Fotosintetski pigmenti u listovima posidonije (Posidonia oceanica (L.) Delile) zadarskog akvatorija

Cvrtila, Adam

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:398634

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Adam Cvrtila

Fotosintetski pigmenti u listovima posidonije (*Posidonia oceanica* (L.) Delile) zadarskog akvatorija

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj rad je izrađen u Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Željke Vidaković-Cifrek. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Iskreno se zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Željki Vidaković-Cifrek na mogućnosti izrade ovog rada. Hvala na pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada te trudu i uloženom vremenu. Hvala na konstruktivnim savjetima, pomoći prilikom pisanja rada te uvijek ugodnim razgovorima.

Zahvaljujem se i izv. prof. Mirti Tkalec na pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela.

Hvala svim članovima Laboratorija za fiziologiju bilja na ljubaznosti, susretljivosti i spremnosti na pomoć.

Veliko hvala i svim mojim prijateljima, kolegama i poznanicima na strpljenju, suradnji i zajedničkim druženjima.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji što mi je omogućila ovaj studij. Hvala za bezuvjetnu ljubav, podršku, razumijevanje te posebice za strpljenje.

Adam

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

Fotosintetski pigmenti u listovima posidonije (*Posidonia oceanica* (L.) Delile) zadarskog akvatorija

Adam Cvrtila
Rooseveltov trg 6, Zagreb

Posidonija (*Posidonia oceanica* (L.) Delile) je morska cvjetnica i endem Sredozemnog mora. Izrazito je osjetljiva vrsta pa je stoga pogodan bioindikator stanja u morskom okolišu. Cilj istraživanja bio je utvrditi količine fotosintetskih pigmenata (klorofila *a* i *b* te ukupnih karotenoida) u intermedijarnim listovima posidonije prikupljenim na dubinama od 2 (3) i 10 m na tri različita lokaliteta zadarskog akvatorija (Zadarski kanal, Zaglav i Brbišćica) u četiri godišnja doba. Rezultati istraživanja pokazali su da udjeli fotosintetskih pigmenata imaju sličan sezonski trend promjena vrijednosti na pojedinoj dubini i lokalitetu. Određeno odstupanje uočeno je u količini ukupnih karotenoida u biljkama iz Zadarskog kanala i dubine od 2 m. U Zaglavu je na 10 m dubine količina pigmenata tijekom godine bila relativno konstantna zbog zasjenjenosti staništa. Omjer klorofila *a* i *b* je većinom bio viši na dubini od 10 m, dok se omjer klorofila i karotenoida na obje dubine pokazao konstantnim samo za Brbišćicu. Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti iz ekstrakta listova posidonije razdvojeni su klorofil *a* i *b*, neoksantin, violaksantin, lutein, β-karoten, i α-karoten. S obzirom na ovisnost količine fotosintetskih pigmenata o okolišnim uvjetima mogu zaključiti da bi oni mogli biti dobri pokazatelji promjena u okolišu.

(59 stranica, 22 slike, 5 tablica, 54 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi:klorofil *a*, klorofil *b*, karotenoidi, tankoslojna kromatografija, HPLC

Voditelj: Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.

Ocjenjitelji: Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.
Dr. sc. Jasna Hrenović, izv. prof.
Dr. sc. Petar Kružić, doc.

Rad prihvaćen: 05.02.2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Divison of Biology

Graduation Thesis

Photosynthetic pigments in the leaves of seagrass (*Posidonia oceanica* (L.) Delile) in the coastal area of Zadar

Adam Cvrtila

Rooseveltov trg 6, Zagreb, Croatia

Marine phanerogam *Posidonia oceanica* (L.) Delile is an endemic species of the Mediterranean Sea. It is extremly sensitive and therefore suitable bioindicator of changes in the marine environment. The aim of this study was to determine the photosynthetic pigments content (chlorophyll *a* and *b* and total carotenoids) in the intermediate leaves of *P. oceanica* collected at depths of 2 (3) and 10 m at three different sites of the coastal area of Zadar (Zadarski kanal, Zaglav and Brbišćica Bay) during the four seasons. The content of photosynthetic pigments have a similar trend of seasonal changes at a particular depth and site. Certain deviation was observed in the amount of total carotenoids in plants from Zadarski kanal at depth of 2 m. In Zaglav Bay at 10 m depth the amount of pigments was relatively constant during the four seasons due to shaded habitat. The ratio of chlorophyll *a* and *b* was mostly higher at a depth of 10 m, while the ratio of total chlorophylls and carotenoids on both depths was constant for Brbišćica Bay. High performance liquid chromatography of *P. oceanica* leaves extracts separated chlorophyll *a* and *b*, neoxanthin, violaxanthin, lutein, β-carotene, and α-carotene. Observed dependence of the quantity of photosynthetic pigments on environmental conditions leads to conclusion that they could be good indicators of environmental changes.

(59 pages, 22 figures, 5 tables, 54 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, carotenoids, thin layer chromatography, HPLC

Supervisor: Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof.

Dr. Jasna Hrenović, Assoc. Prof.

Dr. Petar Kružić, Asst. Prof.

Thesis accepted: 05.02.2015.

Popis kratica

JL – juvenilni list

IL – intermedijarni list

AL – adultni list

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. high pressure liquid chromatography)

PCA – analiza glavnih komponenti (eng. principal component analysis)

VAZ – violaksantin-anteraksantin-zeaksantin

DPI – intenzitet dnevne svjetlosti (eng. daily photon irradiance)

DAD – detektor s nizom dioda (eng. diode array detector)

DHMZ – Državni hidrometeorološki zavod

ROS – reaktivni oblici kisika (eng. reactive oxygen species)

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1. Općе značajke posidonije 1
2. Utjecaj okolišnih čimbenika na fotosintetske pigmente 4
3. Građa i uloga fotosintetskih pigmenata u biljci 5
3.1.1. Klorofili 5
3.1.2. Biosinteza klorofila 7
3.2.1. Karotenoidi 8
3.2.2. Biosinteza karotenoida 9
4. Apsorpcijski spektri fotosintetskih pigmenata 10
5. Metode određivanja fotosintetskih pigmenata u ekstraktima biljnih tkiva 11

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 13

3. MATERIJAL I METODE 14

3.1. Biljni materijal 14
3.1.1. Priprema uzoraka 14
3.1.2. Opis postaja i staništa 14
3.2. Određivanje udjela fotosintetskih pigmenata 16
3.2.1. Priprema biljnih ekstrakata 16
3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje fotosintetskih pigmenata 17
3.3. Razdvajanje fotosintetskih pigmenata tankoslojnom kromatografijom 18
3.3.1. Liofilizacija vodene leće 18
3.3.2. Izrada ploča za tankoslojnu kromatografiju 18
3.3.3. Ekstrakcija fotosintetskih pigmenata za tankoslojnu kromatografiju 19
3.3.4. Tankoslojna kromatografija 19
4.1. Određivanje apsorpcijskih spektara fotosintetskih pigmenata 20
5.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) 20
5.1.1. Izrada standarda fotosintetskih pigmenata 22
6.1. Obrada rezultata 23

4. REZULTATI 24

4.1. Udio fotosintetskih pigmenata u intermedijarnim listovima posidonije 24
4.1.1.Udio klorofila a 24
4.1.2. Udio klorofila b 26
4.1.3. Udio ukupnih klorofila 28
4.1.4. Udio ukupnih karotenoida 30
4.1.5. Omjer klorofila a i klorofila b 32
4.1.6. Omjer ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida 34
4.2. Tankoslojna kromatografija fotosintetskih pigmenata posidonije i vodene leće 36
4.3. Apsorpcijski spektri fotosintetskih pigmenata 39
4.4. Analiza uzoraka posidonije tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti 41
4.5. Analiza glavnih komponenti (PCA) 43

5. RASPRAVA 45

5.1. Udjeli fotosintetskih pigmenata u listovima posidonije na različitim lokalitetima i dubinama 45
5.2. Tankoslojna kromatografija i apsorpcijski spektar fotosintetskih pigmenata 49
5.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti 50

6. ZAKLJUČAK 52

7. LITERATURA 53

8. ŽIVOTOPIS 59

1. UVOD

1. Opće značajke posidonije

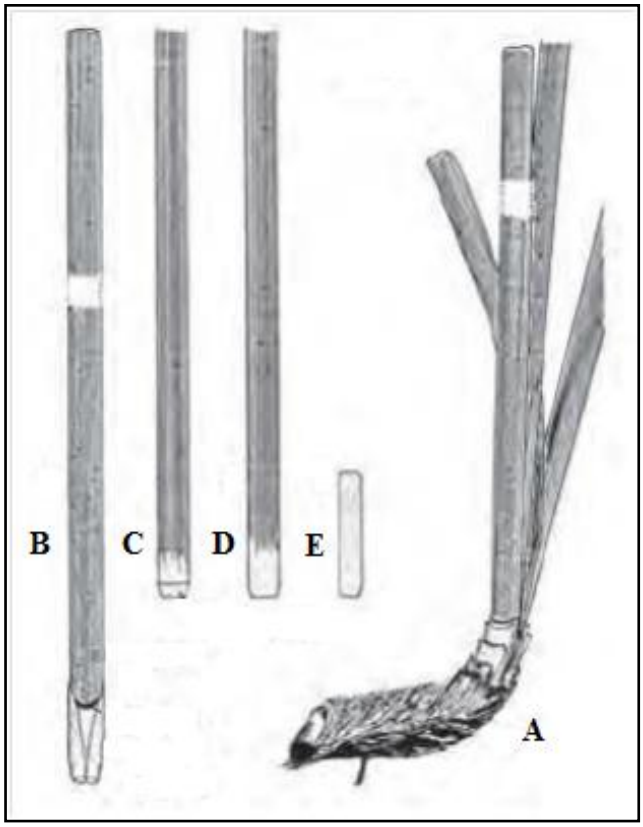
Posidonija, oceanski porost ili voga (*Posidonia oceanica* (L.) Delile) je morska cvjetnica koja spada u porodicu Posidoniaceae i red Alismatales. Od devet vrsta roda Posidonia (Kuo i den Hartog 2001), *Posidonia oceanica* je endemska vrsta za područje Mediterana. Unatoč sporom rastu (nekoliko centimetara godišnje) najraširenija je vrsta morske trave na tom području i prekriva površinu od oko 50 000 četvornih kilometara. Raste u plitkim, obalnim područjima pa sve do dubine od 50-60 m u vrlo čistim morima (Borum i sur. 2004) tvoreći prostrane podvodne livade (Slika 1) koje prekrivaju oko 1-2 % površine morskog dna (Boudoresque i sur. 2006).



Slika 1.*Posidonia oceanica* (L.) Delile (slika preuzeta s http://www.oceanrangerscyprus.org/cause-view/project-poseidon-conservation-poseidonia-oceanica-cyprus-artificial-reef/).

Posidonija je građena od rizoma, korijenja i listova. Rizomi (stabljike) su obično zakopani u sedimentu i jako su lignificirani što ih čini manje savitljivima (Borum i sur. 2004). S obzirom na smjer rasta mogu biti puzajući (plagiotropni) ili uzdignuti (ortotropni). Na rizomima se nalazi korijenje koje može narasti i do 70 cm ispod površine sedimenta. Rizomi završavaju u grupama od 4-8 listova (izdanaka) koji su široki oko 8-11 mm i dugački od 20-80 cm. Listovi se formiraju tijekom cijele godine i s obzirom na duljinu i morfologiju, možemo razlikovati tri tipa listova (Slika 2). Listovi koji su kraći od 5 cm su juvenilni listovi,

dok one veće od 5 cm, ali bez bazalne peteljke, nazivamo intermedijarnim listovima. Adultni listovi su oni kod kojih je rast završen te je formirana bazalna peteljka (Bodouresque i sur. 2012).



Slika 2. Shematski prikaz različitih tipova listova posidonije, ovisno o starosti: A – listovi različite starosti jednog izdanka; B – adultni list; C i D – intermedijarni listovi; E – juvenilni list (slika preuzeta i prilagođena prema Bodouresque i sur. 2012).

Posidonija se može razmnožavati spolnim i nespolnim (vegetativnim) putem. Cvjetanje se događa ujesen (između rujna i studenog) i razvijaju se dvospolni cvjetovi (4-10) koji su organizirani u cvat. Plodu treba oko 6-9 mjeseci da sazrije i na proljeće se otkine, ispliva na površinu te pluta neko vrijeme nošen morskim strujama. Svaki plod sadrži samo jedno sjeme (Den Hartog 1970, Boudoresque i Meinesz 1982, citirano u Bodouresque i sur. 2012). Međutim, zbog malog broja vijabilnih plodova koji nastanu, niske stope preživljenja zrelih plodova i mladih biljaka, prevladava vegetativno razmnožavanje i to pomoću otkinutih dijelova rizoma (Borum i sur. 2004).

Rast i rasprostranjenost posidonije ovisi o fizikalnim, kemijskim i biološkim uvjetima u okolišu u kojem živi. Osnovni uvjeti za njen razvoj slični su uvjetima koji su potrebni za

razvoj terestričkih vrsta, međutim, vodena sredina se bitno razlikuje od terestričkog okoliša posebice zbog ograničavajućih količina ili dostupnosti određenih faktora (Borum i sur. 2004). Svjetlost je jedan od najvažnijih faktora koji utječu na rasprostranjenost i gustoću posidonije (Elkalay i sur. 2003, citirano u Bodouresque i sur. 2012). Nadalje, ona nastanjuje samo morske vode s visokom razinom saliniteta i u usporedbi s drugim morskim cvjetnicama ne podnosi velike varijacije saliniteta. Isto tako, raste natoplijim staništima u kojima je raspon temperature od 10 ºC do 30 ºC. (Borum i sur. 2004).

Zbog široke rasprostranjenosti u Mediteranu i visoke osjetljivosti na promjene okolišnih uvjeta, posidonija bi mogla biti potencijalni bioindikator kvalitete morske vode (Pergent 1991, citirano u Ferrat i sur. 2003). Iz literature je poznato da se već koristi u biomonitoringu morskih okoliša (Boudouresque i sur. 2000) pri čemu se kao pokazatelji učinka okolišnih uvjeta koriste morfološki parametri poput prosječnog broja izdanaka, biomase po kvadratnom metru (Borum i sur., 2004), ali i različite biokemijske reakcije koje su uključene u fotosintetsku aktivnost, sintezu sekundarnih metabolita, mehanizme oksidacijskog stresa i druge (Ferrat i sur. 2003).

U laboratoriju za biljnu fiziologiju Botaničkog zavoda Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta je dosad provedeno istraživanje udjela fenolnih spojeva te aktivnosti enzima uključenih u njihov metabolizam u cilju utvrđivanja njihove prikladnosti kao pokazatelja promjena u okolišu (Vidaković-Cifrek i sur. 2014).

2. Utjecaj okolišnih čimbenika na fotosintetske pigmente

Fotosintetski pigmenti su molekule koje imaju važnu ulogu u fotosintezi jer mogu apsorbirati Sunčevu svjetlost. Dijelimo ih na klorofile, od kojih su u biljkama najzastupljeniji klorofil *a* i *b*, te na karotenoide. Unutar karotenoida razlikujemo dvije skupine – karotene (β-karoten) i ksantofile (neoksantin, violaksantin i lutein) (Taiz i Zeiger 2010).

Duljina dana i temperatura (Herbinger i sur. 1999), salinitet (Khavari-Nejad i Mostofi 1998) ili onečišćenje česticama prašine (Mandre i Tuulmets 1995) mogu utjecati na sadržaj fotosintetskih pigmenata u listovima kopnenih i vodenih biljaka stoga različiti okolišni uvjeti mogu biti dobar pokazatelj kako okoliš djeluje na biljke.

Esteban i sur. (2014) su napravili analizu radova koji sadrže rezultate djelovanja različitih stresnih uvjeta na fotosintetske pigmenate. Obrađeno je djelovanje velikog broja stresnih uvjeta kao što su npr. niska i visoka temperatura, hladnoća, suša, prisutnost ozona u troposferi, salinitet tla, povišeni volumni udio CO_2 u atmosferi i promjena godišnjih doba. Analiza je pokazala da su omjeri Chl *a*:Chl *b*, Neo:Chl i β-Car:Chl među najstabilnijim parametrima bez obzira na to koji su stresni uvjeti primijenjeni. Do značajnih promjena u usporedbi s kontrolom je kod omjera Chl *a*:Chl *b* došlo samo u uvjetima niske temperature, dok je sezonska promjena utjecala na omjer Neo:Chl. Za razliku od njih, ukupni klorofili (Chl *a* + *b*) te omjeri Lut:Chl i VAZ:Chl pokazali su se kao parametri koji su pod jačim utjecajem stresnih uvjeta. Pokazalo se da na ukupne klorofile najviše utječu promjene godišnjih doba i salinitet, dok na dva spomenuta omjera najviše utječe niska temperatura.

Svjetlost, kao najznačajniji faktor koji utječe na fotosintetske pigmente je analizirana posebno. Odgovor pojedinih pigmenata na različite DPI vrijednosti (intenzitet dnevne svjetlosti izražen u mol m^{-2} d^{-1}) značajno se razlikovao. Od svih omjera jedino je omjer Neo:Chl ostao nepromijenjen povećanjem DPI, dok je kod ostalih primijećena značajna ovisnost o promjeni svjetlosnih uvjeta. Povećani DPI je u pozitivnoj korelaciji s omjerima Lut:Chl, VAZ:Chl, β-Car:Chl i Chl *a*:Chl *b*, dok je za vrijednosti ukupnih klorofila u negativnoj korelaciji.

Osim navedenih stresnih uvjeta, na sadržaj i omjer fotosintetskih pigmenata utječu i druge tvari prisutne u okolišu poput ksenobiotika (npr. herbicida) (Brain i Cedergreen 2009) i teških metala (Myśliwa-Kurdziel i sur. 2004) koji mogu imati utjecaj na pigmente djelovanjem na određene enzime u njihovom biosintetskom putu. Prema tome, pigmenti mogu ukazati na stanje i promjene u okolišu i u prisutnosti takvih tvari.

3. Građa i uloga fotosintetskih pigmenata u biljci

Fotosintetski pigmenti su molekule koje imaju važnu ulogu u fotosintezi. Fotosinteza je proces u kojem se iskorištava energija Sunčeve svjetlosti za sintezu organskih spojeva iz anorganskih. Uloga fotosintetskih pigmenata u fotosintezi je apsorpcija Sunčeve svjetlosti određenih valnih duljina (plavi i crveni dio spektra vidljive svjetlosti) i prijenos energije na druge molekule. Svi pigmenti koji su aktivni u fotosintezi nalaze se u tilakoidnim membranama kloroplasta, vezani uz proteinske komplekse – fotosisteme. Njihov sadržaj je zapravo, vrlo konstantan među vaskularnim biljkama, mahovinama i zelenim algama. Većina pigmenata organizirana je u „kompleks antena“ koje apsorbiraju svjetlost i prenose energiju do molekule klorofila *a* u reakcijskom centru u kojem se događa pretvorba svjetlosne energije u kemijsku (Taiz i Zeiger 2010).

Iako se većina bioloških pigmenata može klasificirati u ne više od pet ili šest većih strukturnih grupa, tri su osnovne grupe pigmenata koje mogu „uhvatiti“ energiju koja je potrebna za reakcije fotosinteze. U te grupe spadaju klorofili (koje nalazimo u svim fotosintetskim biljkama i cijanobakterijama), karotenoidi (koje imaju svi fotosintetski organizmi) i fikobiliproteini (u cijanobakterija i crvenih alga) (González 2001).

3.1.1. Klorofili

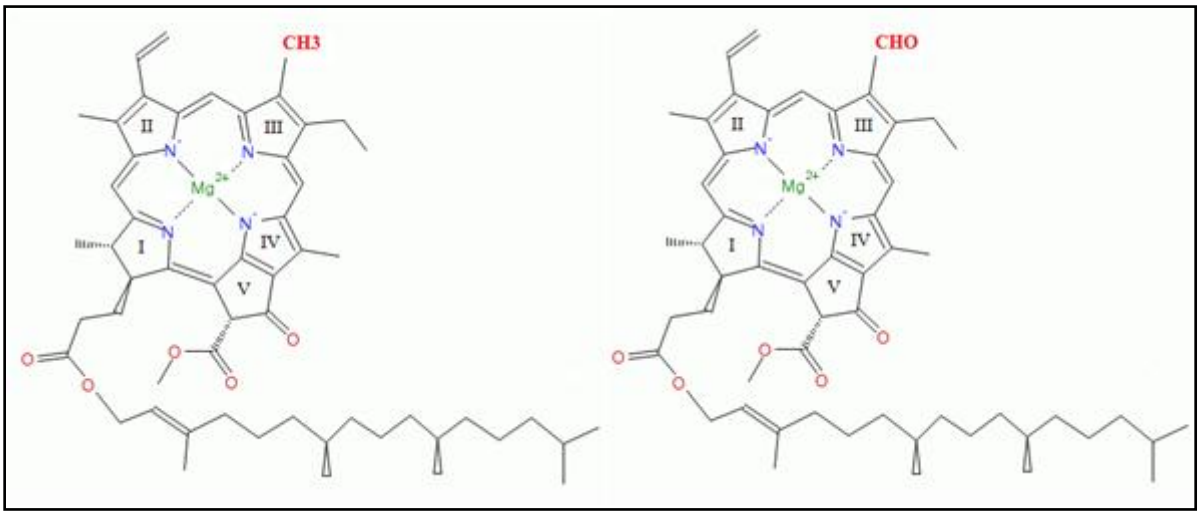
Klorofili su pigmenti koji daju biljkama karakterističnu zelenu boju i najvažniji su spojevi na Zemlji zbog svoje uloge u apsorpciji i prijenosu svjetlosne energijeu fotosintezi. Upravo su klorofili odgovorni za direktnu apsorpciju i prijenos najvećeg udjela svjetlosne energije u procesu fotosinteze.

Pripadaju skupini spojeva koji se nazivaju tetrapiroli. Za razliku od drugih tetrapirola kao što su hem ili vitamin B12, klorofili u središtu molekule imaju atom magnezija vezan koordinacijskim vezamai dodatni peti, tzv. izociklički prsten (Willows 2004). S obzirom na strukturu, postoji nekoliko različitih vrsta klorofila – klorofil *a, b, c* i *d* te bakterioklorofili koji su nađeni u određenim vrstama bakterija. Klorofili *c* i *d* pronađeni su u nekih protista i cijanobakterija (Taiz i Zeiger 2010) i moguće je da imaju evolucijsku značajku zbog prisutnosti u samo određenim skupinama organizama (González 2004). Klorofili *a* i *b* su zastupljeni u zelenim biljkama dajući im karakterističnu boju zbog snažne apsorpcije u plavom i crvenom dijelu spektra.

Klorofil *a* je najznačajniji (primarni) fotosintetski pigment jer se nalazi u reakcijskom središtu fotosistema i omogućuje pretvorbu svjetlosne energije u kemijsku, dok sve ostale klorofile i druge fotosintetske pigmente nazivamo sekundarnima zbog pomoćne i zaštitne uloge (Taiz i Zeiger 2010). Svaki kloroplast sadrži otprilike 600 milijuna molekula klorofila (Simpson i Knoetzel 1995, citirano u Wettstein i sur. 1995) koje čine oko 4 % suhe mase kloroplasta (González 2001).

Osnovnu strukturu klorofila čini porfirinski prsten sastavljen od četiri povezana pirolova prstena označena oznakama od I do IV te peti prsten (V) koji nastaje reakcijom ciklizacije bočnog lanca (propionska kiselina) na prstenu III. U sredini molekule se nalazi magnezijev ion (Mg^{2+}) koji je vezan na atome dušika pirolovih prstena s četiri koordinacijske veze. Na četvrtom (IV) prstenu je esterskom vezom vezan fitol (Von Wettstein i sur. 1995). Fitol nastaje spajanjem četiri izoprenske jedinice i ovaj dugački, hidrofobni lanac čini klorofile vrlo topljivima u lipidima te omogućuje njihovo smještanje u hidrofobno okružje tilakoidne membrane (González 2001).

Razlika u strukturi klorofila *a* i *b* je vidljiva na trećem (III) pirolovom prstenu. Klorofil *a* na toj poziciji ima metilnu skupinu ($-CH_3$), dok je kod klorofila *b* to aldehidna skupina (-CHO) (Von Wettstein i sur. 1995) (Slika 3).



Slika 3. Struktura klorofila *a* (lijevo) i klorofila *b* (desno) (slika preuzeta i prilagođena prema https://www.emolecules.com/).

3.1.2. Biosinteza klorofila

Biosintetski put klorofila sastoji se od niza reakcija koje se odvijaju u plastidima, a cijeli put se može podijeliti u četiri faze. Prvu fazu čini stvaranje osam molekula δ-aminolevulinske kiseline (δ-ALA) iz kojih će asimetričnom kondenzacijom po dvije molekule nastati četiri molekule porfobilinogena (Taiz i Zeiger 2010). Dva su različita puta njene sinteze – jedan uključuje kondenzacijsku reakciju glicina i sukcinil-CoA, a drugi je reakcija u tri koraka iz glutamata. Prvi se odvija u životinja, gljiva, kvasaca i nekih bakterija, dok je drugi put karakterističan za biljke, cijanobakterije i archea (Tanaka i Tanaka 2007).

Druga faza uključuje nekoliko reakcija u kojima će sastavljanjem četiriju molekula porfobilinogena nastati porfirinski prsten. Postepenom deaminacijom molekula porfobilinogena nastaje tetrapirol 1-hidroksimetilbilan. Izomerizacijom prstena IV dolazi do spajanja četiri prstena u jedan veći, porfirinski prsten te nastaje spoj uroporfirinogen III. Daljnjim nizom od tri reakcije dobiva se protoporfirin IX sa sustavom konjugiranih dvostrukih veza. Protoporfirin IX možemo nazvati mjestom grananja biosintetskog puta, jer insercijom iona željeza nastaje hem, a insercijom iona magnezija nastavlja se biosinteza klorofila.

Insercijom magnezijevog iona (Mg^{2+}) u protoporfirin IX započinje treća faza biosintetskog puta klorofila i nastavlja se esterifikacijom lanca prstena IV radi pripreme za reakciju ciklizacije kojom se dobije prsten V te nastaje divinil protoklorofilid. Redukcijom divinil protoklorofilida dobiva se protoklorofilid iz kojeg još jednom redukcijom nastaje klorofilid *a*.

Zadnja, četvrta faza biosintetskog puta uključuje enzim klorofil sintetazu koja katalizira reakciju esterifikacije prstena IV fitil pirofosfatom čime nastaje klorofil *a* (Taiz i Zeiger 2010).

Sinteza klorofila *b* odvija se uz pomoć oksigenaze koja katalizira konverziju klorofila *a* u klorofil *b*, a reverznu reakciju katalizira reduktaza koja je također nađena u kloroplastima (Rüdiger 2002).

3.2.1. Karotenoidi

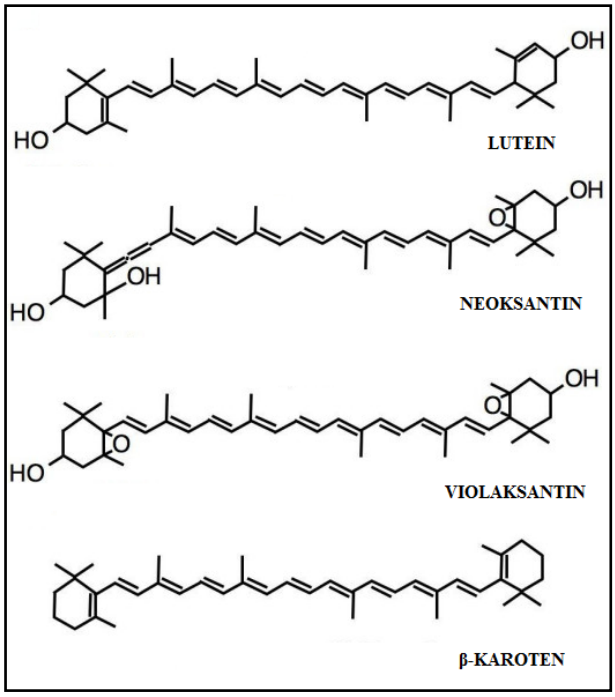
Karotenoidi su druga najbrojnija grupa pigmenata u biljkama i nalazimo ih i u fotosintetski aktivnim i neaktivnim tkivima (González 2001). One koji se nalaze u zelenim, fotosintetski aktivnim tkivima klasificiramo kao primarne karotenoide, dok one koji daju boju plodovima i cvjetovima kao sekundarne (Lichtenthaler 1987). Skoro svi karotenoidi sintetizirani su iz tetraterpena, spoja sa 40 C-atoma čiji je ugljikovodični skelet sastavljen od osam izoprenskih jedinica od 5 C-atoma (Britton 1983). Jednostavna lančana struktura skeleta je ili linearna ili sadrži cikličke grupe na krajevima (Cuttriss i Pogson 2004).

Karotenoidi imaju dvije važne uloge u fotosintezi. Osim što djeluju kao pomoćni pigmenti u apsorpciji svjetlosti proširujući raspon valnih duljina koje pokreću fotosintezu, karotenoidi imaju i ulogu u zaštiti klorofila od fotooksidacije koja bi uzrokovala oštećenja fotosintetskog aparata (Cogdell 1978) što bi dovelo do pada stope fotosinteze.

Izolirani karotenoidi (u obliku čvrste tvari ili u otopini) su poput klorofila izrazito osjetljive molekule kod kojih pod utjecajem jake svjetlosti, povišene temperature ili u prisutnosti kiselina i nekih baza dolazi do autooksidacije ili različitih izomerizacija. Međutim, u uvjetima *in vivo* pigmenti su vezani za različite proteine ili lipidne molekule membrana te su u tim uvjetima zaštićeni od ranije navedenih učinaka (Britton 1983) i stoga stabilniji.

Skupina karotenoida može se podijeliti u dvije grupe – na spojeve bez kisika koje nazivamo karotenima i na ksantofile koji sadrže kisik u različitim oblicima. Tipične boje karotenoida kojesu u rasponu od žutog do crvenog dijela vidljivog spektra posljedica su postojanja niza konjugiranih dvostrukih veza, a raspon boja može se povećati različitim modifikacijama skeleta (Cuttriss i Pogson 2004).

Karoteni koji se nalaze u viših biljaka i zelenih algi su α i β-karoten. Od ksantofila, lutein, violaksantin i neoksantin su u kloroplastima prisutni u većoj količini (uz β-karoten) (Slika 4) za razliku od zeaksantina, anteraksantina i luteinepoksida. Udio karotenoida u biljci ovisi o uvjetima rasta i različitim stresnim faktorima (Lichtenthaler 1987).



Slika 4. Strukture najvažnijih karotenoida
(slika preuzeta i prilagođena prema http://www.biomedcentral.com/1471-2229/6/13).

3.2.2. Biosinteza karotenoida

U biljaka se cijeli put biosinteze karotenoida odvija u plastidima te su poznati gotovo svi enzimi uključeni u te reakcije. Započinje kondenzacijskom reakcijom četiriju molekula isopentenil-pirofosfata (IPP), izoprenske jedinice od 5 C-atoma. Njihovom kondenzacijom nastaje spoj od 20 C-atoma, geranilgeranil-pirofosfat (GGPP). Spajanjem dviju molekula GGPP-a nastaje prvi karotenoid fitoen, spoj od 40 C-atoma. Potom se dvjema desaturazama dodaju konjugirane dvostruke veze te naposljetku nastaje likopen. Njegova ciklizacija je točka grananja u biosintezi karotenoida. Ciklizacija krajeva likopena pomoću dva različita enzima rezultira nastankom α-karotena ili β-karotena koji se dalje modificiraju hidroksilacijama ili epoksidacijama. Uvođenjem hidroksi ili epoksi grupe u α-karoten nastat će lutein i luteinepoksid, dok je β-karoten prekursor zeaksantina, violaksantina, neoksantina i anteraksantina (Tanaka i sur. 2008).

4. Apsorpcijski spektri fotosintetskih pigmenata

Svaki fotosintetski pigment ima svoj jedinstveni apsorpcijski spektar s apsorpcijskim maksimumima pri određenim valnim duljinama (Britton 1983).

Klorofili najbolje apsorbiraju svjetlost u plavom i crvenom dijelu vidljivog spektra. Apsorpcijski maksimum za klorofil *a* u plavom dijelu spektra je na otprilike 430 nm, a u crvenom dijelu na 660 nm. Pozicija apsorpcijskih maksimuma klorofila *b* je između dvaju maksimuma klorofila *a*, i to na oko 450 i 640 nm. Precizne vrijednosti valnih duljina za dva glavna apsorpcijska maksimuma oba klorofila ovise o polarnosti otapala u kojem se nalaze. Tako se s povećanjem polarnosti i/ili udjela vode ove vrijednosti pomiču prema duljim valnim duljinama (Lichtenthaler 1987).

Apsorpcijski spektar svih fotosintetski aktivnih karotenoida pokazuje tri karakteristična apsorpcijska maksimuma (violaksantin i neoksantin) ili dva maksimuma s jednim manje izraženim (lutein i α- i β-karoten) u plavom dijelu spektra. Za karotene koji nemaju kisikove atome, maksimumi apsorpcije su pomaknuti prema većim valnim duljinama, dok su kod ksantofila zbog prisutnosti hidroksilnih skupina pomaknuti prema kraćim valnim duljinama. Njihov položaj, kao i kod klorofila, ovisi o tipu otapala i udjelu vode (Lichtenthaler 1987).

5. Metode određivanja fotosintetskih pigmenata u ekstraktima biljnih tkiva

Svojstvo apsorpcije svjetlosti ima iznimnu važnost u istraživanjima fotosintetskih pigmenata. Apsorpcijska spektroskopija koja prati apsorpciju UV zračenja i vidljive svjetlosti je osnovna spektroskopska metoda za određivanje fotosintetskih pigmenata. Apsorpcijski spektar u vidljivom dijelu zračenja pokazat će barem jedan apsorpcijski maksimum pri određenoj valnoj duljini koji je karakterističan za pojedini pigment. Uz ovu činjenicu i uz to da svaki pigment ima određeni oblik apsorpcijskog spektra, ova metoda se najčešće koristi kao prvo sredstvo identifikacije pigmenata (Britton 1983).

Spektrofotometrija je metoda kojom se intenzitet apsorpcije zračenja ispitivane molekule (za bilo koju valnu duljinu) izražava kao apsorbancija koja je ovisna o koncentraciji molekule u otopini. Uzimajući u obzir i put koji pređe svjetlost, molarni apsorpcijski koeficijent ispitivane molekule te izmjerenu apsorbanciju, lako se može pomoću Beer–Lambert-ovog zakona izračunati koncentracija molekule u otopini (Skoog i sur. 1999)

Kombinacija spektroskopske detekcije i kromatografskih tehnika poput tankoslojne kromatografije i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti je dobar odabir kada je cilj provesti kvantitativnu analizu ukupnih ili pojedinih pigmenata u uzorku (Britton 1983).

Kromatografija je tehnika u kojoj se sastojci smjese odjeljuju ovisno o brzinama kojima ih plinovita ili tekuća mobilna faza nosi kroz kolonu stacionarne faze (Skoog i sur. 1999).

Tankoslojna kromatografija je vrsta adsorpcijske kromatografije koja se provodi na tankom sloju adsorbensa (stacionarna faza) nanesenog na ravnu plohu. Mobilna faza u tankoslojnoj kromatografiji prolazi kroz stacionarnu fazu pod utjecajem kapilarnih sila ili gravitacije (Skoog i sur. 1999). Pritom se komponente smjese razdvajaju na temelju različite adsorpcije na istom adsorbensu. Za analizu pigmenata se kao stacionarna faza najčešće koristi silikagel koji je izrazito polaran, dok se kao mobilna faza koristi smjesa nepolarnih otapala. U tom slučaju će se na stacionarnoj fazi prvo izdvojiti polarniji pigmenti koji će se vezati za silikagel, dok će nepolarniji pigmenti duže putovati otopljeni u mobilnoj fazi (Reiss 1994).

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) temelji se na propuštanju uzorka kroz kolonu pumpanjem mobilne faze pod jako velikim pritiskom. Korištenjem visokog tlaka poboljšava se rezolucija kromatograma. Tijekom same kromatografije može se koristiti izokratična eluacija kod koje se sastav mobilne faze ne mijenja ili gradijentna eluacija čiji je sastav mobilne faze promjenjiv. Stacionarnu fazu čine sitne čestice (veličine 5-15 μm) čime se povećava površina za interakciju uzorka i stacionarne faze. Zbog tih specifičnih

interakcija, vrijeme zadržavanja komponenti uzorka će biti različito i ovisiti o prirodi tvari koja se analizira, stacionarnoj i mobilnoj fazi. Vrijeme koje je potrebno određenoj komponenti da prođe kroz kolonu naziva se retencijsko vrijeme i ono je specifično za svaku tvar.

RP-HPLC (Reverse phase HPLC; HPLC na reverznim fazama) je oblik tekućinske kromatografije u kojoj je stacionarna faza nepolarna, dok je mobilna polarna. Stacionarnu fazu čine čestice silikagela koje na površini, preko silanolnih skupina (Si-O-H), imaju vezane ugljikovodične lance od 18 C-atoma. Mobilna faza je smjesa organskih otapala i vode. Ovaj tip kromatogafije je bolji za analizu fotosintetskih pigmenata zbog njihove prirode, tj. strukture. Tako se pri analizi pigmenata oni koji su manje polarni zadržavaju dulje na koloni od onih polarnijih koji izlaze prvi i prema tome imaju kraće retencijsko vrijeme (Skoog i sur. 1999).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je utvrditi postoji li razlika u količini fotosintetskih pigmenata (klorofila *a* i *b* te ukupnih karotenoida) u intermedijarnim listovima posidonije prikupljenim na dubinama od 2 (3) i 10 m na tri različita lokaliteta zadarskog akvatorija (Zadarski kanal, Zaglav i Brbišćica) u četiri godišnja doba. Obradom rezultata u koju ću uključiti i podatke o slanosti, prozirnosti i temperaturi mora te osunčanosti i primarnoj produkciji posidonije, utvrdit ću utječu li ti čimbenici na fotosintetske pigmente. Također ću metodama tankoslojne kromatografije i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti razdvojiti fotosintetske pigmente iz ekstrakata intermedijarnih listova posidonije i dobivene rezultate usporediti sa sadržajem pigmenata u vodenoj leći (*Lemna minor* L.) te podacima iz literature. Na temelju dobivenih rezultata procijenit ću mogu li fotosintetski pigmenti biti dobri pokazatelji stanja i promjena u okolišu.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Biljni materijal

Za ekstrakciju i određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata koristio sam morsku cvjetnicu *Posidonia oceanica* (L.) Delile. Uzorci posidonije prikupljeni su na tri lokaliteta – na području Zadarskog kanala i u uvalama Brbišćica i Zaglav na Dugom otoku te na dvije dubine – 2 i 10 m u Zadarskom kanalu, odnosno 3 i 10 m u uvalama Brbišćica i Zaglav. Uzorkovanje je provedeno četiri puta, u travnju, lipnju i listopadu 2011. te veljači 2012. godine.

Istraživanje sam proveo na ukupno 24 serije uzoraka (tri lokaliteta, dvije dubine i četiri godišnja doba) od kojih je svaka serija sadržavala po 7 replika.

3.1.1. Priprema uzoraka

Za laboratorijsko istraživanje koristio sam intermedijarne listove posidonije koji su već prethodno bili pripremljeni za moj pokus na sljedeći način: Na mjestu uzorkovanja listovi su zamrznuti u tekućem dušiku, a potom je u laboratoriju slijedila liofilizacija (liofilizator Alfa 1-2, Christ, Njemačka) te usitnjavanje pomoću uređaja za homogenizaciju (Mixer Mill MM200, Retsch, Njemačaka). Usitnjavanje je provedeno na način da su liofilizirani listovi prvo stavljeni u metalne kapsule s metalnim kuglicama te su kapsule potom uronjene u tekući dušik. Nakon toga su pričvršćene u uređaj za homogenizaciju te je usitnjavanje provedeno frekvencijom 30 puta u sekundi tijekom 2 minute. Takav usitnjeni biljni materijal čuvan je u označenim Eppendorf epruvetama u zamrzivaču pri -20 °C.

3.1.2. Opis postaja i staništa

Uzorci posidonije za ovo istraživanje prikupljeni su na tri različita lokaliteta i dvije dubine. Prva postaja nalazi se na području Zadarskog kanala, dok su druge dvije na Dugom otoku.

Postaja kod Zadarskog kanala nalazi se uz njegovu istočnu obalu u blizini samoga grada. Na ovom području, za razliku od druga dva lokaliteta, naselja posidonije nisu brojna. Nagib dna na obje dubine je manji od 2 % u smjeru jugozapada. Kako se radi o blizini grada,

postoji mogućnost prisutnosti otpadnih voda i pojave eutrofikacije, a i promet plovila je intenzivniji, osobito u ljetnim mjesecima.

Druga postaja nalazi se u uvali Brbišćica koja je smještena na jugozapadnoj strani Dugog otoka. U uvali nema ljudskih naselja te je stoga čovjekov utjecaj manji nego na području Zadarskog kanala. Isto tako, lokalitet je okrenut prema otvorenom moru pa nema otpadnih voda iz naselja kao ni pojave eutrofikacije. Nagib dna je manji od 2 % u smjeru jugozapada.

Treća postaja nalazi se sa sjeveroistočne strane Dugog otoka u uvali Zaglav. Iako je luka naseljena, uz obalu nema puno kuća, ali se u Zaglavu nalazi pumpna stanica za gorivo koju obilaze mnogi nautičari tijekom ljetnih mjeseci. Naselja posidonije su gusta i prisutna na mnogo mjesta u širem području oko luke. Nagibi staništa se razlikuju na dvije dubine pa je tako nagib dna na dubini od 3 m manji od 5 % u smjeru sjeverozapada, dok je na drugoj dubini nagib veći od 10 % u istom smjeru. Na ovom lokalitetu uzorkovanje je provedeno na 3 i 10 m dubine kao i u uvali Brbišćica, za razliku od Zadarskog kanala gdje su uzorci sakupljeni na dubinama od 2 i 10 m.

Za ovo istraživanje koristio sam podatke o prosječnim mjesečnim vrijednostima određenih okolišnih faktora poput osunčanosti, prozirnosti, slanosti i temperature mora (Tablica 1) koje sam preuzeo iz literature (DHMZ, Matievć i sur. 2009, Zore-Armanda 2000). Podaci za osunčanost, prozirnost, slanost i temperaturu mora uzeti su za područje srednjeg Jadrana jer se pretpostavlja da sva tri lokaliteta zbog svog geografskog položaja imaju približno jednake vrijednosti. Podaci za prozirnost mora kod Zadarskog kanala su posebno navedeni (označeni *) jer postoje višegodišnja mjerenja u blizini mjesta uzorkovanja. Uz navedene okolišne čimbenike, koristio sam i podatke o primarnoj produkciji posidonije (Tablica 2) koji su procijenjeni na temelju podataka o suhoj masi baze i plojke adultnog lista, broja listova formiranih u jednoj lepidokronološkoj godini te broja izdanaka po m^2 te izračunati prema sljedećoj formuli (Bobetić 2012, Grbčić, 2012).

$$P = \left(m_p + m_b\right) \times N_{lis} \times N_{izd}$$

P – procijenjena primarna produkcija [suha masa (g) po m^2 po godini]

m_p – masa plojke adultnog lista (g suhe mase)

m_b – masa baze adultnog lista (g suhe mase)

N_{lis} – broj listova po godini

N_{izd} – broj izdanaka po m^2

Tablica 1. Prosječne mjesečne vrijednosti određenih okolišnih faktora

Mjesec u godini	Travanj	Lipanj	Listopad	Veljača
Temperatura mora (°C)	19	23	16,3	13,6
Osunčanost (sati)	230	310	200	145
Slanost (PSU)	37,75	37,8	37,95	38,2
Prozirnost (m)	10*/16	15*/18	15*/17	16*/16

Tablica 2. Procijenjena primarna produkcija po kvadratnom metru za tri istraživane postaje

	Procijenjena primarna produkcija [suha masa (g) po m^2 u 2011.]	
	2 (3) m	10 m
Zadarski kanal	955,09	95,07
Zaglav	358,95	274,04
Brbišćica	223,51	479,93

3.2. Određivanje udjela fotosintetskih pigmenata

3.2.1. Priprema biljnih ekstrakata

Za spektrofotometrijsko mjerenje fotosintetskih pigmenata prvo sam ih ekstrahirao iz usitnjenog biljnog materijala. U označene tamne Eppendorf epruvete odvagao sam po 10 mg usitnjenog biljnog materijala te sam u svaku epruvetu spatulom dodao oko 3 mg kalcijevog karbonata ($CaCO_3$). Zatim sam dodao oko 1 ml hladne otopine 80 %-tnog acetona te na mućkalici dobro promiješao. Potom sam epruvete centrifugirao 15 min na 10 000 g pri +4 °C. Zeleno obojani supernatant sam prelio u odgovarajuće graduirane staklene epruvete koje sam začepio i ostavio u kutiji s ledom. Na preostali talog dodao sam još oko 1 ml 80%-tnog acetona, ponovio postupak i supernatant iz svakog uzorka dodao u odgovarajuću gradiuranu epruvetu (u kojoj se već nalazio supernatant dobiven od istog uzorka u prvom krugu

ekstrakcije). Postupak sam ponovio sa svim uzorcima. Prije spektrofotometrijskog mjerenja, u svaku graduiranu epruvetu dodao sam odgovarajući volumen acetona kako bi ukupni volumen (V_{uk}) bio jednak u svim epruvetama (2,5 ml). Tijekom cijelog postupka pripreme uzorka i ekstrakcije pazio sam da uzorci budu hladni (koristio sam usitnjeni led) i zaklonjeni od izvora svjetlosti.

3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje fotosintetskih pigmenata

Spektrofotometrijsko mjerenje izvodio sam u staklenim kivetama. Za slijepu probu koristio sam 80 %-tni aceton. Apsorbanciju svakog uzorka mjerio sam pri valnim duljinama od 470 nm, 645 i 662 nm.

Iz dobivenih apsorbancija izračunao sam koncentracije fotosintetskih pigmenata. Koristeći formulu po Lichtenthaleru (Lichtenthaler 1987), izračunao sam koncentracije klorofila *a* i *b* (c_a, c_b), ukupnih klorofila (c_a+c_b) te karotenoida (c_x+c_c) i rezultate izrazio u µg/ml Uz to sam još izračunao omjer klorofila *a* i klorofila *b* te omjer ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida.

$$c_a = 12.25A_{662} - 2.04A_{645}\ [\mu g/ml]$$

$$c_b = 21.50A_{645} - 5.10A_{662}\ [\mu g/ml]$$

$$c_{a+b} = 7.15A_{662} + 18.71A_{645}\ [\mu g/ml]$$

$$c_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 1.82c_a - 85.02c_b}{198}\ [\mu g/ml]$$

$$\frac{klorofil\ a}{klorofil\ b} = \frac{c_a}{c_b}$$

$$\frac{Uk.klorofili}{Uk.karotenoidi} = \frac{c_{a+b}}{c_{x+c}}$$

Kako sam radio sa suhim biljnim materijalom, dobivene koncentracije pigmenata sam uvrstio u sljedeću formulu da bih rezultate izrazio kao miligrame po gramu suhe mase (mg/g_{SM}).

$$c = \frac{c_{pig}\left(\frac{\mu g}{ml}\right) \times V_{uk}\ (ml)}{1000\ \times m\ (g)}\ [\frac{mg}{g_{SM}}]$$

Spektrofotometrijska mjerenja radio sam na svim uzorcima, 24 serije (tri lokaliteta, dvije dubine i četiri godišnja doba), a svaka je sadržavala po 7 replika.

3.3. Razdvajanje fotosintetskih pigmenata tankoslojnom kromatografijom

Kromatografijom sam razdvajao fotosintetske pigmente iz uzoraka posidonije i vodene leće (*Lemna minor* L.). Vodena leća mi je poslužila za usporedbu s posidonijom jer je sastav njenih fotosintetskih pigmenata već dobro poznat. Za ekstrakciju pigmenata iz posidonije koristio sam već prethodno liofiliziran i usitnjen biljni materijal, dok sam vodenu leću sam pripremio za ekstrakciju. Isto tako, pripremio sam i ploče za tankoslojnu kromatografiju.

3.3.1. Liofilizacija vodene leće

Za liofilizaciju sam uzeo uzorke vodene leće koja je uzgajana na tekućoj hranjivoj podlozi u Erlenmeyerovoj tikvici. Sadržaj tikvice sam prelio preko cjedila te sam potom biljke dobro isprao vodovodnom te naposljetku i destiliranom vodom. Zatim sam ih stavio na filtar papir i prekrio drugim filtar papirom kako bih uklonio višak vode. Kada su se posušile, stavio sam ih u Petrijeve zdjelice koje sam omotao aluminijskom folijom pazeći pritom da poklopci ostanu nadignuti. Petrijeve zdjelice sam tada stavio u liofilizator (Alfa 1-2, Christ, Njemačka). Liofilizacija je trajala oko 6 h pri temperaturi -65 °C i tlaku 0,05 mbara. Liofilizirane uzorke sam stavio u eksikator i čuvao u tami dok ih nisam trebao koristiti.

3.3.2. Izrada ploča za tankoslojnu kromatografiju

Za tankoslojnu kromatografiju koristio sam dobro očišćene staklene ploče (dimenzije 21,5 × 9,8 cm) na koje sam nanio tanki sloj adsorbensa (stacionarna faza). Kao adsorbens koristio sam silikagel. Prvo sam u laboratorijskoj čaši izvagao 30 g silikagla i zatim dodao 67 ml destilirane vode i dobro promiješao staklenim štapićem. Dobivenu smjesu sam prelio u Erlenmeyerovu tikvicu koju sam zatvorio i zatim dobro promućkao kako u suspenziji ne bi ostale nakupine silikagela. Nakon mućkanja, smjesu sam ravnomjerno nanio na staklene ploče koje sam potom pustio da se osuše na zraku tijekom noći. Slijedeći dan sam s donje strane ploča i rubova skalpelom skinuo višak silikagela i ploče stavio u eksikator. Prije upotrebe, ploče sam zagrijao u sušioniku na 80 °C i pustio ih da se ohlade u eksikatoru.

3.3.3. Ekstrakcija fotosintetskih pigmenata za tankoslojnu kromatografiju

Ekstrakciju pigmenata iz uzoraka intermedijarnih listova posidonije radio sam na isti način kao ekstrakciju za spektrofotometrijsko određivanje pigmenata samo što sam ovdje koristio 100 %-tni aceton. Ekstrakciju pigmenata iz vodene leće radio sam istim postupkom samo što sam liofiliziranu vodenu leću prvo morao homogenizirati. To sam napravio u hladnom tarioniku uz dodatak kalcijevog karbonata i 1 ml hladne otopine 100 %-tnog acetona. Kako mi je prilikom homogenizacije u tarioniku aceton ispario, dodao sam još 1 ml kako bi pokupio ostatak homogenata iz tarionika i prelio u tamnu Eppendorf epruvetu.

Nakon ekstrakcije, supernatante iz dva ciklusa centrifugiranja sam spojio i potom nakratko (oko 1 min) ukoncentrirao na rotacionom uparivaču u uvjetima sniženog tlaka. Temperatura vodene kupelji u koju sam uronio tikvicu uparivača bila je oko 30 °C. Tako pripremljene ekstrakte koristio sam za nanošenje na staklene ploče sa silikagelom.

3.3.4. Tankoslojna kromatografija

Tankoslojnu kromatografiju provodio sam na staklenim pločama sa silikagelom. Na jednu ploču stavljao sam po dva uzorka pazeći da se međusobno ne dodiruju i da su sa svake strane dovoljno odmaknuti od ruba ploče (oko 0,5 cm) te da se nalaze na visini od oko 2 cm od donjeg ruba ploče. Ekstrakte sam nanosio u jednoj liniji i ukupno dodao po 200 µl ekstrakta za svaki uzorak. Pripremljene ekstrakte dodavao sam Pasteurovom pipetom tako da sam vrh pipete (na kojoj je bila kapljica ekstrakta) lagano prislonio na površinu silikagela i pričekao da se uzorak na silikagelu posuši. Ploče pripremljene na taj način sam potom stavio u kadicu za kromatografiju (promjera 9,8 cm i visine 21,5 cm) u koju sam prethodno ulio mobilnu fazu. Koristio sam dva sustava mobilnih faza volumena 50 ml. Prvu mobilnu fazu, pripremio sam miješanjem petroletera i acetona u omjeru 70:30 (Reiss 1994), a drugu miješanjem petroletera i n-propanola u omjeru 90:10 (Casazza i Mazzella 2002). Ploče sam pažljivo stavio u kadicu za kromatografiju u okomiti položaji poklopio staklenom pločicom. Prethodno sam rubove kadice premazao vazelinom kako ne bi došlo do isparavanja mobilne faze.

Kromatografija se odvijala pri sobnoj temperaturi, zaklonjena od svjetlosti, oko 45 min odnosno, dok fronta mobilne faze nije bila oko 2 cm ispod gornjeg ruba ploče. Po završetku sam spatulom označio frontu mobilne faze i pustio da se nakratko posuši u mraku.

Nakon toga sam skicirao kromatogram i snimio ploču digitalnim fotoaparatom te za svaku frakciju izračunao R_f vrijednost prema sljedećoj formuli.

$$R_f = \frac{udaljenost\ koju\ je\ prošao\ pojedini\ pigment}{udaljenost\ koju\ je\ prošla\ mobilna\ faza}.$$

Tankoslojnu kromatografiju nisam provodio na svim uzorcima kao kod spektrofotometrije, već sam na temelju rezultata dobivenih spektrofotometrijom uzeo one uzorke koji su pokazali najveće količine pigmenata. Osobito sam uzeo one koji su imali više vrijednosti za ukupne karotenoide kako bi se lakše uočili na pločama prilikom razdvajanja.

4.1. Određivanje apsorpcijskih spektara fotosintetskih pigmenata

Svaku pojedinu frakciju sam spatulom sastrugao s ploče i kroz mali lijevak ubacio u označene tamne Eppendorf epruvete. Radi bolje eluacije pigmenata sa silikagela, klorofile sam otopio u 1 ml hladne otopine 100 %-tnog acetona, a karotenoide u hladnoj otopini 100%-tnog etanola te ih dobro promiješao na mućkalici. Nakon toga sam epruvete stavio centrifugirati 15 min na 10000 g pri temperaturi +4 ºC. Supernatant sam prelio u označene graduirane staklene epruvete i ponovio postupak.

Spektrofotometrijsko mjerenje sam provodio u staklenim kivetama. Za slijepu probu sam koristio 100 %-tni aceton i etanol. Apsorbanciju sam mjerio u rasponu od 400 – 700 nm.

Apsorpcijske spektre pojedinih pigmenata određivao sam na onim pigmentima koji su se dobro razdvojili metodom tankoslojne kromatografije.

5.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Ekstrakciju fotosintetskih pigmenata za HPLC provodio sam na sličan način kao i za tankoslojnu kromatografiju. Jedina razlika je ta što sam ekstrakte prije analize još jednom centrifugirao 20 min na 20000 g pri temperaturi +4 ºC. Nakon centrifugiranja supernatant sam pažljivo Pasteurovom pipetom prenio u označene tamne vijalice.

Kromatografija je provedena na PerkinElmer-ovom uređaju (HPLC Series 200), a uzorci su injektiranina kolonu pomoću uređaja za automatsko unošenje uzoraka (autosampler) koji je držao temperaturu uzoraka na +4 ºC. Sva otapala korištena za HPLC su bila visoke čistoće (HPLC grade). Pomoću crpke sepostiže određeni tlak i omogućava opskrbljivanje

kolone otapalima koja su, prije dolaska na kolonu, prošla kroz sustav za otplinjavanje. Detekcija je provedena detektorom s nizom dioda (DAD detektor) pri valnim duljinama 440 i 660 nm. Rezultati analize su obrađeni računalnim programom TotalChrom Workstation (PerkinElmer).

Prije analize kolonu i predkolonu sam ispirao otopinom metanola i vode u omjeru 50:50, minimalno 8 sati pri protoku od 1,0 ml min^{-1} i tlaku oko 1000 psi. Kromatografija je provedena na Spheri-S ODS koloni (veličine čestica 5 μm; 4,6 × 250 mm) (PerkinElmer, Series 2000) s pretkolonom RB-18 (7 μm; 3,2 × 15 mm) (PerkinElmer). Koristio sam metodu koju su opisali Garzia-Plazaola i Esteban (2012).

Prije početka svake analize kolone sam ispirao otopinom 100 %-tnog metanola minimalno 30 min pri protoku od 1,0 ml min^{-1} i tlaku oko 1000 psi. Mobilna faza se sastojala od dvije komponente – otapala A i otapala B. Otapalo A je bilo smjesa otopina acetonitrila, metanola i Tris-pufera (0,1 mol dm^{-3}, pH 8) u volumnom omjeru 84:2:14, a otapalo B smjesa metanola i etil acetata u volumnom omjeru 68:32. Tris-pufer priredio sam otapanjem 1,2 g Tris-a u oko 90 ml destilirane vode. Zatim sam pH-metrom odredio pH vrijednost otopine i dodavanjem sumporne kiseline (H_2SO_4) različitih koncentracija prilagodio pH na 8. Nakon toga sam destiliranom vodom nadopunio do volumena od 100 ml. Tris-pufer sam filtrirao vakuum filtracijom kroz najlonsku membranu (Supelco) veličine pora od 0,2 μm i zatim koristio za pripremu otapala A.

Pigmente sam eluirao koristeći linearni gradijent udjela otapala A i B: u početku je bilo 100% otapala A, a na kraju eluacije 100 % otapala B. Gradijentna eluacija je trajala 14 min te je zatim uslijedila izokratna eluacija s otapalom B (100 %) u trajanju 6 min. Nakon toga je slijedila 1 min eluacije s linearnim gradijentom od 100 % B do 100 % A i na kraju izokratnaeluacija sa 100 % A sljedećih 6 min radi reekvilibracije kolone s otapalom A prije analize novog uzorka. Protok otapala je bio 1,2 ml min^{-1} uz tlak nešto veći od 1000 psi. Injekcijski volumen uzoraka posidonije bio je 40 μl, a vodene leće 25 μl.

Na temelju retencijskih vremena standarda i uzoraka te podataka iz literature, pomoću dobivenih kromatograma odredio sam vrste fotosintetskih pigmenata u uzorcima posidonije te njihovu količinu iz površina ispod pikova.

Metodom HPLC analizirao sam ukupno osam uzoraka posidonije i jedan uzorak vodene leće. Od uzoraka posidonije analizirao sam one s postaja Brbišćica i Zaglav uzimajući u obzir samo uzorke iz lipnja i veljače na obje dubine.

5.1.1. Izrada standarda fotosintetskih pigmenata

Kako bih odredio koncentraciju pigmenata u uzorcima koje sam analizirao metodom HPLC trebao sam napraviti standarde za svaki pojedini pigment. To je uključivalo razdvajanje pigmenata iz vodene leće metodom tankoslojne kromatografije, njihovu eluaciju sa silikagela te spektrofotometrijsko određivanje apsorbancije pomoću koje sam mogao izračunati njihovu koncentraciju. Kako sam metodu HPLC koristio više kao kvalitativnu, a ne i kvantitativnu metodu, nisam radio kalibracijsku krivulju za standarde, već sam koristio samo jednu koncentraciju.

Koncentracije standarda svakog pigmenta izračunao sam iz izmjerene apsorbancije i molarnih apsorpcijskih koeficijenata pomoću Beer – Lambert-ovog zakona.

$$A = \varepsilon \times b \times c$$

A – apsorbancija

ε – molarni apsorpcijski koeficijent (L mol^{-1} cm^{-1})

b – duljina puta svjetlosti kroz uzorak (cm)

c – koncentracija tvari u otopini (mol dm^{-3})

Koncentracije pojedinih pigmenata u uzorcima izračunao sam prema sljedećoj formuli.

$$c_{uz} = c_{stand} \times \frac{P_{uz}}{P_{stand}}$$

c_{uz} – koncentracija pojedinog pigmenta u uzorku

c_{stand} – koncentracija standarda pojedinog pigmenta

P_{uz} – površina ispod pika pojedinog pigmenta u uzorku

P_{stand} – površina ispod pika pojedinog standarda

6.1. Obrada rezultata

Rezultate istraživanja obradio sam u računalnom programu Microsoft Excel 2007 i Statistica 12, StatSoftInc., USA. Vrijednosti koncentracija pigmenata i njihovih omjera prikazao sam grafički kao srednju vrijednost sedam replika ± standardna pogreška.

Rezultate spektrofotometrijskog određivanja količine pigmenata sam međusobno usporedio analizom varijance (one-way ANOVA) te sam potom koristeći Newman – Keuls-ov test utvrdio koji se uzorci značajno razlikuju na razini $p \leq 0,05$. U slučaju značajnije razlike rezultatima sam pridodao različita slova.

Uz to, napravio sam još i analizu glavnih komponenti (PCA, principal component analysis) da bih vizualizirao odnos među ispitivanim uzorcima s obzirom na sadržaj pigmenata i okolišne uvjete. Set podataka za analizu PCA je sadržavao ukupno 12 varijabli. Uz izračunate koncentracije klorofila *a* i *b*, ukupnih klorofila i karotenoida te omjere klorofila *a* i *b* te ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida, varijable su bile i dubina, osunčanost, slanost, prozirnost, temperatura i primarna produkcija. Korelacije originalnih varijabli i glavnih komponenti su klasificirane kao jake (> 0,75), srednje (0.5-0,75) ili slabe (0,30-0,5).

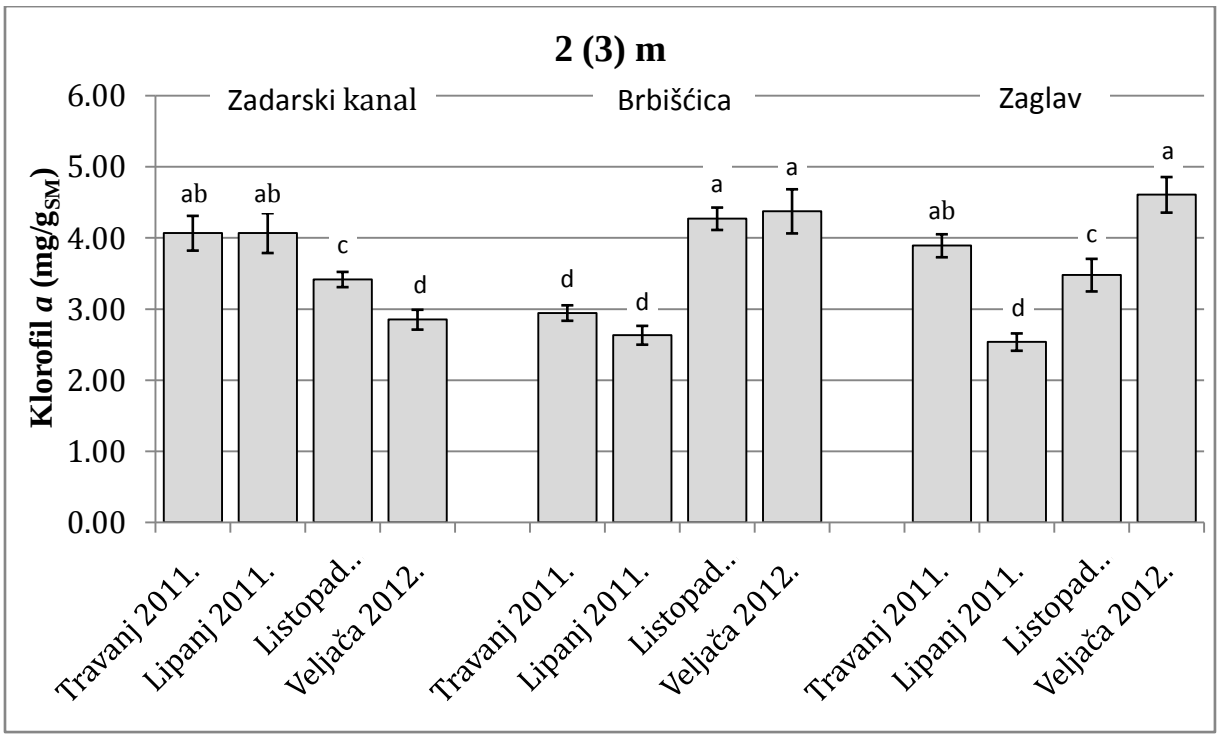
4. REZULTATI

U prvom dijelu ovog rada spektrofotometrijski sam izmjerio fotosintetske pigmente u intermedijarnim listovima posidonije (klorofil *a*, klorofil *b* i ukupne karotenoide) i s tim podacima izračunao i ukupne klorofile te izrazio omjer klorofila *a* i klorofila *b* te omjer ukupnih klorifila i ukupnih karotenoida). U drugom dijelu sam metodama tankoslojne kromatografije i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti analizirao sadržaj pigmenata te njihov apsorpcijski spektar.

4.1. Udio fotosintetskih pigmenata u intermedijarnim listovima posidonije

4.1.1.Udio klorofila *a*

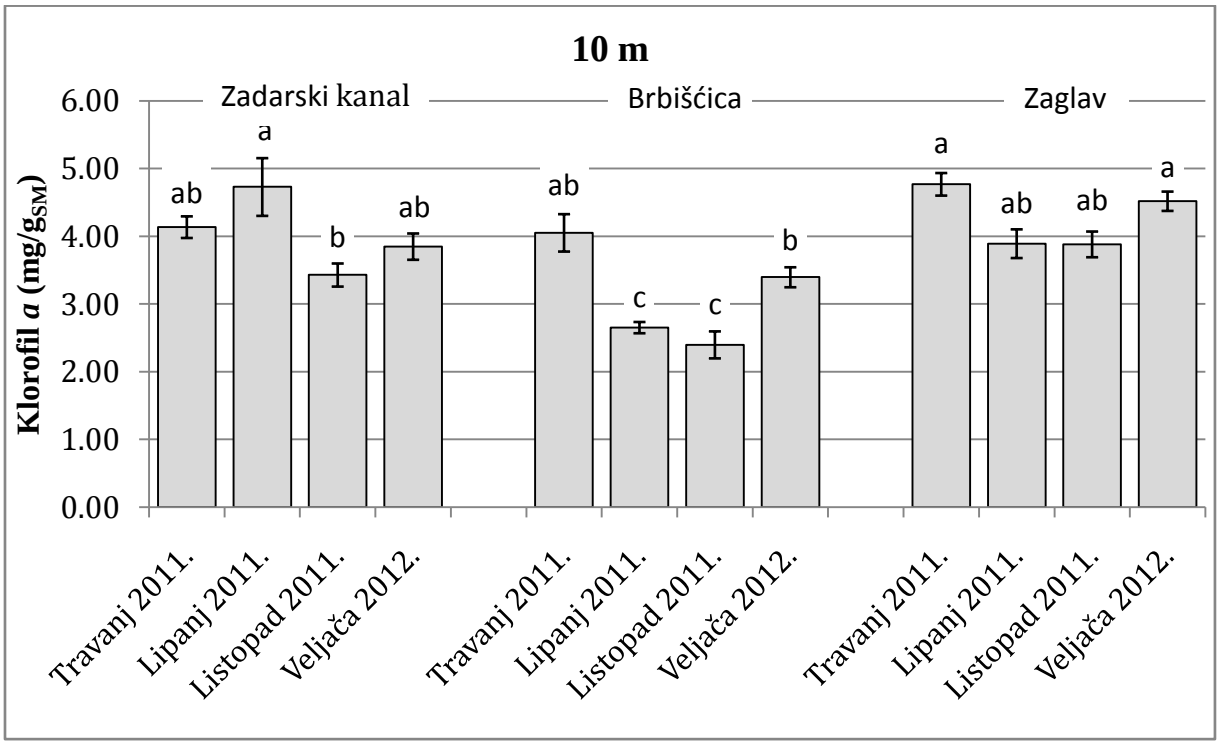
U intermedijarnim listovima posidonije prikupljenim u Zadarskom kanalu na dubini od 2 m je u travnju i lipnju udio klorofila *a* iznosio oko 4 mg/g_{SM} te se potom u listopadu značajno smanjio i u veljači imao vrijednost oko 3 mg/g_{SM}.



Slika 4. Udio klorofila *a* (mg/g_{SM}) u intermedijarnim listovima posidonije prikupljenima na dubini od 2 (3) m. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od sedam replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju na razini $p \leq 0,05$.

Ova vrijednost udjela klorofila *a* je bila na postaji u Brbišćici (na dubini 3 m) tijekom travnja i lipnja te je potom u listopadu došlo do naglog povećanja udjela koji se zadržao i tijekom veljače godine. U biljkama iz uvale Zaglav, najveće koncentracije su bile tijekom travnja i veljače s time da je u lipnju došlo do naglog pada na vrijednost koja je slična onoj u Brbišćici. Tijekom listopada došlo je do rasta i u veljači je izmjerena najveća vrijednost na dubini od 3 m u usporedbi sa svim postajama i iznosi 4,6 mg/g_{SM} (Slika 4).

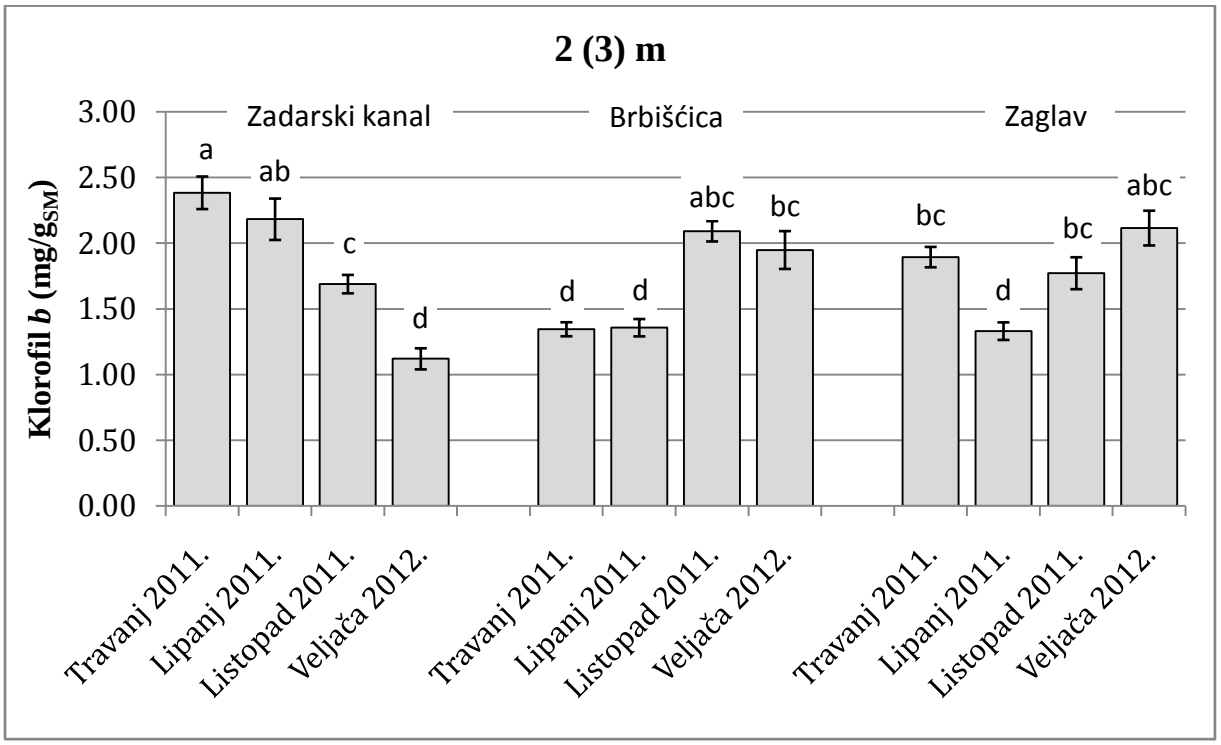
Na dubini od 10 m su u listovima posidonije prikupljenim i u Brbišćici i Zaglavu udjeli klorofila *a* tijekom travnja i veljače bili viši u odnosu na lipanj i listopad, ali u Zaglavu ta razlika nije bila statistički značajna. U biljkama iz Zadarskog kanala je u lipnju koncentracija bila najviša, ali je pala u listopadu, međutim, ta se vrijednost nije značajno razlikovala u usporedbi s onima u travnju i veljači (Slika 5).



Slika 5. Udio klorofila *a* (mg/g_{DSM}) u intermedijarnim listovima posidonije prikupljenima na dubini od 10 m. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od sedam replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju na razini $p \leq 0,05$.

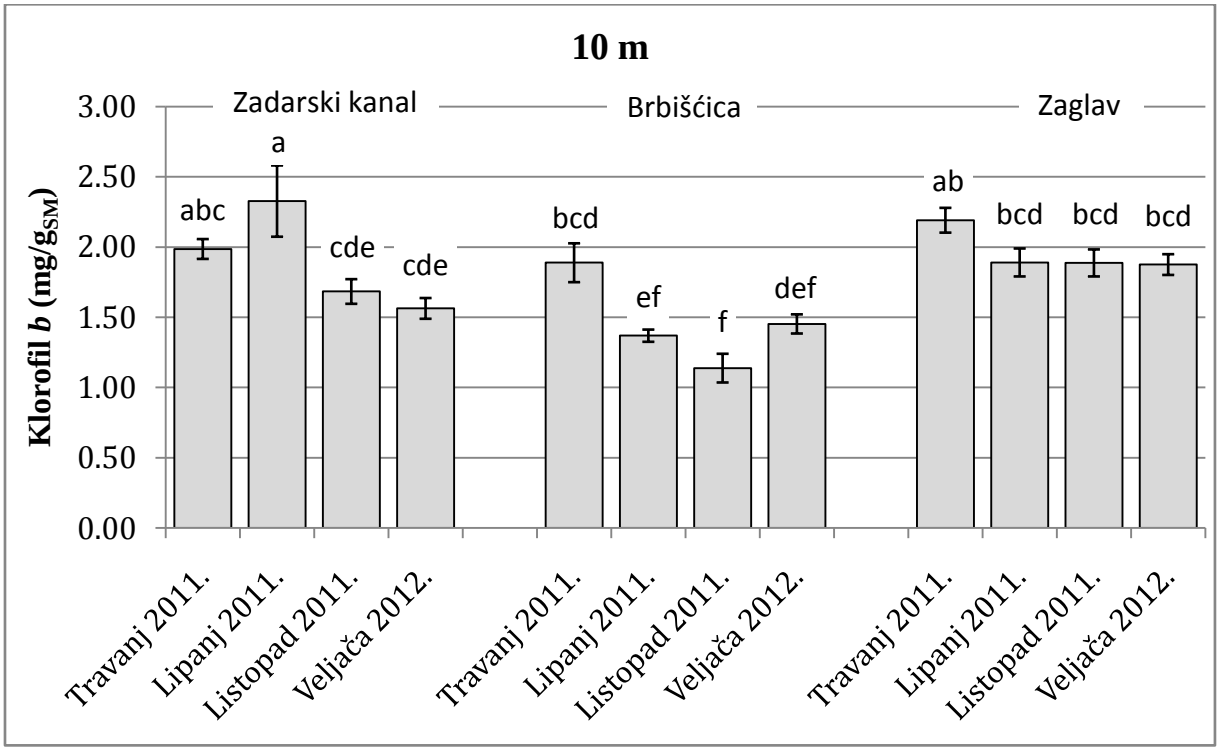
4.1.2. Udio klorofila *b*

U intermedijarnim listovima posidonije prikupljenim u Zadarskom kanalu na dubini od 2 m došlo je do pada udjela klorofila *b* od travnja kada je njegova koncentracija bila najviša (2,38 mg/g_{SM}) do njegove najniže vrijednosti (1,12 mg/g_{SM}) u veljači. Za razliku od biljaka u Zadarskom kanalu, u biljkama iz Brbišćice su koncentracije klorofila *b* bile značajno niže tijekom travnja i lipnja. Nisu se značajno razlikovale od koncentracija izmjerenih u veljači u Zadarskom kanalu, ali su u listopadu i veljači značajno porasle. U uzorcima iz Zaglava su vrijednosti bile više tijekom travnja i listopada te veljače, a u lipnju je koncentracija bila jednaka najnižim vrijednostima klorofila *b* koje su izmjerene u veljači u Zadarskom kanalu te travnju i lipnju u Brbišćici (Slika 6).



Slika 6. Udio klorofila *b* (mg/g_{SM}) u intermedijarnim listovima posidonije prikupljenima na dubini od 2 (3) m. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od sedam replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju na razini $p \leq 0,05$.

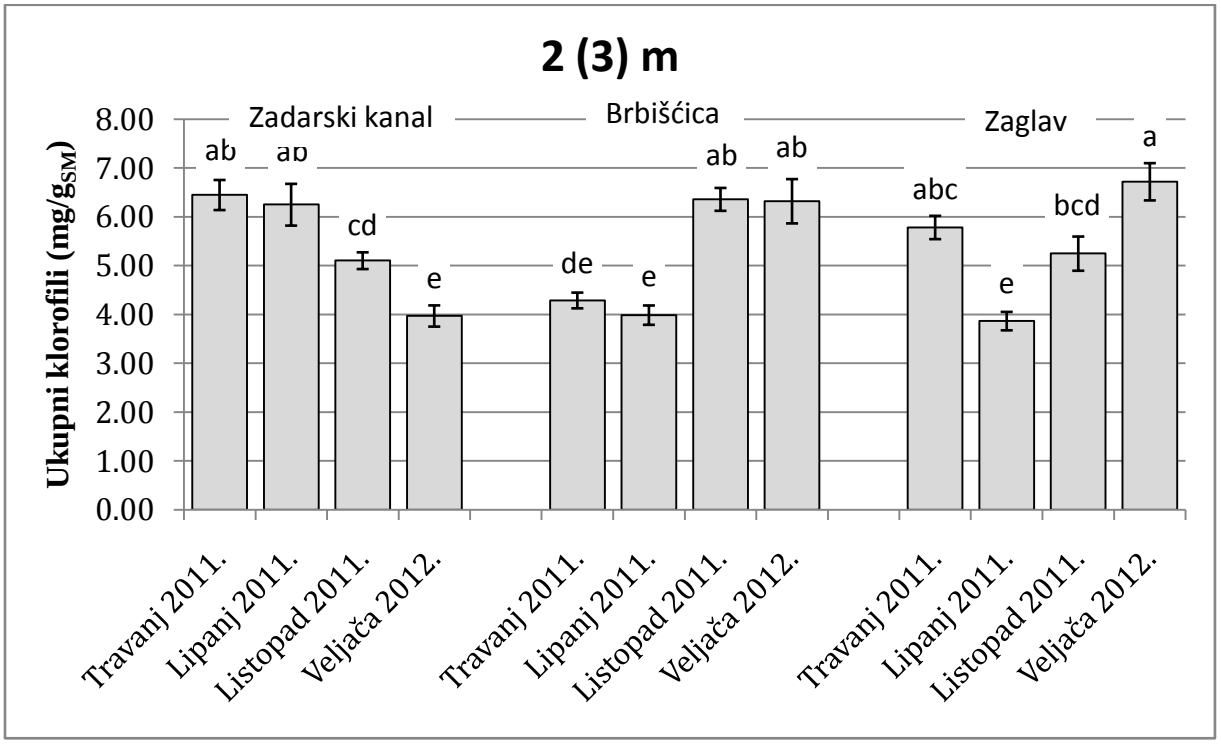
Udio klorofila *b* u uzorcima prikupljenim na dubini od 10 m u Zaglavu je u svim mjesecima bio jednak. U biljkama iz Brbišćice je najveći udio bio u travnju, a u ostalim mjesecima je bio podjednak. Za uzorke iz Zadarskog kanala je najveći udio bio u lipnju, ali se nije značajno razlikovao od travnja, dok je u usporedbi s rezultatima dobivenim za lipanj udio u listopadu i veljači bio značajno manji (Slika 7).



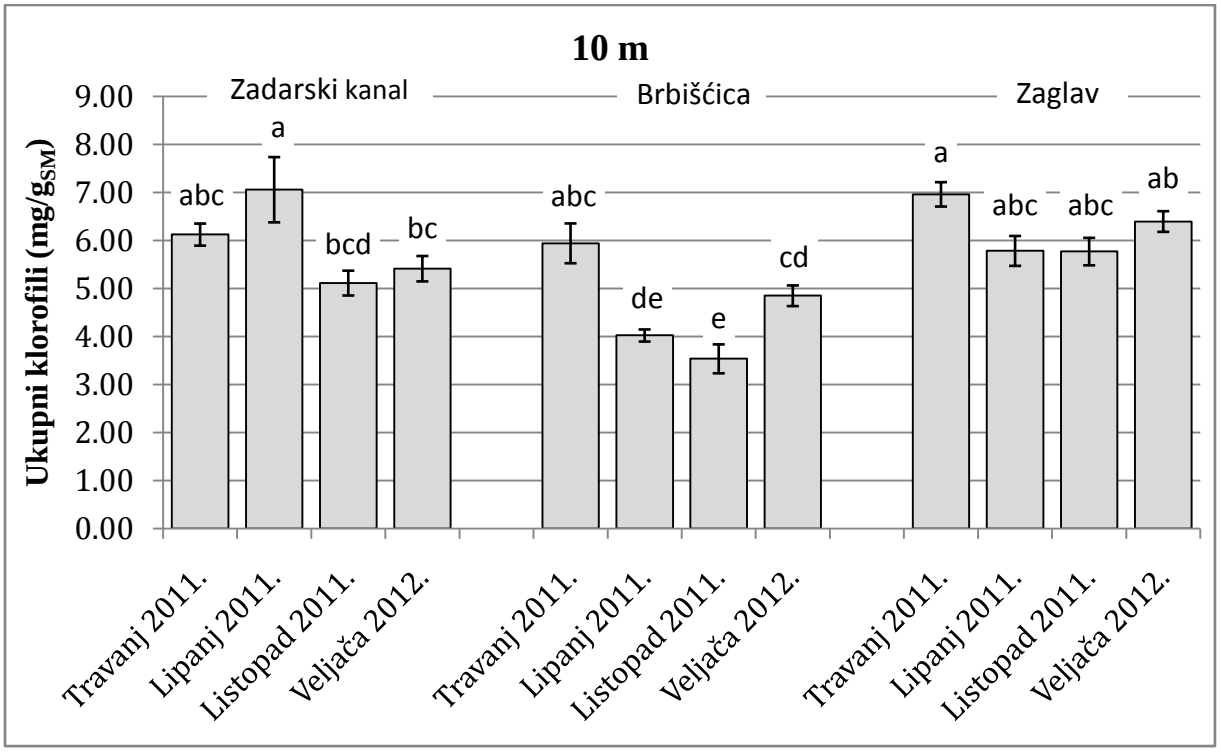
Slika 7. Udio klorofila *b* (mg/g_{SM}) u intermedijarnim listovima posidonije prikupljenima na dubini od 10 m. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od sedam replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju na razini $p \leq 0,05$.

4.1.3. Udio ukupnih klorofila

Udjeli ukupnih klorofila na obje dubine se, uspoređujući s rezultatima dobivenim za pojedine klorofile, toliko bitno i ne razlikuju kada gledamo međusobne odnose njihovih vrijednosti za svaki istraživani mjesec i postaju. Jedina razlika bila je u tome što su ovdje vrijednosti znatno više pošto se, zapravo, radi o zbroju koncentracija klorofila *a* i *b* (Slika 8 i Slika 9).



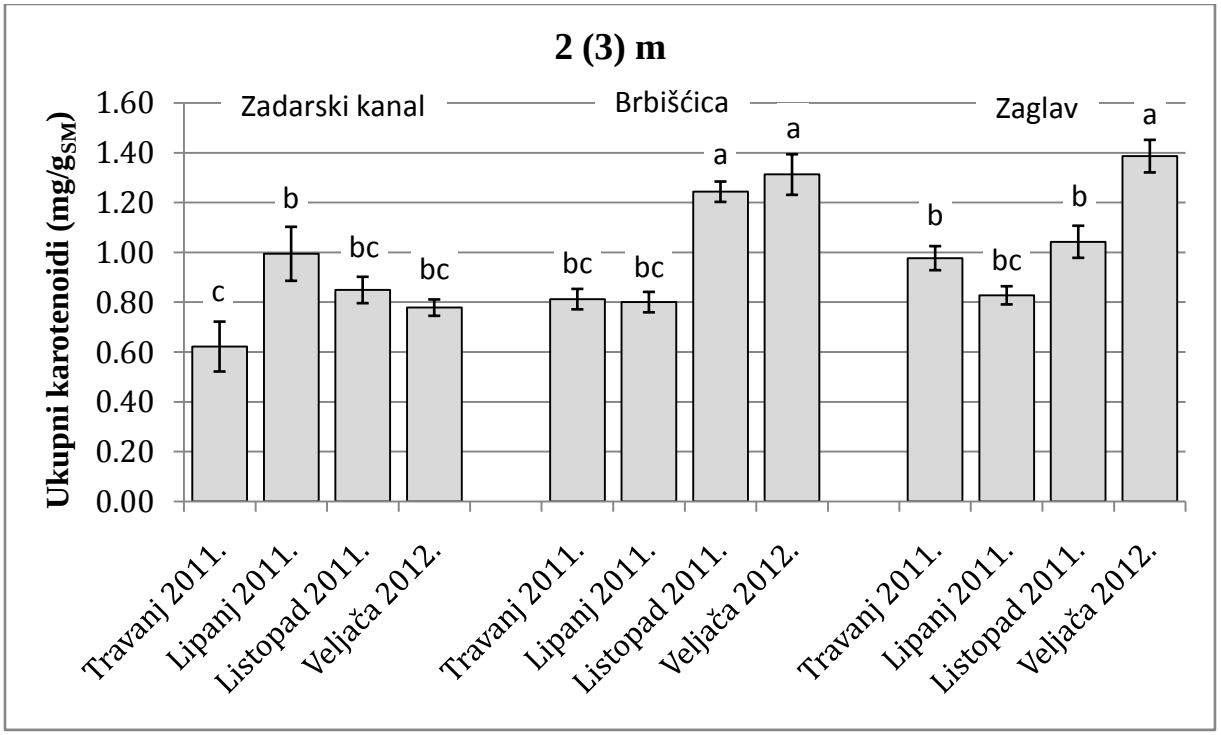
Slika 8. Udio ukupnih klorofila (mg/g_{SM}) u intermedijarnim listovima posidonije prikupljenima na dubini od 2 (3) m. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od sedam replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju na razini $p \leq 0,05$.



Slika 9. Udio ukupnih klorofila (mg/g_{SM}) u intermedijarnim listovima posidonije prikupljenima na dubini od 10 m. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od sedam replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju na razini $p \leq 0,05$.

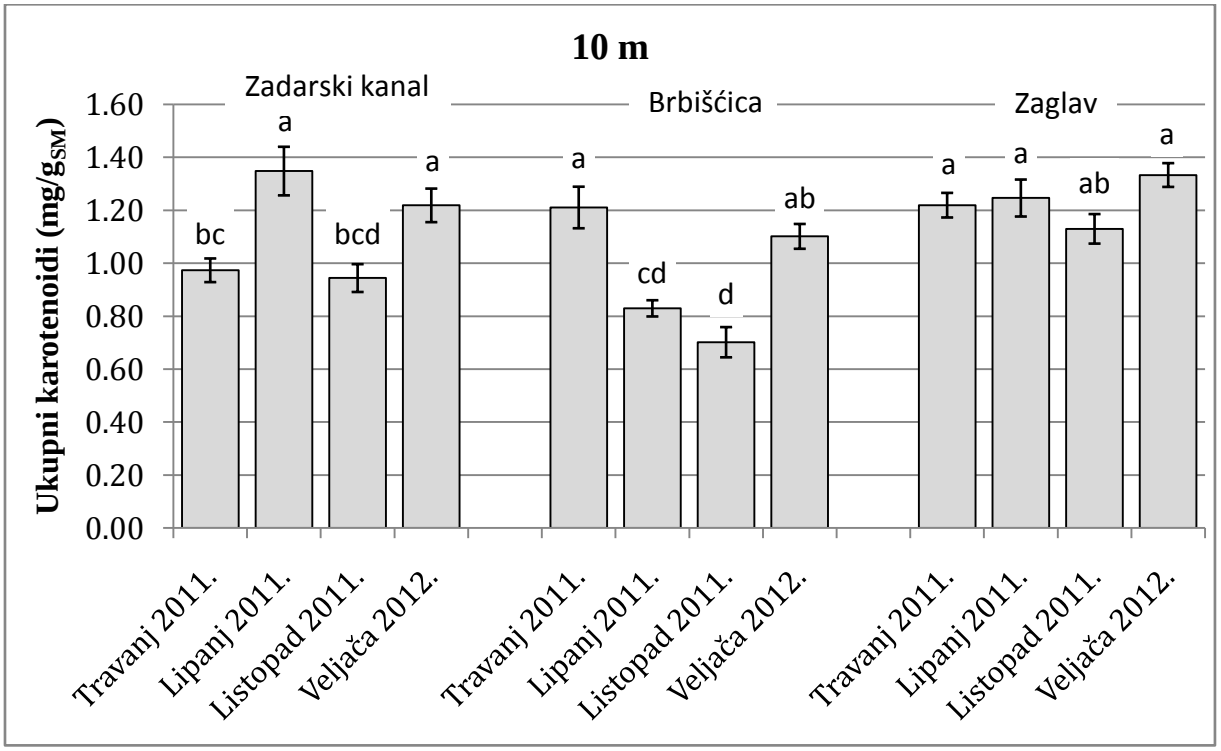
4.1.4. Udio ukupnih karotenoida

Udio ukupnih karotenoida u uzorcima iz Zadarskog kanala u travnju je bio najmanji u usporedbi s ostalim mjesecima i postajama (oko 0,6 mg/g_{SM}) da bi porastao u lipnju i zadržao otprilike jednake vrijednosti tijekom listopada i veljače. Nasuprot tome, u biljkama iz Brbišćice su u travnju i lipnju koncentracije bile značajno niže od onih u listopadu i veljači. U uzorcima iz Zaglava je najviša vrijednost bila u veljači, a u ostalim mjesecima je bila niža i međusobno podjednaka (Slika 10).



Slika 10. Udio ukupnih karotenoida (mg/g_{SM}) u intermedijarnim listovima posidonije prikupljenima na dubini od 2 (3) m. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od sedam replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju na razini $p \leq 0,05$.

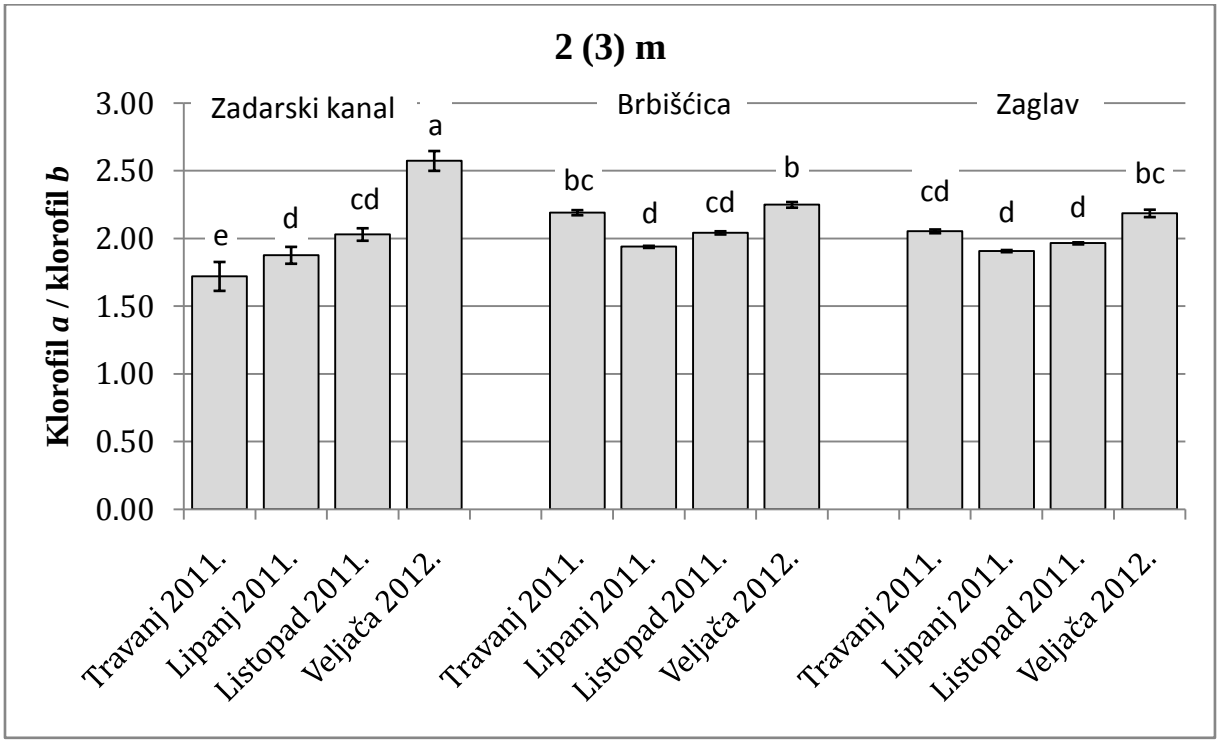
Ukupni karotenoidi su u listovima posidonije prikupljenim na 10 m u uvali Zaglav imali podjednaku vrijednost u svim mjesecima. U uzorcima iz Brbišćice su koncentracije bile približno jednake u travnju i veljači, a niže u lipnju i listopadu. Za razliku od toga, u uzorcima iz Zadarskog kanala su koncentracije bile više u lipnju i veljači, a niže u travnju i listopadu (Slika 11).



Slika 11. Udio ukupnih karotenoida (mg/g_{SM}) u intermedijarnim listovima posidonije prikupljenima na dubini od 10 m. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od sedam replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju na razini $p \leq 0,05$.

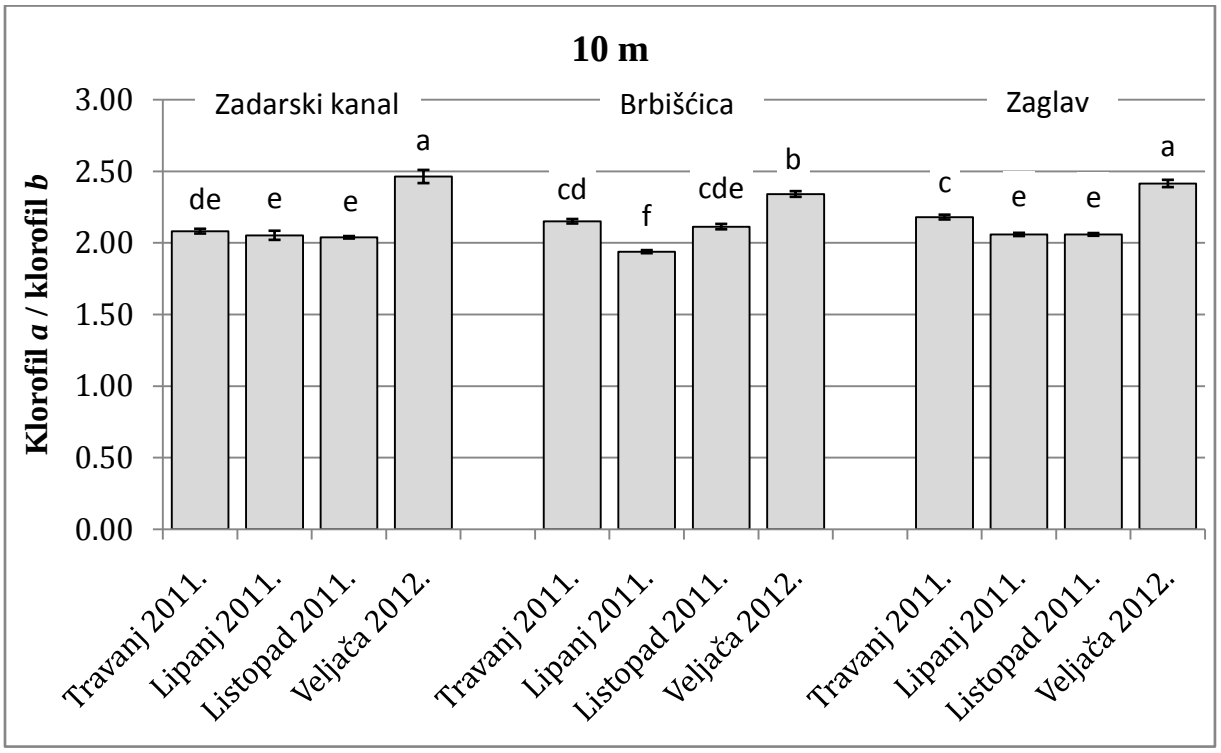
4.1.5. Omjer klorofila *a* i klorofila *b*

Na dubini od 2 (3) m omjer klorofila *a* i klorofila *b* u biljkama Zadarskog kanala povećavao se od travnja 2011. do veljače 2012. U uzorcima iz Brbišćice i Zaglava taj omjer je bio značajno veći tijekom travnja i veljače, dok je u lipnju i listopadu bio manji (Slika 12).



Slika 12. Omjer klorofila *a* i klorofila *b* u intermedijarnim listovima posidonije prikupljenima na dubini od 2 (3) m. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od sedam replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju na razini $p \leq 0,05$.

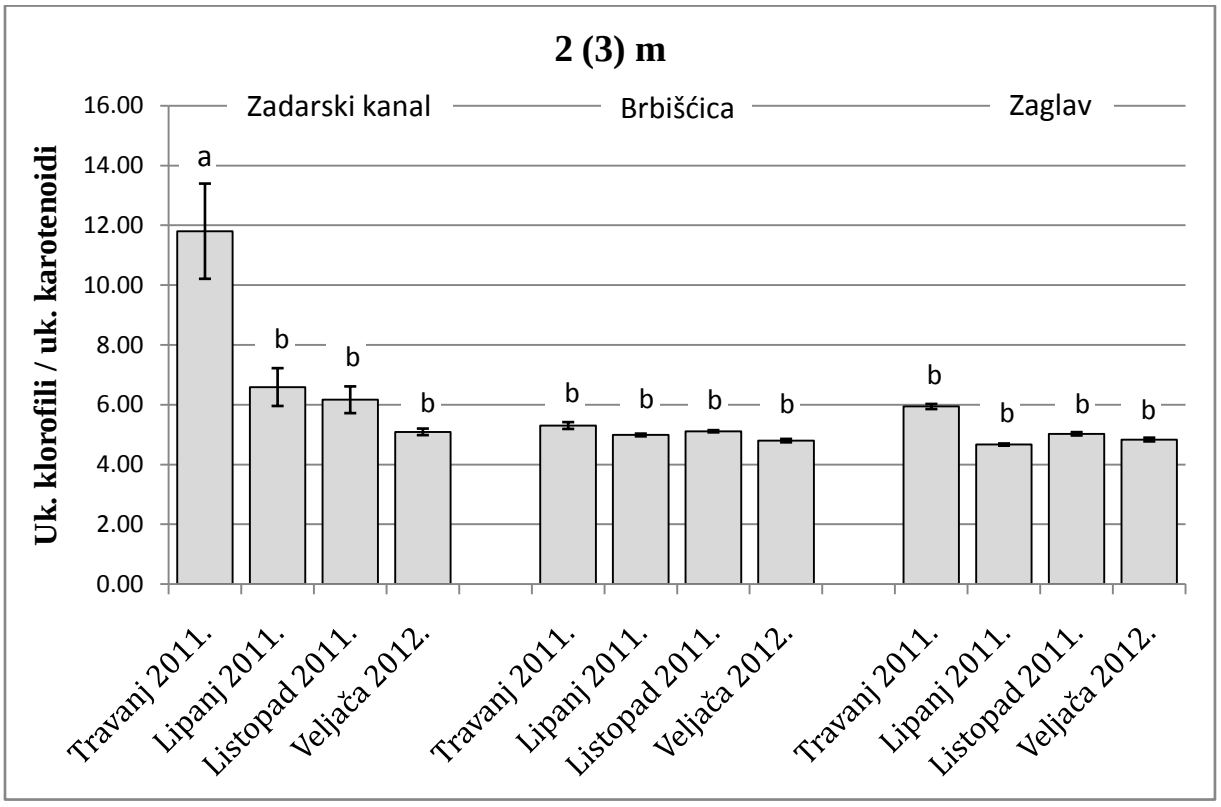
Na dubini od 10 m je omjer u listovima posidonije iz Zadarskog kanala bio najveći u veljači, a podjednak u ostalim mjesecima. U uzorcima iz Brbišćice je bio najmanji u lipnju, a najveći u veljači, dok su u travnju i listopadu omjeri bili jednaki i njihove vrijednosti su bile između najveće i najmanje za tu postaju. Omjer klorofila *a* i klorofila *b* u biljkama iz Zaglava bio je manji tijekom lipnja i listopada, a značajno veći tijekom druga dva mjeseca, s time da je vrijednost u veljači bila statistički značajno veća, nego u travnju (Slika 13).



Slika 13. Omjer klorofila *a* i klorofila *b* u intermedijarnim listovima posidonije prikupljenima na dubini od 10 m. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od sedam replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju na razini $p \leq 0,05$.

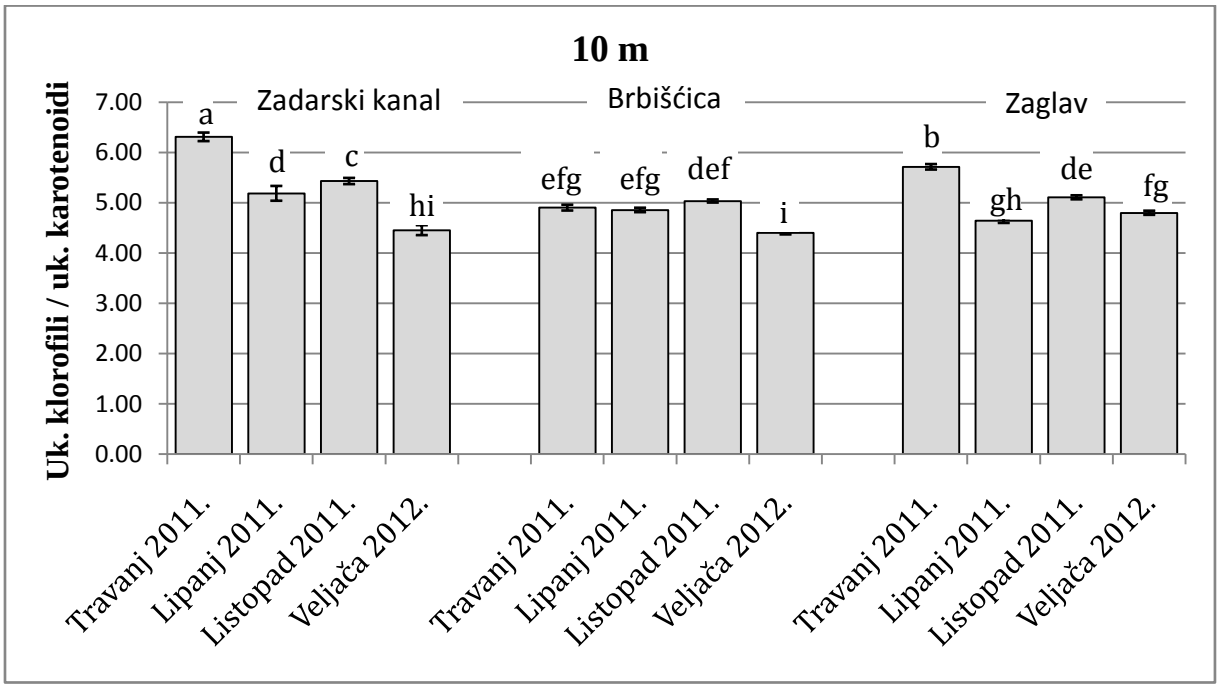
4.1.6. Omjer ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida

Na dubini od 2 (3) m omjer koncentracija ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida u uzorcimase bitno razlikovao jedino u Zadarskom kanalu u travnju gdje je iznosio oko 11,8 dok je u ostalim mjesecima i postajama bio znatno manji i kretao se u rasponu od 4,6 – 6,5 (Slika 14).



Slika 14. Omjer ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida (uk. - ukupni) u intermedijarnim listovima posidonije prikupljenima na dubini od 2 (3) m. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od sedam replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju na razini $p \leq 0,05$.

Na dubini od 10 m u listovima posidonije ovaj omjer je bio znatno drugačiji. U biljkama iz Zadarskog kanala i Zaglava nalazimo sličan trend promjena vrijednosti tijekom godine. Nešto više su bile u travnju i listopadu (ali u listopadu niže nego u travnju), dok su u lipnju i veljači bile značajno niže u usporedbi s dva spomenuta mjeseca. U uzorcima iz Brbišćice su vrijednosti bile jednake u travnju, lipnju i listopadu, dok je u veljači omjer bio niži (Slika 15).



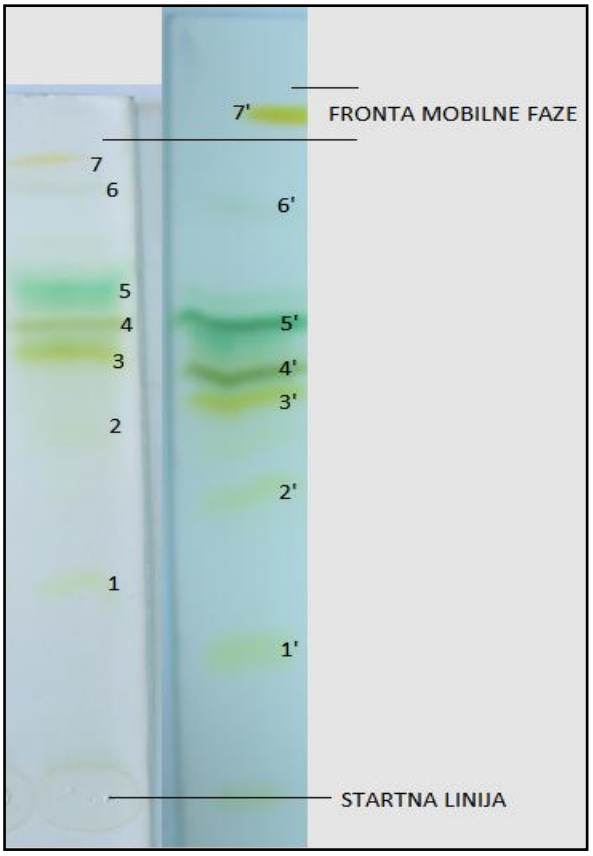
Slika 15. Omjer ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida (uk. - ukupni) u intermedijarnim listovima posidonije prikupljenima na dubini od 10 m. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od sedam replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju na razini $p \leq 0,05$.

4.2. Tankoslojna kromatografija fotosintetskih pigmenata posidonije i vodene leće

Tankoslojnom kromatografijom uzorka posidonije i vodene leće u kojoj je korištena prva mobilna faza (smjesa acetona i petroletera) razdvojilo se sedam pigmenata sličnih R_f vrijednosti (Tablica 3). To su (počevši od pigmenta koji se prvi odvojio) – neoksantin, violaksantin, lutein, klorofil *b*, klorofil *a*, feofitin i β-karoten (Slika 16). Općenito je, prilikom razdvajanja pigmenata, pozadinsko obojenje bilo izraženije kod uzoraka posidonije.

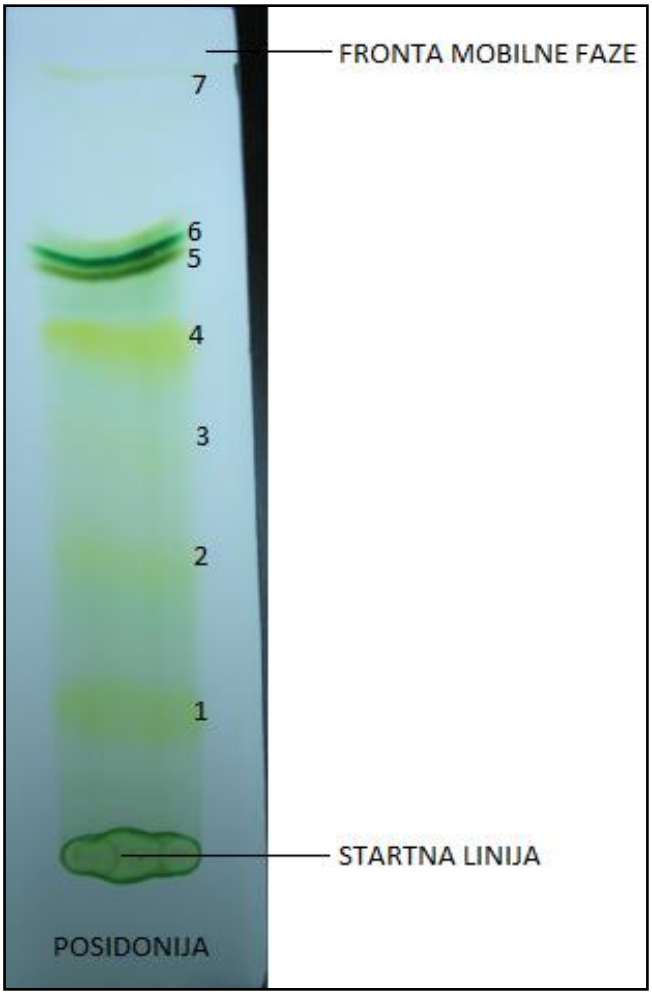
Tablica 3. R_f vrijednosti pigmenata razdvojenih tankoslojnom kromatografijom

Pigment	R_f vrijednost	
	Posidonija	Vodena leća
Neoksantin	0,30	0,21
Violaksantin	0,51	0,43
Lutein	0,64	0,56
Klorofil *b*	0,68	0,59
Klorofil *a*	0,74	0,67
Feofitin	0,90	0,83
β-karoten	0,95	0,96



Slika 16. Fotosintetski pigmenti u uzorcima posidonije (lijevo) i vodene leće (desno) razdvojeni tankoslojnom kromatografijom. Kao stacionarna faza korišten je silikagel G, a kao mobilna faza smjesa petroletera i acetona u omjeru 70:30.

Tankoslojnom kromatografijom uzorka posidonije u kojoj je korištena druga mobilna faza (smjesa n-propanola i petroletera) također je razdvojeno sedam pigmenata (Slika 17). Pri korištenju ove mobilne faze došlo je do slabijeg razdvajanja dviju molekula klorofila – klorofila *a* i klorofila *b*. Uz to, određena količina pigmenata je zaostala na startnoj liniji te je pozadinsko obojenje bilo intenzivnije. Međutim, pojavila se jedna dodatna frakcija koja nije primijećena pri upotrebi prve mobilne faze. Iz analize apsorpcijskog spektra nepoznate frakcije i usporedbe s literaturnim podacima moglo bi se zaključiti da nepoznata frakcija odgovara anteraksantinu. Prema tome, redoslijed pigmenata koji su se odvojili je – neoksantin, anteraksantin, violaksantin, klorofil *b*, klorofil *a* i β-karoten. U ovom slučaju nije primijećen feofitin.

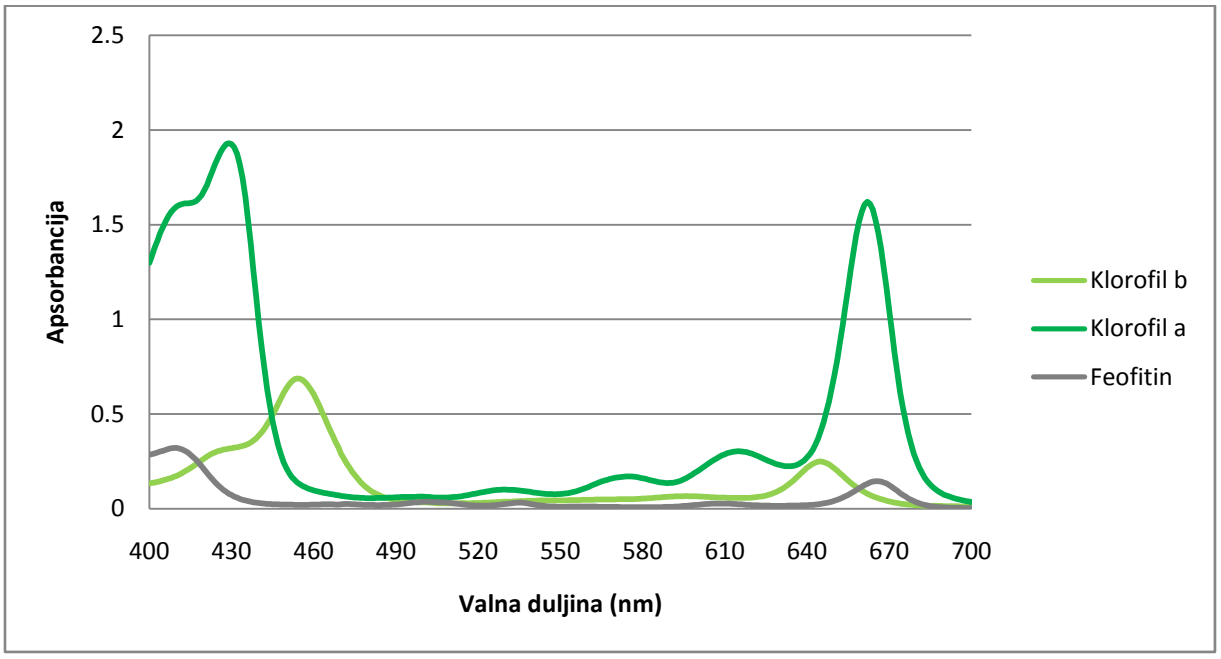


Slika 17. Fotosintetski pigmenti u uzorcima posidonije razdvojeni metodom tankoslojne kromatografije. Kao stacionarna faza korišten je silikagel G, a kao mobilna faza smjesa petroletera i n-propanola u omjeru 90:10.

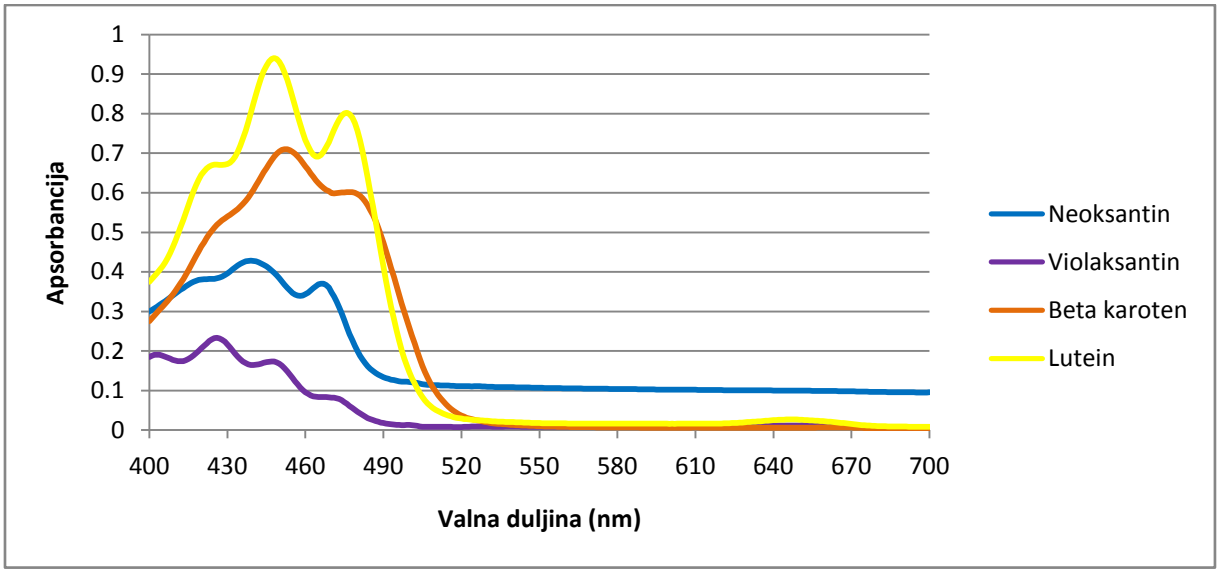
4.3. Apsorpcijski spektri fotosintetskih pigmenata

Na apsorpcijskom spektru raspona valnih duljina od 400 – 700 nm vidi se da klorofil *a* ima dva glavna apsorpcijska maksimuma – jedan u crvenom dijelu spektra (oko 660 nm) i drugi u plavo-ljubičastom dijelu spektra (oko 430 nm). Uz ova dva glavna maksimuma, pojavljuju se i tri mala maksimuma u žutom dijelu spektra. Klorofil *b* također pokazuje dva glavna maksimuma koji su malo pomaknuti u odnosu na klorofil *a* i imaju maksimume u crveno-narančastom (oko 650 nm) te plavom dijelu spektra (oko 450 nm). Feofitin, slično klorofilu *a* ima apsorpcijski maksimum oko 660 nm i jedan pik oko 410 nm (Slika 18).

Svi karotenoidi imaju apsorpcijske maksimume u rasponu od 400 – 500 nm i pokazuju karakteristična tri maksimuma apsorpcije (Slika 19).



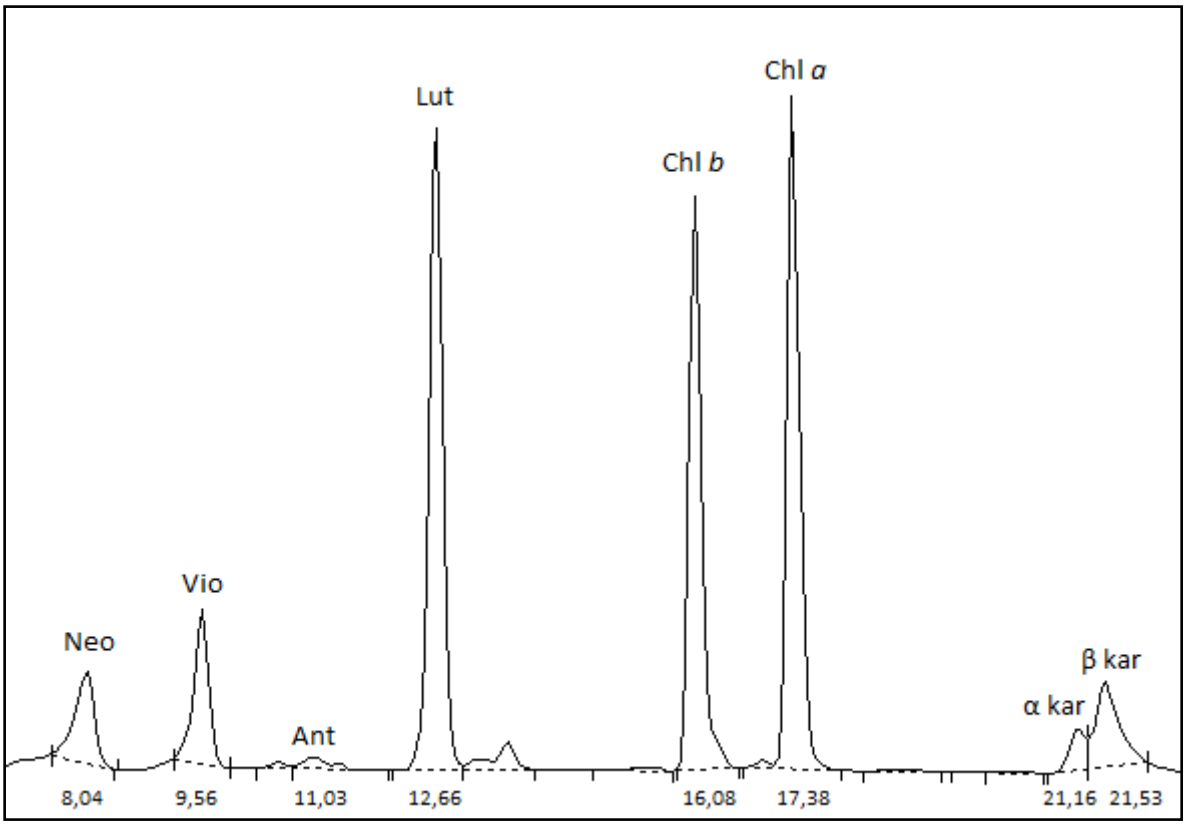
Slika 18. Apsorpcijski spektri klorofila *a* i *b* i feofitina (otopljenih u acetonu) u vidljivom dijelu spektra (400 – 700 nm).



Slika 19. Apsorpcijski spektar karotenoida (otopljenih u etanolu) u vidljivom dijelu spektra (400 – 700 nm).

4.4. Analiza uzoraka posidonije tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Metodom HPLC je kod svih uzoraka posidonije detektirano osam pigmenata. Redoslijed izlaska iz kolone bio je sljedeći: neoksantin, violaksantin, anteraksantin, lutein, klorofil *b*, klorofil *a*, α-karoten te naposljetku β-karoten Ovom metodom detektirani su anteraksantin i α-karoten koji se nisu razdvojili tankoslojnom kromatografijom, osim anteraksantina koji se možda izdvojio pri korištenju druge mobilne faze. Alfa karoten nije detektiran kod vodene leće. Isto tako, kod posidonije i vodene leće nije detektiran feofitin.



Slika 20. Kromatogram ekstrakta fotosintetskih pigmenata iz uzorka posidonije detektiranih metodom HPLC pri 440 nm. Sustav mobilne faze: otapalo A (smjesa acetonitirila, metanola i Tris-pufera; volumni omjer 84:2:14); otapalo B (smjesa metanola i etil acetata; volumni omjeru 68:32). Eluacija pigmenata: linearni gradijent 14 min (100 % A – 100 % B); izokratna eluacija 6 min (100 % B); linearni gradijent 1 min (100 % B – 100 % A); izokratna eluacija 6 min (100 % A). Brojevi na dnu su retencijska vremena pojedinih pigmenata izražena u minutama. Neo: neoksantin; Vio: violaksantin; Ant: anteraksantin, Lut: lutein, Chl *b*: klorofil *b*, Chl *a*: klorofil *a*, α kar: alfa karoten, β kar: beta karoten.

Najveći udjeli svih fotosintetskih pigmenata bili su na postaji u Zaglavu. Tamo su, uspoređujući veljaču na obje dubine, veće količine bile na 2 m, dok je za lipanj bilo obrnuto. U Brbišćici su u oba mjeseca više koncentracije bile na 2 m. Razlike su bile najveće za klorofil *a* i *b*, i to dvostruko za Zaglav u lipnju, dok su razlike među ostalim pigmentima bile značajno manje (Tablica 4).

Tablica 4. Udjeli fotosintetskih pigmenta* (mg/g_{SM}) dobivenih metodom HPLC

Postaja	Mjesec	Dubina (m)	Chl *a*	Chl *b*	Neo	Vio	Lut	β-car
Brbišćica	II	2	3,63	2,39	0,29	0,56	0,49	0,08
		10	2,98	1,89	0,26	0,56	0,42	0,09
	VI	2	2,66	2,03	0,24	0,37	0,38	0,02
		10	1,94	1,43	0,17	0,29	0,27	0,03
Zaglav	II	2	4,41	3,02	0,42	0,60	0,70	0,10
		10	4,12	2,73	0,34	0,44	0,56	0,06
	VI	2	2,24	1,66	0,18	0,23	0,33	0,03
		10	4,66	3,40	0,38	0,82	0,75	0,10

* vrijednosti dobivene mjerenjem jednog uzorka

Tablica 5. Usporedba udjela klorofila *a* i *b* te ukupnih karotenoida (mg/g_{SM}) dobivenih tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)* i spektofotometrijski**

Postaja	Mjesec	Dubina (m)	Chl *a*		Chl *b*		Uk. car.***	
Brbišćica	II	2	**3,63**	4,38	**2,39**	1,95	**1,42**	1,31
		10	**2,98**	3,40	**1,89**	1,45	**1,33**	1,10
	VI	2	**2,66**	2,63	**2,03**	1,36	**1,01**	0,80
		10	**1,94**	2,65	**1,43**	1,37	**0,76**	0,83
Zaglav	II	2	**4,41**	4,61	**3,02**	2,12	**1,82**	1,33
		10	**4,12**	4,52	**2,73**	1,88	**1,40**	1,33
	VI	2	**2,24**	2,54	**1,66**	1,33	**0,77**	0,83
		10	**4,66**	3,89	**3,40**	1,89	**2,04**	1,25

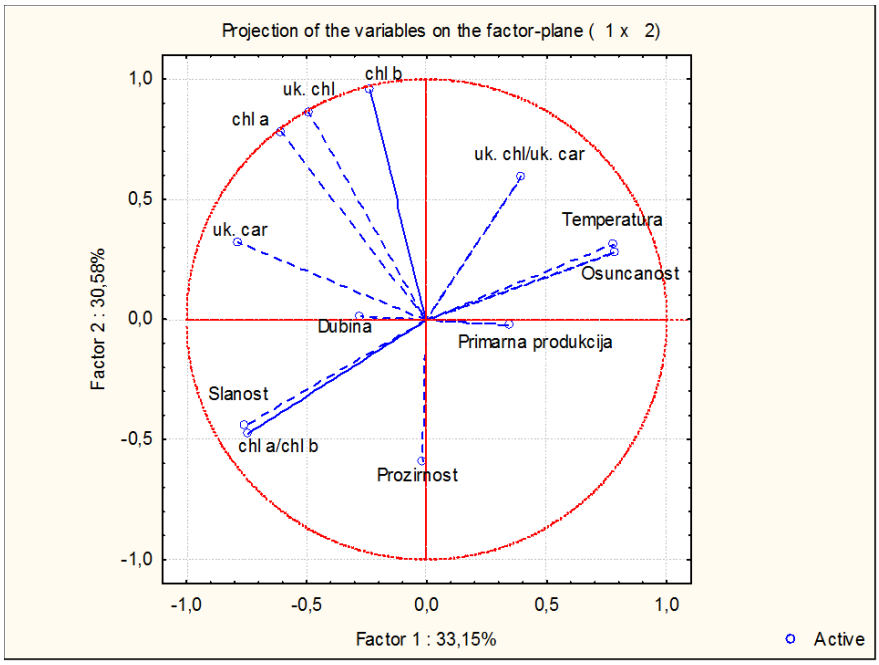
* vrijednosti dobivene mjerenjem jednog uzorka metodom HPLC (lijevi stupac, podebljane)
** srednja vrijednost sedam replika izmjerenih spektrofotometrijski (desni stupac)
***ukupni karotenoidi dobiveni su zbrajanjem vrijednosti pojedinačnih karotenoida (Tablica 4) izmjerenih metodom HPLC

4.5. Analiza glavnih komponenti (PCA)

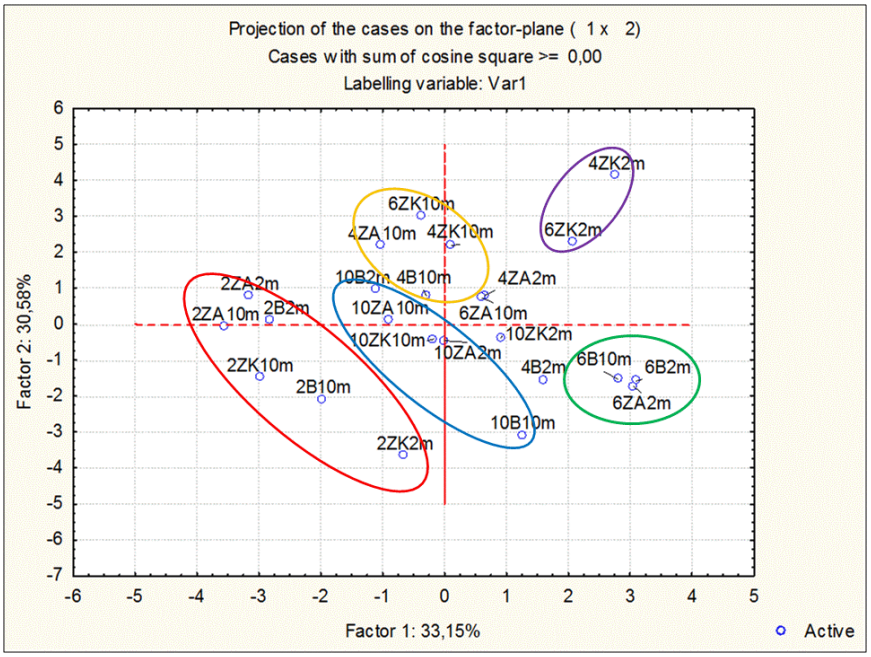
Analizom glavnih komponenti (PCA) obuhvaćeni su udjeli klorofila *a* i *b*, ukupni klorofili i karotenoidi, omjeri klorofila *a* i *b* te ukupni klorofili i ukupni karotenoidi i podaci o primarnoj produkciji te okolišnim čimbenicima koji su uključivali dubinu, osunčanost, slanost, prozirnost i temperaturu. Dobivene su tri glavne komponente koje su obuhvaćale 82,62 % varijabilnosti podataka. Prve dvije komponente (PC1 i PC2) najviše doprinose ukupnoj varijabilnosti podataka (63,73 %). Doprinos svake pojedine mjerene varijable prvoj i drugoj komponenti prikazan je na Slici 21. Prva komponenta snažno korelira s temperaturom i osunčanošću i srednje s omjerom ukupnih klorofila i karotenoida. U negativnoj je korelaciji sa salinitetom i omjerom chl *a*/chl *b*. Druga komponenta snažno korelira s udjelom klorofila *a,* klorofila *b* te ukupnim klorofilima, dok je u negativnoj korelaciji sa salinitetom i omjerom chl *a* i chl *b*.

Orijentacijski dijagram analize PCA prikazuje disperziju svih 24 uzoraka s obzirom na prvu i drugu komponentu. Uzorci su se većinom grupirali s obzirom na godišnje doba i dubinu. Primijećeno je i nekoliko devijacija – uzorci iz Zaglava iz travnja na 3 m dubine

blisko su grupirani s uzorcima iz lipnja s istog lokaliteta, ali s veće dubine. Isto, tako uzorci iz Zadarskog kanala iz travnja i lipnja na 2 m dubine su se grupirali zajedno, ali su udaljeniji od ostalih uzoraka. Moguće je da je to posljedica velike primarne produkcije u Zadarskom kanalu koja bi se mogla povezati s većim utjecajem čovjeka na tom staništu (Slika 22).



Slika 21. Doprinos mjerenih varijabli prvoj i drugoj komponenti



Slika 22. Orijentacijski dijagram PCA analize

5. RASPRAVA

Uzorci posidonije prikupljeni su na tri postaje koje se razlikuju s obzirom na orijentaciju i utjecaj čovjeka stoga se mogu očekivati razlike u količini i omjerima pigmenata. Osim zbog položaja i drugih svojstava staništa, razlike u količini mogu se očekivati i zbog uzorkovanja u različitim godišnjim dobima i na dvjema dubinama.

Fotosintetske pigmente posidonije istraživao sam na intermedijarnim listovima (IL). Ovi listovi su zbog svojih morfoloških i fizioloških karakteristika korišteni u ranijim istraživanjima sadržaja fenolnih spojeva (Maltar 2013, Katanović 2013, Smiljanec 2013), a pokazali su se dobrim i za istraživanje pigmenata. Za razliku od juvenlnih (JL) i adultnih (AL) listova, IL su pogodniji za istraživanje fotosintetskih pigmenata iz nekoliko razloga. Kako su JL najmlađi i još su u razvitku, kod njih fotosintetski aparat nije u potpunosti razvijen niti postignuta pigmentacija u onoj mjeri u kojoj je prisutna u razvijenijih listova. To se može zaključiti na temelju njihove bijele do svijetlozelene boje koje upućuju na manju količinu klorofila. Iz toga možemo zaključiti da je u tim listovima fotosinteza tek u začetku ili još nije ni počela. Osim toga, JL su kraći i zbog toga često zaklonjeni od svjetlosti duljim, starijim listovima. Iako su AL kao i IL zelene boje i imaju u potpunosti razvijeni fotosintetski aparat, ni njih nisam koristio u ovom istraživanju. Naime, prethodno istraživanje pokazalo je da je udio pigmenata u AL manji nego u IL (Dalla Via i sur. 1998). Uz to, budući da su IL mlađi listovi u usporedbi s AL, nemaju značajnu pokrivenost epifitima (Enríquez i sur., 1992). Naime, epifiti mogu umanjiti prodor svjetlosti do lisnog mezofila i na taj način utjecati na biosintezu klorofila. Bitno je napomenuti da su listovi posidonije jako čvrsti zbog velikog udjela lignina u njihovim staničnim stijenkama (Klap i sur. 2000). Iz tog razloga je uobičajena ekstrakcija u tarioniku nemoguća prije prethodnog usitnjavanja smrznutih listova u uređaju namijenjenom za tu svrhu.

5.1. Udjeli fotosintetskih pigmenata u listovima posidonije na različitim lokalitetima i dubinama

Spektrofotometrijska mjerenja ekstrakata fotosintetskih pigmenta pokazala su da se vrijednosti fotosintetskih pigmenata (klorofila *a* i *b*, ukupnih klorofila i karotenoida te omjera klorofila *a* i *b* i omjera ukupnih klorofila i karotenoida) mijenjaju sukladno s promjenama godišnjih doba te ovise o lokalitetu i dubinama.

U listovima posidonije sakupljenim na postajama u Brbišćici i Zaglavu na 3 m dubine udjeli klorofila *a* i *b* u suhoj masi tkiva te ukupni klorofili bili su najviši u kasnu jesen i zimu, te su postupno padali i imali najnižu razinu u ljeto. Ovi rezultati su u skladu s prijašnjim istraživanjima u kojima je tijekom ljeta došlo do redukcije u količini klorofila kod vrsta *P. oceanica* i *Cymodocea nodosa* (Ucria) Aschers (Drew 1976), a isto tako i s istraživanjem na još jednoj morskoj cvjetnici - *Zostera marina* L. (Liu i sur. 2011). Redukcija klorofila tijekom ljetnih mjeseci rezultat je jačeg intenziteta svjetlosti koja je povezana i s prozirnošću mora te osunčanosti. Što je osunčanost veća i prozirnost bolja to će više svjetlosti doprijeti do listova. Kako su prema prosječnim mjesečnim vrijednostima za srednji Jadran (DHMZ) osunčanost i prozirnost bili veći u ljetnim mjesecima, do listova je dopiralo više svjetlosti. Prema tome, u tim uvjetima je i uz manju količinu klorofila moguće postići dovoljnu učinkovitost fotosinteze. Zimi je osunčanost bila upola manja pa se zbog toga količina klorofila povećala radi boljeg iskorištenja dostupne svjetlosti. Isto tako, moguće je da je ljetna redukcija klorofila povezana s djelovanjem visokog intenziteta svjetlosti na fotosintetski aparat. Višak svjetlosti dovodi do fotooksidacijskih reakcija kisika i klorofila. Razlika između postaja Brbišćica i Zaglav vidljiva je u travnju kada je količina klorofila znatno veća u Zaglavu. Mogući uzrok je zasijenjenost staništa. Naime, naselja posidonije u Zaglavu dobivaju manje svjetlosti od onih u Brbišćici. Razlog tomu je orijentiranost uvale Zaglav prema sjeveru kao i nagib staništa u smjeru sjeverozapada. Uz to, južnije od Zaglava se nalazi brdo zbog čega su naselja posidonije u zimskim mjesecima (kada je Sunce niže na horizontu) većinom u sjeni (Maltar 2013). U listovima iz Zadarskog kanala količina klorofila je bila najviša tijekom travnja i lipnja. Iz podataka o prozirnosti mora za Zadarski kanal vidljivo je da je u tim mjesecima prozirnost bila značajno manja, nego na ostalim postajama. To je posljedica dostupnosti većih količina hranjivih tvari koje su dovele do pojačanog razvoja fitoplanktona u toplijim mjesecima. U sastavu fitoplanktona su također fotosintetski organizmi koji ovise o Sunčevoj svjetlosti, a kako slobodno lebde u stupcu vode iznad naselja posidonije, tako ju i prvi iskorištavaju. Stoga je posidoniji dostupno znatno manje svjetlosti.

Na 10 m dubine na postajama u Brbišćici i Zaglavu vidi se različiti trend sezonskih promjena količine klorofila. Više koncentracije su i dalje izmjerene u veljači, ali one se u uzorcima iz Zaglava tijekom godine statistički značajno ne mijenjaju, dok je u uzorcima iz Brbišćice na ovoj dubini uz veljaču, najviša koncentracija bila u travnju. Podjednake koncentracije klorofila tijekom godine u uvali Zaglav vjerojatno su posljedica slabijeg intenziteta svjetlosti. Osim što se radi o većoj dubini pa je intenzitet svjetlosti manji, uzrok je i orijentacija uvale Zaglav. Ove činjenice idu u prilog višim razinama klorofila u zimskim

mjesecima, međutim, kao što sam već ranije spomenuo, u ljetnim mjesecima su također izmjerene slične razine. Ovdje veliki utjecaj vjerojatno također ima svjetlost. Iz mjerenja intenziteta svjetlosti u Zaglavu na 10 m od kraja lipnja 2011. do sredine srpnja 2011 vidljivo je da je prosječni intenzitet upola manji od onog u Brbiščici (Maltar 2013, Smiljanec 2013). Osim, možda smanjene osunčanosti u tom razdoblju, uzrok može biti i veći utjecaj čovjeka. Kao što sam već spomenuo, u uvalu Zaglav tijekom ljetnih mjeseci dolaze mnogi nautičari te i to može imati utjecaj na manju količinu svjetlosti. Vjerojatno se iz tih razloga povećala razina klorofila u biljkama kako bi što efikasnije iskoristile dostupnu svjetlost za primarnu produkciju. Sličan trend kao u Zaglavu pojavljuje se u biljkama u Zadarskom kanalu samo što ovdje nije u pitanju zasjenjenost staništa, već manji intenzitet svjetlosti zbog utjecaja čovjeka. Najviše koncentracije izmjerene su u toplijim mjesecima (osobito u lipnju) kada je vjerojatno i prisutnost fitoplanktona najveća.

Značajno niže koncentracije klorofila u uzorcima iz Brbišćice u listopadu, s obzirom na vrijednosti s 3 m dubine, mogle bi biti posljedica hidrodinamizma. U jesen posidonija odbacuje adultne listove te je moguće da, zbog manjih strujanja vode pri većim dubinama, mladi listovi ostanu duže vrijeme zaklonjeni od svjetlosti. U procesu biosinteze klorofila u jednom od koraka za aktivnost enzima potrebna je svjetlost (Taiz i Zeiger 2010). Ako su listovi posidonije bili djelomično zaklonjeni tada je stopa biosinteze klorofila bila niža što se očitovalo kao znatni manjak u listovima tijekom listopada. Nasuprot tome, na 3 m prisutno je veće strujanje vode koja je mogla odnijeti odbačene listove te je biosinteza klorofila bila u skladu s okolišnim uvjetima. Do većih količina u travnju (s obzirom na 3 m) je vjerojatno došlo kako bi se maksimalno iskoristila dostupna svjetlost.

Najveći udjeli ukupnih karotenoida u Brbišćici i Zaglavu na 3 m dubine zabilježeni su, kao i kod klorofila u kasnu jesen i zimu. Prema istraživanju Liu i sur. (2011) do povećanja koncentracije karotenoida u zimskim mjesecima dolazi zbog niskih temperatura koje potiču stvaranje reaktivnih oblika kisika (ROS) te smanjuju aktivnost antioksidtivnih enzima. Prema tome, dolazi do povećanja biosinteze karotenoida, koji su dio neenzimatskog antioksidativnog sustava, radi zaštite od ROS. Povećanjem temperature i intenziteta svjetlosti u proljeće došlo je do smanjenja koncentracije karotenoida. U Zadarskom kanalu je situacija drugačija. Ovdje je došlo do značajnog povećanja karotenoida u lipnju u odnosu na travanj, dok se u listopadu i veljači ta razina malo smanjila. Veća razina karotenoida mogla bi biti posljedica manje učinkovitosti fotosinteze uslijed manjka svjetlosti zbog visokog stupnja eutrofikacije i pojave veće količine fitoplanktona.

Pri većoj dubini ukupni karotenoidi pokazuju sličan trend promjena tijekom mjeseci kao i klorofili. Za uzorke iz uvale Zaglav mogu se primijeniti isti razlozi uočenog obrasca promjene karotenoida kao i kod klorofila. Karotenoidi su pigmenti koji imaju svoje maksimume apsorpcije u plavom dijelu spektra. Plava i zelena svjetlost, za razliku od crvene koja se odmah apsorbira, prodiru najdublje kroz stupac vode (Kirk 1994). Smanjeni intenzitet (te niža temperatura u zimskim mjesecima, osobito na većoj dubini) i veći udio plave svjetlosti na 10 m uzrokovali su povećanu biosintezu karotenoida. U uzorcima iz Zadarskog kanala sa dubine 10 m pojavio se isti obrazac promjene u travnju i lipnju kao i na 2 m dubine samo što su koncentracije karotenoida bile značajno više. Niža koncentracija u listopadu mogla bi se objasniti manjim stupnjem eutrofikacije zbog čega je i prodor svjetlosti bio bolji, dok je u veljači opet došlo do povećanja količine karotenoida zbog nižih temperatura i manjeg prodora svjetlosti. Udjeli ukupnih karotenoida u listovima iz Brbišćice pokazuju isti rast i pad vrijednosti kao i klorofili što bi moglo ukazivati na to da u biljkama postoje regulacijski mehanizmi koji su zaslužni za održavanje omjera klorofila i karotenoida te optimalne stope fotosinteze.

Vrijednosti omjera klorofila *a* i klorofila *b* pokazuju za postaje Brbišćica i Zaglav (na obje dubine) sličan obrazac promjene kao i kod klorofila. Snižavanje omjera klorofila *a* i klorofila *b* s dubinom primijećeno je kod brojnih vrsta morskih cvjetnica i smatra se prilagodbom za uspješniju apsorpciju svjetlosti (Wolanski 2001). Isto vrijedi i za kopnene biljke – omjer je u biljaka koje rastu na jakom suncu veći od omjera u biljaka sjene. Manji omjer posljedica je povećanja udjela klorofila *b* koji efikasnije apsorbira plavu svjetlost koja u većoj količini dopire do biljaka u sjeni (Pearcy 2000). Međutim, uspoređivanjem vrijednosti na obje dubine vidi se da je taj omjer kod posidonije uglavnom veći pri dubini od 10 m. Isti rezultati nađeni su i u drugim istraživanjima (Collier i sur. 2008, Drew 1976). Moguće je da posidonija ima drugačije prilagodbe na veće dubine od ostalih morskih cvjetnica i smatram da su potrebna detaljnija istraživanja.

Omjer klorofila i karotenoida je na obje dubine za uzorke iz Brbišćice konstantan, uz manje odstupanje u veljači na 10 m dubine. Međutim, ovakav rezultat nije vidljiv i za uzorke iz Zadarskog kanala i Zaglava kod kojih postoje varijacije tijekom sezone. Te promjene mogu ukazivati na prisutnost stresa. Kao što sam već spominjao, stresni faktor može biti svjetlost koja je na tim lokalitetima ograničena ili zbog utjecaja čovjeka ili geografskih obilježja za razliku od Brbišćice koja se smatra neutjecajnim staništem. Vidljivo je da je pri 10 m dubine taj omjer na svim postajama niži tijekom veljače, dakle, u zimskim mjesecima. Tada je osunčanost znatno manja te je intenzitet svjetlosti slabiji, osobito na većoj dubini. Stoga se

povećava udio karotenoida koji kao pomoćni pigmenti osiguravaju što bolje iskorištenje dostupne svjetlosti proširujući spektar koji pokreće fotosintezu. No, ne smiju se zanemariti i neki drugi oblici stresa koji su možda prisutni na tim staništima. Stresni uvjeti vjerojatno su doveli do manje efikasnosti regulacijskih mehanizama koji održavaju taj omjer konstantnim u biljkama tijekom sezone.

Iz orijentacijskog prikaza PCA analize i rezultata udjela fotosintetskih pigmenata vidljivo je da su se uzorci grupirali u većoj mjeri prema godišnjim dobima a u manjoj prema dubini. Uzorci iz Zadarskog kanala s 2 m dubine iz travnja i lipnja najviše su se izdvojili od ostalih i relativno blizu se grupirali. Razlog tome mogao bi biti utjecaj čovjeka na stanište posidonije na tom lokalitetu zbog čega su i rezultati najviše odstupali od ostalih. Na izdvajanje Zadarskog kanala je najveći utjecaj mogao imati rezultat omjera klorofila i karotenoida na 2 m jer se jedino taj rezultat iz travnja isticao u usporedbi s ostalima. Osim pigmenata utjecaj su mogli imati i prozirnost koja je bila znatno manja u toplijim mjesecima, a i primarna produkcija koja je bila i više nego dvostruko veća s obzirom na Brbišćicu i Zaglav.

5.2. Tankoslojna kromatografija i apsorpcijski spektar fotosintetskih pigmenata

Rezultati tankoslojne kromatografije ekstrakata IL (mobilna faza - petroleter i aceton u omjeru 70:30) pokazali su da posidonija ima sastav fotosintetskih pigmenata kao i vodena leća te kopnene biljke. Najveći udio imaju klorofil *a* i *b,* a prisutni su i svi glavni karotenoidi (neoksantin, violaksantin, lutein i β-karoten). Uz ove pigmente, većinom je došlo i do izdvajanja feofitina. Međutim, ne mogu sa sigurnošću reći je li cjelokupna količina izdvojenog feofitina postojala u intaktnoj biljci ili je feofitin jednim dijelom nastao zbog uvjeta ekstrakcije i prirode stacionarne faze. Feofitin je, zapravo, derivat molekule klorofila kojoj nedostaje središnji magnezijev ion. Feofitinizaciju molekula klorofila, odnosno, gubitak magnezija može uzrokovati nekoliko čimbenika. Jedan od njih je prisutnost endogenih organskih kiselina unutar vakuola biljnih stanica koje lako uzrokuju transformaciju klorofila u feofitin. Kako bih to spriječio, prilikom priprema ekstrakta dodao sam malo kalcijevog karbonata koji neutralizira endogene organske kiseline. Međutim, silikagel, koji se koristi kao stacionarna faza u tankoslojnoj kromatografiji, također može uzrokovati nastanak feofitina zbog prisutnosti silicijske kiseline. Osim različitih kiselina, povišena temperatura te prisutnost vode u organskim otapalima koja se koriste za ekstrakciju pigmenata, pospješuju konverziju klorofila. Radi toga, osim neutralizacije endogenih kiselina dodatkom kalcijevog karbonata,

ekstrakciju sam radio na ledu i nastojao u što kraćem roku pripremiti ekstrakte. Međutim, moguće je da je tijekom pripreme i prilikom nanošenja ekstrakta na ploču došlo do značajnije feofitinizacje zbog čega je feofitin i uočen u većini uzoraka.

Kao što sam spomenuo u rezultatima, prilikom razdvajanja pigmenata iz ekstrakata posidonije uočio sam da je došlo do većeg pozadinskog obojenja u usporedbi s vodenom lećom. To je najvjerojatnije rezultat puno većeg udjela fenolnih spojeva u posidoniji. Kako bi smanjio utjecaj fenola na razdvajanje pigmenata, probao sam prilikom ekstrakcije dodati malo polivinilpolipirolidona (PVPP). PVPP veže fenolne spojeve i pošto je netopiv, taj kompleks sedimentacijom prilikom centrifugiranja formira talog, a pigmenti ostaju otopljeni u supernatantu. Ipak, dodatak PVPP-a nije rezultirao značajnim smanjenjem pozadinskog obojenja.

Casazza i Mazzella (2002) su koristili drugi sustav mobilne faze (petroleter i n-propanol u omjeru 90:10) pri kojem su dobili još dvije nepoznate frakcije blijedo-narančaste boje. Koristeći ovu mobilnu fazu dobio sam još jednu žutu frakciju među ksantofilima, ali nisam primijetio blijedo-narančaste frakcije. Kako bih identificirao nepoznatu frakciju, snimio sam njen apsorpcijski spektar. Uspoređujući valne duljine za maksimume apsorpcije nepoznate frakcije sa ostalim poznatim ksantofilima zaključio sam da bi nepoznata frakcija mogla odgovarati anteraksantinu. Ali, kako sam do toga došao samo na temelju jednog rezultata, ne mogu sa sigurnošću tvrditi da se zaista radi o anteraksantinu. Naime, pri kromatografiji s ovakvim sustavom mobilne faze došlo je do intenzivnijeg pozadinskog obojenja što je dovelo do nejasnih apsorpcijskih spektara zbog prisutnosti drugih pigmenata, poglavito klorofila. Da bi se sa sigurnošću moglo reći kako se radi o anteraksantinu ovakav tip kromatografije bi trebalo više puta ponoviti (s malim modifikacijama radi uspješnijeg razdvajanja) te dobivenu frakciju analizirati HPLC-om i retencijsko vrijeme usporediti sa standardom visoke čistoće.

5.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Sastav fotosintetskih pigmenata u ekstraktima IL posidonije odredio sam metodom HPLC prema postupku kojeg su opisali Garzia-Plazaola i Esteban (2012). Ovaj protokol pokazao se učinkovitijim za analizu pigmenata posidonije od protokola prema Pfeifhoferu (1989) jer su maksimumi određenih pigmenata bili jasniji i izraženiji. Novu metodu sam malo prilagodio kako bih dobio bolje razdvajanje pigmenata. Ova metoda pokazala je da se u posidoniji nalaze svi glavni fotosintetski pigmenti kao i u vodenoj leći. Za razliku od vodene

leće, u posidoniji je uz β-karoten detektiran i α-karoten koji je eluiran neposredno prije β-karotena. Zbog male razlike u njihovim strukturama na kromatogramu nisu bili vidljivi kao dva potpuno odvojena maksimuma, već su se djelomično preklapali. Prisutnost α-karotena u skladu je s prijašnjim istraživanjem (Casazza i Mazzella 2002) u kojem je od četiri istraživane morske cvjetnice u Mediteranu (*Posidonia oceanica*, *Cymodocea nodosa*, *Zostera noltii* Hornem. i *Halophila stipulacea* (Forssk.) Asch.) α-karoten nađen samo u posidoniji. Da se uistinu radi o α-karotenu, potvrdio sam uspoređujući s kromatogramom koji sam dobio analizirajući pigmente mrkve za koju je poznato da u podzemnom spremišnom tkivu korijena sadrži α-karoten (Koch i Goldman 2002). Uz to, usporedio sam i oblik njihovog apsorpcijskog spektra kao i valne duljine apsorpcijskih maksimuma.

Na temelju ovog istraživanja fotosintetskih pigmenata na različitim staništima tijekom godine i utjecaja okolišnih čimbenika mogao bih utvrditi da je najveći značaj na količinu pigmenata imala svjetlost. Osim samog intenziteta svjetlosti, važno je i koji dio spektra dopire do biljke što je vidljivo iz količina karotenoida na većim dubinama. Uz svjetlost, od ostalih okolišnih čimbenika, i temperatura se pokazala važnim čimbenikom. Iako je dokazano da i salinitet ima utjecaj na posidoniju, u ovom istraživanju se to ne može zaključiti jer se vrijednosti nisu značajno mijenjale s godišnjim dobima pa smatram da u takvim uvjetima salinitet nije uzrokovao promjenu sadržaja pigmenata.

Iz svih dobivenih rezultata smatram da su fotosintetski pigmenti dobri pokazatelji promjena okolišnih uvjeta, uključujući promjene nastale prirodnim putem ili djelovanjem čovjeka, ali potrebna su daljnja istraživanja koja bi uključila mjerenja što više okolišnih faktora.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata istraživanja sastava i udjela fotosintetskih pigmenata u intermedijarnim listovima posidonije prikupljenima u travnju, lipnju i listopadu 2011. te u veljači 2012. godine na tri različita lokaliteta – u Zadarskom kanalu na 2 i 10 m, odnosno, 3 i 10 m u uvalama Brbišćica i Zaglav, došao sam do sljedećih zaključaka:

1. Udjeli klorofila *a* i *b*, ukupnih klorofila te ukupnih karotenoida u listovima posidonije kao i omjeri klorofila *a* i klorofila *b* te omjeri ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida mijenjali su se ovisno o godišnjem dobu, dubinama i lokalitetu.

2. Udjeli klorofila *a* i *b* te ukupnih karotenoida pokazuju sličan sezonski trend promjena vrijednosti na pojedinoj dubini i lokalitetu. Određeno odstupanje uočeno je u količini ukupnih karotenoida u Zadarskom kanalu. U Brbišćici su na 3 m dubine najniže vrijednosti svih pigmenata izmjerene u travnju i lipnju. U Zaglavu su na toj dubini najniže vrijednosti bile u lipnju, a najviše u travnju i veljači. Na 10 m su u Brbišćici najniže izmjerene vrijednosti fotosintetskih pigmenata bile u lipnju i listopadu, dok su u Zaglavu bile podjednake u svim mjesecima. U Zadarskom kanalu su vrijednosti na dubini od 2 m bile više u travnju i lipnju, dok je na dubini 10 m najviša vrijednost bila u lipnju, ali nije se za sve izmjerene pigmente značajno razlikovala u usporedbi s veljačom.

3. Omjer klorofila *a* i klorofila *b* bio je najviši u veljači na dubini od 10 m na sva tri lokaliteta te na dubini 2 m u Zadarskom kanalu. Omjer ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida bio je konstantan na dubini 2 (3) m na sva tri lokaliteta, uz izuzetak uzoraka iz mjeseca travnja u Zadarskom kanalu. Na dubini od 10 m taj je omjer značajno varirao ovisno o godišnjem dobu i lokalitetu.

4. Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti utvrdio sam u posidoniji prisutnost svih glavnih fotosintetskih pigmenata - klorofila *a* i *b*, neoksantina, violaksantina, luteina, β-karotena, i α-karotena.

5. S obzirom na dobivene rezultate udjela fotosintetskih pigmenata i ovisnost njihove količine o okolišnim uvjetima, pokazalo se da bi se mogli koristiti kao dobri pokazatelji promjena okolišnih uvjeta.

7. LITERATURA

Bobetić, J. (2012): Lepidokronološka analiza i procjena primarne produkcije u naseljima posidonije (*Posidonia oceanica* (L.) Delile) izloženim utjecaju čovjeka. Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 43 str.

Borum, J., Duarte, C. M., Krause-Jensen, D., Greve, M. T. (2004): European Seagrasses: an Introduction to Monitoring and Management. EU Project Monitoring and Managing European Seagrasses (M&MS project), 88 str.

Boudouresque, C. F., Bernard, G., Bonhomme, P., Charbonnel, E., Diviacco, G., Meinesz, A., Pergent, G., Pergent-Martini, C., Ruitton, S., Tunesi, L. (2012): Protection and conservation of *Posidonia oceanica* meadows. RAMOGE and RAC/SPA publisher. Tunis: 1-202.

Boudouresque, C. F., Mayot, N., Pergent, G. (2006): The outstanding traits of the functioning of the *Posidonia oceanica* seagrass ecosystem. Biologia Marina Mediterranea **13**: 109-113.

Boudouresque, C. F., Charbonel, E., Meinesz, A., Pergent, G., Pergent-Martini, C., Cadiou, G., Bertrandy, M. C., Foret, P., Ragazzi, P., Rico-Raimondino, V. (2000): A monitoring network based on the seagrass *Posidonia oceanica* in the northwestern Mediterranean sea. Biologia Marina Mediterranea **7**: 328-331.

Boudouresque, C. F., Meinesz, A. (1982): Découverte de l'herbier de Posidonie. Cahier Parc National Port-Cross **4**: 1-79.

Brain, R. A., Cedergreen, N. (2009): Biomarkers in Aquatic Plants: Selection and Utility. U: Whitcare, D. M. (ur.) Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Springer, str. 49-110.

Britton, G. (1983): The Biochemistry of Natural Pigments. Cambridge University Press, Cambridge.

Casazza, G., Mazzella, L. (2002): Photosynthetic pigment composition of marine angiosperms: preliminary characterization of Mediterranean seagrasses. Bulletin of Marine Science **7**: 1171-1181.

Cogdell, R. J. (1978): Carotenoids in photosynthesis. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **284**: 569-579.

Collier, C. J., Lavery, P. S., Ralph, P. J., Masini, R. J. (2008): Physiological characteristics of the seagrass *Posidonia sinuosa* along a depth-related gradient of light availability. Marine Ecology Progress Series **353**: 65-79.

Cuttriss, A., Pogson, B. (2004): Caroteoids. U: Davies, K. (ur.) Plant Pigments and Their Manipulation. Oxford, Blackwell Publishing, str. 57-91.

Dalla Via, J., Sturmbauer, C., Schönweger, G., Sötz, E., Mathekowitsch, S., Stifter, M., Rieger, R. (1998): Light gradients and meadow structure in *Posidonia oceanica*: ecomorphological and functional correlates. Marine Ecology Progress Series **163**: 267-278.

Den Hartog, C. (1970): The Seagrasses of the World. North Holland Publishing Company, Amsterdam.

Drew, E. A. (1976): Factors affecting photosynthesis and its seasonal variation in the seagrasses *Cymodocea nodosa* (Ucria) Aschers, and *Posidonia oceanica* (L.) Delile in the Mediterranean. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **31**: 173-194.

Elkalay, K., Frangoulis, C., Skliris, N., Goffart, A., Gobert, S., Lepoint, G., Hecq, J. H. (2003): A model of seasonal dynamics of biomass and producton of the seagrass *Posidonia oceanica* in the Bay of Calvi (Northwestern Mediterranean). Ecological Modelling **167**: 1-18.

Enríquez, S., Agusti, S., Duarte, C. M. (1992): Light absorption by seagrass *Posidonia oceanica* leaves. Marine Ecology Progress Series **86**: 201-204.

Esteban, R., Barrutia, O., Artetxe, U., Fernández-Marín, B., Hernández, A., García-Plazaola, J. I. (2014): Internal and external factors affecting photosynthetic pigment composition in plants: a meta-analytical approach. New Phytologist (u tisku), **doi**: 10.1111/nph.13186.

Ferrat, L., Pergent-Martini, C., Roméo, M. (2003): Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. Aquatic Toxicology **65**: 187-204.

Fortes, M. (2001): The Effects of Siltation on Tropical Coastal Ecosystems. U: Wolanski, E. (ur.) Oceanographic Processes of Coral Reefs: Physical and Biological Links in the Great Barrier Reef. CRC Press, str. 93-111.

González, L. (2001): Determination of photosynthetic pigments. U: Reigosa Roger, M. J. (ur.) Handbook of Plant Ecophysiology Techniques. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, str. 65-80.

Grbčić, A. (2012): Osnovna obilježja naselja morske cvjetnice *Posidonia oceanica* (L.) Delile u plitkom moru. Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 38 str.

Herbinger, K., Tausz, M., Grill, D. (1999): Are Winter Adaptive Changes in Glutathione and Chlorophyll Contentsv in Spuce Needles Triggered by Low Temperature or Short Days? Phyton (Austria) **39**: 171-174.

Katanović, J. (2013): Udio fenolnih spojeva u listovima posidonije (*Posidonia oceanica* (L.) Delile) na različitim lokalitetima u zadarskom akvatoriju. Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 59 str.

Khavari-Nejad, R. A., Mostofi, Y. (1998): Effects of NaCl on photosynthetic pigments, saccharides and chloroplast ultrastructure in leaves of tomato cultivars. Photosynthetica **35**: 151-154.

Kirk, J. T. O. (1994): Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Second Edition. Cambridge University Press, Cambridge.

Klap, V. A., Hemminga, M. A., Boon, J. J. (2000): Retention of lignin in seagrasses: angiosperms that returned to the sea. Marine Ecology Progress Series **194**: 1-11.

Koch, T. C., Goldman, I. L. (2004): A One-pass Semi-quantitative Method for Extraction and Analysis of Carotenoids and Tocopherols in Carrot. Horticultural Science **39**: 1260-1261.

Kuo, J., den Hartog, C. (2001): Seagrass taxonomy and identification key. U: Short, F. T., Coles, R. G. (ur.) Global Seagrass Research Methods. Amsterdam, Elsevier Science, str. 31-58.

Lichtenthaler, H. K. (1987): Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology **148**: 350-382.

Liu, J., Zhang, P., Guo, D., Niu, S., Zhang, X. (2011): Annula change in photosynthetic pigment contents of *Zostera marina* L. in Swan Lake. African Journal of Biotechnology **10**: 18194-18199.

Maltar, J. (2013): Udio fenolnih spojeva u listovima posidonije (*Posidonia oceanica* (L.) Delile) na različitim dubinama u uvali Zaglav, Dugi otok. Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 56 str.

Mandre, M., Tuulmets, L. (1997): Pigments changes in Norway spruce induced by dust pollution. Water, Air, and Soil Pollution **94**: 247-258.

Matievć, S., Kušpilić, G., Morović, M., Grbec, B., Bogner, D., Skejić, S., Veža, J. (2009): Physical and chemical properties of the water column and sediments at sea bass/sea bream farm in the middle Adriatic (Maslinova Bay). Acta Adriatica **50**: 59-76.

Mýsliwa–Kurdziel, B., Prassad, M. N. V., Strzalka, K. (2004): Photosynthesis in heavy metal stressed plants. U: Prassad, M. N. V. (ur.) Heavy Metal Stress in Plants. From Biomolecules to Ecosystems. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, str. 148-152.

Pearcy, R.W. (2000): Acclimation to sun and shade. U: Raghavendra, A. S. (ur.) Photosynthesis: A Comprehensive Treatise. Cambridge University Press, Cambridge, str. 250-263.

Pergent, G. (1991): Les indicateurs écologiques de la qualité du milieu marin en Méditerranée. Océanis **17**: 341-350.

Pfeifhofer, H. W. (1989): Evidence for chlorophyll *b* and lack of lutein in *Neottia nidus-avis* plastids. Biochemie und Physiologie der Pflanzen **184**: 55-61.

Reiss, C. (1994): Experiments in Plant Physiology. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.

Rüdiger, W. (2002): Biosynthesis of chlorophyll *b* and the chlorophyll cycle. Photosynthesis Research **74**: 187–193.

Simpson, D.J., Knoetzel, J. (1995). Light-harvesting complexes of plants and algae: lntroduction, Survey and Nomenclature. U: Ortand, D. R., Yocum, C. F. (ur.) Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, str. 493-506.

Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. (1999): Osnove analitičke kemije. Školska knjiga, Zagreb.

Smiljanec, M. (2013): Fenolni spojevi u listovima posidonije (*Posidonia oceanica* (L.) Delile) zadarskog akvatorija. Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 57 str.

Taiz, L., Zeiger, E. (2010): Plant Physiology. Fifth Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.

Tanaka, R., Tanaka, A. (2007): Tetrapyrrole Biosynthesis in Higher Plants. Annual Review of Plant Biology **58**: 321-346.

Tanaka, Y., Sasaki, N., Ohmiya, A. (2008): Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. The Plant Journal **54**: 733-749.

Vidaković-Cifrek, Ž., Tkalec, M., Dolenc Koce, J., Petricioli, D., Cvrtila, A., Katanović, J., Maltar, J., Smiljanec, M., Zupanič, N., Bakran-Petricioli, T. (2014): Phenols, photosynthetic pigments and leaf morphology as biomarkers of environmental influences on *Posidonia oceanica* (L.) Delile. 6th Slovenian Symposium on Plant Biology with International Participation. Book of Abstracts. Dolenc Koce, J., Grebenc, T., Urbanek Krajnc, A. (ur.). Ljubljana, Slovenija: Slovenian Society of Plant Biology, str. 25-25.

Von Wettstein, D., Gough, S., Kannangara, C. (1995): Chlorophyll Biosynthesis. The Plant Cell **7**: 1039–1057.

Willows, R. D. (2004): Chlorophylls. U: Davies, K. (ur.) Plant Pigments and their Manipulation. Oxford, Blackwell Publishing, str. 23-56.

Zore-Armanda, M. (2000): Razvoj fizičke oceanografije na Jadranu. Pomorski zbornik **38**: 301-331.

Korištene mrežne stranice:

Garcia-Plazaola, J., Esteban, R. (2012): Determination of chlorophylls and carotenoids by HPLC, http://www.publish.csiro.au/prometheuswiki/tiki-pagehistory.php?page=Determination of chlorophylls and carotenoids by HPLC&preview=10

http://www.biomedcentral.com/1471-2229/6/13

https://www.emolecules.com/

http://www.oceanrangerscyprus.org/cause-view/project-poseidon-conservation-poseidonia-oceanica-cyprus-artificial-reef/

8. ŽIVOTOPIS

Zovem se Adam Cvrtila i rođen sam 21.02.1991. u Zagrebu, a trenutno živim u Bestovju pokraj Svete Nedelje. Pohađao sam OŠ Rakitje i OŠ Sveta Nedelja, a 2005. godine upisao sam V gimnaziju u Zagrebu.

Preddiplomski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu upisao sam 2009. godine. te 2012. stekao zvanje sveučilišnog prvostupnika biologije. Iste godine upisao sam Diplomski studij molekularne biologije. Tijekom studiranja odradio sam laboratorijsku stručnu praksu na polju ekotoksikologije hidri te pod vodstvom mentora, zajedno s kolegama, sudjelovao na simpoziju Hrvatskog mikroskopijskog društva. Sudjelovao sam i u manifestaciji „Noć biologije“ na temu elektronske mikroskopije. Trenutno volontiram na Medicinskom fakultetu na Zavodu za fiziologiju i radim u tiskari Vjesnik.

Slušajući kolegije Fizilogija bilja te Struktura i funkcija fotosintetskih membrana, zavolio sam biljnu fiziologiju te se iz toga razloga odlučio na izradu ovog diplomskog rada.