upućuje na osjetljivost kolagena, čak i u hidroliziranom obliku, na UV-zračenje. Ovakav rezultat može se povezati s činjenicom da hidrolizirani kolagen sadrži kraće polipeptidne lance koji su strukturno manje stabilni od nativne trostruke zavojnice kolagena u koži (Shoulders i Raines, 2009), što ih čini podložnijima oštećenju. Izlaganje lanaca kolagena UV-zračenju u trajanju od 10 minuta uzrokuje najveće strukturne promjene polipeptidnih lanaca koje rezultiraju većom dostupnosti peptidnih veza i posljedično većim intenzitetom obojenja otopine nakon biuret-reakcije.

Dobiveni rezultati važni su u kontekstu umjetnih izvora UV-zračenja, poput UV-lampi za nokte koje su korištene u ovom istraživanju. Istraživanja Zhivaguija i sur. (2023) pokazala su da takve lampe mogu uzrokovati oksidativna oštećenja i mutacije u stanicama, što dodatno potvrđuje opravdanost korištenja ovog izvora UV-zračenja kao modela stvarne izloženosti ljudi. Ovi nalazi nadovezuju se na uvodni dio rada koji ističe rizike svakodnevnih, često zanemarenih izvora UV-zračenja.

ANOVA test nije pokazao statistički značajne razlike u srednjim vrijednostima lume između uzoraka izloženih različitim vremenima UV-zračenja ($p = 0,696$) što se može objasniti velikom varijabilnošću u dobivenim podatcima. Ta varijabilnost vjerojatno je posljedica ograničene preciznosti korištene metode. RGB vrijednosti izmjerene mobilnom aplikacijom nisu bile potpuno jednake pri svakom mjerenju, no upravo je zato provedeno ukupno 25 mjerenja za svaki uzorak kako bi se smanjila pogreška mjerenja. Za veću točnost bilo bi potrebno koristiti precizniju metodu, poput spektrofotometrije, koja nije bila dostupna u školskim laboratorijskim uvjetima.

Unatoč ograničenjima, poput korištenja hidroliziranog kolagena, nedostatka spektrofotometra i pojednostavljenih uvjeta, ovo istraživanje pokazuje da je moguće u školskim laboratorijskim uvjetima eksperimentalno prikazati utjecaj UV-zračenja na proteinsku strukturu i dostupnost peptidnih veza. Rezultati podupiru temeljnu ideju rada da UV-zračenje ima važnu ulogu u procesima fotostarenja, a ujedno otvaraju mogućnosti za buduća istraživanja, primjerice usporedbu UVA- i UVB-zračenja, primjenu antioksidansa ili korištenje drugih analitičkih metoda.

ZAKLJUČCI

- Izlaganje otopine kolagena UV-zračenju dovodi do promjena u dostupnosti peptidnih veza unutar proteinskih lanaca.
- Intenzitet ljubičastog obojenja otopine kolagena smanjivat će se pri vrlo kratkom izlaganju otopine UV-zračenju (< 5 minuta) i izlaganju dužem od 10 minuta.
- Izlaganje otopine kolagena u intervalu od 5 do 10 minuta uzrokuje najveću razliku u intenzitetu obojenja otopine kolagena, no za razliku od ostalih intervala intenzitet obojenja otopine

kolagena raste što možemo objasniti povećanjem dostupnosti peptidnih veza uzrokovanih razmicanjem polipeptidnih lanaca

- Dulje izlaganje otopine kolagena UV-zračenju (15–25 minuta) dovodi do slabljenja ljubičastog obojenja, što upućuje na kumulativne promjene u dostupnosti peptidnih veza.

LITERATURA

Adnan M. 2023. Study on determination of muscle protein by Biuret method and preparation of standard curve. Marine Fisheries Journal of Marine Fisheries Technology and Management 4: 4.

Bar M., Valiukevičienė S. 2025. Skin aging and type I collagen: A systematic review of interventions with potential collagen-related effects. Cosmetics 12(4): 129.

Diffey B. L. 2002. Sources and measurement of ultraviolet radiation. Methods 28(1): 4–13.

Fisher G. J., Wang Z. Q., Datta S. C., Varani J., Kang S., Voorhees J. J. 1997. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. The New England Journal of Medicine 337(20): 1419–1428.

Guo J., Huang X., Dou L., Yan M., Shen T., Tang W., Li J. 2022. Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments. Signal Transduction and Targeted Therapy 7: 391.

Holick M. F. 2004. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. The American Journal of Clinical Nutrition 80(6): 1678S–1688S.

International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP). 2004. Guidelines on limits of exposure to ultraviolet radiation of wavelengths between 180 nm and 400 nm (incoherent optical radiation). Health Physics 87(2): 171–186.

International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP). 2010. ICNIRP statement on ultraviolet radiation exposure from sunbeds. Health Physics 99(4): 666–684.

Kammeyer A., Luiten R. M. 2015. Oxidation events and skin aging. Ageing Research Reviews 21: 16–29.

Lee S., Kim J., Park H. 2021. Skin aging is a complex process influenced by intrinsic and extrinsic factors. International Journal of Molecular Sciences 22(22): 12489.

Ricard-Blum S. 2011. The collagen family. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 3(1): a004978.

Shoulders M. D., Raines R. T. 2009. Collagen structure and stability. Annual Review of Biochemistry 78: 929–958.

Sikirica M. 2018. Zbirka kemijskih pokusa za osnovnu i srednju školu, Školska knjiga, Zagreb, 2. izdanje, str. 673–674.

Telestream. 2017. Different Color Spaces – or How Levels Go Wrong, https://www.telestream.net/pdfs/whitepapers/wp-Different-Color-Spaces-QC.pdf, pristupljeno 17.11.2025.

Vierkötter A., Krutmann J. 2012. Environmental influences on skin aging and ethnic variations. Dermato-Endocrinology 4(3): 227–231.

Zhivagui M., Hoda A., Valenzuela N., Yeh Y.-Y., Dai J., He Y., Nandi S. P., Otlu B., Van Houten B., Alexandrov L. B. 2023. DNA damage and somatic mutations in mammalian cells after irradiation with a UV-nail polish dryer. Nature Communications 14(1): 276.

Analiza fizikalno-kemijskih svojstava i mikrobiološkog sastava vode na otoku Visu

Ava Grace Mandić Macneill, 3.razred
Petar Vojković, 3. razred

Srednja škola Antun Matijašević Karamaneo, Vis
Mentor: *Josipa Poduje*

SAŽETAK
Voda je primarna i nezamjenjiva komponenta svih živih sustava i ubraja se među najvažnije prirodne resurse na Zemlji. Dostupnost i kakvoća vode imaju ključnu ulogu u očuvanju zdravlja ljudi i stabilnosti okoliša. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi fizikalno- kemijska svojstva i mikrobiološki sastav vode iz različitih izvora, bunara i javnih zahvata na području otoka Visa. Tijekom istraživanja izvršena su uzorkovanje vode sa pet odabranih lokacija: izvora, bunara i javnih na otoku Visu, primijenjene su laboratorijske analize i izmjereni su koncentracija otopljenog kisika i ugljikova (IV) oksida, ukupna tvrdoća, pH vrijednost, koncentracije fosfata i ostala relevantna fizikalno-kemijska svojstva. Pearsonovim koeficijentom korelacije uspoređeni su fizikalno-kemijski parametri. U istraživanju je i analizirana mikrobiološka ispravnost vode prema važećim standardima, uspoređeni su rezultati između različitih tipova izvora i analizirani mogući rizici za zdravlje. Rezultati su pokazali da analizirani uzorci vode s područja otoka Visa imaju karakteristike tvrde vode, s koncentracijama kalcijevih (Ca^{2+}) i magnezijevih (Mg^{2+}) iona iznad 150 mg/L $CaCO_3$. U uzorcima vode iz skladišnih bunara i izvora u neposrednoj blizini poljoprivrednih površina i naselja nije utvrđena prisutnost fosfata. U uzorcima vode iz plitkih bunara i izvora u urbaniziranim područjima detektirana je prisutnost koliformnih bakterija. Prisustvo *E. coli* je utvrđeno na lokacijama Dragovode (DR) i Austrijski bunar (AB). Rezultati su također pokazali da ne dolazi do prodora morske vode u bunare i izvore. Glavni zaključak istraživanja je da je stanje vode na otoku Visu je stabilno, ali pojedini lokaliteti zahtijevaju pojačan nadzor i sanitarne mjere radi zaštite zdravlja stanovništva.

Ključne riječi: *kakvoća vode; otok Vis; antropogeni utjecaj*

UVOD

Voda je primarna i nezamjenjiva komponenta svih živih sustava i ubraja se među najvažnije prirodne resurse na Zemlji jer omogućuje odvijanje osnovnih bioloških procesa, održavanje ekosustava te razvoj ljudskih zajednica. Dostupnost i kakvoća vode imaju ključnu ulogu u očuvanju zdravlja ljudi i stabilnosti okoliša. Otok Vis smješten je u središnjem dijelu Jadranskoga mora te predstavlja najudaljeniji naseljeni otok u Republici Hrvatskoj. Površina otoka iznosi približno 90 km², a najviši vrh Hum doseže 587 m nadmorske visine. Područje obilježava mediteranska klima s izraženim sušnim ljetima, što dodatno povećava važnost lokalnih vodnih resursa. Geološka građa otoka Visa izrazito je složena te se sastoji od karbonatnih stijena (vapnenaca i dolomita) te vulkanskih stijena, ponajprije andezita i tufova (Kapelj i sur., 2002). Krš nije statičan reljef, već rezultat neprekidne kemijske reakcije između stijene, vode i plinova (kisika i ugljikova (IV) oksida). Osnovne stijene Viškog arhipelaga — vapnenac i dolomit — gotovo su netopive u čistoj vodi. Da bi proces otapanja započeo, vodi je potreban "pogon", a to je ugljikov(IV)oksid. Na otoku Visu hidrogeologija je "bitka" između slatke vode i mora prema Ghyben-Herzbergovom principu slatka voda je lakša i pliva na slanoj u obliku leće. Za svaki 1 metar slatke vode iznad razine mora, ispod razine mora nalazi se oko 40 metara slatke vode. U znanstvenim istraživanjima utvrđeno je da upravo prisutnost nepropusnih vulkanskih stijena predstavlja hidrogeološku barijeru koja omogućuje zadržavanje oborinskih voda unutar propusnih karbonatnih slojeva, a istovremeno čuvaju slatku vodu od miješanja s morem (Surić i Velić, 2004). Kao posljedica takvih geoloških odnosa dolazi do akumulacije slatke vode i pojave prirodnih izvora, osobito na području Komiške uvale (Surić i Velić, 2004). Kemijski sastav podzemnih voda na otoku Visu uvjetovan je litološkim sastavom stijena kroz koje voda prolazi. Istraživanjima je utvrđeno da u vodi dominiraju

kalcijevi i bikarbonatni ioni, što je karakteristično za krške akvifere razvijene u vapnencima (Patekar i sur., 2024). Takav sastav uzrokuje povećanu tvrdoću vode, koja nastaje kao posljedica otapanja karbonatnih stijena tijekom infiltracije oborinskih voda (Patekar i sur., 2024). Mjerenja fizikalno-kemijskih parametara izuzetno su važna za cjelovitost istraživanja jer predstavljaju važan čimbenik u procjeni kakvoće pitke vode te analiza svakog od 10 parametara koje mjerimo daje uvid u kemizam vode krškog kraja te specifičnost podzemnih izvora na izoliranim otocima. Na otoku Visu ne postoji povezanost s kopnenim vodoopskrbnim sustavima, zbog čega se cjelokupna opskrba vodom temelji isključivo na lokalnim podzemnim izvorima (Surić i Velić, 2004). Takva hidrološka izoliranost čini vodne resurse otoka posebno osjetljivima na promjene u količini oborina, povećano crpljenje vode te druge antropogene utjecaje (Terzić i sur., 2022). Istraživanja su pokazala da se tijekom ljetnih mjeseci, zbog intenzivnog razvoja turizma, znatno povećava potrošnja vode, što može predstavljati dodatni pritisak na ograničene vodne resurse otoka (Patekar i sur., 2024). Povećani broj turista, izgradnja bazena i veće potrebe za vodom mogu utjecati na kemijski i mikrobiološki sastav pitke vode, osobito u razdobljima smanjene količine oborina. Mikrobiologija voda istražuje mikroorganizme i njihova djelovanja u vodama kao što su jezera, bazeni, rijeke, morski rukavi, mora i oceani. Velik broj bakterija se nalazi u vodi koja je kontaminirana otpadnim vodama ili industrijskim biorazgradivim organskim produktima. U kontaminiranoj vodi najviše se nalaze koliformne bakterije, koje ulaze u skupinu gram negativnih nesporogenih štapića, podrijetlom iz probavnog sustava čovjeka, a to su: *Escherichia coli (E. coli*) i iz roda *Enterobacter*. Koliformi su mikroorganizmi koji se nalaze u probavnom sustavu ljudi i životinja, a koji služe kao indikatori fekalne kontaminacije. Njihova nazočnost u pitkim vodama je u brojevima koji prelaze dopuštenu razinu i time signalizira kontaminaciju fekalnog podrijetla (Duraković i sur.,2002.). Prema važećim standardima tj. prema Pravilniku o parametrima sukladnosti, metodama analiza i monitorinzima vode namijenjene za ljudsku potrošnju Ministarstva zdravstva NN 64/2023 *Escherichia coli* (*E. coli*) i koliformne bakterije ne smiju se nalaziti u vodi namijenjenoj ljudskoj potrošnji.

Svrha i motivacija za provođenje ovog istraživanja je bila osigurati pouzdane podatke o kvaliteti vode na otoku Visu radi zaštite zdravlja lokalnog stanovništva i posjetitelja, podizanja svijesti o važnosti redovite kontrole vode u izoliranim otočnim sustavima te važnosti očuvanja vodnih resursa i održivog upravljanja u uvjetima povećanog antropogenog opterećenja.

Cilj istraživanja je utvrditi fizikalno – kemijska svojstva i mikrobiološki sastav vode iz različitih izvora, bunara i javnih zahvata na području otoka Visa. Specifični ciljevi su: izvršiti terensko uzorkovanje vode iz odabranih izvora i bunara i javnih na otoku Visu, primijeniti laboratorijske analize, izmjeriti ključne parametre kvalitete vode, uključujući: koncentraciju otopljenog kisika i ugljikova (IV) oksida, ukupnu tvrdoću (koncentracije kalcijevih i magnezijevih iona), pH vrijednost, koncentracije fosfata i ostala relevantna fizikalno-kemijska svojstva, utvrditi mikrobiološku ispravnost vode prema važećim standardima te usporediti rezultate između različitih tipova izvora i analizirati moguće rizike za zdravlje.

U skladu s postavljenim ciljevima planiranim istraživanjem testirana je točnost slijedećih hipoteza:

H1: Analizirani uzorci vode s područja otoka Visa pokazati će karakteristike tvrde vode, s koncentracijama kalcijevih (Ca^{2+}) i magnezijevih (Mg^{2+}) iona iznad 150 mg/L $CaCO_3$.

H2: U uzorcima vode iz skladišnih bunara i izvora u neposrednoj blizini poljoprivrednih površina i naselja utvrditi će se prisutnost fosfata i niža koncentracija otopljenog kisika kao dokaz zagađenja.

H3: U uzorcima vode iz plitkih bunara i izvora u urbaniziranim područjima detektirati će se prisutnost koliformnih bakterija.

Rezultati istraživačkog projekta biti će prezentirani učenicima škole i lokalnoj zajednici sa ciljem očuvanja i održivog upravljanja vodnim resursima na otoku.

METODE RADA

Istraživanje je provedeno od 5. listopada 2025. do 17. siječnja 2026. u nekoliko koraka: izbor područja istraživanja, terenski rad, rad u školskom laboratoriju i analiza podataka.

Rad na terenu - Izbor područja istraživanja

Područje istraživanja bile su lokacije na otoku Visu. Istraživanje je provedeno na 5 lokaliteta u suradnji sa Geoparkom Viški arhipelag. Tijekom obilaska područja istraživanja zabilježen je položaj izabranih lokaliteta pomoću GPSMAP 66 prijemnika, a položaj točaka je provjeren na Google Earthu. Izrađena je karta sa lokalitetima (slika 1) i u tablicu 1 unesene vrijednosti geografskih koordinata.

Slika 1 Karta sa lokalitetima: Austrijski bunar (AB), Korita (KO), Dragovode (DR), Kamenice izvor 1 (K1) i Kamenice izvor 2 (K2)

Tablica 1 Geografski položaj istraživanih lokaliteta

Naziv lokacije	Oznaka lokacije	Geografske koordinate lokacije
Austrijski bunar	AB	43°03'36"N 16°10'32"E
Korita	KO	43°03'12"N 16°08'32"E
Dragovode	DR	43°02'21"N 16°05'44"E
Kamenice1	K1	43°02'17"N 16°05'32"E
Kamenice2	K2	43°02'19"N 16°05'28"E

Sakupljanje uzoraka vode na odabranim lokacijama i mjerenje sa kombiniranim ispitivačem HI98129

Sakupljanje uzoraka na terenu je provedeno četiri puta na 5 lokaliteta. Na terenu su sakupljeni uzorci vode u sterilne plastične čašice sa poklopcem. Sa svakog lokaliteta sakupljena su po 3 uzorka vode, uzorci su označeni, a oznake uzoraka upisane u terenski dnevnik. Pomoću mobilnog uređaja Apple iPhone 11 napravljene su fotografije uzorkovanja.

U plastičnu posudicu sa 10 mL uzorka vode uronjen je kombinirani ispitivač HI98129 i očitane su vrijednosti temperature, pH, električne vodljivosti i TDS-a (slika 2).

Slika 2 Mjerenje sa sondom Combo pH/EC (Foto: P.V.)
Autor: Vojković P., 2025.

Rad u školskom laboratoriju

Fizikalno-kemijska analiza uzorka vode provedena je u školskom laboratoriju korištenjem laboratorijskog ruksaka za ispitivanje kvalitete vode Backpack Lab HI3817BP koji sadrži ispitne setove za određivanje zajedničkih parametara u ispitivanju kakvoće vode: kiselost, lužnatost, tvrdoća vode, koncentracija otopljenog kisika, ugljikovog dioksida, nitrata i fosfata. Kombinirani ispitivač HI98129 također je uključen za mjerenje pH, vodljivosti (EC) i ukupne otopljene krute tvari (TDS).

Određivanje fenolnog alkaliteta

U plastičnu posudicu s 5 mL uzorka vode dodana je jedna kap fenolftaleina (indikatora). Promatrana je promjena boje – ako je uzorak ostao proziran, to je bio znak da u vodi nisu prisutni karbonati i hidroksidi, a ako se uzorak obojio u rozo/crveno, to je bio znak da su u vodi prisutni karbonati/hidroksidi – u tom slučaju je bilo potrebno titrirati uzorak s HCl, kap po kap, do nestanka boje (pH ≈ 8,3). Zabilježen je volumen potrošene HCl, vrijednost je pomnožena s faktorom (×300) i dobiven fenolftaleinski alkalinitet u mg/L $CaCO_3$.

Određivanje ukupnog alkaliteta

U plastičnu posudicu s 5 mL uzorka vode dodana je jedna kap indikatora bromfenol plavog. Promatrana je promjena boje uzorka. Ako se uzorak obojao u zeleno ili plavo, provedena je titracija dodavanjem HCl kap po kap uz lagano miješanje. Titracija je nastavljena sve dok boja uzorka nije prešla u žutu, pri čemu je postignuta krajnja točka reakcije (pH ≈ 4,5). Nakon završetka titracije očitan je volumen utrošenog titranta te je pomnožen s faktorom 300 kako bi se odredio ukupni alkalitet izražen u mg/L $CaCO_3$.

Određivanje otopljenog ugljikova dioksida

U plastičnu posudicu dodano je 5 mL uzorka vode te jedna kap fenolftaleinskog indikatora. Uzorak je titriran dodavanjem natrijeva hidroksida kap po kap uz lagano miješanje. Titracija je završena u trenutku kada je uzorak poprimio trajnu ružičastu boju (slika 3). Nakon toga očitan je volumen utrošenog NaOH, a dobivena vrijednost pomnožena je s faktorom 100 kako bi se odredila koncentracija otopljenog ugljikova dioksida u mg/L CO_2.

Slika 3 Određivanje ugljikova dioksida metodom titracije sa NaOH
Autor: Vojković P., 2025.

Određivanje fosfata metodom kolorimetrije

U posudicu s 10 mL uzorka vode dodana je jedna vrećica fosfatnog reagensa. Posudica je zatvorena i sadržaj je miješan sve dok se reagens u potpunosti nije otopio. Dobivena otopina je zatim premještena

u kolor-komparator te ostavljena da stoji jednu minutu kako bi se boja razvila. Nakon isteka vremena boja uzorka uspoređena je s ljestvicom na kolor-komparatoru, a koncentracija fosfata očitana je i zabilježena u mg/L PO_4^{3-}.

Određivanje tvrdoće vode

U plastičnu posudicu s 5 mL uzorka vode dodano je pet kapi pufer otopine za određivanje tvrdoće te jedna do dvije kapi Calmagite indikatora. Otopina je poprimila vino-crvenu boju. Provedena je titracija dodavanjem EDTA otopine kap po kap uz stalno miješanje. Titracija je završena kada je boja uzorka prešla iz vino-crvene u čistu plavu boju (slika 4). Očitan je volumen utrošene EDTA otopine te je pomnožen s faktorom 300 kako bi se izračunala tvrdoća vode izražena u mg/L $CaCO_3$.

Slika 4 Određivanje tvrdoće vode
Autor: Vojković P., 2025.

Određivanje koncentracije otopljenog kisika Winkler jodometrijskom titracijom

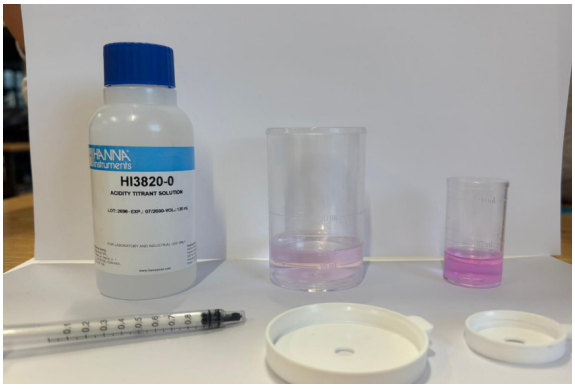
Staklena boca je napunjena uzorkom vode do vrha te su dodani 5 kapi manganovog sulfata i 5 kapi alkalnog azidnog reagensa. Boca je zatvorena i nježno miješana dok se nije stvorio talog. Nakon toga dodano je 10 kapi sumporne kiseline te je sadržaj ponovno promiješan. 5 mL smjese prebačeno je u plastičnu posudicu, u koju je dodana jedna kap škrobnog indikatora, pri čemu je uzorak poprimio plavu boju. Provedena je titracija dodavanjem natrijeva tiosulfata kap po kap uz miješanje. Titracija je završena kada je plava boja prešla u blijedo žutu (slika 5). Očitan je volumen utrošenog titranta te je pomnožen s faktorom 10 kako bi se odredila koncentracija topljivog kisika u mg/L O_2.

Slika 5 Winkler jodometrijska titracija
Autor: Vojković P., 2025.

Određivanje metil-orange i ukupne kiselosti

U posudicu s 5 mL uzorka vode dodana je 1 kap deklorirajućega reagens i 1 kap bromfenol plavi indikatora. Ako je uzorak bio zelene ili plave boje, zaključeno je da metil-orange kiselost nije prisutna. Ako je uzorak bio žute boje, provedena je titracija natrijevim hidroksidom do promjene boje u

zelenkastu. Očitan je volumen titranta te je pomnožen s faktorom 500. Za određivanje ukupne kiselosti dodana je 1 kap fenolftaleinskog indikatora, a titracija je provedena do pojave ružičaste boje (slika 6). Nakon završetka postupka očitan je volumen utrošenog titranta i pomnožen s faktorom 500, čime je dobivena ukupna kiselost izražena u mg/L $CaCO_3$.

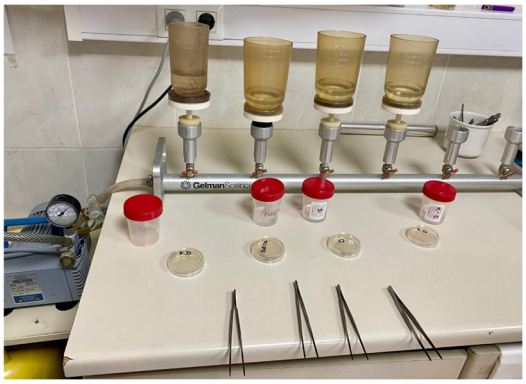


Slika 6 Određivanje metil-orange i ukupne kiselosti
Autor: Vojković P., 2025.

Mikrobiološka analiza uzoraka vode metodom membranske filtracije

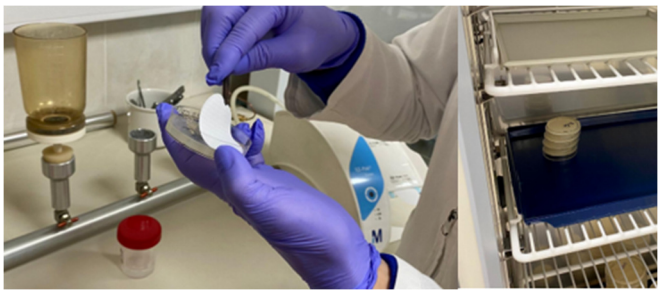
Uzorci vode na terenu su sakupljeni u sterilizirane plastične posudice. Uzorci su transportirani u rashlađenom spremniku (4 °C). Analiza je provedena u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo u Splitu na Odsjeku za mikrobiološku analizu voda metodom membranske filtracije. Membranska filtracija se pokazala kao najbolja metoda za mikrobiološku analizu voda jer je jednostavna, praktična, ekonomična, ponovljiva i omogućava kvantitativno određivanje mikroorganizama. Temelji se na koncentraciji mikroorganizama iz većeg uzorka na površini membranskog filtera, te nacjepljivanje ovih mikroorganizama na hranjivu podlogu. Na površini membranskog filtera se razvijaju kolonije koje se tijekom inkubacije broje i preračunavaju s obzirom na volumen uzorka. Optimalnim rezultatom smatra se rast od 20 do 60 bakterija na filteru, a ako je broj izraslih bakterija veći, uzorak je potrebno razrijediti i postupak ponoviti (Duraković i Duraković, 1997).

Boca s uzorkom vode dobro je protresena kako bi se sadržaj homogenizirao. Pomoću vakuum pumpe filtriran je odgovarajući volumen uzorka kroz membranski filter veličine pora 0,45 µm (slika 7).



Slika 7 Uređaj za membransku filtraciju
Autor: Vojković P., 2025.

Sterilnom pincetom membranski filter je bez preokretanja položen na CHROM agar (kromogena podloga za uzgoj koliforma i *Escherichia coli*) i inkubiran na (36 ± 2) °C; (21 ± 3) h (slika 8).



Slika 8 Polaganje membranskog filtera na CHROM agar i inkubacija podloge
Autor: Vojković P., 2025.

Tipične β-D-galaktozidaza pozitivne kolonije (ružičaste) ispitane su komercijalnim testom na citokrom oksidazu. Za test se uzeto najmanje 10 tipičnih kolonija. Kolonije su presijane na TSA agar (tripton soja agar) i nakon inkubacije na (36 ± 2) °C kroz (21 ± 3) h testirane na citokrom oksidazu. Tipične β-D-galaktozidaza pozitivne kolonije, koje su citokrom oksidaza negativne, brojane su kao koliformi (β-D-galaktozidaza pozitivne bakterije iz porodice Enterobacteriaceae). Sve β-D-galaktozidaza i β-D-glukuronidaza pozitivne kolonije (ljubičasto-modre) brojene su kao *Escherichia coli* (β-D-galaktozidaza i β-D-glukuronidaza pozitivne bakterije iz porodice Enterobacteriaceae).

Statistička obrada rezultata

Sve dobivene vrijednosti statistički su obrađene.

Aritmetička sredina (X) je srednja vrijednost koja se dobiva zbrajanjem vrijednosti članova skupine i dijeljenjem zbroja s brojem pribrojnika.

X = (x1 + x2 + … + xn)/n,

Standardna devijacija (uzorka) je mjera varijabilnosti koja pokazuje koliko se pojedinačne vrijednosti razlikuju od aritmetičke sredine.

Standardna devijacija (standardno odstupanje) (znak σ), prosječno srednje kvadratno odstupanje numeričkih vrijednosti neke veličine x1, x2, …, xN od njihove aritmetičke sredine X.

Izračunata je pomoću formule:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}(x_i - \bar{x})^2}$$

Povezanost između parametara procijenjena je korištenjem Pearsonovog koeficijenta korelacije. Pearsonov koeficijent linearne korelacije (r) mjeri jakost i smjer linearne korelacije, tj. vjerojatnost da vrijednosti jedne statističke varijable odgovara određena vrijednost druge statističke varijable pri izravnoj ili recipročnoj razmjernosti.

$$r = \frac{n(\sum x_i y_i) - (\sum x_i)(\sum y_i)}{\sqrt{[n\sum(x_i)^2 - (\sum x_i)^2][n\sum(y_i)^2 - (\sum y_i)^2]}}$$

, gdje su xi i yi uspoređivane vrijednosti varijable, n broj uspoređivanih vrijednosti, i = 1, 2, …, n, a ∑ znak za zbroj niza podataka.

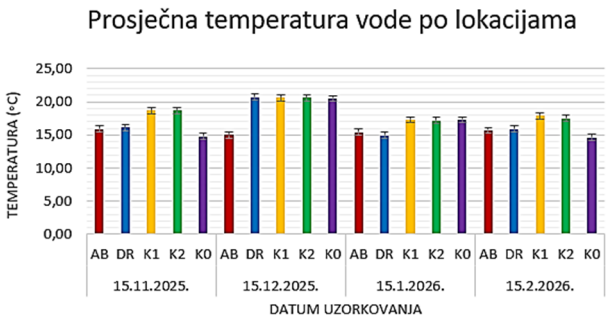
Proveden je i t-test, statistička metoda za utvrđivanje postoji li statistički značajna razlika između aritmetičkih sredina dviju skupina podataka, a temelji se na omjeru razlike sredina i standardne pogreške te razlike.

REZULTATI

Analizom fizikalno-kemijskih svojstva uzoraka vode dobiveni su slijedeći rezultati.

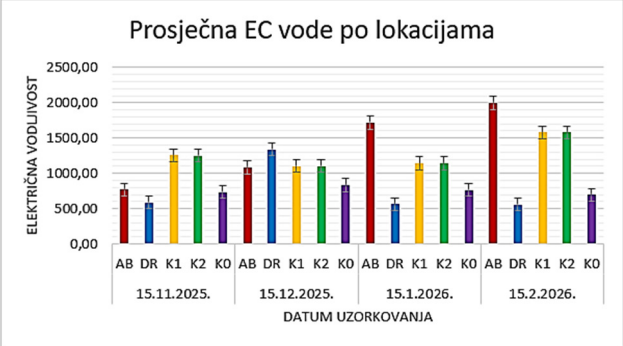
Određivanjem fosfata metodom kolorimetrije na nijednoj od lokacija nije utvrđeno prisustvo fosfata.

Na slici 9 su vidljive najniže vrijednosti temperature zabilježene na lokaciji Austrijski bunar (AB) i najviše vrijednosti temperature, zabilježene na lokaciji Kamenice 1 (K1). Najniže temperature na svim lokacijama zabilježene su u veljači, a najviše u prosincu.



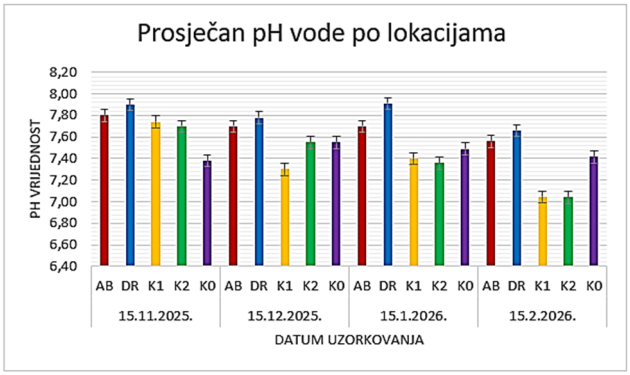
Slika 9 Prosječna vrijednost temperature po lokacijama

Na slici 10 su vidljive najniže vrijednosti električne vodljivosti, zabilježene na lokaciji Dragovode (DR) i najviše vrijednosti električne vodljivosti, zabilježene na lokaciji Austrijski bunar (AB). Najmanja vrijednost električne vodljivosti zabilježena je u studenom, a najveća u veljači.



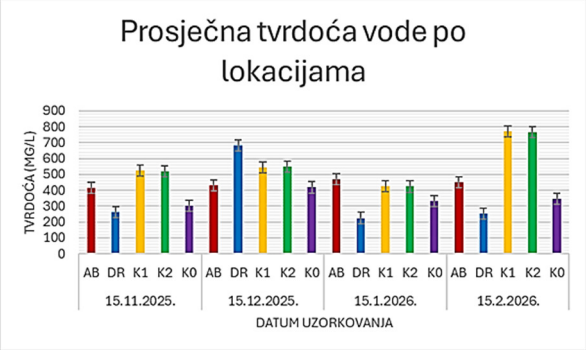
Slika 10 Prosječna vrijednost električne vodljivosti vode po lokacijama

Na slici 11 su vidljive najniže pH vrijednosti, zabilježene na lokaciji Kamenice 2 (K2) i najviše pH vrijednosti, zabilježene na lokaciji Dragovode (DR). Najmanja pH vrijednost zabilježena je u veljači, a najveća u studenom.



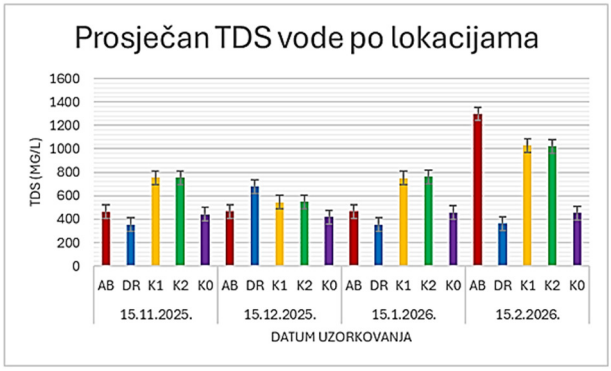
Slika 11 Prosječna pH vrijednost vode po lokacijama

Na slici 12 su vidljive najniže vrijednosti tvrdoće vode, zabilježene na lokaciji Dragovode (DR) i najveće vrijednosti tvrdoće vode, zabilježene na lokaciji Kamenice 1 (K1). Najmanja pH vrijednost zabilježena je u siječnju, a najviša u prosincu.



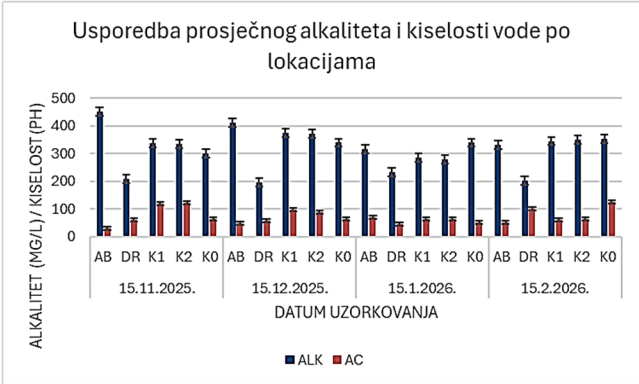
Slika 12 Prosječna vrijednost tvrdoće vode po lokacijama

Na slici 13 su vidljive najniže vrijednosti TDS-a vode, zabilježene na lokaciji Dragovode (DR) i najveće vrijednosti TDS-a vode, zabilježene na lokaciji Kamenice 2 (K2). Najmanja vrijednost TDS-a vode zabilježena je u siječnju, a najviša u veljači.



Slika 13 Prosječna vrijednost TDS-a vode po lokacijama

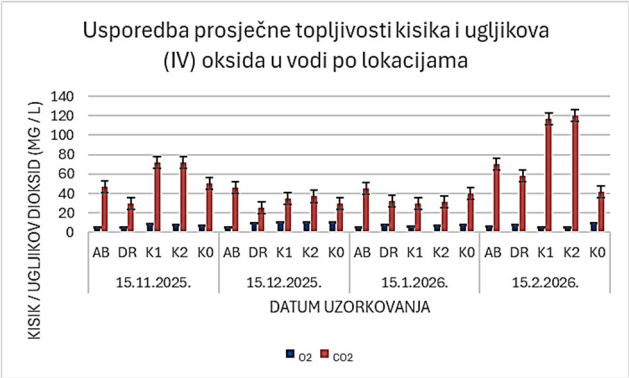
Na slici 14 su vidljive usporedbe vrijednosti prosječnog alkaliteta i kiselosti vode, najniže vrijednosti zabilježene na lokaciji Dragovode (DR) dok su najviše zabilježene na lokaciji Kamenice 1 (K1). Najniže vrijednosti prosječnog alkaliteta i kiselosti vode zabilježene su u siječnju, a najviše u prosincu.



Slika 14 Usporedba prosječnih vrijednosti alkaliteta i kiselosti vode po lokacijama

Na slici 15 su vidljive usporedbe prosječnih vrijednosti topljivosti kisika i ugljikova (IV) oksida u vodi, najniže vrijednosti zabilježene su na lokaciji Dragovode (DR), a najviše na lokaciji Kamenice 2 (K2).

Najniže vrijednosti prosječne topljivosti kisika i ugljikova (IV) oksida zabilježene su u siječnju, a najviše u veljači.



Slika 15 Usporedba prosječnih vrijednosti topljivosti kisika i ugljikova (IV) oksida u vodi po lokacijama

U tablici 1 Pearsonov koeficijent korelacije između električne vodljivosti i tvrdoće iznosi r= 0,842. Kritična vrijednost iz t-distribucije za odabranu razinu značajnosti ($p < 0,05$) iznosi 0,576. Izračunata t-vrijednost prelazi kritičnu vrijednost, što upućuje na statistički značajan rezultat.

Tablica 1 Pearsonov koeficijent korelacije između električne vodljivosti i tvrdoće

	EL. VODLJIVOST µS/cm	TVRDOĆA mg/LCaCO3	PEARSONOV KOEFICIJENT KORELACIJE
15.11.2025.	771	414	0,842
15.12.2025.	1083	432	
15.01.2026.	1719	471	
15.02.2026.	1997	450	

U tablici 2 Pearsonov koeficijent korelacije između pH i aciditeta vode iznosi r = -0,41 pokazuje trend pada, ali ne možemo govoriti o značajnoj povezanosti za vrijednosti ($p < 0,05$).

Tablica 2 Pearsonov koeficijent korelacije između pH i aciditeta vode

	pH	ACIDITET mg/LCaCO3	PEARSONOV KOEFICIJENT KORELACIJE
15.11.2025.	7,7	47	-0,41
15.12.2025.	7,8	30	
15.01.2026.	6,9	70	
15.02.2026.	7,56	100	

U tablici 3 Pearsonov koeficijent korelacije između temperature vode i topljivosti CO_2 iznosi r= -0,141 pokazuje trend pada, ali ne možemo govoriti o značajnoj povezanosti za vrijednosti ($p < 0,05$).

Tablica 3 Pearsonov koeficijent korelacije između temperature vode i topljivosti CO_2

	TEMPERATURA °C	TOPLJIVOST CO2 mg/L	PEARSONOV KOEFICIJENT KORELACIJE
15.11.2025.	15,9	46	-0,141
15.12.2025.	15	47	
15.01.2026.	15,4	45	
15.02.2026.	15,3	70	

U tablici 4 Pearsonov koeficijent korelacije između pH vode i topljivosti CO_2 iznosi r = 0,176 pokazuje trend rasta, ali ne možemo govoriti o značajnoj povezanosti za vrijednosti ($p < 0,05$).

Tablica 4 Pearsonov koeficijent korelacije između pH vode i topljivosti CO_2

	pH	TOPLJIVOST CO2 mg/L	PEARSONOV KOEFICIJENT KORELACIJE
15.11.2025.	7,7	46	0,176
15.12.2025.	7,8	47	
15.01.2026.	6,9	45	
15.02.2026.	7,56	70	

U tablici 5 Pearsonov koeficijent korelacije između pH vode i alkaliteta iznosi r = 0,801 što pokazuje da je dobivena korelacija statistički značajna ($p < 0,05$).

Tablica 5 Pearsonov koeficijent korelacije između pH vode i alkalitet

	pH	ALKALITET mg/LCaCO3	PEARSONOV KOEFICIJENT KORELACIJE
15.11.2025.	7,7	410	0,801
15.12.2025.	7,8	450	
15.01.2026.	6,9	315	
15.02.2026.	7,56	330	

Rezultati mikrobiološke analize uzoraka vode

Nakon mikrobiološke analize uzoraka vode dobiveni su slijedeći rezultati.

U tablici 6 vidljivo je da su na svim lokacijama uočene koliformne bakterije, a na lokaciji Dragovode (DR) ima ih u prevelikom broju da se ne mogu ni prebrojati dok je najmanje kolonija koliformnih bakterija uočeno je na lokaciji Korita (KO). *E.coli* je utvrđena na lokacijama Dragovode (DR) i Austrijski bunar (AB).

Tablica 6 Mikrobiološki pokazatelji (CFU) za uzorke vode s različitih lokacija, 15.11.2025.

Lokacija uzorkovanja	E. coli (CFU/100 mL)	Koliformne bakterije (CFU/100 mL)
Korita (KO)	0	1
Kamenice 1 (K1)	0	70
Kamenice 2 (K2)	0	15
Dragovode (DR)	3	nebrojivo kolonija
Austrijski bunar (AB)	2	91

U tablici 7 vidljivo je da je na lokaciji Dragovode (DR) prevelik broj kolonija koliformnih bakterija da se ne mogu ni prebrojati dok na lokacijama Korita (KO) i Kamenice 2 (K2) nisu utvrđene kolonije koliformnih bakterija.. E.coli je utvrđena na lokacijama Dragovode (DR) i Austrijski bunar (AB).

Tablica 7 Mikrobiološki pokazatelji (CFU) za uzorke vode s različitih lokacija, 15.02.2026.

Lokacija uzorkovanja	E. coli (CFU/100 mL)	Koliformne bakterije (CFU/100 mL)
Korita (KO)	0	0
Kamenice1 (K1)	0	2
Kamenice 2 (K2)	0	0
Dragovode (DR)	2	nebrojivo kolonija
Austrijski bunar (AB)	2	91

RASPRAVA

Analizom fizikalno-kemijskih svojstava vode na više lokacija uočene su jasne prostorne i vremenske razlike koje ukazuju na specifične hidrogeološke i okolišne uvjete pojedinih izvorišta. Rezultati pokazuju da se parametri poput temperature, električne vodljivosti, pH vrijednosti, tvrdoće, TDS-a, alkaliteta, kiselosti te topljivosti plinova u vodi mijenjaju u skladu s lokalnim karakteristikama terena, ali i sezonskim utjecajima.

Najniže temperature zabilježene su na lokaciji Austrijski bunar (AB), a najviše na Kamenicama 1 (K1). Ovakve razlike u skladu su s radom Bonacci (2015), koji navodi da podzemne vode u kršu pokazuju manju temperaturnu varijabilnost od površinskih, ali da plića ili brže obnavljajuća izvorišta mogu imati veće sezonske oscilacije. Najniže vrijednosti u veljači i najviše u prosincu odražavaju lokalne hidrološke uvjete i eventualno miješanje podzemnih i površinskih voda.

Električna vodljivost pokazala je najveće vrijednosti na lokaciji AB, što sugerira veću koncentraciju otopljenih iona, vjerojatno zbog geološkog sastava podzemlja ili duljeg kontakta vode s mineralima. Najniže vrijednosti na Dragovodama (DR) ukazuju na manju mineralizaciju. Sezonski maksimum u veljači može biti posljedica manjeg razrjeđenja oborinskom vodom, dok je minimum u studenom vjerojatno povezan s povećanim dotokom kišnice.

Najniže pH vrijednosti izmjerene su na Kamenicama 2 (K2), dok su najviše zabilježene na DR. Ove razlike mogu biti posljedica različitih karbonatnih sastava tla ili prisutnosti organskih tvari. Najniži pH u veljači može se povezati s povećanim unosom CO_2 u hladnijoj vodi, dok je najviši pH u studenom vjerojatno rezultat smanjenog sadržaja otopljenog CO_2.

Analizirani uzorci vode s područja otoka Visa pokazali će karakteristike tvrde vode, s koncentracijama kalcijevih (Ca^{2+}) i magnezijevih (Mg^{2+}) iona iznad 150 mg/L $CaCO_3$ što je potvrdilo prvu hipotezu. Tvrdoća je bila najniža na DR, što je u skladu s nižom električnom vodljivošću i manjom koncentracijom mineralnih iona. Najveće vrijednosti tvrdoće na K1 upućuju na povećanu prisutnost kalcijevih i magnezijevih iona, što je karakteristično za karbonatne terene. Sezonski minimum u siječnju i maksimum u prosincu mogu se povezati s promjenama u dotoku i miješanju podzemnih voda. Najniži TDS na DR i najviši na K2 potvrđuju trendove uočene kod vodljivosti i tvrdoće. Ovakva povezanost dobro je dokumentirana u radu Hem (1985), koji navodi da TDS i električna vodljivost gotovo linearno rastu s koncentracijom otopljenih iona. Sezonske promjene (minimum u siječnju, maksimum u veljači) odražavaju hidrološke uvjete i dotok oborinskih voda. Najniže vrijednosti alkaliteta i kiselosti na DR te najviše na K1 u skladu su s geokemijskim karakteristikama lokacija. Prema Chapman (1996), alkalitet je snažno povezan s karbonatnim sustavom i pH vrijednošću, što potvrđuje i statistički značajna korelacija u ovom istraživanju.

Najniže vrijednosti topljivosti oba plina zabilježene su na DR, dok su najviše na K2. Ovi rezultati mogu odražavati razlike u temperaturi, protoku i biološkoj aktivnosti. Najniže vrijednosti u siječnju te najviše u veljači odgovaraju očekivanim fizikalnim zakonitostima, hladnija voda bolje otapa plinove.

Fosfati su indikatori onečišćenja oni ne dolaze iz stijene, već iz septičkih jama ili poljoprivrede. Nisu pronađeni ni na jednoj od lokacija što pokazuje su istraživane lokacije nisu onečišćene što je opovrglo našu drugu hipotezu. Korelacijska analiza dodatno je rasvijetlila odnose među parametrima.

Električna vodljivost i tvrdoća ($r = 0,842$), za koje je utvrđena jaka statistički značajna pozitivna korelacija, potvrđuje da povećanje koncentracije iona u vodi izravno povećava i tvrdoću. Ovaj rezultat je u skladu s poznatim hidrogeokemijskim procesima. Ako EC raste zajedno s tvrdoćom, voda prirodno otapa vapnence ili dolomite, ako EC raste, a tvrdoća stoji ili pada to pokazuje prodor mora. Morska sol (NaCl) podiže vodljivost, ali ne i tvrdoću. Korelacija između pH i aciditeta ($r = –0,41$) pokazuje da postoji negativan trend, ali povezanost nije statistički značajna. To znači da promjene pH vrijednosti nisu dovoljno velike ili konzistentne da bi se odrazile na aciditet u mjeri koja bi bila statistički potvrđena.

Korelacija između temperature i topljivosti CO_2 ($r = –0,141$) je slaba negativna korelacija, bez statističke značajnosti, što ukazuje da temperatura nije bila glavni čimbenik koji određuje topljivost CO_2 u analiziranim uzorcima, iako fizikalno-kemijski zakoni sugeriraju da bi topljivost trebala opadati s porastom temperature. Slaba pozitivna korelacija između pH i topljivosti CO_2 ($r = 0,176$) nije statistički značajna, što je u skladu s literaturom koja navodi da su promjene pH u prirodnim vodama često amortizirane karbonatnim puferom. Korelacija između pH i alkaliteta ($r = 0,801$) je jaka i statistički značajna korelacija i u skladu je s radom Chapman (1996) koji potvrđuju da alkalitet raste s povećanjem

pH zbog dominacije bikarbonatnih i karbonatnih iona. Voda s visokim alkalitetom je stabilna. Čak i ako u nju uđe mala količina kiseline, pH se neće značajno promijeniti.

Mikrobiološka analiza uzoraka vode prikupljenih u studenom 2025. i veljači 2026. pokazala je jasne razlike među lokacijama, ali i određene sezonske promjene u prisutnosti indikatorskih bakterija. Rezultati ukazuju na to da pojedina izvorišta pokazuju stabilnu mikrobiološku kvalitetu, dok su druga podložna fekalnom onečišćenju ili povećanom unosu površinskih voda. Nazočnost koliformnih bakterija u pitkim vodama u brojevima koji prelaze dopuštenu razinu signalizira kontaminaciju fekalnog podrijetla (Duraković i sur., 2002). Koliformne bakterije detektirane su na gotovo svim lokacijama u studenom 2025., pri čemu je najniža vrijednost zabilježena na lokaciji Korita (KO), dok je na lokaciji Dragovode (DR) broj kolonija bio toliko visok da nije bilo moguće izvršiti precizno brojanje. Ovakav rezultat upućuje na značajan unos površinskih ili otpadnih voda u sustav Dragovoda, što može biti posljedica hidrogeološke propusnosti terena, blizine antropogenih izvora onečišćenja ili intenzivnih oborina u razdoblju prije uzorkovanja. U veljači 2026. situacija se djelomično poboljšava na većini lokacija: na KO i K2 koliformne bakterije nisu detektirane, dok je na K1 zabilježen vrlo nizak broj kolonija. Međutim, lokacija DR ponovno pokazuje izrazito visok broj koliformnih bakterija, što ukazuje na trajni problem mikrobiološke kontaminacije. Ovakva stabilnost visokih vrijednosti sugerira da je izvor onečišćenja kontinuiran, a ne sezonski. *E. coli*, kao najvažniji pokazatelj fekalnog onečišćenja, detektirana je samo na dvjema lokacijama: Dragovode (DR) i Austrijski bunar (AB), i to u oba razdoblja uzorkovanja. U studenom 2025. na DR je izmjereno 3 CFU/100 mL, a na AB 2 CFU/100 mL. U veljači 2026. vrijednosti ostaju iste na AB, dok na DR blago padaju na 2 CFU/100 mL. Prisutnost *E. coli* na ovim lokacijama ukazuje na fekalnu kontaminaciju, što može biti posljedica infiltracije otpadnih voda, pukotina u vodovodnom sustavu, ispiranja površinskih slojeva tla ili blizine septičkih jama. Posebno zabrinjava činjenica da se *E. coli* pojavljuje u oba razdoblja, što upućuje na trajni rizik, a ne na izolirani incident. U ovom istraživanju dva puta su vršena uzorkovanja za mikrobiološku analizu za detaljniju analizu u budućim istraživanjima trebalo bi napraviti uzorkovanja više puta godišnje i u različitim sezonama. Takav pristup bi osigurao pouzdane podatke o kvaliteti vode na otoku Visu radi zaštite zdravlja lokalnog stanovništva i posjetitelja, podizanja svijesti o važnosti redovite kontrole vode u izoliranim otočnim sustavima te važnosti očuvanja vodnih resursa i održivog upravljanja u uvjetima povećanog antropogenog opterećenja.

ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- analizirani uzorci vode s područja otoka Visa imaju karakteristike tvrde vode, s koncentracijama kalcijevih (Ca^{2+}) i magnezijevih (Mg^{2+}) iona iznad 150 mg/L $CaCO_3$;
- u uzorcima vode iz skladišnih bunara i izvora u neposrednoj blizini poljoprivrednih površina i naselja nije utvrđena prisutnost fosfata;
- pH se kreće u intervalu od 7,039 – 7,912;
- utvrđena je pozitivna korelacija između električne vodljivosti i tvrdoće vode što ukazuje da ne dolazi do prodora morske vode u bunare i izvore;
- utvrđena je pozitivna statistički značajna korelacija između pH i alkaliteta;
- u uzorcima vode iz plitkih bunara i izvora u urbaniziranim područjima detektirana je prisutnost koliformnih bakterije;
- prisustvo *E.coli* je utvrđeno na lokacijama Dragovode (DR) i Austrijski bunar (AB);

- stanje vode na otoku Visu je stabilno, ali pojedini lokaliteti zahtijevaju pojačan nadzor i sanitarne mjere radi zaštite zdravlja stanovništva.

LITERATURA

Bonacci O. 2015. Karst hydrogeology/hydrology of dinaric chain and isles. Environmental Earth Sciences 74(1): 37–55.
Chapman D. 1996. Water quality assessments: A guide to the use of biota, sediments and water in environmental monitoring (2nd ed.). UNESCO/WHO/UNEP.
Duraković S, Delaš F, Stilinović B., Duraković L. 2002. Moderna mikrobiologija namirnica-knjiga prva. Kugler, Zagreb.
Duraković S., Duraković L. 1997. Priručnik za rad u mikrobiološkom laboratoriju, I.dio-knjiga prva. Biblioteka udžbenici i priručnici Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
Hem J. D. 1985. Study and interpretation of the chemical characteristics of natural water (3rd ed.). U.S. Geological Survey.
Patekar, K., Briški M., Terzić J., Nakić Z., Borović S. 2024. Cumulative effects of natural and anthropogenic processes on groundwater chemistry of a small karst island—case study of Vis (Croatia). Applied Water Science 14: 214.
Surić B., Velić J. 2004. Hydrogeological relations on karstified islands – Vis island case study. Rudarsko-geološko-naftni zbornik. https://hrcak.srce.hr/13360, pristupljeno 10. 12.2025.
Kapelj J., Terzić J., Kapelj S., Dolić M. 2002. Recent hydrogeologic study of the Vis island. Geologija 45(2): 419–426.
Terzić J., Frangen T., Borović S., Reberski J. L., Patekar M. 2022. Hydrogeological assessment and modified conceptual model of a Dinaric karst island aquifer (Vis Island). Water 14(3): 404.

Utjecaj duhanskog dima na oralni mikrobiom

Noa Petak, 3. razred
Marko Tatarović, 3. razred

Prirodoslovna škola Vladimira Preloga, Zagreb
Mentor: *Karlo Horvatin*

SAŽETAK
Konzumacija duhanskih proizvoda jedan je od najznačajnijih čimbenika koji narušava ljudsko zdravlje, a njegov utjecaj proteže se i na sastav i funkcionalnost oralnog mikrobioma. Cilj ovog istraživačkog rada bio je usporediti mikrobiome kroničnih pušača i nepušača te ispitati učinak duhanskog dima korištenjem ekstrakta duhanskog dima (CSE) kao *in vitro* modela izloženosti kako bi se bolje razumio utjecaj pušenja na mikrobiološku ravnotežu usne šupljine. Sukladno tome, pretpostavlja se kako postoje razlike u mikrobiomima pušača i nepušača te kako se one temelje na bioraznolikosti i brojnosti bakterija. Uz to, pretpostavlja se i kako ekstrakt duhanskog dima usporava rast bakterija nepušačkog mikrobioma, dok nema značajan učinak na one iz mikrobioma pušača. Za razliku od očekivanog, rezultati su pokazali kako se mikrobiomi ne razlikuju značajno po bioraznolikosti te kako je glavna razlika brojnost nekih vrsta bakterija, čime je prva hipoteza opovrgnuta. Također je potvrđeno kako CSE ne djeluje na rast kao inhibitor, već stimulans za pojačan rast kolonija bakterija nekih vrsta pojačavajući proliferaciju, posebno kod nepušačkih kultura, čime je i druga hipoteza opovrgnuta.

Ključne riječi: *mikrobiom pušača i nepušača; ekstrakt duhanskog dima; proliferacija; bioraznolikost*

UVOD

Mikrobiom je zajednica mikroorganizama (kao što su bakterije, gljivice i virusi) koji nastanjuju određeno okruženje, a posebno skup mikroorganizama koji žive u ili na ljudskom tijelu (Merriam-Webster, 2026). Istraživanja su pokazala kako broj bakterija unutar ljudskog tijela premašuje broj tjelesnih stanica deset puta. Postoje mnoge vrste mikrobioma ljudskog tijela, u fokusu ovog eksperimenta bivajući oralni mikrobiom. Pojam oralnog mikrobioma odnosi se na skup mikroorganizama koji koloniziraju usnu šupljinu i njihove genome. U usnoj šupljini postoji oko 1000 vrsta bakterija, uglavnom uključujući koljena Actinobacteria, Bacteroidetes, Euryarchaeota, Fusobacteria, Firmicutes, Proteobacteria, Spirochaetes i Tenericutes (Dewhirst i sur., 2010).

Nakon kolonizacije usne šupljine, oralni mikroorganizmi prolaze kroz ekološku sukcesiju i postupno formiraju stabilne mikrobne zajednice. Međutim, na ekološku ravnotežu utječu i razni endogeni i egzogeni čimbenici. Ti čimbenici, uključujući upotrebu lijekova, način života domaćina, okoliš i status domaćina, doprinose razlikama u osjetljivosti na bolesti utječući na sastav, strukturu i metaboličke funkcije oralnih mikroorganizama. Jedan od najvećih utjecaja na sastav mikrobioma oralne šupljine ima pušenje. Mikrobiom pušača karakterizira se kao manje bioraznolik, sadrži mnogo više patogenih organizama nego mikrobiom nepušača te, zbog utjecaja na pH-vrijednost sline, simbiotske bakterije teže stvaraju biofilm (Wu i sur., 2016).

Duhanski dim je složena, dinamična i reaktivna smjesa koja sadrži preko 2000 kemikalija, a uglavnom se sastoji od dušika, kisika, ugljikovog(II) oksida i ugljikovog(IV) oksida. Plinska faza sadrži plinove i kemijske sastojke koji su dovoljno hlapljivi da ostanu u plinovitoj fazi dovoljno dugo da prođu kroz filter od staklenih vlakana. Sastojci u čestičnoj fazi uključuju karboksilne kiseline, fenole, vodu, humektante, nikotin, terpenoide, parafinske voskove, nitrozamine specifične za duhan (TSNA), PAH-ove i katehole (Pillsbury, 1969). Često korišten u istraživanjima, ekstrakt duhanskog dima (*Cigarette smoke exctract, CSE*) jedina je otopina sastavljena od svih vodenih sastojaka glavnog toka (izravno udahnutog) duhanskog dima. Služi kao dobro utvrđen *in vitro* model izloženosti dimu cigarete.

Prema procjenama WHO-a, 5,4 milijuna preuranjenih smrti godišnje pripisuje se pušenju duhana diljem svijeta (WHO, 2025). Najčešći uzroci smrti povezani s duhanskim dimom su kardiovaskularne bolesti, kronična opstruktivna plućna bolest i različite vrste raka, posebno rak pluća. Osim toga, duhanski dim iz okoliša također značajno povećava rizik od razvoja ovih i drugih bolesti. WHO također procjenjuje kako u svijetu postoji 1,2 milijarde aktivnih pušača (WHO, 2025), dok se u Republici Hrvatskoj taj broj kreće oko 1,5 milijuna pušača starijih od 15 godina (≈37 % stanovništva). Može se primijetiti kako ovo čini temu eksperimenta iznimno aktualnom te kako je važno ukazati na razlike u mikrobiomima usne šupljine pušača i nepušača zbog predispozicija za razne bolesti koje one stvaraju. Prestankom pušenja se mogu izbjegnuti ove negativne posljedice. Izbjegavanje narušavanja mikrobioma je još jedan razlog na dugoj listi zašto bi se trebalo prestati pušiti. Brojne studije dokazuju kako, ukoliko se pušač odvikne, njegov mikrobiom nakon otprilike godinu dana ponovo počinje poprimati obilježja nepušačkog mikrobioma (Wu i sur., 2016).

Svrha ovog istraživanja je ukazati na narušavanje mikrobioma i pridonijeti razumijevanju utjecaja pušenja na sastav, stabilnost i funkcionalnu ravnotežu mikrobioloških zajednica koje nastanjuju usnu šupljinu te razjašnjavanje mogućih posljedica koje takve promjene mogu imati na zdravlje usne šupljine i sveukupno ljudsko zdravlje. Dobiveni rezultati mogu poslužiti kao znanstvena podloga za bolje razumijevanje štetnih učinaka duhanskog dima na oralni mikrobiom te naglasiti reverzibilnost određenih promjena u njemu koja se očituje nakon prestanka pušenja. Na taj način istraživanje doprinosi podizanju svijesti o važnosti očuvanja oralnog mikrobioma te ujedno ima potencijal potaknuti prestanak pušenja kao ključnu preventivnu mjeru u očuvanju oralnog i općeg zdravlja.

Na temelju navedenih podataka, glavni je cilj ovog istraživanja istražiti i utvrditi postoje li razlike između oralnog mikrobioma pušača i nepušača te utvrditi na koji način kronična izloženost duhanskom dimu utječe na rast kolonija, raznolikost i otpornost bakterija koje čine oralni mikrobiom koristeći se ekstraktom cigaretnog dima pripremljenom u kabinetu za biologiju, pritom procjenjujući njegovo djelovanje na bakterijske stanice izolirane iz usne šupljine. Ovime se ispituje razvijaju li bakterije izloženije duhanskom dimu veću otpornost na nepovoljne uvjete. Sukladno navedenom, postavljene su sljedeće hipoteze:

1. Mikrobiomi pušača i nepušača razlikuju se po vrstama bakterija koje čine te kolonije.
2. Ekstrakt duhanskog dima smanjuje ukupnu pokrivenost hranjivih podloga kolonijama uzgojenih bakterija iz mikrobioma nepušača, a nema utjecaj na pokrivenost hranjivih podloga kolonijama bakterija iz mikrobioma pušača.

METODE RADA

Budući da je cilj istraživanja testirati utjecaj kronične izloženosti duhanskom dimu na rast i otpornost bakterija na duhanski dim, potrebno je prvo identificirati i uzgojiti bakterije koje se pojavljuju u najvećoj brojnosti kod pušača i nepušača. Ovo je potrebno jer se raznolikost mikrobioma koja se istražuje očituje u brojnosti onih bakterija na koje konzumacija duhanskih proizvoda ima utjecaj. Zbog toga se ovo istraživanje odvilo u dva dijela:

1. Identifikacija, izolacija i uzgajanje bakterija učestalih u oralnim mikrobiomima.
2. Testiranje njihove otpornosti na duhanski dim.

Identifikacija, izolacija i uzgoj bakterija učestalih u oralnim mikrobiomima

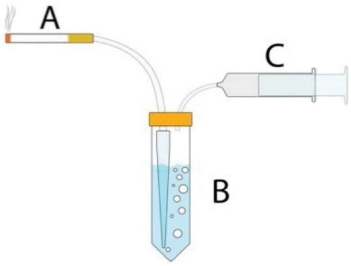
Pokus je izveden u školskom kabinetu iz biologije. Kako bi bakterije na koje utječe izloženost duhanskom dimu bile identificirane, uzeti su uzorci oralnih mikrobioma 30 različitih učenika – 15

pušača i 15 nepušača (pod uvjetom da nikad nisu pušili). Uzorci su uzeti iz usne šupljine (strana obraza, jezik, zubi) trljanjem vatenog sterilnog štapića 45 sekundi. Sterilni štapić zatim je povučen po površini agara (agar-agar) unutar Petrijeve zdjelice u cik-cak pokretu u sterilnoj atmosferi. Uzorci su pušteni da se razvijaju u inkubatoru na temperaturi od 37 °C na 72 h. Nakon što su se bakterije razvile i formirale vidljive kolonije izračunana je razlika u brojnosti kolonija pojedinih vrsta između uzoraka pušača i nepušača te je tablično prikazana uz brojnost kolonija pronađenih vrsta i morfoloških obilježja kolonija. Različite vrste raspoznavane su na temelju morfoloških obilježja kolonija: boje, oblika kolonije, ruba (margine), površine kolonije, reljefa i prozirnosti. Pri radu s uzorcima bakterija koristi se odgovarajuća zaštitna oprema: zaštitne naočale, zaštitne rukavice i kuta.

Za daljnje testiranje na otpornost odabrane su bakterijske vrste s najvećom učestalosti u pušačkom i nepušačkom mikrobiomu, pritom osiguravajući da razlike u otpornosti ne proizlaze iz inherentnih obilježja vrsta te ispitivanje isključivo utjecaja prisutnosti duhanskog dima u staničnom okolišu na otpornost.

Testiranje otpornosti uzoraka na duhanski dim

Kako bi otpornost bakterija na duhanski dim bila testirana pripremljen je CSE (*Cigarette Smoke Extract*) metodom korištenom u istraživanju Cigarette Smoke Extract: A Preclinical Model of Tobacco Dependence (Gellner i sur., 2016) (slika 1), a korištena aparatura prilagođena je školskom kabinetu pomoću predmeta dostupnih u školskome kabinetu. Priprema ekstrakta cigaretnog dima (CSE) provodila se korištenjem žutih *Camel* cigareta. Svi postupci izvedeni su u digestoru kako bi se izbjegla izloženost dimu. Dim cigarete uvlačio se kroz gumenu cijev spojenu na pripremljenu aparaturu (slika 2) u Erlenmeyerovu tikvicu od 100 mL koja je sadržavala 20 mL fiziološke otopine. Povlačenje dima volumena 35 mL provodi se putem plastične šprice od 50 mL povlačenjima u trajanju od 2 sekunde, svakih 30 sekundi, sve dok cigareta nije izgori. Specifično odabrani vremenski intervali korišteni su kako bi se eksperimentalni uvjeti što vjernije približili stvarnim uvjetima pušenja. Pripremljene su 3 različite otopine CSE-a ovisno o broju cigareta čijim je izgaranjem dim provučen kroz 20 mL fiziološke otopine tijekom pripreme otopine ekstrakta – otopina C_1 u kojoj je otopljen dim jedne (≈ 25 %-tna), otopina C_2 u kojoj je otopljen dim dviju (≈ 50 %-tna) te otopina C_4 u kojoj je otopljen dim četiriju cigareta (≈ 100 %-tna otopina). Razlike u koncentracijama otopina lako su vidljive zbog različitih intenziteta boja otopina (slika 3). Otopina C_0 je fiziološka otopina koja se koristi za prekrivanje kontrolne skupine.



Slika 1 Aparatura za pripravu CSE
Izvor: Gellner i sur., 2016

Slika 2 Korištena prilagođena aparatura

Slika 3 Pripremljene otopine CSE

Otpornost bakterija na duhanski dim testirana je tako da su odabrane dvije vrste bakterija na temelju najveće učestalosti kod pušača i nepušača radi mogućnosti uzimanja većeg broja uzoraka te su potom presađene u zasebne Petrijeve zdjelice. U ovome dijelu pokusa korišteno je ukupno 48 Petrijevih zdjelica sa hranjivom podlogom (agar-agar). Po 12 Petrijevih zdjelica korišteno ja za uzgoj svake skupine bakterija: pušačka kultura A, nepušačka kultura A, pušačka kultura B, nepušačka kultura B. Ispitivana

je i uspoređivana razlika u otpornosti između pušačkih i nepušačkih kultura. Presađivanje je provedeno standardnim postupkom – steriliziranom ezom je iz kultura uzgojenih bakterija uzet uzorak pojedinih kolonija te cik-cak metodom prenesen u novu Petrijevu zdjelicu s agar-agarom u sterilnoj atmosferi. Površina agara Petrijevih zdjelica bila je zalivena jednim mililitrom otopine CSE koncentracije C_n gdje je n broj izgorjelih cigareta: C_0, C_1, C_2 i C_4. Za svaku testnu skupinu pripremljeno je 12 Petrijevih zdjelica, unutar kojih su po tri zdjelice bile izložene svakoj od pripremljenih koncentracija CSE-a. Bakterije su potom ostavljene u inkubatoru 72 h na 37 °C. Nakon toga, bakterijske su kolonije pregledane te je zabilježen udio površine Petrijeve zdjelice koju prekrivaju bakterije. Kao kontrolnu skupinu koristi se uzorak bakterija prekriven fiziološkom otopinom (C_0).

Analiza podataka

Udio površine Petrijeve zdjelice koju prekrivaju bakterije 72 sata nakon tretmana otopinom CSE-a koncentracije C_n određen je pomoću računalnog programa OpenCFU koji kvantitativno opisuje rast bakterijskih kolonija. Osim tabličnog prikaza svih pojedinih mjerenja, dobivene srednje vrijednosti udjela pokrivenosti hranjive površine po skupinama (pušačka kultura A, nepušačka kultura A, pušačka kultura B, nepušačka kultura B) dodatno su prikazane grafički kako bi se olakšala usporedba rezultata između eksperimentalnih skupina.

U istraživanju nije provedena statistička analiza rezultata zbog manje količine uzoraka od potrebne za vjerodostojnu i preciznu analizu.

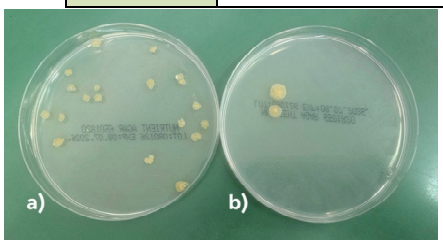
REZULTATI

Identifikacija, izolacija i uzgoj bakterija na koje utječe pušenje

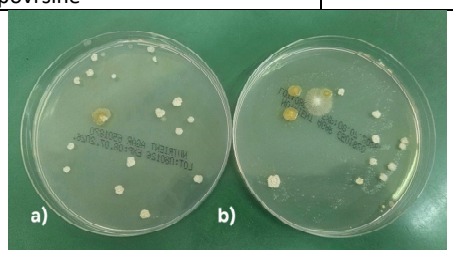
Nakon uzgoja bakterija iz uzoraka pušača i nepušača uspoređene su brojnosti kolonija i vrsti bakterija (razlikovane po morfologiji). Brojnost kolonija bakterija utvrđuje se ručnim brojenjem svake pojedine uzgojene kolonije u uzorcima te su na temelju nje utvrđene razlike u brojnosti. Rezultati su prikazani u tablici 1, a prikazi nekih od uzgojenih kultura na slikama 4, 5 i 6.

Tablica 1 Prikaz ukupne brojnosti kolonija vrsta bakterija kod pušača i nepušača

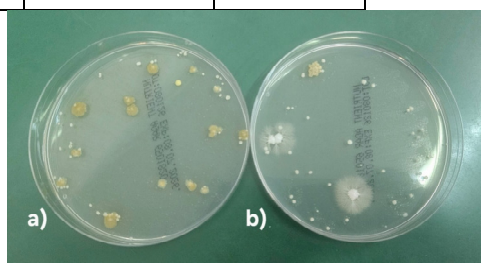
Slovo označenja	Opis – morfološka analiza	Broj kolonija kod pušača	Broj kolonija kod nepušača	Razlika u brojnosti
A	kolonije nepravilnih oblika i rubova, svijetložute boje te konveksne površine	**136**	**768**	632
B	kolonije nepravilnog oblika i nazubljenog ruba, konveksne površine te bijele boje	**73**	**80**	7
C	bijele okrugle kolonije izrazito razgranatih rubova	4	11	7
D	okrugla žuta kolonija pravilnog ruba i plosnate površine	1	2	1
E	male okrugle kolonije pravilnog ruba i konveksne površine	6	4	2



Slika 4 Prikaz uzgojenih a) pušačkih te b) nepušačkih kultura bakterija vrste A



Slika 5 Prikaz uzgojenih a) pušačkih te b) nepušačkih kultura bakterija vrste B (uz prisutnost vrste A kod pušačkog i vrsta A i C kod nepušačkog mikrobioma)



Slika 6 Prikaz uzgojenih bakterijskih kultura a) pušačkog mikrobioma – uključujući vrste A, D i E; b) nepušačkog mikrobioma – uključujući vrste A, C i E

U obje skupine su nađene iste vrste bakterija bez značajne razlike u brojnosti kolonija (osim kod vrste A). Sve su, izuzev vrste E, pronađene vrste iz uzetih uzoraka imale veću brojnost u skupini nepušača u odnosu na skupinu pušača. Za daljnje testiranje su izabrane kolonije koje su bile najbrojnije u obje skupine – vrsta bakterije A i vrsta bakterije B radi prikupljanja većeg broja uzoraka.

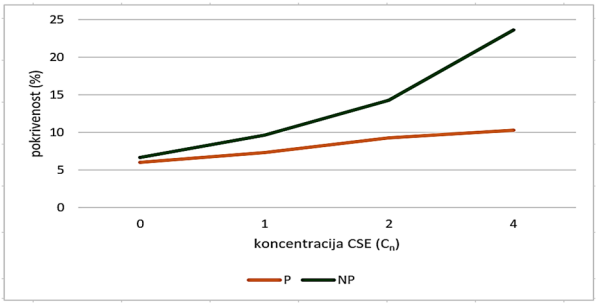
Testiranje otpornosti uzoraka na duhanski dim

Rezultati mjerenja udjela pokrivene hranjive podloge prikazani su u tablici 2, a srednje vrijednosti mjerenja udjela pokrivenosti hranjive površine po skupinama (pušačka kultura A, nepušačka kultura A, pušačka kultura B, nepušačka kultura B) prikazane su na slikama 7 i 8.

Tablica 2 Ovisnost udjela pokrivene površine Petrijeve zdjelice o koncentraciji CSE-a

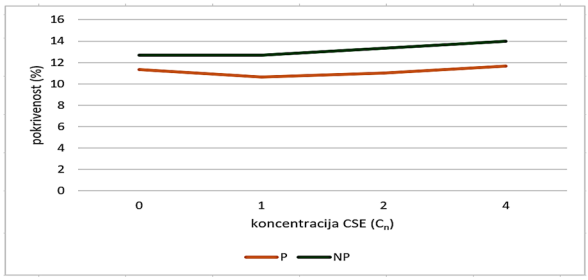
	Pokrivenost / %											
C_n	Vrsta A (pušači)			Vrsta A (nepušači)			Vrsta B (pušači)			Vrsta B (nepušači)		
C_0	8,00	5,00	5,00	6,00	8,00	6,00	11,00	10,00	13,00	13,00	11,00	14,00
C_1	9,00	7,00	6,00	8,00	9,00	11,00	10,00	12,00	10,00	13,00	12,00	13,00
C_2	11,00	7,00	10,00	13,00	17,00	13,00	12,00	12,00	9,00	12,00	13,00	15,00
C_4	10,00	12,00	9,00	24,00	25,00	22,00	13,00	10,00	12,00	14,00	16,00	12,00

Povećanje koncentracije CSE-a povećava udio pokrivenosti hranjive podloge vrstom A. Kod bakterija porijeklom iz nepušačkog mikrobioma taj je utjecaj intenzivniji nego kod bakterija iz mikrobioma pušača (slika 7).



Slika 7 Prikaz ovisnosti udjela pokrivenosti hranjive podloge o koncentraciji CSE-a – bakterijske kulture vrste A kod pušača (P) i nepušača (NP)

Povećanje koncentracije CSE-a nije utjecala na razvoj kolonija vrste B, koja se razvija s većom brojnosti u skupini nepušačkih bakterija vrste B (slika 8). Razlike u pokrivenosti hranjive podloge u odnosu na povećanje koncentracije CSE-a minimalne su.



Slika 8 Prikaz ovisnosti udjela pokrivenosti hranjive podloge o koncentraciji CSE-a – bakterijske kulture vrste B kod pušača (P) i nepušača (NP)

RASPRAVA

Rezultati ovog učeničkog rada pokazuju kako se razlike u mikrobiomima prvenstveno odnose na brojnost bakterijskih kolonija, dok sama bioraznolikost mikrobioma ostaje uglavnom nepromijenjena neovisno o pušenju kao životnoj navici, odnosno sam oralni mikrobiom pušača čine iste vrte bakterija kao i kod nepušača. Sukladno tomu, prva je pretpostavka ovog istraživanja opovrgnuta, odnosno, može

se zaključiti kako pušenje nema izražen utjecaj na brojnost kolonija većine bakterijskih vrsta koje prirodno nastanjuju usnu šupljinu, što upućuje na relativnu stabilnost oralnog mikrobioma. Slični su rezultati dobiveni u brojnim istraživanjima, poput Studije oralnog mikrobioma u Kathmandu – istraživanje pokazuje da mikrobna bioraznolikost nije značajno različita između pušača i nepušača, iako se kvalitativni sastav mikrobioma razlikuje među skupinama. To znači da ukupna bioraznolikost ostaje slična, ali određene vrste bakterija stvaraju biofilm u izraženo različitoj brojnosti u pušača u odnosu na nepušače (Bhattarai i sur., 2025). Ovo proizlazi iz inherentnih svojstava bakterija te njihovoj sposobnosti da stvaraju stabline kolonije i biofilm neovisno o uvjetima.

Iako, važno je istaknuti određene specifične obrasce koji ukazuju na suptilnije učinke pušenja. Iz rezultata je vidljivo kako je vrsta A najbrojnija i u oralnim mikrobiomima pušača i nepušača te kako kod nepušača dolazi do izraženo većeg broja razvijenih kolonija (tablica 1) što implicira kako duhanski dim ipak ima negativni dugoročni utjecaj na neke bakterijske vrste. Smatra se da duhanski dim mijenja imunološke i kemijske uvjete usne šupljine, uključujući promjene pH-vrijednosti i viskoznosti sline, povećani oksidativni stres te smanjenu dostupnost kisika. Takve promjene otežavaju stvaranje stabilnog biofilma i dugoročnu kolonizaciju, čime se narušava optimalno bakterijsko okruženje. Umjesto stabilnih i raznolikih mikrobnih zajednica, kod pušača se češće razvijaju nestabilne i funkcionalno izmijenjene zajednice, što dugoročno može dovesti do disbioze (neuravnoteženog i nestabilnog mikrobioma), čak i ako ukupna bioraznolikost na prvi pogled ne pokazuje značajne razlike (Rajasekaran i sur., 2024).

Cilj drugog dijela istraživanja bio je provjeriti razvijaju li bakterije stalnom izloženošću duhanskom dimu određenu razinu otpornosti ili prilagodbu na takav kemijski stres. Analizom grafičkih prikaza jasno je prikazano da izloženost duhanskom dimu nije imala značajan učinak na razvoj kolonija vrste B. Njezino se razmnožavanje odvijalo gotovo potpuno neovisno o koncentraciji CSE-a, što ukazuje na visoku toleranciju na kemijski stres. Istraživanja su pokazala kako kod određenih bakterijskih vrsta postoji visoka razina tolerancije na komponente duhanskog dima, a u nekim slučajevima čak i pojačana sposobnost preživljavanja u nepovoljnim uvjetima. Navodi se kako duhanski dim može djelovati kao pritisak koji potiče aktivaciju brojnih stresnih regulacijskih mehanizama (Hutcherson i sur., 2015). Iako je s porastom koncentracije zabilježen blag porast pokrivenosti kolonija, taj je trend zanemariv s obzirom na ograničenu veličinu uzorka te ne omogućuje donošenje čvrstih zaključaka o učinku na temelju njega.

Suprotno tome, vrsta A pokazala je izražen odgovor na povećanje koncentracije CSE-a, i to neovisno o tome potječu li uzorci od pušača ili nepušača. Povećana koncentracija CSE-a rezultirala je većom brojnošću i bržim rastom kolonija, što upućuje na to da je CSE u ovom slučaju djelovao kao poticaj za rast kolonija. Brojne komponente duhanskog dima, uključujući nikotin, njegove derivate te različite male organske molekule, bakterijama mogu poslužiti kao dodatni izvor ugljika i dušika. Uz to, nagla izloženost kemijskom stresu može aktivirati stresne regulatorne mehanizme u bakterijskim stanicama, što dovodi do ubrzane proliferacije i pojačane metaboličke aktivnosti kao oblika adaptacije. Prijašnja su istraživanja (*S. aureus u kontroliranom i stabilnom in vitro modelu*) dokazala kako izloženost duhanskom dimu povećava formaciju biofilma i adherenciju bakterije. Smatra se da je razlog tomu aktivacija oksidativnih odgovora bakterija koje potiču formaciju biofilma (Kulkarni i sur., 2012).

Proliferacija bakterija vrste A kod pušača ostvarila se na manjoj razini nego kod nepušača, iz čega se može zaključiti kako nepušačke kulture bolje reagiraju na nagle i stresne situacije. Također, CSE im je novi stimulans što izaziva jači metabolički odgovor i veću proliferaciju. Ovo se također očituje zbog

izoliranog utjecaja CSE-a na proliferaciju i razvoj kolonija koristeći se *in vitro* modelom, isključujući njegov utjecaj na stanični okoliš i ostale vrste s kojima su bakterije u kompeticiji. S druge strane, bakterije vrste A autohtone pušačima već su navikle na ovaj stimulans, što znači da su njihovi stresni i adapcijski mehanizmi već prilagođeni za optimalan rast uz kontinuiranu prisutnost duhanskog dima. Iz svega navedenog slijedi kako je CSE za vrstu A pozitivan modulator rasta, ali da jačina njegovog učinka ovisi o prethodnoj izloženosti duhanskom dimu. Ovo je potvrđeno brojnim istraživanjima u kojima se pokazalo da bakterije autohtone pušačima razvijaju adaptivne mehanizme koji ih čine manje osjetljivima na stimulativne učinke CSE-a, dok nepušačke kulture pokazuju veći metabolički i proliferacijski odgovor pri prvom izlaganju. Ovo potvrđuje ideju da je prethodna adaptacija na duhanski dim ključna za modulaciju rasta i metaboličkog odgovora (Kulkarni i sur., 2012; Wu i sur., 2019).

Zbog navedenih je razloga i druga pretpostavka ovog učeničkoga rada opovrgnuta. Iz zabilježenih rezultata jasno je kako na otpornost bakterija prema duhanskom dimu, osim inherentno različitih svojstava, utječu prijašnja kontinuirana izlaganja duhanskom dimu. Na određene bakterijske vrste akutna izloženost CSE-u različitih koncentracija nije imala utjecaj na razvoj kolonija, dok na drugu vrstu ima izuzetno pozitivan utjecaj. Razlika u prethodnoj izloženosti duhanskom dimu kod uzoraka obje vrste bakterija očituje se u smanjenom udjelu pokrivenosti Petrijeve zdjelice kod bakterija nađenih u mikrobiomu pušača te u smanjenom porastu udjela pokrivenosti zbog kroničnog bakterijskog stresa.

Kada se istovremeno promatraju rezultati oba dijela istraživanja, vidljivo je kako je sveukupni utjecaj izloženosti duhanskome dimu na brojnost bakterija negativan. To ne proizlazi iz njegovog negativnog učinka na same bakterijske kulture, već iz izuzetnog utjecaja na stanični okoliš promjenom pH-vrijednosti i viskoznosti sline, povećanim oksidativnim stresom te smanjenom dostupnosti kisika što dovodi do otežanog stvaranja biofilma i uspješne i funkcionalne kolonizacije usne šupljine pušača.

U istraživanju nije provedena statistička analiza rezultata, što ograničava njihovu pouzdanost. Povećanjem broja uzoraka uzgojenih bakterija u budućim istraživanjima omogućila bi se statistička obrada podataka, čime bi se dobili precizniji rezultati s većom stopom sigurnosti. Također, istraživanje bi moglo u budućnosti uključivati i brojne druge vrste prisutne u mikrobiomu pušača i nepušača. U ovome su istraživanju korištene samo one koje su u najbrojnije u mikrobiomu obje skupine. Za veću bioraznolikost mikrobioma, valjalo bi povećati uzorak ispitanika (i pušača i nepušača).

ZAKLJUČCI

Temeljem rezultata ovog učeničkog istraživačkog projekta moguće je zaključiti sljedeće:

- oralni mikrobiomi pušača i nepušača ne razlikuju se znatno te uglavnom sadrže iste vrste bakterija, dok se njihove razlike očituju u različitoj brojnosti bakterijskih kolonija;
- povećanje koncentracija CSE-a pojačava i ubrzava proliferaciju vrste A, dok na proliferaciju vrste B ne utječe;
- proliferacija je intenzivnija kod bakterija nepušačkog mikrobioma zbog noviteta stimulansa;
- dugoročni utjecaj pušenja na vrstu bakterije A je negativan, što se očituje u ukupnoj količini njezinih kolonija u pušačkim kulturama zbog utjecaja dima na stanični okoliš, odnosno usnu šupljinu.

LITERATURA

Bhattarai K., Kafle S., Adhikari B., Tamang M., Raut R., Sah R., Baral S., Thapa C. 2025. Oral microbiome differences between smokers and non-smokers highlight a small unique cluster. Nepal Journal of Biotechnology 13(2): 168–175.

Dewhirst F. E., Chen T., Izard J., Paster B. J., Tanner A. C., Yu W. H., Lakshmanan A., Wade W. G. 2010. The human oral microbiome. Journal of Bacteriology 192(19): 5002–5017.

Gellner C. A., Reynaga D. D., Leslie F. M. 2016. Cigarette smoke extract: a preclinical model of tobacco dependence. Current Protocols in Neuroscience 77: 9.

Hutcherson J. A., Scott D. A., Bagaitkar J. 2015. Scratching the surface – tobacco-induced bacterial biofilms. Tobacco Induced Diseases 13(1): 1.

Kulkarni R., Antala S., Wang A., Amaral F. E., Rampersaud R., LaRussa S. J., Planet P. J., Ratner A. J. 2012. Cigarette smoke increases *Staphylococcus aureus* biofilm formation via oxidative stress. Infection and Immunity 80(11): 3804–3811.

Merriam-Webster. 2026. Mikrobiom. Rječnik Merriam-Webster.com, https://www.merriamwebster.com/dictionary/microbiome, pristupljeno 18.1.2026.

Rajasekaran J. J., Krishnamurthy H. K., Bosco J., Jayaraman V., Krishna K., Wang T., Bei K. 2024. Oral microbiome: a review of its impact on oral and systemic health. Microorganisms 12(9): 1797.

WHO. 2025. Tobacco trends report: 1 in 5 adults still addicted to tobacco, https://www.who.int/news/item/06-10-2025-who-tobacco-trends-report-1-in-5-adults-stilladdicted-to-tobacco, pristupljeno 18.1.2026.

Wu J., Peters B.A., Dominianni C., Zhang Y., Pei Z., Yang L., Ma Y., Purdue P.M., Jacobs E.J., 2019. The effect of smoking on caries-related microorganisms. Tobacco Induced Diseases 17: 32.

Ispitivanje razlika u citotoksičnom i genotoksičnom djelovanju sintetičkih i prirodnih boja za kosu metodom *Allium*-testa

Franka Atlija, 4.razred
Kaja Cvitanović, 4.razred

Srednja škola Antun Matijašević Karamaneo, Vis
Mentor: *Josipa Poduje*

SAŽETAK
Boje za kosu često su korišten i popularni proizvod modernog doba. Bojenje kose prošireno je među svim generacijama, a nedovoljno se zna o utjecaju boja za kosu na ljudsko zdravlje. Cilj ovog istraživanja jest naglasiti važnost razumijevanja mogućih posljedica učestalog korištenja boja za kosu te posebno ispitati njihovu citotoksičnost i genotoksičnost, koristeći pritom različite vrste sintetičkih i prirodnih boja. U istraživanju su korištene tri vrste boja: dvije sintetičke i jedna prirodna te su napravljene njihove različite koncentracije (5 %, 25 %, 50 %, 100 %). Promatran je broj, dužina i morfološka obilježja korjenčića lukovica *Allium cepa* L. i izračunat Hi-kvadrat odstupanja od pozitivne i negativne kontrole. Prebrojavanjem stanica određen je mitotski indeks, udio pojedine faze u mitozi te učestalost kromosomskih aberacija i interfaznih vakuola. Rezultati su pokazali da sintetičke boje za kosu negativno utječu na broj, duljinu i morfološka obilježja korjenčića. Korjenčići tretirani otopinama sintetičkih boja bili su kraći, tanji, krhi te ih je bilo manje u odnosu na korjenčiće negativne kontrole i prirodne boje za kosu. Tretiranje korijena *Allium cepa* L. otopinama sintetičkih boja za kosu značajno je smanjilo mitotski indeks u odnosu na kontrolu i prirodne boje za kosu, poremetilo udjele pojedinih faza u mitozi, uzrokovalo zaustavljanje dioba te invazivne diobe. Sintetičke boje za kosu uzrokovale su veći broj kromosomskih aberacija u stanicama korijena *Allium cepa* L. u usporedbi s prirodnim bojama i kontrolom. Učestalost kromosomskih aberacija rasla je s porastom koncentracije otopina. Osnovni zaključak istraživanja je da postoje razlike u citotoksičnom i genotoksičnom djelovanju sintetičkih i prirodnih boja za kosu metodom *Allium*-testa tj. sintetičke boje za kosu uzrokuju veći stupanj citotoksičnosti i genotoksičnosti u stanicama luka (*Allium cepa* L.) u odnosu na prirodne boje za kosu.

Ključne riječi: *boja za kosu; Allium-test; kromosomske aberacije; citotoksičnost; genotoksičnost*

UVOD

Kosa predstavlja važan element vizualnog identiteta pojedinca. Odabir frizure i boje kose često služi kao sredstvo izražavanja osobnog identiteta, stavova i pripadnosti određenim društvenim ili kulturnim skupinama. Iako nema vitalnu funkciju, igra vrlo važnu ulogu u izgledu osobe. Ona je jedna od rijetkih fizičkih karakteristika kojima možemo sami manipulirati i mijenjati ih.

Boja za kosu koristila se još od starih Egipćana kada su pojačavali crvenu boju kose uporabom kane. U antičkom Rimu bojali su kosu kamilicom kako bi posvijetlili kosu i dobili zlatni odsjaj (Ashby i sur., 2004). Tada se radilo o prirodnim bojama za kosu koje su u modernom dobu često zaboravljene i zanemarivane. Zato danas najčešće govorimo o sintetičkim bojama za kosu čiji je razvoj krenuo nakon Drugog svjetskog rata. Odonda pa do sada boje za kosu su postale proizvod koji se učestalo koristi u gotovo svim životnim dobima (Ahmati i sur., 2022).

Boja za kosu je kozmetički proizvod namijenjen promijeni boje kose. Sastoje se od pigmenata, kemijskih ili prirodnih sastojaka koji omogućuju unošenje, modifikaciju ili uklanjanje boje u vlasima. Dijelimo ih na prirodne, mineralne i sintetičke. Prirodne boje za kosu (kana, kamilica...) mijenjaju nijansu boje, nisu toksične, traju kratko vrijeme. Mineralne ili metalne boje za kosu (srebrni nitrat ili olovne soli) zahtijevaju svakodnevnu upotrebu, one postupno potamnjuju ili posvjetljuju na kosi, potencijalno su otrovne i zato se više ne koriste (Sfarčić, 2021). Sintetičke boje za kosu klasificirane su prema otpornosti na pranje i stupnju postojanosti na: privremene boje za kosu (boja ostaje na mjestu nekoliko dana, imaju visoko molekularnu težinu i ostaju na površini kutikule), polutrajne boje za kosu (boja se zadržava

tjednima, imaju malu molekularnu težinu i postižu plitko prodiranje u korteks), trajne boje kod kojih boja ostaje u nedogled, imaju vrlo malu molekularnu težinu i duboko prodiru u korteks (Sfarčić, 2021). Često sadrže kemikalije poput amina (razmiče ljuskice kutikule, tako iritiraju i isušuju kosu, npr. amonijak), aromatskih amina (alergeni, stvaraju trajnu boju, npr. p-fenilendiamin (PPD)), oksidansa (izbjeljuju, oštećuju strukturu, npr. vodikov peroksid) i resorcinola (pomoćni pigment, može iritirati i imati dugoročne učinke), koje mogu uništiti vlasište i imati toksične učinke na žive organizme (Sfarčić, 2021). Naime, boja za kosu sadrži najreaktivnije kemikalije koje se koriste u kozmetičkoj industriji. Prema istraživanju He i sur. (2022), iako se mnogi spojevi smatraju sigurnima za korisnike u koncentracijama korištenim u bojama za kosu, postoje proturječni podaci o velikom broju formulacija boja za kosu.

Genotoksičnost je pojam koji opisuje interakciju toksičnih tvari s genskim materijalom stanice koja dovodi do nasljednih promjena staničnog genotipa, točnije kromosomskih aberacija. Dok se citotoksičnost odnosi na sposobnost nekih tvari da usmrte stanicu ili onemoguće njezinu diobu (Baptista i sur., 2025). Njihova procjena je nužna za bolje razumijevanje potencijalnih rizika za ljudsko zdravlje i okoliš.

U istraživanju je procijenjen genotoksičan i citotoksičan učinak boja za kosu na korjenčiće običnog luka *Allium cepa L.* pomoću *Allium*-testa koji je jedan od najstarijih i najčešće upotrebljavanih biljnih testova za proučavanje djelovanja različitih kemijskih spojeva na genom viših biljaka, kojeg je 1938. godine uveo Levan, upotrijebivši korjenčiće zdravih lukovica običnog luka (*Allium cepa L.*). *Allium*-test pokazao se pogodan za utvrđivanje inhibicije rasta korjenčića, kromosomskih aberacija kao i za ispitivanje raznih supstanci iz okoliša na proces mitoze (Roša, 1998). Kromosomske aberacije su strukturne promjene kromosoma koje se javljaju zbog loma kromosoma, grešaka prilikom razdvajanja kromosoma u pojedinim fazama ili zbog grešaka tijekom *crossingovera*. To su na primjer: anafazni mostovi, lomovi kromosoma, c-mitoza, ljepljivi kromosomi. Anafazni mostovi pojavljuju se kao jedna ili dvije kromosomske strukture koje povezuje dvije grupe kromosoma prilikom razdvajanja u anafazi, dok se kod lomova kromosoma dio kromosoma odvojio od ostatka kromosoma. C-mitoza očituje se kao maksimalno kondenzirani kromosomi porazbacani po stanici, a ljepljivi kromosomi se prepoznaju u metafazi kao nepravilno smotane strukture koje su i međusobno povezane (Cabaravdic, 2010). Te se promjene mogu pratiti pomoću mikroskopa kojim daje uvid u izgled kromosoma u točno određenim fazama. Još jedan od promatranih pokazatelja citotoksičnosti su interfazne vakuole, specifične šupljine ili mjehurići ograničeni membranom koji se pojavljuju unutar jezgre ili citoplazme stanice tijekom faze mirovanja (interfaze) staničnog ciklusa.

Sve veća učestalost korištenja boja za kosu potaknula nas je na dublje promišljanje o njihovom utjecaju na zdravlje i okoliš i motivirala za ovo istraživanje. Iako su boje za kosu široko dostupne i svakodnevno korištene među različitim dobnim skupinama, potencijalni rizici povezani s njihovim sastavom i načinom odlaganja često ostaju zanemareni. Upravo zato želimo skrenuti pozornost na moguće opasnosti koje proizlaze iz njihove primjene, osobito među našim kolegama, prijateljima, obitelji i učiteljima. Osim zdravstvenih rizika, važno je istaknuti i ekološki aspekt, budući da nepravilno odlaganje boja za kosu može imati negativan utjecaj na okoliš (Belak, 2025).

Ključne varijable ovoga rada odnose se na boje za kosu, odnosno na njihove različite koncentracije, koje čine nezavisne varijable istraživanja. Zavisne varijable obuhvaćaju broj i duljinu korjenčića, udio stanica u mitozi te raspodjelu stanica po pojedinim fazama mitoze, kao i učestalost kromosomskih

aberacija i interfaznih vakuola. Analizom navedenih pokazatelja procjenjuje se potencijalni citotoksični i genotoksični učinak ispitivanih boja za kosu.

Cilj ovog istraživanja jest naglasiti važnost razumijevanja mogućih posljedica učestalog korištenja boja za kosu. Posebno želimo ispitati njihovu citotoksičnost i genotoksičnost, koristeći pritom različite vrste sintetičkih i prirodnih boja. Usporedbom dobivenih rezultata nastojimo identificirati najsigurniju i najmanje štetnu opciju koju bismo mogli preporučiti potrošačima. Specifični ciljevi istraživanja su: usporediti citotoksičnost sintetičkih i prirodnih boja za kosu, odrediti utjecaj boja za kosu na mitotski indeks, analizirati učestalost i vrste kromosomskih aberacija i ispitati učinak različitih koncentracija boja na citotoksičnost i genotoksičnost.

U skladu s postavljenim ciljevima postavljene su slijedeće hipoteze:

- H1 Sintetičke boje za kosu uzrokuju veći stupanj citotoksičnosti i genotoksičnosti u korijenskim stanicama luka (*Allium cepa*) u odnosu na prirodne boje za kosu;
- H2 Tretiranje korijena *Allium cepa* otopinama sintetičkih boja za kosu značajno smanjuje mitotski indeks u odnosu na kontrolu i prirodne boje za kosu;
- H3 Sintetičke boje za kosu uzrokuju veći broj kromosomskih aberacija (npr. fragmenti, mostovi, zaostali kromosomi) u stanicama korijena *Allium cepa* L. u usporedbi s prirodnim bojama i kontrolom;
- H4 Povećanje koncentracije boja za kosu (sintetičkih i prirodnih) dovodi do porasta citotoksičnih.

METODE RADA

Istraživanje je provedeno od 25. rujna 2025. do 17. siječnja 2026. u nekoliko koraka: proučavanje literature, rad u školskom laboratoriju i analiza podataka.

Istraživanje literature i analiza anketnog upitnika

Kako bi se bolje razumjela tema bilo je potrebno prvo istražiti i izvući potrebne činjenice i podatke iz dostupne literature. Istraživan je sastav boje za kosu i koji od kemijskih sastojaka djeluju citotoksično i genotoksično. Pomoću sakupljanih podataka izrađena je i tablica sa štetnim tvarima koje se nalaze u sastavu promatranih boje za kosu.

Priprema otopina boja za kosu

U istraživanju je korišteno ukupno tri različite vrste boja za kosu od kojih su dvije sintetičke: L'Oreal Paris Preference – trajna boja i Schwarzkopf LIVE Ultra Brights – privremena boja te jedna kana (Henna), 100 % prirodna boja. Različite vrste boja za kosu su s vodom miješane u omjeru 1:20 (za 5 % koncentraciju), 1:4 (za 25 % koncentraciju), 1:2 (za 50 % koncentraciju), dok se za 100 % koncentraciju koristila nerazrijeđena boja za kosu. Ukupni volumen svih priređenih koncentracija bio je 50 mL. Za svaku vrstu boje za kosu i određenu koncentraciju provedena su po tri mjerenja stoga su otopine podijeljene u 3 plastične posudice. Također su pripremljene tri plastične posudice s destiliranom vodom namijenjene negativnoj kontroli i tri plastične posudice s vodikovim peroksidom (0,3 M) kao pozitivnom kontrolom. Vodikov peroksid korišten je kao pozitivna kontrola zbog njegove dostupnosti i korištenja kod istraživanja Radića i sur. (2010), jer je pokazano da vodikov peroksid uzrokuje u stanicama oksidativni stres, što znači da uzrokuje povećanje koncentracije kisikovih radikala koji dovode do oštećenja DNA.

Allium cepa L. pod utjecajem otopina različitih boja za kosu

Za istraživanje korišteno je ukupno 42 lukovice *Allium cepa* L. (kontrola po 3 mjerenja). Lukovicama *Allium cepa* L. veličine 15 – 20mm i težine oko 4 g skalpelom su odstranjeni osušeni dijelovi kako bi korijen mogao rasti. Postavljene su na epruvete napunjene destiliranom vodom tako da donjim dijelom dodiruju površinu vode. Praćen je rast korjenčića do dužine oko 1 cm. Nakon što su korjenčići narasli do 10 mm izdvojene su lukovice koje su bile kontrolna skupina i one su nastavile rast u destiliranoj vodi, a ostale lukovice su tretirane 24 sata različitima otopinama boja za kosu (koncentracije 5 %, 25 %, 50 %, 100 %). Nakon 24 sata dio korjenčića se fiksira mješavinom etanola i octene kiseline u omjeru 3:1 i pripremi za mikroskopiranje, a dio materijala je prebačen u destiliranu vodu na oporavak od 24 sata i potom fiksiran i pripremljen za mikroskopiranje.

Određivanje broja i duljine korjenčića _Allium cepa_ L.

Vršeno je praćenje kontrolne skupine i skupina pod utjecajem različitih boja za kosu tijekom 72 sata. Prebrojani su korjenčići na svim lukovicama *Allium cepa* L. i izmjerena im je duljina u mm, izmjerene vrijednosti bilježene su u radni dnevnik, izračunate prosječne vrijednosti dobivenih rezultata te statistički obrađene.

Određivanje mitotskog indeksa, udio pojedinih faza mitoze te uočavanje vrsta i učestalosti kromosomskih aberacija kod _Allium cepa_ L.

Vršni dio korjenčića duljine do 10 mm odstranjen je sa svježih korjenčića *Allium cepa* L. kontrolnih skupina i lukovica izloženih utjecaju otopina boja za kosu, potom je stavljen pomoću pincete u staklenu posudu s destiliranom vodom i tamo ostavljen 1 minutu. Nakon toga vršni dio korjenčića je premješten 10 minuta u staklenu posudu sa 6 M klorovodičnom kiselinom. Ponovo se korjenčići stavljaju u destiliranu vodu oko 1 minute kao bi bili isprani nakon čega se premještaju u staklenu posudu sa acetoorceinom gdje se oboje slijedećih 20 minuta. Vršni dio korjenčića duljine oko 0,5 mm stavljen je na predmetno stakalce i prekriven sa pokrovnim stakalcem. Preko pokrovnog stakalca stavljen je komadić filter papira te palcem preparat pritisnut kako bi se stanice preparata jednoslojno rasporedile. Pripremljeni preparat promatran je pod mikroskopom, zbog jednostavnijeg prebrojavanja oko 200 stanica po preparatu te uočavanja stanica u diobi i onih koje nisu u diobi, preparat je fotografiran. Od stanica koje su u diobi određuje se udio stanica u profazi, metafazi, anafazi i telofazi. Također se određuju vrste i učestalost kromosomskih aberacija kod korjenčića tretiranih različitim razrjeđenjima boje za kosu i nakon oporavka od 24 sata u destiliranoj vodi.

Statistička obrada rezultata

Sve dobivene vrijednosti statistički su obrađene. Izračunate su prosječne duljine korjenčića lukovica *Allium cepa* L. prema formuli:

$$\mathrm{MKL} = \frac{DKL}{NL}$$

MKL= prosječne duljine korjenčića lukovica
DKL= zbroj duljina svih korjenčića lukovica
NL= broj korjenčića svih lukovica.

Izračunat je i prosječan broj korjenčića lukovica *Allium cepa* L. prema formuli:

$$\mathrm{MKL} = \frac{DKL}{NL}$$

MKL= prosječnog broja korjenčića lukovica
DKL= zbroj korjenčića lukovica
NL= broj lukovica.

Proveden je hi – kvadrat test, kako bismo utvrdili statističku značajnost dobivenih rezultata tj. jesu li odstupanja kontrolnih skupina i skupina biljka izloženih utjecaju boje za kosu statistički značajna. Formula za izračunavanje hi-kvadrat testa:

$$x^2 = \sum \frac{(f0 - ft)^2}{ft}$$

Izračunat je i mitotski indeks (MI), koji govori koliki je udio stanica u korjenčiću promatranog *Allium cepa* L. u mitozi u odnosu na ukupan broj stanica promatranog uzorka. Korištena je sljedeća formula za izračunavanje mitotskog:

$$\text{MI} = \frac{\text{broj stanica u mitozi}}{\text{ukupan broj stanica}}$$

Izračunat je i udjel pojedinih faza mitoze, koji govori koliki je udio stanica u korjenčiću promatranog *Allium cepa* L. u pojedinoj fazi u mitozi u odnosu na ukupan broj stanica koje su u diobi promatranog uzorka. Korištena je sljedeća formula za izračunavanje udjela pojedine faze mitoze:

$$\text{udio pojedine faze u mitozi} = \frac{\text{broj stanica u pojedinoj fazi mitoze}}{\text{ukupan broj stanica u diobi}}$$

REZULTATI

Prebrojavanjem korjenčića i mjerenjem njihovih duljina te analizom izrađenih mikroskopskih preparata utvrđeni su sljedeći rezultati.

U tablici 1 navedene su oznake koje se koriste u daljnjem tekstu rada. Slika 1 prikazuje dio ispitanih lukovica u pripravljenim testnim otopinama.

Tablica 1 Legenda korištenih oznaka za različite boje i njihove koncentracije

Oznake	Vrste testnih otopina
PP	pozitivna kontrola – vodikov peroksid
NP	negativna kontrola – destilirana voda
L1	100 % L'Oreal Paris Preference – trajna boja
L2	50 % L'Oreal Paris Preference – trajna boja
L3	25 % L'Oreal Paris Preference – trajna boja
L4	5 % L'Oreal Paris Preference – trajna boja
S1	100 % Schwarzkopf LIVE Ultra Brights – privremena boja
S2	50 % Schwarzkopf LIVE Ultra Brights – privremena boja
S3	25 % Schwarzkopf LIVE Ultra Brights – privremena boja
S4	5 % Schwarzkopf LIVE Ultra Brights – privremena boja
K1	100 % Henna (kana) – 100 % prirodna boja
K2	50 % Henna (kana) – 100 % prirodna boja
K3	25 % Henna (kana) – 100 % prirodna boja
K4	5 % Henna (kana) – 100 % prirodna boja

Slika 1 Prikaz analiziranih korjenčića iz različitih testnih otopina (legenda navedena u tablici1)

Jasno je vidljivo da najkraće korjenčiće imaju uzorci tretirani otopinama L'Oreal Paris Preference i pozitivne probe (vodikova peroksida). Kraće korjenčiće uočavamo kod lukovica tretiranih otopinama boje Schwarzkopf LIVE Ultra Brights. Korjenčići kane su najsličniji negativnoj probi.

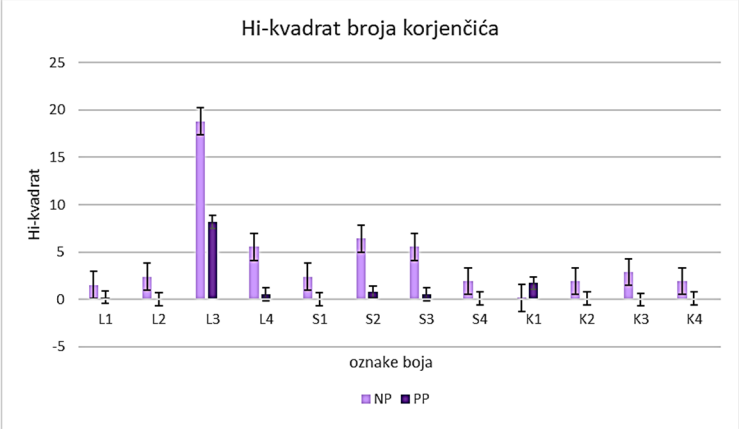
U tablici 2 su detaljniji rezultati analize korjenčića.

Tablica 2 Rezultati duljine, broja i morfologije korjenčića

Oznake	Broj korjenčića	Duljina korjenčića (mm)	Morfologija korjenčića
NP	31	33	dugi, čvrsti, ravni, neobojani
PP	19	19	kratki, mekani, krhki, savijenog vrha, neobojani

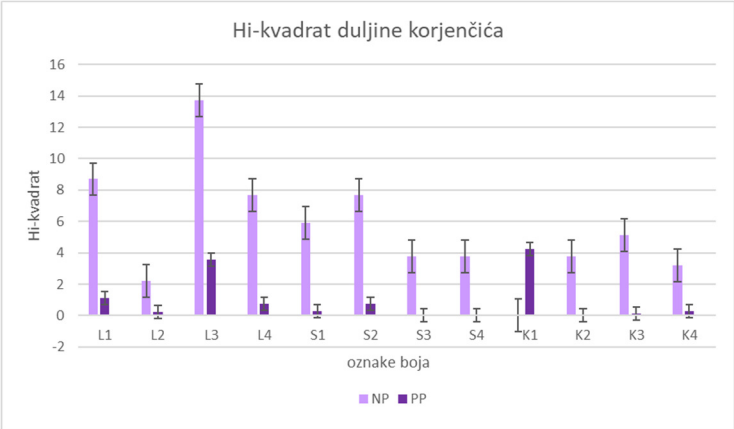
Oznake	Broj korjenčića	Duljina korjenčića (mm)	Morfologija korjenčića
L1	22	13	kratki, mekani, krhki, savijenog vrha, obojani
L2	20	22	kratki, mekani, krhki, savijenog vrha, obojani
L3	5	9	kratki, mekani, krhki, savijenog vrha, obojani
L4	15	14	kratki, mekani, krhki, savijenog vrha, obojani
S1	20	16	kratki, mekani, krhki, ravni, obojani
S2	14	14	kratki, mekani, krhki, ravni, obojani
S3	15	19	kratki, mekani, krhki, ravni, obojani
S4	21	19	kratki, mekani, krhki, ravni, obojani
K1	28	34	dugi, ravni, obojani, čvrsti
K2	21	19	dugi, ravni, obojani, čvrsti
K3	19	17	dugi, ravni, obojani, čvrsti
K4	21	20	dugi, ravni, obojani, čvrsti

Na slici 2 su vidljiva viša odstupanja od negativne kontrole (NP) u odnosu na odstupanja od pozitivne kontrole (PP). Izračunani stupanj slobode je 1 te prema odabranoj razini značajnosti p = 0,05 kritička vrijednost hi-kvadrat iznosi 3,841. Svi rezultati niži od tog broja ne smatraju se statistički značajnima. Najizraženije odstupanje uočavamo kod 25 %-tne koncentracije L'Oreal Paris Preference boje čiji hi kvadrat iznosi 18,7778 u odnosu na negativnu kontrolu te 8,16667 u usporedi s pozitivnom kontrolom. Još neka značajnija odstupanja od negativne kontrole uočavamo kod uzoraka L4, S2 i S3 koje iznose oko 6, dok kod pozitivne kontrole nemamo više značajnijih odstupanja.



Slika 2 Hi-kvadrat prosječnog broja korjenčića

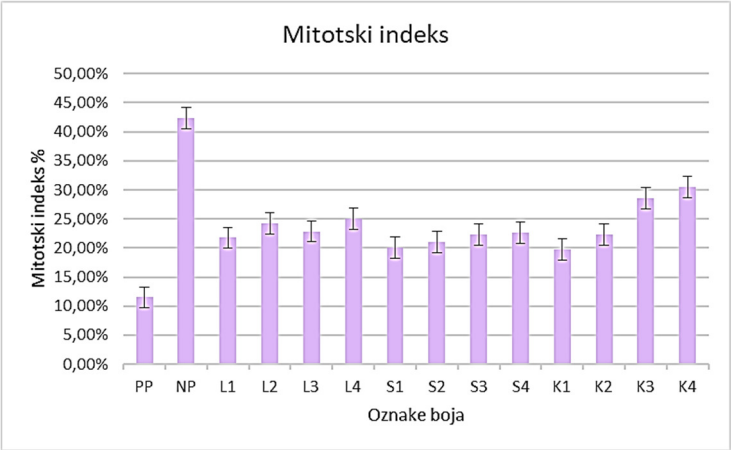
Analizom rezultata hi-kvadrata (slika 3) opet uočavamo izraženija odstupanja od negativne kontrole (NP) u usporedbi s pozitivnom kontrolom (PP).



Slika 3 Hi-kvadrat prosječne duljine korjenčića

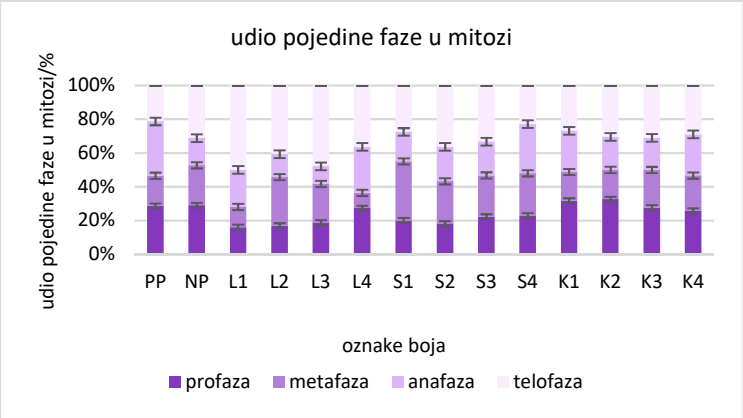
Dobiveni stupanj slobode je 1 te prema odabranoj razini značajnosti p = 0,05 kritička vrijednost hi-kvadrat iznosi 3,841. Svi rezultati niži od tog broja ne smatraju se statistički značajnima. Kod uzoraka tretiranih L'Oreal Paris Preference vidljiva su najveća odstupanja u odnosu na negativnu kontrolu, L3 čak 13,7143. Bitnija odstupanja od NP uočena su i kod uzoraka boje Schwarzkopf LIVE Ultra Brights, najveća je S2 (7,6809). Najmanja odstupanja od NP primijećena su kod prirodne boje, najveće odstupanje je iznosilo 5,12 (K3). Jedino statistički značajno odstupanje u usporedbi s PP uočeno je kod uzorka K1 (4,2453).

Iz slike 4 je vidljiv niski postotak stanica u mitozi kod PP, te visoki udio kod NP. Mitotski udjeli tretirani kanom K3 (28,57 %) i K4 (30,54 %) imali su najveći postotak stanica u mitozi u usporedbi s ostalim korištenim bojama. Kod korjenčića tretiranih L'Oreal Paris Preference bojom za kosu MI prosječno je iznosio nešto manje od 25 %. Bitno je naglasiti da među različitim koncentracijama boje nisu uočene veće razlike u postotku stanica u mitozi. Naprimjer, kod različitih koncentracija Schwarzkopf LIVE Ultra Brights primijećen je postepeni rast. Najmanji udio je vidljiv kod 100 %-tne koncentracije S1 te postepeno raste do 5 %-tne koncentracije S4.



Slika 4 Mitotski indeks korjenčića luka ovisno o tretmanima

Promatranjem udjela pojedinih faza u mitozi (slika 5) uočavamo da se kod kod korjenčića tretiranih L'Oreal Paris Preference bojom najveći postotak stanica nalazi u telofazi (kod L1 gotovo 50 %).

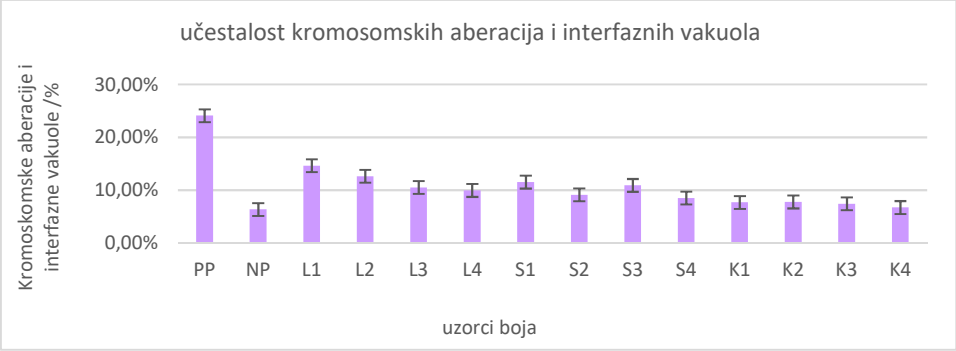


Slika 5 Udio pojedine faze u mitozi

Broj stanica u profazi je ujednačen, iznimka je L4 gdje je postotak nešto veći, oko 28 %. Kod L1 i L4 vidljiv je manji udio metafaze na sprema anafazi dok je kod uzoraka L2 i L3 suprotna situacija. Rezultati različitih koncentracija boje Schwarzkopf LIVE Ultra Brights ukazuju na postepeno povećavanje udjela profaze i anafaze od veće koncentracije boje prema manjoj. Broj stanica u metafazi je gotovo

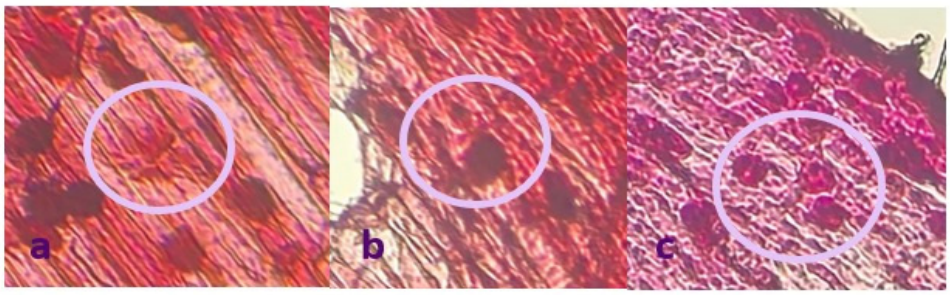
izjednačen kod svih koncentracija boje Schwarzkopf LIVE Ultra Brights (oko 25 % stanica). Iznimka je 100 %-tna koncentracije (S1) s nešto većim udjelom (oko 37 %). Također je uočen neznatno veći udio stanica u telofoazi. Kod uzoraka tretiranima prirodnom bojom rezultati za pojedine faze su uravnoteženi, odnosno udjeli pojedinih faza u mitozi su gotovo izjednačeni. Iznimke su malo veći udjeli stanica u profazi i manji u metafazi kod otopina većih koncentracije K1 i K2.

Iz slike 6 je vidljiv najveći udio kromosomskih aberacija i interfaznih vakuola u pozitivnoj kontroli te najmanji kod negativne kontrole što je bilo očekivano. Nadalje, najveća učestalost uočena je kod lukovica tretiranih L'Oreal Paris Preference (kod L1 gotovo 15%). Vidljivo je i proporcionalno smanjenje kromosomskih aberacija i interfaznih vakuola usporedno sa smanjenjem koncentracija boje. U različitim koncentracijama tretiranim Schwarzkopf LIVE Ultra Brights nema pravilnog redoslijeda pojave kromosomskih aberacija i interfaznih vakuola. Uzorci prirodne boje su bili najsličniji negativnoj kontroli te je njihova učestalost bila približno jednaka, iako je učeno blago smanjenje učestalosti proporcionalno smanjenju koncentracije.



Slika 6 Udjeli svih uočenih kromosomskih aberacija (KA) i interfaznih vakuola (IV)

Na slici 7 su vidljive najčešće pronađene kromosomske aberacije (slika 7a – segmentirana jezgra i slika 7b – mikronukleus) na uzorku tretiranom 100 %-tnom koncentracijom L'Oreal Paris Preference (trajna boja) te interfazne vakuole (Slika 7c – interfazne vakuole) na uzorku tretirano 100 %-tnom koncentacijom privremene boje Schwarzkopf LIVE Ultra Brights.



Slika 7 Uočene kromosomske aberacije i interfazne vakuole: a) segmentirana jezgra u uzorku L1, b) mikronukleus u uzorku L1, c) interfazne vakuole u uzorku S1

U tablici 3 jasno su prikazani ključni štetni sastojci ispitanih boja. Vidljivo je da trajna boja L'Oreal Paris Preference ima najviše poznatih štetnih sastojaka (p-fenilendiamin (PPD), amonijak, vodikov peroksid, resorcinol). Privremena boja Schwarzkopf LIVE Ultra Brights ima drukčiji sastav te manji broj poznatih toksičnih tvari za stanicu (samo ethanolamine). Također možemo primjetiti da prirodna boja kana ne sadrži nikakve poznate štetne sastojke.

Tablica 3 Usporedba poznatih toksičnih tvari za stanicu i sastojaka istraživanih boja

Štetni sastojci	L'Oreal Paris Preference	Schwarzkopf LIVE Ultra Brights	Henna (kana)
Amini (ethanolamine)	-	+	-
Aromatski amini (p-fenilendiamin PPD)	+	-	-
Oksidansi (amonijak, vodikov peroksid)	+	-	-
Resorcinol	+	-	-

RASPRAVA

Ovo istraživanje ukazuje na moguće učinke različitih vrsta boja za kosu (L'Oreal Paris Preference, Schwarzkopf LIVE Ultra Brights, Henna Kana). Različite koncentracije (100 %, 50 %, 25 %, 5 %) boje za kosu pokazale su drukčija djelovanja. Saznajemo da su sintetičke boje u većini segmenata osjetno štetnije (citotoksične i genotoksične) u odnosu na prirodno boju kanu. Više koncentracije korištenih boja također su bile u nekim slučajevima negativnijeg utjecaja u odnosu na njihove inačice nižih koncentracija. Prisutnost raznih kromosomskih aberacija i interfaznih vakuola itekako to dokazuje.

Istraživanje je provedeno na korjenčićima lukovica *Allium cepa L.*. Na samoj vizualnoj analizi korjenčića uočeni su negativni učinci boja (slika 1). Korjenčići na kojima su korištene sintetičke boje bili su tanki, manje čvrstoće, savijeni na vrhu i promijenjene boje, dok su korjenčići kod prirodne boje Kana bili gotovo jednaki negativnoj kontroli (destiliranoj vodi). Daljnjim proučavanjem korjenčića, točnije prebrojavanjem i mjerenjem njihove duljine (tablica 2) uočeno je da su korjenčići sintetičkih boja kraći i u manjem broju u usporedbi s prirodnom bojama. U radu je to prikazano pomoću hi-kvadrata (slika 2 i slika 3). Na njima je vidljivo odstupanje sintetičkih boja, posebno 100 %-tne boje L'Oreal Paris Preference, koja značajno odstupa od negativne kontrole. Sve to ukazuje da korištene boje za kosu, točnije korištene sintetičke boje imaju citotoksičan učinak te time uzrokuju inhibiciju stanične diobe (Cabaravdic, 2010).

Izračunavanjem mitotskog indeksa primijećen je manji broj stanica u mitozi kod sintetičkih boja i pozitivne kontrole u odnosu na prirodnu boju i negativnu kontrolu. Mitotski indeks (MI) u vodi kao i negativnoj kontroli iznosio je 41,34 %, dok se u radovima drugih istraživača navode MI od 13 % (Sutan, 2014) pa sve do 36,57 % (Grubišić i Medić, 2023). MI pozitivne kontrole (H_2O_2) je znatno manji (11,48 %) kao i kod istraživanja Vareško (2017) te Radić i sur. (2010). Lukovice tretirane otopinama prirodne boje imale su vidljivo veće mitotske indekse od pozitivne kontrole za razliku od sintetičkih boja (slika 4). To nam ponovo ukazuje na citotoksičan učinak boja za kosu. Štoviše, niži mitotski indeks može ukazivati i na sporiji ulaz stanica u diobu ili stanični zastoj što navodi i Cabaravdic (2010). To potvrđuje našu hipotezu H2 da se tretiranje korijena *Allium cepa* L. otopinama sintetičkih boja za kosu značajno smanjuje mitotski indeks u odnosu na kontrolu i prirodne boje za kosu. Nadalje, izračunavanjem udjela pojedine faze mitoze saznali smo da različite boje za kosu mijenjaju postotak različitih faza koji bi trebao biti gotovo jednak za svaku fazu, ako uspoređujemo negativnoj kontroli (slika 5). U uzorcima tretiranima bojom L'Oreal Paris Preference većina se stanica nalazila u telofazi i anafazi, što najčešće ukazuje na intenzivnu diobu. Ujedno, to može ukazivati i na negativan nagli rast ili pojavu tumora. (Dulout i Olivero, 1984). Promatrajući uzorke Schwarzkopf LIVE Ultra Brights, kod nekih uzoraka je uočen veći udio stanica u metafaze. Wang i sur. (2017) navode da razlog tomu može biti oksidativni stres stanica i stanični zastoj. Kod lukovica tretiranim prirodnom bojom sve faze bile su gotovo izjednačene i slične negativnoj probi.

Analizom rezultata učestalosti kromosomskih aberacija i interfaznih vakuola (slika 6) potvrđena je hipoteza H3. Sintetičke boje za kosu uzrokuju veći broj kromosomskih aberacija u stanicama korijena

Allium cepa L. u usporedbi s prirodnim bojama i kontrolom. Naime, najčešće pronađene kromosomske aberacije bile su segmentirane jezgre i mikronukleusi (slika 7). Mikronukleusi ukazuju na genotosičnost, odnosno lomljenje kromosoma i njihovo nepravilno razdvajanje dok nam segmentirane jezgre često ukazuju na staničnu smrt ili teške citotoksičnosti kao što kaže rad Baptiste i sur. (2025). Ipak prema učestalosti većinu postotka nose interfazne vakuole (slika 7) koje se pojavljuju kada je stanica pod visokim citotoksičnim stresom i izložena ekstremno štetnim kemikalijama. Uzorci tretirani bojom L'Oreal Paris Preference imaju najveću učestalost aberacija, slijede korjenčići tretirani privremenom bojom Schwarzkopf LIVE Ultra Brights. Još možemo primjetiti postepan porast učestalosti kromosomskih aberacija i interfaznih vakuola s porastom koncentracije boja (pogotovo u uzorcima L'Oreala). Uzorci tretirani prirodnom bojom imali su gotovo jednaku vrijednost kao negativna proba usporedno s povećanjem koncentracije. Razlog tomu je to što sintetičke boje sadrže amine i aromatske amine s dokazanim genotoksičnim potencijalom kao što kažu He i sur. (2022). Kana ne sadrži takve spojeve, što može objasniti njezin blaži biološki učinak.

Dodatnom analizamo literature ponađene su povezanosti između toksičnih sastojaka za stanice i sastojaka naših boja (tablica 3). Najviše štetnih sastojaka imala je trajna boja L'Oreal Paris Preference što se poklapa sa ostalim rezultatima u kojima je promatrana njena citotoksičnost i genotoksičnost. U istaživanju He i sur. (2022) uz veće spomenute amine i aromatske amine navodi se da su vodikov peroksid i amonijak (oksidansi), standardni sastojci u trajnim bojama za kosu, povezani s oksidativnim stresom i citotoksičnim učincima u stanicama kože i vlasišta. Također navode da takav oksidativni stres može dovesti do reakcija poput dermatitisa i iritacije kože. Nadalje Lee i sur. (2015) nam govore o citotoksičnosti resorcinola, točnije o njegovom negativnom učinku na broj stanica u mitozi. Ovaj dokaz ukazuje da neki sastojci boja za kosu mogu imati negativne biološke učinke, osobito pri čestoj i dugotrajnoj izloženosti.

Ovim istraživanjem je potvrđen pretpostavka o citotoksičnom i genotoksičnom učinku sintetičkih boja za kosu. Uz spomenute hipoteze H2 i H3 uzimanjem u obzir svega navedenog potvrđene su i ostale hipoteze H1 i H4 koje govore kako su sintetičke boje toksičnije od prirodnih i da se povećanjem koncentracije boje povećava i njihov negativan učinak. Toksičnost sintetičkih boja (L'Oreal Paris Preference – trajna boja i Schwarzkopf LIVE Ultra Brights – privremena boja) dokazana je pomoću *Allium*-testa govori nam da učestalo korištenje boja za kosu ima negativan, štoviše toksičan učinak na ljudsko zdravlje kao i na okoliš izložen spomenutim bojama. Kao optimalno rješenje preporučujemo prirodnu boju Henna (Kanu) koja nije pokazala značajne toksične učinke te se smatra najsigurnijim izborom za primjenu. Za poboljšanje i proširenje istraživanja trebalo bi se uzeti više uzoraka različitih boja te informirati ljude o najštetnijima. Također, ovim istraživanjem dokazali smo toksičnost sintetičkih boja za kosu, a u novim istraživanjima trebalo bi se koncentrirati na preciznije podatke o toksičnom učinku na ljudsko zdravlje.

Istraživanje bi trebalo proširiti tako što bi se bazirali na sastav pojedinih boja i odredili genotoksičnost i citotoksičnost pojedinih sastojaka.

ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Sintetičke boje za kosu uzrokovale su veći stupanj citotoksičnosti i genotoksičnosti u korijenskim stanicama luka (*Allium cepa* L.) u odnosu na prirodne boje za kosu;

- Neki korjenčići iz otopina sintetičkih boja za kosu pokazuju morfološke promjene kao što su savijeni vrhovi, krhki, mekani i obojani korjenčići;
- Tretiranje korijena *Allium cepa* L. otopinama sintetičkih boja za kosu smanjuje mitotski indeks u odnosu na kontrolu i prirodne boje za kosu;
- Sintetičke boje za kosu uzrokovale su veći broj kromosomskih aberacija (fragmentirane jezgre, mikronukleusi) i interfaznih vakuola u stanicama korijena *Allium cepa* L. u usporedbi s prirodnim bojama i negativnom kontrolom.
- Povećanje koncentracije boja za kosu (sintetičkih i prirodnih) dovodi do porasta citotoksičnih i genotoksičnih učinaka;
- Prirodna boja kana pokazala se boljom inačicom te je u svim istraživanim segmentima uzrokovala manja ili ne značajna odstupanja u odnosu na negativnu probu.

LITERATURA

Ahmadi M., Saeedi M., Hedayatizadeh-Orman A., Eslami M., Janbabai G., Alizadeh-Navaei R. 2022. Association between hair dye use and cancer in women: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. African Health Sciences 22(2): 323–333.

Baptista F., Garcia P. V., Rodrigues A. S., Ladeira C. 2025. Genotoxicity and cytotoxicity assessment of volatile organic compounds in pathology professionals through the buccal micronuclei assay. Toxics 13(5): 411.

Belinak T. 2025. Kemijski utjecaj proizvodnje kozmetičkih sredstava na okoliš. Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb.

Cabaravdic M. 2010. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of cells to benzo(a)pyrene. Medicinski Arhiv 64(4): 221–224.

He L., Michailidou F., Gahlon H. L., Zeng W. 2022. Hair dye ingredients and potential health risks from exposure to hair dyeing. Chemical Research in Toxicology 35(6): 901–915.

Pavlica M., Balabanić J. 2016. Mutacije gena i kromosoma. U: Draganović Matekalo J., Genetika i evolucija, Školska knjiga, Zagreb, str. 41–45.

Radić S., Stipaničev D., Vujčić V., Marijanović Rajčić M., Širac S., Pevalek-Kozlina B. 2010. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. Science of the Total Environment 408(5): 1228–1233.

Roša J. 1998. Utjecaj fosfogipsa iz industrijskog odlagališta na hrast lužnjak (*Quercus robur*). Šumarski list 122(11–12): 491–506.

Sfarčić N. 2021. Boje za kosu: sastav, kvaliteta te utjecaj na pojavnost karcinoma dojke. Doktorska disertacija, Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Split.

Vareško A. 2019. Ispitivanje mutagenosti antiperspiranta i dezodoransa na korjenčićima luka. Bioznalac 5: 149–160.

Dulout F. N., Olivero O. A. 1984. Anaphase-telophase analysis of chromosomal damage induced by chemicals. Environmental Mutagenesis 6(3): 299–310.

Wang G. F., Dong Q., Bai Y., Yuan J., Xu Q., Cao C., Liu X. 2017. Oxidative stress induces mitotic arrest by inhibiting Aurora A-involved mitotic spindle formation. Free Radical Biology and Medicine 103: 177–187.

Grubišić T., Medić V. 2023. Ispitivanje toksičnosti troske iz Dugog Rata pomoću *Allium cepa* testa. Bioznalac 9: 142–155.

Utjecaj različitih frekvencija zvuka na rast i klijanje biljke graha

Nika Baričić, 4. razred
Marina Margetić, 4. razred

V. gimnazija, Zagreb
Mentor: *Romana Halapir Franković*

SAŽETAK
Ovim istraživanjem nastojao se proučiti utjecaj različitih frekvencija zvuka na klijanje i rast biljke graha *(Phaseolus vulgaris* L.). 60 sjemenki podijeljeno je u 6 skupina (od kojih je jedna bila kontrolna) te je svakoj skupini puštana odgovarajuća frekvencija zvuka (20, 100, 1000, 10 000 i 20 000 Hz). Svaka se skupina sastojala od dviju teglica te su one svaki dan bile odnesene u izoliranu prostoriju u kojoj im je puštana odgovarajuća frekvencija na 60 minuta. Rezultati su pokazali da frekvencija od 1000 Hz potiče klijanje sjemenke graha. Početna hipoteza da će niže frekvencije zvuka bolje utjecati na rast je opovrgnuta, no došlo je do metodološkog nedostatka; kontrolna skupina najbolje je rasla jer nije bila premještana tijekom istraživanja. Ako se kontrolna skupina ne uzima u obzir, više frekvencije bolje utječu na rast graha te je ustanovljeno da valna duljina optimalne frekvencije za rast biljaka odgovara širini njegovog lišća.

Ključne riječi: *bioakustika; valna duljina; visina biljke; širina lista; razvoj biljke graha*

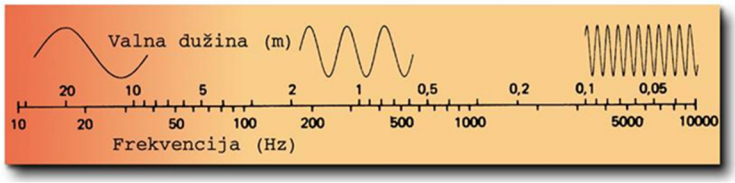
UVOD

Zvuk je česti način komunikacije u živom svijetu, pa tako i ponekad kod biljaka. Saznali smo da mogu prepoznati zvuk zujanja pčela (frekvencija 250-300Hz) i drugih oprašivača te stoga proizvesti nektar veće slatkoće (Veits i sur., 2019), što nas je potaklo na istraživanje.

Biostimulatori su proizvodi koji sadrže prirodne ili sintetičke tvari koje poboljšavaju fiziološke procese biljaka, čime se povećava njihova otpornost na stres, učinkovitost upotrebe hranjivih tvari i opći rast. Za razliku od klasičnih gnojiva koja opskrbljuju biljke hranjivim tvarima, biostimulatori djeluju na procese unutar biljaka, poboljšavajući njihovu sposobnost iskorištavanja dostupnih resursa i suočavanja s nepovoljnim uvjetima (Vitakemija, 2025). Dok su čimbenici poput vode, zraka, tla, temperature i dr. poznati i proučavani, postoji malo istraživanja o utjecaju zvuka na rast biljaka.

Zvuk je mehanički val te se širi prenošenjem poremećaja elastičnog medija, to jest titranjem čestica koje čine medij. Kažemo da zvuk ima frekvencije u rasponu od 20 Hz do 20 kHz, odnosno u rasponu u kojem ga čuje ljudsko uho. Frekvencije ispod 20 Hz naziva se infrazvukom, a zvuk iznad 20 kHz jest ultrazvuk. Zvuk nastaje periodičnim titranjem izvora zvuka koji u neposrednoj okolici mijenja tlak medija, poremećaj tlaka prenosi se na susjedne čestice medija i tako se širi u obliku uglavnom longitudinalnih valova u plinovima i tekućinama i longitudinalnih i transverzalnih valova u čvrstim tvarima. Zvuk se širi bez prijenosa mase, ali se zvukom prenose impulsi i energija. Valna duljina (λ) najkraća je udaljenost između dviju točaka koje titraju u fazi (slika 1). Jedan puni val ujedno predstavlja i jedan puni titraj čestice, a broj valova koji u sekundi prođu nekim mjestom naziva se frekvencijom tog vala (Hrvatska enciklopedija, 2013).

Zvuk putujući stvara valove kompresije i regresije tlaka. Kompresija rezultira pozitivnim tlakom (iznad atmosferskog), a regresija negativnim (ispod atmosferskog) i predstavlja se kao sinusoidna varijacija tlaka zraka. Brzina čestice proporcionalna je zvučnom tlaku. Čestice medija zvuka giba se po površini lista te ono stvara ribanje ili djelovanje četkanja po površini lista koje briše ustajali film vlage i olakšava biljci transpiraciju i omogućava brži ulazak CO_2 što utječe na proces fotosinteze (Collins i Foreman, 2001).

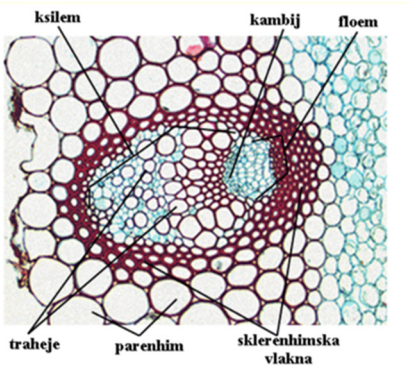


Slika 1 Valne duljine različitih frekvencija
Izvor: Audiologs, 2025.

Grah (*Phaseolus vulgaris* L.) biljka je koja raste na toplim područjima. Minimalna temperatura potrebna za klijanje je 10 do 12 °C, a idealna je oko 22 °C. Mlade biljke su osjetljive na niske temperature pa stradaju već na temperaturama manjima od -0,5 °C. Grahu treba mnogo svjetlosti, pogotovo u prvih 7 dana kad sjemenka klije te mu je potrebna velika količina vode (Gospodarski list, 2025). Biljka graha posjeduje tri tipa listova. Prvi su kotiledoni, zatim prvi par listova i treći tip su ostali listovi odrasle biljke. Prvi listovi su jednostavno građeni i nasuprotno položeni. Pravi listovi (slika 2) odnosno listovi odrasle biljke mogu biti složeni, sastavljeni iz tri liske na kratkim peteljkama od kojih je srednja liska nešto jače razvijena. Listovi se pojavljuju naizmjenično na stabljici, a liske po obliku mogu biti ovalne, romboidne, izdužene i slično. A njihova površina je prekrivena finim dlačicama (Golubov, 2018).

Slika 2 Izgled pravog lista graha
Izvor: Golubov, 2018.

Provodno (žilno) tkivo u biljaka (slika 3) sastoji se od dvije vrste provodnih elemenata. Jedan dio je ksilem, drveni dio žile kojeg čine mrtvi elementi koji provode vodu. Drugi dio je floem, živi dio koji provodi produkte fotosinteze (Strasburger i sur., 1978).



Slika 3 Poprečni presjek kroz stabljiku dvosupnice
Izvor: Botanic.hr, 2025

Način komunikacije među biljkama nije dovoljno istražen, no poznato je da biljke proizvode spontano zvuk relativno niskih frekvencija 50 Hz – 120 Hz ovisno o stadiju rasta i situaciji u kojoj se nalaze. Naime, biljke izložene stresu od suše doživljavaju kavitaciju – proces u kojem zračni mjehurići nastaju, šire se i rasprsnu se u ksilemu, mrtvom provodnom elementu, uzrokujući vibracije (Cochard i sur., 2013).

Zvučni valovi utječu na stanični ciklus biljke, vibraciju lišća i protoplazmatsko kretanje u stanicama biljke, te poboljšanje procesa fotosinteze (Xiujuan i sur., 2003).

Zvuk stimulira otvaranje puči lista te se time povećava učinkovitost upijanja tvari preko lista (Carlson, 2013). Dokazano je da zvučna stimulacija snižava potrebu za kemijskim gnojivima i pesticidima (15 - 25%), povećava otpornost na bolesti te da može poslužiti kao herbicid (Hassanien i sur., 2014).

U dosad provedenim istraživanjima dokazano je da drukčije frekvencije zvuka imaju različit utjecaj na rast biljaka, ali nije ustanovljeno da nužno vrlo visoke frekvencije najbolje utječu na rast biljke, već da postoji optimalna frekvencija za svaku biljku (Collins i Foreman, 2001).

Ciljevi istraživanja:

1. Utvrditi kako promjena visine frekvencije zvuka kojoj su izložene biljke graha utječe na njihov rast i razvoj.
2. Odrediti optimalnu frekvenciju zvuka, to jest optimalni raspon frekvencija zvuka za ubrzani rast i razvoj biljke graha.
3. Istražiti koja je granica između pozitivnog djelovanja (ubrzavanja rasta) te negativnog djelovanja (usporavanja rasta) frekvencija na biljku graha.

S obzirom na saznanje da biljke mogu spontano proizvoditi zvuk frekvencije 50 – 120 Hz, glavna hipoteza ovog istraživanja jest da će niže frekvencije ubrzati klijanje i rast te da će biljke u tim skupinama imati veću površinu plojki od biljaka u skupinama tretiranim višim frekvencijama.

METODE

Tijekom istraživanja praćen je rast običnog graha (*Phaseolus vulgaris* L.) koji je odabran su zbog lake dostupnosti, nezahtjevnosti brige i brzog klijanja.

Istraživanje je provedeno na 60 sjemenki graha podijeljenih u 6 skupina po 10 sjemenki od čega je jedna skupina kontrolna. Svaka skupina sastojala se od dvije teglice (60 x 15 x 15; 40 x 15 x 15) u kojima je bilo po 5 sjemenki. Svaka od 5 skupina bila je izložena jednoj od izabranih frekvencija zvuka (20, 100, 1000, 10 000 i 20 000 Hz). Frekvencije od 20 i 20 000 Hz odabrane su kao ekstremi spektra koje čuje ljudsko uho. Biljke mogu spontano proizvoditi frekvencije u rasponu 50 – 120 Hz (Cochard i sur., 2013) te je stoga odabrana frekvencija od 100 Hz za jednu od skupina. Odabrane frekvencije (pronađene na YouTube-u) po skupinama bile su raspoređene kao:
1. skupina - 20 Hz, λ = 17 m (https://www.youtube.com/watch?v=riVal-VBLzg)
2. skupina - 100 Hz, λ = 3 m (https://www.youtube.com/watch?v=Cdi0jQtMqV8)
3. skupina - 1000 Hz, λ = 34 cm (https://www.youtube.com/watch?v=TbPh0pmNjo8)
4. skupina - 10 000 Hz, λ = 3,4 cm (https://www.youtube.com/watch?v=y412fwrht3E)
5. skupina - 20 000 Hz, λ = 1,7 cm (https://www.youtube.com/watch?v=0DyVytR5aO4)
kontrolna skupina – nije bila izložena frekvencijama.

Sjemenke su preko noći ostavljene u vodi iz slavine sobne temperature te su sljedeći dan posađene. Teglice su napunjene do polovine visine zemljom za biljke marke *Compo* (kupljene u *Bauhausu*). Sastav korištene zemlje: 200 – 450 mg/L topivi dušik (N) (CaCl2), 200 – 500 mg/L topivog fosfornog pentoksida (P2O5) (CAL), 300 – 600 mg/L topljivog kalijevog oksida (K2O) (CAL).

Smještene su u izoliranoj prostoriji u podrumu škole sobne temperature (20 °C). Svaki dan prostorija se provjetravala dva sata. Budući da u toj prostoriji nema dovoljno sunčeve svjetlosti, kao zamjenu za nju korištene su tri LED žarulje jačine 600 lm jer je utvrđeno da biljke graha izložene svjetlosti LED

žarulja jačine oko 1800 lm rastu najsličnije biljkama graha koje rastu na sunčevoj svjetlosti (u usporedbi s ostalim umjetnim izvorima svjetlosti (Periša, 2018)). Žarulje su postavljene na 60 cm visine od dna teglica te su ravnomjerno postavljene s obzirom na teglice. Rasvjeta je bila uključena preko noći (kako bi se preko dana mogle puštati frekvencije) 9 sati jer je danje svjetlo u ovo doba godine (veljača) prosječno dugo 9 sati (Zvjezdarnica Zagreb, 2025).

Slika 4 Postav teglica i žarulja u školskom podrumu

Slika 5 Led žarulje korištene tijekom istraživanja
Izvor: Bauhaus, 2025

Dok nisu proklijale, sve sjemenke su zalijevane s 5 mL vode iz slavine svaki dan, a nakon klijanja prema potrebi. Svaka skupina bila je jednako zalijevana.

Svaki su dan skupine, jedna po jedna, bile udaljene od ostalih (odnesene u drugu prostoriju i postavljene u ormarić) te su bile izložene određenoj frekvenciji zvuka, ovisno o skupini, na 60 minuta. Ormarić je iznutra obložen stiroporom i pokriven dekama kako bi se smanjio utjecaj zvukova iz okoline na biljke. Za puštanje frekvencija korišten je prijenosni bluetooth zvučnik Sony SRS-XB10 na jačini od 60 dB koji je postavljen u isti ormarić, pokraj teglica.

Rast biljaka praćen je 21 dan. Visina stabljike prvi je put izmjerena nakon 7 dana te je nakon toga mjerena svaka tri dana te je izračunata prosječna vrijednost visine po skupinama. Pri svakom mjerenju visine prebrojane su proklijane sjemenke te izračunat postotak. Također je na svaki dan mjerenja zabilježeno kojim biljkama su narasla prva dva i kojima prvi pravi listovi.

Zadnji dan istraživanja odrezani su prvi par listova i prvi pravi listovi sa svake stabljike te im je izmjerena površina plojki preko programa *SketchAndCalc Area Calculator*. Određena je prosječna vrijednost površine plojki prvog para listova po stabljici i ukupna prosječna površina plojki zbroja površina prvih pravih listova. Iz tih podataka izračunate su prosječne vrijednosti po skupinama. Nakon prikupljenih podataka napravljen je ANOVA test te Tukey HSD post hoc analiza kojim je utvrđeno između kojih skupina se nalazi statistički značajna razlika. Za značajnu razliku uzeta je p-vrijednost manja od 0,05. Navedena statistička obrada provedena je preko stranice *Social Science Statistics* (Social Science Statistics, 2025).

REZULTATI

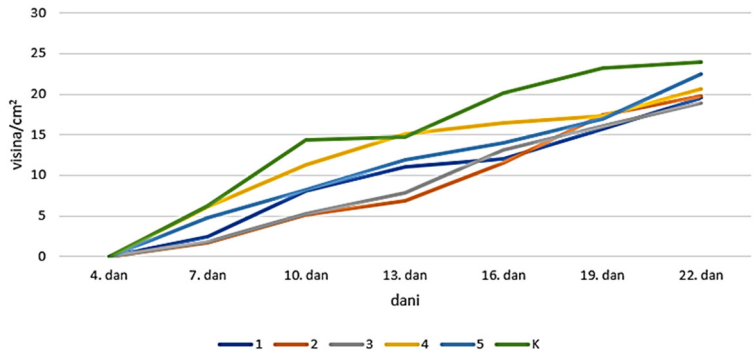
Dobiveni rezultati ne potvrđuju hipotezu da će niže frekvencije ubrzati rast biljke graha jer su bolji utjecaj na rast graha imale više frekvencije. U tablici 1 prikazan je postotak proklijalih sjemenki po skupinama kroz dane.

Tablica 1 Postotak proklijalih sjemenki po skupinama kroz dane

	7. dan	10. dan	13. dan	16. dan	19. dan	22. dan
1. skupina	75%	87%	87%	100%	100%	100%
2. skupina	85%	85%	85%	85%	85%	100%
3. skupina	90%	100%	100%	100%	100%	100%
4. skupina	71%	100%	100%	100%	100%	100%
5. skupina	88%	100%	100%	100%	100%	100%
kontrola	88%	88%	100%	100%	100%	100%

Na slici 6 prikazana je promjena visine biljaka kroz dane po skupinama u centimetrima. Za svaku skupinu izračunata je prosječna visina po danu svaka tri dana. Vidljivo je kako je kontrolna skupina imala najbolji rast, a 3. skupina (1000 Hz) najslabiji. Među ispitanim skupinama najviše je u visinu narasla 5. skupina kojoj se puštala frekvencija od 20 000 Hz. Uočljivo je kako brzine rasta po skupinama nisu konstantne i nisu proporcionalni s visinom frekvencije zvuka, već su promjenjive.

U početku je najviše rasla 4. skupina kojoj je puštana frekvencija od 10 000 Hz, valne duljine 3,4 cm, dok je nakon 20. dana naglo narasla 5. skupina kojoj se puštao zvuk frekvencije 20 000 Hz, valne duljine 1,7 cm. Ovi rezultati u skladu su sa zaključkom Collinsa i Foremana (2001) da najbolje rastu skupine izložene frekvencijama valnih duljina koje su jednake prosječnoj širini lista (koja je u njihovom eksperimentu određena prema površini lista kontrolne skupine). U našem istraživanju, unutar perioda od 7. dana do 13. dana 4. skupina ima najveću visinu (jer valna duljina frekvencije odgovara prosječnoj širini lista).



Slika 6 Promjena prosječne visine biljaka u cm po skupinama tijekom dana

Pojavom prvih pravih listova 5. skupini frekvencija od 20 000 Hz postaje optimalna te joj se rast naglo ubrzava. Između 19. i 22. dana brzina rasta 5. skupine nastavlja se povećavati, a u podatcima 4. skupine pojavljuje se blagi porast brzine jer je jednoj od biljaka 19. dana izrastao prvi par listova koji je povećao prosječnu visinu skupine. Također, 4. i 5. skupina imale su najveću brzinu rasta prvih dvaju i prvih pravih listova. Ostalim skupinama nije moguće pronaći pravilnost u rezultatima prosječne visine s obzirom na to da im valne duljine frekvencija kojima su bile izložene nikada nisu odgovarale širini lišća.
U tablici 2 prikazan je udio biljaka po skupinama kojima su izrasli prva dva lista istraživanja, a u tablici 3 prikazan je udio biljaka po skupinama kojima su izrasli prvi pravi listovi tijekom istraživanja.

Tablica 2 Postotak biljaka po skupinama kojima su izrasla prva dva lista

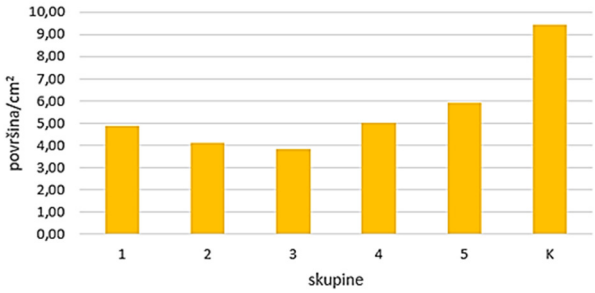
	7. dan	10. dan	13. dan	16. dan	19. dan	22. dan
1. skupina	0%	25%	50%	75%	87.5%	100%
2. skupina	0%	29%	29%	71%	86%	86%
3. skupina	0%	20%	30%	80%	80%	80%
4. skupina	14%	57%	71%	86%	100%	100%
5. skupina	22%	44%	67%	89%	100%	100%
kontrola	22%	56%	67%	100%	100%	100%

Tablica 3 Postotak biljaka po skupinama kojima su izrasli prvi pravi listovi

	7. dan	10. dan	13. dan	16. dan	19. dan	22. dan
1. skupina	0%	12.5%	12.5%	37.5%	37.5%	37.5%
2. skupina	0%	0%	0%	14%	14%	29%
3. skupina	0%	10%	20%	20%	30%	30%
4. skupina	0%	14%	43%	57%	57%	57%
5. skupina	0%	11%	22%	22%	44%	44%
Kontrola	0%	33%	33%	56%	56%	56%

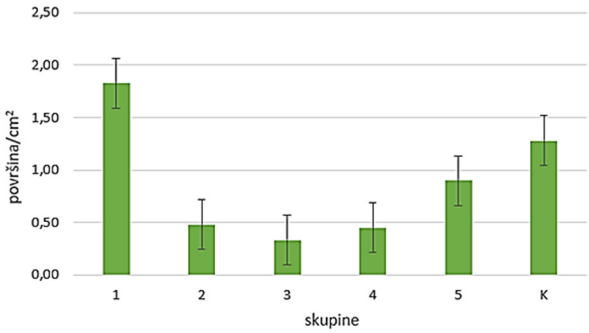
U kontrolnoj skupini našeg istraživanja prosječna širina plojki prvog para listova iznosila je 4,75 cm što je najbliže valnoj duljini zvuka frekvencije 10 000 Hz, no prosječna širina plojki prvih pravih listova izraslih oko 20. dana istraživanja iznosila je 1,13 cm što je najbliže valnoj duljini zvuka frekvencije 20 000 Hz Iz navedenog se može zaključiti da je optimalna frekvencija zvuka za rast biljke graha promjenjiva s obzirom na stadij rasta i broju listova. Slične rezultate navode Hassanien i sur. (2014) u svojem pregledu literature utjecaja zvučnih valova na različite parametre rasta biljke u različitim fazama rasta).

Najveću prosječnu površinu prvog para listova po stabljici imala je kontrola skupina, a zatim peta skupina (slika 7). Najmanju površinu imala je treća skupina.



Slika 7 Ukupna prosječna površina plojki prvog para listova stabljici u cm² po skupinama

Slično prvom paru listova, treći, prvi pravi listovi imali su najveću površinu u kontrolnoj skupini, a zatim u petoj skupini (Slika 8). Najmanju površinu imali su listovi u trećoj skupini.



Slika 8 Ukupna prosječna površina plojki prvih pravih listova u cm² po skupinama

RASPRAVA

Prema dobivenim rezultatima vidljivo je kako je 3. skupina, kojoj je puštana frekvencija od 1000 Hz, najbrže klijala. U pregledu literature Hassanien i sur. (2014) navodi se kako frekvencije raspona 400 – 800 Hz ubrzavaju klijanje što je u skladu s dobivenim rezultatima. Hipoteza da će biljke izložene nižim frekvencijama imati lišće veće površine također nije potvrđena, naprotiv, istraživanje je pokazalo suprotno. Biljke izložene višim frekvencijama imaju veću površinu plojki. Pretpostavlja se da je kontrolna skupina najbolje rasla jer je ona jedina skupina koja je tijekom cijelog istraživanja bila u jednoj prostoriji. Ostale su teglice stepenicama nošene u drugu prostoriju što je dovelo do mehanički uzrokovanog stresa i usporilo njihov rast (Biddington, 1986). Smatra se da su ispitane skupine od početka trebale biti u odvojenim prostorijama ili komorama, kao što je učinjeno u radu Collinsa i Foremana (2001), pod jednakim uvjetima kako bi se izbjegao stres. Naime, takvi uvjeti nisu mogli biti omogućeni jer je istraživanje provedeno u školskim uvjetima i u ograničenom prostoru. Na rezultate su još mogli utjecati građevinski radovi i proizvedene buke za vrijeme istraživanja. ANOVA testom dobivene se statistički neznačajne p-vrijednosti zbog nedovoljnog broja uzoraka za pravilnu statističku

obradu podataka. Na temelju dobivenih rezultata, pod uvjetom da zanemarimo kontrolnu skupinu, može se zaključiti da više frekvencije zvuka bolje utječu na rast i razvoj graha.

ZAKLJUČCI

Na osnovi provedenog istraživanja izvedeni su sljedeći zaključci:

- valna duljina optimalne frekvencije za rast biljaka odgovara širini njegovog lišća;
- optimalna frekvencija ovisi o stadiju rasta biljke;
- niže frekvencije bolje utječu na klijanje graha;
- više frekvencije bolje utječu na rast graha;
- mehanički stres (uzrokovan premještanjem teglica) usporava rast graha.

LITERATURA

Audiologs. 2025. Bilan Audio Site. https://www.audiologs.com/ozrenbilan/osnovez.htm, pristupljeno 5.3.2025.
Bauhaus. 2025. Green Tech LED žarulja (E27, Hladna bijela, 600 lm, 6 W) https://www.bauhaus.hr/led-zarulje/green-tech-led-zarulja-wi-fi/, pristupljeno 30.1.2025.
Benko B. 2022. Uzgoj graha mahunara. Gospodarski list, https://gospodarski.hr/rubrike/povrcarstvo-rubrike/uzgoj-grahamahunara/, pristupljeno 15.2.2025.
Biddington N. L. 1986. The effects of mechanically-induced stress in plants — a review. Plant Growth Regul 4: 103–123
Botanic.hr. 2025. Botanički praktikum On-line. http://www.botanic.hr/praktikum/Ranun_repe4.htm, pristupljeno 17.1.2025.
Carlson D. 2013. Sonic bloom. https://dancarlsonsonicbloom.com/, pristupljeno 17.1.2025.
Cochard H., Badel E., Herbette S., Delzon S., Choat B., Jansen S. 2013. Methods for measuring plant vulnerability to cavitation: a critical review. Journal of Experimental Biology 64: 4779–4791.
Collins M. E., Foreman J. E. K. 2001. The effect of sound on the growth of plants. Canadian Acoustics 2(29): 3–8.
Golubov F. 2018. Tehnologija uzgoja graha (*Phaseolus vulgaris* L.). Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Osijek.
Hassanien R. H. E., Tian-zhen H., Yu-feng L., Bao-ming L. 2014. Advances in effects of sound waves on plants. Journal of Integrative Agriculture 13(2): 335–348.
Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2013. – 2025. https://www.enciklopedija.hr/clanak/zvuk, pristupljeno 11.1.2025.
Periša L. 2018. Utjecaj različitih izvora svjetlosti na rast i razvoj biljaka. Bioznalac 4: 80–92.
Social Science Statistics. 2025. Social Science Statistics, https://www.socscistatistics.com/, pristupljeno 30.1.2025.
Strasburger E., Noll F., Schneck H., Schimper A. F. W. 1978. Provodna tkiva. U: Strasburgcr, E., Noll F., Schenck H. i Schimper A. F. W., Udžbenik botanike za visoke škole - Morfologija i fiziologija. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, str. 127–134.
Veits M., Khait I., Obolski U., Zinger E., Boonman A., Goldshtein A., Saban K., Seltzer R., Ben-Dor U., Estlein P., Kabat A., Peretz D., Ratzersdorfer I., Krylov S., Chamovitz D., Sapir Y., Yovel Y., Hadany L. 2019. Flowers respond to pollinator sound within minutes by increasing nectar sugar concentration. Ecology Letters 22: 1483–1492.
Vitakemija. 2025. Biostimulatori. Vitakemija, https://www.vitakemija.hr/biostimulatori, pristupljeno 22.2.2025.
Xiujuan W., Bochu W., Yi J., Chuanren D. i Sakanishi A. 2003. Effect of sound wave on the synthesis of nucleic acid and protein in chrysanthemum. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 29: 99–102.
Zvjezdarnica Zagreb. 2025. Izlasci i zalasci Sunca u Zagrebu. Zvjezdarnica Zagreb, https://zvjezdarnica.hr/znanost/izlazak-i-zalazak-sunca-u-zagrebu/, pristupljeno 22.2.2025.

Usporedba redukcijske snage i bioloških učinaka biljnih ekstrakata u ROS-ovisnim procesima

***Anton Ladović*, 4. razred**

Gimnazija Petra Preradovića Virovitica, Virovitica

Mentor: *Borna Louvar*

SAŽETAK

Provedeno je istraživanje s ciljem usporedbe redukcijske snage i bioloških učinaka biljnih ekstrakata bijelog čaja (*Camellia sinensis*), kamilice (*Matricaria chamomilla*) i matičnjaka (*Melissa officinalis*) u procesima povezanima s djelovanjem reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Vodeni biljni ekstrakti pripremljeni su metodom hladne maceracije u koncentracijama od 1 % i 5 % te su ispitani pomoću triju testova dostupnih u školskim uvjetima. Kemijskim testom s otopinom kalijevog permanganata procijenjena je redukcijska snaga biljnih ekstrakata, enzimskim testom ispitan je njihov učinak na aktivnost katalaze u stanicama pivskog kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*), a fiziološkim testom praćen je utjecaj predtretmana sjemenki rotkvice (*Raphanus sativus*) na klijavost i duljinu korjenčića, koji su ovisni o fiziološkom djelovanju ROS-a. Rezultati kemijskog testa pokazali su da kod ekstrakta bijelog čaja nema statistički značajne razlike u antioksidativnoj aktivnosti između niže i više koncentracije, dok je kod kamilice i matičnjaka zabilježen porast antioksidativne aktivnosti povećanjem koncentracije. U enzimskom testu nije utvrđena statistički značajna promjena aktivnosti katalaze. U fiziološkom testu nisu uočene veće razlike u klijavosti sjemenki između više i niže koncentracije istog biljnog ekstrakta, što je vidljivo iz sličnih postotaka klijavosti. Razlike su zabilježene u duljini korjenčića, pri čemu su ekstrakti bijelog čaja, suprotno njegovu očekivanju, djelovali stimulativno na rast, dok su kamilica i matičnjak djelovali inhibicijski. Dobiveni rezultati pokazuju da visoka redukcijska snaga biljnih ekstrakata nije nužno jednaka njihovom biološkom učinku u živim sustavima te da je za razumijevanje njihova djelovanja potrebno koristiti i kemijske i biološke testove.

Ključne riječi: *oksidativni stres; prooksidans; vodikov peroksid; doza-ovisni učinak*

UVOD

Prema Svjetskoj organizaciji za koroziju (Hays, 2016), procjenjuje se da korozija metala svake godine uzrokuje goleme štete na vozilima i građevinama diljem svijeta. No, pojava slična koroziji ne prijeti samo metalima, nego i živim bićima. I unutar naših stanica svakodnevno se odvijaju slične reakcije koje ih postupno oštećuju. Zanimljivo je da iza oba procesa stoji isti kemijski element – kisik. Tijekom staničnog disanja u mitohondrijima, osim stvaranja ATP-a, dolazi i do nastanka štetnih spojeva koje nazivamo reaktivnim kisikovim vrstama (ROS, engl. Reactive Oxygen Species), među kojima su najpoznatiji superoksidni anion (O_2^-•) i hidroksilni radikal (•OH). Ovi se spojevi nazivaju se slobodnim radikalima jer sadrže jedan nespareni elektron, zbog čega su vrlo reaktivni i snažni oksidansi. Vodikov peroksid (H_2O_2) nema nesparene elektrone pa pripada neradikalnim reaktivnim vrstama. Ipak, u reakciji s prijelaznim metalima može postati izvor vrlo reaktivnih •OH (Sotler i sur., 2019).

Tijekom milijuna godina evolucije organizmi su razvili različite antioksidanse kako bi se obranili od prekomjernog stvaranja ROS, tj. oksidativnog stresa. Budući da su biljke sesilne i neprestano izložene promjenama u okolišu, ti su im zaštitni mehanizmi posebno važni. Antioksidansi mogu biti enzimski kao što je katalaza koja razgrađuje H_2O_2 na vodu (H_2O) i kisik (O_2), ili neenzimski, poput fenola i karotenoida (Sotler i sur., 2019). Fenolni spojevi su među najvažnijim biljnim antioksidansima, a građeni su od jednog ili više aromatskih prstenova s jednom (fenoli) ili više (polifenoli) fenolnih –OH skupina. Njihova antioksidativna uloga temelji se na doniranju elektrona ili atoma vodika iz svoje –OH skupine ROS-u, čime ga reduciraju i smanjuju njegovo štetno djelovanje. Pritom se fenolni spoj sam

oksidira u stabilniji fenoksilni radikal (slika 1). Ovakva sposobnost antioksidansa, da prijenosom elektrona (ili vodikovog atoma), reducira oksidans naziva se redukcijska snaga (Zagoskina i sur., 2023). Redukcijska snaga je kemijsko svojstvo antioksidansa, čija se biološka uloga može dodatno provjeriti u pokusima s enzimima i živim stanicama.

$$X^{\bullet} + AH \rightarrow XH + A^{\bullet}$$

Slika 1 Neutralizacija ROS-a (X•) antioksidansom (AH). Slobodni radikal X• preuzima vodikov atom iz molekule antioksidansa AH, čime nastaje stabilna molekula XH te stabilni radikal antioksidansa A•
Izvor: Echegaray i sur., 2021

Za istraživanje antioksidativne aktivnosti i bioloških učinaka povezanih s ROS-om odabrane su sljedeće biljne vrste: bijeli čaj (*Camellia sinensis*), kamilica (*Matricaria chamomilla*) i matičnjak (*Melissa officinalis*). Ove su biljne vrste odabrane jer su svima dobro poznate, lako se mogu nabaviti i izvor su bioaktivnih spojeva koji se mogu ekstrahirati vodom. Iako se najčešće konzumiraju u obliku toplih čajeva, u ovom istraživanju primijenjena je metoda maceracije vodom na sobnoj temperaturi kako bi se očuvali spojevi osjetljivi na visoku temperaturu. Stoljećima se brojne biljne vrste zbog svog blagotvornog djelovanja koriste za ublažavanje tegoba. Danas je poznato da njihov učinak uvelike ovisi i o fenolnim spojevima koje sadrže. Fenolni spojevi su vrlo raznolika skupina, a u ovom istraživanju opisani su oni najzastupljeniji u analiziranim biljkama.

U svom preglednom radu, McKay i Blumberg (2006) navode da kamilica sadrži brojne bioaktivne spojeve, ponajprije flavonoide, među kojima se ističe apigenin. Prema njihovim navodima, kamilica pokazuje antioksidativno, antimikrobno i protuupalno djelovanje, što je potvrđeno u istraživanjima na životinjama. Apigenin je flavonoid građen od triju aromatskih prstenova i sadrži tri –OH skupine. U svojoj preglednoj analizi, Somavanshi i sur. (2021) ističu da bijeli čaj obiluje flavonoidima, osobito katehinima, među kojima je najznačajniji epigalokatehin galat (EGCG). Autori navode da EGCG pokazuje snažno antioksidativno djelovanje te inhibira enzime povezane sa starenjem kože, poput elastaze i kolagenaze. EGCG je građen od triju aromatskih prstenova i sadrži ukupno osam –OH skupina. U svom eksperimentalnom radu, Ghazizadeh i sur. (2020) pokazali su da ekstrakt matičnjaka sadrži fenolne kiseline, među kojima se kao glavni bioaktivni spoj ističe rosmarinska kiselina. Prema njihovim rezultatima matičnjak smanjuje oksidativni stres i povećava aktivnost antioksidativnih enzima u organizmu. Rosmarinska kiselina građena je od dvaju aromatskih prstenova, sadrži četiri –OH skupine te jednu karboksilnu skupinu (–COOH), koja joj daje kiseli karakter.

Odnos između antioksidansa i ROS-a složeniji je nego što se na prvi pogled čini, jer antioksidansi u određenim uvjetima mogu djelovati i prooksidativno, osobito u prisutnosti prijelaznih metala. Primjer je askorbinska kiselina koja u prisutnosti iona željeza može reducirati Fe^{3+} u Fe^{2+}, a takvi ioni mogu reagirati s H_2O_2 i stvarati slobodne radikale •OH (Sotler i sur., 2019). S druge strane, ROS ne djeluju uvijek štetno. U odgovarajućim količinama ROS oksidiraju ključne embrionalne proteine, čime se prekida dormantnost sjemena i potiče početak klijanja (Oracz i sur., 2007). Zbog toga se u ovom istraživanju očekuje da veće koncentracije biljnih ekstrakata mogu inhibirati procese ovisne o ROS-u, poput klijanja.

Postoji više specifičnih testova za procjenu antioksidativne aktivnosti, među kojima je jedan od najčešće korištenih DPPH test, koji se temelji na mjerenju promjene apsorbancije nastale redukcijom slobodnog radikala DPPH. Međutim, reagens za ovaj test je teško dostupan, toksičan i zahtijeva uporabu spektrofotometra (Amponsah i sur., 2016). Zbog toga su u ovom istraživanju odabrana tri

modificirana testa koja omogućuju ispitivanje djelovanja biljnih ekstrakata na različitim razinama. Prvi test prikazuje izravnu kemijsku antioksidativnu aktivnost biljnih ekstrakata prema modelnom oksidansu, dok druga dva prikazuju biološke učinke povezane s procesima ovisnima o ROS-u:

1. **kemijski test** – mjeri sposobnost biljnih ekstrakata da reduciranjem smanje oksidativno djelovanje modelnog oksidansa, odnosno permanganatnih iona (MnO_4^-)
2. **enzimski test** – mjeri učinak biljnih ekstrakata na aktivnost katalaze u razgradnji H_2O_2 u stanicama kvasca
3. **fiziološki test** – mjeri kako predtretman biljnim ekstraktima utječe na klijavost i rast korjenčića, procesima koji ovise o razini ROS-a.

Svrha ovoga istraživanja bila je ispitati povezanost između kemijske redukcijske snage biljnih ekstrakata i njihovih bioloških učinaka u procesima ovisnima o ROS-u, odnosno može li se na temelju njihova kemijskog djelovanja predvidjeti učinak u živim sustavima. Nezavisne varijable su vrsta biljnih ekstrakata i njihova koncentracija, a zavisne varijable stupanj redukcije MnO_4^-, aktivnost katalaze te postotak klijavosti i duljina korjenčića. Na temelju postavljene svrhe, cilj je bio ispitati djelovanje ekstrakata bijelog čaja, kamilice i matičnjaka na kemijskoj, enzimskoj i fiziološkoj razini te usporediti njihove učinke pri koncentracijama od 1 % i 5 %, kako unutar pojedinih biljnih vrsta tako i među ispitivanim vrstama.

U skladu s postavljenim ciljevima istraživanja, provjerene su sljedeće hipoteze:

1) Ekstrakti veće koncentracije (5 %) pokazat će veću antioksidativnu aktivnost u kemijskom testu s $KMnO_4$ u odnosu na ekstrakte niže koncentracije (1 %);
2) Ekstrakti veće koncentracije (5 %) uzrokovat će statistički značajnu promjenu aktivnosti katalaze u razgradnji H_2O_2 u odnosu na referentnu kontrolu i ekstrakte niže koncentracije (1 %);
3) Ekstrakti veće koncentracije (5 %) pokazat će jači učinak u fiziološkom testu klijavosti te će smanjiti postotak klijavosti i prosječnu duljinu korjenčića u odnosu na ekstrakte niže koncentracije (1 %);
4) Učinci biljnih ekstrakata razlikovat će se među biljnim vrstama, pri čemu se očekuje da će intenzitet kemijskog i biološkog učinka slijediti redoslijed: bijeli čaj > matičnjak > kamilica.

Poticaj za odabir ove teme bila je spoznaja da se redukcijska snaga biljnih ekstrakata može mjeriti i bez uporabe spektrofotometra. Osim toga, rezultati kemijskih testova ne moraju nužno pokazivati učinak koji ekstrakti imaju u živim organizmima. Stoga su u ovom istraživanju, uz kemijski test, primijenjena i dva biološka testa. Njima se procjenjivao učinak ekstrakata na aktivnost katalaze u stanicama kvasca izloženima oksidativnom stresu te na proces klijanja, koji je povezan s razinom ROS-a, uz poseban naglasak na doza-ovisni učinak.

METODE RADA

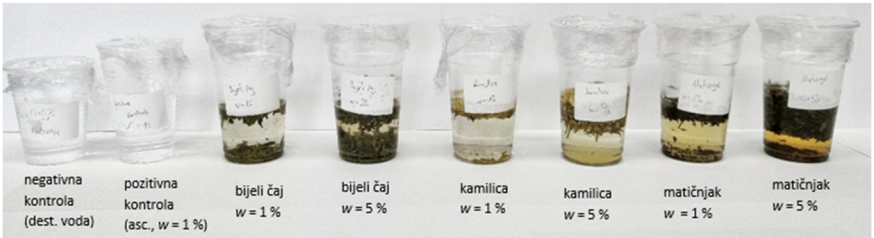
U ovom istraživanju ispitani su vodeni ekstrakti komercijalno nabavljenih suhih listova bijelog čaja (*Camellia sinensis*, „Yunnan Special“, Harissa Spice Store, Zagreb, Hrvatska; zemlja podrijetla: Kina), suhih cvjetova kamilice (*Matricaria chamomilla* L., Pampa Tea, Koprivnica, Hrvatska) i suhih listova matičnjaka (*Melissa officinalis* L., Suban d.o.o., Strmec, Hrvatska). Kao pozitivna kontrola korišten je vitamin C u obliku čiste askorbinske kiseline (SilaVit Vitamin C Pulver, Mivolis GmbH, Njemačka; čistoća 100 %), dok je kao negativna kontrola ili referentna kontrola korištena destilirana voda. Za svaki test pripremljena je nova otopina biljnih ekstrakata i kontrola. Ispitivani uzorci prikazani su na slici 2.

Prije provođenja testova provedeno je mjerenje pH vrijednosti biljnih ekstrakata te pozitivne i negativne kontrole. Za mjerenje pH korišteni su pH-indikator papirići pH-Fix 0–14 PT proizvođača Macherey-Nagel. Kemijski i enzimski test izvedeni su u učionici škole, dok je fiziološki test proveden u kući učenika, autora istraživačkog rada. Sva mjerenja organizirana su po danima prema sljedećem redoslijedu: najprije kemijski test, zatim enzimski test, a na kraju fiziološki test. Nakon provedenih i zabilježenih mjerenja provedena je statistička analiza podataka te izrađeni grafovi za svaki pojedini test.

Slika 2 Shematski prikaz ispitivanih biljnih uzoraka s masenim udjelima od 1 % i 5 % te kontrola
Autor: Ladović A., 2026.

Priprema biljnih ekstrakata

Biljni ekstrakti pripremljeni su potapanjem 1,01 g suhog biljnog materijala za pripravu 1 %-tnog ekstrakta te 5,26 g za 5 %-tni ekstrakt u 100 g destilirane vode. Koncentracija ekstrakta izračunata je kao maseni udio (%) prema formuli: $w(\%) = \frac{m_{tvari}}{m_{tvari} + m_{vode}} \cdot 100$ gdje je m_{tvari} masa biljnog materijala (g), a m_{vode} masa destilirane vode (g). Odabrane koncentracije omogućuju usporedbu učinka dviju različitih doza biljnih ekstrakata u kemijskom, enzimskom i fiziološkom testu. Budući da sastav ekstrakata nije točno određen, dobiveni rezultati se odnose na djelovanje cijelog biljnog ekstrakta, a ne na pojedine tvari. Maceracija je provedena tijekom 24 sata na sobnoj temperaturi, u plastičnim čašama. Biljni materijal prethodno je usitnjen u tarioniku. Čaše s uzorcima bile su prekrivene plastičnom folijom i pohranjene u tamnom ormaru kako bi se smanjio utjecaj svjetlosti. Nakon maceracije, svi ekstrakti filtrirani su kroz dvostruki sloj sterilne gaze, pri čemu je za svaki uzorak korišten novi sloj gaze. Askorbinska kiselina u prahu otopljena je u 100 g destilirane vode (1,01 g), čime je dobivena 1 %-tna otopina koja odgovara najnižoj ispitivanoj koncentraciji biljnih ekstrakata. Destilirana voda korištena za pripremu pozitivne, negativne i referentne kontrole također je ostavljena na sobnoj temperaturi tijekom 24 sata kako bi se osigurali jednaki uvjeti izlaganja kao i kod biljnih ekstrakata. Sve plastične čaše označene su nazivom biljne vrste i masenim udjelom (slika 3).



Slika 3 Biljni dijelovi uronjeni u destiliranu vodu za maceraciju (w = 1 % i 5 %)
Autor: Ladović A., 2026.

Kemijski test biljnih ekstrakata u otopini $KMnO_4$

Za ispitivanje antioksidativne aktivnosti korištena je razrijeđena otopina $KMnO_4$, a tijek reakcije praćen je vizualnim opažanjem karakteristične promjene boje permanganatnog iona (MnO_4^-). Polazna otopina

$KMnO_4$ pripremljena je otapanjem 0,10 g tvari u 100 mL destilirane vode. Iz polazne je otopine odmjeren 1 mL te razrijeđen s 499 mL destilirane vode (razrjeđenje 1:500). Za svako ispitivanje u Erlenmeyerovoj tikvici odmjereno je 20 mL pripremljene radne otopine $KMnO_4$, a biljni je ekstrakt dodavan kapalicom, uz lagano miješanje nakon svake dodane kapi. Prethodno je volumen kapi određen kalibracijom, pri čemu je utvrđeno da 10 kapi odgovara volumenu od 0,5 mL, što znači da jedna kap ima približan volumen od 0,05 mL. Za svaki je uzorak bilježen broj kapi potreban za postizanje trajne promjene boje. Zbog mogućih razlika u veličini kapi i vizualne procjene boje, rezultati ovog testa služe samo za usporedbu uzoraka. Svaki je uzorak ispitivan u šest ponavljanja i to u dvije odvojene serije pokusa, koje su uključivale pozitivnu kontrolu (askorbinska kiselina) i negativnu kontrolu (destiliranu vodu). Metoda je djelomično prilagođena prema radu Amponsah i sur. (2016), u kojem je redukcija MnO_4^- provedena pomoću taninske kiseline i mjerena spektrofotometrom. Antioksidativna aktivnost (AA) određena je prema formuli: $\mathrm{AA}\ (\%) = \left(\frac{N_{neg} - N_{ekstrakt}}{N_{neg} - N_{poz}}\right) \cdot 100$ gdje je N_{neg} prosječan broj kapi u negativnoj kontroli, N_{poz} prosječan broj kapi u pozitivnoj kontroli, a $N_{ekstrakt}$ prosječan broj kapi biljnog ekstrakta. Vrijednost 100 % označava antioksidativnu aktivnost pozitivne kontrole, dok 0 % odgovara negativnoj kontroli, odnosno odsutnosti antioksidativne aktivnosti.

Enzimski test katalazne aktivnosti u biljnim ekstraktima

Za ispitivanje utjecaja biljnih ekstrakata na aktivnost enzima katalaze korištene su žive dehidrirane stanice pivskog kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*, Dr. Oetker), koje sadrže prirodni izvor katalaze. Odvagano je 7,00 g suhog praha kvasca, koji je zatim usipan u 100,0 mL biljnog ekstrakta, kao i u otopine referentne kontrole (destilirana voda) i pozitivne kontrole (askorbinska kiselina). Suspenzije su povremeno promiješane staklenim štapićem tijekom inkubacije od 60 minuta na sobnoj temperaturi (25 °C). Vrijeme inkubacije od 60 minuta odabrano je kako bi se omogućila interakcija biljnih spojeva s enzimima kvasca prije izlaganja H_2O_2. Nakon inkubacije, iz svake je suspenzije odvojeno 2,0 mL uzorka te je on raspoređen u tri odvojene epruvete (160 × Ø16 mm), čime su dobivena tri ponavljanja za svaku skupinu. U svaku epruvetu dodano je 0,50 mL 3 %-tne otopine H_2O_2. Epruvete su lagano promućkane kako bi se potaknula enzimska razgradnja i stvorila pjena. Nakon što se pjena stabilizirala, njezina je razina označena markerom, a visina je izmjerena ravnalom s najmanjom podjelom od 1 mm (± 0,5 mm). Ideja testa preuzeta je iz rada Iwase i sur. (2013), u kojem se aktivnost katalaze procjenjuje prema visini pjene nastale tijekom razgradnje H_2O_2. Referentna kontrola sadržavala je prah kvasca u destiliranoj vodi te je predstavljala osnovnu vrijednost katalazne aktivnosti. Negativna kontrola sadržavala je biljni ekstrakt i H_2O_2, ali bez dodatka praha kvasca, radi isključenja mogućeg pjenjenja uzrokovanog sastojcima ekstrakta.

Tijekom razgradnje H_2O_2 djelovanjem enzima katalaze oslobađa se kisik, pa je visina pjene u epruveti korištena kao jednostavan pokazatelj relativne katalazne aktivnosti u usporedbi s referentnom kontrolom. Na temelju prosječnih vrijednosti visine pjene izračunan je indeks katalazne aktivnosti prema formuli: $\mathrm{IKA}\ (\%) = \frac{\bar{h}_{uzorak}}{\bar{h}_{kontrola}} \cdot 100$, gdje $\bar{h}_{uzorak}$ predstavlja prosječnu visinu pjene u suspenziji biljnih ekstrakata u kojima je kvasac bio inkubiran, a $\bar{h}_{kontrola}$ prosječnu visinu pjene referentnog uzorka (kvasac u destiliranoj vodi). Na taj je način katalazna aktivnost prikazana relativno u odnosu na referentnu kontrolu. Vrijednosti veće od 100 % ukazuju na pojačanu razgradnju H_2O_2, dok vrijednosti manje od 100 % označavaju smanjenu katalaznu aktivnost u odnosu na kontrolu.

Fiziološki test djelovanja biljnih ekstrakata na klijavost rotkvice

Za ispitivanje utjecaja biljnih ekstrakata na klijavost korištene su sjemenke rotkvice (*Raphanus sativus*, Bavicchi spa, Via della Valtiera 293, Perugia 06135, Italija) iz ekološkog uzgoja. Prema uputama proizvođača, sjemenke se namaču 10 sati, a tijekom klijanja zalijevaju dva do tri puta dnevno. Sjemenke rotkvice (60 po čaši) potopljene su 6 sati u 100,0 mL otopine biljnih ekstrakata, destilirane vode (referentna kontrola) i otopine askorbinske kiseline (pozitivna kontrola). Vrijeme predtretmana skraćeno je na 6 sati kako bi se izbjegao mogući stres uzrokovan duljim izlaganjem biljnim ekstraktima. Predtretman sjemenki proveden je primjenom metode hidro-priminga. Ideja ove metode preuzeta je iz rada Adhikari i sur. (2022) te se temelji na kratkotrajnom namakanju sjemenki u destiliranoj vodi, odnosno u različitim otopinama. Nakon predtretmana sjemenke su raspoređene na pamučne ubruse navlažene destiliranom vodom, koji su bili položeni na porculanske tanjure. Ukupno su pripremljena 24 tanjura, jer je ispitano osam različitih tretmana, a svaki tretman proveden je u tri ponavljanja. Na svaki tanjur stavljeno je 20 sjemenki, što daje ukupno 60 sjemenki po tretmanu. Tanjuri su bili smješteni uz zapadni prozor, uz prirodno svjetlo (~ 8 h dnevno) i sobnu temperaturu (~ 25 °C). Svaki tanjur sa sjemenkama redovito je vlažen s 20 mL destilirane vode pomoću kapaljke. Desetog dana pokusa izbrojan je ukupan broj proklijalih sjemenki i izmjerena duljina svih korjenčića. Postotak klijavosti (PK) određen je kao omjer broja proklijalih sjemenki i ukupnog broja sjemenki:

$\mathrm{PK}\ (\%) = \left(\frac{\text{broj proklijalih sjemenki}}{\text{ukupan broj sjemenki}}\right) \cdot 100$. Indeks prosječne duljine korjenčića (IPDK) izračunat je kao omjer prosječne duljine korjenčića iz predtretmana biljnim ekstraktima i prosječne duljine korjenčića iz predtretmana s destiliranom vodom: $\mathrm{IPDK}\ (\%) = \left(\frac{\text{prosječna duljina korjenčića u tretmanu}}{\text{prosječna duljina korjenčića u kontroli}}\right) \cdot 100.$

Statistička obrada

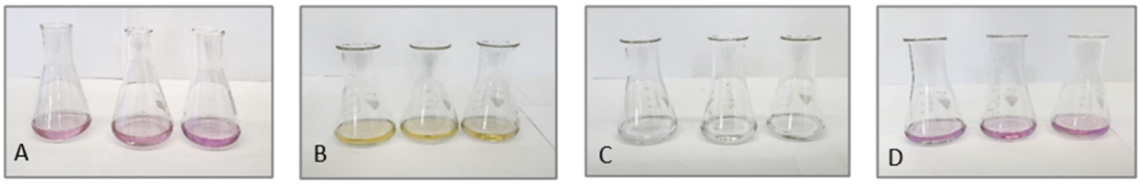
Podatci su obrađeni u programu Microsoft Excel izračunom srednjih vrijednosti i standardnih devijacija. Razlike između uzoraka analizirane su jednofaktorskom analizom varijance (ANOVA), a pri statistički značajnim razlikama ($p < 0,05$) primijenjen je post-hoc test Tukey HSD, uz korištenje javno dostupnog statističkog kalkulatora Statistics Kingdom (https://www.statskingdom.com, 2025). Za analizu podataka o klijavosti korišten je hi-kvadrat test u programu Microsoft Excel ($p < 0,05$ – statistički značajna razlika, $p \geq 0,05$ – nije statistički značajno).

REZULTATI

Izmjerene pH-vrijednosti pomoću pH-indikatorskih listića pokazale su da svi biljni ekstrakti u koncentracijama 1 % i 5 %, kao i destilirana voda (kontrolni uzorak), imaju pH vrijednost 5. Otopina askorbinske kiseline u koncentraciji 1 % imala je pH vrijednost 2.

Kemijski test biljnih ekstrakata u otopini $KMnO_4$

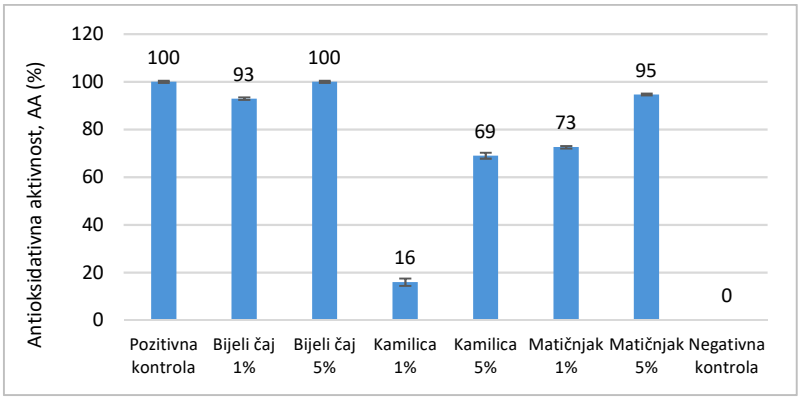
U kemijskom testu početna ljubičasta boja otopine $KMnO_4$ promijenila se nakon dodavanja biljnih ekstrakata i askorbinske kiseline. U pozitivnoj kontroli, nakon dodavanja askorbinske kiseline, ljubičasta boja otopine $KMnO_4$ postala je bezbojna. U svim uzorcima s biljnim ekstraktima u koncentracijama 1 % i 5 %, nakon dodavanja ekstrakata, otopina $KMnO_4$ poprimila je smeđu boju, dok je u negativnoj kontroli s destiliranom vodom zadržana početna ljubičasta boja (slika 4). Kako bi se provjerio mogući utjecaj boje samih ekstrakata na opaženu promjenu boje, ekstrakti su kapanjem dodavani u destiliranu vodu. Pritom nije uočeno zamućenje niti obojenje otopine.



Slika 4 Promjena boje otopine $KMnO_4$ nakon dodavanja ispitivanih uzoraka. Promjena boje $KMnO_4$ u prisutnosti biljnih ekstrakata prikazana je na reprezentativnom primjeru ekstrakta bijelog čaja u koncentraciji od 5 %. Početna ljubičasta boja radne otopine $KMnO_4$ (A). Promjena boje nakon dodavanja biljnih ekstrakta od 1 % i 5 % (B). Pozitivna kontrola – promjena boje nakon dodavanja askorbinske kiseline (C). Negativna kontrola – otopina nakon dodavanja destilirane vode (D)

Autor: Ladović A., 2026

Na slici 5 prikazana je antioksidativna aktivnost (AA) osam ispitivanih uzoraka $KMnO_4$ testom.



Slika 5 Usporedba antioksidativne aktivnosti (AA) ispitivanih uzoraka u $KMnO_4$ testu

Antioksidativna aktivnost bila je najveća kod askorbinske kiseline 1 % i bijelog čaja 5 %, gdje je zabilježena maksimalna vrijednost od 100 %. Vrlo visoke vrijednosti pokazao je i matičnjak 5 % (95 %) i bijeli čaj 1 % (93 %). Umjerenu aktivnost imao je matičnjak 1 % s 73 %. Kamilica je u usporedbi s ostalim uzorcima pokazala slabiji učinak, pri koncentraciji 5 % iznosila je 69 %, a pri 1 % svega 16 %, što je ujedno i najniža zabilježena vrijednost. Negativna kontrola nije pokazala antioksidativnu aktivnost. Detaljni izvorni podaci o prosječnom broju kapi potrebnih za promjenu boje otopine $KMnO_4$ nalaze se u prilogu 1.

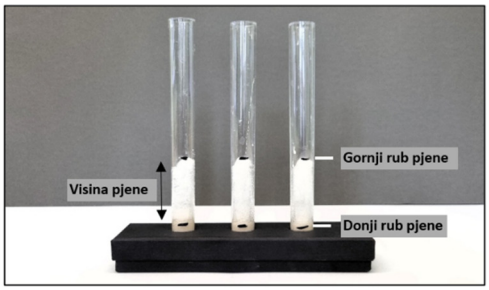
ANOVA testom utvrđena je statistički visoko značajna razlika u antioksidativnoj aktivnosti između ispitivanih skupina (F = 5154,888; p < 0,001), nakon čega je provedena Tukey HSD post-hoc analiza parova.

Post-hoc analizom utvrđeno je da između bijelog čaja u koncentracijama 1 % i 5 % nije postojala statistički značajna razlika u antioksidativnoj aktivnosti. Za razliku od toga, kod matičnjaka i kamilice utvrđene su statistički značajne razlike između koncentracija, pri čemu su ekstrakti u koncentraciji 5 % pokazali veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na ekstrakte u koncentraciji 1 %.

Usporedbom ispitivanih ekstrakata biljnih vrsta utvrđeno je da su ekstrakti bijelog čaja imali statistički značajno veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na kamilicu u obje ispitivane koncentracije te u odnosu na matičnjak u koncentraciji 1 %, dok između bijelog čaja (1 % i 5 %) i matičnjaka u koncentraciji 5 % nije utvrđena statistički značajna razlika. Matičnjak u koncentraciji 5 % pokazao je statistički značajno veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na kamilicu u obje koncentracije, dok između matičnjaka u koncentraciji 1 % i kamilice u koncentraciji 5 % nije utvrđena statistički značajna razlika. Detaljni rezultati post-hoc analize prikazani su u prilogu 2.

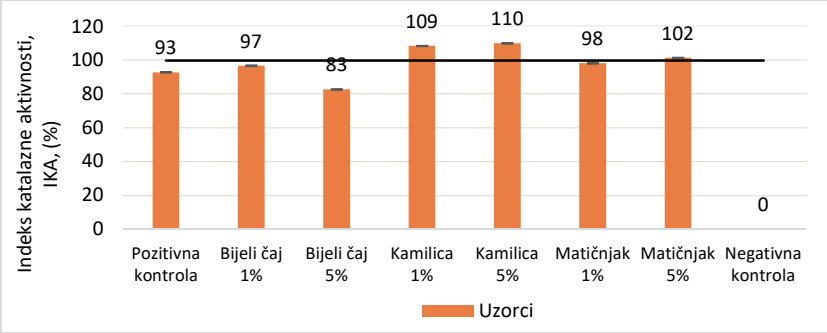
Enzimski test katalazne aktivnosti u biljnim ekstraktima

U enzimskom testu katalazne aktivnosti, nakon dodavanja otopine H_2O_2 u uzorke biljnog ekstrakta i kvasca došlo je do stvaranja pjene (slika 6). Pjena se formirala u svim uzorcima koji su sadržavali kvasac, dok se u uzorku bez kvasca (negativna kontrola) nije pojavila. Izmjerene srednje vrijednosti visine pjene korištene su za usporedbu katalazne aktivnosti između ispitivanih uzoraka (biljni ekstrakti + kvasac) i referentne kontrole (destilirana voda + kvasac).



Slika 6 Reprezentativan prikaz pjene nastale razgradnjom H2O2 u stanicama kvasca inkubiranima s ekstraktom kamilice koncentracije 1 %. Prikazana su tri ponavljanja s istim ekstraktom
Autor: Ladović A., 2026

Na slici 7 prikazane su relativne vrijednosti indeksa katalazne aktivnosti (IKA).



Slika 7 Indeks katalazne aktivnosti (IKA) u biljnim ekstraktima nakon inkubacije s kvascem

Najviše vrijednosti IKA zabilježene su kod kamilice 5 % (110 %) i kamilice 1 % (109 %). Matičnjak 5 % imao je nešto višu vrijednost (102 %) u odnosu na matičnjak 1 % (98 %). Bijeli čaj 1 % postigao je 97 %, dok je bijeli čaj 5 % imao najnižu relativnu vrijednost (83 %). Askorbinska kiselina 1 % postigla je 93 %. Izvorni podatci o prosječnoj visini pjene prikazani su u prilogu 1.

ANOVA testom nije utvrđena statistički značajna razlika u indeksu katalazne aktivnosti između ispitivanih uzoraka ($F = 0{,}9735$; $p = 0{,}464$).

Fiziološki test djelovanja biljnih ekstrakata na klijavost i duljinu korjenčića rotkvice

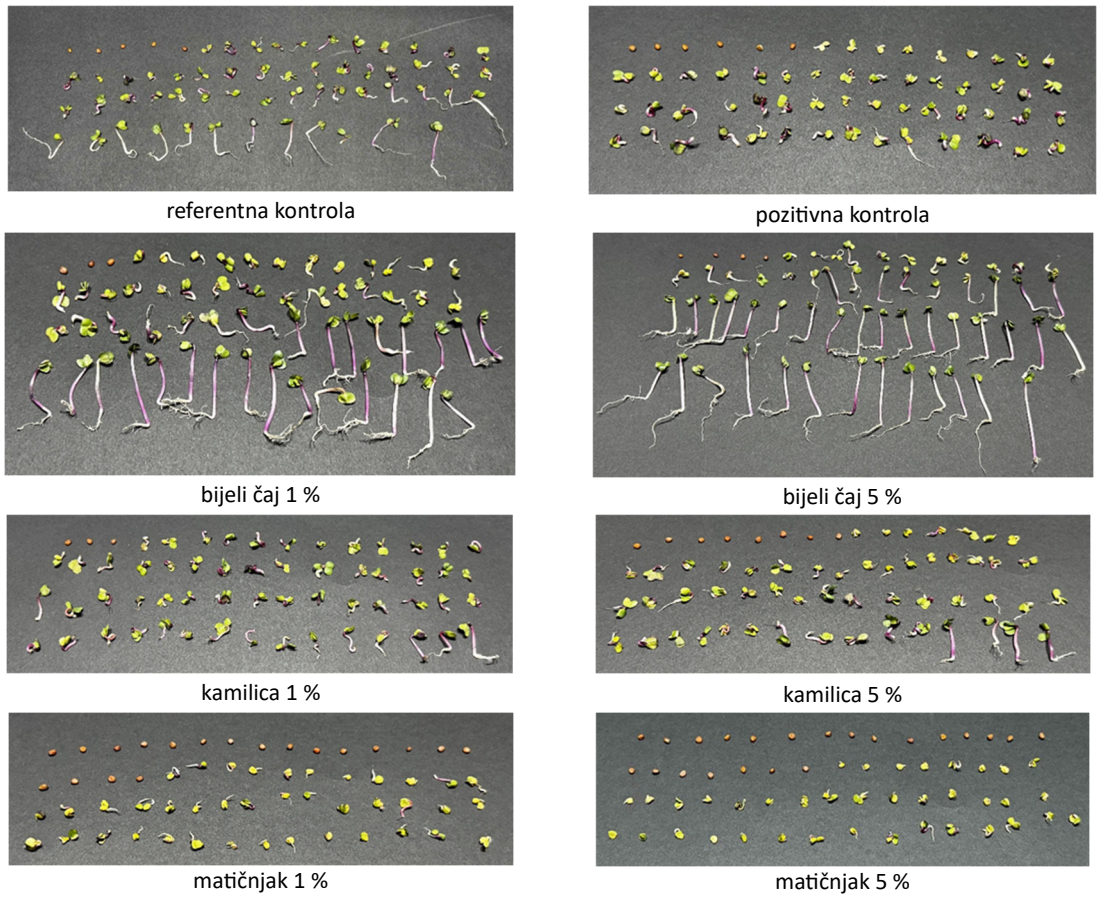
Rezultati klijavosti sjemenki rotkvice prikazani su u tablici 1 te pokazuju visoku klijavost u većini tretmana, uz primjetno smanjenje kod predtretmana ekstraktima matičnjaka.

Tablica 1 Utjecaj predtretmana biljnim ekstraktima na klijavost sjemenki rotkvice

Predtretman sjemenki s uzorcima	Postotak klijavosti (%)	Predtretman sjemenki s uzorcima	Postotak klijavosti (%)
bijeli čaj 1 %	95	pozitivna kontrola	87
kamilica 1 %	95	kamilica 5 %	87
bijeli čaj 5 %	93	matičnjak 1 %	70
referentna kontrola	92	matičnjak 5 %	65

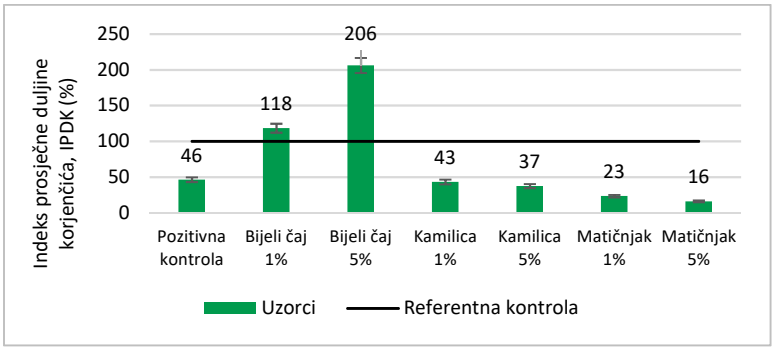
Hi-kvadrat test pokazao je statistički značajnu razliku u klijavosti između tretmana (p = 1,79 × 10^{-9}). Iz postotaka klijavosti vidljivo je da najveće odstupanje imaju uzorci tretirani ekstraktom matičnjaka, koji su pokazali najniži postotak klijanja u odnosu na ostale tretmane.

Razlike u duljini korjenčića i općem izgledu klijanaca rotkvice nakon predtretmana biljnim ekstraktima prikazane su na slici 8. Osim razlika u duljini korjenčića, mogu se uočiti i razlike u općem izgledu klijanaca. Budući da dodatna morfološka obilježja klijanaca nisu bila predmet ovog istraživanja, ona nisu dodatno opisivana ni statistički analizirana.



Slika 8 Klijanci rotkvice nakon predtretmana biljnim ekstraktima. Prikazani su uzorci referentne kontrole, pozitivne kontrole te tretmana bijelim čajem, kamilice i matičnjaka u koncentracijama 1 % i 5 %
Autor: Ladović A., 2026

Rezultati indeksa prosječne duljine korjenčića (IPDK) klijanaca rotkvice prikazani su na slici 9.



Slika 9 Indeks prosječne duljine korjenčića (IPDK) klijanaca rotkvice nakon predtretmana biljnim ekstraktima i kontrolama

Vrijednost IPDK veća od 100 % zabilježena je kod sjemenki predtretiranih ekstraktima bijelog čaja. Pri koncentraciji od 1 % iznosila je 118 %, dok je pri 5 % porasla na 206 %. Niže vrijednosti od referentne kontrole zabilježene su kod sjemenki tretiranih ekstraktima kamilice i matičnjaka. Kod predtretmana ekstraktom kamilice IPDK je iznosio 43 % pri koncentraciji od 1 % te 37 % pri 5 %. Kod matičnjaka su izmjerene još niže vrijednosti: 23 % pri 1 % i 16 % pri 5 %. Izvorni podatci o prosječnoj duljini korjenčića prikazani su u prilogu 1.

ANOVA test pokazao je statistički visoko značajnu razliku u prosječnoj duljini korjenčića između ispitivanih skupina (F = 480,304; p < 0,001). Post-hoc analiza pokazala je da povećanje koncentracije ima statistički značajan učinak samo kod bijelog čaja, dok kod kamilice i matičnjaka razlike između koncentracija 1 % i 5 % nisu bile statistički značajne.

Usporedbom biljnih ekstrakata utvrđeno je da bijeli čaj u obje koncentracije ima statistički značajno veći učinak na duljinu korjenčića u odnosu na kamilicu i matičnjak, dok između kamilice i matičnjaka nisu utvrđene statistički značajne razlike. Svi biljni ekstrakti statistički značajno su se razlikovali od referentne kontrole, pri čemu je najveći učinak u odnosu na referentnu kontrolu zabilježen kod bijelog čaja pri koncentraciji 5 %. Pozitivna kontrola također se statistički značajno razlikovala od referentne kontrole. Detaljni rezultati post-hoc analize prikazani su u prilogu 2.

RASPRAVA

Analiza kemijskog testa s otopinom kalijeva permanganata pokazala je da se kod ekstrakata kamilice i matičnjaka antioksidativna aktivnost povećava s porastom koncentracije biljnog ekstrakta. Ovakav rezultat je očekivan jer veća količina biljnog materijala sadrži više spojeva koji mogu reducirati permanganatne ione. Kod ekstrakta bijelog čaja nije bilo statistički značajne razlike u antioksidativnoj aktivnosti između niže i više koncentracije. To pokazuje da bijeli čaj ima vrlo visoku redukcijsku sposobnost već pri niskim koncentracijama u uvjetima ovog testa. Ovi rezultati djelomično potvrđuju prvu hipotezu jer je doza-ovisni učinak uočen kod kamilice i matičnjaka, ali ne i kod bijelog čaja.

Kemijski test temeljio se na promjeni boje otopine $KMnO_4$ nakon dodavanja biljnih ekstrakata i askorbinske kiseline. Prema Moon i sur. (2015), u prisutnosti blago kiselih biljnih ekstrakata dolazi do djelomične redukcije MnO_4^- u manganov dioksid (MnO_2), koji daje smeđu boju otopini. Hanchi i sur. (2022) navode da jako kisele otopine dovode do potpune redukcije MnO_4^- u manganove(II) ione (Mn^{2+}) i obezbojenja otopine. Takve promjene u skladu su s rezultatima ovoga istraživanja, a razlike u boji ne upućuju nužno na slabiju antioksidativnu aktivnost biljnih ekstrakata, nego na neujednačene pH uvjete (pH otopine askorbinske kiseline bio je 2, a biljnih ekstrakata 5), koje bi u budućim istraživanjima trebalo ujednačiti.

U enzimskom testu katalazne aktivnosti pjena se pojavila u svim uzorcima koji su sadržavali kvasac, dok u negativnoj kontroli (biljni ekstrakt i H_2O_2 bez dodatka kvasca) nije nastala pjena. Ovim je potvrđeno da je razgradnja H_2O_2 posljedica djelovanja enzima katalaze prisutnog u stanicama kvasca. Između koncentracija biljnih ekstrakata od 1 % i 5 % nisu utvrđene statistički značajne promjene u indeksu katalazne aktivnosti. Druga hipoteza nije potvrđena jer nema statistički značajne razlike u aktivnosti katalaze između otopina biljnih ekstrakata niže i više koncentracije kao u odnosu na referentnu kontrolu.

Unatoč izostanku statistički značajnih razlika u enzimskom testu, na grafu (slika 8) se mogu uočiti najveća i najmanja izmjerena odstupanja aktivnosti katalaze u odnosu na ostale biljne ekstrakte i referentnu kontrolu. U otopini bijelog čaja (5 %) zabilježena je najniža izmjerena aktivnost katalaze, dok je kod kamilice u obje koncentracije (1 % i 5 %) zabilježena najviša izmjerena aktivnost katalaze. Budući da razlika nije bila statistički značajna, ove se promjene ne mogu smatrati dokazom, već mogu biti poticaj za daljnja istraživanja. Uočena odstupanja kod bijelog čaja i kamilice mogu se povezati s rezultatima ranijih istraživanja. Pal i sur. (2014) navode da se katehini iz bijelog čaja mogu vezati na katalazu i tako smanjiti njenu aktivnost. S druge strane, Bhaskaran i sur. (2012) pokazali su da ekstrakti kamilice mogu potaknuti aktivaciju antioksidativnih enzima, uključujući katalazu, ali u stanicama makrofaga.

Za razliku od kemijskog i enzimskog testa, fiziološki test omogućio je praćenje učinka biljnih ekstrakata na živi organizam tijekom klijanja. Učinak ekstrakata ispitan je praćenjem klijavosti sjemenki rotkvice i mjerenjem duljine korjenčića. Hi-kvadrat test pokazao je statistički značajnu razliku u klijavosti između tretmana. Iz dobivenih postotaka klijavosti vidljivo je da su tretmani ekstraktom matičnjaka pokazali najnižu klijavost, dok razlike između koncentracija 1 % i 5 % kod svih uzoraka nisu bile velike. Duljina korjenčića pokazala se osjetljivijim pokazateljem djelovanja biljnih ekstrakata. Očekivalo se inhibicijsko djelovanje ekstrakta bijelog čaja na rast korjenčića zbog snažne antioksidativne aktivnosti i mogućeg smanjenja razine ROS-a. Međutim, suprotno očekivanju, ekstrakt bijelog čaja, osobito u koncentraciji od 5 %, potaknuo je rast korjenčića i pokazao statistički značajno jače djelovanje u odnosu na nižu koncentraciju i referentnu kontrolu. Kod kamilice i matičnjaka ekstrakti obje koncentracije imali su inhibicijski učinak na duljinu korjenčića, bez statistički značajne razlike između 1 % i 5 %. S obzirom na dobivene rezultate, treća hipoteza nije potvrđena.

Usporedbom djelovanja biljnih ekstrakata različitih biljnih vrsta pokazalo se da se njihovi učinci razlikuju. U kemijskom testu dobiven je očekivani redoslijed antioksidativne aktivnosti (bijeli čaj > matičnjak > kamilica), čime je kemijski dio četvrte hipoteze potvrđen. Slične rezultate navode i Shannon i suradnici (2017), koji su utvrdili niži sadržaj fenolnih spojeva i slabiji antioksidativni potencijal kamilice u odnosu na bijeli čaj. Matičnjak nije bio obuhvaćen navedenim istraživanjem.

U enzimskom testu katalazne aktivnosti nisu utvrđene statistički značajne razlike među biljnim ekstraktima, pa se u tom dijelu četvrta hipoteza ne može potvrditi.

Rezultati fiziološkog testa razlikovali su se od očekivanog redoslijeda. Najveći inhibicijski učinak zabilježen je kod matičnjaka, a zatim kod kamilice, dok bijeli čaj nije pokazao inhibicijski, već stimulativni učinak na rast korjenčića. Prema Kato-Noguchiju (2001), ekstrakti matičnjaka mogu snažno inhibirati rast biljaka, osobito korijena, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Iako autori navode prisutnost alelopatskih tvari kao uzrok inhibicije, mehanizam njihova djelovanja nije razjašnjen. Dobiveni inhibicijski učinak kamilice potvrđuju i Al-Hawas i sur. (2025), koji navode da kamilica sadrži alelopatske tvari s inhibicijskim učinkom, pri čemu su otišli korak dalje i pokazali da je on povezan s potaknutim oksidativnim stresom i porastom ROS-a. Moguće je da slični mehanizmi sudjeluju i u inhibicijskom učinku matičnjaka, no to ovim istraživanjem nije moguće potvrditi. Suprotno tome, Bais i sur. (2010) ističu da učinak katehina ovisi o koncentraciji, što može objasniti stimulativni, a ne toksični učinak ekstrakta bijelog čaja pri koncentracijama od 1 % i 5 %, no točan mehanizam takvih odgovora

ostaje nepoznat. Budući da je očekivani redoslijed potvrđen samo kemijskim testom, četvrta hipoteza smatra se djelomično potvrđenom.

Otopina askorbinske kiseline u ovom je istraživanju korištena kao pozitivna kontrola. Radi se o „čistom“ i dobro poznatom snažnom antioksidansu, te je njime potvrđena osjetljivost kemijskog testa. U enzimskom testu nije zabilježen utjecaj askorbinske kiseline na aktivnost katalaze. U fiziološkom testu zabilježeni su statistički značajno kraći korjenčići u odnosu na referentnu kontrolu, no ne može se sa sigurnošću utvrditi je li taj učinak posljedica izrazito niske pH vrijednosti otopine ili smanjene razine ROS-a. Zbog toga bi, kako je već ranije navedeno, u budućim istraživanjima trebalo ujednačiti pH vrijednost otopine kontrole kako bi se omogućilo detaljnije objašnjenje rezultata.

Rezultati sva tri testa pokazuju da najsnažnija antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakata ne mora nužno dovesti do najveće promjene aktivnosti katalaze niti do najintenzivnije inhibicije klijanja i rasta korjenčića, koji su povezani s djelovanjem ROS-a. To pokazuje kako se kemijskim testovima ne mogu u potpunosti predvidjeti biološki učinci u živim organizmima. Budući da su biljni ekstrakti složene smjese različitih bioaktivnih spojeva koji mogu djelovati putem različitih metaboličkih mehanizama, njihovo ukupno biološko djelovanje nije moguće pouzdano predvidjeti isključivo na temelju kemijskih testova. Kako bi se ti učinci u potpunosti objasnili na molekularnoj razini, bilo bi potrebno koristiti naprednije metode koje nisu dostupne u školskom laboratoriju.

Ograničenja ovoga istraživanja su ispitivanje samo dviju koncentracija biljnih ekstrakata i neujednačena pH vrijednost uzoraka. Zbog toga bi u budućim istraživanjima bilo korisno ispitati širi raspon koncentracija otopina biljnih ekstrakata te uključiti dodatna obilježja rasta i razvoja, poput vremena potrebnog za klijanje, mase klijanaca ili promjena u razvoju nadzemnih dijelova biljke. Također, bilo bi korisno ispitati kako zagrijavanje, kakvo se koristi pri pripremi čajeva, utječe na ekstrakciju bioaktivnih spojeva i usporediti ih s rezultatima testova ovoga rada, kao i provesti izolaciju pojedinačnih spojeva s antioksidativnim svojstvima radi preciznijeg povezivanja kemijskog sastava s biološkim učinkom.

ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

- U kemijskom testu potvrđen je doza-ovisni porast antioksidativne aktivnosti kod ekstrakata kamilice i matičnjaka, dok između koncentracija od 1 % i 5 % ekstrakta bijelog čaja nije utvrđena statistički značajna razlika, čime je prva hipoteza djelomično potvrđena;
- U enzimskom testu nije utvrđena statistički značajna razlika u aktivnosti katalaze između koncentracija od 1 % i 5 % biljnih ekstrakata niti u odnosu na referentnu kontrolu, zbog čega druga hipoteza nije potvrđena;
- U fiziološkom testu utvrđena je statistički značajna razlika u klijavosti između tretmana, pri čemu je najniži postotak klijavosti zabilježen kod ekstrakta matičnjaka, a razlike između koncentracija 1 % i 5 % unutar istog ekstrakta nisu bile izražene. Statistički značajna razlika u duljini korjenčića zabilježena je samo kod bijelog čaja, pri čemu je koncentracija od 5 %, suprotno očekivanom, imala stimulativni učinak, zbog čega treća hipoteza nije potvrđena;
- U kemijskom testu utvrđen je očekivani redoslijed antioksidativne aktivnosti (bijeli čaj > matičnjak > kamilica), dok u enzimskom i fiziološkom testu nije utvrđen isti redoslijed učinaka kao u kemijskom testu, zbog čega je četvrta hipoteza djelomično potvrđena.

LITERATURA

Adhikari B., Olorunwa O. J., Barickman T. C. 2022. Seed priming enhances seed germination and morphological traits of *Lactuca sativa* L. under salt stress. Seeds 1: 74–86.

Al-Hawas G. H. S. 2025. Allelopathy effects of *Matricaria chamomilla* L. on germination, early growth and nutrient uptake of pea seedlings. Brazilian Journal of Biology 85: e292131.

Amponsah I. K., Orman E., Mensah A. Y., Sarpong F. M., Armah F. A., Sarpong L. M. 2016. Development and validation of a radical scavenging antioxidant assay using potassium permanganate. Journal of Scientific and Innovative Research 5(2): 36–42.

Bais H. P., Venkatachalam L., Biedrzycki M. L. 2010. Stimulation or inhibition: Conflicting evidence for (±)-catechin's role as a chemical facilitator and disease-protecting agent. Plant Signaling & Behavior 5(3): 239–246.

Bhaskaran N., Srivastava J. K., Shukla S., Gupta S. 2012. Chamomile confers protection against hydrogen peroxide-induced toxicity through activation of Nrf2-mediated defense response. Phytotherapy Research 26(12): 1837–1844.

Echegaray N., Pateiro M., Munekata P. E. S., Lorenzo J. M., Chabani Z., Farag M. A., Domínguez R. 2021. Measurement of antioxidant capacity of meat and meat products: Methods and applications. Molecules 26: 3880.

Ghazizadeh J., Hamedeyazdan S., Torbati M., Farajdokht F., Fakhari A., Mahmoudi J., Araj-Khodaei M., Sadigh-Eteghad S. 2020. *Melissa officinalis* L. hydro-alcoholic extract inhibits anxiety and depression through prevention of central oxidative stress and apoptosis. Metabolic Brain Disease 35: 291–302.

Hanchi H., Sebei K., Mottawea W., Al Kasaa I., Hammami R. 2022. An agar-based bioassay for accurate screening of the total antioxidant capacity of lactic acid bacteria cell-free supernatants. Journal of Microbiological Methods 195: 106437.

Hays G. F. 2016. Now is the Time. World Corrosion Organization, https://corrosion.org/Corrosion+Resources/Publications.html, pristupljeno 25.12.2025.

Iwase T., Tajima A., Sugimoto S., Okuda K., Hironaka I., Kamata Y., Takada K., Mizunoe Y. 2013. A simple assay for measuring catalase activity: A visual approach. Scientific Reports 3: 3081.

Kato-Noguchi H. 2001. Effects of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract on germination and seedling growth of six plants. Acta Physiologiae Plantarum 23: 49–53.

McKay D.L., Blumberg J. B. 2006. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea. Phytotherapy Research 20: 519–530.

Moon S. A., Salunke B. K., Alkotaini B., Sathiyamoorthi E., Kim B. S. 2015. Biological synthesis of manganese dioxide nanoparticles by *Kalopanax pictus* plant extract. IET Nanobiotechnology 9(3): 129–134.

Oracz K., El-Maarouf-Bouteau H., Kranner I., Bogatek R., Corbineau F., Bailly C. 2007. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. The Plant Journal 50: 452–465.

Pal S., Dey S. K., Saha C. 2014. Inhibition of catalase activity by tea catechins. Journal of Biological Chemistry 289(36): 24957–24969.

Shannon E., Jaiswal A. K., Abu-Ghannam N. 2017. Polyphenolic content and antioxidant capacity of white, green, black, and herbal teas: A kinetic study. Food Research International 97: 16–28.

Somavanshi D. B., Kamble P. R., Patil C. D., Jadhav S. P., Sonawane G. B. 2021. A review on the antioxidant and antiaging properties of white tea. Journal of Pharmaceutical Research International 33: 129–136.

Sotler R., Poljšak B., Dahmane R., Jukić T., Pavan Jukić D., Spahić S., Rotim C. 2019. Prooxidant activities of antioxidants and their impact on health. Acta Clinica Croatica 58(4): 726–736.

Zagoskina N. V., Zubova M. Y., Nechaeva T. L., Kazantseva V. V., Goncharuk E. A., Katanskaya V. M., Baranova E. N., Aksenova M. A. 2023. Polyphenols in plants: Structure, biosynthesis, abiotic stress regulation, and practical applications. Plants 12(18): 3227.

PRILOZI

Prilog 1 Prosječan broj kapi (lijevo), prosječna visina pjene (sredina) i prosječna duljina korjenčića (desno) s izračunatim standardnim devijacijama

Uzorci	Prosječan broj kapi ± SD	Uzorci	Prosječna visina pjene (cm) ± SD	Uzorci	Prosječna duljina korjenčića (cm) ± SD
Pozitivna kontrola	1,17 ± 0,41	Referentna kontrola	4,27 ± 0,15	Referentna kontrola	8,17 ± 9,62
Bijeli čaj 1 %	2,50 ± 0,55	Pozitivna kontrola	3,97 ± 0,15	Pozitivna kontrola	3,78 ± 3,27
Bijeli čaj 5 %	1,17 ± 0,41	Bijeli čaj 1 %	4,13 ± 0,21	Bijeli čaj 1 %	9,67 ± 6,26
Kamilica 1 %	17,00 ± 1,55	Bijeli čaj 5 %	3,53 ± 0,12	Bijeli čaj 5 %	16,83 ± 10,56
Kamilica 5 %	7,00 ± 1,26	Kamilica 1 %	4,63 ± 0,06	Kamilica 1 %	3,52 ± 3,40
Matičnjak 1 %	6,33 ± 0,52	Kamilica 5 %	4,70 ± 0,10	Kamilica 5 %	3,05 ± 2,75
Matičnjak 5 %	2,17 ± 0,41	Matičnjak 1 %	4,20 ± 0,26	Matičnjak 1 %	1,90 ± 1,68
Negativna kontrola	20,00 ± 0,00	Matičnjak 5 %	4,33 ± 0,06	Matičnjak 5 %	1,30 ± 1,17

Prilog 2 Statistički značajne razlike u antioksidativnoj aktivnosti u KMnO4 testu (lijevo) i prosječnoj duljini korjenčića rotkvice nakon predtretmana biljnim ekstraktima i kontrolama (desno) (post hoc Tukey HSD)

Uspoređivani uzorci	p-vrijednost	Statistička značajnost	Uspoređivani uzorci	p-vrijednost	Statistička značajnost
Bijeli čaj 1 % – Bijeli čaj 5 %	p = 0,09916	n.s.	Bijeli čaj 1 % – Bijeli čaj 5 %	p = 2,204 × 10^{-6}	***
Matičnjak 1 % – Matičnjak 5 %	p = 8,32 × 10^{-7}	***	Matičnjak 1 % – Matičnjak 5 %	p = 0,9993	n.s.
Kamilica 1 % – Kamilica 5 %	p = 1,06 × 10^{-8}	***	Kamilica 1 % – Kamilica 5 %	p = 0,9999	n.s.
Bijeli čaj 1 % – Kamilica 1 %	p = 1,06 × 10^{-8}	***	Bijeli čaj 1 % – Kamilica 1 %	p = 5,204 × 10^{-4}	***
Bijeli čaj 1 % – Kamilica 5 %	p = 1,07 × 10^{-7}	***	Bijeli čaj 1 % – Kamilica 5 %	p = 4,46 × 10^{-8}	***
Bijeli čaj 5 % – Kamilica 1 %	p = 1,06 × 10^{-8}	***	Bijeli čaj 5 % – Kamilica 1 %	p = 1,753 × 10^{-7}	***
Bijeli čaj 5 % – Kamilica 5 %	p = 1,06 × 10^{-11}	***	Bijeli čaj 5 % – Kamilica 5 %	p = 1,753 × 10^{-7}	***
Bijeli čaj 1 % – Matičnjak 1 %	p = 7,45 × 10^{-6}	***	Bijeli čaj 1 % – Matičnjak 1 %	p = 2,314 × 10^{-7}	***
Bijeli čaj 5 % – Matičnjak 1 %	p = 1,22 × 10^{-8}	***	Bijeli čaj 5 % – Matičnjak 1 %	p = 1,753 × 10^{-7}	***
Bijeli čaj 1 % – Matičnjak 5 %	p = 0,9957	n.s.	Bijeli čaj 1 % – Matičnjak 5 %	p = 1,766 × 10^{-7}	***
Bijeli čaj 5 % – Matičnjak 5 %	p = 0,3869	n.s.	Bijeli čaj 5 % – Matičnjak 5 %	p = 1,753 × 10^{-7}	***
Matičnjak 5 % – Kamilica 1 %	p = 1,06 × 10^{-8}	***	Matičnjak 5 % – Kamilica 1 %	p = 0,9627	n.s.
Matičnjak 1 % – Kamilica 1 %	p = 1,06 × 10^{-8}	***	Matičnjak 1 % – Kamilica 1 %	p = 0,8051	n.s.
Matičnjak 5 % – Kamilica 5 %	p = 2,27 × 10^{-8}	***	Matičnjak 5 % – Kamilica 5 %	p = 0,733	n.s.
Matičnjak 1 % – Kamilica 5 %	p = 0,8278	n.s.	Matičnjak 1 % – Kamilica 5 %	p = 0,441	n.s.
Pozitivna kontrola – Bijeli čaj 1 %	p = 0,09916	n.s.	Pozitivna kontrola – Bijeli čaj 1 %	p = 1,983 × 10^{-6}	***
Pozitivna kontrola – Bijeli čaj 5 %	p = 1,0000	n.s.	Pozitivna kontrola – Bijeli čaj 5 %	p = 1,753 × 10^{-7}	***
Pozitivna kontrola – Kamilica 1 %	p = 1,06 × 10^{-8}	***	Pozitivna kontrola – Kamilica 1 %	p = 1,0000	n.s.
Pozitivna kontrola – Kamilica 5 %	p = 1,06 × 10^{-11}	***	Pozitivna kontrola – Kamilica 5 %	p = 0,9974	n.s.
Pozitivna kontrola – Matičnjak 1 %	p = 1,22 × 10^{-8}	***	Pozitivna kontrola – Matičnjak 1 %	p = 0,6527	n.s.
Pozitivna kontrola – Matičnjak 5 %	p = 0,3869	n.s.	Pozitivna kontrola – Matičnjak 5 %	p = 0,2899	n.s.
Pozitivna kont. – Negativna kont.	p = 1,06 × 10^{-8}	***	Pozitivna kont. – Referentna kont.	p = 1,368 × 10^{-3}	**
Negativna kontrola – Bijeli čaj 1 %	p = 1,06 × 10^{-8}	***	Referentna kontrola – Bijeli čaj 1 %	p = 0,8591	n.s.
Negativna kontrola – Bijeli čaj 5 %	p = 1,06 × 10^{-8}	***	Referentna kontrola – Bijeli čaj 5 %	p = 1,755 × 10^{-7}	***
Negativna kontrola – Kamilica 1 %	p = 1,06 × 10^{-8}	***	Referentna kontrola – Kamilica 1 %	p = 4,877 × 10^{-4}	***
Negativna kontrola – Kamilica 5 %	p = 2,265 × 10^{-6}	***	Referentna kontrola – Kamilica 5 %	p = 6,97 × 10^{-5}	***
Negativna kontrola – Matičnjak 1 %	p = 8,32 × 10^{-7}	***	Referentna kontrola – Matičnjak 1 %	p = 2,854 × 10^{-4}	***
Negativna kontrola – Matičnjak 5 %	p = 1,06 × 10^{-8}	***	Referentna kontrola – Matičnjak 5 %	p = 1,137 × 10^{-5}	***

*** p < 0,001 – statistički visoko značajna razlika ; ** p < 0,01 – statistički značajna razlika;
* p < 0,05 – statistički značajna razlika; n.s. – nije statistički značajno

Mužjaci bez očeva i sinova: morfometrijska analiza asimetrije prednjih krila i glave papirnih osa roda *Polistes*

Sara Polašek, 4. razred

Prirodoslovna škola Vladimira Preloga, Zagreb
Mentor: *Gorica Grozdanić*

SAŽETAK
Cilj ovog istraživanja bio je primjenom morfometrijske analize izmjeriti i usporediti razinu asimetrije prednjih krila i glave mužjaka i ženki dvije vrste roda Polistes izložene različitim temperaturnim uvjetima. Pretpostavljeno je da će mužjaci imati veću razinu asimetrije prednjih krila u odnosu na ženke te da će i mužjaci i ženke uzgajane pri 12°C imati značajno veću razinu asimetrije krila i glave u odnosu na one ose uzgajane pri 25 °C. Mužjaci obje analizirane vrste imali su statistički značajno višu razinu asimetrije prednjih krila u odnosu na ženke. Za vrstu Polistes nimpha mužjaci uzgojeni pri niskoj temperaturi demonstrirali su višu razinu asimetrije krila u usporedbi s onima uzgojenima na sobnoj temperaturi, dok kod ženki takva razlika nije bila zabilježena. Razina asimetrije glave nije pokazala statistički značajne razlike ni u jednoj od testiranih skupina. Dodatno, utvrđena je statistički značajno viša razina rane smrtnosti mužjaka u odnosu na ženke. Prilikom mjerenja asimetrije na divljim populacijama potrebno je sagledati cijelu populaciju, ne samo aktivne odrasle jedinke.

Ključne riječi: *haploidna podložnost; spol; temperatura*

UVOD

Da bi mogle maksimizirati pokretljivost i proizvesti dovoljnu potisnu silu za kretanje, približno 99 % svih životinjskih vrsta razvilo je bilateralno simetrični oblik tijela, odnosno tijelo im se, površinski gledano, zamišljenom ravninom može podijeliti na dvije međusobno zrcalne polovice (Holló i Novák, 2012). Ove se dvije polovice razvijaju iz iste embrionalne osnove, ali se dalje razvijaju neovisno jedna o drugoj. Idealno, razvit će se organizam simetričnih obilježja (Holló i Novák, 2012). Međutim, djelovanjem različitih okolišnih i genetskih čimbenika može doći do odstupanja od makroskopske bilateralne simetrije tijela. Ovo odudaranje pojedine karakteristike od idealne simetrije za neku populaciju definira se kao fluktuirajuća asimetrija i moguće ju je mjeriti na bilo kojem simetričnom obilježju (fluktuirajuća asimetrija općenito se mjeri na razini populacije, ne na razini jedinke zbog mogućih devijacija fenotipa) (Møller, 1998). Povećana izloženost stresnim uvjetima u okolišu poput zagađenja teškim metalima, pesticidima i insekticidima, parazitizmu, nepovoljnim temperaturnim uvjetima, ali i pojavnosti križanja u srodstvu povećava vjerojatnost razvoja asimetrične osobine (Banaszak-Cibicka i sur., 2017). Upravo zato mjera asimetrije može služiti kao pokazatelj razvojne nestabilnosti (eng. *developmental instability*), odstupanja od prosječnog fenotipa uzrokovano nemogućnošću regulacije embrionalnog razvoja pod nepovoljnim utjecajem okoline (Møller, 1998).

Međutim, brojna su istraživanja čiji su rezultati mjerenja asimetrije kontradiktorni, implicirajući pitanje zašto stresni uvjeti u okolišu ne rezultiraju uvijek pojavom asimetrije (Lens i sur., 2002). Jedno je od ponuđenih odgovora bilo ispitivanje pojavnosti asimetrije na više karakteristika istog organizma. No, mjerenjem asimetrije različitih organa muhe *Sepsis cynipsea* pokazano je da u istoj populaciji neka svojstva mogu pokazivati izraženu asimetriju, dok druga ne (Blanckenhorn i sur., 2004).

Upravo se u zahtjevnim uvjetima okoliša, poput onih koji uzrokuju pojavu asimetrije, organizmi konstantno trebaju prilagođavati. Ovu sposobnost organizma da se prilagodi, preživi u svojemu okolišu te razmnožava stvarajući fertilno potomstvo moguće je definirati kao njegovu funkcionalnu sposobnost (eng. *fitness*) određenu međudjelovanjem okoliša i samoga genoma jedinke (Wadgymar i sur., 2024). Općenito, nepovoljni okoliš će zahtijevati veću mogućnost prilagodbe na njega. Jedinka će se ovome stresu

prilagođavati sve do teorijske točke u kojoj opseg stresa nadilazi njezin kapacitet prilagodbe, što će dovesti do manjka regulacije, povećane vjerojatnosti nastanka asimetrije ili čak ugibanja organizma (Graham i sur., 2010). Zbog toga je razlika u razini funkcionalne sposobnosti među jedinkama mehanizam kojim se postiže prirodna selekcija, odnosno opstanak najprilagođenijih jedinki koje će razmnožavanjem svoje osobine prenijeti potomstvu (Wadgymar i sur., 2024).

Kao i gotovo svi drugi organizmi, papirne ose iz roda *Polistes* aktivno se prilagođavaju okolišu u kojemu žive. Sistematski, papirne ose svrstavamo u zadružne kukce iz reda opnokrilaca (Hymenoptera), skupine žalčara (Aculeata) i porodice prave ose (Vespidae), a karakterizira ih potpuna preobrazba. Žive u gnijezdima čiji materijal podsjeća na papir zbog čega su dobile trivijalni naziv papirne ose. Društvena hijerarhija iznimno je bitna u kolonijama sačinjenim od jedne ili više kraljica, radilica i mužjaka, ali za razliku od stvarno društvenih (eusocijalnih) kukaca poput pčela i mrava, papirne ose nemaju izražene morfološke razlike između kraljica i radilica zbog čega se njihove zajednice smatraju primitivno društvenima (Liebert i sur., 2005).

Godišnji ciklus kolonije papirnih osa roda *Polistes* moguće je podijeliti u četiri stadija; stadij osnivanja, stadij radilica, reproduktivni stadij i međustadij (Liebert i sur., 2005). Ciklus svake godine započinje u proljeće kada buduće kraljice, rođene krajem prošlogodišnjeg ciklusa, napuste stadij dijapauze, gotovo potpune redukcije metaboličke i reproduktivne aktivnosti (Stabentheiner i sur., 2024) i započinju s osnivanjem kolonije gradnjom gnijezda od usitnjenih biljnih vlakana pomiješanih sa slinom. Nakon stadija osnivanja, u rano ljeto započinje stadij radilica. Prve ženke koje se rode u ovom stadiju sterilne su radilice koje od kraljice preuzimaju ulogu brige o gnijezdu, potomstvu te prikupljanju hrane, dok kraljica sada preuzima pretežito reproduktivnu ulogu. Sterilnost ovih radilica određena je specifičnim feromonima koji sprječavaju oogenezu i razvoj jajnika, a izlučuje ih kraljica (Van Oystaeyen i sur., 2014). Tijekom razdoblja kasnog ljeta kolonija ulazi u reproduktivni stadij. Sada se pojavljuju dvije nove kaste, haploidni mužjaci i diploidne, fertilne ženke. Na vrhuncu razvoja kolonije ovi mužjaci i ženke napuštaju gnijezdo kako bi se parili. Dolaskom jeseni dolazi do međustadija ugibanjem radilica, mužjaka i stare kraljice, dok oplođene buduće kraljice traže mjesto pogodno prezimljavanju.

Papirne ose, zajedno s drugim pripadnicima reda opnokrilaca, mogu se razmnožavati posebnim oblikom partenogeneze iz neoplođene jajne stanice, arhenotokijom (Liebert i sur., 2005). Nakon parenja u jesen, buduće kraljice imaju pune spermateke, organe namijenjene skladištenju spermija te zrele oocite u jajnicima (Strassmann, 1991). Kraljice same biraju koja će jaja biti oplođena izravno određujući sastav kolonije; iz oplođenih jajašaca rodit će se radilice i buduće kraljice, dok će se iz neoplođenih jajašaca arhenotokijom roditi mužjaci. S obzirom na to da mužjaci nastaju nakon genetske rekombinacije u mejozi, oni nisu genetski klonovi kraljice. Ovakav haplodiploidni način razmnožavanja od presudne je važnosti za životni ciklus kukaca, ali i razumijevanje pojave složene hijerarhije kod zadružnih kukaca (Kennedy i Radford, 2020).

Haplodiploidija opisana je i kod pčela. U jednom istraživanju provedenom na solitarnim pčelama vrste *Osmia bicornis* u uvjetima povećanog okolišnog zagađenja izmjeren je veći opseg asimetrije krila mužjaka od ženki (Szentgyörgyi i sur., 2017). Najizglednije objašnjenje takvog rezultata proizlazi iz teorije haploidne podložnosti (eng. *haploid susceptibility theory*) (Wilson-Rich i sur., 2014). Prema ovoj teoriji, razvojna stabilnost organizma ovisi o njegovu genomu. Diploidne (2n) ženke zbog prisutnosti dva seta kromosoma mogu biti heterozigoti, odnosno posjedovati dvije različite kopije gena za bilo koje svojstvo. Ova raznolikost na lokusima, lokacijama pojedinih gena, može inaktivirati ekspresiju štetnih recesivnih alela, potencijalno

minimizirajući njihov negativni učinak tijekom razvoja. S obzirom na to da su mužjaci haploidni, odnosno imaju samo jedan set kromosoma, ukoliko naslijede štetni alel ne posjeduju drugi kojim bi ga inaktivirali. Ovaj manjak regulacijskog mehanizma potencijalno povećava vjerojatnost pojave asimetrije određenog obilježja (Szentgyörgyi i sur., 2017).

Osim kemijskih stresora, na ose također utječu temperaturni uvjeti u okolišu. Poznato je da smanjenje temperature dovodi do promjene u obojenju tijela odrasle ose (de Souza i sur., 2020). S obzirom na to da se temperaturni uvjeti različitih od optimalnih za pojedinu jedinku smatraju nepovoljnim okolišnim uvjetima, moguće je postaviti pitanje hoće li modifikacija temperature utjecati na promjenu morfologije i drugih sustava.

Primarna motivacija za odabir teme proizlazi iz razlike u percepciji osa i pčela u općoj populaciji. Budući da je pozornost javnosti i bivših pčelara u autorovoj obitelji pretežito usmjerena na pčele zbog ekonomski značajnih sirovina koje proizvode, ekološki doprinos osa često je zanemaren. Unatoč negativnoj javnoj percepciji, ose igraju važnu ulogu u biološkoj kontroli kukaca nametnika te pridonose procesima oprašivanja (Rayor i sur., 2007) zbog čega zaslužuju preispitivanje reputacije.

Sukladno navedenom, ciljevi ovog istraživanja bili su morfometrijskom analizom utvrditi razliku u opsegu asimetrije prednjih krila između mužjaka i ženki uzgojenih pri sobnoj temperaturi, izmjeriti opseg asimetrije krila i glave kod jedinki izloženih smanjenju temperature te ispitati postojanje povezanosti između okolišnog stresa uzrokovanog smanjenjem temperature i razine asimetrije kao pokazatelja razvojne nestabilnosti.

Temeljem postavljenog, pretpostavlja se da će haploidni mužjaci imati veći opseg asimetrije prednjih krila u odnosu na diploidne ženke pri sobnoj temperaturi. Dodatno, pretpostavlja se da će i mužjaci i ženke izloženi nižim temperaturnim uvjetima demonstrirati veći opseg asimetrije prednjih krila i glave u odnosu na one jedinke izložene sobnoj temperaturi.

U provedenom istraživanju nezavisne varijable bile su temperatura i spol dok su zavisne varijable bile opseg asimetrije prednjih krila i glave osa roda *Polistes.* S obzirom na to da su sve ose bile hranjene jednakom učestalošću i vrstom hrane, prikupljene u približno jednakom stadiju razvoja te da su dva različita lokaliteta i vrste bili parametri korišteni samo zbog replikacije rezultata, ne kao čimbenici koji utječu na asimetriju, sve su ove varijable kontrolne.

METODE RADA

Prikupljeno je ukupno 102 primjerka papirnih osa roda Polistes iz gnijezda u reproduktivnom stadiju s dva lokaliteta tijekom ranog kolovoza. Gnijezda s primarnog lokaliteta bila su prikupljena s tavana zapuštenog stambenog objekta na području sela Okunšćak (geolokacija 45.752405, 16.209025) prije provedbe opsežne dezinsekcije objekta. Nakon pretrage tavana prizemnice, pronađena su 42 aktivna gnijezda vrste Polistes nimpha C. te najmanje još toliko srušenih ili napuštenih gnijezda bez odraslih osa. Osam je gnijezda, zajedno s odraslim osama koje su bile na njima u trenutku, bilo prikupljeno i označeno oznakama od G01 do G08. Odrasle su ose odmah na lokaciji bile pohranjene u 70 % alkoholu etanolu. Osim ovih osam, prikupljena su i dva gnijezda iste vrste s livada u neposrednoj blizini lokaliteta (G14 – 45.754707, 16.207695; G15 – 45.755192, 16.206574) te 26 odraslih osa (19 ženki i 7 mužjaka) za koje je pretpostavljena dovoljna funkcionalna sposobnost da ih se može smatrati divljom kontrolnom populacijom. Dodatnih pet gnijezda bilo je prikupljeno na području grada Virovitice (G09 – 45.846184, 17.407202; G10 – 45.846472, 17.406482; G11 – 45.846717, 17.40585; G12 – 45.847029, 17.405821; G13

– 45.846697, 17.405661). Gnijezda G09, G10 i G13 pripadala su vrsti Polistes gallicus L., dok su gnijezda G11 i G12 pripadala vrsti P. nimpha. Sva su gnijezda bila prikupljena od strane autora uz korištenje potpune zaštitne pčelarske opreme. Određivanje vrsta provedeno je korištenjem ključa za rod Polistes (Schmid-Egger i sur., 2017).

Uzgoj, hranjenje i prikupljanje odraslih osa pri sobnoj temperaturi (25 °C)

Sva prikupljena gnijezda bila su pohranjena u prozirne plastične spremnike i prekrivena mrežicom od tila kako bi se osigurali primjereni uvjeti za kontrolirani uzgoj. Da bi se omogućio usporediv stadij razvoja svih jedinki, u istraživanju su korišteni samo organizmi u stadiju ličinke koje još nisu u tom trenutku sa svih strana ispunjavale ćeliju. S obzirom na to da se ličinke u prirodi hrane prožvakanim kukcima, nakon testiranja tri komercijalne vrste hrane sastava različitih mješavina crva i ličinki kupljenih u trgovini za kućne ljubimce odabrana je hrana *Insectivore diet, ReptiPlanet* sastava: ličinke crne vojničke muhe, rižino brašno, bjelančevine krumpira, crvi brašnari, kalcijev karbonat, krumpir, slatki krumpir, račiči, guma rogačeve mahune, banane, jabuka, laneno sjeme, kokosovo mlijeko, maslačak, hibiskus, lucerna, pelud, med, vitamin Premix, Spirulina, probiotici, ekstrakt ružmarina te nutritivne vrijednosti: bjelančevine 33 %, sadržaj masti 10 %, sirova vlakna 9 %, sirovi pepeo 6 %.

Praškasta hrana i voda za svako su hranjenje bili pomiješani u omjeru približno 1:1 kako bi se dobio gusti tekući materijal.

Dovođenje hrane do usta ličinke bilo je otežano zbog izuzetno male veličine ličinke. Ličinke su hranjene do zasićenja, tj. do trenutka kada više nisu aktivno otvarale usta prilikom približavanja s kapljicom hrane. U konačnici je hrana ličinkama do usta dostavljena zatupljenom entomološkom iglicom svakoj ličinki omogućujući jednu do tri kapljice po hranjenju. Ova je količina određena na temelju dvije ličinke koje su zbog nakupljanja i sušenja pretjerane količine hrane oko usne šupljine ugibale. Uz dostatnu količinu hrane, ličinkama je također bilo potrebno omogućiti dovoljnu količinu vode. Prve ličinke kojima dovoljna količina vode nije bila omogućena zaostajale su u rastu i dobivale staklast ili crvenkast izgled. Kasnijim dodavanjem kapljice vode u većem broju slučajeva rezultiralo je nastavkom rasta (dvije su ličinke uginule zbog ovoga, ostale koje su vidno zaostale u rastu nisu bile korištene u analizi asimetrije nervature krila). Odrasle ose bile su prikupljene s gnijezda otprilike 48 sati nakon napuštanja kukuljice da bi se osiguralo da im krila budu dovoljno razvijena za provedbu morfometrijske analize. Osim prikupljanja odraslih osa, na svakom je gnijezdu bilo prikupljeno nekoliko osa koje su uginule nakon završetka preobrazbe pa im je bilo moguće odrediti spol. U tu svrhu su otvorene sve kukuljice na gnijezdima iz kojih nisu izašle odrasle ose (smrt prije izlaska) te su i prikupljene ose koje su uginule unutar 24 sata od izlaska (prva skupina je na sebi zadržala ovojnicu, dok je druga bila bez nje).

Uzgoj, hranjenje i prikupljanje odraslih osa pri sniženoj temperaturi (12 °C)

Svi su uvjeti osim temperature bili podjednaki i konstantni u obje skupine izložene različitim temperaturnim uvjetima. Tri gnijezda vrste *P. nimpha* s ukupno 26 jedinki u približno istom stadiju kao i u drugoj skupini bila su čuvana u hladnjaku na stalnoj temperaturi od 12 °C kako bi se minimizirala nanesena šteta uz osiguravanje dovoljnog temperaturnog odmaka prosječnim ljetnim temperaturama te dostatnog eksperimentalnog uzorka. Morfometrijska analiza krila i glave provedena je na 6 ženki i 4 mužjaka koja su u ovim uvjetima doživjela stadij adulta. Za sva tri gnijezda koja su bila izložena niskoj temperaturi postojali su odrasli primjerci ženki za usporedbu koji su bili prikupljeni prije početka mjerenja.

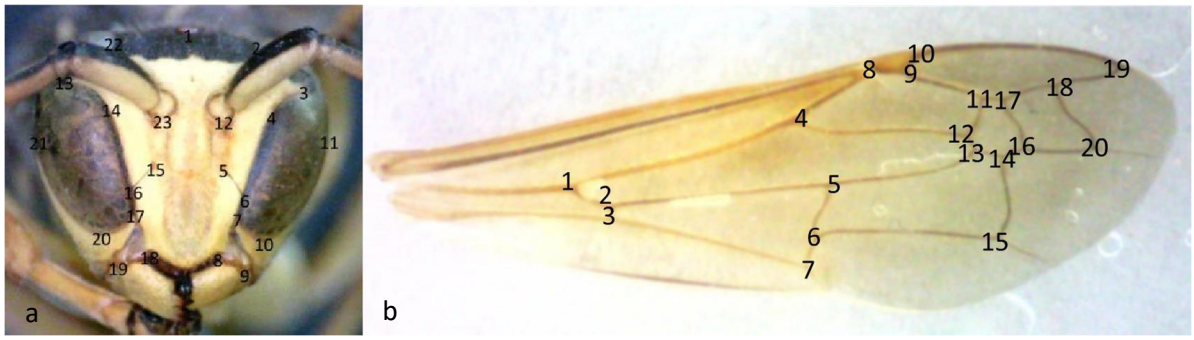
Prikupljanje preparata za morfometrijsku analizu

Anatomskim škaricama svakoj su osi bila odrezana prednja krila i pincetom prenesena na predmetno

staklo na koje je prethodno bila nanesena kapljica vode. Zatim je preko krila bilo postavljeno pokrovno stakalce koje je omogućilo pravilno i potpuno širenje krila. Uz analizu krila, analizirane su i glave svih jedinki vrste *P. nimpha* koje su bile izložene niskoj temperaturi te nasumično odabranih 10 (5 ženki, 5 mužjaka) glava jedinki iste vrste držanih na sobnoj temperaturi za usporedbu. Kako bi se izradile čim ujednačenije slike glave, svaki je primjerak pažljivo postavljen u vidno polje osiguravajući da su oba oka i svi anatomski važni detalji u istoj ravnini. Sve su fotografije bile načinjene komercijalno kupljenim Dino-Lite digitalnim mikroskopom modela AM7515MT8A rezolucije 5 megapiksela.

Izrada morfometrijskog dokumenta u programu *tpsUtil*, označavanje krila u programu *tpsDig* i analiza podataka u programu *tpsRelw* (Rohlf, 2015)

Sve su slike bile uvrštene u dokument javno dostupnog programa *tpsUtil.* Mjerenje opsega asimetrije bilo je provedeno analizom tanke ploče označavajući 23 točke na svakoj slici glave (slika 1a; Oliveira i Gonçalves, 2023) i 20 točaka na svakoj slici krila (slika 1b; Owen, 2012) u programu *tpsDig*. Prilikom označavanja točaka, slike su bile nasumično poredane da se minimizira vjerojatnost pojave pogreške uzrokovane inicijalnom nepreciznošću.



Slika 1 (a) Glava mužjaka vrste P. nimpha s 23 morfometrijske oznake; (b) Krilo mužjaka vrste P. nimpha s 20 morfometrijskih oznaka

Ovdje je svaka točka na svakom krilu i na svakoj glavi dobila svoju x i y koordinatu na odvojenim koordinatnim sustavima. U posljednjem koraku provedena je analiza krila u programu *tpsRelw* (Rohlf, 2015). Udaljenost između dvije točke koje su predstavljale krila iste ose ili lijevu i desnu polovicu glave korištena je kao mjera opsega asimetrije u ovom istraživanju (Rohlf, 2015; Oliveira i Gonçalves, 2023). Asimetrija glava bila je izmjerena na pojedinim uzorcima na kojima je već mjerena asimetrija krila. Kao mjera asimetrije korištena je *procrustes* udaljenost (usporedba nakon usklađivanja po veličini, položaju i rotaciji koja osigurava izravnu usporedivost različitih objekata) između lijevog i desnog krila ili lijeve i desne strane glave, izračunata pomoću *tpsRelw* programa.

Provjera pogreške mjerenja provedena je za postupak označavanja točaka na krilima s obzirom na neautomatiziranu prirodu procesa. Na svakom je od dvadeset nasumično odabranih slika krila proces označavanja svih točaka bio neovisno ponovljen tri puta. Krila su zatim analizirana istim principom kao i u glavnom mjerenju asimetrije uspoređivanjem samo s identičnim primjercima fotografije krila, ne međusobno.

Statistička analiza provedena je izračunom prosječne vrijednosti, standardne devijacije te provedbom t-testa za brojčane i hi-kvadrat testa za kategorijske podatke u programu MS Excel uz razinu statističke značajnosti od $p < 0,05$. Grafički prikaz (slika 2) izrađen je u programu Datanovia (*online R console*).

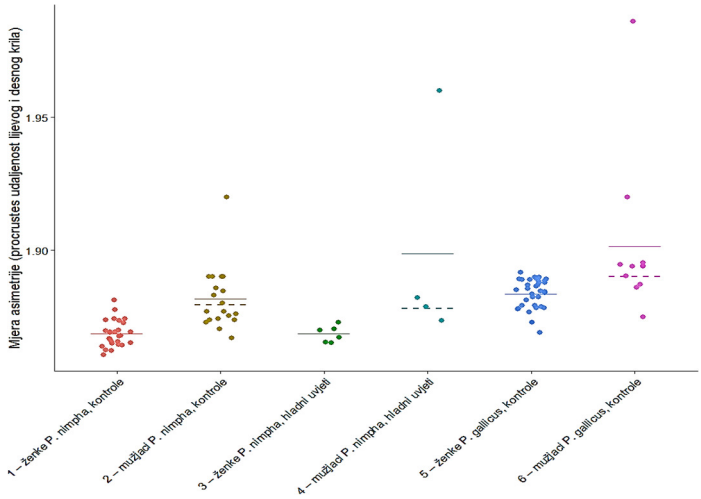
REZULTATI

U ovom istraživanju analizirana su prednja krila ukupno 102 jedinke papirnih osa (68 ženki i 34 mužjaka) od kojih je za 20 jedinki bila izmjerena i asimetrija glave. Uz mjerenje asimetrije koje je u ovom istraživanju

služilo kao glavni pokazatelj razvojne nestabilnosti također je analiziran 21 slučaj smrti tijekom ili neposredno nakon izlaska iz kukuljice (16 mužjaka i 5 ženki) koje nisu bile korištene pri mjerenju asimetrije krila i glave. Ovo je bio statistički značajan rezultat koji je ukazivao na izraženo veću smrtnost mužjaka u ovom stadiju razvoja, u odnosu na dobiveni omjer spolova (χ^2 = 17,36; p < 0,001). Osim navedenih primjeraka papirnih osa, u ovom radu je prikupljeno i 8 primjeraka parazitske ose *Latibulus argiolus* L. određenih ključem za rod *Latibulus* (Oh i sur., 2012), od kojih je jedan primjerak dobiven s gnijezda koje je bilo izloženo niskoj temperaturi.

Poput veće učestalosti ranih smrti, mužjaci obje analizirane vrste imali su izraženiju asimetriju prednjih krila od ženki (slika 2). Kod vrste *P. nimpha* dobiven je statistički značajan rezultat pri usporedbi asimetrije krila mužjaka koja je iznosila 1,881 ± 0,012, a za ženke 1,869 ± 0,005 (p < 0,001). Za mužjake vrste *P. gallicus* zabilježena je asimetrija iznosila 1,901 ± 0,030 što je bilo statistički značajno u usporedbi sa ženkama čija je razina asimetrije iznosila 1,884 ± 0,006 (p = 0,001).

Analiza krila osa vrste *P. nimpha* koje su bile uzgojene pri niskoj temperaturi također je pokazala zanimljiv rezultat (slika 2). Krila mužjaka uzgojenih pri 12 °C bila su statistički značajno veće razine asimetrije od onih mužjaka uzgajanih pri 25 °C (1,899 ± 0,041 za eksperimentalnu skupinu u usporedbi s 1,882 ± 0,041 za kontrolnu; p = 0,029). Istovremeno, ženke nisu pokazale gotovo nikakav opseg razlike s obzirom na to da je razina asimetrije onih ženki uzgajanih pri 12 °C iznosila 1,869 ± 0,003, a za one jedinke uzgajane pri 25 °C 1,869 ± 0,016 (p = 0,314).



Slika 2 Mjere asimetrije prednjih krila za šest analiziranih skupina određenih temeljem vrste, spola i temperaturnih uvjeta u kojima su ose uzgajane (pune horizontalne crte označavaju prosječnu vrijednost asimetrije, iscrtane crte prosječnu vrijednost nakon uklanjanja četiri vrlo visoke vrijednosti, a točke predstavljaju pojedinu jedinku)

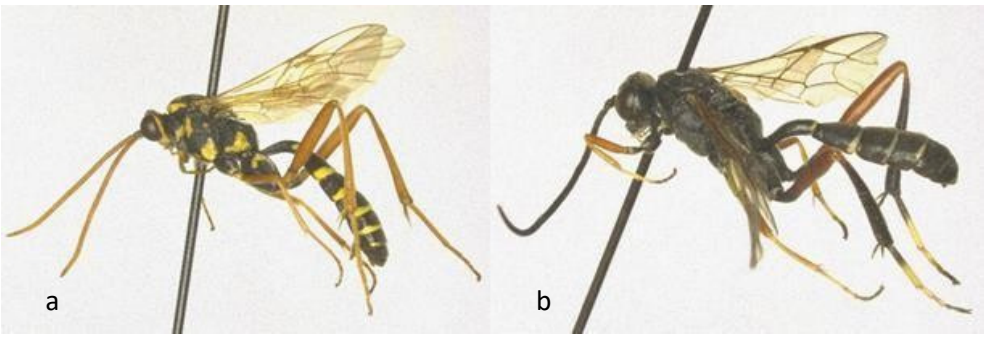
Analiza asimetrije glave nije pokazala ni jednu statistički značajnu razliku. Mužjaci uzgojeni pri niskoj temperaturi imali su prosječnu vrijednost asimetrije od 13,836 ± 0,591 dok su mužjaci uzgojeni pri sobnoj temperaturi imali prosječnu vrijednost od 13,641 ± 0,321 (p = 0,545). Ženke uzgojene pri niskoj temperaturi imale su usporedivu razinu asimetriju sa ženkama uzgojenim na sobnoj temperaturi (13,513 ± 0,201 za eksperimentalnu u usporedbi s 13,691 ± 0,225 za kontrolnu; p = 0,200). Unatoč tome, nije zabilježena statistički značajna razina asimetrije prilikom usporedbe mužjaka i ženki uzgojenih pri temperaturi od 12°C (p = 0,241) kao ni mužjaka i ženki uzgojenih pri 25 °C (p = 0,900).

Za 12 je odraslih ženki prikupljenih iz okoliša (divlja populacija) na krilima u području stigme, pigmentiranog zadebljanja krila, zabilježena hiperpigmentacija (slika 3), dok su za 16 mužjaka i 23 ženke

zabilježene manje promjene nervaturnog sustava krila (nepotpuni spoj ili pomak pojedine žilice).

Slika 3 Hiperpigmentacija prednjeg krila ženke vrste *P. gallicus* oko područja stigme

Dodatno, opažena je fenotipska varijacija i parazitske ose *Latibulus argiolus* uzgojene pri niskoj temperaturi na gnijezdu vrste *P. nimpha* držane na temperaturi od 12 °C (slika 4). Jedinka koja je neplanirano bila uzgojena zajedno s ostalim uzorcima u ovoj skupini razvila je tamnije tjelesno obojenje (slika 4b) u odnosu na druge jedinke *L. argiolus* uzgojene pri sobnoj temperaturi (slika 4a).



Slika 4 (a) Primjerak parazitske ose *L. argiolus* sa svjetlijim obrascem obojenosti tijela; (b) primjerak parazitske ose *L. argiolus* s tamnijim obrascem obojenosti

Od 21 primjerka osa koje su uginule nakon završetka procesa preobrazbe, njih je 12 uginulo prije izlaska iz kukuljice još uvijek unutar ovojnice (slike 5a, b), dok ih je devet uginulo nakon izlaska iz kukuljice (ovojnica odsutna; slika 5c). Pri tome je smrt prije izlaska iz kukuljice bila zabilježena za ukupno dvije ženke i 10 mužjaka (χ^2 = 13,50; p < 0,001), dok je nakon izlaska iz kukuljice zabilježeno tri smrti ženki i šest smrti mužjaka (χ^2 = 4,50; p = 0,034). Od mužjaka koji su uginuli u ova dva stadija tri su imala vidljive makroskopske malformacije. Dva su bila ispravne anatomske građe uz iznimno izraženu asimetriju krila, dok je kod jednog zabilježeno više morfoloških odstupanja, uključujući skraćene noge, deformirana ticala te nedovoljno razvijena krila (slika 5b).

Slika 5 (a) Mužjak vrste *P. nimpha* koji je uginuo prije izlaska iz kukuljice; (b) mužjak vrste *P. nimpha* s višestrukim morfološkim odstupanjima; (c) mužjak vrste *P. nimpha* koji je uginuo nakon izlaska iz kukuljice

Konačno, bila je određena pogreška mjerenja za proces postavljanja morfometrijskih oznaka. Za dvadeset

nasumično odabranih krila je pogreška u mjerenju i izračunu asimetrije iznosila u prosjeku 0,173 ± 0,012, što je bilo znatno manje od prosječne vrijednosti asimetrije pojedinih primjeraka.

RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja potvrdili su da mužjaci obje od ispitivanih vrsta pokazuju značajno višu razinu asimetrije prednjih krila u usporedbi sa ženkama. Ovakav rezultat podupire teoriju haploidne podložnosti, odnosno pretpostavke da su haploidni organizmi, poput mužjaka analiziranih osa, podložniji nepovoljnom utjecaju okoliša kojeg je moguće izmjeriti na fenotipu. Ovime je prva hipoteza potvrđena, odnosno viši stupanj asimetrije krila analiziranih mužjaka može služiti kao dokaz njihove smanjene funkcionalne sposobnosti.

Uzgojem jedinki vrste *P. nimpha* na niskoj temperaturi nije dobivena statistički značajna razlika u razini asimetrije prednjih krila ženki u odnosu na ženke uzgojene na sobnoj temperaturi. Za razliku od ženki, kod mužjaka je zabilježena statistički značajna razlika ponovno ukazujući na njihovu smanjenu sposobnost kompenziranja utjecaja nepovoljnog okoliša. Ovime je dio druge hipoteze koji se odnosio na opseg asimetrije prednjih krila djelomično potvrđen.

Međutim, analiza asimetrije glave nije pokazala statistički značajne razlike ni u odnosu na temperaturu ni između spolova čime je dio druge hipoteze u potpunosti opovrgnut. Ovaj rezultat moguće je interpretirati na više načina. Moguće je da je glava u razvojnom smislu stabilnija i da se njezina razvojna regulacija snažnije održava prilikom izloženosti stresnim uvjetima za razliku od krila koja su potencijalno osjetljivija na razvojne poremećaje (Graham i sur., 2010). Dodatno, u obzir treba uzeti manji uzorak glava u usporedbi s krilima te složeniju prirodu procesa fotografiranja trodimenzionalne glave u usporedbi s dvodimenzionalnim krilom. Moguće je da bi na većem ispitivanom uzorku rezultati opsega asimetrije glave odstupali od rezultata dobivenih u ovom istraživanju. Sve ovo ide u prilog činjenici da je mjerenje utjecaja stresa i asimetrije na jedinki, a time i u populaciji, složenije od uspostavljanja jednostavnog uzročno-posljedičnog odnosa (De Coster i sur., 2013).

Jedna od glavnih spoznaja ovog istraživanja potreba je za proširivanjem testiranog uzorka pri mjerenju funkcionalne sposobnosti na razini populacije. Mjerenje funkcionalne sposobnosti isključivo na aktivnim, odraslim jedinkama može dovesti do pogrešnih zaključaka o ekološkoj stabilnosti vrste s obzirom na to da takav pristup zanemaruje smrtnost u ranijim razvojnim stadijima. Pri tome je u ovom istraživanju pokazano da je rana smrtnost statistički značajno češća kod mužjaka, što dodatno potvrđuje teoriju haploidne podložnosti. Ovo se može smatrati preciznom mjerom stresa u koloniji s obzirom na to da visoka stopa smrtnosti ukazuje na narušenu funkcionalnu sposobnost populacije. Stoga je za potpunu evaluaciju funkcionalne sposobnosti nužno analizirati cijelo gnijezdo, idealno za vrijeme trajanja godišnjeg ciklusa od njegova početka do kraja, uključujući i nerazvijene stadije.

Na nekima je od analiziranih krila jedinki koje su iz okoliša bile prikupljene u odraslom stadiju oko područja stigme, pigmentiranog zadebljanja krila, uočeno zatamnjenje, tj. pojava hiperpigmentacije. Jedno je od mogućih objašnjenja ove hiperpigmentacije oštećenje uzrokovano sunčevim zračenjem. S obzirom na to da ne postoji dovoljan broj uzoraka koji imaju ovo fenotipsko obilježje te da nije poznato u kojim su uvjetima jedinke s tim obilježjem živjele prije nego što su bile prikupljene, nije moguće sigurno tvrditi da je ova hiperpigmentacija uzrokovana utjecajem sunčeva zračenja.

Osim svih rezultata zabilježenih za ose roda *Polistes,* opažene su fenotipske varijacije i parazitske ose *Latibulus argiolus* uzgojene pri niskoj temperaturi na gnijezdu vrste *P. nimpha* u vidu tamnijeg obojenja

tijela u odnosu na parazitske ose uzgojene pri sobnoj temperaturi. Ovaj fenomen, termalni melanizam, zabilježen je i kod ženki papirnih osa roda *Polistes* pojavom tamnijeg obojenja abdomena radi učinkovitije apsorpcije sunčeva zračenja i bržeg postizanja radne temperature tijela (De Souza i sur., 2017). Ova prilagodba boje sugerira da hladnoća na sličan način utječe i na ose drugih vrsta, potičući prilagodbu uvjetima okoliša.

Konačno, iako rezultati ovog istraživanju djelomično potvrđuju hipoteze, potrebno ih je sagledati kroz nekoliko ograničenja. Prvo, opseg asimetrije izmjeren je na ograničenom broju uzoraka samo dvije vrste, čime se valjanost rezultata ne može izravno primijeniti na druge vrste. Dodatno, u ovom je istraživanju izmjeren utjecaj samo jednog okolišnog stresora u mjeri koja je učinak pokazala pretežito na mužjacima. Različiti okolišni čimbenici mogli bi uzrokovati drugačije ishode.

ZAKLJUČCI

Temeljem rezultata provedenog istraživanja moguće je zaključiti sljedeće:

- mužjaci vrste P. nimpha i P. gallicus imaju veći opseg asimetrije prednjih krila od ženki uzgojenih pri sobnoj temperaturi;
- mužjaci vrste P. nimpha uzgojeni pri 12 °C imaju statistički značajno veću razinu asimetrije od mužjaka uzgojenih na sobnoj temperaturi, dok za ženke uzgojene u istim kontrolnim i eksperimentalnim uvjetima nije zabilježena statistički značajna razlika;
- asimetrija glave mužjaka i ženki nije se statistički značajno razlikovala između skupina uzgojenih pri sobnoj temperaturi i na niskoj temperaturi;
- stopa rane smrtnosti bila je statistički značajno veća za mužjake u odnosu na ženke;
- mjerenje opsega asimetrije isključivo na aktivnim odraslim jedinkama uhvaćenima u prirodi nije dovoljno za cjelovitu analizu asimetrije, potrebno je sagledati koloniju u cijelosti, uključujući i stope rane smrtnosti.

LITERATURA

Banaszak-Cibicka W., Fliszkiewicz M., Langowska A., Żmihorski M. 2017. Body size and wing asymmetry in bees along an urbanization gradient. Apidologie 49: 297–306.

Blanckenhorn W. U., Kraushaar U. R., Teuschl Y., Reim C. 2004. Sexual selection on morphological and physiological traits and fluctuating asymmetry in the black scavenger fly Sepsis cynipsea. Journal of evolutionary biology 17: 629–641.

De Coster G., Van Dongen S., Malaki P., Muchane M., Alcántara-Exposito A., Matheve H., Lens L. 2013. Fluctuating asymmetry and environmental stress: understanding the role of trait history. PloS one 8: e57966.

De Souza A., Turillazzi S., Lino-Neto J., Santini G. 2017. Colder environments may select for darker paper wasps. Biological journal of the Linnean Society 120.

de Souza A. R., Mayorquin A. Z., Sarmiento C. E. 2020. Paper wasps are darker at high elevation. Journal of thermal biology 89: 102535.

Graham J. H., Raz S., Hel-Or H., Nevo E. 2010. Fluctuating Asymmetry: Methods, Theory, and Applications. Symmetry 2: 466–540.

Holló G. i Novák M. 2012. The manoeuvrability hypothesis to explain the maintenance of bilateral symmetry in animal evolution. Biology direct 7: 22.

Kennedy P., Radford A. N. 2020. Sibling quality and the haplodiploidy hypothesis. Biology Letters 16: 20190764.

Lens L., Van Dongen S., Kark S., Matthysen E. 2002. Fluctuating asymmetry as an indicator of fitness: can we bridge the gap between studies? Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society 77: 27–38.

Liebert A. E., Sumana A., Starks P. T. 2005. Diploid males and their triploid offspring in the paper wasp Polistes dominulus. Biology letters 1: 200–203.

Møller A. P. 1998. Developmental instability as a general measure of stress. U: Møller A. P., Milinski M., Slater P. J. B., Stress and Behavior. Academic Press, San Diego, str. 181–213.

Oh S. H., An S. L., Lee J. W. 2012. Review of Korean Latibulus (Hymenoptera: Ichneumonidae: Cryptinae) and a key to the world species. The Canadian entomologist 144: 509–525.

Oliveira P. S., Gonçalves R. B. 2023. Head geometric morphometrics as a reliable method to discriminate sexes and species of Megalopta, a nocturnal bee genus (Hymenoptera, Apoidea). Apidologie 54: 44.

Owen R. 2012. Applications of morphometrics to the Hymenoptera, particularly bumble bees (Bombus, Apidae). InTech doi: 10.5772/34745

Rayor L. S., Mooney L. J., Renwick J. A. 2007. Predatory behavior of Polistes dominulus wasps in response to cardenolides and glucosinolates in Pieris napi caterpillars. Journal of chemical ecology 33: 1177–1185.

Rohlf J. F. 2015. The tps series of software. Hystrix, the Italian journal of mammalogy 26: 9–12.

Schmid-Egger C., van Achterberg K., Neumeyer R., Morinière J., Schmidt S. 2017. Revision of the West Palaearctic Polistes Latreille, with the descriptions of two species – an integrative approach using morphology and DNA barcodes (Hymenoptera, Vespidae). Pensoft Publishers 713: 53–112.

Stabentheiner A., Mauerhofer T., Willfurth R., Kovac H., Stabentheiner E., Käfer H., Petrocelli I. 2024. The costs of overwintering in paper wasps (Polistes dominula and Polistes gallicus): the use of energy stores. Journal of comparative physiology B 194: 131–144.

Strassmann J. E. 1991. Costs and benefits of colony aggregation in the social wasp, Polistes annularis. Behavioral ecology 2: 204–209.

Szentgyörgyi H., Moroń D., Nawrocka A., Tofilski A., Woyciechowski M. 2017. Forewing structure of the solitary bee Osmia bicornis developing on heavy metal pollution gradient. Ecotoxicology 26: 1031–1040.

Van Oystaeyen A., Oliveira R.C., Holman L., van Zweden J.S., Romero C., Oi C.A., d'Ettorre P., Khalesi M., Billen J., Wäckers F., Millar J.G., Wenseleers T. 2014. Conserved class of queen pheromones stops social insect workers from reproducing. Science 343: 287–290.

Wadgymar S.M., Sheth S., Josephs E., DeMarche M., Anderson J. 2024. Defining fitness in evolutionary ecology.
International journal of plant sciences 185: 218–227.

Wilson-Rich N., Pilowsky J.A., Foo B., Tien T., Hester F., Starks P.T. 2014. A test of the haploid susceptibility hypothesis using a species with naturally occurring variation in ploidy. Insectes Sociaux 61: 163–169.

Kvaliteta morske vode i školjkaša kao pokazatelj promjena morskog ekosustava u omiškoj gradskoj luci

Josip Ćatipović, 7. razred
Rina Knezović i Tonka Stanić, 8. razred

Osnovna škola Josip Pupačić, Omiš
Mentor: *Tamara Banović*

SAŽETAK
U radu je istražena kakvoća morske vode i školjkaša u gradskoj luci Omiša kao pokazatelj mogućih promjena u morskom ekosustavu nakon rekonstrukcije luke i povećanja broja plovila. Fizikalno-kemijska svojstva mora praćena su dugoročno, od 2015. do 2026. godine, prema GLOBE protokolima, dok je mikrobiološka kakvoća morske vode i mediteranske dagnje *Mytilus galloprovincialis* procijenjena analizom indikatora fekalnog onečišćenja (*Escherichia coli* i crijevni enterokoki). Također je ispitan potencijalni utjecaj bio kugli s efektivnim mikroorganizmima na poboljšanje kakvoće morske vode. Rezultati pokazuju relativnu stabilnost većine fizikalno-kemijskih parametara, uz blagi porast temperature mora i pojavu mjerljivih koncentracija nitrata i nitrita nakon rekonstrukcije luke. Mikrobiološka analiza pokazala je niske koncentracije indikatorskih bakterija u morskoj vodi i školjkašima, što more svrstava u kategoriju izvrsne kakvoće prema važećim propisima. Dobiveni rezultati ne ukazuju na pogoršanje sanitarne kakvoće mora i školjkaša u odnosu na prethodna istraživanja iz 2017. godine. Primjena bio kugli s efektivnim mikroorganizmima nije pokazala značajan učinak na smanjenje mikrobiološkog opterećenja tijekom kratkog razdoblja istraživanja. Rezultati upućuju na potrebu daljnjeg dugoročnog praćenja kako bi se pouzdanije procijenili trendovi promjena u morskom okolišu.

Ključne riječi: *indikatori fekalnog onečišćenja; membranska filtracija; bio kugle*

UVOD

Obalna područja su dinamični i ekološki osjetljivi sustavi pod snažnim utjecajem ljudskih aktivnosti. Urbanizacija, razvoj infrastrukture, pomorski promet, turizam te rekonstrukcije luka mijenjaju fizikalno-kemijska i biološka svojstva mora, povećavajući unos hranjivih i organskih tvari te mikroorganizama fekalnog podrijetla, što može narušiti ekosustav i ugroziti zdravlje ljudi (WHO, 1997; Krstulović i Šolić, 2006).

Gradske luke, kao zatvoreni ili poluzatvoreni sustavi, posebno su osjetljive na takve utjecaje. Povećan broj plovila i blizina urbanih zona dovode do većeg unosa onečišćujućih tvari, uključujući fekalne mikroorganizme. Njihova prisutnost procjenjuje se pomoću indikatora poput bakterije *Escherichia coli* i crijevnih enterokoka, koji upućuju na moguće prisustvo patogena (Ottaviani i sur., 2006). Školjkaši, poput mediteranske dagnje, filtriranjem akumuliraju mikroorganizme te služe kao bioindikatori kakvoće mora, ali i potencijalni izvor infekcija za ljude (Marino i sur., 2005; Stabili i sur., 2005).

Istraživanje koje su proveli učenici GLOBE grupe 2016. i 2017. u gradskoj luci u Omišu pokazala su da su fizikalno-kemijska svojstva mora i razine indikatora fekalnog onečišćenja bile niske, što je upućivalo na visoku kakvoću mora i sanitarnu ispravnost školjkaša (Banović i Štrbac, 2024). U međuvremenu je luka rekonstruirana i proširena, čime su moguće promjene u hidrodinamici, izmjeni vode i unosu onečišćenja, pa je potrebno ponovno praćenje kakvoće mora i školjkaša.

Za procjenu sanitarne kakvoće koriste se indikatori koji trebaju biti povezani s prisutnošću patogena, proporcionalni njihovoj koncentraciji, lako odredivi i nepatogeni za čovjeka (Sbaraglia i sur., 1995; Menon, 2000; Ottaviani i sur., 2006). Riječ je o mikroorganizmima crijevnog podrijetla koji ukazuju na fekalno onečišćenje i moguće prisustvo patogena (Krstulović i Šolić, 2006).

Suvremena istraživanja usmjerena su i na biološke metode poboljšanja kakvoće vode, poput primjene efektivnih mikroorganizama (EM), koji potiču razgradnju organske tvari i smanjuju broj nepoželjnih mikroorganizama (Yamada i Xu, 2000; Javaid, 2006). U vodi se primjenjuju kao bio kugle, s ciljem poboljšanja fizikalno-kemijskih i mikrobioloških svojstava, no njihov učinak zahtijeva dodatna lokalna istraživanja kako bi se procijenio njihov stvarni doprinos u specifičnim obalnim uvjetima (Tomczyk i sur., 2024). Sustavno praćenje kakvoće mora i školjkaša ključno je za zaštitu ekosustava i zdravlja ljudi, jer omogućuje uočavanje promjena i primjenu održivih mjera upravljanja obalnim područjima.

Istraživačka pitanja koja smo si postavili su radu su sljedeća: Mijenja li se kakvoća morske vode i školjkaša u gradskoj luci Omiša nakon rekonstrukcije i povećanja broja plovila? Mogu li bio kugle s efektivnim mikroorganizmima poboljšati fizikalno-kemijska svojstva i mikrobiološku ispravnost morske vode i školjkaša?

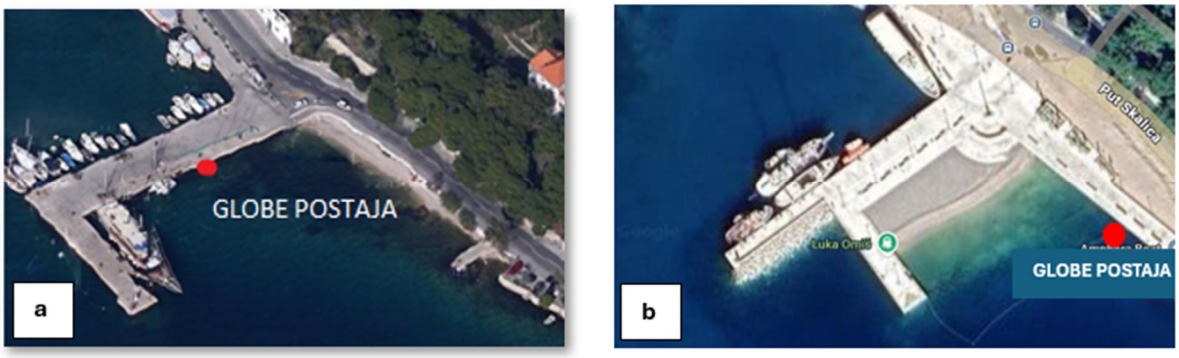
Cilj istraživanja je usporediti fizikalno-kemijska svojstva morske vode u omiškoj luci s podacima prije rekonstrukcije, procijeniti mikrobiološku kakvoću vode i mediteranskih dagnji te ispitati učinak EM bio kugli na mikrobiološko opterećenje i fizikalno-kemijske parametre.

Na temelju svega navedenoga, postavljene su sljedeće hipoteze:
1. Zbog urbanizacije i većeg broja plovila, fizikalno-kemijska svojstva morske vode u omiškoj gradskoj luci upućuju na smanjenje kvalitete morske vode u odnosu na analizu prije deset godina.
2. Sanitarna ispravnost morske vode i školjkaša lošija je u odnosu na uzorke analizirane na istom području prije rekonstrukcije luke.
3. Bio kugle s efektivnim mikroorganizmima pozitivno utječu na smanjenje mikrobiološkog opterećenja morske vode i školjkaša te na poboljšanje fizikalno-kemijskih svojstava morske vode.

METODE RADA

Metodologija istraživanja temelji se na kontinuitetu mjerenja od 2016./2017. godine, uz dodatak eksperimentalne primjene EM bio kugli. Istraživanje obuhvaća tri faze: kontinuirano praćenje fizikalno-kemijskih svojstava mora prema GLOBE protokolima, mikrobiološku analizu morske vode i školjkaša prije i nakon rekonstrukcije luke te ispitivanje učinka EM bio kugli na njihovu kakvoću.

Mjerenja su provedena u omiškoj gradskoj luci na dvjema prostorno bliskim lokacijama koje predstavljaju razdoblje prije i nakon rekonstrukcije (slika 1).



Slika 1 Satelitska snimka GLOBE postaje u omiškoj gradskoj luci a) prije rekonstrukcije luke (od 2014. do 2022. godine); b) nakon rekonstrukcije luke (od svibnja 2025. godine)

Postaja a) nalazila se u unutarnjem, dubljem dijelu luke, no nakon rekonstrukcije i nasipavanja postala je plitka i neprikladna za uzorkovanje. Stoga je postaja b) uspostavljena na suprotnoj strani istog lučkog bazena, na udaljenosti manjoj od 100 m, zbog odgovarajuće dubine i sigurnog pristupa.

Obje postaje nalaze se unutar istog poluzatvorenog akvatorija te su izložene sličnim hidrološkim i meteorološkim uvjetima. Iako je konfiguracija obale djelomično izmijenjena, osnovne značajke cirkulacije mora ostaju usporedive. Na uvjete utječe i blizina ušća Cetine, čiji dotok slatke vode može utjecati na salinitet i slojevitost, podjednako na obje postaje.

Unatoč manjoj brojnosti i rastu mediteranskih dagnji na GLOBE postaji, one su prisutne na konopima i vezovima, s kojih su uzorkovane kao i u istraživanju 2016./2017. godine. Slični stanišni uvjeti (podloga, zasjenjenost, hidrodinamika) omogućuju usporedivost rezultata pa promjena mikrolokacije nije značajno narušila kontinuitet istraživanja.

Određivanje fizikalno-kemijskih svojstva vode korištenjem GLOBE protokola

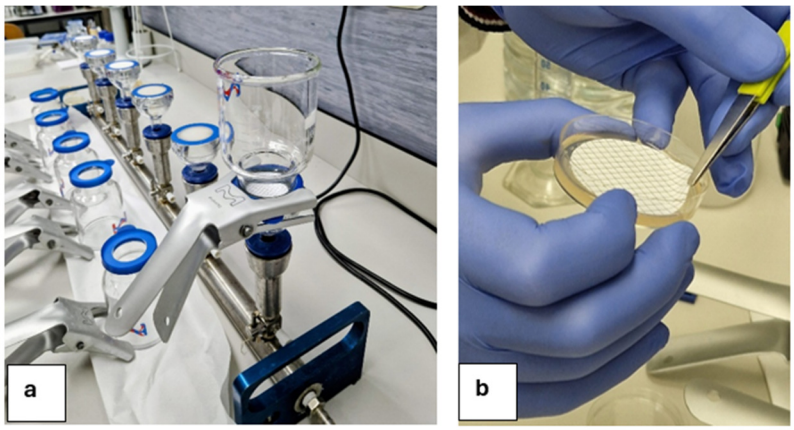
Fizikalno-kemijska svojstva morske vode određivana su prema standardnim GLOBE protokolima (GLOBE, 2003). Uzorkovanja su provedena najmanje jednom tjedno tijekom nastavne godine, a ljeti najmanje dva puta mjesečno, uz odstupanja tijekom pandemije COVID-19 i izgradnje luke zbog ograničenog pristupa.

Temperatura je mjerena termometrom, pH digitalnim pH-metrom ili lakmus papirom, prozirnost turbidity-cijevi, nitrati i nitriti Hach setom ili indikatorskim trakicama, otopljeni kisik Winklerovom metodom, a salinitet areometrom ili digitalnom sondom (Vernier GDX-SAL). Svi podaci pohranjeni su u GLOBE bazu.

Određivanje mikrobiološke ispravnosti morske vode i školjkaša u omiškoj gradskoj luci

Uzorkovanje morske vode provedeno je sterilnim bocama na GLOBE postaji uz obalu gradske luke. Uzorci su unutar jednog sata transportirani u ovlašteni laboratorij Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu, gdje su učenici sudjelovali u filtriranju i postavljanju membrana na selektivne hranjive podloge.

Kakvoća mora procijenjena je pomoću indikatora fekalnog onečišćenja (*E. coli* i crijevni enterokoki), primjenom metode membranske filtracije (slika 2a). Membrane su inkubirane na selektivnim podlogama (slika 2b): enterokoki 48 h na 37 °C, a *E. coli* 24 h na 37 °C. Izrasle kolonije prebrojane su lupom, a rezultati izraženi kao broj kolonija na 100 mL morske vode.

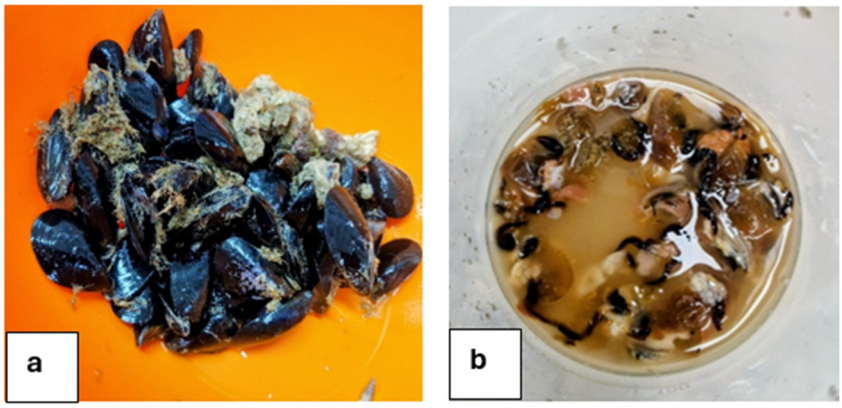


Slika 2 Uređaj za membransku filtraciju (a) i postavljanje membrane na hranjivu podlogu (b)

Kakvoća mora za kupanje određena je prema Uredbi o kakvoći mora za kupanje (NN 73/2008).

Uzorkovanje školjkaša provedeno je na plutači u središtu lučkog bazena uz GLOBE postaju, dostupnoj isključivo brodom. Ista lokacija korištena je i 2017. što je važno radi usporedivosti podataka. Uzorci su ručno prikupljeni (jedinke slične veličine), a u laboratoriju su obrađeni tako da su se odvajale ljušture,

homogeniziralo tkivo i međuljušturna tekućina, potom su rađena serijska razrjeđenja i inkubaciju (slike 3 i 4).



Slika 3 Uzorci dagnje prije mikrobiološke analize (a) te tkivo i međuljušturna tekućina dagnji (b)

Slika 4 Priprema podloga za inkubaciju

Kao indikator za procjenu kvalitete školjkaša korištena je *E. coli*. Detekcija i brojenje *E. coli* u školjkašima provedeno je metodom najvjerojatnijeg broja (MPN), a procjena kvalitete školjkaša određena prema Pravilniku o higijeni hrane životinjskog podrijetla (NN 99/2007) i Pravilniku o službenim kontrolama hrane životinjskog podrijetla (NN 99/2007). Izračunao se i faktor akumulacije bakterija kao omjer koncentracije bakterija u tkivu školjkaša i koncentracije bakterija u morskoj vodi.

Izrada i primjena bio kugli s efektivnim mikroorganizmima

Bio kugle izrađene su prema uputama proizvođača EM pripravka (EFEKTIVNI MIKROORGANIZMI ORIGINALNA TEHNOLOGIJA RIJEKA d.o.o.) miješanjem EM otopine, gline i Bokashi piljevine. Smjesa je oblikovana u kugle promjera 5–7 cm te fermentirana i sušena 15 dana (slika 5).

Slika 5 EM bio kugle tijekom fermentacije

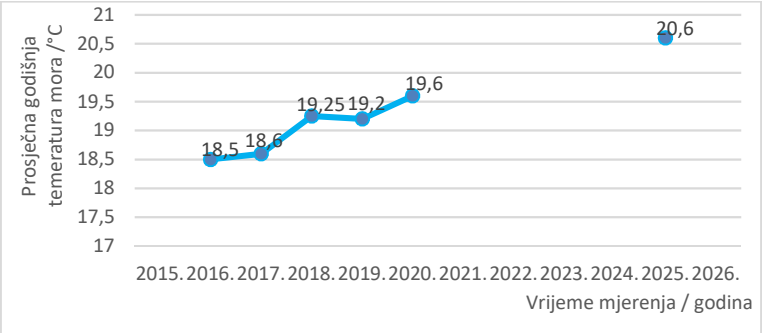
Nakon toga u more je, uz suglasnost gradskih vlasti, ravnomjerno raspoređeno 2000 bio kugli na istraživanoj lokaciji. Tijekom fermentacije razvijaju se mikroorganizmi koji doprinose razgradnji organske tvar i smanjenju neugodnih mirisa u vodenom okolišu. Mjesec dana nakon primjene provedeno je ponovno uzorkovanje i mikrobiološka analiza morske vode i školjkaša u suradnji s Institutom za oceanografiju i ribarstvo u Splitu.

REZULTATI

Fizikalno-kemijska svojstva vode

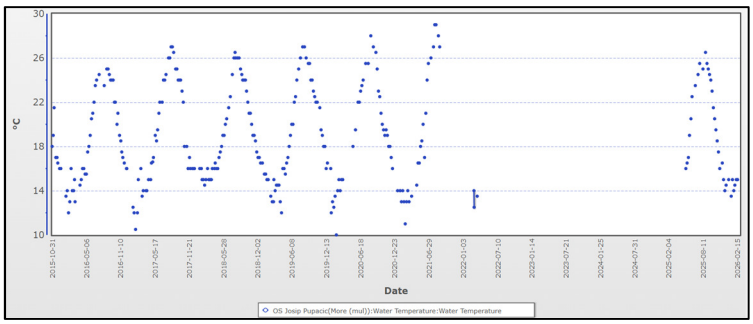
Analiza fizikalno-kemijskih svojstava morske vode u omiškoj gradskoj luci, prema GLOBE protokolima napravljena je 288 puta u vremenskom razdoblju od listopada 2015. do ožujka 2026. godine. Radi preglednosti višegodišnjeg niza mjerenja (2015. – 2026.) izračunate su prosječne godišnje vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara mora. Mjerenja nisu napravljena tijekom 2023. i 2024. godine zbog rekonstrukcije gradske luke i nemogućnosti pristupa GLOBE postaji, a ponovo su nastavljena od svibnja 2025. godine. Izostaje i određeni broj podataka za 2021. i 2022. godinu kada su mjerenja periodično izostajala zbog pandemije COVID-a.

Tijekom promatranog razdoblja uočava se blagi, ali stalni porast prosječne godišnje temperature mora (slika 6), ali zaključke treba izvoditi oprezno, prvenstveno zato što izostaju mjerenja, a i korišteni termometri nisu uvijek bili isti tijekom desetak godina mjerenja temperature mora.



Slika 6 Prosječna godišnja temperatura mora na GLOBE mjernoj postaji u omiškoj gradskoj luci od 2015. do 2026.

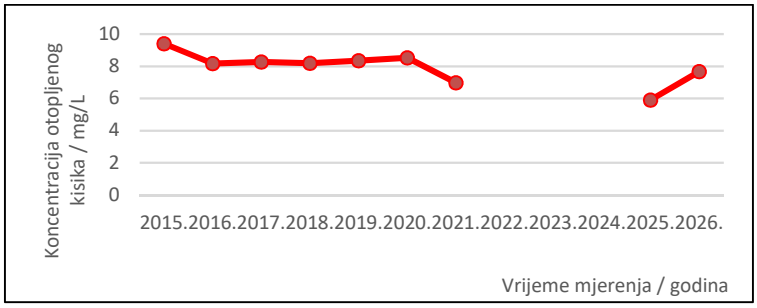
Prikaz ukupnog niza podataka omogućuje uvid u amplitudu sezonskih kolebanja, dok srednje godišnje vrijednosti olakšavaju uočavanje eventualnih dugoročnih promjena. Graf svih mjerenja (slika 7) prikazuje izražene sezonske oscilacije temperature, s najvišim vrijednostima tijekom ljetnih mjeseci i najnižima tijekom zime. Amplituda sezonskih kolebanja ostaje relativno ujednačena kroz godine, dok je vidljivo da se maksimalne ljetne vrijednosti u novijem razdoblju javljaju pri nešto višim temperaturama nego u početnim godinama mjerenja.



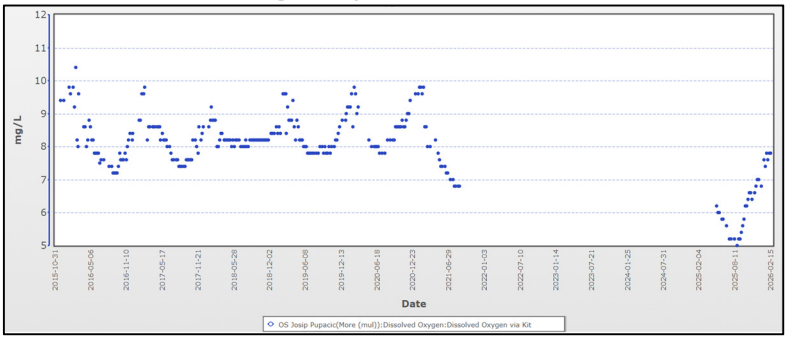
Slika 7 Grafički prikaz svih unesenih izmjerenih vrijednosti temperature mora u °C od 2015. do 2026. za GLOBE postaju u omiškoj gradskoj luci Izvor: https://vis.globe.gov/GLOBE/

Srednje godišnje koncentracije otopljenog kisika prikazane su na slici 8, dok je grafički prikaz svih unesenih mjerenja koncentracije otopljenog kisika prikazan na slici 9. Graf pojedinačnih mjerenja (slika 9) pokazuje sezonski obrazac obrnut od temperature, s višim koncentracijama tijekom hladnijeg dijela godine i nižim tijekom toplijih mjeseci.

Na grafikonu s unesenim prosječnim godišnjim vrijednosti koncentracija otopljenog kisika (slika 8) uočavaju se manje varijacije u koncentraciji kisika i smanjenje koncentracije tijekom 2021. i 2025. godine.



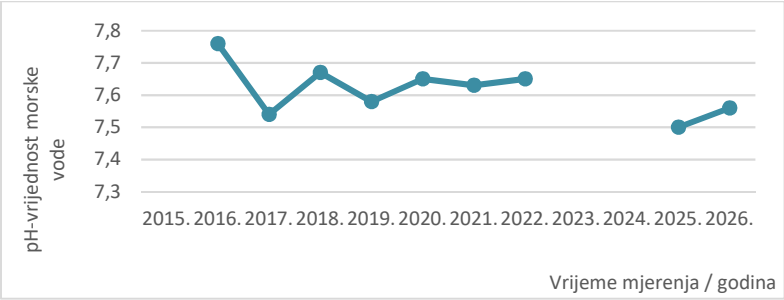
Slika 8 Prosječna godišnja koncentracija otopljenog kisika u mg po L morske vode na GLOBE mjernoj postaji u omiškoj gradskoj luci od 2015. do 2026.



Slika 9 Grafički prikaz svih unesenih izmjerenih vrijednosti koncentracije otopljenog kisika u mg po L morske vode od 2015. do 2026. godine za GLOBE postaju u omiškoj gradskoj luci

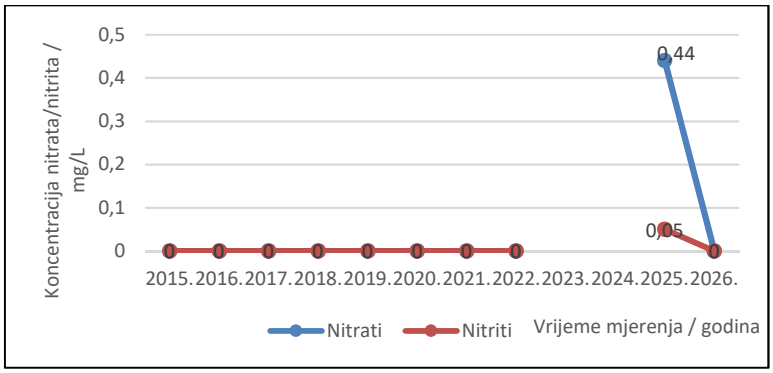
Izvor: https://vis.globe.gov/GLOBE/

Srednje godišnje pH-vrijednosti morske vode (slika 10) pokazuju relativnu stabilnost tijekom cijelog razdoblja mjerenja.



Slika 10 Grafički prikaz prosječnih godišnjih pH-vrijednosti morske vode, na GLOBE mjernoj postaji u omiškoj gradskoj luci od 2015. do 2026.

Slika 11 prikazuje prosječne godišnje vrijednosti koncentracija nitrata i nitrita u mg po L morske vode. Uočljivo je da su samo tijekom 2025. godine koncentracije nitrita i nitrata bile mjerljive.



Slika 11 Prosječna godišnja koncentracija nitrata i nitrita u mg po L morske vode, na GLOBE mjernoj postaji u omiškoj gradskoj luci od 2015. do 2026.

Vrijednosti saliniteta promjenjive su i kretale su se od 36,9 do 38,9‰. Podaci o salinitetu nisu dostupni u GLOBE bazi podatak pa izostaje grafički prikaz mjerenja. Najčešća izmjerena vrijednost saliniteta bila je 38 i 38,2‰. Kod svih mjerenja imali smo kontinuitet u određivanju prozirnosti vode i ona je uvijek iznosila maksimalnih 120 cm koje mjeri turbidity-cijev iz školskog GLOBE laboratorija.

Mikrobiološka analiza morske vode i školjkaša

Tablica 1 prikazuje broj bakterijskih kolonija indikatora u tri uzorka morske vode iz omiške gradske luke. Uzorak 1 uzet je 10. veljače 2017. prije rekonstrukcije luke, a uzorak 2 10. veljače 2026. nakon rekonstrukcije. Dan nakon drugog uzorkovanja u luku je uneseno 2000 EM bio kugli, a treći uzorak prikupljen je mjesec dana kasnije.

Vrijednosti koncentracija enterokoka u uzorcima kretao se od 23 do 24 kolonije u 100 mL morske vode, dok je koncentracija broja kolonija *E. coli* u 100 mL morske vode bila od 14 do 25 poraslih kolonija, što upućuje da morska voda prema Uredbi o kakvoći mora za kupanje (NN 73/2008) pripada kategoriji izvrsne kakvoće vode, kako 2017. godine tako i 2026. godine nakon puštanja u uporabu novoizgrađene nautičke luke.

Tablica 1. Pregled broja kolonija indikatora fekalnog onečišćenja u različitim uzorcima morske vode u omiškoj gradskoj luci i fizikalno-kemijske vrijednosti morske vode izmjerene prema GLOBE protokolima na dan uzorkovanja

Uzorak	Datum uzorkovanja	CFU Fekalni enterokoki/ 100 mL vode	CFU *E. coli* / 100 mL vode	Temperatura °C	Kisik mg/L	pH	Nitrati/ nitriti mg/L
Uzorak 1	10.2.2017.	24	14	12,0	9,6	7,74	0/0
Uzorak 2	10.2.2026	23	25	13,5	7,8	7,54	0/0
Uzorak 3	11.3.2026.	23	24	14,5	7,8	7,58	0/0

Vrijednosti poraslih kolonija *E. coli* u mediteranskoj dagnji kretale su se od 23 do 42 kolonije (tablica 2). Prema Pravilniku o higijeni hrane životinjskog podrijetla (NN 99/2007) i Pravilniku o službenim kontrolama hrane životinjskog podrijetla (NN 99/2007), vrijednosti su ispod granice koja bi ukazivala na sanitarnu neispravnost školjkaša.

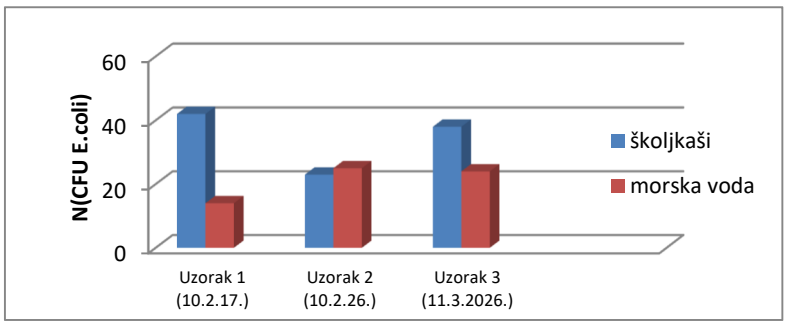
Tablica 2 Pregled broja poraslih kolonija *Escherichia coli* u uzorcima školjkaša iz omiške gradske luke i faktor akumulacije bakterija u školjkašima

Uzorak	Datum	*Escherichia coli*/100 g mesa i međuljušturne tekućine	Faktor akumulacije *E.coli*
Uzorak 1	10.2.2017.	42	3,00
Uzorak 2	10.2.1026.	23	0,92
Uzorak 3	11.3.2026.	38	1,58

Usporedbom dobivenih koncentracija indikatora fekalnog onečišćenja *E.coli* uočava se da je faktor akumulacije *E. coli* u uzorcima školjkaša iz 2017. godine veći tri puta u odnosu na zastupljenost iste indikatorske vrste u slobodnoj mrskoj vodi, dok je u veljači 2026. godine faktor akumulacije ispod 1 jer

je koncentracija *E.coli* u morskoj vodi bila veća nego u tkivu i međuljušturnoj tekućini uzorkovanih dagnji. Faktor akumulacije u ponovljenoj analizi u ožujku 2026. iznosio je 1,58 (tablica 2).

Slika 12 prikazuje odnos broja izraslih kolonija *E. coli* u školjkašima i u slobodnoj morskoj vodi usporedno za sve uzorke koji su analizirani u ovome radu.



Slika 12. Odnos broja kolonija *E. coli* izoliranih iz morske vode i dagnji

RASPRAVA

Rezultati dugogodišnjeg praćenja fizikalno-kemijskih svojstava morske vode u omiškoj gradskoj luci pokazuju relativnu stabilnost većine parametara, uz uočenu tendenciju blagog porasta srednje godišnje temperature mora. Takav trend u skladu je s opažanjima globalnog i regionalnog porasta temperature mora, koji se povezuje s klimatskim promjenama i dugoročnim zagrijavanjem površinskog sloja mora (Garcia-Monteiro, 2022). Mogući porast vrijednosti prosječne razine mora u 2025. godini leži u činjenici da se u 2025. godini s mjerenjima krenulo tek od svibnja, odnosno izostala su mjerenja u najhladnijim zimskim mjesecima te prije konačnog zaključka treba nastaviti s redovitim mjerenjima temperature mora u budućnosti.

Koncentracije otopljenog kisika pokazivale su sezonska kolebanja, vrijednosti su obrnuto proporcionalne mjerenim vrijednostima temperature, s višim vrijednostima tijekom hladnijih mjeseci i nižima tijekom toplijeg dijela godine. Takav odnos očekivan je s obzirom na smanjenu topljivost kisika pri višim temperaturama. Manje varijacije u pojedinim godinama, osobito 2025., mogu se djelomično objasniti manjim brojem mjerenja i izostankom podataka za najhladnije mjesece, što ograničava potpunu usporedivost godišnjih srednjih vrijednosti.

Vrijednosti pH morske vode bile su relativno stabilne tijekom većeg dijela promatranog razdoblja, uz blagi pad u 2025. godini. Iako pojedinačno godišnje odstupanje ne može potvrditi dugoročan trend zakiseljavanja, promjene pH-vrijednosti u obalnim sustavima mogu biti povezane s povećanim unosom organske tvari i promjenama u biološkoj aktivnosti (Krstulović i Šolić, 2006). Budući da se 2025. godina odnosi na razdoblje nakon rekonstrukcije luke, potrebno je daljnje praćenje kako bi se utvrdilo radi li se o privremenoj oscilaciji ili o trajnijoj promjeni.

Zanimljiv je podatak da prije rekonstrukcije luke nisu zabilježene mjerljive koncentracije nitrata i nitrita, dok su u 2025. godini prosječne vrijednosti nitrata iznosile 0,44 mg/L, a nitrita 0,05 mg/L. Povećane koncentracije anorganskih oblika dušika u obalnim područjima često se povezuju s antropogenim utjecajem, uključujući urbani utjecaj, komunalne ispuste i pomorski promet. Urbanizacija obale i intenzivnije korištenje lučkog prostora mogu doprinijeti povećanom unosu hranjivih tvari u poluzatvorene sustave s ograničenom izmjenom vode (Krstulović i Šolić, 2006). Ipak, izmjerene vrijednosti u ovom istraživanju nisu bile visoke te ne upućuju na izraženu eutrofikaciju (Cloern, 2001).

Moguće je da manja odstupanja u pojedinim izmjerenim vrijednostima proizlaze i iz činjenice da tijekom dugog razdoblja praćenja nisu uvijek korišteni isti mjerni uređaji. Razlike u instrumentima i njihovoj kalibraciji mogu djelomično utjecati na usporedivost rezultata. Unatoč tome, dobiveni podaci pružaju vrijedan dugogodišnji uvid u promjene fizikalno-kemijskih svojstava mora na istraživanoj lokaciji.

Mikrobiološka analiza morske vode pokazala je niske koncentracije indikatora fekalnog onečišćenja u svim analiziranim uzorcima. Vrijednosti fekalnih enterokoka (23-24 CFU/100 mL) i *Escherichia coli* (14-25 CFU/100 mL) svrstavaju more u kategoriju izvrsne kakvoće prema Uredbi o kakvoći mora za kupanje (NN 73/2008). Usporedba rezultata iz 2017. i 2026. godine ne pokazuje pogoršanje sanitarne kakvoće mora nakon rekonstrukcije luke i povećanja broja plovila. Time se ne potvrđuje hipoteza o pogoršanju mikrobiološke kakvoće mora uslijed urbanizacije i intenzivnijeg korištenja luke. Niske koncentracije indikatorskih bakterija upućuju na odsutnost značajnog fekalnog opterećenja, što je važno s javnozdravstvenog stajališta (WHO, 1997).

Rezultati mikrobiološke analize školjkaša pokazali su da se koncentracija *E. coli* u tkivu dagnji kretala od 23 do 42 MPN/100 g, što je znatno ispod graničnih vrijednosti za područje najbolje kakvoće prema Pravilniku (NN 99/2007). Time se potvrđuje sanitarna ispravnost školjkaša na istraživanoj lokaciji. Usporedba s rezultatima iz 2017. godine ne pokazuje pogoršanje mikrobiološke kakvoće školjkaša.

Izračunati faktor akumulacije iz 2017. potvrđuje sposobnost mediteranskih dagnji da filtriranjem koncentriraju bakterije iz okolne vode. Takav nalaz u skladu je s istraživanjima koja pokazuju da školjkaši mogu višestruko akumulirati bakterije prisutne u morskoj vodi (Marino i sur., 2005; Stabili i sur., 2005). Iako je koncentracija bakterija u vodi bila niska, njihova razina u tkivu školjkaša bila je nekoliko puta veća, što pokazuje njegovu važnost i utjecaj kao filtratora. U uzorku iz veljače 2026. zabilježena je situacija u kojoj je koncentracija bakterije *E. coli* u morskoj vodi bila viša nego u tkivu dagnji. Takav nalaz može se objasniti dinamičnom prirodom filtracijskog procesa kod školjkaša te promjenjivim uvjetima u okolišu. Iako su dagnje poznate po sposobnosti akumulacije mikroorganizama iz okolne vode, njihova filtracijska aktivnost i razina zadržavanja bakterija ovise o nizu čimbenika, uključujući temperaturu mora, brzinu protoka vode, koncentraciju suspendiranih čestica i fiziološko stanje organizma. Također je moguće da je u trenutku uzorkovanja došlo do nedavnog unosa bakterija u vodeni stupac, primjerice uslijed dotoka slatke vode ili lokalnog onečišćenja, pri čemu školjkaši još nisu stigli akumulirati bakterije u tkivu. Slične pojave zabilježene su i u drugim istraživanjima, koja pokazuju da koncentracija fekalnih bakterija u školjkašima ne mora uvijek biti izravno proporcionalna njihovoj koncentraciji u vodi, već ovisi o vremenu izlaganja i fiziološkim procesima filtracije i depuracije (Burkhardt i Calci, 2000).

Primjena bio kugli s efektivnim mikroorganizmima nije pokazala jasno izražen učinak na smanjenje broja indikatorskih bakterija u kratkom razdoblju od mjesec dana. Iako koncept primjene efektivnih mikroorganizama ima potencijal u razgradnji organske tvari (Yamada i Xu, 2000; Javaid, 2006), njihova učinkovitost u otvorenim morskim sustavima s kontinuiranom izmjenom vode može biti ograničena. Potrebna su dugotrajnija i kontrolirana istraživanja kako bi se pouzdano procijenio njihov stvarni doprinos poboljšanju kakvoće mora.

Ukupno gledajući, rezultati istraživanja ne potvrđuju postavljenu hipotezu o značajnom pogoršanju kakvoće morske vode i školjkaša nakon rekonstrukcije gradske luke. Iako su uočene određene promjene u pojedinim fizikalno-kemijskim parametrima (nitrati, nitriti, pH-vrijednost), mikrobiološki

pokazatelji ostali su u granicama izvrsne kakvoće mora. Time se može zaključiti da, barem u dosadašnjem razdoblju praćenja, povećanje broja plovila i prostorne promjene u luci nisu dovele do značajnog narušavanja sanitarne kakvoće morskog okoliša.

Primjena EM bio kugli u ovom istraživanju nije rezultirala poboljšanjem sanitarne ispravnosti morske vode i školjkaša. Međutim, početne vrijednosti indikatora fekalnog onečišćenja bile su već niske, što upućuje na dobru kakvoću mora i ograničen prostor za dodatno poboljšanje. U takvim uvjetima učinak bioloških metoda može biti slabije izražen ili teško mjerljiv. Slični rezultati zabilježeni su i u drugim istraživanjima, gdje učinkovitost EM pripravaka ovisi o početnom stupnju onečišćenja i lokalnim uvjetima (Tomczyk i sur., 2024).

Za potpuniju procjenu dugoročnih trendova potrebno je nastaviti sustavno praćenje kroz dulje vremensko razdoblje te uključiti veći broj uzoraka i sezonskih ponavljanja, osobito tijekom ljetne turističke sezone kada je antropogeni pritisak najveći.

ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Dugogodišnje praćenje fizikalno-kemijskih svojstava morske vode u omiškoj gradskoj luci pokazuje relativnu stabilnost većine parametara, uz uočeni blagi porast temperature mora.
- Nakon rekonstrukcije luke zabilježene su mjerljive koncentracije nitrata i nitrita te blagi pad pH-vrijednosti, što može upućivati na povećani antropogeni utjecaj, ali izmjerene vrijednosti ne ukazuju na izraženu eutrofikaciju.
- Mikrobiološka analiza morske vode pokazala je niske koncentracije fekalnih enterokoka i bakterije *E. coli*, zbog čega more pripada kategoriji izvrsne kakvoće prema Uredbi o kakvoći mora za kupanje.
- Mikrobiološka analiza školjkaša pokazala je da su koncentracije *E. coli* znatno ispod graničnih vrijednosti propisanih za sanitarnu ispravnost školjkaša, čime se potvrđuje njihova zdravstvena sigurnost.
- Usporedba rezultata iz 2017. i 2026. godine ne pokazuje značajno pogoršanje kakvoće morske vode i školjkaša nakon rekonstrukcije gradske luke i povećanja broja plovila.
- Primjena bio kugli s efektivnim mikroorganizmima u kratkom razdoblju od mjesec dana nije pokazala jasan utjecaj na smanjenje mikrobiološkog opterećenja morske vode i školjkaša.
- Za pouzdaniju procjenu utjecaja urbanizacije obale i učinkovitosti bioloških metoda poboljšanja kakvoće mora potrebno je nastaviti dugoročno i sustavno praćenje morskog okoliša.

ZAHVALA

Ovaj istraživački projekt proveli su učenici GLOBE grupe iz Omiša, njih 50-ak, a na Državnoj smotri i natjecanju hrvatski GLOBE škola rad su predstavila tri učenika: Josip, Rina i Tonka. Projekt je istaknut i nagrađen kao jedan od najuspješnijih projekta na području hidrologije. Ovo istraživanje ne bi bilo moguće provesti da nije bilo i bivših GLOBE učenika OŠ Josip Pupačić koji već dvanaestu godinu redovito provode mjerenja i analize fizikalno-kemijskih svojstava morske vode i čiji su se podaci u ovom radu koristili. Ovim putem želimo se zahvaliti Institutu za oceanografiju i ribarstvo u Splitu, osobito dr. sc. Dariji Ezgeta Balić i dr. sc. Slavenu Joziću koji su izdvojili svoje znanje i vrijeme te nam omogućili rad na Institutu s ciljem određivanja broja bakterijskih kolonija u uzorcima mora i školjkaša.

LITERATURA

Banović T., Štrbac I. 2024. Naših 10 GLOBE godina. Tiskara Kovačić, Omiš, str. 17 -27.

Burkhardt W., Calci K. R. 2000. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. Applied and Environmental Mivrobiology 66(4): 1375-1378.

Cloern J. E. 2001. Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. Marine Ecology Progress Series, 210: 223–253.

García-Monteiro S., Sobrino J. A., Julien, Y. Sòria, G., Skokovic D. 2022. Surface temperature trends in the Mediterranean Sea from MODIS data during years 2003–2019. Regional Studies in Marine Science 49, 102086.

GLOBE Visualization System. https://vis.globe.gov/GLOBE/, pristupljeno 28.2.2026.

Javaid A. 2006. Foliar application of effective microorganisms on pea as an alternative fertilizer. Agronomy for Sustainable Development 26: 257–262.

Krstulović N., Šolić M. 2006. Mikrobiologija mora. Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split.

Marino A., Lombardo L., Fiorentino C., Orlandella B., Nostro A., Alonzo V. 2005. Uptake of *Escherichia coli* by mussels (*Mytilus galloprovincialis*, L.). International Journal of Food Microbiology 99: 281–286.

Matoničkin Kepčija R. 2003. Priručnik za voditelje programa GLOBE; Istraživanje vode, http://globe.pomsk.hr/prirucnik/voda.PDF, pristupljeno 10.1.2026.

Narodne novine br.99/2007. Pravilnik o higijeni hrane životinjskog podrijetla, Narodne novine, http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2007_10_99_2946.html, pristupljeno 28.2.2026.

Narodne novine br.99/2007. Pravilniku o službenim kontrolama hrane životinjskog podrijetla, Narodne novine, http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2007_10_99_2947.html, pristupljeno 28.2.2026.

Narodne novine br. 73/2008. Uredba o kakvoći mora za kupanje, Narodne novine, http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008_06_73_2426.html, pristupljeno 28.2.2026.

Ottaviani D., Santarelli S., Bacchiocchi S., Masini L., Ghittino C., Bacchiocchi I. 2006. Occurrence of *Aeromonas* spp. in mussels from the Adriatic Sea. Food Microbiology 23: 418–422.

Sbaraglia G., Ottaviani D, Bacchiocchi I. 1995. Correlation between metabolic pathway and phenotypic markers of virulence in *Aeromonas* spp. Microecology and Therapy 25: 188–193.

Stabili L., Aquaviva M. I., Cavallo R. A. 2005. *Mytilus galloprovincialis* filter feeding on bacterial community. Water Research 39: 469–477.

Tomczyk P., Wierzchowski P. S., Dobrzyński J. 2024. Effective microorganism water treatment method for rapid eutrophic reservoir restoration. Environmental Science and Pollution Research 31: 2377–2393.

Yamada K., Xu H. L. 2000. Properties and applications of an organic fertilizer inoculated with effective microorganisms. Journal of Crop Production, 3: 255–268.

WHO 1997. Health impact of human exposure to fresh and saline recreational waters. WHO Regional Office for Europe. https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/117f5c92-3733-48fb-9020-40e965eb8844/content, pristupljeno 16. siječnja 2026.

U potrazi za zaštićenom florom

Nela Benjak, 7. razred
Edna Kapetanović, 7. razred

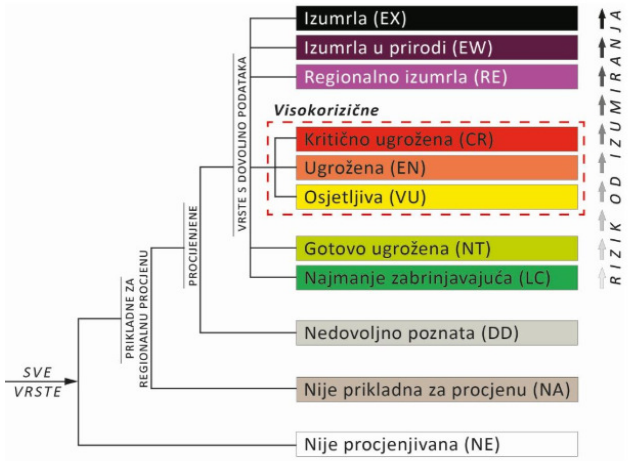
OŠ Ljudevita Gaja, Zaprešić
Mentor: *Đurđica Patafta*

SAŽETAK
Istraživanje je provedeno 2024. godine na pet različitih staništa tijekom proljeća i ljeta, od kojih se tri nalaze u kontinentalnom, a ostala dva u primorskom dijelu Hrvatske. Cilj istraživanja je bio proučiti koje zakonom zaštićene vrste žive na tim promatranim područjima. Iako su odabrana staništa vrlo različita što se tiče klimatskih zona i površine promatranja, važno je osvijestiti da je suživot ljudi i životinja moguć. Zakonom zaštićene životinje (kralježnjaci i beskralježnjaci) žive u našoj neposrednoj blizini. Sva promatrana područja, osim okoliša zgrade, dobro su prekrivena zelenim površinama i značajno doprinose biološkoj raznolikosti. Na svim promatranim staništima pronađene su zakonom zaštićene životinje. Male, dobro uređene zelene površine, vrlo su važne u očuvanju vrsta. Primjer je obiteljska okućnica koja svojim uređenjem predstavlja dom zakonom zaštićenim i strogo zakonom zaštićenim životinjama. Važno je educirati i lokalno stanovništvo o prisutnosti zakonom zaštićenih životinja te poticati uređenje okoliša na održiv način. Takvim pristupom olakšavamo život i opstanak svim vrstama.

Ključne riječi: *crveni popis divljih vrsta; biološka raznolikost; stanište*

UVOD

Biološka raznolikost podrazumijeva svu raznovrsnost života na Zemlji, a obuhvaća sve gene, životinjske i biljne vrste, ekološke sustave i krajobraze. Uključuje šume, travnjake, močvare, vode na kopnu, more, tlo, usjeve, domaće životinje, divlje vrste i mikroorganizme. Hrvatska je s obzirom biološku raznolikost jedna od najbogatijih zemalja Europe jer ima veliku raznolikost kopnenih, morskih i podzemnih staništa. "Održivo korištenje" znači gospodarsko korištenje prirode na način kojim se ona neće dugoročno osiromašiti, nego će prirodni potencijal Zemlje ostati na korištenje i budućim naraštajima (Holcer i Pavlinić, 2008). U *Crvenom popisu divljih vrsta* (Ministarstvo zaštite okoliša i zelene tranzicije, 2018; Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja, 2020) navode se stupnjevi zaštite prema posebnom Pravilniku o zaštićenim i strogo zaštićenim divljim vrstama iz 2013. godine. To uključuje i dodatne podatke o vrstama i staništima kojima je procijenjena ugroženost (kritično ugroženi (CR); ugroženi (EN); osjetljivi (VU); blizu ugroženosti (NT); najmanje zabrinjavajuća (LC); nedovoljno poznata (DD). Stupnjevi zaštite pojedine vrste vide se na slici 1.



Slika 1 Pregled kategorija ugroženosti vrsta
Izvor: https://www.haop.hr/hr/tematska-podrucja/prirodne-vrijednosti-stanje-i-ocuvanje/ugrozenost-vrsta-i-stanista/crveni-0, 2018

U *Priručniku za invertizaciju, kartiranje i praćenje stanja* (Holcer i Pavlinić, 2008) navodi se da faunu Hrvatske čine sve životinjske vrste koje trajno ili privremeno žive na njezinu području. Faunu Hrvatske čini nešto više od 23.885 vrsta, i to 101 vrsta sisavaca, 401 vrsta ptica, 20 vrsta vodozemaca i 41 vrsta gmazova, 152 vrste slatkovodnih i 437 vrsta morskih riba. Beskralježnjaci su slabo istraženi, a navode se 22.733 vrste. Pretpostavlja se da je prava brojka oko 55.000 vrsta. Priručnik je svojevrsni poticaj profesorima osnovnih i srednjih škola i njihovim učenicima, ali i drugima da se uključe u prikupljanje podataka kojima se pridonosi boljem poznavanju naše faune i pomaže u donošenju pravilnijih odluka prilikom planiranja prostornih zahvata. Prikupljanjem podataka omogućava se i lakše praćenje promjena u brojnosti i rasprostranjenosti pojedinih vrsta tijekom vremena.

Zbog nedostatka ključeva za određivanje vrsta teško je odrediti pojedine životinje. U Hrvatskoj postoji samo nekoliko ključeva za određivanje pojedinih skupina životinja, ali to je problem i u drugim zemljama. Primjerci ugrožene ili zaštićene faune smiju se prikupljati samo uz posebno dopuštenje ministarstva mjerodavnog za poslove zaštite prirode. U određivanju raznolikosti vrsta mogu pomoći različiti digitalni alati koji su danas dostupni, kao što je besplatna aplikacija Seek (Seek od iNaturalista, 2024). To je besplatna aplikacija koja omogućuje korisnicima prepoznavanje biljaka, životinja i gljiva pomoću mobitela. Aplikacija koristi umjetnu inteligenciju za analizu slika i prepoznavanje oko 30.000 različitih vrsta. Vrste se mogu istraživati opažanjima i promatranjima životinja u pokretu na različitim staništima. Pronalaskom uginulih životinja ili njihovih tragova također se može doprinijeti poznavanju rasprostranjenosti pojedinih vrsta faune. Pri promatranju i dokumentiranju mogu se koristiti različita optička pomagala kao što su dalekozor, fotoaparat. Tijekom prikupljanja podataka treba voditi brigu o ugroženim ili zaštićenim vrstama, a fotografija je dobar način dokumentiranja za naknadno prepoznavanje nalaza pojedine vrste (Holcer i Pavlinić, 2008).

Na putu do škole često uočavamo ćukove koji svake godine zimuju na brezama u dvorištima. Upravo iz toga proizašla je ideja za ovo istraživanje te spoznaja da zaštićene životinje žive svuda oko nas. Važno je očuvanje biološke raznolikosti na malim prostorima, u našim dvorištima i kućama. Takva mala staništa mogu biti dom rijetkim i zaštićenim životinjama. Cilj istraživanja je proučiti koje zakonom zaštićene vrste žive na promatranim staništima. Krajnji cilj je upoznati i osvijestiti lokalno stanovništvo o prisustvu zaštićenih životinjskih organizama, educirati ih o potrebi njihove zaštite radi očuvanja biološke raznolikosti. Iako su odabrana staništa vrlo različita što se tiče klimatskih zona i površine promatranja, cilj je bio osvijestiti važnost suživota ljudi i životinja.

Pretpostavke istraživanja su:

- zakonom zaštićene životinje (kralježnjaci i beskralježnjaci) žive u našoj neposrednoj blizini bilo da se radi o mjestu stanovanja ili mjestu ljetovanja u Hrvatskoj;
- zelene površine na malim staništima povećavaju biološku raznolikost jer su dom različitim životinjama;
- veći broj zaštićenih vrsta može se povećati uređivanjem okoliša, primjerice sadnjom biljaka, bez obzira na klimatsko područje na kojoj se promatraju životinje (kontinentalno ili primorsko područje).

METODE RADA

Istraživanje je provedeno 2024. godine na 5 različitih staništa tijekom proljeća i ljeta. Tri se nalaze u kontinentalnom dijelu na području Zaprešića, a ostala dva su u primorskom dijelu na Dugom otoku i otoku Hvaru.

Opisi promatranih staništa i razdoblje istraživanja

STANIŠTE 1. Školsko dvorište

Površina mjesta istraživanja je oko 25 000 m^2 (slika 2). Dvorište ima travnati dio i dio zasađen drvećem. Na travnatom dijelu rastu livadna vlasnjača, ljulj, divlja zob, bijela i crvena djetelina, tratinčice, maslačak, livadna kadulja, puzava petoprsta. U dvorištu su zasađeni hrastovi lužnjaka, breze, crni borovi, smreke, bijeli dud, topole, grmovi tise, divlja šljiva. Tijekom proljeća temperature su od oko 11°C do 20°C, a tijekom ljeta su od 25°C do iznad 30°C. Istraživanje prisustva vrsta praćeno je tijekom proljeća (travanj i svibanj) te ljeta (lipanj, srpanj i kolovoz) u slobodno vrijeme.

Slika 2 Stanište 1. – školsko dvorište

STANIŠTE 2. Obiteljska kuća s okućnicom u Zaprešiću

Površina mjesta istraživanja je oko 1 000 m^2 (slika 3). U dvorištu ima različitih drvenastih biljaka kao što jorgovan, tamaris, dud, dvije trešnje, magnolija, čempresi, smokva, glicinija, ribizl, malina, borovnica. U teglama su posađeni lovor, kadulja te limun i mandarina. Također ima začinskog bilja kao što su ružmarin, menta, smilje, origano, bosiljak. U povišenim gredicama nalaze se mrkva, krumpir, poriluk, luk, rajčica, zelena salata, jagode i blitva. Na travnjaku oko kuće rastu tratinčice, maslačci, posađene su hortenzije, ljiljani. Temperature se kreću kao i na Lokaciji 1. Istraživanje prisustva vrsta praćeno je tijekom proljeća (travanj i svibanj) te ljeta (lipanj, srpanj i kolovoz) u slobodno vrijeme.

Slika 3 Stanište 2. – obiteljska kuća s dvorištem

STANIŠTE 3. Okoliš zgrade u Zaprešiću

Površina mjesta istraživanja je oko 60 m^2 (slika 4). Uz zgradu zasađeno je drveće cretna breza, crni bor, javor, lovorvišnja, japanska kurika i juka. Temperature se kreću kao i na Lokaciji 1 i 2. Istraživanje prisustva vrsta praćeno je tijekom proljeća (travanj i svibanj) te ljeta (lipanj, srpanj i kolovoz) u slobodno vrijeme. Na slici 4 vidi se Stanište 3 koje je najviše urbanizirano u odnosu na ostala koja su promatrana u radu.

Slika 4 Stanište 3. – okoliš zgrade u Zaprešiću

STANIŠTE 4. Parcela u kampu na sjeverozapadnom dijelu Dugog otoka

Površina mjesta istraživanja je oko 85 m^2 (slika 5). Na tlu je posipani šljunak, a po rubovima parcele nalaze se razne biljke: lovor višnja, bijeli dud, pinija, smilje, lavanda, potočnica, oleandar, pitospor te još neke. Tijekom proljeća temperature se protežu od oko 15°C do oko 20°C, a tijekom ljeta su i više od 27°C. Istraživanje prisustva vrsta praćeno je tijekom ljeta (srpanj) u slobodno vrijeme.

Slika 5 Stanište 4. – parcela u kampu na sjeverozapadnom dijelu Dugog otoka

STANIŠTE 5. Parcela na otoku Hvaru (Jelsa), šuma i vrt unutar kompleksa

Površina mjesta istraživanja je oko 2.500 m^2 (slika 6). Neke od vrsta biljaka na mjestu istraživanja su smilje, lovor, kadulja, ružmarin, lavanda, kao i više vrsta borova, poput dalmatinskog, alepskog i crnog bora. S obzirom na geografski položaj mjesto je značajno po blagim zimama i sušnim ljetima, u proljeće je uglavnom temperatura između 15 °C i 25 °C, ljeti je često iznad 30 °C. Istraživanje prisustva vrsta praćeno je tijekom ljeta (kolovoz) u slobodno vrijeme.

Slika 6 Stanište 5. – parcela na otoku Hvaru

Fotografiranje i prikupljanje podataka o pojedinoj vrsti

Pronađene vrste fotografirane su na opisanim lokacijama pomoću mobitela. Ovisno o vrsti životinja i njihovim prilagodbama prilagođavalo se i bilježenje njihovog prisustva. Za one koje se skrivaju u zemlji, na drvetu ili u tegli za cvijeće trebalo je više upornosti i strpljenja. Da bi se životinje što manje uznemiravalo, većina je promatrana s dovoljne udaljenosti. Fotografirane su cijele životinje sa što više pojedinosti kako bi određivanje pojedine vrste bilo točnije.

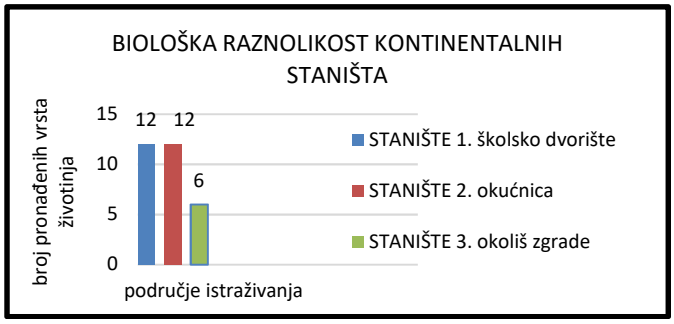
Za određivanje vrsta upotrebljavana je aplikacija Seek (Seek od iNaturalista, 2024). Prilikom uporabe aplikacija je prvo instalirana pomoću Google Play Storea. Nakon što je omogućen pristup za korištenje aplikacije, kamera mobitela usmjeravana je prema životinji koju se želi identificirati. Aplikacija analizira sliku i pokušava prepoznati vrstu na temelju svoje baze podataka. Nakon što prepozna vrstu, prikazuje se ime vrste i dodatne informacije o njoj (Seek od iNaturalista, 2024).

Vrste su određivane i pomoću literature kao što je *Fauna Evrope* (Garms i Borm, 1981) te pomoću aplikacije Plant.Net (Plant.Net, 2024). Fotografije vrsta pohranjivane su u mape na računalu za svaku navedenu lokaciju. Nakon određivanja vrsta za svaku je provjeravan stupanj zaštite uz pomoć podataka s interneta navedenih u *Crvenoj knjizi* u Hrvatskoj (Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja, 2020). Životinje nakon determinacije su razvrstavane i upisivane u tablice u kojima se navode podaci o vrsti (hrvatsko i latinsko ime) te kategorija ugroženosti (nije zakonom zaštićena, zakonom je zaštićena, kritično ugroženi (CR); ugroženi (EN); osjetljivi (VU); blizu ugroženosti (NT); najmanje zabrinjavajuća (LC); nedovoljno poznata (DD). Iz dobivenih podataka izvode se zaključci o stupnju zaštite. Bioraznolikost je određivana grafičkim prikazom tako da je broj pronađenih vrsta uspoređivan sa svakom pojedinom lokacijom. Za svaku lokaciju određivan je i postotak zaštićenih vrsta u odnosu na pronađene vrste.

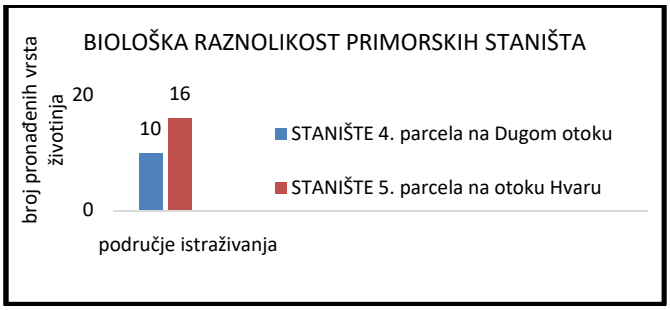
REZULTATI

Na promatranim područjima pronađeno je ukupno 56 vrsta. Vrste su navedene u prilozima 1 - 5. U prve tri tablice nalaze se vrste pronađene u kontinentalnim staništima, a u četvrtoj i petoj su vrste s primorskih područja.

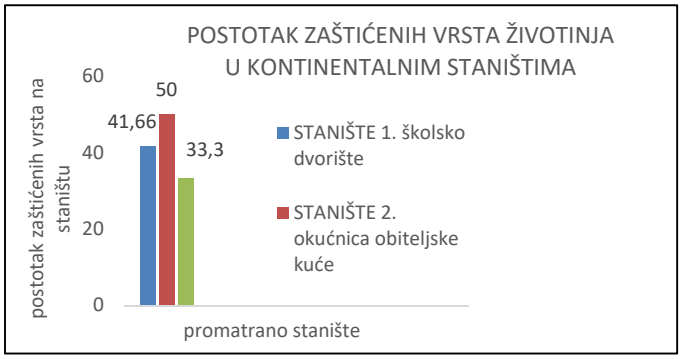
U nastavku su i slike koje prikazuju rezultate analize raznolikosti kontinentalnih i primorskih staništa (slike 7 i 8) te postotak zaštićenih vrsta u kontinentalnim i primorskim staništima (slike 9 i 10).



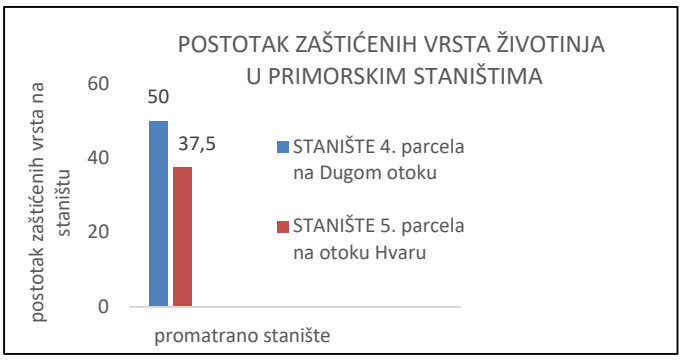
Slika 7 Biološka raznolikost kontinentalnih staništa



Slika 8 Biološka raznolikost primorskih staništa



Slika 9 Postotak zaštićenih vrsta u kontinentalnim staništima



Slika 10 Postotak zaštićenih vrsta na primorskim staništima

RASPRAVA

Rezultati istraživanja prikazani u tablicama 1 – 5 pokazuju da na svim mjestima istraživanja postoje zakonom zaštićene vrste, bilo da se radi o beskralježnjacima ili kralježnjacima. Broj vrsta na njima je sigurno i veći od prikazanih rezultata, ali s obzirom da nisu uspješno fotografirane, nisu se uzimale kao dio rezultata istraživanja. Promatrana staništa ne nalaze se u istim klimatskim područjima. Prva tri su u kontinentalnom dijelu, a preostala dva u primorskom djelu. Od odabranih pet staništa najmanje vrsta ima okoliš zgrade na kojem je prisutno uglavnom drveće, najviše je urbanizirano, vide se asfaltirane staze i ceste. Vjerojatno zvukovi automobila i ispušni plinovi dodatno utječu na brojnost vrsta. Kontinentalna staništa, područje škole i obiteljska okućnica, zasađena su raznolikim biljkama. Na tim područjima žive duže vrijeme ili privremeno različite vrste beskralježnjaka i kralježnjaka. Takva su mjesta dobar primjer kako životinjama omogućiti njihov opstanak, osobito onima koje se nalaze u *Crvenom popisu divljih vrsta* (Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja, 2020), a koje su procijenjene kao strogo zakonom zaštićene. Na tim su staništima pronađene crna vrana i crni daždevnjak. Iako spadaju u najmanje zabrinjavajuću kategoriju "LC" (Least Concern) na *Crvenom popisu* u smislu rizika od izumiranja i trenutno nema značajnih prijetnji koje bi mogle ozbiljno ugroziti populaciju te vrste na globalnoj razini, ipak bi se trebalo educirati lokalno stanovništvo da ne

uznemiravaju te životinje i da im se uređuju postojeća staništa. Zanimljivi su rezultati na primorskim staništima na kojima je postotak zaštićenih vrsta različit. Veća biološka raznolikost je u Jelsi, gdje je pronađeno šest vrsta više u odnosu na Dugi otok. No, na Dugom otoku je veći postotak zaštićenih životinja i iznosi 50 % od ukupnog broja. Na tim područjima također su pronađene strogo zakonom zaštićene životinje, i to zelena krastača na Dugom otoku i kornjača čančara na otoku Hvaru. Kao što je u uvodu navedeno „održivo korištenje", koje označava gospodarsko korištenje prirode na način da ju se dugoročno ne osiromašuje (Holcer i Pavlinić, 2008), na istraživanim staništima stanje je zadovoljavajuće. Parkovi, vrtovi, zeleni krovovi mogli bi imati ključnu ulogu u povećanju biološke raznolikosti i pružiti staništa različitim vrstama životinja, a osobito onima koje ne bi mogle preživjeti u urbanim betoniziranim sredinama. Zelene površine na istraživanim lokacijama djeluju kao koridori koji povezuju ostale lokacije, omogućujući kretanje vrsta. To pomaže u održavanju genetske raznolikosti i zdravlja populacija. Zelene površine omogućuju ljudima da se povežu s prirodom, što može povećati svijest o važnosti očuvanja biološke raznolikosti i potaknuti ekološki odgovorno ponašanje. Osobito su zanimljivi podaci iz kojih se vidi da na svih pet staništa postotak zaštićenih životinja je iznad 30 %, što predstavlja značajan podatak.

ZAKLJUČCI

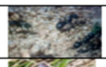
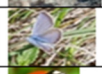
S obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti da su pretpostavke istraživanja potvrđene. Zakonom zaštićene životinje (kralježnjaci i beskralježnjaci) žive u našoj neposrednoj blizini. Sva promatrana staništa, osim okoliša zgrade, dobro su prekrivena zelenim površinama i značajno doprinose biološkoj raznolikosti nekog područja. Također se može zaključiti da su područja dobro uređenih malih zelenih površina vrlo važna. Primjer je obiteljska okućnica koja svojim uređenjem predstavlja dom zakonom zaštićenim i strogo zaknom zaštićenim životinjama. Vrlo je važno educirati lokalno stanovništvo o prisutnosti zakonom zaštićenih životinja te poticati uređenje okoliša na održiv način. Takvim pristupom olakšavamo život i opstanak svim vrstama. Iako su odabrana staništa vrlo različita što se tiče klimatskih zona i površine promatranja, važno je osvijestiti da je suživot ljudi i životinja moguć.

LITERATURA

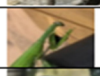
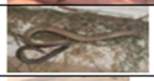
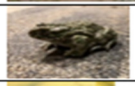
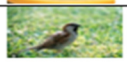
Garms H., Borm L. 1981. Fauna Evrope, priručnik za određivanje. Mladinska knjiga, Ljubljana.
Holcer D., Pavlinić I. 2008. Fauna, Priručnik za inventarizaciju i praćenje stanja. Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.
Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja. 2020. Crveni popis Hrvatske, https://crvenipopis.haop.hr/, pristupljeno 29.12.2024.
Ministarstvo zaštite okoliša i zelene tranzicije 2018. Pregled kategorija ugroženosti vrsta ili staništa, https://www.haop.hr/hr/tematska-podrucja/prirodne-vrijednosti-stanje-i-ocuvanje/ugrozenost-vrsta-i-stanista/crveni-0, pristupljeno 10.10.2024.
Plant.Net 2024. Prepoznavanje biljaka. Google play, https://play.google.com/store/apps/details?id=org.plantnet&hl=hr&pli=1, pristupljeno 10.10.2024.
Seek od iNaturalista 2024. Prepoznavanje biljaka i životinja. Google play, https://play.google.com/store/apps/details?id=org.inaturalist.seek&hl=hr, pristupljeno 29.12.2024.

PRILOZI

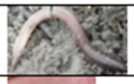
Prilog 1 Fotografirane životinje na Staništu 1. u školskom dvorištu (kontinentalno područje)

Hrvatsko ime	Latinsko ime	Kategorija ugroženosti (Hrvatska)	Fotografija životinje
BESKRALJEŠNJACI			
Pčela	*Apis melifera* L.	Zakonom je zaštićena	
Mrav	*Formica sp.*	Zakonom zaštićen	
Obični plavac	*Polyommatus icarus* L.	Nije zakonom zaštićen	
Bubamara	*Coccinella septempunctataL* L.	Nije zakonom zaštićen	
Gujavica	*Lumbricus terrestris* L.	Nije zakonom zaštićen	
Zemni bumbar	*Bombus terrestris* L.	Nije zakonom zaštićen	
Golemi kožar	*Procrustes coriaceus* L.	Nije zakonom zaštićen	
Stršljen	*Vespa crabro* L.	Nije zakonom zaštićen	
KRALJEŠNJACI			
Crni kos	*Turdus merula* L.	Nije zakonom zaštićen	
Ćuk	*Athene noctua* L.	Zakonom zaštićena	
Grlica	*Streptopelia turtur* L.	Zakonom zaštićena	
Crna vrana	*Corvus corone* L.	Strogo zakonom zaštićen (LC – najmanji stupanj zaštićenosti)	

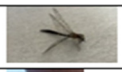
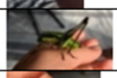
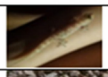
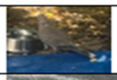
Prilog 2 Fotografirane životinje na Staništu 2. na području okućnice obiteljske kuće u Zaprešiću (kontinentalno područje)

Hrvatsko ime	Latinsko ime	Kategorija ugroženosti (Hrvatska)	Fotografija životinje
BESKRALJEŠNJACI			
Smrdljivi martin	*Rhaphigaster nebulosa* Poda	Nije zakonom zaštićen	
Pauk krstaš	*Araneus diadematus* Clerck	Nije zakonom zaštićen	
Bogomoljka	*Manstis religiosa* L.	Nije zakonom zaštićena	
Rogaš truležar	*Dorcus parallelopipedus* L.	Nije zakonom zaštićen	
Pčela	*Apis melifera* L.	Zakonom je zaštićena	
Osoliki pauk	*Agriope bruennichi* Scopoli	Nije zakonom zaštićen	
KRALJEŠNJACI			
Crni daždevnjak	*Salamandra atra* Laurenti	Strogo zakonom zaštićen (LC – najmanji stupanj zaštićenosti)	
Sljepić	*Anguis fragilis* L.	Zakonom zaštićen	
Žaba krastača	*Bufo bufo* L.	Zakonom zaštićena	
Šumska smeđa žaba	*Rana dalmatina* Fitzinger	Zakonom zaštićena	
Vrabac	*Passer domesticus* L.	Nije zakonom zaštićen	
Plavetna sjenica	*Cyanistes caeruleus* L.	Zakonom zaštićena	

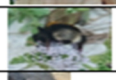
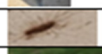
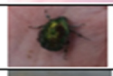
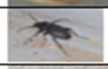
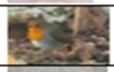
Prilog 3 Fotografirane životinje na Staništu 3. na području okoliša zgrade u Zaprešiću (kontinentalno područje)

Hrvatsko ime	Latinsko ime	Kategorija ugroženosti (Hrvatska)	Fotografija životinje
BESKRALJEŠNJACI			
Gujavica	*Lumbricus terrestris* L.	Nije zakonom zaštićen	
Tigrasti komarac	*Aedes albopictus* Skuse	Nije zakonom zaštićen	
Mrav	*Formica sp.*	Nije zakonom zaštićen	
KRALJEŠNJACI			
Gradski golub	*Columba livia domestica* L.	Nije zakonom zaštićen	
Grlica	*Streptopelia turtur* L.	Zakonom zaštićena	
Crna vrana	*Corvus corone* L.	Strogo zakonom zaštićen (LC – najmanji stupanj zaštićenosti)	

Prilog 4 Fotografirane životinje na Staništu 4., parcela u kampu na Dugom otoku (primorsko područje)

Hrvatsko ime	Latinsko ime	Kategorija ugroženosti (Hrvatska)	Fotografija životinje
BESKRALJEŠNJACI			
Vretence zimska djeva	*Sympecma fusca* Linden	Zakonom zaštićen	
Zimski moljac	*Operophthera brumata* L.	Nije zakonom zaštićen	
Skakavac	*Caelifera sp.*	Nije zakonom zaštićen	
Egipatski skakavac	*Anacridium aegyptium* L.	Nije zakonom zaštićen	
Europski paličnjak	*Baccilus rossii* Rossi	Nije zakonom zaštićen	
KRALJEŠNJACI			
Macaklin	*Hemidactylus turcicus* L.	Zakonom zaštićen	
Zelena krastača	*Bufo viridis* L.	Strogo zakonom zaštićen (LC – najmanji stupanj zaštićenosti)	
Galeb	*Larus michahellis* Naumann	Zakonom zaštićen	
Grlica	*Streptopelia turtur* L.	Zakonom zaštićena	
Šojka	*Garrulus glandarius* L.	Nije zakonom zaštićena	

Prilog 5 Fotografirane životinje na Staništu 5., parcela na otoku Hvaru (Jelsa), šuma i vrt unutar kompleksa

Hrvatsko ime	Latinsko ime	Kategorija ugroženosti (Hrvatska)	Fotografija životinje
BESKRALJEŠNJACI			
Slakov ljiljak	*Agrius convolvuli* L.	Nije zakonom zaštićen	
/	*Clogmia albipunctata* Williston	Nije zakonom zaštićen	
Egipatski skakavac	*Anacridium aegyptium* L.	Nije zakonom zaštićen	
Zemni bumbar	*Bombus terrestris* L.	Nije zakonom zaštićen	
Prugasto jedarce	*Iphiclides podalirius* L.	Zakonom zaštićeno	
Kućna stonoga	*Scutigera coleoptrata* L.	Nije zakonom zaštićena	
Zeleni konjic	*Tettigonia viridissima* L.	Nije zakonom zaštićen	
Zlatna mara	*Cetonia aurata* L.	Nije zakonom zaštićena	
Puž vinigradnjak	*Helix pomatia* L.	Zakonom zaštićen	
Golemi kožar	*Procrustes coriaceus* L.	Nije zakonom zaštićen	
Stršljenova muha	*Volucella zonaria* Neuhaus	Nije zakonom zaštićena	
Crni vrtni mrav	*Lasius niger* L.	Nije zakonom zaštićen	
KRALJEŠNJACI			
Čančara	*Testudo hermanni* Gmelin	Zakonom zaštićena NT (blizu ugroženosti prema Crvenom popisu)	
Crvendać	*Erithacus rubecula* L.	Zakonom zaštićen	
Macaklin	*Hemidactylus turcicus* L.	Zakonom zaštićen	
Primorska gušterica	*Podarcis siculus* Rafinesque	Zakonom zaštićena	

Zelena baština bana Josipa Jelačića

Julia Berger, 7. razred
Leona Ralić, 7. razred

Ljudevita Gaja, Zaprešić
Mentor: *Đurđica Patafta*

SAŽETAK
Istraživanje je provedeno na kompleksu zaprešićkih Novih Dvora tijekom travnja i svibnja te rujna i listopada 2024. godine. Cilj rada je bio istražiti postojanje biljnih vrsta koje se navode u pisanim tragovima iz monografije (Laljak, 1991) i Studije zaštite i obnove perivoja Novi Dvori zaprešićki (Obad Šćitaroci i sur., 1991). Starost biljaka određivana je pomoću kalkulatora za određivanje starosti drveća, preko godova porušenih hrastova te mjerenjem opsega drveća na kompleksu. Od 29 banovih biljnih vrsta navedenih u Studiji zaštite i obnove perivoja Novi Dvori zaprešićki pronađeno je njih 16. Od biljaka koje mogu doživjeti starost od oko 170 godina ostao je samo hrast lužnjak. Pronađeno je 14 starih hrastova koje bi trebalo zaštititi kao svjedoke nekih prošlih vremena.

Ključne riječi: *usporedba popisa starih i današnjih vrsta; god; opseg drveća; kalkulator za određivanje starosti drveća*

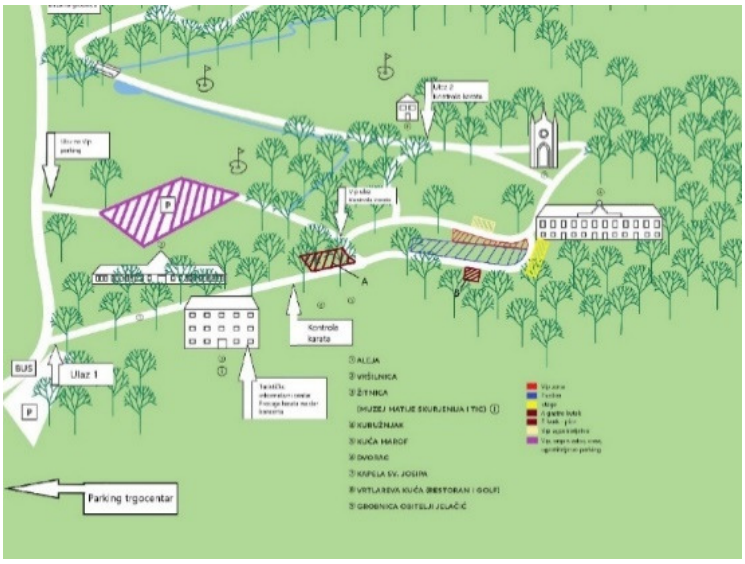
UVOD

U gradskoj arhivi Zaprešića pronađena je monografija o Novim Dvorima koja, pretežno na izvornoj, dokumentiranoj i neobjavljenoj građi, opisuje zanimljivu prošlost imanja bana Josipa Jelačića. Ban je za imanje potpisao kupoprodajni ugovor 23. lipnja 1851. na 175 tisuća forinti (Laljak, 1991). Imanje je kupio od grofa Erdödya. U to vrijeme ban se već oženio s mladom i bogatom groficom Sofijom Stockau, a buduću obitelj odlučio je uzdržavati uglavnom u Novim Dvorima. Prema pisanim tragovima u monografiji se opisuje kako je ban osobno sadio biljke jer nije htio biti zemljoposjednik samo na papiru. Poznavao je koje su koristi odvodnjavanja tla, sam je proučavao vrste biljaka i uvjete njihovog uzgoja, svojim ih je rukama sadio, uređivao i njegovao. Bio je miljenik cvijeća i drveća (Laljak, 1991).

Nakon banove smrti, 1934. godine, dvorac je pripao u vlasništvo hrvatskog naroda (Laljak, 1991). U vrijeme kad je Hrvatska bila dio Jugoslavije, Novi Dvori su dugi niz godina bili zapušteni u cijelosti. Sve građevine kao i nasadi bili su zapušteni, zarasli u šikare. Tek od stvaranja Hrvatske kao samostalne države povela se briga oko obnove cijelog kompleksa. Sada je u tijeku njihova detaljna obnova. (Grad Zaprešić, 2024).

Novi Dvori (slika 1) su jedinstveni primjer očuvanog gospodarskog vlastelinskog kompleksa iz 16. stoljeća na površini od 20,5 ha. To je spomenik kulturno-povijesne baštine. Uključuje perivoj s jedinstvenom „vršilnicom“, „kuružnjakom“, gospodarskom zgradom, Muzejom Matije Skurjenija. Ovdje se nalazi i dvorac, kapelica sv. Josipa, obiteljska grobnica (neogotički mauzolej obitelji Jelačić) i vrtlarska kuća (Turistička zajednica Zaprešić, 2024).

Perivoj dvorca u doba bana Jelačića predstavljao je sklad biljne i arhitektonske cjeline. Prema pisanim tragovima (Laljak, 1991) prilazna aleja s oko 200 metara duljine bila je zasađena divljim kestenima koji su imali zadatak uvesti posjetitelje do ulaznog portala dvorca. Trenutni drvored zasađen je s mladim sadnicama divljeg kestena.



Slika 1 Kompleks Novi Dvori
Izvor: Informativni centar Zaprešić d.o.o., 2022

U monografiji Laljak (1991) opisuje da su prema pisanim tragovima u perivoju bili zasađeni: „žalobni jasen, crvenolisna bukva, trnovac, maklura, katalpa, gimnoklad, smreka obična i žalosna, bor i jela od četinjača. Naravno, od ranije su oko dvorca bili zasađeni hrast lužnjak, a platane (zapadno od dvorca) su iz kasnijeg vremena (najvjerojatnije oko 1870. godine, vršnjakinje su platana na Zrinjevcu.)“ Laljak (1991) također navodi da su zasađeni američki i gorski javor, klen, negundovac, pajasen, breza, grab, divlji kesten, crni orah, bijela i žalosna vrba, malolisna i velelisna vrba, američki borovac. Stručni vrtlari obrađivali su vrt oko vrtlareve kuće, gdje je bio i voćnjak. Na slikama 2 i 3 može se vidjeti djelić nekadašnjeg izgleda dvorca u vrijeme bana J. Jelačića.

Slika 2 Novi Dvori 1895. godina
Autor akvarela: Elza Ramberg
Izvor: Laljak, 1991

Slika 3 Novi Dvori 1897. godina
Autor ulja na platnu: Hemen
Izvor: Laljak, 1991

Obad Šćitaorci i sur. (1991) navode da je Dolenec 1985. godine proveo projekt *Sanacije i revitalizacije starog drveća u parku* prema kojem je obrađeno 110 stabala. Opisuje se drveće unutar perivoja i gospodarskog prostora s većim oštećenjima, koja su dokaz dugogodišnjeg nemara i neodržavanja perivoja. Navode se vrste: divlji kesten, američki javor, klen, negundovac, gorski javor, pajasen, breza, grab, katalpa, američki jasen, žalosni jasen, poljski jasen, crvenolisna bukva, trnovac, gimnoklad, crni orah, maklura, javorolisna platana, crvenolisna trešnja, bijela i žalosna vrba, malolisna i velelisna lipa, brijest, hrast lužnjak, crveni američki hrast, smreka obična, bijeli bor i borovac. U studiji zaštite i obnove perivoja *Novi Dvori zaprešićki* (Obad Šćitaroci i sur., 1991) navodi se kako se nažalost nije mogao pronaći povijesni nacrt s popisom drveća i grmlja iz banovog razdoblja. Stručnjaci su determinaciju biljnih vrsta radili prema prikupljenim starim fotografijama i razglednicama s motivima dvorca,

kapelice, staklenika i perivoja. S velikom točnošću može se na temelju prikupljene i obrađene arhivske građe te obilaskom perivoja zaključiti da su prilikom nastanka perivoja sađene vrste drveća koje je naveo i Dolenec 1985. Mnoge vrste ukrasnog drveća i grmlja nestajale su. Neke su se vrste samostalno podmlađivale kao što su hrast lužnjak i grab.

Prema dostupnim podacima proučavane su i biljke s popisa koje mogu doživjeti veću starost i koje je mogao zasaditi ban Josip Jelačić:

- hrast lužnjak je drvo visine do oko 40 m. Može doseći starost od 500 do 800 godina (Wikipedia, 2024a)
- gorski javor živi do 500 godina (Plantea, 2024a)
- lipa može doživjeti nekoliko stotina godina 100-300 godina (Wikipedia, 2024b)
- bukva može doživjeti i više od 300 godina (Plantea, 2024b)
- borovac može doživjeti starost preko 250 godina (Yuflor, 2024).

Ostale biljke koje se navode u Studiji zaštite i obnove perivoja ne mogu doživjeti starost iz vremena kad je ban sadio biljke, a to je bilo oko 1851. godine.

Pl@ntNet je aplikacija za prepoznavanje biljaka snimljenih mobilnim uređajem (Pl@ntNet, 2024). Koristi veliku bazu podataka slika za identifikaciju biljnih vrsta. Aplikacija je besplatna, a pomoću nje znanstvenici diljem svijeta analiziraju prikupljene podatke kako bi bolje razumjeli i zaštitili biljnu bioraznolikost.

Cilj rada je istražiti postojanje biljnih vrsta koje se navode u pisanim tragovima iz monografije (Laljak, 1991) i Studije zaštite i obnove perivoja Novi Dvori zaprešićki (Obad Šćitaroci i sur., 1991). Također je cilj odrediti postojanje banovih biljaka. Naime, šetajući perivojem dvorca, nakon oluje koja je poharala grad prošle godine, dio starog drveća je porušeno i na njima se mogu uočiti godovi koji upućuju na njihovu starost. God predstavlja godišnji prirast drva u debljinu kod višegodišnjih drvenastih biljaka. Vide se kao koncentrični krugovi (Hrvatska enciklopedija, 2024). Kako je ban kupio kompleks 1851. godine, možda u perivoju raste i drveće koje bi moglo imati oko 173 godina i koje je mogao i on sam posaditi. Dobiveni rezultati predstavit će se i na lokalnoj razini te tako upoznati širu javnost na postojanje banovih biljaka. Naime, prema istraženim podacima do sada nije procjenjivana starost drveća na kompleksu Novih Dvora pa bi se pronađeno drveće moglo dodatno zaštititi.

Na temelju Studije zaštite i obnove perivoja Novi Dvori zaprešićki (Obad Šćitaroci i sur., 1991) u kojoj se navodi popis biljaka s posjeda Novih Dvora, postavljene su sljedeće pretpostavke:

- veći dio biljaka koje se navode u Studiji zaštite i obnove perivoja Novi Dvori zaprešićki (Obad Šćitaroci i sur., 1991) neće biti determinirane jer se područje kompleksa Novih Dvora, kao što piše u studiji, loše održavalo. Mnoge su biljke propale zbog bolesti, starosti i vremenskih neprilika;
- dio starijeg drveća, s obzirom na procijenjenu starost, moglo bi potjecati iz vremena kada je ban Josip Jelačić uređivao svoje imanje, a to bi mogli biti hrast lužnjak, gorski javor, lipa, bukva ili borovac.

METODE RADA

Područje istraživanja nalazi se na opisanom kompleksu Novih Dvora.

Istraživanje je provedeno u tri posjeta tijekom travnja i svibnja te rujna i listopada 2024. godine. Vrste biljaka su postepeno istraživane na području aleje kestena, oko dvorca Novih Dvora, kapelice sv. Josipa,

uz vrtlarevu kuću te obiteljsku grobnicu. Vrste biljaka određivane su pomoću aplikacije Pl@ntNet (Pl@ntNet, 2024) i ključevima za determinaciju (Forenbacher, 2001; Domac, 2002). Podaci su spremani u mapu s biljkama. Za potrebe istraživanja upisivane su u tablicu (primjer: tablica 1).

Tablica 1 Biljke determinirane istraživanjem koje su rasle i u doba bana Jelačića

Redni broj	Vrsta drveća upisanih u Studiji zaštite i obnove perivoja Novi Dvori zaprešićki (Obad Šćitaroci i sur., 1991).	Potvrđena vrsta 2024. znak +, nepotvrđena vrsta znak -
1.	divlji kesten (*Aesculus hippocastanum* L.)	
2.	američki javor (*Acer dasycarpum* L.)	
3.	klen (*Acer campestre* L.)	
4.	negundovac (*Acer negundo* L.)	
5.	gorski javor (*Acer pseudoplatanus* L.)	
6.	pajasen (*Ailanthus glandulosa* Desf.)	
7.	breza (*Betula verrucosa* L.)	
8.	grab (*Carpinus betulus* L.)	
9.	katalpa (*Catalpa bignonioides* Walter)	
10.	američki jasen (*Fraxinus americana* L.)	
11.	žalosni jasen (*Fraxinus excelsior var. Pendula*)	
12.	poljski jasen (*Fraxinus angustifolia* Vahl)	
13.	obična bukva (*Fagus silvatica* L.)	
14.	trnovac (*Gleditsia triacanthos* L.)	
15.	gimnoklad (*Gymnocladus dioicus* L.)	
16.	crni orah (*Juglans nigra* L.)	
17.	maklura (*Maclura pomifera (Raf.) C. K. Schneid.*)	
18.	javorolisna platana (*Platanus acerifolia* Willdenow)	
19.	crvenolisna trešnja (*Prunus pissardi* Vilmorin)	
20.	bijela vrba (*Salix alba* L.)	
21.	žalosna vrba (*Salix babilonica* L.)	
22.	malolisna lipa (*Tillia parvifolia* L.)	
23.	velelisna lipa (*Tillia grandifolia* Scopoli)	
24.	brijest (*Ulmus carpinifolia* Gled.)	
25.	hrast lužnjak (*Quercus robur* L.)	
26.	crveni američki hrast (*Quercus rubra* L.)	
27.	smreka obična (*Picea abies* (L.) Karsten)	
28.	bijeli bor (*Pinus silvestris* L.)	
29.	borovac (*Pinus strobus* L.)	

Pomoću kalkulatora za određivanje starosti drveća *Calculatorian.com* procjenjivana je starost na temelju opsega debla na visini od približno 1,3 metra iznad tla. Nakon što se na stranici *Calculatorian.com* (Calculatorian.com, 2021) odabere vrsta drveća kojem se želi procijeniti starost, unese se izmjereni opseg na visini od 1,3 metra iznad tla. Kalkulator prikazuje procjenu starosti na osnovu unesenih podataka. Visina i opseg mjeri se običnim metrom. Ova procjena je samo približna vrijednost.

Na slikama 4 i 5 prikazano je mjerenje opsega drveta i visine 1,3 m iznad tla pomoću metra.

Slika 4 Određivanje visine debla od 1,3 m iznad zemlje

Slika 5 Određivanje opsega debla

Podaci o starosti dobivene kalkulatorom provjeravane su preko godova hrasta lužnjaka (slika 6). Također je izmjeren i opseg panjeva.

Slika 6 Godovi na panju hrasta lužnjaka

Položaj svake biljke, za koju je procijenjeno da potječe iz razdoblja bana J. Jelačić, označen je na Google karti (slika 7).

Slika 7 Google karta kompleksa Novih Dvora

Izvor: Google karte, 2005

Na primjeru tablice 2 upisivan je broj i položaj biljaka koje bi mogle potjecati iz razdoblja bana Jelačića. Upisivane su na određena mjesta gdje su pronađene.

Tablica 2 Biljke starosti oko 170 godina i starije od 170 godina

Vrsta biljke	Broj jedinki pojedine vrste koje potječu iz vremena bana Jelačića	Položaj biljke (aleja kestena, staza prema vrtlarevoj kući, kod kapelice, kod vrtlareve kuće, kod grobnice, kod parkirališta)

REZULTATI

Na području kompleksa mogu se vidjeti biljke u dobrom stanju, ali i oštećeno i bolesno drveće. Također se vide i tragovi nevremena. Aleja kestena je pomlađena mladim divljim kestenovima. Uglavnom se vodi briga o biljkama. Uklanja se staro i bolesno drveće.

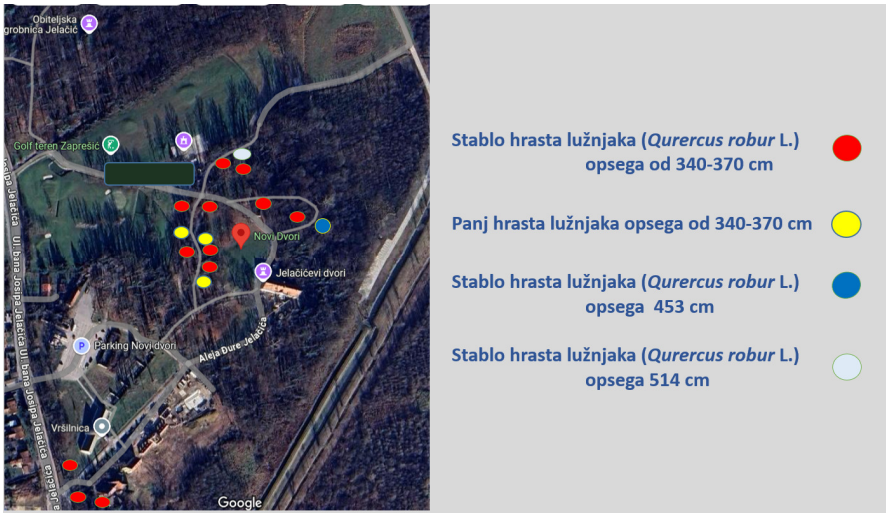
Biljke zasađene u aleji, oko dvorca, kapelice, vrtlareve kuće i grobnice uglavnom je mlađe drveće. Aleja kestena je pomlađena 2024. godine u potpunosti.

U tablici 3 znakom + upisane su biljke koje su rasle u vrijeme kad je ban upravljao kompleksom Novih Dvora. Sve su navedene i u Studiji zaštite i obnove perivoja Novi Dvori zaprešićki (Obad Šćitaroci i sur., 1991).

Tablica 3 Biljke determinirane istraživanjem koje su rasle i u doba bana Jelačića

Redni broj	Vrsta drveća upisanih u Studiji zaštite i obnove perivoja Novi Dvori zaprešićki (Obad Šćitaroci i sur., 1991).	Potvrđena vrsta 2024. znak +, nepotvrđena vrsta znak -
1.	divlji kesten (*Aesculus hippocastanum* L.)	+
2.	američki javor (*Acer dasycarpum* L.)	+
3.	klen (*Acer campestre L.*)	+
4.	negundovac (*Acer negundo* L.)	+
5.	gorski javor (*Acer pseudoplatanus L.*)	-
6.	pajasen (*Ailanthus glandulosa* Desf.)	-
7.	breza (*Betula verrucosa* L.)	+
8.	grab (*Carpinus betulus* L.)	+
9.	katalpa (*Catalpa bignonioides* Walter)	+
10.	američki jasen (*Fraxinus americana* L.)	+
11.	žalosni jasen (*Fraxinus excelsior var. Pendula*)	-
12.	poljski jasen (*Fraxinus angustifolia* Vahl)	-
13.	obična bukva (*Fagus silvatica* L.)	+
14.	trnovac (*Gleditsia triacanthos* L.)	-
15.	gimnoklad (*Gymnocladus dioicus* L.)	+
16.	crni orah (*Juglans nigra* L.)	-
17.	maklura (Maclura pomifera (Raf.) C. K. Schneid.)	+
18.	javorolisna platana (*Platanus acerifolia* Willdenow)	-
19.	crvenolisna trešnja (*Prunus pissardi* Vilmorin)	-
20.	bijela vrba (*Salix alba* L.)	+
21.	žalosna vrba (*Salix babilonica* L.)	-
22.	malolisna lipa (*Tillia parvifolia* L.)	-
23.	velelisna lipa (*Tillia grandifolia* Scopoli)	+
24.	brijest (*Ulmus carpinifolia Gled.*)	-
25.	hrast lužnjak (*Quercus robur* L.)	+
26.	crveni američki hrast (*Quercus rubra* L.)	-
27.	smreka obična (*Picea abies (L.)* Karsten)	+
28.	bijeli bor (*Pinus silvestris* L.)	-
29.	borovac (*Pinus strobus* L.)	+

Pronađeno je dvanaest stabala hrasta lužnjaka opsega od 340 cm do 370 cm. Jedan hrast lužnjak u blizini vrtlareve kuće bio je najvećeg opsega od 514 cm. Kod kapelice pronađen je još jedan veći hrast lužnjak opsega 453 cm (slika 8).



Slika 8 Stabla i panjevi hrasta lužnjaka iz banovog razdoblja

Hrast lužnjak opsega od 340 cm do 370 cm mogao bi biti starosti 170 godina, što bi odgovaralo razdoblju kad je ban održavao svoje imanje. Sve ostale biljke navedene u tablici 4 su iz novijeg vremena.

Tablica 4 Biljke starosti oko 170 godina i starije od 170 godina

Vrsta biljke	Broj jedinki pojedine vrste koje potječu iz vremena bana Jelačića	Položaj biljke (aleja kestena, staza prema vrtlarevoj kući, kod kapelice, kod vrtlareve kuće, kod grobnice, kod parkirališta)
hrast lužnjak (*Quercus robur* L.)	3	aleja kestena
hrast lužnjak (*Quercus robur* L.)	5	staza prema vrtlarevoj kući
hrast lužnjak (*Quercus robur* L.)	3	kod vrtlareve kuće
hrast lužnjak (*Quercus robur* L.)	2	kod kapelice

Na ulazu u aleju kestena nalaze se tri hrasta lužnjaka koje je mogao posaditi ban. Na slici 9 vide se dva stara hrasta lužnjaka koji su obrasli bršljanom.

Slika 9 Dva hrasta lužnjaka na ulazu u aleju kestena opsega 343 cm i 365 cm

Na slici 10 vide se dva hrasta lužnjaka koji svojom visinom nadmašuju ostalo drveće.

Slika 10 Dva hrasta lužnjaka kod kapelice koji potječu iz banovog doba

Na slici 11 nalazi se panj hrasta lužnjaka. Zbog oštećenja nisu se mogli precizno izbrojati godovi. Broj godova kreće se otprilike 90, a opseg panja je 185 cm. Da bi se što točnije procijenila starost pojedinog hrasta, iz broja godova panja i njegovog opsega, te opsega pronađenog hrasta lužnjaka, jednostavnim matematičkim izračunavanjem omjera procijenjena je starost hrasta.

Slika 11 Panj hrasta lužnjaka star oko 90 godina i opsega 185 cm

Na slici 12 nalazi se panj hrasta lužnjaka čiji je broj godova preko 160, a njegov je opseg 342 cm.

Slika 12 Panj hrasta lužnjaka star više od 160 godina

RASPRAVA

Na temelju rezultata vidi se da je od 29 banovih biljnih vrsta, navedenih u Studiji zaštite i obnove perivoja Novi Dvori zaprešićki (Obad Šćitaroci i sur., 1991), pronađeno njih 16. To je oko 55 % vrsta koje su rasle i u njegovo vrijeme, a koje su istražene na temelju prikupljenih starih fotografija i razglednica s motivima dvorca, kapelice, staklenika i perivoja iz različitih izvora i arhivske građe. Aleja divljih kestena obnovljena je u cijelosti. Ostalo drveće koje bi moglo doživjeti starost od oko 173 godine vjerojatno se samo pomlađivalo ili je zasađeno naknadno, a to su gorski javor, lipa, bukva i borovac. Pronađene biljke koje su živjele u banovo vrijeme, ali nisu mogle doživjeti veću starost, su američki javor, klen, negundovac, breza, grab, katalpa, američki jasen, gimnoklad, maklura, bijela vrba i obična smreka. Biljke koje bi mogle doživjeti starost od oko 173 godina vjerojatno su propale zbog bolesti, starosti i vremenskih neprilika, ali i ljudskog nemara što je navedeno i u Studiji zaštite i obnove perivoja Novi Dvori zaprešićki (Obad Šćitaroci i sur., 1991).

Od biljaka koje mogu doživjeti starost od oko 170 godina ostao je samo hrast lužnjak. Prema izračunima pomoću kalkulatora o starosti drveća, provjeravanjem preko broja godova i mjerenjem opsega debla, svo drveće manjeg opsega od 300 cm nije se uzimalo u obzir, jer je zasigurno iz mlađeg razdoblja. Opseg hrastova koje je mogao zasaditi ban su oni od 340 do 370 cm. Broj godova na nekim panjevima odgovara banovom razdoblju upravljanja imanjem. Hrast lužnjak u blizini vrtlareve kuće (opsega od 514 cm) i hrast lužnjak (opsega 453 cm) pronađen kod kapelice vjerojatno su posađeni i prije nego što je ban kupio imanje. Trebalo bi razmisliti, obavijestiti lokalne vlasti o potrebi očuvanja hrastova kao spomenike prirode. Također bi trebalo uz pomoć dendrologa odrediti starost drveća, procijeniti stanje te poduzeti bolju brigu o njima.

ZAKLJUČCI

Iz rezultata dobivenih istraživanjem može se zaključiti da su pretpostavke potvrđene. U kompleksu Novih Dvora pronađeno je 55% biljaka navedenih u Studiji zaštite i obnove perivoja Novi Dvori zaprešićki. Od drveća koje može doživjeti starost od 173 godine, samo je pronađena jedna vrsta biljaka. Ban Jelačić vjerojatno je mogao zasaditi hrast lužnjak današnjeg opsega od 340-370 cm. S obzirom na dobivene rezultate, trebalo bi dodatno zaštititi 14 pronađenih hrastova koji su svjedoci nekih prošlih vremena.

LITERATURA

Calculatorian.com. 2021. Kalkulator za starost drveća. https://calculatorian.com/hr/biology/tree-age-calculator, pristupljeno 10.9.2024.
Domac R. 2002. Flora Hrvatske. Školska knjiga, Zagreb.

Forenbacher S. 2001. Velebit i njegov biljni svijet. Školska knjiga, Zagreb.
Google karte. 2005. https://www.google.hr/maps/search/novi+dvori/@45.8717287,15.7957789,2921m/data=!3m2!1e3!4b1?hl=hr&entry=ttu&g_ep=EgoyMDI1MDIxOS4xIKXMDSoASAFQAw%3D%3D, pristupljeno 22.12.2024.
Grad Zaprešić. 2024. Novi Dvori u obnovi. https://zapresic.hr/obnova-novih-dvora-vrijedna-10-milijuna-eura/, pristupljeno 22.12.2024.
Hrvatska enciklopedija. 2024. God. https://www.enciklopedija.hr/clanak/god, pristupljeno 22.12.2024.
Informativni centar Zaprešić d.o.o. 2022. Najnovije informacije iz Zaprešića. https://icz.hr/2022/07/06/regulacija-prometa-i-pristup-novim-dvorima-od-6-do-10-srpnja/, pristupljeno 22.12.2024.
Laljak S. 1991. Novi Dvori od Jelačića bana do naših dana. Matica hrvatska, Zaprešić.
Nikolić T., Mitić B., Boršić I. 2014. Flora Hrvatske, Invazivne biljke. Alfa d.d., Zagreb.
Obad Šćitaroci M., Bojanić Obad Šćitaroci B., Denich A. 1991. Studija zaštite I obnove perivoja uz dvorac Novi dvori zaprešićki. Regionalni zavod za zaštitu spomenika kulture u Zagrebu, Zagreb.
Pl@ntNet 2024. Prepoznavanje biljaka, Google play. https://play.google.com/store/apps/details?id=org.plantnet&hl=hr&pli=1, pristupljeno 10.10.2024.
Plantea 2024a. Gorski javor. https://www.plantea.com.hr/gorski-javor/, pristupljeno 22.12.2024.
Plantea 2024b. Bukva. https://www.plantea.com.hr/bukva/, pristupljeno 22.12.2024.
Turistička zajednica Zaprešić 2024. Kompleks Novi Dvori. https://www.visitzapresic.hr/upoznaj-zapresic/kompleks-novi-dvori/, pristupljeno 22.12.2024.
Wikipedija 2024a. Hrast lužnjak. https://hr.wikipedia.org/wiki/Hrast_lu%C5%BEnjak, pristupljeno 22.12.2024.
Wikipedija 2024b. Lipa. https://bs.wikipedia.org/wiki/Lipa_(biljka), pristupljeno 22.12.2024.
Yuflor 2024. *Pinus strobus* L. https://yuflor.rs/prodavnica/pinus-strobus-l-vajmutov-svilasti-petouglicavi-bor/, pristupljeno 22.12.2024.

Analiza i usporedba sastojaka žirova dviju vrsta hrasta

Greta Drakšić, 7. razred
Elena Kiseljak, 7. razred

OŠ Ljudevita Gaja, Zaprešić
Mentor: *Đurđica Patafta*

SAŽETAK
Istraživanje je provedeno u listopadu 2024. godine. Ciljevi su bili usporediti kemijski sastav žirova hrasta kitnjaka i lužnjaka te u obje vrste dokazati hranjive sastojke kao što su škrob, šećer, bjelančevine, ulja i mineralne tvari. Udio vode i pepela u oba uzorka određivan je kvantitativnim metodama, a masti i ulja, bjelančevine, glukoza i škrob kvalitativnim metodama (otapanjem u benzinu, Biuretnom reakcijom, Trommerovim reagensom te Lugolovom otopinom). Obje vrste žirova sadrže škrob, šećer, bjelančevine, ulja, vodu i mineralne tvari. Pretpostavka da će u ispitivanom uzorku žir hrasta lužnjaka imati veći udio vode, budući da raste na vlažnijem staništu, nije potvrđena. Znatno veći udio vode dobiven je u uzorku hrasta kitnjaka. Pretpostavka da će u ispitivanom uzorku hrasta kitnjaka, u odnosu na uzorak hrasta lužnjaka, biti veći udio mineralnih tvari je potvrđena.

Ključne riječi: *hrast lužnjak; kitnjak; kvantitativna i kvalitativna analiza žira*

UVOD

Hrast lužnjak (*Quercus robur* L.) listopadno je drvo iz porodice bukvi (*Fagaceae*). Cvjetovi su jednospolni i jednodomni te zelenožuti. Cvatu u proljeće. Oprašuju se vjetrom pa nemaju boju ni miris. Muški cvat resa ima dužinu od 2 do 5 cm. Ženski cvjetovi javljaju se pojedinačno ili u skupinama do pet. Nalaze se na dugoj peteljci. Plod žir je izdužen i jajast, svijetlosmeđe boje (slika 1). Dug je od 2 do 5 cm, a nalazi se na peteljci dugoj od 2 do 6 cm. Dozrijeva u rujnu i listopadu (Plantea, 2024). Na slici 1 prikazan je list i plod žir hrasta lužnjaka.

Slika 1 Žir hrasta lužnjaka
Izvor: https://www.inaturalist.org/taxa/56133-Quercus-robur, 2020

Hrast kitnjak (*Quercus petraea* (Mattuschka) Liebl.) iz iste je porodice kao i lužnjak. Cvjetovi su jednospolni i jednodomni. Kao i kod lužnjaka, muški cvjetovi su u resi. Ženski cvjetovi rastu pojedinačno ili po 2 do 5 u skupinama. Žir je izdužen i jajast, dug od 1,5 do 4 cm. Stoji na kratkoj peteljci, a često se nekoliko žirova drži zajedno. Dozrijeva u rujnu i listopadu (Plantea, 2024). Na slici 2 vidi se skupina od tri žira hrasta kitnjaka koji se drže zajedno.

Slika 2 Žir hrasta kitnjaka
Izvor: https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/hrast_kitnjak_%28quercus_petraea%29, 2024

Najvažniji dijelovi žira su klica i dvije supke koje služe za rast klice do razvoja listova (Hrvatska enciklopedija, 2024). Žirovi dozrijevaju u rujnu i listopadu (Plantea, 2024).

Istraživanje kemijskog sastava žira hrasta cera pokazalo je da sadrži vitamin E, 60,4% ugljikohidrata, 6,7% vlage, 6,3% proteina, 4,0% masti i 2,4% pepela (Bilje-zdravlje.com, 2024). U 14. stoljeću različite vrste žirova koristile su se kao hrana u vrijeme „Velike gladi“. U 19. stoljeću postojala je tehnologija za preradu žira u Švedskoj, Norveškoj i Ukrajini. U Španjolskoj su pekarski proizvodi od žira činili 20 % ukupne prehrane. Hrast crnika se nekada koristio u prehrani i na našim otocima Šolti, Molatu i Velom Ižu (Agroportal, 2024).

Pinto i sur. (2019) otkrili su u napitku od žira veću količina spojeva fenola i flavonoida, koji su pokazali ljekovito djelovanje na probavni sustav. Na stranici *net.hr* (Net.hr, 2024) opisuje se da su žirovi bogat izvor hranjivih tvari jer sadrže ugljikohidrate, proteine, nezasićene masne kiseline, vlakna i vitamine te minerale. Posebno su bogati vitaminima A i E, te željezom i manganom. Žir bi mogao imati značajnu ulogu u budućnosti prehrane i održivog razvoja, osobito za ljude koji boluju od celijakije. Mogao bi se uvesti i kao inovacija u gastronomiji i biti poveznica s tradicijom i lokalnim ekosustavima (Net.hr 2024).

Grlić (1990) navodi da se gorčina žira može smanjiti posebnom tehnikom otapanja u vodi 24 sata i pečenja u pećnici na 150°C. Danas se žir koristi kao zamjenska kava ili se melje u brašno te koristi kao dodatak varivima. Problem korištenja žira u ljudskoj prehrani su gorki tanini, koji se mogu smanjiti ispiranjem žira u vodi (Agroportal, 2024). U svom radu Čvrljak (2022) opisuje da se količina vode može odrediti jednostavnim postupkom sušenja ubranih i mljevenih sjemenki. Na temelju gubitka mase računa se koliki je njezin maseni udio. Maseni udio minerala može se odrediti žarenjem uzorka do pojave jednoličnog pepela svijetlosive boje ili do pepela konstantne mase (Čvrljak, 2022). U udžbeniku iz Kemije 8 (Mamić i sur., 2020) opisuju se kvalitativni postupci dokazivanja škroba Lugolovom otopinom, bjelančevina Biuretnom reakcijom, ulja otapanjem uzoraka u medicinskom benzinu, a prisutnost glukoze Trommerovim reagensom.

Na istraživanje plodova žira potaknula nas je ideja o češćoj primjeni žira u prehrani. Mogao bi se koristiti kao zdrava hrana jer se hrastove šume uglavnom kemijski ne tretiraju. Cilj je bio usporediti kemijski sastav žirova hrastova kitnjaka i lužnjaka koristeći uvjete u školi, pribor i kemikalije. Također je cilj bio dokazati hranjive sastojke u obje vrste žirova. Pretpostavke istraživanja su:

- Žirovi hrasta kitnjaka i lužnjaka sadrže škrob, šećer, bjelančevine, ulja, vodu i mineralne tvari;
- U ispitivanom uzorku žir hrasta lužnjaka ima veći udio vode jer raste na vlažnijem staništu;
- U ispitivanom uzorku udio mineralnih tvari je različit kod obje vrste hrasta jer rastu na različitom staništima. Hrast lužnjak raste na glinenom tlu, a hrast kitnjak na humusnom tlu, pa bi hrast lužnjak trebao imati veći udio mineralnih tvari u žirovima.

METODE RADA

Istraživanje je provedeno u listopadu 2024. godine. Plodovi žira hrasta lužnjaka ubrani su u školskom dvorištu 20. listopada 2024. godine. Tlo oko hrasta lužnjaka je glineno i često je nakon kiše poplavljeno. Plodovi hrasta kitnjaka ubrani su u obližnjoj šumi uz školu isti dan i pod istim vremenskim uvjetima kao i hrast lužnjak. Tlo oko hrasta kitnjaka je prekriveno otpalim lišćem ispod kojeg se nalazi humus. Za kemijsku analizu oba hrasta prikupljeno je po 0,5 kg svake vrste žira bez oštećenja.

Plodovima žira uklanja se vanjska ljuska. Supke se usitnjavaju u tarioniku i dodatno melju „štapnim“ mikserom (slika 3). Dobiveni uzorci spremaju se u sterilne bočice kupljene u apoteci i ostavljaju na sobnoj temperaturi do analize.

Slika 3 Postupak dobivanja uzorka žirova za istraživanje

Približan udio vode određivan je fizikalnom metodom sušenja. Za razliku od postupka kemijske analize opisanog u literaturi (Čvrljak, 2022), sušenje je provedeno u skladu s uvjetima u školskom kabinetu. Čisti i suhi porculanski lončić zagrijan je kratko (20 sekundi) na plinskom plameniku kako bi isparila prisutna voda iz lončića. Nakon što je lončić ohlađen, odvagnulo se po 3 g svakog uzorka na digitalnoj vagi (Čvrljak, 2022). Ukupno je izvagano po tri uzorka od svakog hrasta. Uzorak se lagano grijao 20 minuta na slabom plamenu plinskog plamenika da se izbjegne pougljenjivanje uzorka. Nakon toga se izvagao i zabilježila se masa. Postupak zagrijavanja se nastavio, a masa uzorka provjeravala se dok se nije postigla konstantna vrijednost. Razlika u masi prije i poslije sušenja odgovara količini vode u uzorku (Čvrljak, 2022). Udio vode računa se prema formuli:

$$\% \text{ vode} = \frac{m2-m3}{m2-m1} \text{ x } 100$$

gdje je: m1 – masa praznog porculanskog lončića
m2 – masa porculanskog lončića s uzorkom žira prije sušenja
m3 – masa porculanskog lončića s uzorkom žira nakon sušenja.

Zbog preciznijeg rezultata postupak je ponavljan 3 puta i izračunavana je srednja vrijednost. Isti je postupak ponovljen 3 puta i za drugi uzorak žira.

Približni udio pepela, odnosno mineralnog ostatka, određivan je karboniziranjem uzorka na plameniku do pojave jednoličnog svijetlosivog pepela. Kod izvođenja pokusa treba paziti na prozračivanje prostora jer se uzorak jako dimi. Također se treba zaštititi naočalama. Porculanski lončić prvo je zagrijan 20 sekundi, zatim je ohlađen i izvagan. Nakon toga dodano je 3 g usitnjenog uzorka žira. Skupa sa zdjelicom uzorak je zagrijavan na plameniku sve dok nije pougljenio. Nakon što je postignut jednoličan svijetlosivi pepeo bez crnih čestica, zdjelica je ohlađena i izvagana (Čvrljak, 2022). Udio minerala u uzorku žira izračunao se prema formuli:

$$\%\text{pepela} = \frac{m3-m1}{m2-m1} \text{ x } 100$$

gdje je: m1 – masa prazne porculanske zdjelice
m2 – masa porculanske zdjelice i uzorka prije spaljivanja
m3 – masa porculanske zdjelice i pepela.

Zbog preciznijeg rezultata postupak je ponavljan 3 puta i izračunavana je srednja vrijednost.

S obzirom na naše mogućnosti, primijenjena je jednostavna kvalitativna metoda dokazivanja prisutnosti masti ili ulja u uzorcima žira otapanjem u benzinu. Za dokazivanje se koristion medicinski benzin (Mamić i sur., 2020). Pri izvođenju pokusa vodila se briga o osobnoj zaštiti naočalama i rukavicama od izravnog kontakta te o zapaljivosti benzina. Zbog para benzina radilo se u prozračenom prostoru. Po 3 g uzorka od svake vrste žira stavio se u epruvetu do polovice. Benzin se dolijevao toliko da prekrije uzorak žira. Začepljena epruveta s uzorkom lagano se mućkala 2 minute. Tako dobiven

uzorak ostavio se još 60 minuta i ponovno promućkao, kako se pospješila bolja ekstrakcija ulja iz ploda. Dobiveni uzorak homogene smjese benzina i ulja dekantirao se na satno stakalce, gdje je ostavljen da benzin ispari iz smjese.

Proteini su određivani kvalitativno Biuretnom reakcijom. Za kvantitativni način nije bilo uvjeta u školskom kabinetu. U Biuretnoj reakciji korištena je 0,5 % otopina bakrovog(II) sulfata (odvagano je 0.5 grama modre galice i nadopunjeno destiliranom vodom do volumena od 100 mL). Za dokazivanje proteina stavljene su 2 žlice uzorka žira u staklenu čašu od 250 mL, dodana je destilira voda toliko da prekrije uzorak. Nakon miješanja je smjesa filtrirana, a filtrat je dalje istraživan. U 2 mL filtrata dodano je 2 mL 20 % otopine natrijeve lužine te 2–3 kapi otopine bakrovog(II) sulfata. Na kraju reakcije promatrana je promjena boje. Ljubičasta boja bila je dokaz proteina.

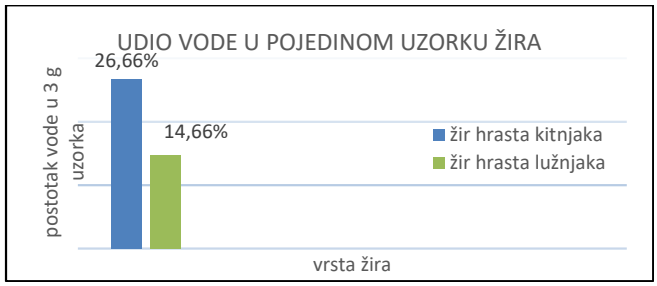
Glukoza je kvalitativno određivana Trommerovim reagensom kako je opisano u udžbeniku iz Kemije 8 (Mamić i sur., 2020). Uzorak žira otopljen je u destiliranoj vodi i potom filtriran. U filtrat je dodano 1 mL 0,5 % otopine bakrovog(II) sulfata i nekoliko kapi natrijeve lužine. Ako je u uzorku prisutna glukoza, pojavio se talog bakrovog(I) oksida crvenosmeđe boje.

Škrob je kvalitativno dokazivan Lugolovom otopinom (vodenom otopinom joda u kalijevom jodidu). Na uzorak žira dodano je 2 kapi indikatora škroba. Tamnoplava boja bila je dokaz da je u uzorku prisutan škrob.

Nakon provedenih postupaka uspoređivan je kvalitativni i kvantitativni kemijski sastav žirova hrasta. Udio vode i minerala grafički je prikazivan i uspoređivan.

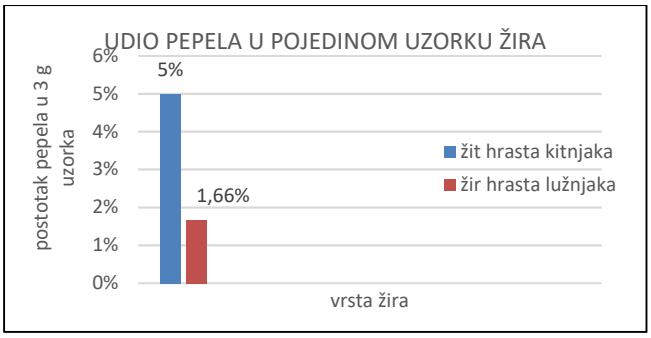
REZULTATI

Udio vode (srednja vrijednost u 3 ponovljena pokusa) u 3 g uzorka žira hrasta kitnjaka i lužnjaka grafički je prikazan na slici 4.



Slika 4 Prosječan udio vode u žirovima

Udio pepela (srednja vrijednost u 3 ponovljena pokusa) u 3 g uzorka žira hrasta kitnjaka i lužnjaka grafički je prikazan na slici 5 .

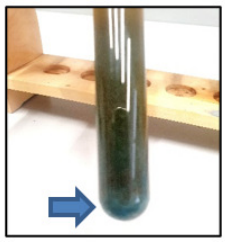


Slika 5 Prosječan udio pepela u žirovima

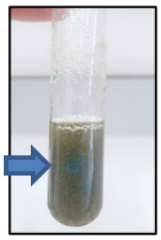
Na slici 6 vidi se prisutnost masne mrlje nakon što je uzorak žira otapan u benzinu. Benzin je ispario, a na satnom stakalcu zaostala je žuta mrlja. U oba uzorka dokazano je prisustvo ulja.

Slika 6 Masna mrlja na vati nakon isparavanja benzina iz otopine

Na uzorcima žirova bila je pozitivna i Biuretna reakcija. Na pojedinim mjestima u epruvetama vidi se ljubičasta boja (slika 7 i 8).

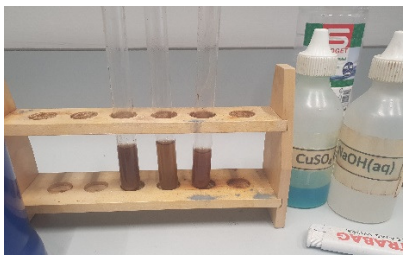


Slika 7 Rezultat Biuretne reakcije u uzorku žira hrasta kitnjaka



Slika 8 Rezultat Biuretne reakcije u uzorku žira hrasta lužnjaka

U oba uzorka kvalitativno je dokazana i glukoza Trommerovim reagensom (slika 9). U epruvetama se pojavio ciglastocrveni talog, što je dokaz glukoze.



Slika 9 Ciglastocrveni talog u tri uzorka žira

Nakon dodavanja Lugolove otopine u uzorcima se pojavilo tamnoplavo obojenje, što je dokaz škroba (slika 10).

Slika 10 Tamnoplava boja s Lugolovom otopinom

RASPRAVA

Kod kvantitativnog određivanja vode, za razliku od hrasta cera koji sadrži 6,7 % vlage (Bilje-zdravlje.com, 2024), u ove dvije vrste udio vode je veći. Prema pretpostavci da će udio vode biti veći kod hrasta lužnjaka, budući da raste na vlažnom tlu, dobiveni su suprotni rezultati. Udio vode kod

hrasta kitnjaka veći je za 12 % i iznosi 26,66 %, a kod hrasta lužnjaka 14,66 %. Razlog tome može biti sušnije tlo na području našeg školskog dvorišta, u kojem su ubrani plodovi hrasta lužnjaka. Kitnjak je ubran na šumskom tlu koje je možda vlažnije od onog u školskom dvorištu pa njegovi plodovi ne moraju čuvati vodu. Možda bi dobiveni rezultati bili drugačiji da su žirovi hrasta lužnjaka ubrani na njegovom prirodnom staništu, koje je močvarno.

U odnosu na istraživanje u kojem se dokazalo da hrast cer ima udio pepela 2,4 % (Bilje-zdravlje.com 2024), iz dobivenih rezultata vidi se da hrast kitnjak sadrži znatno više mineralnih tvari i to 5 %, a lužnjak manje od cera 1,66 % pepela. Žir hrasta kitnjaka bogatiji je mineralima, a možda i kvalitetniji u prehrani od cera i lužnjaka. Kitnjak je ubran u šumi čije je tlo humusno, bogatije mineralnim tvarima. Plodovi hrasta lužnjaka rastu na glinenom tlu u školskom dvorištu, koje je vjerojatno siromašno mineralnim tvarima. Trebalo bi napraviti detaljnija istraživanja da se utvrdi razlikuju li se sastojci žira hrasta lužnjaka koji raste na prirodnom staništu od onog ubranog kod škole.

Nakon isparavanja benzina, na satnom stakalcu zaostala je količina ulja, što je dokaz da se i u ovim žirovima nalaze određene količine ulja. Količina ulja hrasta kitnjaka u 3 g uzorka bila je vizualno malo veća u odnosu na hrast lužnjak. Iako je ulje dokazivano kvalitativno, može se zaključiti da humusno tlo pospješuje i veću količinu ulja u plodovima, ali i za to su potrebna detaljnija istraživanja.

Kod dokazivanja škroba, tamnoplava boja Lugolove otopine odmah se pojavila. Koliki je udio škroba ne može se reći iz kvalitativne analize. Kako se izrazito tamnoplava boja indikatora nalazila na području cijele njegove površine, moglo bi se procijeniti da se količina škroba podudara s pronađenom literaturom u kojoj se navodi da žir hrasta cera sadrži 60,4 % ugljikohidrata (Bilje-zdravlje.com, 2024). Za to su potrebna dodatna istraživanja hrasta kitnjaka i lužnjaka.

Talog ciglastocrvenog bakrovog(I) oksida dobiven je također u oba uzorka, što je dokaz postojanja glukoze u njima.

Kod dokazivanja bjelančevina Biuretnom reakcijom tamnoplava boja bila je vidljiva na pojedinim mjestima u epruveti. Vjerojatno je i u ovim uzorcima žirova udio bjelančevina niži kao i kod žira hrasta cera kod kojeg je bio 6,3% (Bilje-zdravlje.com, 2024), za što su potrebna kvantitativna istraživanja.

ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata može se zaključiti da su pretpostavke istraživanja većinom potvrđene. Obje vrste žirova sadrže škrob, šećer, bjelančevine, ulja, vodu i mineralne tvari. Pretpostavka da će u ispitivanom uzorku žir hrasta lužnjaka imati veći udio vode, budući da raste na vlažnijem staništu, nije potvrđena. Znatno veći udio vode dobiven je u uzorku hrasta kitnjaka, što je suprotno postavljenoj pretpostavci. Pretpostavka da će u ispitivanom uzorku udio mineralnih tvari biti veći kod hrasta kitnjaka je potvrđena.

LITERATURA

Agroportal 2024. Brašno od žira. Agroportal, https://www.agroportal.hr/zanimljivosti/31732, pristupljeno 7.1.2025.

Bilje-zdravlje.com 2024. Rezime naučne studije kafe od žira objavljene u časopisu farmaceutskog fakulteta Porto. Bilje I zdravlje, https://www.bilje-zdravlje.com/vesti/rezime-naucne-studije-kafe-od-zira-objavljene-u-casopisu-farmaceutskog-fakulteta-porto/, pristupljeno 20.12.2024.

Čvrljak M. 2022. Kemijski sastav lješnjaka iz sezone 2022. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Grlić LJ. 1990. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, drugo izdanje. August Cesarec, Zagreb.

Hrvatska enciklopedija 2024. Sjeme. Hrvatska enciklopedija, https://www.enciklopedija.hr/clanak/sjeme, pristupljeno 20.12.2024.

Mamić M., Mrvoš-Semek D., Peradinović V., Ribarić N. 2020. Kemija 8, udžbenik i radna bilježnica za osmi razred osnovne škole. Alfa, Zagreb.

Net.hr 2024. Je li žir jestiv? Net.hr, https://net.hr/magazin/kuhinja-i-recepti/za-sto-se-koristi-zir-je-li-jestiv-i-koje-su-njegove-prednosti-u-prehrani-45fa20e8-8621-11ef-92a7-4ae518db97c5, pristupljeno 20.12.2024.

Plantea 2024. Hrast lužnjak. Plantea, https://www.plantea.com.hr/hrast-luznjak, pristupljeno 20.12.2024.

Plantea 2024. Hrast kitnjak. Plantea, https://www.plantea.com.hr/hrast-kitnjak, pristupljeno 20.12.2024.

Pinto D., Diaz Franco S., Silva A. M., Cupara S., Koskovac M., Kojicic K., Soares S., Rodrigues F., Sut S., Dall'Acqua S., Oliveira M. B. P. P. 2019. Kemijska karakterizacija i bioaktivna svojstva napitka nalik kavi pripremljenog od zrna *Quercus cerris*. Food & Function 10(4): 2050–2060.

Svilena krila

Mila Gržetić, 7. razred
Ana Ivetić, 7. razred

OŠ Vladimira Nazora Pazin, Pazin
Mentor: *Maja Curić*

SAŽETAK
Ples na svili akrobatska je vještina koja pokreće cijelo tijelo, povećava koncentraciju, potiče kreativnost i jača samopouzdanje. Cilj ovog istraživanja je utvrditi kratkoročni i dugoročni utjecaj treniranja plesa na svili na naše ispitanike. Naša pretpostavka je da će kratkoročno treniranje plesa na svili (kao i bavljenje ostalim fizičkom aktivnostima) dovesti do poboljšanja općeg stanja organizma (osjećaja opuštenosti), aktivirat će rad više mišića te će se poboljšati opskrba tijela kisikom (ubrzat će se tlak i broj otkucaja srca). Dugoročno treniranje plesa na svili poboljšat će fleksibilnost i koordinaciju pokreta kod ispitanika te će im jačati samopouzdanje. Istraživanje je provedeno na uzorku od 16 ispitanika (učenice šestog i sedmog razreda) od kojih prvu skupinu čini osam ispitanika koji treniraju ples na svili 6 ili 18 mjeseci. Drugu skupinu čini 8 ispitanika (neki treniraju odbojku, košarku ili mažoret ples dok ostali ne treniraju nikakav sport) koji su u 5. razredu osnovne škole imali podjednake vrijednosti visine, testa fleksibilnosti (pretklon) i testa koordinacije (poligon) kao i ispitanici koji treniraju ples na svili. Njihovi pojedinačni rezultati u 5. razredu uzeti su kao kontrolne vrijednosti i uspoređeni su s rezultatima postignutim ove školske godine. Provedeni su testovi fleksibilnosti (pretklon raznožno), koordinacije (savladavanje poligona unatraške u što kraćem roku), odrađen je trening plesa na svili. Ispitanicima je izmjeren krvni tlak i broj otkucaja srca (puls) prije i nakon treninga plesa na svili, a anketom je utvrđen stupanj opuštenosti i samopouzdanja prije i nakon treninga plesa na svili. Ispitanici koji treniraju ples na svili uspješniji su u testovima fleksibilnosti (rezultat im se poboljšava za 6 cm nakon svake godine treniranja), procjenjuju da imaju puno veće samopouzdanje (za čitavu 1 ocjenu) te da ih treniranje plesa na svili opušta. Ispitanici koji treniraju sportove koje se temelje na brzini i eksplozivnosti (odbojka, košarka) postižu bolje rezultate u koordinaciji.

Ključne riječi: *ples na svili; fleksibilnost; koordinacija; samopouzdanje.*

UVOD

Ples na svili akrobatska je vještina, potekla iz cirkuskih krugova u dvadesetom stoljeću. Pleše se na dvjema svilenim trakama koje su pričvršćene na strop karabinerom (metalni dio kojime se svila učvršćuje za strop) i užetom. Taj sport smatra se vrlo elegantnim, snažnim i koordinatnim za cijelo tijelo, kako anatomski tako i umno. Njegov cilj je elegantno izvođenje različitih pokreta te da se čini publici da je nemoguće moguće. Poboljšava rad srca i pokreće sve mišiće tijela. U zraku se smanjuje utjecaj i pritisak na tetive i zglobove, zbog toga smo sigurniji od istegnuća i drugih ozljeda mišića i zglobova. Ples na svili zagrijava i pokreće cijelo tijelo, potiče mentalno zdravlje. Uvelike smanjuje depresiju, stres i anksioznost. Povećava koncentraciju, potiče kreativnost i jača samopouzdanje zbog toga što se trebamo pouzdati na vlastito znanje i vještine, osim toga nakon svakog izvedenog atraktivnog pokreta plesači jačaju samopouzdanje. Prije početka svakog plesanja treba se dobro zagrijati vježbama koje uključuju zagrijavanje gležnja, koljena, kuka, lakta i zapešća. Na svili se može plesati u prostoru, vani, a neki koje vole avanture, plešu i na mostovima. Za plesanje samo treba neko visoko mjesto gdje se može zakačiti svila. Za izvedbu treba visoko mjesto da se osigura prostor za izvođenje pokreta velikih raspona (što pozitivno utječe na fleksibilnost organizma). Ples na svili pozitivno utječe čak i na osobe koje se boje visine jer su mnogi zahvaljujući njemu uspjeli prebroditi strah. Početnici počinju trenirati na maloj visini te se nadograđuje visina i kompleksnost pokreta, a pomalo se jača samopouzdanje (Dragićević Vukman, 2021).

Trening plesa na svili aktivira rad više mišića zbog čega se ubrzava rad srca (puls), što pridonosi boljem općem stanju organizma. Broj otkucaja srca, puls varira od osobe do osobe, a u fazi mirovanja normalan broj otkucaja srca za djecu u dobi od 7 do 15 godina kreće se u rasponu od 70 do 100 otkucaja u minuti. Puls ovisi o dobi i veličini tijela, a povećava se povećanjem tjelesne aktivnosti (jer je tada veća potreba za energijom) te pod utjecajem emocija (strah i uzbuđenje također mogu ubrzati broj otkucaja srca). Aktivne osobe imaju niži broj otkucaja srca jer njihov srčani mišić lakše održava stabilnost otkucaja. Broj otkucaja srca može se izmjeriti mjerenjem pulsa koji se mjeri brojem širenja i stezanja arterija uvjetovanog stezanjem srčanog mišića. Krvni tlak je mjera sile (pritiska) krvi na stjenku arterija, a normalna vrijednost iznosi 120/80 mm Hg. U većini slučajeva povećanje krvnog tlaka prati i povećanje broj otkucaja (Kujundžić, 2022). Ovim istraživanjem želimo utvrditi poboljšava li ples na svili fleksibilnost i koordinaciju ispitanika. Gibljivost ili fleksibilnost je sposobnost izvođenja pokreta što većeg raspona. Mjerilo gibljivosti je maksimalni raspon pokreta u pojedinom zglobnom sustavu. U osnovi ove osobine su elastičnost mišića i ligamenata te struktura i oblik zglobnih tijela. Gibljivost se lakše razvija kod djece i mlađih pa njezin razvoj treba planirati u dobi 11 – 14 godina. Procjenjuje se mjerom „pretklon raznožno“ (Prskalo, 2004). Koordinacija ili motorička inteligencija je sposobnost upravljanja pokretima tijela, mjeri se brzinom rješavanja motoričkih problema pri čemu je bitno usklađivanje viših regulacijskih centara živčanog sustava s perifernim dijelovima sustava za kretanje (Prskalo, 2004). Koordinacija je produkt međusobnog djelovanja središnjeg živčanog sustava i skeletnih mišića u izvođenju željenog motoričkog pokreta (Milanović, 2013). Na fleksibilnost i koordinaciju utječe genetska predispozicija te treniranje i bavljenje sportom. Dobro razvijena koordinacija važna je za usvajane i usavršavanje različitih vještina. Početak razvoja koordinacije može se vidjeti već kod male djece kod igre kada dijete želi doći do igračke. Kada se govori o odbojci, dobra koordinacija ruku, nogu i čitavog tijela ključna je za sve elemente odbojke a odnosi se na bacanje i hvatanje lopte s mjesta ili tijekom kretnji te odbijanje lopte. Odbojka je sport u kojem dominiraju eksplozivna snaga, koordinacija, preciznost, brzina i izdržljivost. Ispitanici koji treniraju odbojku postižu bolje rezultate u poligonu unatrag u odnosu na one koji ne treniraju (Kukec, 2023).

Razlog odabira ove teme je ljubav prema bavljenju plesom na svili (jedna autorica ovog rada aktivno trenira 18 mjeseci) i interes da se bolje istraže dobrobiti bavljenja ovim prekrasnim sportom. Cilj ovog istraživanja je utvrditi kratkoročni i dugoročni utjecaj treniranja plesa na svili na naše ispitanike. Naša pretpostavka je da će kratkoročno treniranje plesa na svili (kao i bavljenje ostalim fizičkom aktivnostima) dovesti do poboljšanja općeg stanja organizma (osjećaja opuštenosti), aktivirat će rad više mišića te će se poboljšati opskrba tijela kisikom (ubrzat će se tlak i broj otkucaja). Dugoročno treniranje plesa na svili poboljšat će fleksibilnost i koordinaciju pokreta kod ispitanika. Treniranjem plesa na svili aktivira se i jača veći broj mišića što će utjecati na bolju fleksibilnost, ali i koordinaciju ispitanika. Bavljenje svakom fizičkom aktivnosti dovodi do povećanja broja otkucaja srca i krvnog tlaka. Na razvoj i rezultate fleksibilnosti i koordinacije utječe čitav niz čimbenika, a osim genetskih predispozicija najvažniji utjecaj ima tjelesna aktivnost.

METODE RADA

Istraživanje je provedeno u školskoj dvorani na uzorku od 16 ispitanika (učenice šestog i sedmog razreda). Od tih 16 ispitanika njih osam trenira ples na svili (tablica 1). Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine ovisno o tome treniraju li ili ne ples na svili (tablica 2). Prilikom odabira ispitanika koji ne treniraju ples na svili vođeno je računa da se uzmu oni ispitanici koji su imali slične vrijednosti visine, testa fleksibilnosti (pretklon) i testa koordinacije (poligon) u 5. razredu osnovne škole kao i ispitanici

koji treniraju ples na svili (među njima su ispitanici koji treniraju odbojku i košarku, ali i oni koji ne treniraju nikakav sport). Navedene podatke (mjerenja) nam je ustupio učitelj Tjelesne i zdravstvene kulture. Početkom studenog 2024. ponovljeno je testiranje fleksibilnosti (pretklon raznožno) i test koordinacije (poligon unatraške) sa svim ispitanicima prema istim kriterijima kao i ranije. Na razvoj i rezultate fleksibilnosti i koordinacije osim genetskih predispozicija utječe tjelesna aktivnost. Zato će za svakog ispitanika biti detaljno opisano je li se u 5. razredu (od kada uzimamo njihove vrijednosti fleksibilnosti i koordinacije kao kontrolne vrijednosti) bavio sportom, kojim i koliko je sati tjedno je trenirao s rezultatima navedenih testova (tablica 1). Isto će biti ponovljeno i za rezultate fleksibilnosti i koordinacije ispitanika dobivene zadnjim mjerenjima u ovoj školskoj godini.

Tablica 1 Rezultati ankete ispitanika koji treniraju ples na svili

		Podatci u 5. razredu	Podaci u sadašnjem razredu
Ispitanik broj:	Koji razred pohađate?	Jeste li trenirali neki sport u 5. razredu? Ako da, koji i koliko sati tjedno ste trenirali?	Koliko dugo trenirate ples na svili i koliko sati tjedno trenirate? Trenirate li još neki sport? Ako da, koji i koliko sati tjedno?
1	7. razred	Da, odbojka, 2 x 1,30 sat	18 mjeseci, 2 x 1 sat
2	7. razred	Da, ples, 2 x 1,30 sat	18 mjeseci, 2 x 1 sat
3	6. razred	Da, ples na svili, 2 x 1 sat	18 mjeseci, 2 x 1 sat
4	6. razred	Da, ples na svili, 2 x 1 sat	18 mjeseci, 2 x 1 sat
5	6. razred	Da, odbojka, 3 x 1 sat	6 mjeseci, 2 x 1 sat + odbojka, 3 x 1,5 sat
6	6. razred	Da, ples, 2 x 1 sat	6 mjeseci, 2 x 1 sat
7	7. razred	Da, ples, 2 x 1 sat	6 mjeseci, 2 x 1 sat
8	6. razred	Da, košarka, 2 x 1,5 sat	6 mjeseci, 2 x 1 sat

Tablica 2 Rezultati ankete ispitanika koji ne treniraju ples na svili

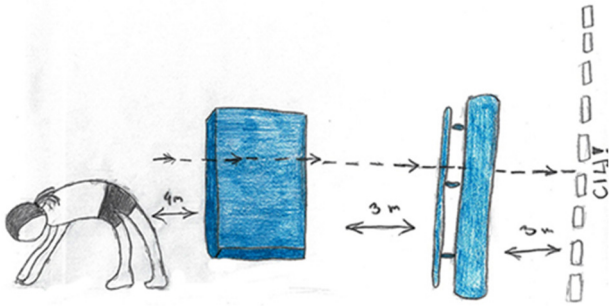
		Podatci u 5. razredu	Podaci u sadašnjem razredu
Ispitanik broj:	Koji razred pohađate?	Jeste li trenirali neki sport u 5. razredu? Ako da, koji i koliko sati tjedno ste trenirali?	Trenirate li neki sport? Ako da, koji i koliko sati tjedno?
9	7. razred	Ne	Da, odbojka, 3 x 2 sata
10	6. razred	Da, odbojka, 2 x 1,5 sat	Ne
11	6. razred	Da, odbojka, 3 x 1,5 sat	Ne
12	6. razred	Da, mažoret ples, 2 x 1 sat	Da, odbojka, 3 x 1,5 sat
13	6. razred	Da, odbojka, 3 x 1,5 sat	Da, odbojka 3 x 1,5 sat
14	6. razred	Da, odbojka, 3 x 1,5 sat	Da, odbojka, 3 x 1,5 sat
15	7. razred	Ne	Ne
16	7. razred	Da, ples, 2 x 1 sat	Ne

Svi ispitanici su prošli sva testiranja tri puta, a nakon tri pokušaja zabilježen je najbolji rezultat. Uspoređeni su dobiveni rezultati za svakog ispitanika u 5. razredu (dok još nitko nije trenirao ples na svili) s njihovim rezultatima dobivenim u studenom 2024. Rezultati su prikazani grafički (u programu Microsoft Excel), utvrđeno je jesu li se poboljšali rezultati i za koliko. Izračunate su aritmetičke sredine za obje skupine ispitanika.

Test fleksibilnosti (pretklon raznožno)

Za ovu metodu rada potrebna je okomita ravna površina i drveni metar. Osoba treba sjesti na pod i nasloniti se na okomitu ravnu površinu (slika 1). Noge treba postaviti pod kutom od 60° te ih se prilikom pretklona ne smije savijati u koljenima. Okomito na zid ispred ispitanika postavlja se metar (udaljenost od tijela ispitanika do metra je duljina dlana ispitanika). Ispitanik podiže ruke u zrak, postavlja dlan preko dlana te izvodi što dublji pretklon. Pritom vrhovi prstiju klize uz traku na podu (bez trzaja) te spušta dlanove na drveni metar. Rezultat u testu je maksimalna duljina dohvata, od početnog do krajnjeg dodira na centimetarskoj vrpci. Rezultat se očitava u centimetrima. Mjerenje se ponavlja 3 puta, a bilježi se najbolji rezultat.

Slika 1 Test fleksibilnosti (pretklon raznožno)
Autor: učenica iz razreda - Negovetić V., 2025



Slika 2 Test koordinacije (poligon unatraške)
Autor: učenica iz razreda - Negovetić V., 2025

Test koordinacije (poligon unatraške)

Za ovu metodu su potrebni štoperica, okvir švedskog sanduka, tapecirana baza i samoljepljiva traka. Prvo se označi početna oznaka za start, nakon 4 metra postavlja se tapecirana baza švedskog sanduka, a nakon 3 metara postavlja se najveći okvir tako da tlo dodiruje svojom najvećom stranicom (slika 2). Do ciljne ravnine ispitanik se kreće još 3 metra. Mjesto gdje je potrebno staviti sanduke označeno je samoljepljivom trakom. Ispitanik zauzima početni položaj ispred startne linije (ne smije stati na startnu liniju), zauzima četveronožni položaj (tako da dlanovima i stopalima dodiruje tlo, a koljena su savinuta i ne smiju tijekom kretanja dotaknuti tlo) te se kreće unatraške savladavajući prepreke do ciljne ravnine. Ispitanik kreće na znak ,,sad'' i tada se pokreće vrijeme na štoperici i mjeri se vrijeme (u sekundama) potrebno da ispitanik prijeđe stazu od startne do ciljne ravnine. Ispitanik treba krećući se unatraške savladati prvu prepreku penjanjem, a drugu prepreku provlačenjem. Mjerenje se ponavlja 3 puta, a bilježi se najbolji rezultat.

Drugi dio istraživanja proveden je u sportskoj dvorani gdje se provode treninzi plesa na svili. Trenerica plesa na svili pokazala je vježbe nakon čega su ih ispitanici ponovili. Jedna grupa ispitanika radila je vježbe na podu, a druga grupa ispitanika na svili. Svaka grupa ispitanika je radila jednu minutu vježbu, nakon toga su se zamijenili. Ona grupa koja je radila vježbe na podu, zamijenila se s onima koji rade vježbe na svili i obrnuto. Ispitanici su podijeljeni u grupe zbog toga što nije bio dovoljan broj svila da svi odjednom rade na svili.

Opis izvedenih vježbi na svili:

- ruke vezane u ručni ključ i preokretanje naopake u stoj
- ruke vezane u ručni ključ i preokretanje u naopake i noge se oslone na vezane ruke
- ručno vezani čvor, uspravno stajanje na nogama, podizanje noge prema licu, okomita ženska špaga.

Vježbe na podu:

- izdržaj na rukama, zvan plank
- podizanje nogu prema potpomognutom položaju ruka, u ležećem položaju
- u ležećem položaju noge se podignu da su u istoj ravnini kao glava, noge se izravnaju i nakon toga šire, ležeća muška špaga.

Prije i nakon treninga na svili provedene su ankete samoprocjene.

Anketa 2 – Samoprocjena prije treninga na svili

1. Kako bi ocijenili svoju sportsku formu?

a) Odlično. b) Vrlo dobro. c) Dobro. d) Slabo. e) Jako slabo.

2. Na ljestvici od 1 do 6 procijenite svoj osjećaj opuštenosti:

(1 – 0 %, 2 – 20 %, 3 – 40 %, 4 – 60 %, 5 – 80 %, 6 – 100 %)

3. Procijeni svoje samopouzdanje?

a) Odlično. b) Vrlo dobro. c) Dobro. d) Slabo. e) Jako slabo.

Anketa 3 – Samoprocjena poslije treninga na svili

4. Kako procjenjujete razinu opterećenja tijekom vježbanja plesa na svili?

a) Minimalno. b) Malo. c) Srednje. d) Jako. e) Vrlo jako.

5. Biste li nastavili s treniranjem plesa na svili?

Da. Ne.

6. Na ljestvici od 1 do 6 procijenite svoj osjećaj opuštenosti nakon treninga:

(1 – 0 %, 2 – 20 %, 3 – 40 %, 4 – 60 %, 5 – 80 %, 6 – 100 %)

7. Procijeni svoje samopouzdanje?

a) Odlično. b) Vrlo dobro. c) Dobro. d) Slabo. e) Jako slabo.

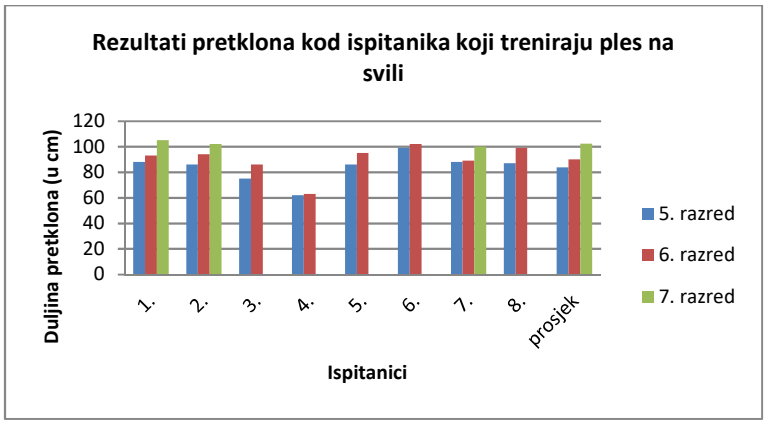
Osjećaj opuštenosti procjenjuje se na skali od 1 do 6, pri čemu 1 - označava potpunu neopuštenost (odnosno stupanj opuštenosti: 0 %), 2 - minimalna opuštenost (odnosno stupanj opuštenosti: 20 %), 3 – djelomična opuštenost (odnosno stupanj opuštenosti: 40 %), 4 - srednja opuštenost (odnosno stupanj opuštenosti: 60 %), 5 – vrlo opušteno (odnosno stupanj opuštenosti: 80 %), 6 – potpuna opuštenost (odnosno stupanj opuštenosti: 100 %). Zbog lakše i detaljnije obrade podataka, odgovorima iz ankete: a) Odlično. b) Vrlo dobro. c) Dobro. d) Slabo. e) Jako slabo., pridodane su brojčane vrijednosti: Odličan – 5, Vrlo dobar – 4, Dobar – 3, Slabo – 2, Jako slabo – 1.

Sva pitanja iz ankete analizirana su i grafički prikazana. Za ispitanike koji i dalje žele trenirati ples na svili bit će organizirani dodatni treninzi. Krvni tlak i broj otkucaja srca (puls) svim ispitanicima izmjeren je tlakomjerom prije i nakon vježbanja plesa na svili (mjerenja su ponovljena 3 puta u razmaku od 5 minuta, te je izračunata aritmetička sredina). Dobivene vrijednosti uspoređene su za svakog ispitanika (prije i nakon vježbanja plesa na svili), a grupni rezultat prikazan je kao aritmetička sredina.

REZULTATI

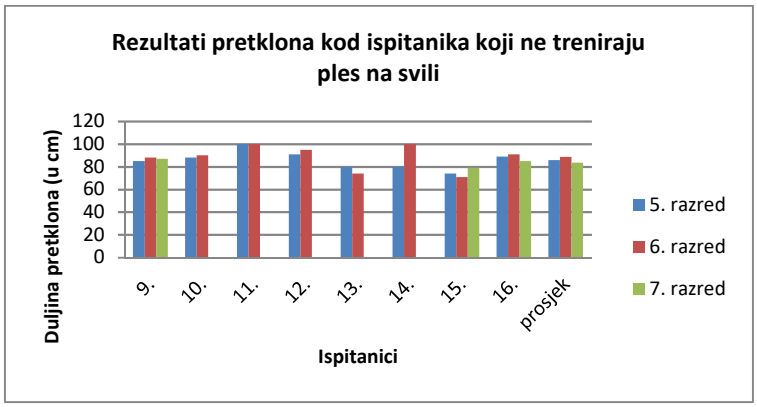
U prvom dijelu ispitan je dugoročni utjecaj treniranja plesa na svili.

U prosjeku se ispitanicima u šestom razredu (slika 3) poboljšala vrijednost izbačaja u pretklonu za 6 centimetara u odnosu na peti razred. Izuzetak je ispitanik 4. Kod sva 3 ispitanika koji pohađaju sedmi razred duljina postignutog izbačaja u pretklonu se povećala za 12 centimetara u odnosu peti razred.



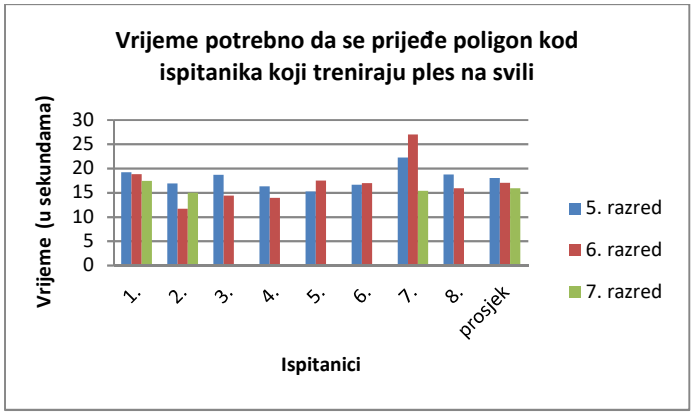
Slika 3 Rezultati pretklona kod ispitanika koji treniraju ples na svili

U prosjeku se ispitanicima koji ne treniraju ples na svili u šestom razredu poboljšala vrijednost izbačaja u pretklonu za 3 centimetara u odnosu na peti razred (slika 4). Od tri ispitanika sedmog razreda, samo se jednom ispitaniku povećao iznos pretklona (za 8 centimetara) dok je kod ostala 2 zabilježen pad u odnosu na šesti razred.



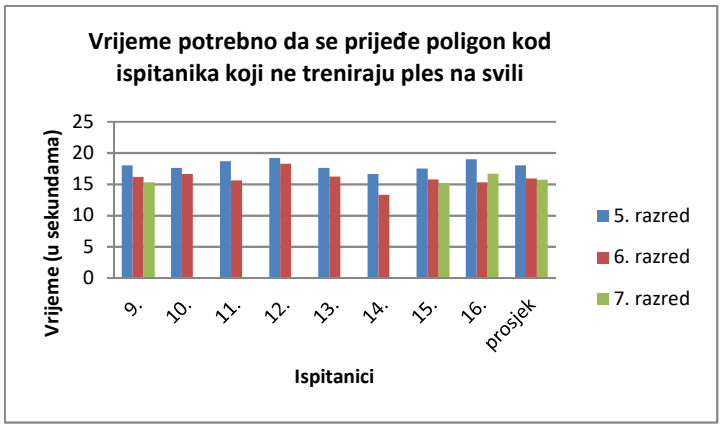
Slika 4 Rezultati pretklona kod ispitanika koji ne treniraju ples na svili

Ispitanici koji treniraju ples na svili, u 5. razredu u prosjeku poligon prelaze za 18 sekundi, u 6. razredu za 17 sekundi, a u 7. razredu za 16 sekundi. Nema kontinuiteta u postizanju rezultata. Najbolji rezultat u 5. razredu postiže ispitanik 5, koji uz ispitanike 6 i 7 postiže lošiji rezultat u 6. razredu (slika 5). U 6. razredu najbolji rezultat postiže ispitanik 2, koji u 7. razredu (jedini od 3 ispitanika) postiže lošiji rezultat. Daleko najlošiji rezultat ostvaruje ispitanik 7 u šestom razredu.



Slika 5 Vrijeme potrebno da se prijeđe poligon kod ispitanika koji treniraju ples na svili

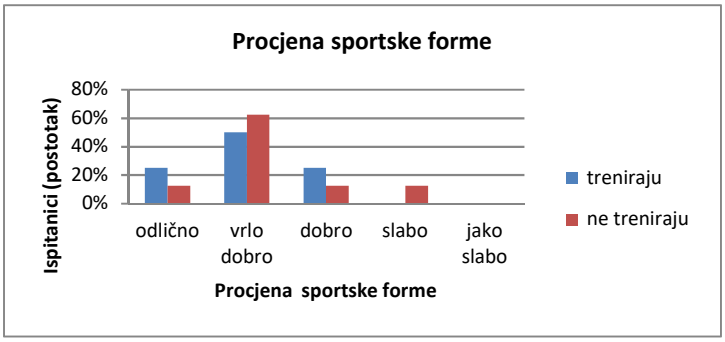
Iz slike 6 vidljivo je da ispitanici koji ne treniraju ples na svili u prosjeku postižu bolje rezultate u višim razredima. U 5. razredu to u prosjeku iznosi 18 sekundi, u 6. razredu 15,9 sekundi, a u 7. razredu 15,7 sekundi. Jedino ispitanik 16 u 7. razredu postiže lošiji rezultat u odnosu na 6. razred.



Slika 6 Vrijeme potrebno da se prijeđe poligon kod ispitanika koji ne treniraju ples na svili

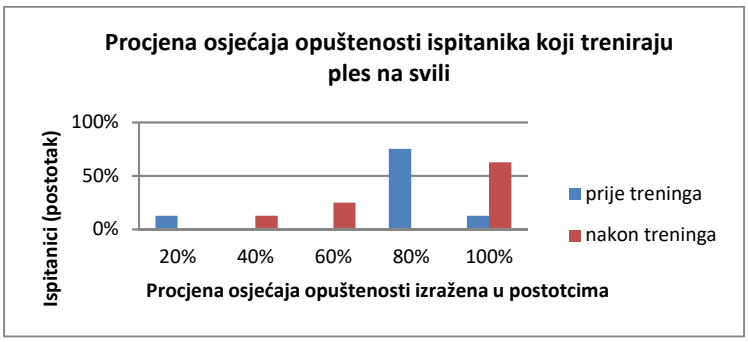
Kratkoročni utjecaj treniranja plesa na svili:

Ispitanici koji treniraju ples na svili procjenjuju da imaju bolju formu od ispitanika koji ne treniraju (slika 7). Aritmetička sredina ocjena sportske forme onih koji treniraju iznosila je 4.00, a onih koji ne treniraju 3.75. Samo ispitanik 16 koji ne trenira nikakav sport procjenjuje da je u slaboj sportskoj formi.



Slika 7 Procjena sportske forme

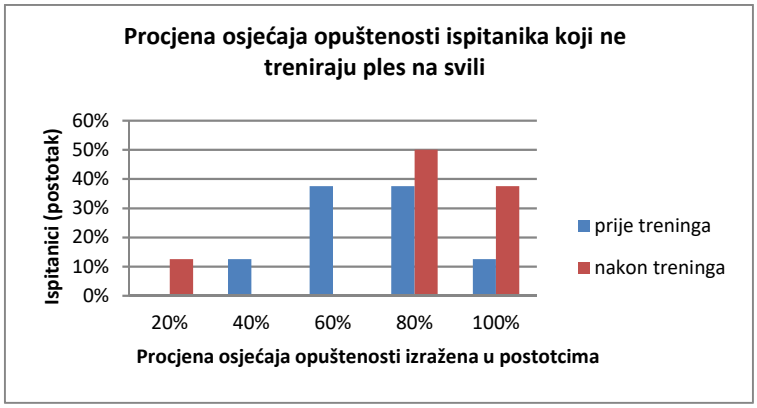
Iz slike 8 vidljivo je da prije treninga plesa na svili 75 % ispitanika koji treniraju ples na svili procjenjuje osjećaj opuštenosti 80 %. Nakon treninga čak njih pet procjenjuje osjećaj opuštenosti 100%. Aritmetička sredina ocjena prije je 75 %, a nakon treninga je 82,5 %. Četiri ispitanika (ispitanici 1, 4, 5, 8) procjenjuju da je trening na svili pozitivno utjecao na njihovu opuštenost, a ispitanik broj šest procjenjuje da nije bilo promjene tijekom treninga, a ostali su se osjećali manje opušteno.



Slika 8 Procjena osjećaja opuštenosti ispitanika koji treniraju ples na svili

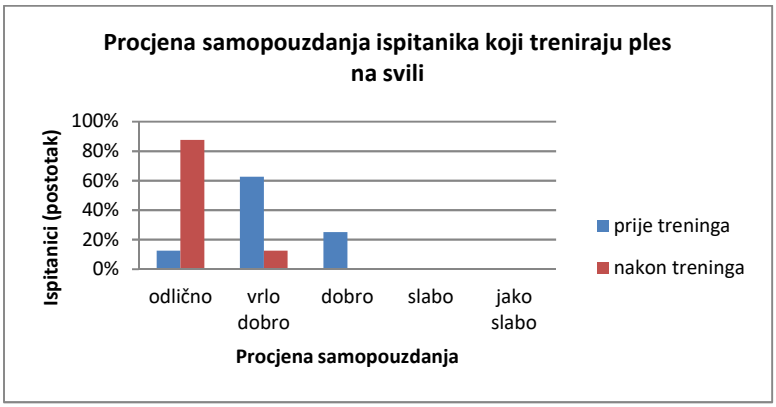
Prije treniranja plesa na svili većina ispitanika koji ne treniraju ples na svili procjenjuje osjećaj opuštenosti 60% i 80%, a nakon plesa na svili rezultati su 80 % ili 100 %. Četiri ispitanika (9, 11, 12, 15)

procjenjuje da im se opuštenost nakon treninga smanjila. Dva ispitanika (10, 13) procjenjuju da im je opuštenost ostala ista i da im nije utjecala na njihovu opuštenost.



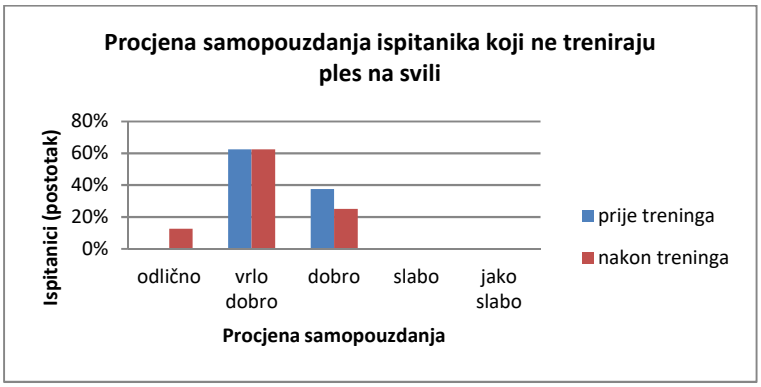
Slika 9 Procjena osjećaja opuštenosti ispitanika koji ne treniraju ples na svili

Prije treninga većina ispitanika koji treniraju ples na svili izjašnjava se da ima vrlo dobro samopouzdanje, a nakon treninga odlično (slika 10). Svi ispitanici osim ispitanice 7, koja je i prije imala odlično samopouzdanje, izjašnjavaju se da im je trening svile podigao samopouzdanje.



Slika 10 Procjena osjećaja samopouzdanja ispitanika koji treniraju ples na svili

Šest ispitanika koji ne treniraju ples na svili (slika 11) smatra da im trening plesa na svili nije utjecao na samopouzdanje, dok se samo dvije ispitanice izjašnjavaju da je pozitivno utjecao na njih.

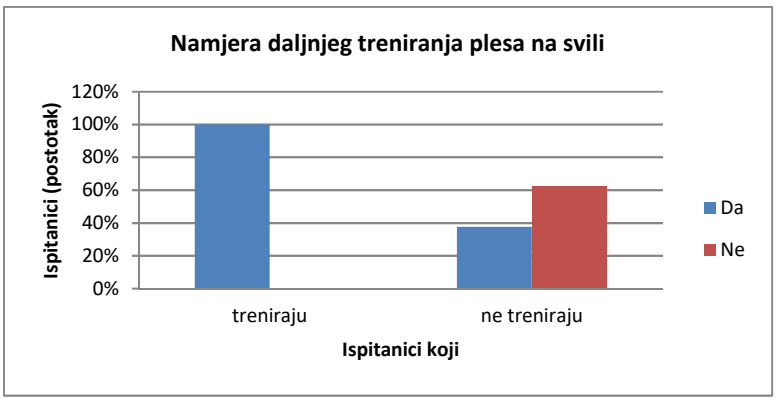


Slika 11 Procjena osjećaja samopouzdanja ispitanika koji ne treniraju ples na svili

Gotovo svi ispitanici koji treniraju ples na svili smatraju da im je opterećenje tijekom treninga plesa na svili bilo minimalno (slika 12), a oni koji ne treniraju smatraju da im je opterećenje bilo za dvije ocjene veće.

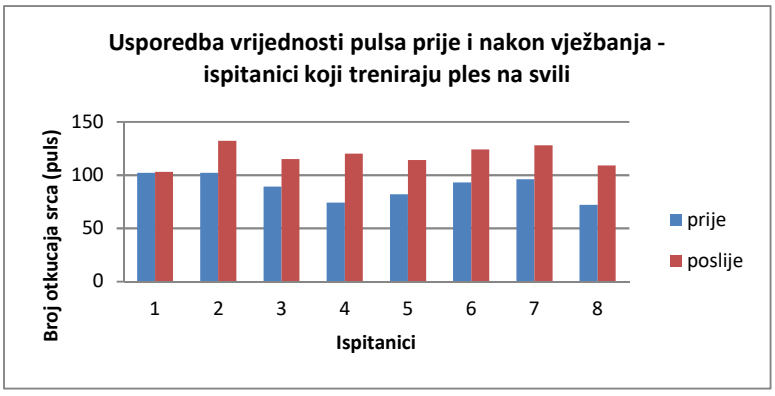
Slika 12 Procjena razine opterećenja tijekom treninga plesa na svili

Tri od osam ispitanika koji ne treniraju ples na svili želi nastaviti s treningom (slika 13).



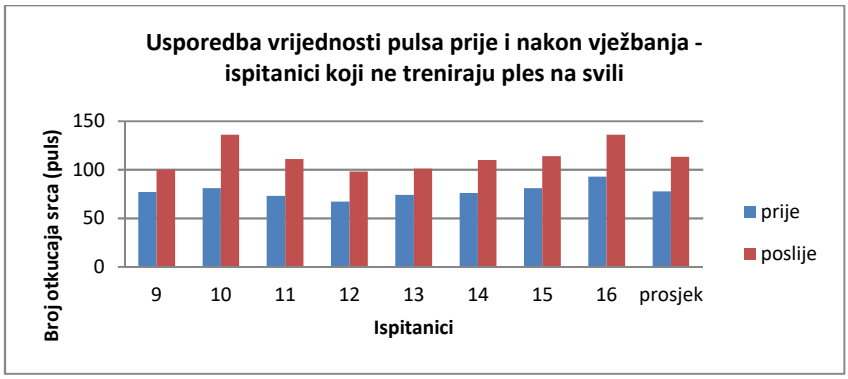
Slika 13 Namjera daljnjeg treniranja plesa na svili

Ispitanicima koji treniraju ples na svili, aritmetička sredina vrijednosti pulsa prije treninga plesa na svili iznosila 89 otkucaja u minuti, a nakon treninga 118 otkucaja u minuti. Jedino su kod ispitanika 1 zabilježena znatna odstupanja.



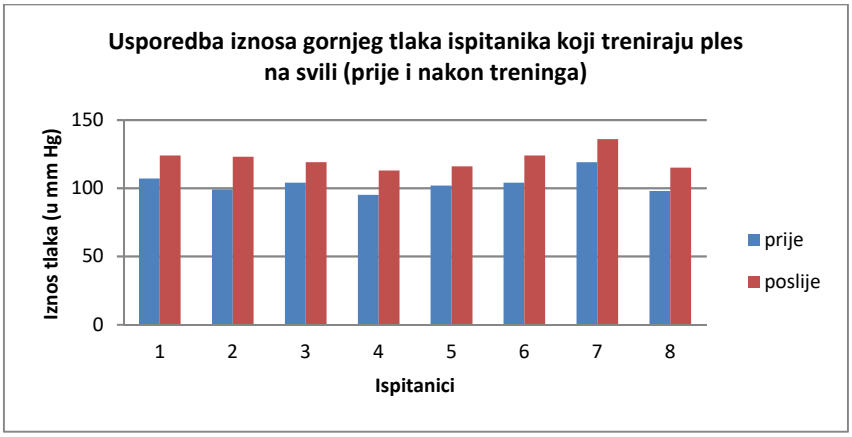
Slika 14 Usporedba vrijednosti pulsa prije i nakon vježbanja - ispitanici koji treniraju ples na svili

Ispitanicima koji ne treniraju ples na svili aritmetička sredina vrijednosti pulsa prije treninga plesa na svili iznosila 78 otkucaja u minuti, a nakon treninga 113 otkucaja u minuti (slika 15). Razlika je za 35 otkucaja više. Veliko odstupanje uočeno je kod ispitanika broja 10 i 16.



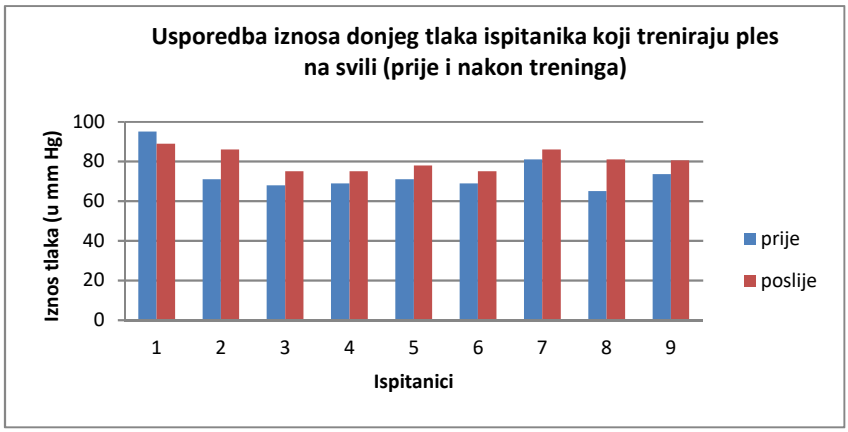
Slika 15 Usporedba vrijednosti pulsa prije i nakon vježbanja - ispitanici koji ne treniraju ples na svili

Aritmetičku sredina gornjeg tlaka ispitanika koji treniraju ples na svili je iznosila 104 mm Hg (slika 16), a nakon treninga 121 mm Hg.



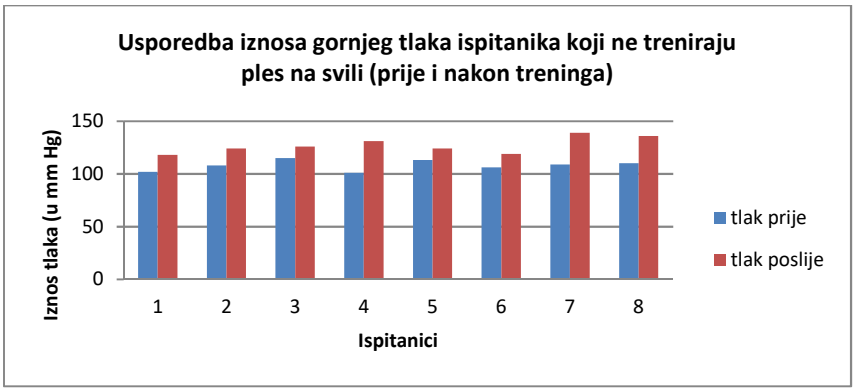
Slika 16 Usporedba iznosa gornjega tlaka ispitanika koji treniraju ples na svili (prije i nakon treninga)

Iz grafičkog prikaza na slici 17 vidljivo je da je aritmetička sredina donjeg tlaka ispitanika koji treniraju ples na svili iznosila 74 mm Hg prije treninga, a nakon treninga 81 mm Hg.



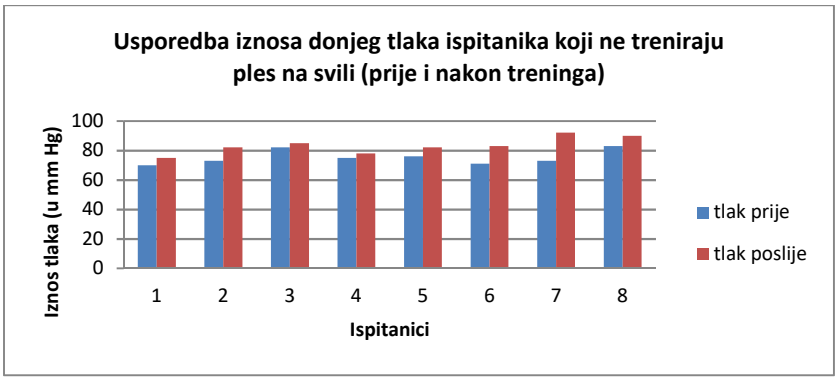
Slika 17 Usporedba iznosa donjeg tlaka ispitanika koji treniraju ples na svili (prije i nakon treninga)

Aritmetička sredina gornjeg tlaka (slika 18) ispitanika koji ne treniraju ples na svili iznosila je 108 mm Hg, a nakon treninga 127 mm Hg.



Slika 18 Usporedba iznosa gornjega tlaka ispitanika koji ne treniraju ples na svili (prije i nakon treninga)

Aritmetička sredina donjeg tlaka ispitanika koji ne treniraju ples na svili iznosila je 75 mm Hg (slika 19), a nakon treninga 83 mm Hg. Nisu uočena druga odstupanja.



Slika 19 Usporedba iznosa donjeg tlaka ispitanika koji ne treniraju ples na svili (prije i nakon treninga)

RASPRAVA

Ispitanici koji treniraju ples na svili postižu bolji rezultati izbačaja u pretklonu (izuzetak je ispitanik 4). U prosjeku se ispitanicima koji treniraju ples na svili u odnosu na 5. razred rezultat dosegnute vrijednosti u pretklonu povećava u 6. razredu za 6 centimetara, a za sva 3 ispitanika u 7. razredu za čak 12 centimetara. Ispitanicima koji ne treniraju ples na svili u prosjeku se ista vrijednost u šestom razredu poboljšala za 3 centimetara, što je dvostruko manje. Lošiji rezultati su posebno vidljivi u toj skupini kod ispitanika u 7. razredu gdje se samo jednom ispitaniku povećao iznos pretklona (za 8 centimetara) dok je kod ostala 2 zabilježen pad u odnosu na šesti razred. Ovaj rezultat u skladu je s našom hipotezom i dosadašnjim istraživanjima jer se treniranjem plesa na svili istovremeno aktivira i jača veći broj mišića nego u ostalim sportovima što može utjecati na bolju fleksibilnost (Dragićević Vukman, 2021). Treba uzeti u obzir mali uzorak ispitanika, njihovu motiviranost kao i genetske predispozicije koje mi ne možemo utvrditi, a koji utječu na postignute rezultate. U skupini učenika koji ne treniraju ples na svili ističemo da su lošije rezultate postigli ispitanici 10 (ispitanica je u 5. razredu trenirala odbojku, ali je prestala nakon pola godine), ispitanica 15 koja ne trenira nikakav sport, te ispitanica 16 koja je također u 5. razredu trenirala ples, ali je odustala nakon 4 mjeseca. Bolje rezultate (u odnosu na one koji ništa ne treniraju) postigli su ispitanici koji treniraju odbojku što je u skladu s dosadašnjim rezultatima (Nešić i sur. 2013).

Ispitanici koji treniraju ples na svili, u 5. razredu u prosjeku poligon prelaze za 18 sekundi, u 6. razredu 17 sekundi a u 7. razredu 16 sekundi. Uočeno je da nema kontinuiteta u postignutim rezultatima. Ispitanici koji ne treniraju ples na svili u prosjeku postižu nešto bolje rezultate u testu koordinacije. U

5. razredu to u prosjeku iznosi 18 sekundi, u 6. razredu 15,9 sekundi, a u 7. razredu 15,7 sekundi. Najbolji rezultat u testu koordinacije (poligonu) zabilježen je kod ispitanika 14, koji 2 godine trenira odbojku. Dobiveni rezultati nisu u skladu s našom hipotezom, a mogu se djelomično objasniti slabom motiviranošću ispitanika koji su nam kasnije potvrdili da im je taj test bio dosadan. U prilog ovom rezultatu ide i činjenica da se na treninzima odbojke (koju trenira većina naših ispitanika koji ne treniraju ples na svili) trening i igra bazira na brzini pokreta što može pozitivno utjecati na rezultate testa koordinacije (poligon). Dobiveni rezultati mogu se usporediti s istraživanjem koje su proveli Nešić i sur. (2013). Ti su autori ispitivali utjecaj treninga na motoričke sposobnosti (među njima i koordinacija i fleksibilnost) kod odbojkašica uzrasta 13 - 14 godina. Dobiveni rezultati nakon zadnjeg testiranja pokazuju pozitivan pomak u svim testovima. Do sličnih rezultata došla je i Kukec (2023), koja je istraživala povezanost dvomjesečnog treninga odbojke i razvoja motoričkih sposobnosti kod djece u dobi od 7 do 10 godina. Ispitanici su poligon prosječno prvi put prešli za 25,1 sekundi, a nakon dvomjesečnog treninga za 21,2 sekunde. Za utvrđivanje kratkoročnog učinka plesa na svili analizirani su i uspoređeni rezultati ankete i rezultati mjerenja broja otkucaja i krvnog tlaka. Ispitanici koji treniraju ples na svili procjenjuju da imaju bolju formu od ispitanika koji ne treniraju ples na svili. Aritmetička sredina ocjena sportske forme onih koji treniraju iznosila je 4,00, a onih koji ne treniraju 3,75. Većini njih je trening plesa na svili predstavljao minimalan napor jer su radili već poznate i uvježbane pokrete za razliku od ispitanika koji ne treniraju ples na svili. U toj skupini ples na svili ispitanicima je uglavnom predstavljao srednji napor (prvenstveno onima koji se ne bave nekim sportom). U prilog tome ide i izmjereni broj otkucaja srca (puls). Aritmetička sredina broja otkucaja srca u minuti ispitanika koji treniraju ples na svili prije vježbanja iznosila je 89, a nakon vježbanja 118, što čini razliku od 29 otkucaja u minuti. Ista vrijednost za ispitanike koji ne treniraju ples na svili prije treninga iznosila 78 otkucaja u minuti, a nakon 113. U prosjeku ta razlika u ovom slučaju iznosi 35 otkucaja i može se tumačiti kao znak većeg napora (što su potvrdili u anketi) na koji naše tijelo reagira povećanjem broja otkucaja srca jer je potrebno više kisika i hranjivih tvari da se oslobodi više energije. Promjene u broju otkucaja srca (pulsa) usklađene su s promjenama u krvnom tlaku i nisu zabilježena značajna odstupanja kod obje skupine. Prema Kujundžić (2022), aktivne osobe imaju niži broj otkucaja srca jer njihov srčani mišić lakše održava stabilnost otkucaja. Skupina koja trenira ples na svili imala je prosječno, u fazi mirovanja 11 otkucaja srca više u odnosu na drugu skupinu, a nakon treninga plesa na svili 5 otkucaja više. Ovaj podatak nije u skladu s njihovom procjenom da su u boljoj sportskoj formi. Opet se ovdje ističe lošiji rezultat ispitanika koji ne treniraju, dok oni koji treniraju odbojku imaju manji broj otkucaja srca što je znak bolje forme. U prilog tome ide i činjenica da oni imaju češće treninge (3 puta tjedno po 1,30 sati, jedna ispitanica 3 puta po 2 sata), dok oni koji treniraju ples na svili treniraju 2 puta tjedno po 1 sat. Najmanji broj otkucaja imala je ispitanica 5 koja trenira oboje.

Trening plesa na svili općenito je pozitivnije djelovao na ispitanike koji treniraju ples na svili, što je u skladu s našim očekivanjima jer nam aktivnosti koje nam se sviđaju, potiču lučenje adrenalina (ubrzava rad srca) i više hormona sreće koji pojačavaju osjećaj zadovoljstva, čime pozitivno djeluju na naše zdravlje. Njima je trening plesa na svili pojačao osjećaj opuštenosti i samopouzdanja jer su uspješno i elegantno izvodili pokrete na svili na opće oduševljenje svih prisutnih. Veći broj otkucaja srca prije provedenog vježbanja plesa na svili može se povezati i s većim lučenjem adrenalina.

Ples na svili djelovao je pozitivno i na neke ispitanike koji ga inače ne treniraju. Dva ispitanika procjenjuju da je trening na svili povećao njihovu opuštenost dok druga dva procjenjuju da im je opuštenost ostala ista te da im ples na svili nije utjecao na njihovu opuštenost. Također, dva ispitanika

smatraju da je pozitivno djelovao na njihovo samopouzdanje, a njih tri želi nastaviti s treningom plesa na svili. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem trebaju se uzeti sa rezervom zbog malog broja ispitanika, kao i činjenice da na rezultate jako utječe raspoloženje i motiviranost ispitanika. Bilo bi zanimljivo nastaviti istraživanje i pratiti razvoj fleksibilnosti i koordinacije ispitanika do kraja osnovne ili srednje škole te ujednačiti trajanje svih treninga.

ZAKLJUČCI

Ovim istraživanjem utvrđeno je da:

- ispitanici koji treniraju ples na svili postižu najbolje rezultate u testu fleksibilnosti, a fleksibilnost im se povećava s vremenom treniranja;
- treniranje plesa na svili pozitivno utječe na osjećaj opuštenosti i samopouzdanje ispitanika koji treniraju ples na svili;
- ispitanici koji treniraju sportove koje se temelje na brzini i eksplozivnosti (odbojka, košarka) imaju nešto bolje rezultate u testovima koordinacije.

ZAHVALA

Hvala svima, obitelji, prijateljima i učiteljima koji su nam bili potpora pri provedbi ovog istraživačkog rada. Posebno hvala trenerici plesa na svili, Veroniki Vlašić bez koje ovaj rad ne bi postojao. Ona nam je prenijela ljubav prema ovom divnom sportu i pomogla nam u realizaciji ovog projekta. Demonstrirala je vježbe, ustupila nam svile za ples i vodila praktični dio plesa na svili. Hvala i Daliboru Radoviću, učitelju Tjelesne i zdravstvene kulture, koji nam je ustupio rezultate testova pretklona i poligona naših ispitanika kada su bili u 5. razredu i koji nam je pomogao u provedbi istih testova tijekom ovog istraživanja. Hvala i našoj prijateljici iz razreda, Vanesi Negovetić, koja je ilustrirala slike.

LITERATURA

Dragićević Vukman A. 2021. Ples na svili - Elementi i koreografija, priručnik o vazdušnoj svili. Čigoja štampa, Beograd.

Kujundžić K. 2022. Otkucaji srca. Normalne varijacije i odstupanja. https://www.vasezdravlje.com/otkucajisrcanormalnevarijacije-i-odstupanja, pristupljeno 11.9.2024.

Kukec E. 2023. Povezanost dvomjesečnog treninga odbojke i razvoja motoričkih sposobnosti kod djece mlađe životne dobi. Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo, Osijek.

Milanović D. 2013. Teorija treninga, kineziologija sporta. Kineziološki fakultet Sveučilišta, Zagreb.

Nešić G., Ilić D., Majstorović N., Grbić V., Osmankač N. 2013. Uticaj treninga na opšte i specifične motoričke sposobnosti odbojkašica uzrasta 13-14 godina. Sportlogia 9(2): 119–127.

Prskalo I. 2004. Osnove kineziologije, udžbenik za studente učiteljskih škola. Visoka učiteljska škola, Petrinja.

Utjecaj broja gnijezda i ponašanje vrana na suživot s ljudima

Mia Sesar, 8. razred

Osnovna škola Mladost, Osijek
Mentor: *Jasna Rebrina*

SAŽETAK
Vrane gačci (*Corvus frugilegus* L.) sve češće nastanjuju urbana područja, gdje broj gnijezda raste zbog dostupnosti hrane i mjesta za gniježđenje. Ptice se prilagođavaju urbanom ekosustavu fiziološki (promjene hormona stresa) i ponašanjem (promjene u ponašanju hranjenja, produljenja sezone gniježđenja). Veća gustoća naseljenosti povezana je s većom količinom hrane, a vjerojatno i smanjenjem predatorskog pritiska. Ponašanje vrana uključuje glasno oglašavanje koje stvara buku i izbacivanje izmeta postaje sve izraženije, što može izazvati nelagodu i smanjiti kvalitetu života ljudi. Buka koju vrane proizvode u gustim urbanim sredinama može ometati svakodnevni život, dok izmet koji ostavljaju na javnim površinama uzrokuje nelagodu i potencijalnu štetu. U istraživačkom radu želim utvrditi kako broj gnijezda vrana i njihovo ponašanje utječu na interakciju između ljudi i ptica. Obrađujući anketu saznala sam da ih većina ljudi negativno doživljava u svojoj svakodnevnici. Uspoređujući količinu izmeta i jačinu buke na lokalitetima Sjenjak, Autoslavonija i Mačkamame (A, B, C kolonije), uočeno je da je broj gnijezda različit. Možemo zaključiti da stanovnici pokazuju prilagodbe na nove stanare našeg grada i traže rješenja za kvalitetniji suživot.

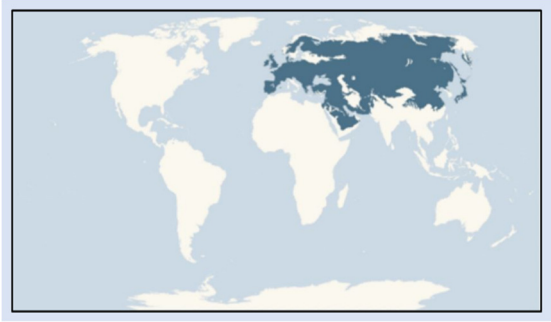
Ključne riječi: *vrana gačac (Corvus frugilegus L.); broj gnijezda; ponašanje vrana; buka; izbacivanje izmeta; suživot s ljudima; urbanizacija*

UVOD

Vrana gačac, *Corvus frugilegus*, Linnaeus, 1758 (red: vrapčarke (Passeriformes), porodica: Vrane (Corvidae), rod: gavrani (*Corvus*); IUCN, 2026) jedna su od brojnijih vrsta ptica u gradu Osijeku te ih s pravom možemo nazvati gradske ptice (Hrvatsko društvo za zaštitu ptica i prirode, 2017). Postale su svakodnevni posjetitelji našeg školskog dvorišta, naselja, okolice (slika 1).

Slika 1 Kolonija vrana gačaca u krošnjama Sjenjaka
Autor: Sesar M., 2025.

Zbog svoje prehrambene prilagodljivosti i ekološke uloge zauzimaju važno mjesto u ekosustavu. Kao mesožderke pomažu u regulaciji organskog materijala i čišćenju okoliša čime smanjuju rizik od širenja zaraznih bolesti te ih se smatra „ čistačima grada “. Vrane se hrane i kukcima koji mogu biti štetni za poljoprivredne usjeve čime pomažu ratarima u održavanju ratarskih kultura. Vrlo su inteligentne i prilagodljive te u nedostatku hrane na otvorenim poljima približavaju se naseljima, gdje nadomještaju hranu (Jurčević, 2002). Neprekidno graktanje ispunjava našu okolicu a crni oblak vrana zamračuje nebo u blizini njihovih gnijezda, širenje izmeta estetski uneređuje okoliš što ljuti mnoge stanovnike. Ovi razlozi naveli su me da nešto više saznam o vranama, te kako stanovnici doživljavaju svakodnevnicu s ovim pticama.



Slika 2 Područje rasprostranjenosti vrane gačac
Izvor: IUCN, 2026

Vrana gačac široko je rasprostranjena diljem Europe i zapadne Azije (slika 2). Stepske regije i ravnice izvrsna su staništa za gačce jer im bogato tlo obiluje kukcima, a traganje za hranom je lakše kada je tlo mekano. Gačci nastanjuju područja koja graniče s gradovima, te same gradove sve dok im je dostupna dovoljna količina hrane i stabla kao zaklon (slike 3 i 4). S obzirom da naseljavaju veći dio Europe i Azije, gačci naseljavaju područja s velikim rasponom visine, od razine mora oko 4 000 m nadmorske visine.

Slika 3 Vrana gačac (*Corvus frugilegus* L.)

Slika 4 Vrana gačac u gnijezdu

Gačac je vrana metalnog sjaja perja. Kljun se sužava u oštar vrh oko kojeg je gola koža. Na tlu se opažaju opernaćene noge koje ostavljaju dojam „gaća“. Bućni su, zov im je prodorno graktanje. Težine su 300-320 gr, dugi su 44-46 cm, raspon krila im je 81-99 cm (Rokk Corvus Frugilegus Species i BirdLife DataZone). Razmnožavanje i polaganje jaja započinje obično krajem veljače, ali može početi krajem travnja i svibnja, ovisno o temperaturi. Gnijezda grade na visokim listopadnim stablima (javor, topola, platana), a rjeđe u grmlju.

Gačci grade gnijezda od štapića, grana s listovima i travom (slika 4). Gačac polaže dva do sedam plavo-zelenih jaja sa sivim pjegama. Inkubacija traje 16–18 dana i uglavnom ženke sjede na jajima, a mužjak po potrebi. Nakon desetak dana mladi postaju samostalniji i ženka se pridružuje mužjaku u skupljanju hrane. Sa 32–33 dana starosti, mladi gačci napuštaju gnijezdo, ali nastanjuju obližnja stabla u blizini roditelja (Baughman, 2003; Bird i Emery, 2008).

Cilj je istraživanja utvrditi utječe li broj gnijezda i njihovo ponašanje, stvaranje buke, izbacivanje određene količine izmeta na suživot s ljudima, uspoređujući tri kolonije u Osijeku: naselje Sjenjak, dio Vinkovačke ulice i dio Vukovarske ulice.

Pretpostavka je kako će najmanji broj gnijezda biti u koloniji A, u naselju Sjenjak, zbog blizine ljudi, što bi moglo utjecati na njihovu smanjenu dnevnu aktivnost, graktanje čime stvaraju buku, izbacivanje izmeta te da će to utjecati i na pozitivan ili neutralan stav mještana na suživot s vranama. Negativniji stav očekuje se na području kolonije B (Vinkovačka cesta; blizina dvorca Mačkamama). Očekuje se da će veći broj gnijezda kao i udaljenost stambenih objekata u odnosu na koloniju A, a manji u odnosu na

koloniju C, na području kolonije B uzrokovati stvaranje veće buke, veće onečišćenje količinom izmeta i rasipanjem hrane. Na dijelu Vukovarske ulice (blizina Autoslavonije), odnosno na području kolonije C , očekuje se najveći broj gnijezda u odnosu na kolonije A i B. Pretpostavlja se da stanovnici ovog dijela imaju manje problema s navedenim ponašanjem vrana, jer se one kreću više prema otvorenim poljima te da vrane nemaju veći utjecaj na njihov svakodnevni život, što bi moglo dovesti do pozitivnog stava dijela stanovništva na ovom području.

METODE RADA

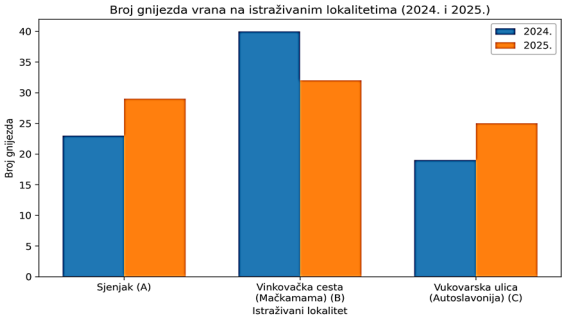
Kvantitativno je istraživanje provedeno od ožujka 2024. do veljače 2025., brojanjem gnijezda na tri lokacije, odnosno na području triju kolonija, u gradu Osijeku: kolonija A (Sjenjak), kolonija B (dio Vinkovačke ceste oko dvorca Mačkamame) i kolonija C (dio Vukovarske ulice oko Autoslavonije). Gnijezda su brojana jednom mjesečno, radi kontrole. Rezultati brojanja gnijezda prikazani su tabelarno i grafički.

Na terenu je praćeno ponašanje vrana gačaca u blizini njihova gnijezda, stvaranje buke graktanjem te količina izbačenog izmeta na mjestima njihova okupljanja. Za procjenu buke je korištena sljedeća skala: 1 znači visoka buka, 0 umjerena buka, -1 znači tišina, a za procjenu količine izmeta sljedeća skala: 1 znači puno izmeta, 0 umjereno izmeta,-1 znači nema izmeta. Opažanja su vršena jednom tjedno, podaci su prikazani korelacijskom analizom kroz deskriptivne skale (1, 0, -1). Graktanje vrana snimano je diktafonom.

Metodom razgovora s predstavnikom udruge *Zeleni* (Osijek) te s predstavnicom komunalnog poduzeće *Unikom d.o.o.* proveden je intervju s ciljem prikupljanja informacija o mogućim problemima s vranama na području grada te kako ih rješavati. Anketirani su i građani (ukupno 60 ispitanika) koji žive u naseljima blizu kolonija gniježđenja, s ciljem utvrđivanja kako doživljavaju utjecaj vrana na njihovu svakodnevnicu. Rezultati ankete (prilog 1) prikazani su grafički, dijagramom.

REZULTATI

Iz dobivenih rezultata možemo primijetiti da se broj gnijezda mijenja uspoređujući 2024. i 2025. godinu na promatranim lokalitetima (slika 5). Na lokaciji A, Sjenjak, broj gnijezda je 2024. godine bio 23 te se povećao na 29 u 2025. godini. Na lokaciji B, Vinkovačka cesta (dio Mačkamame), broj gnijezda se smanjio s 40 na 32, dok se u Vukovarskoj ulici (oko Autoslavonije) primjećuje porast broja gnijezda sa 19 na 25 (slika 5).



Slika 5 Broj gnijezda vrana na istraživanim lokalitetima

Metodom korelacijske analize stavljeni su u odnos jačina buke i količina izmeta koju vrane gačci proizvode na mjestima gniježđenja i okupljanja: 1 znači savršena pozitivna korelacija (kad jedno raste,

drugo raste); -1 znači savršena negativna korelacija (kad jedno raste drugo pada); 0 znači da nema korelacije (nema veze između promatranih varijabli).

Rezultati buke i izmeta

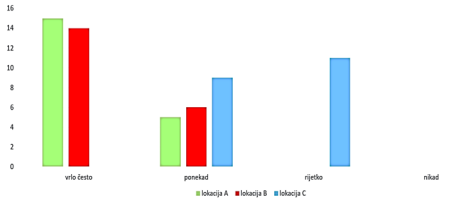
Na lokalitetu A (Sjenjak) opaženo je puno izmeta te je i buka bila visoka (oznaka 1 na korištenoj skali), što znači savršena pozitivna korelacija (kad jedno raste, drugo raste). Na lokalitetu B (Mačkamama) opaženo je umjereno izmeta, a buka je bila najviša (visoka), što bi ocijenili korelacijom -1 (negativna korelacija). Na lokalitetu C (Autoslavonija) opaženo je puno izmeta, ali nema buke, što bi ocijenili korelacijom 0.

Intervju s predstavnicima udruge *Zeleni* i *Unikom d.o.o.* i rezultati ankete

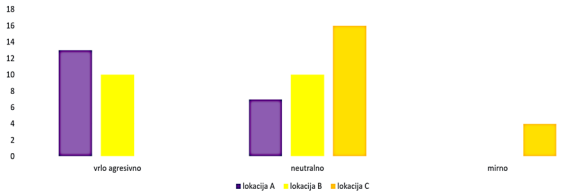
U razgovoru s predstavnikom udruge *Zeleni*, Osijek, saznala sam da oni nemaju većih pritužbi stanovnika o ponašanju vrana. Osim mail-a jedne majke koja se žali na agresivno ponašanje vrane prema djetetu.

U razgovoru s predstavnikom *Unikom d.o.o.* saznala sam da se građani često žale na buku, a naročito na izmet koji im uništava imovinu. Komunalna služba je morala intervenirati u dvorištu dječjeg vrtića *Pčelica* na Vinkovačkoj ulici. Posjekli su grane sa gnijezdima jer su vrane izbacivale izmet na djecu, a takvih je primjera u gradu bilo puno.

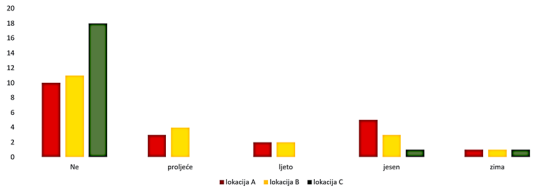
Sastavljanjem ankete (prilog 1) prikupila sam mišljenja i iskustva slučajnih ispitanika o vranama Gačcima na odabranim A, B, C lokacijama. Rezultati ankete prikazani su slikama 6 – 16 u nastavku.



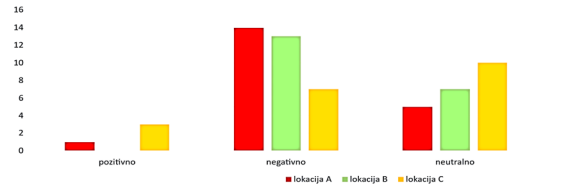
Slika 6 Odgovori ispitanika na pitanje: Koliko često primjećujete prisutnost vrana u vašem susjedstvu?



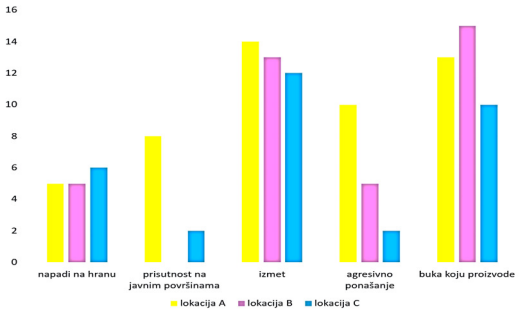
Slika 7 Odgovori ispitanika na pitanje: Kako biste opisali ponašanje vrana u vašem okruženju?



Slika 8 Odgovori ispitanika na pitanje: Jeste li primijetili da broj vrana varira tijekom godine?

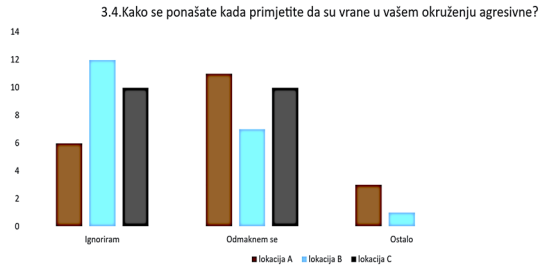


Slika 9 Odgovori ispitanika na pitanje: Kakvo je vaše mišljenje o utjecaju vrana na svakodnevni život?

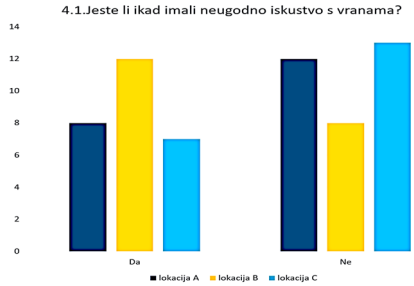


Slika 10 Odgovori ispitanika na pitanje: Koje vrste ponašanja smatrate problematičnima u vašem okruženju?

Slika 11 Odgovori ispitanika na pitanje: Jeste li svjesni da ponašanje vrana može biti uzrokovano različitim utjecajima?



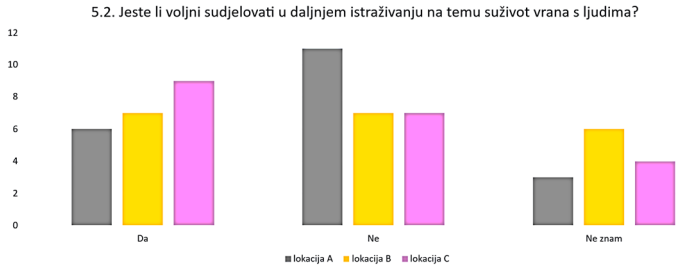
Slika 12 Odgovori ispitanika na pitanje: Kako se ponašate kada primijetite da su vrane u vašem okruženju agresivne?



Slika 13 Odgovori ispitanika na pitanje: Jeste li ikad imali neugodno iskustvo s vranama?

Slika 14 Odgovori ispitanika na pitanje: Smatrate li da bi ljudi trebali poduzeti određene mjere kako bi regulirali brojnost gnijezda vrana?

Slika 15 Odgovori ispitanika na pitanje: Koliko mislite da bi smanjenje vrana poboljšalo suživot s ljudima?



Slika 16 Odgovori ispitanika na pitanje: Jeste li voljni sudjelovati u daljnjem istraživanju na temu suživot vrana s ljudima?

RASPRAVA

Rezultati istraživanja broja gnijezda na našim lokalitetima grada Osijeka (kolonija A,B,C) poklapaju s pretpostavkom istog. Broj gnijezda je u urbanim naseljima u porastu zbog dostupnosti hrane i lakšem bijegu od predatora, što možemo povezati s istraživanjem (Mikuška i sur., 2015). Gačci se prije odlaska na mjesto spavanja u zimskom periodu godine okupljaju u kolonijama a također i prilikom gniježđenja u proljeće, kada stvaraju buku i onečišćuju okoliš izmetom što predstavlja problem u svim urbanim sredinama (Ward i Zahavi, 1973). Moja je pretpostavka u istraživačkom radu bila djelomično točna. Najmanji broj gnijezda bio je u koloniji C, gdje je veća udaljenost ljudi i objekta od mjesta gniježđenja, ljudima tamo ne smetaju buka i izmet, jer se vrane više kreću prema otvorenim poljima gdje pronalaze hranu. Istraživanje pokazuje da je najmanji broj gnijezda bio u naselju Sjenjak, što se podudara s mojom pretpostavkom. Blizina ljudi utječe na broj gnijezda iako vrane izvor hrane pronalaze u ovom urbanom naselju. Najveći broj gnijezda bio je u koloniji Mačkamame, što se ne podudara s mojom pretpostavkom. Blizina gnijezda je veća u odnosu na naselje Sjenjak jer se radi o naselju s obiteljskim kućama, a dostupnost hrane je također dovoljna da bi se vrane zadržavale u ovom naselju. Manji broj gnijezda vrana možemo povezati s manjom količinom buke i manje onečišćenja izmetom, što su u anketi potvrdili ispitanici navedene kolonije kod Autoslavonije. Vrana gačac svojom brojnošću u urbanim sredinama ima značajnu ekološku važnost. U suživotu s ljudima važna je obostrana prilagodba koja pridonosi održavanju vrste (Bird Life International, 2024). Smatram da je stanovnike potrebno

osvijestiti o korisnosti ove vrste ptica te poduzeti mjere koje bi utjecale na kvalitetniji suživot čovjeka i vrane gačac.

ZAKLJUČCI

Na temelju istraživanja, možemo zaključiti da veći broj gnijezda vrana u blizini naselja u našem slučaju naselje Sjenjak ima negativan utjecaj na suživot s ljudima, jer se povezuje s većom bukom i količinom izmeta. To pridonosi stresu, onečišćenju okoliša koje može uzrokovati štetu na javnim prostorima, što stvara probleme za ljude u urbanim sredinama. U mjestima gdje su vrane gačci prisutne u većem broju, a na raspolaganju je blizina otvorenih polja i mogućnost izvora hrane na otvorenom, ispitanici nemaju odbojnost prema vranama. Na tim lokalitetima (npr. lokalitet C) ih ne primjećuju zbog pojačane buke ili izbacivanja veće količine izmeta. Ispitanici su u velikoj mjeri pokazali nelagodu prema prisutnosti vrana u susjedstvu. To naglašava potrebu za uravnoteženim pristupima održavanja populacije vrana u urbanim područjima, što uključuje nove izazove i potencijalna rješenja.

Predlažemo potencijalna rješenja kroz kontrolirane mjere:

- premještanje gnijezda na manje naseljena područja, može pomoći smanjenju buke i količine izmeta;
- sadnja drveća s nižim krošnjama u urbanim naseljima mogla bi spriječiti gniježđenja vrana gačca , čime bi se izbjeglo stvaranje buke , rasipanje izmeta te onemogućilo širenje moguće zaraze;
- zabrana uništavanja gnijezda u vrijeme gniježđenja i odstrel vrana.

Prema izvoru informacija Udruge Biom (2024), i Hrvatskog društva za zaštitu ptica i prirode (2017) iz Osijeka, brojnost vrane gačca je u opadanju. Godine 2024., proglašena je pticom godine.

LITERATURA

BIOM. 2024. Gačac – ptica godine 2024, https://www.biom.hr/2023/11/22/gacac-ptica-godine-2024/ , pristupljeno: 4.2.2025.

Bird C. D., Emery N. J. 2008. Extraordinary large brains in tool-using New Caledonian crows (*Corvus moneduloides*). Neuroscience Letters 433(3): 241–245.

Hrvatsko društvo za zaštitu ptica i prirode. 2017. Projekt prebrojavanja kolonija gačaca u Hrvatskoj 2017. godine, neobjavljeni podatci.

Jurčević I. 2002. Ekologija i dinamika populacija vrsta roda *Corvus* (Aves) u istočnoj Hrvatskoj. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.

Mikuška A., Felja A., Bjedov D., Kajan K., Blažević M., Zovko A., Benić P. 2015. Rasprostranjenost i trend gnijezdeće populacije vrane gačac (*Corvus frugilegus* L., 1758.) na području Osijeka. Larus 50: 37–46.

IUCN. 2026. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2026-1. IUCN, https://www.iucnredlist.org, pristupljeno 4.2.2025.

Bird Life International. 2024. Rook Corvus Frugilegus Species, https://datazone.birdlife.org/species/factsheet/rook-corvus-frugilegus, pristupljeno 20.2.2025.

PRILOZI

Prilog 1 Sadržaj ankete za građane koji žive u naseljima blizu kolonija gniježđenja gačaca, s ciljem utvrđivanja kako doživljavaju utjecaj vrana na njihovu svakodnevnicu

Istraživački rad: UTJEČE LI BROJ GNIJEZDA I PONAŠANJE VRANA NA SUŽIVOT S LJUDIMA

DEMOGRAFSKA PITANJA (kako bi se osigurao uzorak koji prezentira različite skupine):

1. Koliko godina imate? (Otvoreno/raspon godina) _____
2. Koji je vaš spol?
   a) muški
   b) ženski
3. Živite li u:
   a) urbanom ili
   b) ruralnom području?
4. Koliko godina živite na trenutnoj lokaciji? (Otvoreno) _____

PITANJA O PERCEPCIJI VRANA

5. Koliko često primjećujete prisutnost vrana u vašem susjedstvu?

a) Vrlo često
b) Povremeno
c) Rijetko
d) Nikada

6. Kako biste opisali ponašanje vrana koje viđate u vašem okruženju?
a) Vrlo agresivno
b) Neutralno
c) Mirno

7. Jeste li primijetili da brojnost vrana u vašem okruženju varira tijekom godine?
a) Da
b) Ne

8. Ako da, kada najčešće viđate veći broj vrana?
a) Ljeto
b) Jesen
c) Zima
d) Proljeće

UTJECAJ NA SUŽIVOT

9. Koje vrste ponašanja vrana smatrate problematičnima u vašem okruženju?
a) Napadi na hranu
b) Prisutnost na javnim površinama
c) Izmet
c) Agresivno ponašanje
d) Buka koju proizvode

10. Jeste li svjesni da ponašanje vrana može biti uzrokovano različitim utjecajima kao na primjer nedostatak hrane na prirodnim staništima?
a) Da
b) Ne

11. Kako se ponašate kada primijetite da su vrane u vašem okruženju agresivne?
a) Ignoriram
b) Odmaknem se
c) Ostali odgovori _____

ISKUSTVA I MIŠLJENJA

12. Jeste li ikada imali neugodno iskustvo s vranama ?
a) Da
b) Ne
Ako da, molimo da podijelite iskustva
_____

13. Smatrate li da bi ljudi trebali poduzeti određene mjere kako bi regulirali brojnost gnijezda vrana?
a) Da
b) Ne
c) Ne znam
Ako da, koje mjere smatrate korisnim
_____

ZAKLJUČNA PITANJA

14. Koliko mislite da bi smanjenje broja vrana poboljšalo suživot s ljudima?
a) Jako poboljšalo
b) Pogoršalo
c) Nema promjena

15. Jeste li voljni sudjelovati u daljnjem istraživanju na temu suživot vrana s ljudima?
a) Da
b) Ne
c) Ne znam

Istina ili mit: kućni pripravci za čišćenje i UV zaštitu

Sara Polašek, 3. razred

Prirodoslovna škola Vladimira Preloga, Zagreb
Mentor: *Gorica Grozdanić*

SAŽETAK
Kako bi se unaprijedila kvaliteta istraživanja i smanjio *znanstveni otpad* u medicini i drugim granama znanosti, potrebno je osigurati da se samo provjereni i pouzdani rezultati i spoznaje koriste u zdravstvu, industriji i svakodnevnom životu. Nužno je osmisliti nove metode i optimizirati postojeće kako bi se smanjio rizik od nuspojava i neželjenih rezultata. Temeljem navedenog, cilj ovog istraživanja bio je antibiogramom ispitati učinkovitost kućno pripravljenih dezinficijensa, UV-Vis spektrofotometrom izmjeriti apsorbanciju kućno- pripremljenih krema za sunčanje te rezultate usporediti s komercijalnim proizvodima. Sukladno tome, pretpostavlja se kako će kućno pripravljeni dezinficijensi imati slabiji antibakterijski učinak na nepatogeni soj bakterije *Micrococcus luteus* od komercijalnog te da će kućno-pripremljena krema za sunčanje imati slabiju apsorbanciju i zaštitni faktor od komercijalnih. U skladu s očekivanim, statistička analiza rezultata pokazala je kako komercijalni dezinficijens ima najsnažnije antibakterijsko djelovanje, a zatim kućno pripravljeni dezinficijens sastava jednake količine vode i octa. Kućno-pripremljena krema za sunčanje imala je znatno manje vrijednosti apsorbancije od komercijalnih, a time i znatno slabiji, gotovo zanemariv, zaštitni faktor. Ovi rezultati ukazuju na važnost ispitivanja svojstava kućnih pripravaka kako bi se u populaciji spriječila nesvjesno nanesena šteta uzrokovana primjenom neprovjerenih metoda i proizvoda.

Ključne riječi: *antibakterijski učinak; zaštitni faktor; komercijalno; kućno-proizvedeno*

UVOD

Ljudi su već od davnina bili izloženi opasnostima i rizicima koje su im ugrožavale zdravlje. Zarazne bolesti uništavale su čitave populacije (Fauci i Morens, 2012), a manjak vitamina i minerala nerijetko je značio smrt. Potaknuti potrebom za promjenom i preživljavanjem, ljudi su pronalazili i osmišljavali rješenja ovih problema. Izumljena su i razvijena cjepiva, antibiotici, uspostavljene su higijenske mjere i uvedene metode za borbu protiv bolesti (Rappuoli, 2014). Sve je ovo bilo moguće razvojem znanosti koja je iskorjenjivala mitove i neprovjerene ideje, a zadržavala samo znanstvene činjenice. Iz ovoga se razvila ideja da sva znanost, posebice medicina, mora biti utemeljena na provjerenim i ponovljivim idejama. Stvorena je ideja medicine utemeljene na dokazima (Sackett i sur., 1996).

Stresna razdoblja, poput onih usred svjetske medicinske krize zbog pandemije koronavirusom, zahtijevale su brza i jednostavna rješenja, zbog čega ona često nisu bila dovoljno utemeljena na znanstvenim spoznajama (Nelson i sur., 2020). Osim rezultata znanstvenih radova koja nisu bila provjerena, za vrijeme pandemije također se pojavila i infodemija; pretjerana količina podataka koja nastupi za vrijeme trajanja pandemije. Tako su za vrijeme pandemije koronavirusom mediji postali glavni izvor podataka populaciji o stanju u svijetu. Pojavljivao se niz samoprozvanih stručnjaka koji su nudili savjete koji su ponekad bili točni, nerijetko krivi, a iznimno i katastrofalnih posljedica. Centri za kontrolu i prevenciju bolesti pronašli su kako je čak jedna u tri osobe u SAD-u na nesiguran način koristila sredstva za čišćenje za vrijeme pandemije, što je dovelo do porasta broja poziva prema centrima za trovanje (Gharpure i sur., 2020). Navode kako su pojedine osobe koje su same pokušale pripremiti sredstva za čišćenje iz neznanja miješale izbjeljivač s octom ili amonijakom i zagrijavale ga, što je uslijedilo stvaranjem plinova klora i kloramina koji mogu dovesti do znatnog oštećenja tkiva

pluća. Osim sredstava za čišćenje, u pokušaju liječenja i prevencije zaraze koronavirusom često su korišteni lijekovi koji nisu predviđeni suzbijanju virusne infekcije kod ljudi. U jednom su od takvih primjera korišteni klorokin i hidroksiklorokin koji se inače koriste za liječenje malarije, a u tretiranju infekcije koronavirusom

ne smanjuju smrtnost i ne skraćuju vrijeme potrebno za poboljšanje zdravstvenog stanja (Singh i sur., 2021). Još jedan krivo korišteni lijek u liječenju koronavirusa bio je ivermektin. Ovaj je lijek odobren za primjenu kod ljudi i životinja u liječenju parazitskih bolesti, a od samog izbijanja pandemije korišten je unatoč manjku znanstvenih dokaza o njegovoj učinkovitosti. Sinteza dokaza objavljena u časopisu COCHRANE nedvosmisleno je pokazala kako ivermektin nema učinka na liječenje koronavirusa (Popp i sur., 2022).

Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća, ideja o vrijednosti dokaza u medicini proširila se znanstvenom zajednicom. Temelj ove ideje znanstveni je rad koji je pokazao kako je čak 85 % svih objavljenih radova u medicini vrlo malo doprinijelo stvaranju novih spoznaja (Ioannidis, 2005). Iz ove ideje razvijena je ideja znanstvenog otpada, odnosno rezultata i objavljenih znanstvenih radova koji ne doprinose općem napretku znanja, ili mu čak i odmažu (Macleod i sur., 2014). Uglavnom su ovo radovi koji istražuju kriva pitanja (na koja već postoje odgovori), koji koriste neprimjerenu metodologiju ili krivu metodu analize podataka, izostavljaju rezultate koji ne potvrđuju postavljenu hipotezu (kao što je bilo u testiranju ovisnosti unosa masti o razvoju kardiovaskularnih bolesti gdje su rezultati iz 15 država bili odbačeni zbog odstupanja od pretpostavke) (Ritterman, 2017), donose neodgovarajuće zaključke (poput onih o veličini atrofirale timusne žlijezde kronično bolesne djece zbog čega su mnoga bila pogrešno liječena i preminula od raka štitnjače) (Ritterman, 2017) ili na drugi način udaljavaju znanstvenu spoznaju od istine (Macleod i sur., 2014). Kao reakcija na ovaj znanstveni rad (Ioannidis, 2005) stvorila se ideja da moderna znanost, posebice u području medicine, mora na svaki način djelovati kako bi se znanstveni otpad umanjio ili u potpunosti iskorijenio. Mjere umanjivanja znanstvenog otpada višestruke su, a uključuju i korištenje neovisne replikacije rezultata koja nalaže kako se rezultati jednog istraživanja moraju moći ponoviti i provjeriti kako bi se utvrdila njihova ispravnost i ukupna vrijednost originalnog istraživanja (Nosek i Errington, 2020). Iako nikada neće biti moguće u potpunosti iskorijeniti sva istraživanja s pogrešnim rezultatima ili zaključcima, nužno je konstantno propitkivati spoznaje i razvijati nove ideje, a ključno je, ukoliko je zapažena pogreška, priznati je i daljnjim istraživanjem ispraviti kako bi se zaštitili životi pacijenata.

Osim neprovjerenih znanstvenih radova, bitno je također provjeravati valjanost objava iz područja znanosti kojima su autori osobe koje za to nisu kvalificirane. Neizmjeran je broj internetskih stranica i videa na društvenim mrežama koji nude brza, jednostavna, a neprovjerena rješenja svakodnevnih problema, a bitno je navesti kako se na ovakvim stranicama također često promoviraju kozmetički i drugi proizvodi autora. Ovaj fenomen, potaknut dostupnošću informacija putem interneta i društvenih mreža, omogućio je ljudima pristup neograničenoj količini neprovjerenih podataka. Osobe bez potrebnog predznanja bile su prisiljene same procjenjivati ispravnost podataka kojima su bile izložene. Neprovjerene terapije provodile su se bez odgovarajuće stručnosti i opreme, što je nerijetko dovodilo do neželjenih zdravstvenih posljedica. Osim već spomenutog recepta za izradu kućnog dezinficijensa miješanjem izbjeljivača i octa, na internetu je moguće pronaći veliki broj mrežnih stranica koje nude uputstva za mnoga druga sredstva za čišćenje. Potrebno je ne samo testirati učinkovitost ovih otopina na suzbijanje rasta bakterija metodama difuzije (*disk* ili *well*) i razrjeđivanja (Balouiri i sur., 2016), već i učinak koji ove otopine imaju na ljudsko zdravlje (uzrokuju li nadraživanje sluznice nosa, opekline na koži i sl.). Dodatno, sve je veći broj ljudi koji zbog izražene želje da im proizvodi budu „prirodni“ odlučuju samostalno početi proizvoditi svoje kreme za sunčanje. Ovo je pogotovo zabrinjavajuće s obzirom da se pretjeranim izlaganjem sunčevim UV zrakama bez odgovarajuće zaštite (ako krema nije dovoljnog zaštitnog faktora) drastično povećava vjerojatnost obolijevanja od raka kože i drugih eritemogenih oštećenja poput opeklina ili crvenila (EPA, 2024). Kako bi

se ovo spriječilo, potrebno je testiranjem apsorbancije spektrofotometrom i određivanjem zaštitnog faktora (SPF) odrediti koje su kućno- pripremljene kreme za sunčanje, ali i komercijalne, sigurne za upotrebu.

Mnogi se ljudi, unatoč uputstvima medicinskog i stručnog osoblja, samostalno dijagnosticiraju, liječe i osmišljavaju metode prevencije zaraze i ozlijede. Ukoliko se liječe krivom metodom ili prekasno započnu s potrebnim liječenjem, moguće je da će pretrpjeti ozbiljne zdravstvene posljedice koje su mogli izbjeći. Kako bi se spriječio broj ljudi koji će si nesvjesno naštetiti, ali i broj ljudi koji ništa neće postići korištenim metodama, potrebno je provoditi istraživanja kojima se ispituje i provjerava učinak kućno-proizvedenih pripravaka.

Temeljem navedene potrebe, glavni cilj ovog istraživanja bio je testirati učinkovitost kućnih pripravaka za čišćenje i kućno-proizvedenih krema za sunčanje. *Agar well diffusion* metodom cilj je bio ispitati antibakterijski učinak kućno pripravljenih dezinficijensa i usporediti ga s antibakterijskim učinkom komercijalnog dezinficijensa na nepatogeni soj *Micrococcus luteus*. Dodatni je cilj bio UV-Vis spektrofotometrom izmjeriti apsorbanciju kućno-proizvedenih krema za sunčanje i izračunati njihov zaštitni faktor i usporediti ga sa zaštitnim faktorom komercijalnih krema za sunčanje.

Sukladno navedenom, prva je pretpostavka istraživanja da će kućno pripravljeni dezinficijensi imati manju mjeru antibakterijskog učinka od komercijalnog dezinficijensa. Druga je pretpostavka da će kućno-proizvedena krema za sunčanje imati manju vrijednost apsorbancije od komercijalnih krema za sunčanje, a samim time i manji zaštitni faktor.

METODE RADA

U istraživanju je testirana učinkovitost kućnih pripravaka za čišćenje i kućno-proizvedenih krema za sunčanje. Svi su recepti za pripremu testiranih otopina pronađeni pretraživanjem internetskih stranica i ponovljeni s navedenim sastojcima u navedenoj količini prateći spomenuti postupak. Nepatogeni bakterijski soj *Micrococcus luteus* (Schroeter 1872) Cohn 1872 korišten u ispitivanju antibakterijskog djelovanja uzoraka dobiven je sa Zavoda za mikrobiologiju Prirodoslovno matematičkog fakulteta. Do trenutka provođenja ispitivanja, bakterijski soj bio je čuvan u inkubatoru na temperaturi od 25 °C. Svi su dijelovi testiranja antibakterijskog učinka provedeni u digestoru strogo se pridržavajući svih mjera zaštite. Drugi dio istraživanja odnosio se na mjerenje apsorbancije uzoraka krema za sunčanje. Test apsorbancije proveden je korištenjem V-760 UV-Vis spektrofotometra u znanstveno istraživačkom laboratoriju Zavoda za opću i anorgansku kemiju u BIOCentru.

Priprema uzoraka za testiranje antibakterijskog učinka

Pet različitih otopina za čišćenje bilo je pripremljeno prema uputama s internetskih stranica (tablica 1).

Tablica 1 Sastav otopina za čišćenje i metode pripreme

Uzorak	Sastav	Količina	Postupak pripreme
1D	terdžent za pranje posuđa	¼ žličice (1,2 mL)	U posudu pomiješati deterdžent, vodovodnu vodu i eterično ulje (u istraživanju korišteno eterično ulje limuna). Dobro promiješati.
	Vodovodna voda	1 čaša (237 mL)	
	Eterično ulje (po izboru)	4 – 6 kapi (u istraživanju korišteno 5)	
2D	Vodovodna voda	1 čaša (237 mL)	U posudu pomiješati vodovodnu vodu, bijeli ocat, izopropilni alkohol i eterična ulja. Dobro promiješati.
	Bijeli ocat	1 čaša (237 mL)	
	Izopropilni alkohol	2 žlice (30 mL)	
	Eterično ulje limuna	20 kapi	
	Eterično ulje čajevca	20 kapi	
	Ocat	1 dio	

Uzorak	Sastav	Količina	Postupak pripreme
3D	Vodovodna voda	1 dio	U posudu pomiješati ocat, vodovodnu vodu i eterično ulje. Dobro promiješati.
	Eterično ulje (limun)	5 – 15 kapi (u istraživanju korišteno 10)	
4D	Vodovodna voda	4 čaše (946 mL)	U posudu pomiješati vruću vodovodnu vodu, bijeli ocat i soda bikarbonu. Miješati dok se soda bikarbona ne otopi, zatim iscijediti limun i u otopinu dodati limunovu koru.
	Bijeli ocat	¼ čaše (59 mL)	
	Soda bikarbona	2 žlice (29 g)	
	Limun	1 komad	
5D	3 % vodikov peroksid	¼ čaše (59 mL)	U posudu pomiješati 3 % vodikov peroksid i vodovodnu vodu te dodati nekoliko kapi eteričnog ulja (u istraživanju korišteno eterično ulje limuna).
	Vodovodna voda	1 čaša (237 mL)	
	Eterično ulje (po izboru)	Nekoliko kapi (u istraživanju korišteno 5)	

Prva otopina 1D (McDonough Smith i Gautieri, 2024), druga otopina 2D (SGC, 2021), treća otopina 3D (Rising, 2024), četvrta otopina 4D (Rising, 2024) i peta otopina 5D (CB, 2024). Kao kontrolni uzorci u istraživanju su korišteni komercijalni dezinficijens (uzorak K) (sastava 72 g etanola, 0,05 g alkil-dimetil-benzil-amonijevog klorida, glicerol, ekstrak Aloe vera, gliceril-monooleat, pročišćena voda) i demineralizirana voda (uzorak V).

Testiranje antibakterijskog učinka kućnih otopina za čišćenje i kontrolnih uzoraka

Antibakterijski učinak otopina za čišćenje ispitan je agar well diffusion metodom (Balouiri i sur., 2016) na nepatogeni soj bakterije *M. luteus* stvaranjem varijacije antibiograma za svaki uzorak. Čvrsta podloga od općeg hranjivog agara proizvođača Biolife Italiana sastava goveđeg ekstrakta (3 g/L), peptona (5 g/L) i agara (15 g/L) korištena je za testiranje učinka otopina. Podloga je načinjena miješanjem 5,75 g agara s 250 mL vode i autoklaviranjem u CV-EL 12L/18L autoklavu proizvođača CertoClav. Nakon autoklava, podloga je bila ulivena u prethodno sterilizirane (suhi sterilizator ST-01/02 proizvođača Instrumentaria) Petrijeve zdjelice koje su odmah nakon bile položene u hladnjak na 24 sata kako bi se spriječilo nastajanje kondenzata. Nakon hlađenja, svaka je hranjiva podloga mikropipetom bila prelivena sa 125 µL bakterijske otopine koja je Drigalski spatulom bila razmazana na podlogu. Pore su napravljene bušenjem kružnica u podlozi od hranjivog agara sterilnom epruvetom promjera 8 mm i odstranjivanjem viška sterilnom pincetom. U svakoj Petrijevoj zdjelici načinjene su tri pore, jedna napunjena sa 70 µL pojedine kućne otopine za čišćenje, druga sa 70 µL komercijalnog dezinficijensa i treća sa 70 µL demineralizirane vode. Za svaku je otopinu postupak ponovljen 10 puta, čineći ukupno 50 Petrijevih zdjelica (10 pora za svaku kućnu otopinu za čišćenje i 50 pora za svaki kontrolni uzorak). Sve su zdjelice nakon nasađivanja bile odložene u inkubator (proizvođača Inkolab) na 72 sata na temperaturu od 25 °C prema uputstvima Zavoda za mikrobiologiju. Antibakterijski učinak zabilježen je mjerenjem zone inhibicije svakom pojedinom uzorku od granice pore do ruba zone inhibicije. U slučaju da zona inhibicije nije približno bila kružnica, izmjeren je najveći i najmanji odmak sa svake strane i izračunata je srednja vrijednost svih mjerenja za tu poru. Vrijednost zone inhibicije korištena u analizi podataka dobivena je računanjem srednje vrijednosti 10 izmjerenih zona inhibicije za pojedini uzorak kućnih dezinficijensa.

Priprema kućno-proizvedene kreme za sunčanje

Jedna krema za sunčanje bila je pripremljena prema uputama s internetske stranice (tablica 2) navedenog zaštitnog faktora 40 (Narmadha, 2020). Apsorbancija kreme za sunčanje testirana je neposredno nakon pripreme. Kao kontrolni uzorak korištene su dvije komercijalne kreme za sunčanje istog proizvođača: SPF50 i SPF30.

Tablica 2 Sastav kućno-proizvedene kreme za sunčanje i metoda pripreme

Uzorak	Sastav	Količina	Postupak pripreme
1K	Shea maslac	¼ čaše (85 g)	U vrućoj vodenoj kupelji otopiti shea maslac. Zatim dodati kokosovo ulje i pčelinji vosak. Nakon što su se svi sastojci otoplili, mješavinu hladiti 30 minuta. Konačno, dodati eterična ulja i promiješati.
	Ekstra djevičansko kokosovo ulje	2 žice (28,8 g)	
	Pčelinji vosak	2 žlice (28,8 g)	
	Sezamovo ulje	1 žlica (14,8 mL)	
	Eterično ulje sjemena mrkve	1 žlica (14,8 mL)	
	Eterično ulje lavande	10 kapi	

Testiranje apsorbancije kućno-proizvedene kreme za sunčanje i komercijalnih krema za sunčanje UV- Vis spektrofotometrom

Test apsorbancije proveden je po uzoru na postojeća istraživanja s promjenom parametara poput koncentracije uzoraka i otapala (Sayre i sur., 1979). 25 mg kućno-proizvedene kreme za sunčanje kvantitativno je bilo preneseno u volumetrijsku tikvicu od 50 mL i do oznake razrijeđen 96 % *pro analysis* alkoholom etanolom. Nakon intenzivnog miješanja, otopina je bila filtrirana kroz filter papir. Postupak je bio ponovljen za kontrolne uzorke vaganjem 15 mg uzorka SPF50 u volumetrijsku tikvicu od 50 mL i 25 mg uzorka SPF30 u drugu tikvicu od 50 mL koje su do oznake bile napunjene 96 % p.a etanolom. Zbog prevelike apsorbancije pri ovim koncentracijama, oba su uzorka dodatno bila razrjeđenja miješanjem 25 mL pojedine otopine s 25 mL čistog 96 % etanola. Za slijepu probu korišten je uzorak 96 % p.a etanola. Etanol je bio uliven u 10 mm kvarcnu kivetu do oznake i apsorbancija je mjerena u rasponu valnih duljina od 200 do 400 nm s pomakom od 0,5 nm. Mjerenje apsorbancije za testiranih pet uzoraka (1K masene koncentracije 0,5 mg/mL, SPF30_A koncentracije 0,5 mg/mL, SPF30_B koncentracije 0,25 mg/mL, SPF50_A 0,3 mg/mL i SPF50_B koncentracije 0,15 mg/mL) za svaki je ponovljeno tri puta. Vrijednosti korištene u istraživanju dobivene su računanjem srednjih vrijednosti apsorbancija za svaki uzorak pri pojedinoj valnoj duljini. Nakon određivanja svih vrijednosti apsorbancije, korištena je Mansurova formula za određivanje zaštitnog faktora (Mansur i sur., 1986).

Analiza podataka

Nakon što su sve vrijednosti bile izmjerene, provedena je statistička analiza računajući srednju vrijednost, standardnu devijaciju te provođenjem t-testa za vrijednosti zona inhibicije i računanjem zaštitnog faktora za kreme za sunčanje. Podatci su analizirani u programu MS Excel koristeći funkcije average, stdev i ttest (neovisni uzorci) uz razinu statističke značajnosti od $p < 0,05$. Izračun t-testa temeljio se na usporedbi pojedinih uzoraka s pripadajućim kontrolnim uzorkom (prosječna vrijednost deset zona inhibicije iz Petrijevih zdjelica s pripadajućim kućno pripravljenim uzorkom, ne od ukupne prosječne vrijednosti zona inhibicije komercijalnog dezinficijensa). Zaštitni faktor krema za sunčanje izračunat je uz korištenje Mansurove formule (slika 1) izmjerenim vrijednostima apsorbancije u rasponu od 290 to 320 nm.

$$SPF_{spectrophootometric} = CF \times \sum_{290}^{320} EE\,(\lambda) \times I\,(\lambda) \times Abs\,(\lambda)$$

Slika 1 Mansurova formula; SPF (zaštitni faktor), CF (korekcijski faktor, CF = 10), EE(λ) (eritemogeni učinak zračenja na valnoj duljini λ), I(λ) (intenzitet sunčeve svjetlosti na valnoj duljini λ), Abs(λ) (apsorbancija na valnoj duljini λ) (Mansur i sur., 1986)

EE(λ)·I(λ) vrijednosti (tablica 3) korištene u istraživanju standardne su u rasponu od 290 nm do 320 nm (Sayre i sur., 1979).

Tablica 3 Standardni produkt $EE_{(\lambda)} \cdot I_{(\lambda)}$ korišten za izračun zaštitnog faktora; EE(λ) (eritemogeni učinak zračenja na valnoj duljini λ), I(λ) (intenzitet sunčeve svjetlosti na valnoj duljini λ) (Sayre i sur., 1979)

Valna duljina (nm)	EE(λ)·I(λ)	Valna duljina (nm)	EE(λ)·I(λ)
290	0,0150	310	0,1864
295	0,0817	315	0,0839
300	0,2874	320	0,0180
305	0,3278		

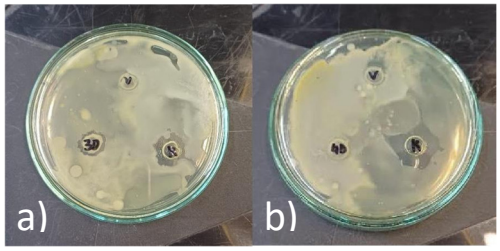
REZULTATI

Nakon mjerenja zona inhibicija, izračunata je srednja vrijednost zona inhibicije za svaki uzorak kućno proizvedenih dezinficijensa i za komercijalni dezinficijens (tablica 4). Srednja vrijednost zona inhibicije za uzorak demineralizirane vode iznosila je 0 mm.

Tablica 4 Prosječna vrijednost zona inhibicije (nm) ± standardna devijacija za uzorke kućnih proizvedenih dezinficijensa i komercijalni dezinficijens

Uzorak	Prosječna vrijednost zona inhibicije (mm) ± standardna devijacija		Statistička značajnost razlike zona inhibicije ($p < 0,05$)
	Kućno pripravljeni dezinficijens	Komercijalni dezinficijens	
1D	0,35 ± 0,41	3,55 ± 1,17	**$1,76 \cdot 10^{-7}$**
2D	1,60 ± 0,70	3,10 ± 0,74	**$1,90 \cdot 10^{-4}$**
3D	2,50 ± 0,67	3,00 ± 0,82	0,160
4D	0,10 ± 0,21	3,60 ± 0,70	**$1,09 \cdot 10^{-11}$**
5D	2,45 ± 0,83	3,10 ± 0,74	0,081

Najveću srednju vrijednost zona inhibicije imao je uzorak 3D (slika 2a), zatim neposredno manju srednju vrijednost zona inhibicije imao je uzorak 5D. Oko uzorka 4D nije se razvila zona inhibicije (slika 2b).

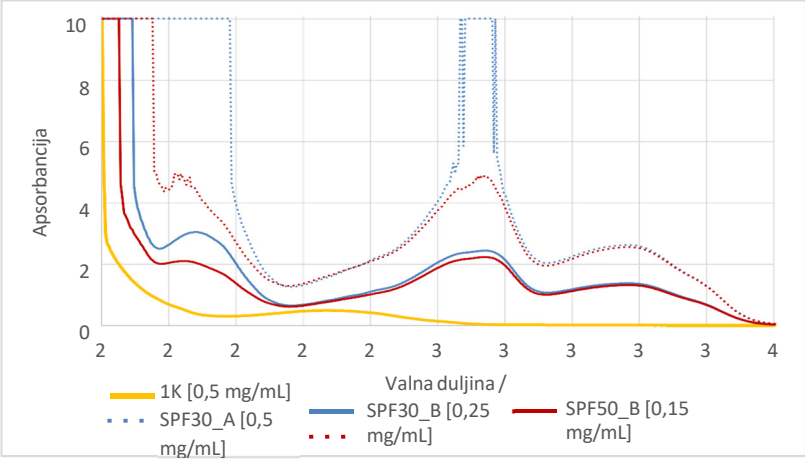


Slika 2 (a) Zone inhibicije kućno pripravljenog uzorka 3D, komercijalnog dezinficijensa i vode; (b) zone inhibicije kućno pripravljenog uzorka 4D, komercijalnog dezinficijensa i vode
Autor: Polašek S., 2025

Statistički značajni rezultati dobiveni su pri usporedbi zona inhibicije uzoraka 1D, 2D i 4D sa zonama inhibicije komercijalnog dezinficijensa iz pripadajućih Petrijevih zdjelica (tablica 4). Usporedbom zona inhibicije uzoraka 3D i 5D s kontrolnim uzorkom nije zabilježen statistički značajan rezultat.

Rezultati mjerenja apsorbancije (slika 3) pokazuju kako je najmanju vrijednost imao kućni uzorak 1K u svim područjima spektra (unatoč većoj koncentraciji od uzorka SPF50).

Uzorku 1K izmjerena je najveća vrijednost apsorbancije od 0,478812 pri valnoj duljini 267 nm (UVC). Uzorku SPF30_B najveća izmjerena vrijednost apsorbancije iznosila je 4,53943 pri valnoj duljini od 209 nm (UVC), a u rasponu valnih duljina u UVB području najveća je vrijednost apsorbancije iznosila 2,4284 pri 314 nm. Uzorku SPF50_B najveća je izmjerena vrijednost apsorbancije 2,21932 pri valnoj duljini od 314 nm.



Slika 3 Ovisnost apsorbancije o valnoj duljini za sve testirane uzorke

Zaštitni faktor za svaki je uzorak dobiven od vrijednosti apsorbancije na području UVB spektra (tablica 5).

Tablica 5 Srednje vrijednosti apsorbancije za sve testirane uzorke na UVB području spektra

Valna duljina	1K (0,5 mg/mL)	SPF30_A (0,5 mg/mL)	SPF30_B (0,25 mg/mL)	SPF50_A (0,3 mg/mL)	SPF 50_B (0,15 mg/mL[1])
290	**0,248580**	2,71602	1,40973	2,61887	1,29843
295	0,178528	3,30159	1,71555	3,13495	1,57174
300	0,136386	4,05402	2,04937	3,7595	1,87084
305	0,089333	**4,94263**	2,29713	4,35798	2,09413
310	0,069443	10	2,38606	4,59634	2,17698
315	0,050563	10	**2,42103**	**4,75703**	**2,21355**
320	0,023235	4,23707	2,11423	3,79598	1,93204

Uzorak 1K imao je najmanji zabilježeni zaštitni faktor (tablica 6). Najveći je zaštitni faktor zabilježen za uzorak SPF30_A. Najmanji je zaštitni faktor kontrolnih uzoraka bio zabilježen za uzorak najmanje masene koncentracije, SPF50_B. Uzorci SPF50_B i SPF30_B imali su slične vrijednosti zaštitnog faktora. Dodatno, proveden je izračun vrijednosti zaštitnog faktora za uzorak SPF30_A bez dvije izmjerene vrijednosti, izmjerene na valnim duljinama od 310 i 315 nm, čija je vrijednost iznosila 10 (tablica 5). Vrijednost korigiranog zaštitnog faktora za uzorak SPF30_A iznosila je 31,36.

Tablica 6 Eksperimentalne vrijednosti zaštitnog faktora svakog testiranog uzorka dobivene Mansurovom formulom; u zagradi je prikazana vrijednosti zaštitnog faktora nakon isključivanja dva mjerenja s maksimalnim vrijednostima za uzorak SPF30_A

	1K	SPF30_A	SPF30_B	SPF50_A	SPF50_B
štitni faktor (SPF)	**1,03**	58,39 (31,36)	21,71	40,95	19,81

RASPRAVA

Rezultati ovog učeničkog rada pokazuju kako je antibakterijski učinak kućno pripravljenih dezinficijensa, iako postoji, u većini slučajeva znatno manji od antibakterijskog učinka komercijalnog dezinficijensa. Sukladno tome, prva pretpostavka istraživanja potvrđena je, odnosno moguće je zaključiti kako je komercijalni dezinficijens učinkovitiji u suzbijanju širenja bakterije *M. luteus* u odnosu na kućno pripravljene dezinficijense. Ovo je u skladu s jednim drugim istraživanjem u kojem je zabilježeno kako je kućni pripravak za čišćenje (DIY uzorak) bio manje učinkovit od izbjeljivača i ekološkog proizvoda (EP) na bakterije *Escherichia coli* (Migula, 1895) Castellani i Chalmers (1919) i *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884 (Goodyear i sur., 2015). Analizom antibakterijskog učinka pojedinih komponenti DIY dezinficijensa jedino je ocat imao značajan učinak na bakteriju *E. coli*, dok je cijeli uzorak imao nezadovoljavajući učinak na bakteriju *S. aureus*. Također, u ovome je istraživanju pronađeno kako DIY uzorak gubi učinkovitost prolaskom vremena, ukazujući na to da bi ga osobe koje ga koriste za čišćenje svakodnevno trebale svježe pripremati kako bi bio učinkovitiji od onog starog 24 sata (Goodyear i sur., 2015).

Analiza rezultata pokazala je kako je uzorak 4D, sastava vodovodne vode, octa, sode bikarbone i limuna, neučinkovit u suzbijanju rasta bakterije *M. luteus*. Moguće objašnjenje ovako male izmjerene zone inhibicije reakcija je neutralizacije koja se dogodila pri miješanju natrijeva hidrogenkarbonata (soda bikarbona) i octene kiseline u kojoj je nastala sol natrijev acetat, voda i plinoviti ugljikov dioksid. Iako ovaj uzorak nije pokazao nikakvo antibakterijsko djelovanje na testiranom nepatogenom soju, moguće je da bi demonstrirao učinak na nekoj drugoj bakterijskoj vrsti. Zbog ovoga je potrebno provoditi daljnja istraživanja na druge patogene i nepatogene vrste kako bi se utvrdio širi raspon učinkovitosti i preciznije odredila uporaba pojedinog dezinficijensa.

Mehanizmi djelovanja testiranih dezinficijensa i njihovih komponenti na bakterije višestruki su. Primjenom etanola može se oštetiti struktura membrane, omesti dioba stanica, promijeniti pH unutarstanične tekućine, mogu se uzrokovati promjene u sintezi proteina i dr. (Chatterjee i sur., 2006). Uz korištenje octa, zbog octene se kiseline smanjuje se pH unutarstanične tekućine i time inhibira rast i razvoj patogenih

mikroorganizama (Trček i sur., 2015). Vodikov peroksid, ovisno o koncentraciji i vrsti bakterije na koju se primjenjuje, može djelovati bakteriostatski ili baktericidno (Juven i Pierson, 1996). Za citotoksičnost vodikova peroksida odgovorni su izrazito reaktivni radikali, nespareni elektroni najčešće kisikovih i dušikovih spojeva (kod vodikova peroksida hidroksilni radikal), koji uzrokuju oksidativni stres (neravnotežu između nakupljanja i neutralizacije slobodnih radikala) i oštećuju nukleinske kiseline, proteine i lipide od kojih je izgrađena stanična membrana bakterija (Juven i Pierson, 1996).

S obzirom da je temeljna komponenta svakog kućno pripravljenog dezinficijensa bila ocat, etanol ili vodikov peroksid, svaka je otopina (osim one u kojoj se dogodila neutralizacija) pokazala ograničeno antibakterijsko djelovanje. Moguće je zaključiti kako prevelikim razrjeđenjem ove otopine gube svoju učinkovitost, odnosno svoju primjenu. U slučaju da određeni komercijalni proizvod ne odgovara potrebama potrošača, potrebno je potražiti provjereni proizvod koji bolje odgovara potrebi, ne proizvoditi novo sredstvo vlastitim miješanjem kemikalija ili pretjeranim ublaživanjem postojećih.

Rezultati drugog dijela istraživanja pokazali su kako su mjerenja apsorbancije za uzorak 1K i njegova vrijednost zaštitnog faktora znatno manji od vrijednosti apsorbancije i zaštitnih faktora kontrolnih uzoraka. Ovime je druga hipoteza također potvrđena. Međutim, jedan je od izazova ovog istraživanja bio osigurati usporediva mjerenja apsorbancije. Zbog previsoke vrijednosti apsorbancije komercijalnih krema, spektrofotometrom nije bilo moguće ispravno izmjeriti njihove vrijednosti. Zbog toga su komercijalne kreme bile dodatno razrijeđene, a razrijeđena krema zaštitnog faktora 50 manje je koncentracije od ostalih. Unatoč maloj razlici u koncentracijama, nije moguće izravno uspoređivati vrijednosti apsorbancije, no moguće je zaključiti kako čak i u znatno manjoj koncentraciji kreme i zaštitnog faktora 30 i zaštitnog faktora 50 imaju puno veću opću vrijednost apsorbancije, a samim time i zaštitni faktor.

Dodatnom analizom djelovanja u pojedinom dijelu spektra, moguće je vidjeti kako su oba kontrolna uzorka aktivna u UVA (od 320 do 400 nm) i UVB (od 290 do 320 nm) rasponu. S obzirom da pretjerano izlaganje UVA i UVB zračenju može uzrokovati oštećenje tkiva, potrebno je koristiti kremu za sunčanje koja pruža zaštitu u svim dijelovima spektra (Mancuso i sur., 2017). Stoga je moguće zaključiti kako komercijalne kreme služe funkciji kojoj su namijenjene. Kućno-proizvedena krema za sunčanje nema djelovanje u UVA i UVB spektru, a najviše vrijednosti apsorbancije ima u UVC rasponu. Zbog slabog ili nepostojećeg djelovanja u rasponu u kojem bi trebala biti djelotvorna, neovisno o vrijednosti zaštitnog faktora moguće je zaključiti kako testirana kućno-proizvedena krema za sunčanje nije učinkovita.

Na početku je istraživanja bilo predviđeno testiranje apsorbancije za dva uzorka kućno-proizvedenih krema za sunčanje, ali zbog cinkova oksida u sastavu jedne ona nije mogla biti testirana UV spektrofotometrom. Međutim, kako je temeljni recept svih kućno-proizvedenih krema za sunčanje bio jednak ili približno jednak, ispitana je apsorbancija samo jedne ovakve kreme, odnosno u istraživanje nije uvrštena supstitucija za odbačeni uzorak. Dodatan bi način testiranja učinkovitosti kreme za sunčanje bio izravno izlaganje kože sunčevu zračenju i mjerenje vremena do pojave eritema, odnosno crvenila kože. Kako ova metoda nije mogla biti korištena u istraživanju, u izračunu je zaštitnog faktora bio korišten standardni produkt eritema i intenziteta sunčeva zračenja iz literature. Moguće je da bi rezultati bili drugačiji od izmjerenih da je neovisno provedeno mjerenje eritema specifično za istraživanje.

Naposljetku, kako bi se utvrdila njihova pouzdanost, rezultate ovog istraživanja trebalo bi potvrditi neovisnim istraživanjem. Na ovaj bi se način ustanovilo da tijekom provedbe istraživanja nije došlo do

pojave pogreške koja bi umanjila njegov značaj.

ZAKLJUČCI

Temeljem rezultata ovog učeničkog istraživačkog projekta moguće je zaključiti sljedeće:

- kućno pripravljeni dezinficijensi manje su učinkoviti od komercijalnog, odnosno zabilježen im je manji antibakterijski učinak na nepatogeni soj *M. luteus*;
- najučinkovitiji kućno proizvedeni dezinficijensi uzorci su 3D (sastava jednake količine vodovodne vode i octa) i 5D (sastava vodovodne vode i vodikova peroksida), a najmanje je učinkovit uzorak 4D (sastava bijelog octa, sode bikarbone i vode);
- kućno-proizvedena krema za sunčanje ima manju ukupnu vrijednost apsorbancije od komercijalnih krema, a samim time i manji zaštitni faktor.

ZAHVALA

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Tomislavu Ivankoviću na ustupanju bakterijskog soja *M. luteus* korištenog u istraživanju te izv. prof. dr. sc. Ani Budimir na omogućavanju korištenja UV-Vis spektrofotometra i stručnoj pomoći pri analizi uzoraka.

LITERATURA

Balouiri M., Sadiki M., Ibnsouda S. K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of pharmaceutical analysis 6: 71–79.

CB. 2024. How to make your own disinfectant spray. Cleanzen Blog. https://cleanzen.com/blog/diy-disinflectant-spray/, pristupljeno 4.1.2025.

Chatterjee I., Somerville G. A., Heilmann C., Sahl H. G., Maurer H. H., Herrmann M. 2006. Very low ethanol concentrations affect the viability and growth recovery in post-stationary-phase *Staphylococcus aureus* populations. Applied and environmental microbiology 72: 2627–2636.

EPA. 2024. Health Effects of UV Radiation. United States Environmental Protection Agency. https://www.epa.gov/sunsafety/health-effects-uv-radiation, pristupljeno 2.1.2025.

Fauci A. S., Morens D. M. 2012. The perpetual challenge of infectious diseases. New England journal of medicine 366: 454–461.

Gharpure R., Hunter C. M., Schnall A. H., Barrett C. E., Kirby A. E., Kunz J., Berling K., Mercante J. W., Murphy J. L., Garcia-Williams A. G. 2020. Knowledge and practices regarding safe household cleaning and disinfection for COVID-19 prevention — United States, May 2020. Morbidity and Mortality Weekly Report 69: 705–709.

Goodyear N., Brouillette N., Tenaglia K., Gore R., Marshall J. 2015. The effectiveness of three home products in cleaning and disinfection of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* on home environmental surfaces. Journal of applied microbiology 119: 1245–1252.

Ioannidis J. P. 2005. Why most published research findings are false. PLoS Med 2: e124.

Juven B. J., Pierson M. D. 1996. Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantitation. Journal of food protection 59: 1233–1241.

Khalid I. S. 2007. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. Food Control 18: 566–575.

Macleod M. R., Michie S., Roberts I., Dirnagl U., Chalmers I., Ioannidis J. P., Al-Shahi. 2014. Biomedical research: increasing value, reducing waste. Lancet 383: 101–104.

Mancuso J. B., Maruthi R., Wang S. Q., Lim H. W. 2017. Sunscreens: an update. American journal of clinical dermatology 18: 643–650.

Mansur J. S., Breder M. N. R., Mansur M. C. A., Azulay R. D. 1986. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. An Bras Dermatol Rio De Janeiro 61: 121-124.

McDonough Smith L., Gautieri A. 2024. How to make simple homemade cleaning sprays. Good Housekeeping, https://www.goodhousekeeping.com/, pristupljeno 2.1.2025.

Narmadha. 2020. DIY Homemade Sunscreen With SPF 40 – Without Zinc Oxide. Write a path. https://writeapath.com/diy-homemade-sunscreen-with-spf-40-without-zinc-oxide/, pristupljeno 4.1.2025.

Nelson T., Kagan N., Critchlow C., Hillard A., Hsu A. 2020. The danger of misinformation in the COVID-19 crisis. Missouri medicine 117: 510–512.

Nosek B. A., Errington T. M. 2020. What is replication? PLoS Biol 18: e3000691.

Popp M., Reis S., Schießer S., Hausinger R. I., Stegemann M., Metzendorf M. I., Kranke P., Meybohm P., Skoetz N., Weibel S. 2022. Ivermectin for preventing and treating COVID-19. Cochrane Database of Systematic Reviews 6: CD015017.

Rappuoli R. 2014. Vaccines: science, health, longevity, and wealth. PNAS 111: 12282.

Rising H. 2024. How to make a natural disinfectant. wikiHow, https://www.wikihow.com/Make-a-Natural- Disinfectant, pristupljeno 4.1.2025.

Ritterman J. B. 2017. To err is human: can American medicine learn from past mistakes? The Permanente journal 21: 16–181.
Sackett D. L., Rosenberg W. M., Gray J. A., Haynes R. B., Richardson W. S. 1996. Evidence based medicine: what it is and what it isn't. BMJ 312: 71-72.
Sayre R. M., Agin P. P., LeVee G. J., Marlowe E. 1979. A comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreening formulas. Photochemistry and photobiology 29: 559–566.
SGC. 2021. 3 Safe + Natural DIY Ways to Disinfect Your Home (Recipes Included!). Sandia Green Clean, https://sandiagreenclean.com/3-safe-natural-diy-ways-to- disinfect-your-home-recipes-included/, pristupljeno 4.1.2025.
Singh B., Ryan H., Kredo T., Chaplin M., Fletcher T. 2021. Chloroquine or hydroxychloroquine for prevention and treatment of COVID-19. Cochrane Database of Systematic Reviews 2: CD013587.
Trček J., Mira N. P., Jarboe L. R. 2015. Adaptation and tolerance of bacteria against acetic acid. Applied microbiology and biotechnology 99: 6215-29.

Utjecaj različitih čimbenika na klijavost i rast boba (*Vicia faba* L.)

Eva Čakanić, 7. razred
Petra Ćurković, 7. razred

Osnovna škola Bogumila Tonija, Samobor
Mentor: *Nataša Kletečki*

SAŽETAK
Istraživanje utjecaja različitih čimbenika na klijavost i rast boba (*Vicia faba* L.) provođeno je s ciljem utvrđivanja kako različite metode stratifikacije utječu na klijavost sjemenki i rast boba (*Vicia faba* L.). Rezultati su pokazali kako prve kliju sjemenke stratificirane s KNO_3, a posljednje sjemenke izložene smrzavanju (-5 °C, 48 h) i kontrolna skupina. Najveću klijavost imaju sjemenke boba stratificirane s KNO_3 (100 %), a najmanju sjemenke koje su bubrile u vodi 48 h (35 %). Najveća pojedinačna i prosječna visina boba zabilježena u uzorku L2 (smrzavanje, -20 °C, 24 h), a najmanja u uzorcima VV1 (vodovodna voda 48 h) i L1 (smrzavanje, -5 °C, 48 h). Kontrolna skupina je postigla veće prosječne visine od pojedinih uzoraka iz eksperimentalne skupine. Način stratifikacije utječe na uspješniju klijavost ili rast biljke.

***Ključne riječi*:** *bob; čimbenici; klijavost; rast; stratifikacija*

UVOD I OBRAZLOŽENJE TEME

Bob (*Vicia faba* L.) je jednogodišnja zeljasta biljka (slike 1 i 2), dobro razvijenoga korijena, skromnih zahtjeva za tlom (Devčić, 2014).

Slika 1 Bob (*Vicia faba* L.), dijelovi biljke
Izvor: https://hr.wikipedia.org/wiki/Bob_%28biljna_vrsta%29

Slika 2 Uzgoj boba
Izvor: https://species.wikimedia.org/wiki/Vicia_faba

Klasifikacija boba:
Carstvo: Plantae
Odjeljak: Magnoliophyta
Razred: Magnoliopsida
Red: Fabales
Porodica: Fabaceae
Rod: Vicia
Vrsta: *Vicia faba* L.

Kultivari boba su *Vicia faba* var. *minor*, sitnozrni bob i *Vicia faba* var. *major* Harz, krupnozrni bob. Bob (*V. faba* L.) se upotrebljava u ljudskoj prehrani i u ishrani stoke (govedarstvo, ovčarstvo, konjogojstvo, svinjogojstvo, peradarstvo) (Metayer, 2004). U prošlosti je bio važna namirnica u zemljama diljem svijeta jer je kao jedan od prvih uroda, već krajem proljeća, predstavljao izvrstan izvor bjelančevina, ugljikohidrata, vlakana, raznih minerala i vitamina (Devčić, 2014). Nema velikih zahtjeva za toplinom te

najbolje uspijeva na području s umjereno toplom klimom. Minimalna temperatura klijanja boba (*V. faba* L.) je u rasponu od 1 do 3°C. Optimalne temperature klijanja boba (*Vicia faba* L.) kreću se od 20°C do 25°C. Lešić i sur. (2002) navode kako se vegetativni rast bez zastoja odvija na temperaturama između 12°C i 25°C. Bob (*V. faba* L.) ima umjerene potrebe za vodom do početka cvatnje, ali dobra opskrba vodom neophodna je i nakon cvatnje, tijekom oplodnje, zametanja mahuna i to zbog postizanja što stabilnijeg i kvalitetnijeg prinosa mahuna i veličine zrna (Lešić i sur., 2002). Premda bob (*V. faba* L.) uspijeva na različitim tipovima tala, najviše mu pogoduju srednje neutralna do blago alkalna tla pH reakcije 7-8, a slabo uspijeva na suhim i kiselim tlima.

Kod biljnih vrsta čije sjeme pokazuje svojstvo dormantnosti, pa tako i kod boba (*V. faba* L.), propisane su metode koje omogućuju njezino prekidanje. Dormantnost predstavlja prilagodbu biljaka koja onemogućuje klijanje sjemena nakon sazrijevanja. Kako bi dormantno sjeme moglo proklijati, potrebno je određenim metodama stratifikacije prekinuti stanje dormancije ili mirovanja. To se postiže: klijanjem u mraku, tretiranjem sjemena svjetlom različitog spektra, tretiranjem sjemena kemikalijama (vodikov peroksid, natrijev i kalijev hidroksid, kalijev nitrat), hormonima, visokim i niskim temperaturama te suhim skladištenjem sjemena (Pečarić, 2018).

Cilj ovog rada je utvrditi kako različite metode stratifikacije utječu na klijanje i rast boba (*V. faba* L.).
Istraživačko pitanje: Utječu li različite metode stratifikacije na klijanje i rast boba (*V. faba* L.)*?*
Hipoteze:

1) Sjemenke boba (*V. faba* L.) imaju veću klijavost kada su podvrgnute nekoj od metoda stratifikacije.
2) Brzina rasta boba (*V. faba* L.) nakon sadnje ovisi o metodi stratifikacije kojoj su bile podvrgnute sjemenke.

METODE RADA

Metoda rada primijenjena u ovom radu modificirana prema Pečarić (2018).

Materijal i pribor

Za istraživanje su korišteni: zemlja za cvijeće, vata, KNO_3 (2 %), H_2O_2 (9 %), sjeme boba (*V. faba* L.) (klijavost do 12/25, proizvodnja *Green Garden*), voda, termometar, ravnalo, mobitel, Petrijeva posuda, filter papir.

Vrijeme provođenja istraživanja

Istraživanje je provedeno od siječnja do veljače 2024. godine.

Opis pokusa

Iz kutija sa sjemenom boba (*V. faba* L.) izdvojene su sjemenke. Od izdvojenih sjemenki:

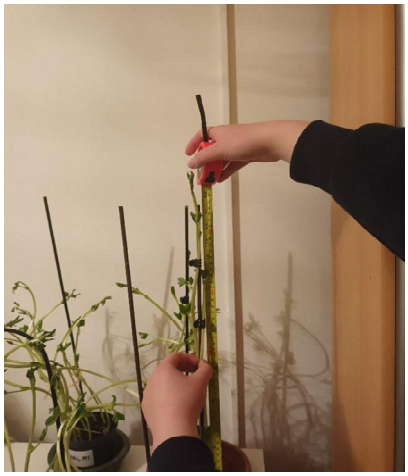
1) 20 je odloženo u čašu s vodovodnom vodom (sobna temperatura 22° C, 48 h), oznaka VV1.
2) 20 je odloženo u čašu s vodovodnom vodom (sobna temperatura 22° C, 24 h), oznaka VV2.
3) 20 je odloženo u plastičnu vrećicu i nakon toga u ledenicu (temperatura -5 ° C, 48 h), oznaka L1.
4) 20 je odloženo u plastičnu vrećicu i nakon toga u ledenicu (temperatura -20 ° C, 24 h), oznaka L2.
5) 20 je odloženo u Petrijevu posudu na filter papir i vatu 48 h, uz vlaženje podloge s KNO_3 (2 %), oznaka PP1.
6) 20 je odloženo u Petrijevu posudu na filter papir i vatu 48 h, uz vlaženje podloge s H_2O_2 (9 %), oznaka PP2.
7) 20 je odloženo u čašu i ostavljeno na zraku (sobna temperatura 22° C, 48 h), ST1, kontrolna skupina.

Nakon što je sjeme boba (*V. faba* L.) 24 – 48 h podvrgnuto stratifikaciji zasađeno je (slika 3) u plastične lonce za cvijeće i označeno brojevima 1-7 i oznakama navedenim u opisu pokusa.

Slika 3 Stratifikacija sjemenki boba (*V. faba* L.)
Autor: Ćurković P. 2024

Slika 4 Zasađene sjemenke boba (*V. faba* L.)
Autor: Ćurković P. 2024

Slika 5 Rast stabljike boba (*V. faba* L.)
Autor: Ćurković P. 2024



Slika 6 Mjerenje visine stabljike boba (*V. faba* L.)
Autor: Ćurković P. 2024

Nakon sadnje, sve su posude za cvijeće stavljene na isto mjesto (slike 4 i 5), tj. izložene su istim vanjskim uvjetima klijanja. Rast boba (V. faba L.) praćen je 11 dana nakon sadnje.

Analiza rezultata

1) Određivana je klijavost sjemenki boba (*V. faba* L.) (broj proklijali sjemenki, postotak klijavosti) prema načinu stratifikacije;
2) Određivana je visina (slika 6) stabljike svake biljke prema načinu stratifikacije;
3) Određivana je prosječna visina biljaka prema načinu stratifikacije.

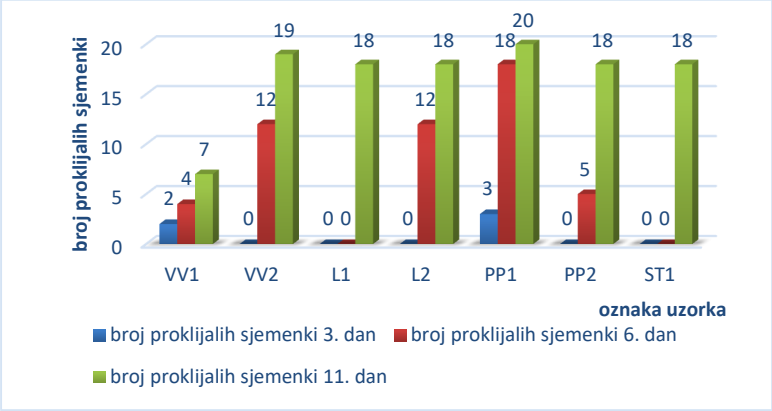
Tijekom provođenja istraživanja i analize rezultata nezavisnu varijablu predstavlja klijanje i rast, a zavisnu uvjeti u kojima je bilo sjeme prije sadnje, a koji su mogli utjecati na klijanje i rast boba (*V. faba* L.).

Za obradu podataka korišten je *Microsoft Excel 365*.

REZULTATI

Određena je klijavost sjemenki boba (*V. faba* L.) u eksperimentalnim skupinama i kontrolnoj skupini. Rezultati istraživanja pokazali su kako prve kliju sjemenke koje su tretirane s KNO_3 (slika 7), a posljednje

sjemenke koje su izložene smrzavanju uzorak L1 (-5 °C, 48 h) i kontrolna skupina. Sjemenke podvrgnute smrzavanju uzorak L1 (-5 °C, 48 h) počinju klijati nakon 6. dana istraživanja i do kraja istraživanja ostvaruju istu klijavost kao i kontrolna skupina.



Slika 7 Broj proklijalih sjemenki u kontrolnoj skupini i eksperimentalnim skupinama

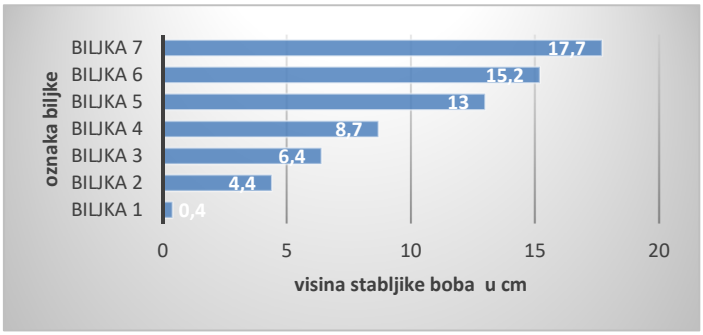
Najveću klijavost, 100 %, imaju sjemenke boba stratificirane sa KNO_3, dok najmanju klijavost od 35 % imaju sjemenke koje su bubrile u vodovodnoj vodi 48 h (tablica 1).

Tablica 1 Klijavost sjemenki u eksperimentalnim i kontrolnoj skupini

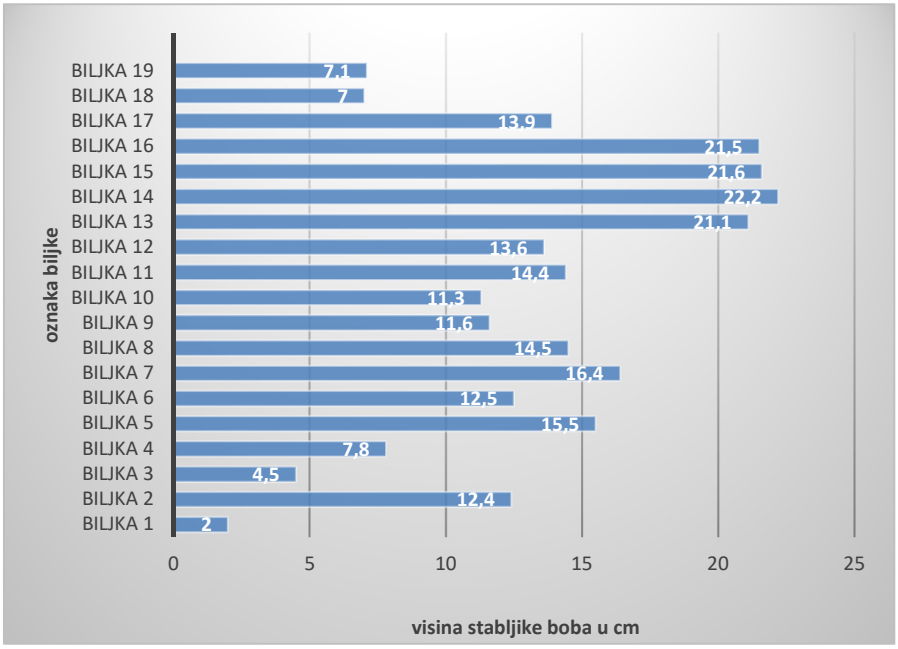
Uzorak	Postotak (%) klijavosti
VV1 – vodovodna voda 48 h	35
VV2 – vodovodna voda 24 h	95
L1 – smrzavanje (-5 °C, 48 h)	90
L2 – smrzavanje (-20 °C, 24 h)	90
PP1 – stratifikacija s KNO_3	100
PP2 - stratifikacija s H_2O_2	90
ST1 – kontrolna skupina	90

Određena je visina stabljike svake biljke u eksperimentalnim i kontrolnoj skupini. Rezultati mjerenja visine stabljike boba kod eksperimentalne skupine pokazali su kako je najveća pojedinačna visina boba zabilježena u uzorku L2 (smrzavanje, -20 °C, 24 h) (slika 11), a najmanja u uzorcima VV1 (vodovodna voda 48 h) (slika 8) i L1 (smrzavanje, -5 °C, 48 h) (slika 10). Visina stabljike boba u uzorku VV1 (vodovodna voda 48 h) (slika 8) dosegla je najveću visinu od 17, 7 cm.

Visina stabljike boba u uzorku VV2 (vodovodna voda 24 h) (slika 9) dosegla je najveću visinu od 22, 2 cm, a najmanju od 2 cm. Rezultat pokazuje kako veću pojedinačnu visinu stabljike postiže bob (*V. faba* L.) čije su sjemenke kraće bubrile u vodi.

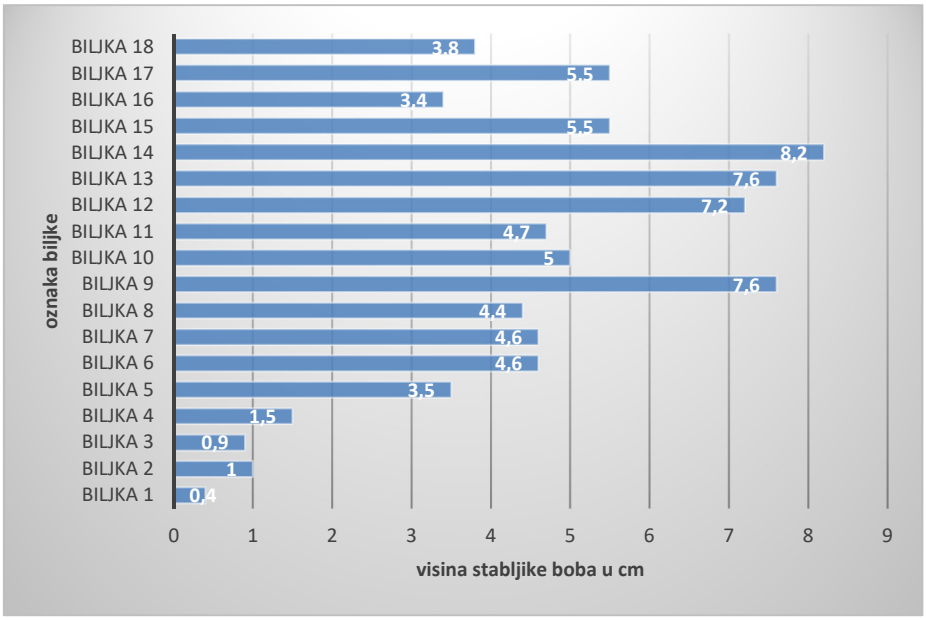


Slika 8 Visina stabljike (cm) boba (*V. faba* L.) uzorak VV1 (vodovodna voda, 48 h)



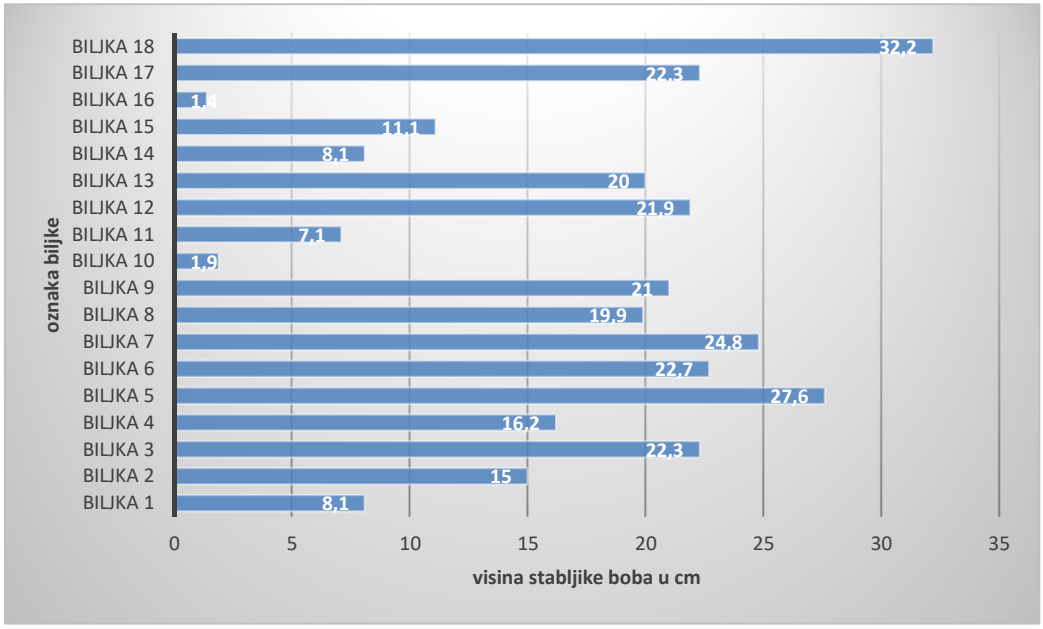
Slika 9 Visina stabljike (cm) boba (*V. faba* L.) uzorak VV2 (vodovodna voda, 24 h)

Visina stabljike boba u uzorku L1 (smrzavanje, -5 °C, 48 h) postiže najveću visinu od 8,2 cm, a najnižu od 0,4 cm (slika 10).



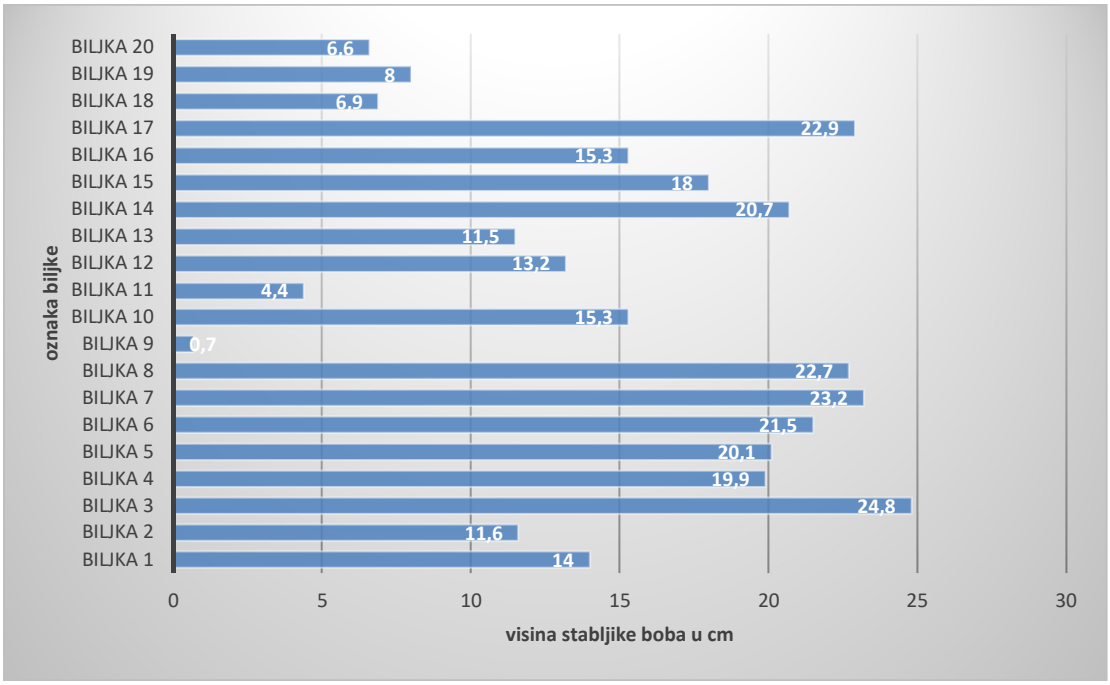
Slika 10 Visina stabljike (cm) boba (*V. faba* L.) L1 (smrzavanje, -5 °C, 48 h)

U uzorku L2 (smrzavanje, -20 °C, 24 h) najveća zabilježena visina stabljike boba je 32,2 cm, a najmanja 1,4 cm (slika 11).



Slika 11 Visina stabljike (cm) boba (*V. faba* L.) L2 (smrzavanje, -20 °C, 24 h)

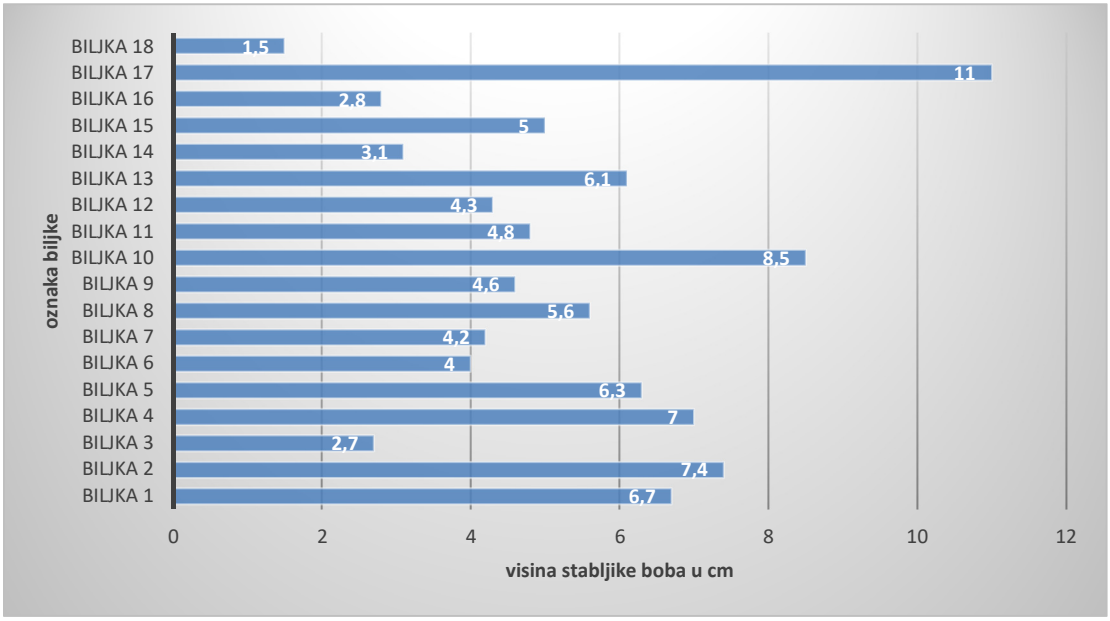
U uzorku PP1 (stratifikacija s KNO_3) najveća zabilježena visina stabljike boba je 24,8 cm, a najmanja 0,7 cm (slika 12).



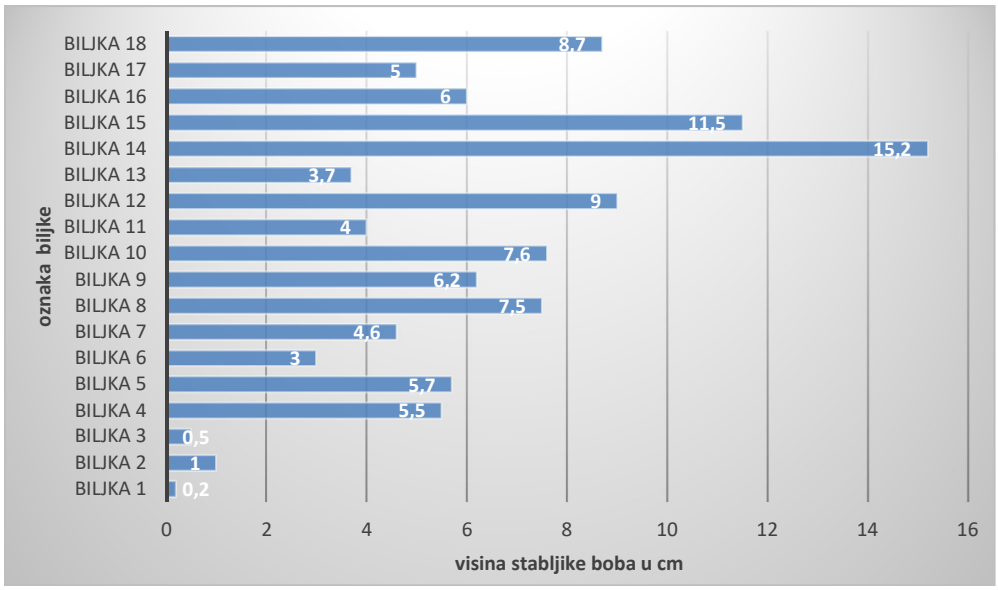
Slika 12 Visina stabljike (cm) boba (*V. faba* L.) PP1 (stratifikacija s KNO3)

U uzorku PP2 (stratifikacija s H_2O_2) najveća zabilježena visina stabljike boba je 11 cm, a najmanja 1,5 cm (slika 13).

Najveća zabilježena visina stabljike boba u kontrolnoj skupini iznosi 15,2 cm, a najmanja 0,2 cm (slika 14).



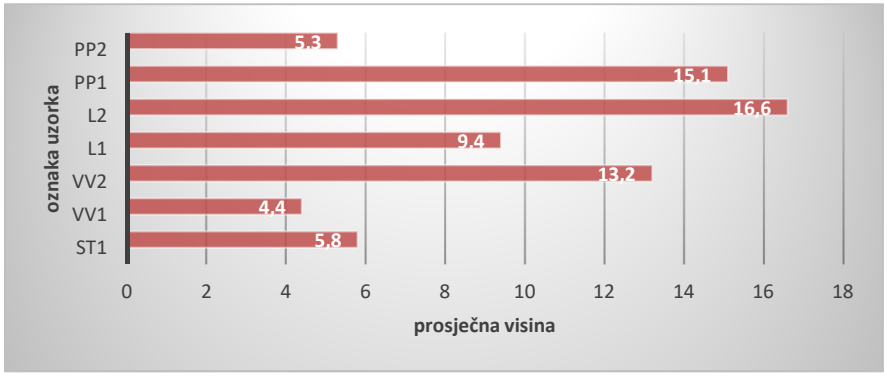
Slika 13 Visina stabljike (cm) boba (*V. faba* L.) PP2 (stratifikacija s H_2O_2)



Slika 14 Visina stabljike (cm) boba (*V. faba* L.) kod kontrolne skupine

Određivanje prosječne visine biljaka u eksperimentalnim i kontrolnoj skupini

Najveću prosječnu visinu stabljike postigle su stabljike boba u uzorku L2 (smrzavanje, -20 °C, 24 h) 16,6 cm, dok su najmanju prosječnu visinu postigle stabljike u uzorku VV1 (vodovodna voda, 48 h). Kontrolna je skupina postigla veće prosječne vrijednosti visine stabljike (5,8 cm) od dvije eksperimentalne skupine (VV1, PP2) (slika 15).



Slika 15 Prosječna visina (cm) stabljike boba (*V. faba* L.) u eksperimentalnim i kontrolnoj skupini (ST1)

RASPRAVA

Sjemenke podvrgnute smrzavanju (-5 °C, 48 h) i kontrolna skupina počinju klijati nakon 6. dana istraživanja i do kraja istraživanja ostvaruju istu klijavost. Najveću klijavost imaju sjemenke boba stratificirane s KNO_3 (100 %), a najmanju sjemenke koje su bubrile u vodi 48 h (35 %).

Rezultati mjerenja visine stabljike pokazali su kako je najveća pojedinačna i prosječna visina boba zabilježena u uzorku L2 (smrzavanje, -20 °C, 24 h), a najmanje u uzorcima VV1 (vodovodna voda 48 h) i L1 (smrzavanje, -5 °C, 48 h). Kontrolna skupina je postigla veće prosječne visine od pojedinih uzoraka iz eksperimentalne skupine, ali manje pojedinačne visine.

Iz rezultata istraživanja vidljivo je kako način stratifikacije utječe na uspješniju klijavost (stratifikacija KNO_3) ili rast biljke (smrzavanje, -20 °C, 24 h) stabljike. Kod izbora metode stratifikacije moramo odlučiti što želimo postići, brži rast ili veću klijavost.

Istraživanja drugih autora pokazala su kako postoje različite metode stratifikacije tijekom kojih sjeme prelazi iz stadija dubokog mirovanja (dormantnost) u stadij klijanja i nicanja (Agroklub, 2024). Dormantnost sjemena, kao i načini prekida dormantnosti, zajednička su karakteristika mnogim biljnim vrstama. Od izuzetnog je značaja jer omogućava očuvanje sjemena tijekom nepovoljnih vremenskih uvjeta što može produljiti životni vijek sjemena i ima veliki utjecaj na preživljavanje biljaka (Wang i sur., 2007). Kod mahunarki je ispitivana učinkovitost različitih metoda na prekid dormantnosti. Metode stratifikacije (tretmani s visokom temperaturom, smrzavanje, mehaničke metode i tretmani s kiselinama) pokazale su značajnu važnost za prekid dormantnosti te poboljšanje klijavosti, a svaku je metodu potrebno prilagoditi vrsti (Kimura i Islam, 2012).

ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata zaključeno je:

- metoda stratifikacije utječe na brzinu klijanja sjemenki boba;
- metoda stratifikacije utječe na visinu rasta boba;
- metoda stratifikacije utječe na prosječnu visinu stabljika boba;
- najbolje metode stratifikacije su smrzavanje (-20 °C, 24 h) i stratifikacija s KNO_3.

Ovim je istraživanjem boba potvrđena hipoteza da bob (*V. faba* L.) ima veću klijavost ako je podvrgnut nekoj od metoda stratifikacije. Potvrđena je hipoteza da brzina rasta boba (*V. faba* L.) ovisi o metodi stratifikacije kojoj su bile izložene sjemenke.

LITERATURA

Agroklub, Zašto se neko sjeme izlaže hladnoći i kako obavljati stratifikaciju?, https://www. agroklub. com/agro-hobi/ zasto-se-neko-sjeme-izlaze-hladnoci-i-kako-obaviti-stratifikaciju/82105/, pristupljeno 9.1.2024.

Devčić A. 2014. Proizvodnja i ljekovita svojstva boba (*Vicia faba* L.). Završni rad. Poljoprivredni fakultet, Osijek.

Lešić R., Borošić J., Butorac I., Ćustić M., Poljak M., Romić D. 2002. Povrćarstvo. Zrinski d.d., Čakovec.

Kimura E., Islam M. A. 2012. Seed scarification methods and their use in forage legumes. Research Journal of Seed Science 5 (2): 38–50.

Metayer N. 2004. *Vicia faba* breeding for sustainable agriculture in EUROPE. D7: WP 1- EUFABA, Pariz.

Pečarić A. 2018. Utjecaj metoda ispitivanja na energiju klijanja i klijavost sjemena endivije (*Cichorium endivia*) i radića (*Cichorium intybus*). Završni rad. Visoko gospodarsko učilište u Križevcima, Križevci.

Wang Y. R., Hanson J., Mariam Y. W. 2007. Effect of sulfuric acid pretreatment on breaking hard seed dormancy in diverse accessions of five wild Vigna species. Seed Science and Technology 35: 550–559.

Koliki broj bakterija sadrže spužve i krpe za brisanje školske ploče?

Karlo Kabalin, 8. razred

Osnovna škola Tituša Brezovačkog, Zagreb
Mentor: *Nikolina Konjuh Reljić*

SAŽETAK

U školama postoje različita onečišćenja površina mikroorganizmima. Učenici s njima mogu doći u kontakt na različite načine, a između ostalog i pri brisanju školske ploče. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi i usporediti broj aerobnih mezofilnih bakterija na spužvama i krpama od mikrofibre koje se koriste za brisanje ploče. U tu svrhu korištena je uobičajena metodologija uzimanja briseva s površina te nasađivanja i brojanja aerobnih mezofilnih bakterija nakon 48 sati inkubacije (pri 37°C). U 14 učionica osnovne osmogodišnje škole raspoređeno je 7 spužvi i 7 krpa od mikrofibre za brisanje ploča. Brisevi za određivanje broja bakterija uzeti su na dan kada su bile otpakirane i stavljene u učionice, a zatim svakih sedam dana u razdoblju od 4 tjedna. Brisevi su uzeti s površine i iz sredine spužve te s površine krpe. Na početku mjerenja je prosječan broj bakterija u krpama i spužvama bio jednak (0,07 CFU/cm^2), da bi on tijekom četiri tjedna jako porastao, pri čemu je u središtu spužvi on iznosio skoro trostruko više (134,54 CFU/cm^2) u odnosu na površinu krpe od mikrofibre (49,46 CFU/cm^2) i samu površinu spužve (45,82 CFU/cm^2) koja se brzo sušila na zraku. Može se zaključiti da oba sredstva za brisanje ploče predstavljaju povoljan medij za razmnožavanje aerobnih mezofilnih bakterija, posebice školska spužva zbog veće mogućnosti zadržavanja vlage u dubini. S obzirom da učenici prilikom pranja i cijeđenja bilo spužve, bilo krpe, dolaze u doticaj sa svim bakterijama koje se nalaze u njima, preporučljivo bi bilo za brisanje školskih ploča koristiti krpe od mikrofibre s obzirom na bolju mogućnost njihovog ispiranja i sušenja nakon uporabe.

Ključne riječi: *školska spužva; krpa od mikrofibre; aerobne mezofilne bakterije; onečišćenje mikroorganizmima*

UVOD

Onečišćenje mikroorganizmima raznih površina u školi može predstavljati ozbiljnu prijetnju zdravlju učenika. Iako samo manji broj bakterija uzrokuje bolesti kod ljudi, u školama bi se trebala voditi briga o mogućim onečišćenjima, kako bi se spriječila pojava bolesti i očuvao zdrav okoliš (Wang, 2007).

Kod uzimanja mikrobioloških briseva s različitih površina, ruku i pribora najčešće se utvrđuje broj aerobnih mezofilnih bakterija, koji, ako je povećan, često upućuje na nedovoljno čišćenje, pranje i dezinfekciju. Aerobne mezofilne bakterije su one koje rastu i razmnožavaju se pri optimalnom rasponu temperature od 20° do 45°C (kod većine vrsta ona iznosi 37°C, što je ujedno i tjelesna temperatura ljudi), te uz prisutnost kisika (ZZJZDNZ, 1996). Razlog tomu je što bakterije aerobno disanje koriste za dobivanje energije iz oksidacijske fosforilacije (BiologyOnline, 2001). Najvažniji vanjski čimbenici koji pogoduju rastu i razmnožavanju mezofilnih bakterija su: temperatura (određena najnižom temperaturom ispod koje su stanice metabolički neaktivne i najvišom temperaturom iznad koje ne rastu), te relativna vlažnost, jer se mikroorganizmi bolje razmnožavaju pri povišenoj vlazi u okolišu (Gregić, 2014).

Jedan od zadataka učenika u školama, prvenstveno redara, je brisanje školske ploče spužvama i/ili krpama od mikrofibre. Erdogrul i Erbilir (2005) navode da su spužve i krpe za čišćenje prepoznate kao potencijalna sredstva kojima se lako šire mikroorganizmi te da oni dugo opstaju u njima. Krpe od mikrofibre jako su učinkovite pri čišćenju s obzirom na iznimna apsorbirajuća svojstva, pri čemu mogu ukloniti većinu bakterija (i do 99 %) s površina na kojima ih koristimo (Moore i Griffith, 2006). Spužve dobro apsorbiraju tekućinu, a zbog svoje debljine puno dulje zadržavaju vlagu (Erdogrul i Erbilir, 2005).

Na temelju dosadašnjih prikupljenih spoznaja nameće se pitanje o sigurnosti korištenja ta dva različita pomagala za brisanje školske ploče, tj. o tome sadrže li spužve ili krpe, kao mogući mediji za razmnožavanje mikroorganizama, veći broj bakterija nakon redovite uporabe. Različita istraživanja (Erdogrul i Erbilir, 2005; Dey i sur., 2020; Ramli i sur., 2020) pokazala su da su spužve, pogotovo one koje se koriste u kućanstvu, „leglo“ velikog broja bakterija, zbog prisustva optimalnih uvjeta potrebnih za njihov rast i razmnožavanje (vlaga, ostaci hrane), dok se u drugim istraživanjima nastojao utvrditi samo broj bakterija u školskim prostorima (Karwowska, 2003; Bartlett i sur., 2004). U istraživanju NSFa (*engl. National Science Foundation*) nastojalo se analizirati na kojim je školskim površinama prisutan najveći broj bakterija (NSF, 1950).

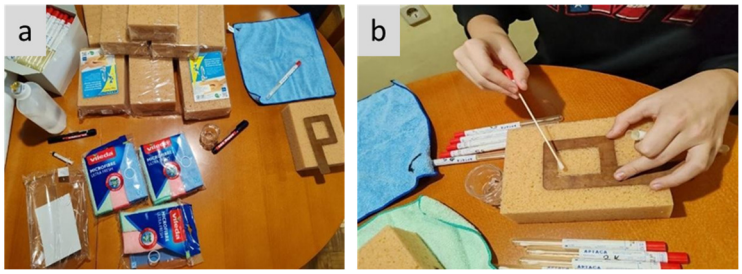
Cilj ovog istraživanja je utvrditi i usporediti broj aerobnih mezofilnih bakterija na spužvama i krpama od mikrofibre koje se koriste za brisanje školske ploče te predložiti što je od navedenog sigurnije koristiti u školama. Pri tome je pretpostavka da krpe od mikrofibre, koje su puno tanje i teže zadržavaju vlažnost od spužvi, nakon mjesec dana korištenja sadrže manji ukupni broj aerobnih mezofilnih bakterija od spužvi te su stoga i sigurnije za korištenje.

METODE RADA

Istraživački dio proveden je prema uobičajenoj metodologiji uzorkovanja tj. uzimanja briseva s površina te nasađivanja i brojanja aerobnih mezofilnih bakterija (Vučemilo i Tofant, 2009; Bešić i sur., 2023). Prikupljanje uzoraka i svaki daljnji korak rada u laboratoriju je samostalno proveden uz detaljne upute i nadzor djelatnika laboratorija.

Prikupljanje uzoraka

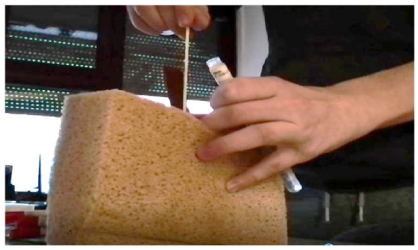
U 14 učionica osnovne osmogodišnje škole (gdje se održava mješovita nastava od petog do osmog razreda) raspoređeno je 7 novih (zapakiranih) spužvi i 7 novih krpa od mikrofibre za brisanje školskih ploča. Kako bi se što više smanjio utjecaj moguće razlike u intenzitetu korištenja spužvi i krpa, one su raspoređene u učionice s podjednakim opterećenjem s obzirom na kabinetsku nastavu, tj. po 2 spužve/krpe u učionicama gdje se u najvećoj mjeri održava nastava iz jezika, po 2 u učionicama za matematiku i fiziku, po 1 u učionicama za biologiju i kemiju, po 1 u učionicama za geografiju i povijest i po 1 u učionicama vjeronauka i tehničke kulture. U svim učionicama nalazila se tzv. „zelena ploča“. Brisevi za određivanje broja bakterija uzeti su na dan kada su spužve i krpe bile otpakirane (slika 1) i stavljene u učionice, a zatim svakih sedam dana u razdoblju od 4 tjedna.



Slika 1 Priprema spužvi i krpa od mikrofibre za istraživanje (a) te prvotno uzimanje briseva nakon otpakiravanja (b)

S obzirom da su spužve veće debljine u odnosu na krpe od mikrofibre, brisevi spužvi su uzimani i s površine, i iz dubine, te su u tu svrhu skalpelom napravljeni bočni prorezi (5 cm duljine) do središta spužve. Brisevi su uzeti sterilnim vatenim štapićem, koji je prethodno uronjen u sterilnu fiziološku

otopinu. Štapićem je prebrisana površina i središte spužvi te površina krpa korištenjem sterilne šablone (5×4 cm), nakon čega je isti vraćen u sterilnu epruvetu (slika 2). Brisevi su uzeti ujutro, prije početka nastave, te su isti dan dopremljeni u laboratorij Zavoda za higijenu, ponašanje i dobrobit životinja Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.



Slika 2 Primjer uzimanja briseva iz sredine spužve

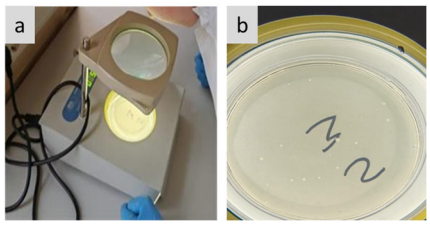
Nasađivanje uzoraka i brojanje bakterija

U laboratoriju je u svaku epruvetu s uzorkom uliveno 5 mL sterilne fiziološke otopine. Nakon pola sata stajanja, 1 mL uzorka otpipetiran je u sterilnu Petrijevu zdjelicu sterilnom pipetom (Vučemilo i Tofant, 2009). Potom se u Petrijevu zdjelicu nalio hranjivi agar (Nutrient agar, Biolife, Italija) (slika 3) za određivanje ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija, koji je prethodno otopljen i ohlađen na 45 °C. Hranjivi agar pripremljen je od strane djelatnika laboratorija.

Slika 3 Pipetiranje i nasađivanje uzoraka u sterilnu Petrijevu zdjelicu

Petrijeve zdjelice su bile inkubirane u termostatu na 37 °C tijekom 48 sati (slika 4), nakon čega su izbrojane izrasle kolonije bakterija na aparatu Colony counter (Selecta, Spain) (slika 5).

Slika 4 Termostat za inkubaciju Petrijevih zdjelica s uzorcima nasađenim na hranjivi agar



Slika 5 Brojanje izraslih kolonija na Colony counter-u (a) te njihov vizualni prikaz (b)

Broj izraslih kolonija korišten je za izračun broja bakterija po cm^2 površine (CFU/cm^2 , *engl. Colony Forming Unit*) uz pomoć sljedeće formule: broj kolonija bakterija pomnoženo s 5 (zbog razrjeđenja uzorka) te podijeljeno s 20 (zbog površine Petrijeve zdjelice od 20 cm^2).

Obrada podataka

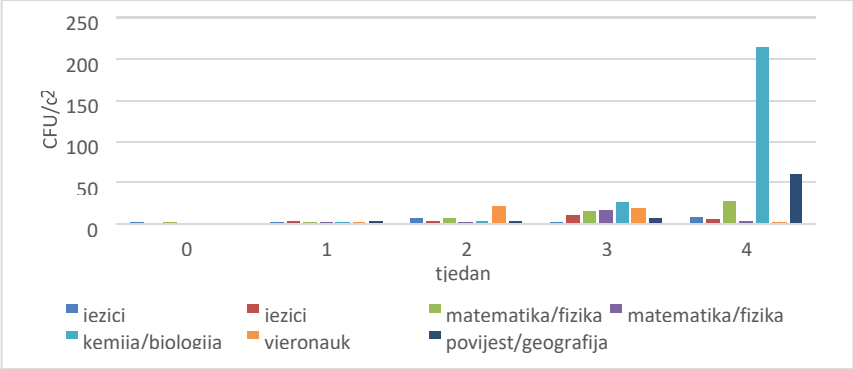
Broj bakterija po cm^2 (CFU/cm^2) na površini i u središtu spužve te na krpama od mikrofibre prikazan je tablično i grafički. Rezultati su prikazani kao prosječan broj bakterija na spužvama (površina i središte), odnosno krpama po danima istraživanja, te njihova najmanja i najveća zabilježena vrijednost. Za obradu i prikaz podataka korišten je program Excel.

REZULTATI

Nakon uzimanja uzoraka, njihova nasađivanja i inkubacije, od svih su uspješno izbrojane izrasle kolonije (slika 6). Broj bakterija u svim uzorcima (nakon preračunavanja iz pobrojanog broja kolonija u svakom uzorku) prema vrsti pomagala za čišćenje (spužva - površina i središte te krpa) prikazani su na slikama od 7 do 9.

Slika 6 Brojanje i slikanje izraslih kolonija bakterija

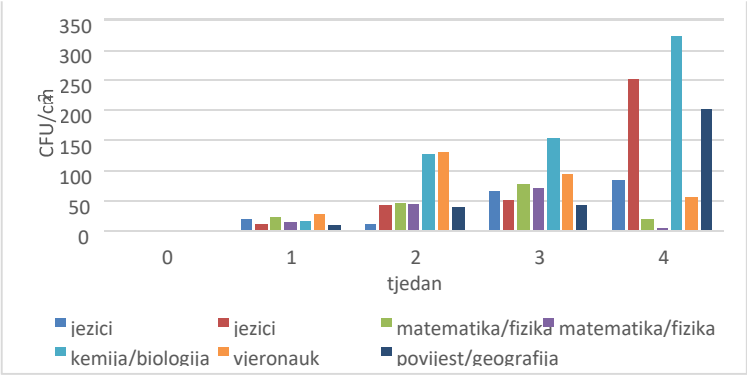
Promatrajući broj bakterija na površini spužvi (slika 7), opaženo je da je on uglavnom kontinuirano rastao s vremenom promatranja. No, u zadnjem tjednu je kod dijela uzoraka zabilježen manji broj bakterija.



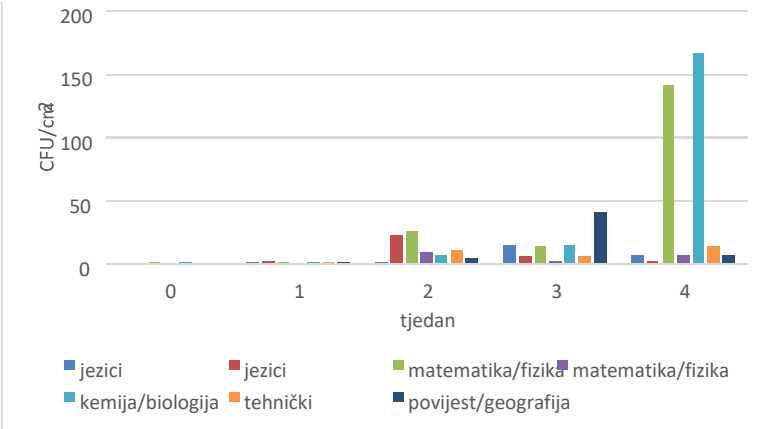
Slika 7 Broj bakterija po cm^2 na površinama spužvi u različitim učionicama kroz 4 tjedna mjerenja

U središtu svih spužvi obuhvaćenih promatranjem utvrđen je veći broj bakterija (slika 8) nego na njihovoj površini, te je on također u najvećoj mjeri kontinuirano rastao s vremenom promatranja.

Slično kao što je tijekom četiri tjedna istraživanja rastao broj aerobnih mezofilnih bakterija na površini i u sredini spužve, povećavao se i njihov broj na krpama od mikrofibre (slika 9).



Slika 8 Broj bakterija po cm² u središtu 7 spužvi u različitim učionicama kroz 4 tjedna mjerenja



Slika 9 Broj bakterija po cm² na površinama 7 krpa od mikrofibre u različitim učionicama kroz 4 tjedna mjerenja

Prosječne vrijednosti broja bakterija, najmanje i najviše vrijednosti, te njihovo kretanje kroz promatrano razdoblje (s obzirom na korišteno pomagalo za brisanje školske ploče) prikazani su u tablici 1.

Tablica 1 Prosječne vrijednosti broja bakterija, te najmanja i najveća vrijednost (CFU/cm²) utvrđena na površini krpe od mikrofibre te na površini i u središtu spužve

	0-ti dan (1. mjerenje)	Na kraju 1. tjedna (2. mjerenje)	Na kraju 2. tjedna (3. mjerenje)	Na kraju 3. tjedna (4. mjerenje)	Na kraju 4. tjedna (5. mjerenje)
Sredstvo za brisanje	prosječna vrijednost (min – maks) CFU/cm²	prosječna vrijednost (min – maks) CFU/cm²	prosječna vrijednost (min – maks) CFU/cm²	prosječna vrijednost (min – maks) CFU/cm²	prosječna vrijednost (min – maks) CFU/cm²
Krpa od mikrofibre	0,07 (0 - 0,25)	0,89 (0 - 2)	11,68 (1,75 - 26)	14,07 (3 - 41)	49.46 (2,5 - 166)
Spužva – površina	0,07 (0 - 0,25)	2,11 (0,75 - 3,75)	6,82 (2,75 - 21,5)	13,89 (2,5 - 25,5)	45.82 (2 - 214)
Spužva - sredina	0,07 (0 - 0,25)	17,21 (9 - 28)	63 (11,5 - 130)	78,64 (41 - 153)	134,54 (5,25 - 323)

Iz tablice 1 vidljivo je da na početku istraživanja (nakon otpakiravanja) većina spužvi i krpa nije imala prisutnih bakterija (samo je po jedna kolonija izbrojana nakon inkubacije na dvije spužve i dvije krpe, tj. na 28,6% pomagala za brisanje). Nakon tjedan dana korištenja na jednoj krpi od mikrofibre također još nije pronađena niti jedna aerobna mezofilna bakterija, dok je na površini spužve pronađeno najmanje 0,75 CFU/cm², a u njenoj dubini 9 CFU/cm². Razlika je zabilježena i u najvećem broju bakterija koje su izbrojane nakon tjedan dana – na površini krpe 2, na površini spužve 3,75, a u dubini spužve čak

28 CFU/cm^2. Slično je kretanje zabilježeno i u daljnjim razdobljima (u dubini spužve je uvijek bio najveći broj bakterija, kako prosječni, tako i maksimalni), dok između površine krpa i površine spužva nije bilo većih razlika. Na kraju četverotjednog razdoblja istraživanja maksimalni broj bakterija na krpama iznosio je 166, na površini spužve 214, a u sredini spužve 323 CFU/cm^2.

RASPRAVA

U dostupnoj literaturi do sada nisu objavljeni rezultati koji bi obuhvaćali analizu broja bakterija u spužvama ili krpama od mikrofibre koje se koriste za brisanje školske ploče.

U našem su istraživanju i spužve i krpe od mikrofibre nakon otpakiravanja i pri stavljanju u učionice uglavnom bile bez bakterija (prosječna vrijednost kod svih 0,07 CFU/cm^2) da bi njihov broj rastao s duljinom uporabe kao sredstva za brisanje. Tako je na kraju razdoblja promatranja (nakon četiri tjedna) prosječan broj bakterija na krpama iznosio 49,46 CFU/cm^2, a na površini spužvi 45,82 CFU/cm^2. Od samog početka korištenja spužvi zabilježen je znatno veći broj bakterija u njihovom središtu, koji je ubrzano rastao s vremenom te je na kraju razdoblja promatranja iznosio 134,54 CFU/cm^2. Navedeno se može objasniti samom građom i svojstvima spužve. Pošto je ona porozna, na površini se vrlo brzo suši i time ne predstavlja tako povoljne uvjete za razvoj aerobnih mezofilnih bakterija kojima je, osim povoljne temperature zraka, neophodna i vlaga za razmnožavanje, a time je vrlo slična površini krpe od mikrofibre. Za razliku od toga, unutrašnjost spužve je dovoljno topla, a uz to i odlično zadržava vlagu (Erdogrul i Erbilir, 2005; Dey i sur., 2020; Ramli i sur., 2020). Uz to, učenici često samo „brzinski“ operu spužve, čime se vjerojatno i ukloni dio bakterija s površine, no ne peru je dovoljno dobro da bi se detaljnije isprala njezina unutrašnjost. Iz tog je razloga zabilježen višestruko veći prosječni broj bakterija u središtu spužve, u odnosu na površinu (od 3 do 9 puta više).

U svom radu Erdogrul i Erbilir (2005), promatrajući broj bakterija u kuhinjskim spužvama, navode da je broj aerobnih mezofilnih bakterija nakon jednog tjedna (7. dan) iznosio 5,8 CFU/cm^2. Prosječne vrijednosti zabilježene sedmog dana korištenja sredstva za brisanje školske ploče u našem su istraživanju bile 0,89 CFU/cm^2 (krpe od mikrofibre), 2,11 CFU/cm^2 (površina spužvi) i 17,21 CFU/cm^2 (u sredini spužvi).

U istraživanju NSF-a (1950), koji je suradnički centar Svjetske zdravstvene organizacije (*engl. World Health Organisation*, WHO), nastojalo se analizirati na kojim je površinama najveći broj bakterija u školama. Tako se raspon broja bakterija na analiziranim površinama kretao od 186 CFU/cm^2 na rukama učenika te površini kaveza za laboratorijske životinje do čak 418500 CFU/cm^2 na površini pipe (fontane) iz koje su učenici pili vodu. U istom istraživanju, utvrđeni broj bakterija na površini školske ploče bio je 511,5 CFU/cm^2 (NSF, 1950). Navedeni rezultati opisanih istraživanja prikazuju moguće izvore kontaminacije bakterijama pri korištenju spužvi i krpa za brisanje različitih površina.
U on-line provedenoj mini anketi od strane profesorice biologije (Konjuh Reljić, 2024, pers. comm.), a kojom je obuhvaćena analiza učestalosti uporabe krpa od mikrofibre za brisanje školskih ploča u ukupno 25 škola (17 osnovnih i 8 srednjih škola) iz različitih dijelova Hrvatske, dobiveni su sljedeći rezultati: u 44 % anketiranih škola krpa od mikrofibre se nije upotrebljavala, dok je u preostalih 56 % škola prosječna zastupljenost uporabe krpa od mikrofibre za brisanje školskih ploča bila u 55 % učionica (u rasponu od 8 do 100 %). Pri tome je zanimljivo istaknuti da su se u tim školama krpe od mikrofibre većinom koristile za brisanje „bijelih ploča“ (ili su one brisane specijalnim spužvicama koje imaju plastični držak), dok su za „zelene ploče“ u najvećoj mjeri korištene spužve. U ovoj školi, koja je bila

obuhvaćena istraživanjem, krpe od mikrofibre se ranije nisu upotrebljavale za brisanje školske ploče (Konjuh Reljić, 2024, pers. comm.). U opisanoj školi se nalazi 40 učionica: 30 sa „zelenim pločama“ (koje su se brisale klasičnim školskim spužvama) te 10 učionica s „bijelim pločama“ (za koje su upotrebljavane specijalne spužvice). Na osnovu prikupljenih rezultata ovog istraživanja i usporedbe kretanja broja aerobnih mezofilnih bakterija u različitim pomagalima koja se u školama upotrebljavaju za brisanje školskih ploča, kao i na temelju istraživanja (Erdogrul i Erbilir, 2005; Dey i sur., 2020; Ramli i sur., 2020) koja analiziraju brojnost bakterija u spužvama korištenih u druge svrhe (za brisanje radnih površina u kućanstvu i sl.), bilo bi dobro razmotriti mogućnost prezentacije prednosti korištenja krpa od mikrofibre za brisanje školskih ploča, radi smanjenja potencijalnih izvora širenja bakterija.

ZAKLJUČCI

Nakon provedenog istraživanja i analize rezultata mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Oba sredstva za brisanje školske ploče – i spužve i krpe od mikrofibre sadrže mezofilne aerobne bakterije. Pri tome je broj bakterija tijekom promatranog razdoblja bio manji na krpama od mikrofibre nego u središtu spužve.
- Na kraju četverotjednog istraživanja, broj bakterija u središtu spužve bio je skoro trostruko veći nego na krpama od mikrofibre (134,54 CFU/cm^2 u središtu spužve, a 49,46 CFU/cm^2 na površini krpa od mikrofibre).
- Kod uzimanja uzoraka sa spužvi, neophodno je osim površinskog uzorka uzeti i dubinski (iz sredine), jer se površina brzo suši na zraku, a aerobne bakterije se u većem broju umnažaju u središtu koje zadržava vlagu, te učenici kod cijeđenja spužvi dolaze u doticaj s njima.
- Preporučljivo bi bilo za brisanje školskih ploča koristiti krpe od mikrofibre, s obzirom na jednostavnost pranja/ispiranja te bolju mogućnost cijeđenja i sušenja nakon uporabe. Na taj način bi se mogao smanjiti broj bakterija s kojima učenici (redari) dolaze u doticaj.

LITERATURA

Bartlett K. H., Kennedy S. M., Brauer M., van Netten C., Dill B. 2004. Evaluation and determinants of airborne bacterial concentrations in school classrooms. Journal of Occupational and Environmental Hygiene 1: 639–647.

Bešić A., Hrapović E., Čaklovica K. 2023. Uvod u metodologiju uzorkovanja. Metodologija uzorkovanja u okolišu. Sveučilište / Univerzitet „VITEZ“, Travnik, str. 17–78.

BiologyOnline 2001. Aerobic bacteria. Dictionary, https://www.biologyonline.com/dictionary/aerobic-bacteria, pristupljeno 19.11.2023.

Dey N., Farjees Fathima A., Shafinaz Filwa S., Sowjenya M. 2020. Microbial evaluation of domestic kitchen sponge. International Journal of Advanced Research in Engineering and Technology (IJARET) 11: 657–663.

Erdogrul O., Erbilir F. 2005. Microorganisms in Kitchen Sponges. Journal of Food Safety 6: 17–22.

Gregić Z. 2014. Bakterije kao najčešći uzročnici kvarenja namirnica biljnog i životinjskog podrijetla. Završni rad. Poljoprivredni fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, str. 1–5.

Karwowska E. 2003. Microbiological air contamination in some educational settings. Polish Journal of Enviromental Studies 12: 181–185.

Moore G., Griffith C. 2006. A laboratory evaluation of the decontamination properties of microfibre cloths. Journal of Hospital Infection 64: 379–385.

NSF. 1950. Germiest Places at School, https://www.nsf.org/blog/consumer/germiest-places-schools, pristupljeno 16.2.2024.

Ramli P. R., Syakira Salman H., Sariza Sazari L. N., Azmi A. 2020. Evaluating microbiological quality of kitchen equipment in school canteens. Health Scope 3: 49–53.

Vučemilo M., Tofant A. 2009. Sanitacija. Praktikum – Okoliš i higijena držanja životinja. Naklada Slap, Jastrebarsko, str. 119–146.

Wang Z. 2007. Potential pathogens in the school environment. Journal of Student Research, https://minds.wisconsin.edu/bitstream/handle/1793/52929/Pathogens.pdf?sequence=1&isAllowed=y, pristupljeno 12.12.2003.

ZZJZDNZ. 1996. Aerobne mezofilne bakterije. Rječnik pojmova, https://www.zzjzdnz.hr/hr/o-nama/rjecnik-pojmova/960, pristupljeno 19.11.2023.