Utjecaj čivitnjače (Amorpha fruticosa L.) na razvoj alga

Šimić, Mario

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:957363

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Mario Šimić

Utjecaj čivitnjače (*Amorpha fruticosa* L.) na razvoj alga

Završni rad

Osijek, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Završni rad**
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski sveučilišni studij Biologije
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Utjecaj čivitnjače (*Amorpha fruticosa* L.) na razvoj alga

Mario Šimić

Rad je izrađen na: Zavod za ekologiju voda, Odjel za biologiju
Mentor: dr. sc. Tanja Žuna Pfeiffer, docent
Komentor: dr. sc Dubravka Špoljarić Maronić, docent

Sažetak:
Čivitnjača je invazivna biljna vrsta koja naseljava obale vodenih ekosustava. Poznato je da čivitnjača ima alelopatska svojstva kojima onemogućuje rast i razvoj drugih biljaka. Odumrli djelovi biljke (npr. listovi) dospijevaju i postepeno se razgrađuju u vodenim tijelima ispuštajući alelokemikalije. Istraživanje utjecaja čivitnjače na razvoj alga u obraštaju provedeno je u eksperimentalnim akvatičkim sustavima. Praćene su promjene fizikalno-kemijskih svojstava vode te promjene u razvoju obraštaja i mikrofita u obraštajnim zajednicama. Vodeni ekstrakti čivitnjače utjecali su na promjene fizikalno-kemijskih parametara te na taj način doveli do promjena u sastavu mikrofita na što ukazuju promjene u koncentraciji pojedinih klorofila.

Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: čivitnjača, alge, obraštaj, eksperimentalni vodeni sustav

Rad je pohranjen u: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

BASIC DOCUMENTATION CARD
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **Bachelor'sthesis**
Department of Biology Bachelor's thesis
Undergraduate university study programme in Biology Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Biology

Effect of false indigo-bush (*Amorpha fruticosa* L.) on algae development

Mario Šimić

Thesis performed at: Sub-department of Water Ecology, Department of Biology
Supervisor: Tanja Žuna Pfeiffer, PhD, Asst. Prof.
Cosupervisor: Dubravka Špoljarić Maronić, PhD, Asst. Prof.

Abstract:
False indigo-bush is an invasive species that inhabits the shore zones of a variety of aquatic ecosystems. It has allelopathic properties and can inhibit growth and development of other plant species. During the decomposition of plant dead mass (eg. leaves) different allelochemicals could be released into the aquatic environment. The aim of this study was to investigate the influence of the false indigo-bush aqueous extracts on the development of periphytic microphytes in the experimental aquatic systems. Aqueous extracts caused changes in the physico-chemical parameters as well as in the periphyton chlorophyll concentrations indicating changes in the structure of microphytes.

Original in: Croatian
Key words: false indigo-bush, algae, periphyton, experimental aquatic system

Thesis deposited in: on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

SADRŽAJ

1.UVOD.....1

1.1 Karakteristike obraštaja.....1

1.2 Invazivne biljne vrste.....2

1.2.1 Čivitnjača, *Amorpha fruticosa* L.....3

1.3 Cilj istraživanja.....5

2. METODE I MATERIJALI.....6

2.1 Dizajn eksperimenta.....6

2.2 Priprema otopine čivitnjače.....7

2.3 Mjerenje fizikalno-kemijskih svojstava vode.....8

2.4 Laboratorijska obrada podataka.....8

3. REZULTATI.....10

3.1 Fizikalno-kemijska svojstva vode.....10

3.2 Biomasa obraštaja.....15

3.3 Koncentracija klorofila u obraštaju 17

4. RASPRAVA.....20

ZAKLJUČAK.....22

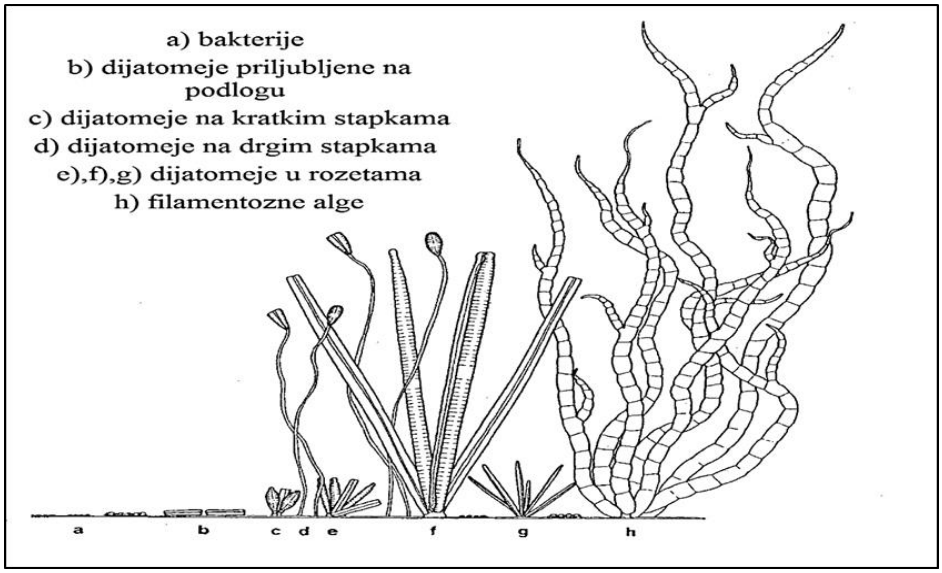
LITERATURA.....23

1. UVOD

1.1. Karakteristike obraštaja

Obraštaj ili perifiton je zajednica različitih organizama (praživotinje, beskralježnjaci, mikrofiti, gljive) koji žive pričvršćeni za supstrat uronjen u vodu. S obzirom na vrstu supstrata na kojima se razvija, za obraštaj se koriste i nazivi: epifiton koji se razvija na vodenim biljkama, epiksilon na drvenim podlogama, epipsamon na pijesku, epiliton na kamenim podlogama te epipelon na muljevitim površinama i sedimentu (Azim i sur. 2005). Obraštaj se razvija u različitim trofičkim uvjetima i u različitim vodenim biotopima, od bara do oceana (Azim i Asaeda 2005; Azim i sur. 2005). Organizmi u obraštaju imaju važnu ulogu u svim akvatičkim ekosustavima jer fiksiraju ugljik, utječu na kruženje hranjivih tvari, izvor su hrane ribama i malim životinjama, a mikrofiti odnosno alge i cijanobakterije su, uz navedeno, i važni primarni producenti (Azim i sur. 2005).

Razvoj obraštaja započinje taloženjem otopljene organske tvari, aminokiselina i mukopolisaharida na čistu podlogu djelovanjem elektrostatskih sila. Prvi organizmi koji se naseljavaju su bakterije koje se mukoznim nitima pričvršćuju za podlogu (Carrias i sur. 2002; Azim i Asaeda 2005). Na organski matriks kojeg izlučuju bakterije pričvršćuju se (Slika 1) male penatne dijatomeje, a zatim dijatomeje koje razvijaju različito duge stapke, dijatomeje u rozetama te na kraju uspravne filamentozne zelene i crvene alge (Azim i Asaeda 2005).



Slika 1: Slijed naseljavanja mikrofita na podlogu (prilagođeno prema Hoagland i sur. 1982).

Razvoj alga u obraštaju pod utjecajem je velikog broja čimbenika kao što su svjetlost, koncentracija hranjivih tvari, tip podloge, temperatura vode i plavljenje (Larned 2010). Autotrofni organizmi se razvijaju u uvjetima dobre osvijetljenosti, dok se heterotrofni, kao npr. bakterije, razvijaju pri slabijem osvijetljenju (Asaeda i Hong Son 2000). Za rast i razvoj alga potrebne su hranjive tvari, dušik i fosfor, a dijatomejama su potrebni još i silikati (Tank i Dodds 2003; Azim i sur. 2005). Brzom razvoju alga u obraštaju pogoduju čvršće i veće prirodne površine koje svojom hrapavošću usporavaju struju vode (Bergey 2008). Struja vode značajnije djeluje na muljevite i pjeskovite sedimente. Zbog jačine struje sediment se pomiče, a time se smanjuje prodor svjetlosti zbog čega su takve podloge vrlo nestabilne (Azim i sur. 2005). Na čvrstim podlogama dominiraju nitaste zelene alge, a cijanobakterije i dijatomeje na manjim podlogama (Cattaneo i sur. 1997). Na rast, reprodukciju, strukturu i raznolikost obraštaja utječe i temperatura. Povišena temperatura intenzivno djeluje na stanično disanje i fotosintezu obraštaja te potiče razvoj cijanobakterija i zelenih alga. U vodama s nižim temperaturama prevladavaju alge kremenjašice, odnosno dijatomeje. (Baulch i sur. 2005; Žuna Pfeiffer 2012.) Veliki utjecaj na obraštaj imaju i poplave koje mogu narušiti njihov razvoj i smanjiti ukupnu biomasu obraštaja (Burns i Ryder 2001; Azim i Asaeda 2005). Poplave uzrokuju podizanje sedimenta što rezultira smanjenjem hranjivih tvari u vodi i ograničenom osvijetljenošću vodenog stupca. Poplave visokog intenziteta oštećuju alge u obraštaju i onemogućavaju njihovo naseljavanje, a ponekad u potpunosti razaraju obraštaj (Wood i Armitage 1997).

1.2 Invazivne biljne vrste

U hrvatskoj flori do sada je zabilježeno preko 5000 biljnih vrsta i podvrsta. Među njima se razlikuju zavičajne ili autohtone biljke koje su prirodno raširene na području Hrvatske te strane ili alohtone biljke koje su posredstvom čovjeka slučajno ili namjerno unesene u područje na kojemu nisu prirodno rasprostranjene. Različite gospodarske djelatnosti, posebice poljoprivreda, turizam, arhitektura, hortikultura i šumarstvo značajno pridonose širenju stranih biljaka. Slučajan unos stranih biljaka na novo područje obično je povezano s prijenosom biljnih dijelova, plodova i sjemenki na odjeći, obući, transportnim sredstvima ili životinjama (Nikolić i sur. 2014).

Strane biljne vrste koje se brzo prilagođavaju području koje naseljavaju te se brzo šire i potiskuju autohtone vrste, nazivamo invazivnim vrstama (Novak i Kravarščan 2011). Ove

biljke proizvode velik broj plodova, sjemenki, spora i peludi koji se šire hidrohorno, anemohorno i zoohorno. Kod mnogih se javlja samooplodnja ili sposobnost vegetativnog razmnožavanja. Njihovo brzo širenje je često povezano i s činjenicom da ove biljke na novim staništima nisu izložene prirodnim neprijateljima te sve prirodne resurse umjesto za obranu koriste za rast i razvoj. Osim toga, pojedine vrste imaju i sposobnost alelopatskog djelovanja. Invazivne biljne vrste najčešće naseljavaju područja koja su pod velikim utjecajem čovjeka. To su urbana ili područja gdje je dobro razvijena industrija i poljoprivreda, te područja u blizini onečišćenih voda, prometnica i šuma (Nikolić i sur. 2014).

Invazivne vrste negativno djeluju na sustav u kojem se razvijaju. Pokazuju veliku kompeticiju s drugim biljkama, a rastom u gustim zajednicama ne dopuštaju širenje autohtonih vrsta. Mogu se križati s domaćim vrstama te dovesti do genskog zagađenja ili stvaranja sterilnih hibrida. Navedeni učinci mogu dovesti do smanjenja biološke raznolikosti. Nadalje, unosom stranih vrsta slučajno se mogu prenijeti i patogeni organizmi kao što su bakterije, virusi, gljivice i dr. Invazivne vrste na novim staništima mogu promijeniti vodni režim i kemijski sastav tla, utjecati na kruženje tvari u prirodi, smanjiti rast poljoprivrednih kultura ponašajući se kao snažni korovi, ali i negativno djelovati na zdravlje ljudi uzrokujući alergijske reakcija i trovanja (Nikolić i sur. 2014).

U flori Hrvatske do sada je opisano 70 vrsta invazivnih biljaka (Nikolić 2012) među kojima su najzastupljenije vrste iz porodica Asteraceae i Poaceae Na području Hrvatske najveći je broj stranih invazivnih vrsta unesen s područja Amerike, Azije i Afrike (Nikolić i sur. 2014.).

1.2.1 Čivitnjača, *Amorpha fruticosa L.*

Čivitnjača, *Amorpha fruticosa* L. je listopadni grm iz porodice mahunarki, Fabaceae (Slika 2). Porijeklom iz SAD-a, u Europu je donesena 1724. godine, a u Hrvatskoj se pojavila početkom prošlog stoljeća (Idžojtić i sur. 2009). Ovaj fanerofit ima neparno perasto sastavljene listove s jajolikim ili elipsoidnim liskama. Od ostalih vrsta iz porodice razlikuje se po svojim karakterističnim cvjetovima. Naime, vjenčić amorfe se sastoji samo od jedne tamnoljubičaste latice, zastavice, dok ostale latice, krila i lađica, nisu razvijene. Iz cvijeta izlazi 10 žutonarančastih prašnika koji u vrijeme cvjetanja biljke, od travnja do lipnja, privlače oprašivače, najčešće kukce. Cvjetovi čivitnjače su skupljeni u cvatove, guste

tamnoljubičaste metlice koje su uspravno postavljene. Iz nadrasle plodnice se nakon oprašivanja i oplodnje razvija plod, žljezdasta mahuna. Uz spolni način razmnožavanja, čivitnjača se razmnožava i vegetativno pomoću podzemnih podanaka (Nikolić i sur. 2014).



Slika 2: Listovi i cvat čivitnjače (Fotografija: Mario Šimić).

Čivitnjača raste na osunčanim, vlažnim i poplavnim staništima, često uz obale rijeka (Idžojtić i sur. 2009). Čivitnjača ima veliki ekonomski značaj. Koristi se u proizvodnji parfema, boja, pesticida te prehrambenih proizvoda od kojih se najviše ističe med. Dobro fiksira dušik, a njeno bogato razvijeno korijenje sprječava eroziju tla. Čivitnjača sadrži i glikozid amorfin koji se koristi u liječenju bolesti srca i živčanog sustava (Glavaš 2009). Međutim, velika otpornost na niske i visoke temperature, brzi rast i razvoj, veliki broj plodova, otpornost na parazite i bolesti omogućuju njeno invazivno ponašanje (Idžojtić i sur. 2009) što je uvelike čini nepoželjnom biljnom vrstom na različitim staništima. Osim toga, različita su istraživanja pokazala da čivitnjača ima i alelopatska svojstva te da može inhibirati klijanje i rast različitih biljnih vrsta (Novak 2018).

Alelopatija predstavlja biokemijsku interakciju između biljnih vrsta. Interakcije mogu imati inhibicijski, ali i stimulirajući učinak (Pierik i sur. 2004). Alelokemikalije po kemijskoj strukturi mogu biti alkaloidi, tanini, saponini, terpeni i glukozidi, a pohranjuju se u obliku soli, polimera ili glikozida topljivih u vodi. Alelokemikalije se iz biljaka mogu oslobađati na više načina: u plinovitom obliku, ispiranjem s lišća pod utjecajem oborina,

izlučivanjem iz korijena ili razgradnjom uginule biljke pri čemu različiti spojevi dospijevaju u tlo (Zeman i sur. 2011).

Bljke iz rodova *Lotus*, *Nymphaea*, *Alternanthera* i *Iris* te mnoge druge vodene vrste izlučuju alelokemikalije koje inhibiraju rast alga. Alelokemikalije uništavaju staničnu membranu cijanobakterija, utječu na fotosintezu alga, enzimatsku aktivnost, sintezu proteina te metabolizam nukleinskih kiselina. Osim flotantnih i submerznih biljaka koje alelokemikalije otpuštaju izravno u vodeni stupac, inhibiciju alga mogu potaknuti i biljke čiji mrtvi i suhi dijelovi dospiju u vodu gdje trunu i na taj način ispuštaju alelokemikalije (Cheng i sur. 2017).

1.3. Cilj istraživanja

Čivitnjača naseljava područja uz obale različitih vodenih ekosustva, a njeni odumrli listovi nakupljaju se i postupno razgrađuju u vodenim tijelima. Cilj ovog rada je istražiti alelopatski utjecaj vodenih ekstrakata listova čivitnjače na mikrofite u obraštajnim zajednicama.

2. METODE I MATERIJALI

2.1. Dizajn eksperimenta

Za istraživanje naseljavanja alga i razvoja obraštaja korištene su umjetne staklene podloge (predmetna stakalca) koje su tjekom mjeseca studenog bile uronjene u Sakadaško jezero. Podloge su prije toga očišćene, isprane 1M otopinom klorovodične kiseline, a zatim destiliranom vodom. Staklene podloge su postavljene vertikalno u plastični okvir koji je vezan na drveni nosač umjetnih podloga na površini jezera (Slika 3). Nosači su privezani kamenim blokovima kako bi tijekom razdoblja istraživanja ostali na istoj udaljenosti od obale. Nakon mjesec dana kutija sa stakalcima je prenesena u plastičnu posudu napunjenu vodom iz Sakadaškog jezera (Slika 4).



Slika 3: Nosači umjetnih staklenih podloga (Fotografija: Mario Šimić).



Slika 4: Uzorkovanje umjetnih staklenih podloga iz Sakadaškog jezera (Fotografija: Mario Šimić).

Za istraživanje utjecaja vodenih ekstrakata čivitnjače na mikrofite u obraštaju postavljena su četiri akvarija (Slika 5) u koja je ulivena predviđena količine vode iz Sakadaškog jezera. U akvarije su instalirane pumpe, a iznad njih su postavljene lampe. Vremenski prekidač je podešen na način da akvariji 12 sati budu na svjetlu, a zatim 8 sati u mraku. Plastični okviri sa stakalcima uronjeni su na dno akvarija. Nakon 24 sata aklimatizacije, u tri akvarija su uliveni ekstrakti čivitnjače različite koncentracije (0.5%, 1% i 2%), a četvrti akvarij je služio kao kontrola. Prvo uzorkovanje je provedeno nakon 24 sata, drugo 3. dan nakon tretmana, a treće 6. dan nakon tretmana. Tijekom svakog uzorkovanja, tri staklene podloge s razvijenim obraštajem iz svakog akvarija prenesene su u zasebne staklene bočice ispunjene destiliranom vodom. Staklene podloge korištene su za analizu biomase obraštaja i određivanje koncentracije klorofila u obraštaju.



Slika 5: Postavljanje akvarija za istraživanje razvoja obraštaja (Fotografija: Mario Šimić).

2.2 Priprema otopine čivitnjače

Osušeni listovi čivitnjače potrebni za pripremu vodenih ekstrakata koncentracija 0.5%, 1% i 2% su izvagani i pohranjeni u papirnatim vrećicama te do upotrebe čuvani u eksikatoru. Listovi čivitnjače su u tarioniku usitnjeni u prah te prenešeni u staklenu čašu u koju je uliven potrebni volumen destilirane vode. Nakon 1 sata ekstrakcije pri sobnoj temperaturi i uz stalno miješanje, dobiveni ekstrakt je nekoliko puta procijeđen kroz višeslojnu gazu kako bi se uklonili ostaci bijnog materijala. Procjeđeni ekstrakt je preliven u čistu čašu, poklopljen aluminijskm folijom te ostavljen u hladnjaku do korištenja (Slika 6).



Slika 6: Vodeni ekstrakt listova čivitnjače (Fotografija: Mario Šimić).

2.3 Mjerenje fizikalno-kemijskih svojstava vode

Fizikalno-kemijski čimbenici vode mjereni su *in situ* prilikom svakog uzorkovanja podloga s obraštajem. Temperatura vode, pH, koncentracija otopljenog kisika i provodljivost vode mjereni su minilaboratorijem WTW Multi 340i/SET (Wissenschafttlich-Technische Werkstäten, Weilheim, Njemačka). Koncentracije hranjivih tvari analizirane su standardnim metodama u Ekološkom laboratoriju Vodovoda d.d. u Osijeku. Analizirane su koncentracije amonijevih iona (HRN ISO 7150-1:1998), nitrata (HRN ISO 7890-3:1998), nitrita (HRN EN 26777:1998), dušika po Kjeldahlu (HRN EN 25663:1993), ukupnog dušika (HRN ISO 5663:20001 + (NO2-N+NO3-N)) i ukupnog fosfora (HRN EN ISO 6878:2008) u vodi.

2.4 Laboratorijska obrada podataka

Za određivanje koncentracije klorofila u obraštaju, jedna polovica obraštaja s jedne strane stakalca sastrugana je žiletom u staklenu čašu sa 100 ml destilirane vode. Uzorak je filtriran kroz filter-papir od staklenih vlakana promjera 55 mm s otvorom pora od 1,2 µm. Filter-papir je u tarioniku usitnjen, a pigmenti su ekstrahirani u 15 mL 90%-tnog acetona. Nakon ekstrakcije, uzorci su centrifugirani 10 minuta na 3000 okretaja u minuti.

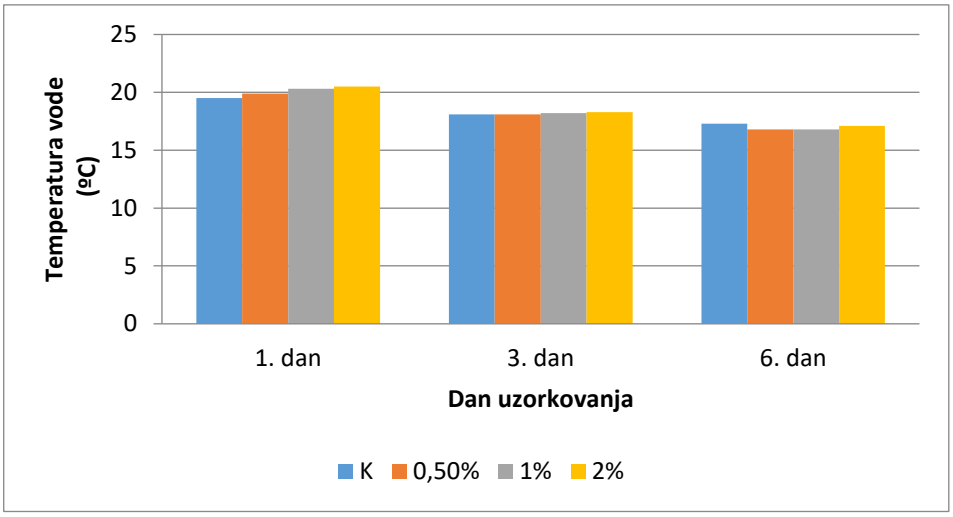
Apsorbancija je mjerena spektrofoometrom pri valnim duljinama od 630, 645, 663, 750 nm (SCOR-UNESCO 1966; Strickland i Parsons 1972).

Za određivanje biomase, druga polovica obraštaja je sastrugana u prethodno izvagani lončić za žarenje. Za određivanje ukupne suhe mase obraštaja (DW), materijal je sušen na temperaturi od 105 °C tijekom 24 sata, te je izvagan. Za određivanje sadržaja organske (AFDW) i anorganske tvari (AW), uzorak je nakon sušenja žaren jedan sat na temperaturi od 500 ºC. Sadržaj AFDW predstavlja razliku između DW i težine pepela (AW).

3. REZULTATI

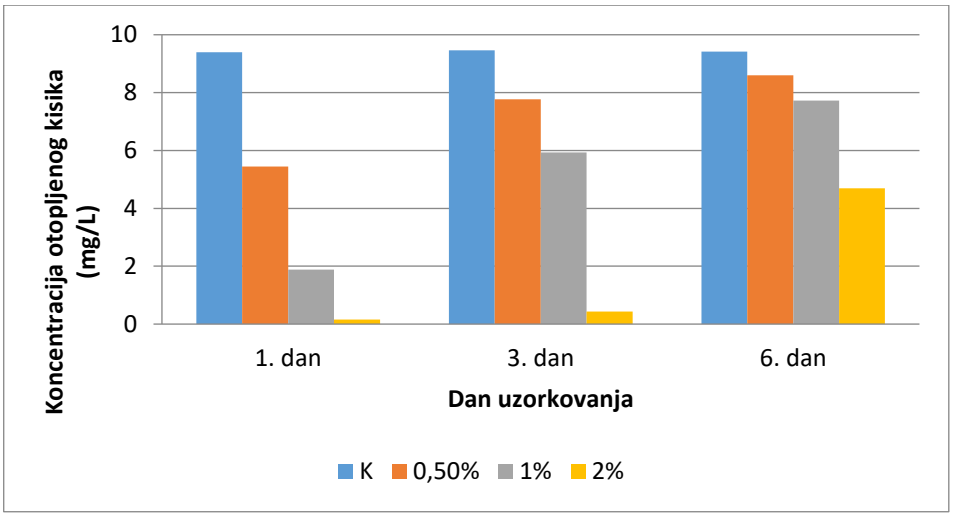
3.1 Fizikalno-kemijska svojstva vode

Temperatura vode nije se značajno mijenjala tijekom istraživanja (Slika 7). Najniža temperatura vode od 16,8 °C izmjerena je šestog dana tretmana u akvarijima s koncentracijama ekstrakta listova čivitnjače koncentracije 0,5% i 1%, dok je najviša temperatura vode od 20,5 °C zabilježena prvog dana tretmana u akvariju s koncentracijom ekstrakta listova čivitnjače koncentracije 2%.



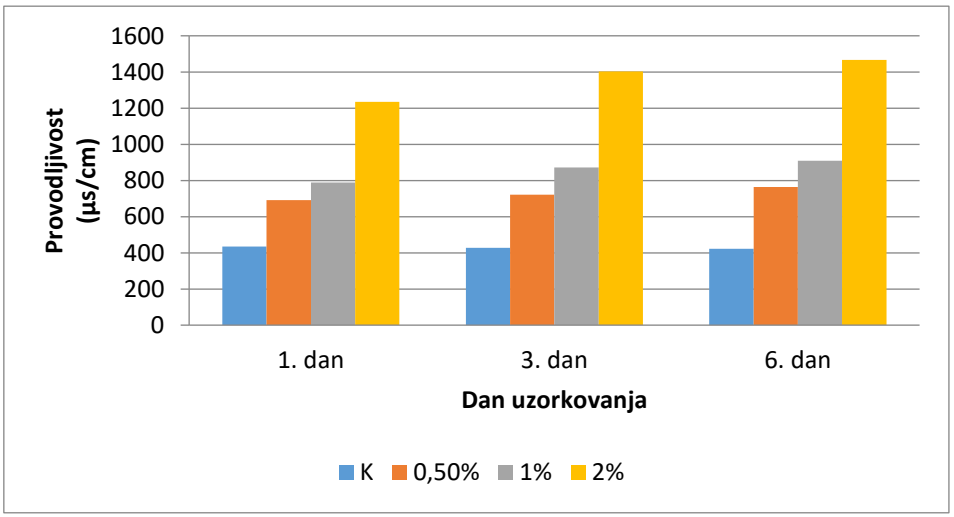
Slika 7: Promjene temperature vode u sustavima za istraživanje obraštaja (K – kontrola; 0,50%, 1% i 2% - koncentracije vodenih ekstrakata čivitnjače).

Koncentracija otopljenog kisika u kontrolnom je sustavu tijekom istraživanja bila visoka i nije se značajno mijenjala (Slika 8). Nakon tretmana ekstraktima čivitnjače, koncentracija otopljenog kisika se smanjila. Najniže koncentracije u svim sustavima zabilježene su nakon 24 izlaganja ekstraktima, a kretale su se od 0,16 do 5,44 mg/L. Do kraja istraživanja u sustavu s 2%-tnim ekstraktom čivitnjače koncentracija je ostala vrlo niska i nije prelazila 5 mg/L.



Slika 8: Koncentracije otopljenog kisika u sustavima za istraživanje obraštaja (K - kontrola; 0,50%, 1% i 2% - koncentracije vodenih ekstrakata čivitnjače).

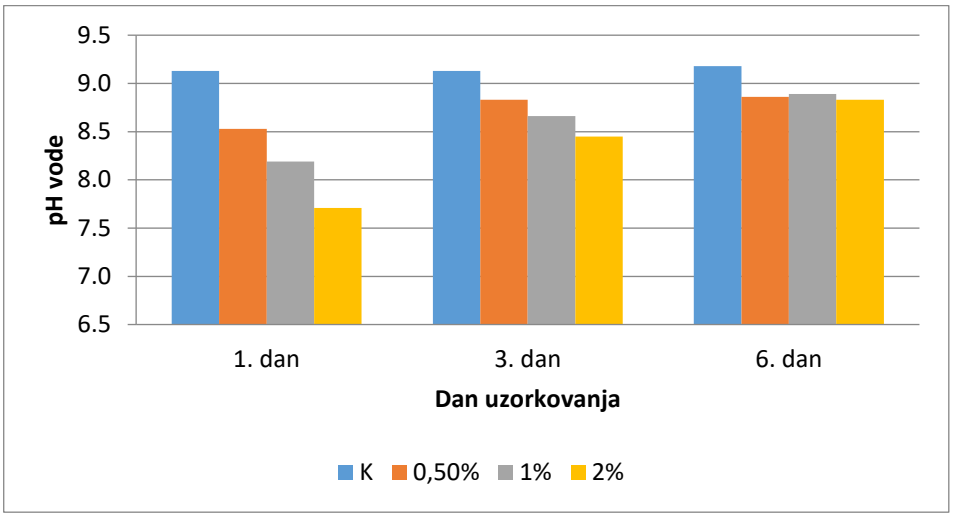
Provodljivost vode se u kontrolnom sustavu tijekom istraživanja nije značajno mijenjala (Slika 9). U sustavima s ekstraktima čivitnjače provodljivost se značajno povećavala te su najviše vrijednosti zabilježene zadnjeg dana istraživanja, a kretale su se od 763 do 1467 µS/cm.



Slika 9: Provodljivost vode u sustavima za istraživanje obraštaja (K - kontrola; 0,50%, 1% i 2% - koncentracije vodenih ekstrakata čivitnjače).

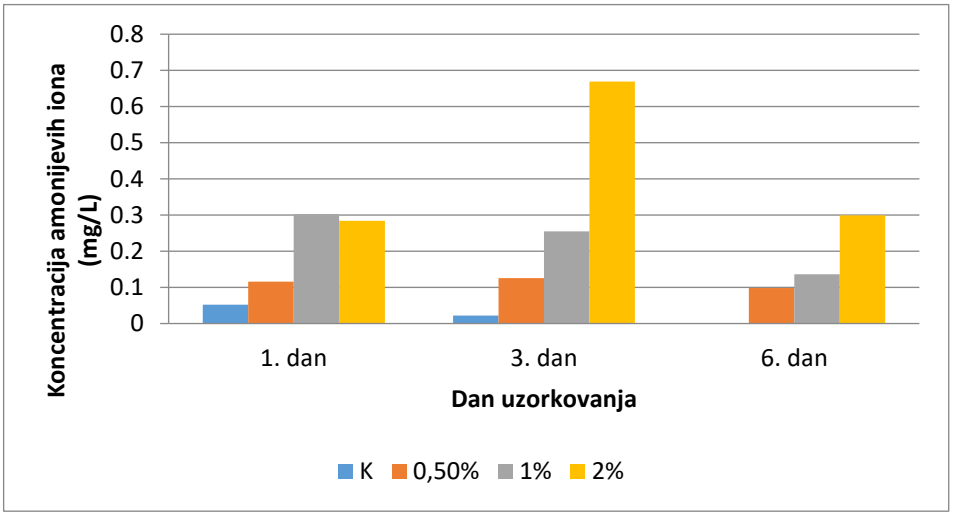
pH vode (Slika 10) u kontrolnom sustavu je tijekom istraživanja bila vrlo slična, a vrijednosti su se kretale od 9,08 do 9,18. U sustavima tretiranim ekstraktima čivitnjače pH

vrijednosti su bile najniže nakon 24 sata izlaganja, a zadnjeg su dana istraživanja bile vrlo slične i kretale su se od 8,83 do 8,89.



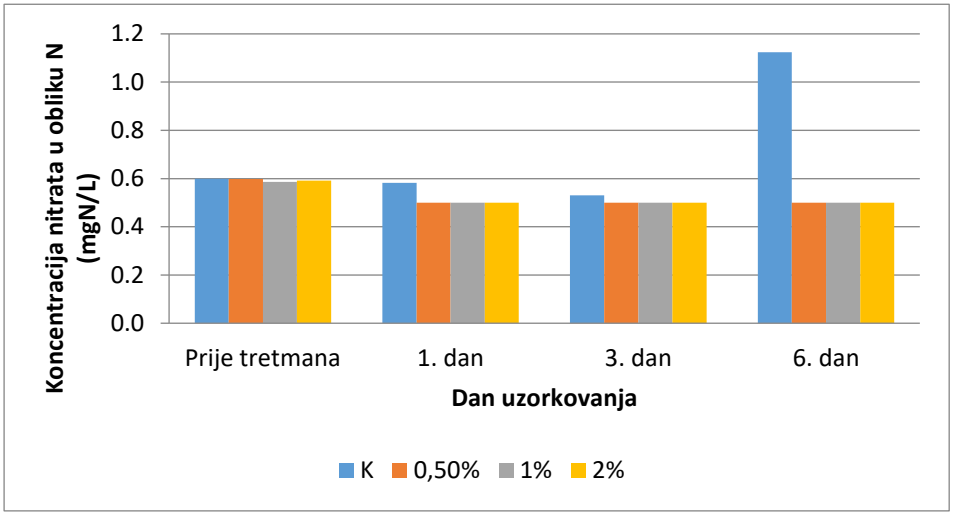
Slika 10: pH vode u sustavima za istraživanje obraštaja (K - kontrola; 0,50%, 1% i 2% - koncentracije vodenih ekstrakata čivitnjače).

Koncentracija amonijevih iona (Slika 11) bila je tijekom cijelog razdoblja istraživanja najniža u kontrolnom sustavu, a posebno je niska vrijednost zabilježena zadnjeg dana istraživanja. U sustavima s ekstraktima čivitnjače koncentracije su se mijenjale, a najviša koncentracija od 0,66 mg/L zabilježena je trećeg dana izlaganja u sustavu s najvišom koncentracijom ekstrakta (2%).



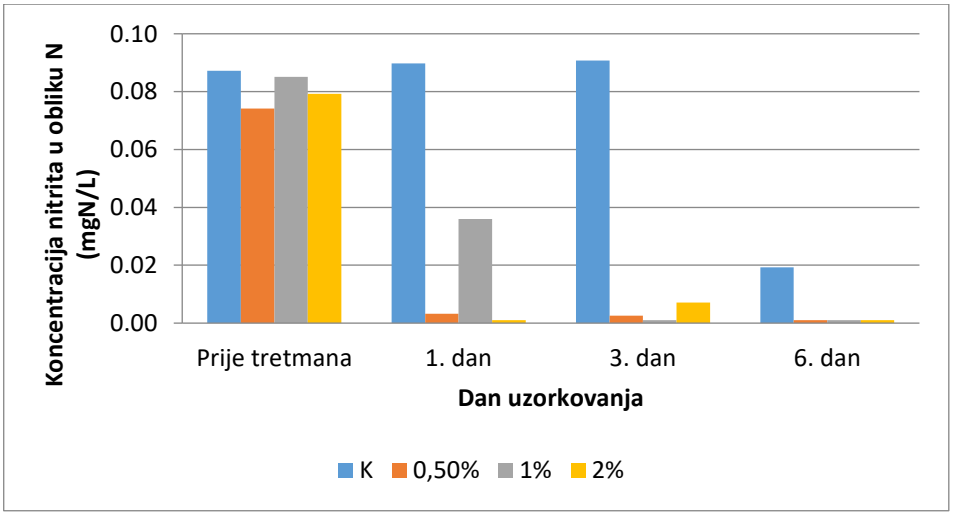
Slika 11: Koncentracija amonijevih iona u sustavima za istraživanje obraštaja (K - kontrola; 0,50%, 1% i 2% - koncentracije vodenih ekstrakata čivitnjače).

Koncentracija nitrata (Slika 12) u kontrolnom sustavu je bila najviša zadnjeg dana istraživanja i iznosila je 1,12 mgN/L. U svim sustavima s ekstraktima čivitnjače koncentracije nitrata su bile vrlo niske tijekom cijelog razdoblja istraživanja.



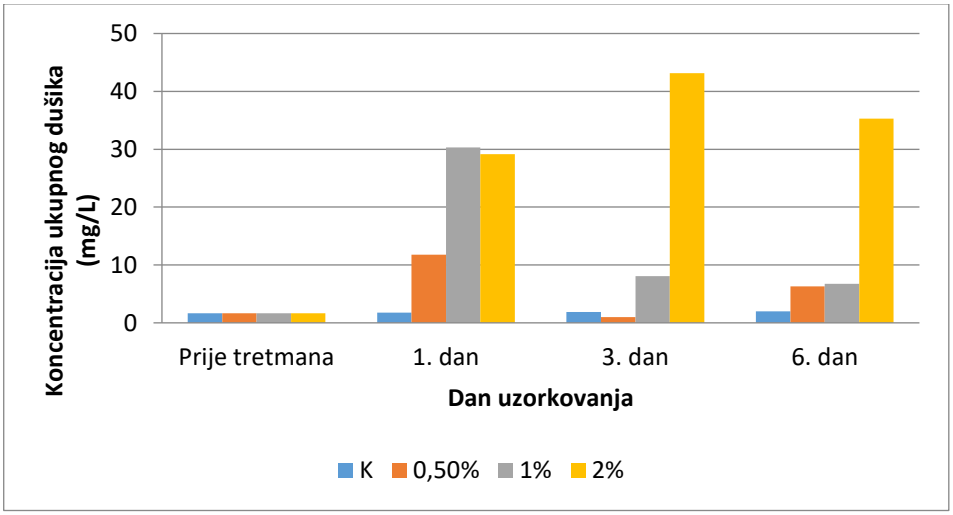
Slika 12: Koncentracija nitrata u sustavima za istraživanje obraštaja (K - kontrola; 0,50%, 1% i 2% - koncentracije vodenih ekstrakata čivitnjače).

Koncentracija nitrita mijenjala se tijekom istraživanja (Slika 13). U kontrolnom sustavu je koncentracija nitrita bila najmanja zadnjeg dana istraživanja, a iznosila je 0,01 mgN/L. U sustavima s ekstraktima čivitnjače koncentracije su uglavnom bile niske, a najviša je vrijednost zabilježena nakon 24 sata izlaganja u sustavu s 1%-tnim ekstraktom.



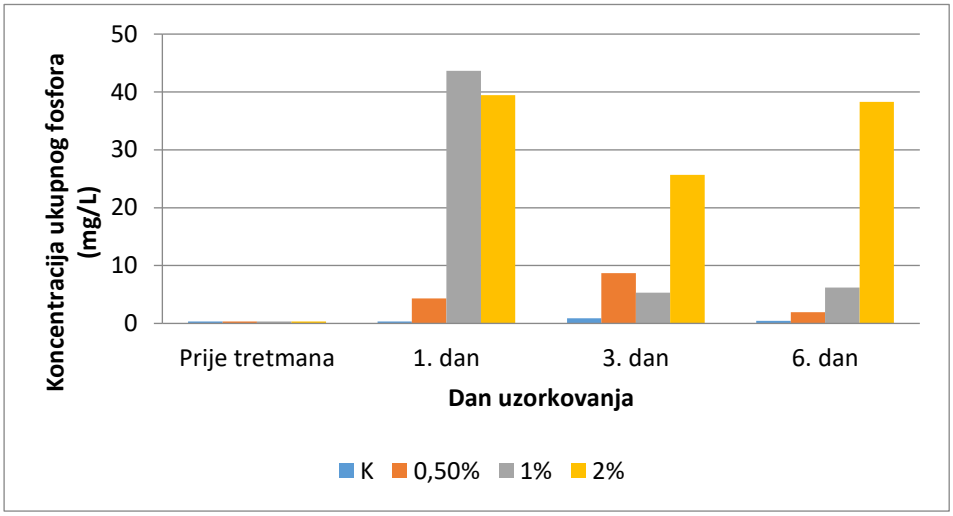
Sika 13: Koncentracija nitrita u sustavima za istraživanje obraštaja (K - kontrola; 0,50%, 1% i 2% - koncentracije vodenih ekstrakata čivitnjače).

Koncentracija ukupnog dušika (Slika 14) u kontrolnom je sustavu bila niska i nije se značajno mijenjala tijekom istraživanja. U sustavima s ekstraktima čivitnjače koncentracije dušika su u odnosu na kontrolu bile više, osim nakon trećeg dana izlaganja u sustavu s 1%-tnim ekstraktom. Najviša koncentracija zabilježena je istog dana, ali u sustavu s 1%-tnim ekstraktom, a iznosila je 43,14 mg/L.



Slika 14: Koncentracija ukupnog dušika u sustavima za istraživanje obraštaja (K - kontrola; 0,50%, 1% i 2% - koncentracije vodenih ekstrakata čivitnjače).

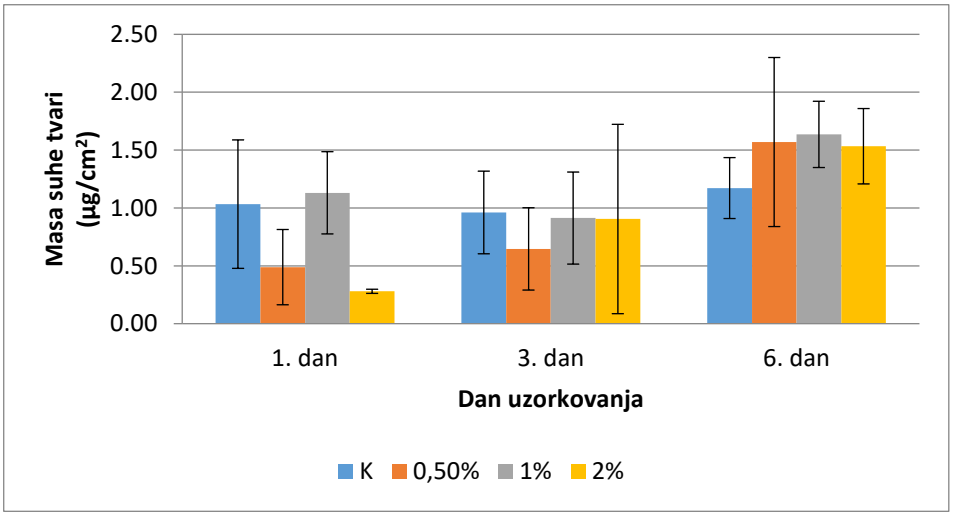
Koncentracija ukupnog fosfora (Slika 15) je bila niska u kontrolnom sustavu tijekom cijelog razdoblja istraživanja i kretala se od 0,33 do 0,91 mg/L. U ostalim je sustavima značajno varirala, ali su u sustavu s 2%-tnim ekstraktom koncentracije bile vrlo visoke tijekom cijelog istraživanja. Najviša koncentracija zabilježena je nakon 24 sata izlaganja u sustavu s 1%-tnim ekstraktom i izosila je 43,67 mg/L.



Slika 15: Koncentracija ukupnog fosfora u sustavima za istraživanje obraštaja (K - kontrola; 0,50%, 1% i 2% - koncentracije vodenih ekstrakata čivitnjače).

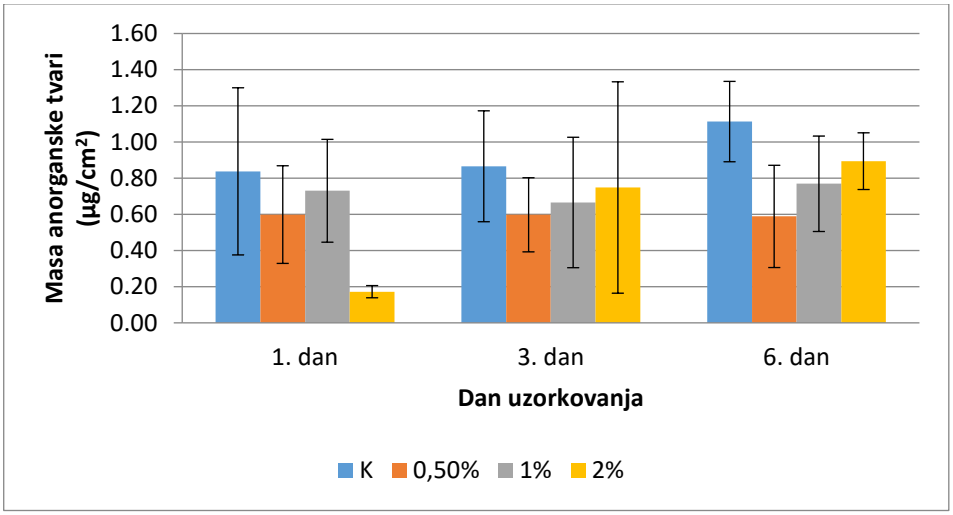
3.2 Biomasa obraštaja

Masa suhe tvari obraštaja (Slika 16) u kontrolnom sustavu bila je vrlo slična tijekom istraživanja, a varirala je od 0,96 ± 0,35 do 1,17 ± 0,26 µg/cm^2. U sustavima s vodenim ekstraktima čivitnjače DW obraštaja se mijenjala. Nakon prvog dana ekspozicije smanjenje DW utvrđeno je u sustavima s 0,5% (52,70%) i 2%-tnim ekstraktima čivitnjače (72,92%). Međutim, nakon šest dana ekspozicije, u svim sustavima s ekstraktima čivitnjače DW obraštaja se povećala u odnosu na kontrolu, a povećanje se kretalo između 30,84% i 39,58%.



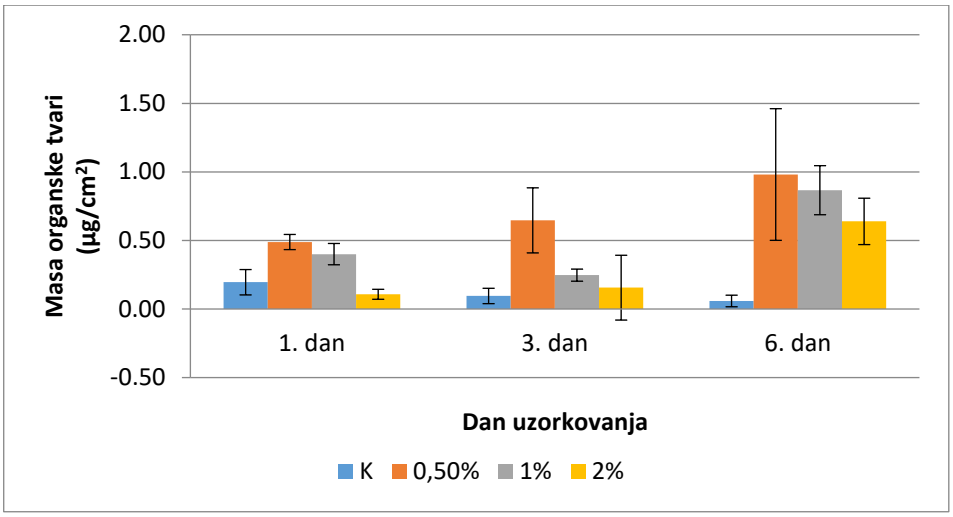
Slika 16: Promjene mase suhe tvari (DW) obraštaja tijekom istraživanja.

Masa anorganske tvari obraštaja mijenjala se tijekom eksperimenta u svim sustavima osim u kontrolnom u kojem je bila vrlo slična i varirala između 0,83 ± 0,46 i 1,11 ± 0,22 µg/cm^2 (Slika 17). U sustavima s ekstraktima čivitnjače različitih koncentracija AW je bio manji u odnosu na kontrolu. Najveće smanjenje (79,42%) AW utvrđeno je nakon prvog dana ekspozicije u sustavu s 2%-tnim ekstraktom čivitnjače.



Slika 17: Promjene mase anorganske tvari (AW) obraštaja tijekom istraživanja.

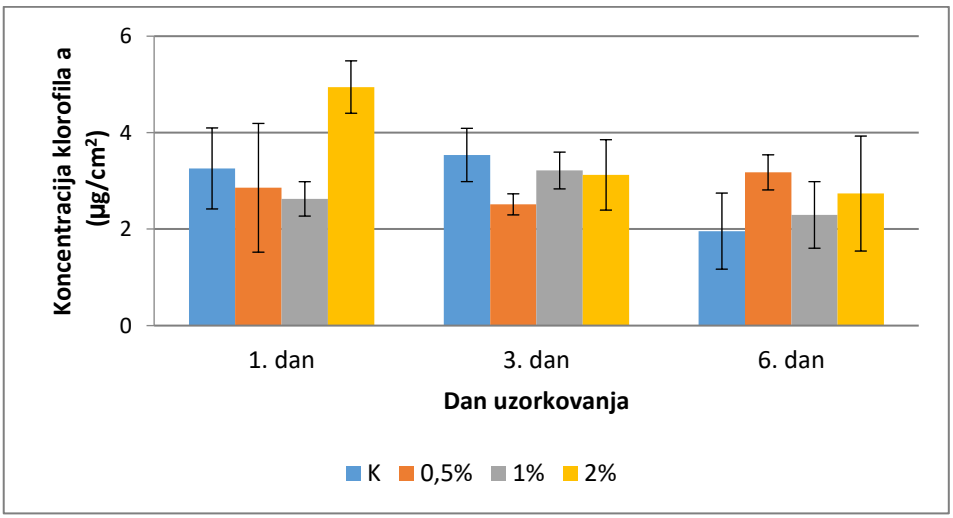
Masa organske tvari obraštaja (Slika 18) u kontrolnom sustavu se tijekom istraživanja smanjivala. Najveća AFDW zabilježena nakon prvog dana iznosila je 0,19 ± 0,09 µg/cm^2, a najmanja, zabilježena nakon šestog dana ekspozicije, 0,05 ± 0,04 µg/cm^2. U sustavima s ekstraktima čivitnjače različitih koncentracija AFDW je bio veći u odnosu na kontrolu i povećavao se tijekom istraživanja. Nakon zadnjeg dana ekspozicije najveća AFDW utvrđena je u sustavu s 0,5%-tnim ekstraktom (0,98 ± 0,48 µg/cm^2), a najmanja u sustavu s 2%-tnim ekstraktom čivtinjače (0,63 ± 0,16 µg/cm^2).



Slika 18: Promjene mase organske tvari (AFDW) obraštaja tijekom istraživanja.

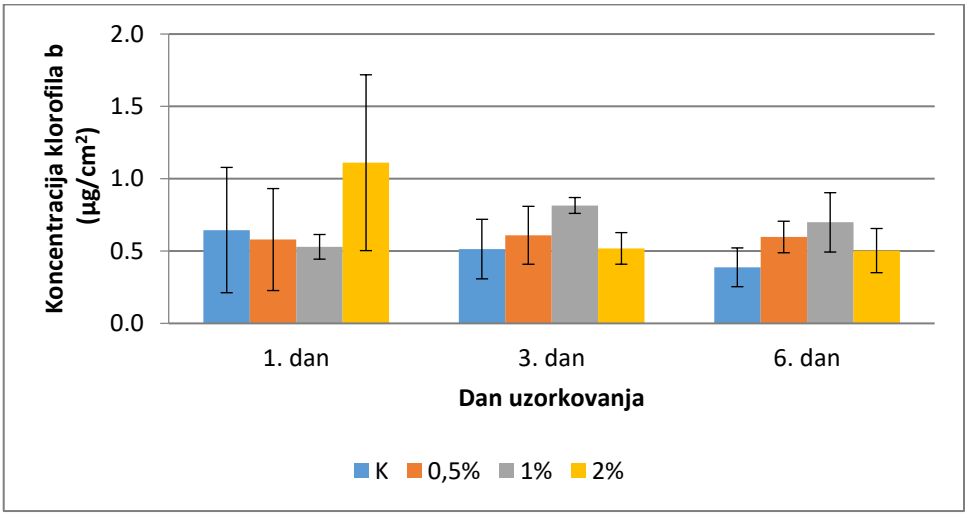
3.3 Koncentracija klorofila u obraštaju

Koncentracija klorofila a (Chl-a) u obraštaju se mijenjala tijekom razdoblja istraživanja (Slika 19). U kontrolnom sustavu koncentracija Chl-a je bila najveća nakon prvog (3,25 ± 0,84 µg/cm^2), a najmanja nakon zadnjeg dana istraživanja (1,95 ±0,78 µg/cm^2). Nakon prvog dana, u sustavu s 0,5%-tnim ekstraktom koncentracija Chl-a se smanjila za 12,29%, a u sustavu s 1%-tnim ekstraktom čivitnjače za 8,05%. Međutim, u sustavu s 2%-tnim ekstraktom koncentracija Chl-a je bila za gotovo 52% veća u odnosu na kontrolu. Nakon šestog dana, koncentracija Chl-a je u svim sustavima bila veća u odnosu na kontrolu, a najveća je bila u sustavu s 0,5%-tnim ekstraktom i i iznosila je 3,17 ± 0,36 µg/cm^2.



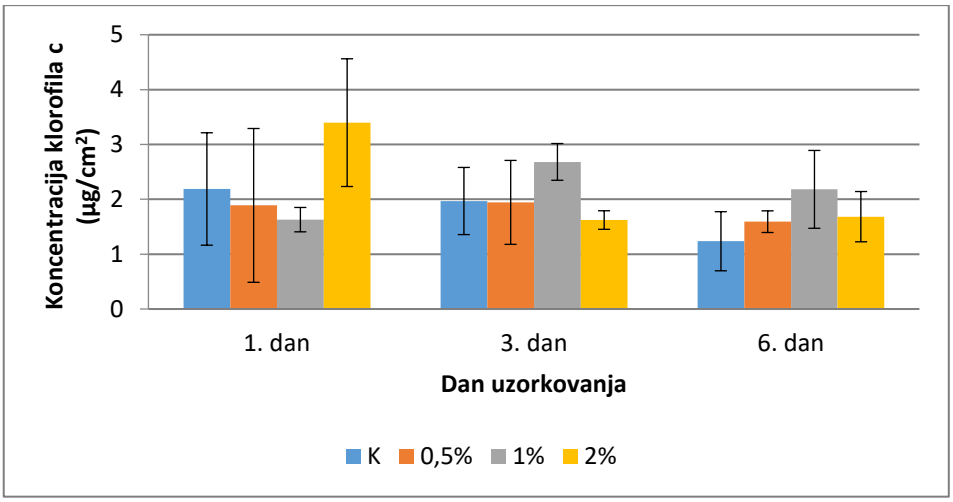
Slika 19: Promjene koncentracije klorofila a (Chl-a) u obraštaju tijekom istraživanja (K – kontrola; 0,50%, 1% i 2% - koncentracije vodenih ekstrakata čivitnjače).

Koncentracija Chl-b (Slika 20) u kontrolnom sustavu se smanjivala tijekom istraživanja te je najmanja vrijednost zabilježena zadnjeg dana i iznosila je 0,38 ± 0,13 µg/cm^2. U sustavima s ekstraktima čivitnjače različitih koncentracija, koncentracije Chl-b su se mijenjale. Najveća koncentracija zabilježena je nakon prvog dana istraživanja u sustavu s 2%-tnim ekstraktom. Zadnjeg dana istraživanja koncentracije Chl-b su u svim sustavima bile veće u odnosu na kontrolu.



Slika 20: Promjene koncentracije klorofila b (Chl-b) u obraštaju tijekom istraživanja (K – kontrola; 0,50%, 1% i 2% - koncentracije vodenih ekstrakata čivitnjače).

Koncentracija Chl-c (Slika 21) u kontrolnom sustavu se kontinuirano smanjivala tijekom istraživanja, te je zadnjeg dana iznosila 1,23 ± 0,53 µg/cm^2. U sustavima s ekstraktima čivitnjače različitih koncentracija, koncentracije Chl-c su se mijenjale. Najveća koncentracija zabilježena je nakon prvog dana istraživanja u sustavu s 2%-tnim ekstraktom, a bila je oko 50% veća odnosu na kontrolu. Zadnjeg dana istraživanja koncentracije Chl-c su u svim sustavima bile veće u odnosu na kontrolu, a najmanja masa od 1,59 ± 0,53 µg/cm^2 zabilježena je u sustavu s 0,5%-tnim ekstraktom.



Slika 21: Promjene koncentracije klorofila c (Chl-c) u obraštaju tijekom istraživanja (K - kontrola; 0,50%, 1% i 2% - koncentracije vodenih ekstrakata čivitnjače).

4. RASPRAVA

U vodenim ekosustavima mikrofiti su izloženi djelovanju različitih čimbenika, pa tako i utjecaju alelokemikalija koje mogu ispuštati različite vrste mikrofita (Leão i sur. 2009) te akvatičke (Hootsmans i Blindow 1994; van Donk i van de Bund 2002) ili terestričke biljke. Alelokemikalije se najlakše oslobađaju iz submerznih listova akvatičkih biljaka jer nemaju puči, imaju tanju kutikulu i slabije međusobno povezane stanice mezofila u odnosu na listove koji plutaju na površini vode (Hutchinson 1975), ali i u odnosu na listove terestričkih biljaka koji imaju puno deblju kutikulu. Međutim, kod terestričkih biljaka, alelokemikalije se mogu oslobađati kroz puči ili epidermske stanice (Gross 2003). Dosadašnja istraživanja su pokazala da ekstrakti terestričkih biljaka iz porodica Papaveraceae (Jančula i sur. 2007), Rutaceae (Meepagala i sur. 2005), Apiaceae (Meepagala i sur. 2005a) i Ephedraceae (Yan i sur. 2012) inhibiraju rast mikrofita. Spojevi izolirani iz različitih biljnih vrsta iz navedenih porodica, a koji najčešće djeluju alelopatski su polifenoli, kinoni, alkaloidi, organske i amino kiseline te terpeni (Lu i sur. 2013; Shao i sur. 2013).

Tijekom ovog istraživanja utvrđeno je da je unos vodenih ekstrakata listova čivitnjače utjecao na fizikalno-kemijske parametre, ali i dinamiku razvoja te strukturu obraštaja. Fizikalno-kemijski parametri mijenjali su se u svim eksperimentalnim sustavima. S obzirom da listovi čivitnjače imaju visok sadržaj dušika i fosfora (Wu i sur. 2012), a biljka je općenito bogata različitim spojevima kao što su izoflavoni, terpeni, viteksin i ulja (Jakovljević i sur. 2015; Cui i sur. 2017), unos vodenih ekstrakata čivitnjače pridonio je povećanju provodljivosti vode kao i dostupnih koncentracija hranjivih tvari. Međutim, unos ekstrakata ujedno je pridonio i smanjenju koncentracije kisika u vodi. Ovo je posebno bilo izraženo u sustavu s 2%-tnim ekstraktom čivitnjače što ukazuje na intenzivnije procese razgradnje.

Unos ekstrakata bogatih različitim spojevima te promjene fizikalno-kemijskih parametara vode utjecali su na razvoj obraštajnih zajednica. Nakon početnog smanjenja ukupna biomasa obraštaja se povećala u svim sustavima. Razvoj obraštaja općenito prolazi kroz faze rasta i gubitka, a različiti čimbenici određuju vrijeme trajanja pojedine faze (Žuna Pfeiffer 2012). Naglo povećanje koncentracije različitih spojeva u svim je sustavima narušio razvoj obraštaja što je s obzirom na smanjenje koncentracije klorofila u prvom

dijelu eksperimenta moglo biti povezano s otpuštanjem mikrofita i njihovim prelaskom u stupac vode.

Iako se masa obraštaja zadnjeg dana istraživanja povećala, utvrđene su razlike u sastavu obraštaja između pojedinih sustava. U sustavu s 0,5%-tnim ekstraktom čivitnjače obraštaj se najvećim dijelom sastojao od organske tvari te je sadržavao najviše Chl-a, a najmanje Chl-c, dok se obraštaj u sustavu s 1%-tnim ekstraktom sastojao najvećim dijelom od anorganske tvari i sadržavao najviše Chl-b i -c. Poznato je da je Chl-a prisutan kao vrlo važan fotosintetski pigment u algama različitih skupina, da Chl-b nije prisutan kod cijanobakterija, te da je Chl-c posebno karakterističan za dijatomeje (Žuna Pfeiffer i sur. 2018). Utvrđene razlike u sastavu pigmenata u obraštaju ukazuju da su primijenjeni ekstrakti čivitnjače utjecali na sastav i raznolikost mikrofita u obraštaju u istraživanim sustavima. Osim toga, veći udio Chl-c u obraštaju ukazuje da se dijatomeje bolje prilagođavaju uvjetima u sustavima s većim koncentracijama ekstrakata čivitnjače. Različita su istraživanja također pokazala da dijatomeje malih dimenzija, karakteristične za eutrofne vode pokazuju tolerantnost na različite štetne tvari u vodi poput pesticida (Debenest i sur. 2010) te da pojedine vrste kao što su *Melosira varians*, *Nitzschia dissipata* i *Cocconeis placentula* nisu osjetljive na pojedine vrste herbicida (Debenest i sur. 2009).

ZAKLJUČAK

Vodeni ekstrakti čivitnjače različitih koncentracija mijenjaju fizikalno-kemijske parametre u eksperimentalnim sustavima i utječu na promjenu sastava zajednice mikrofita na što ukazuju promjene koncentracija pojedinih tipova klorofila. Daljnja istraživanja taksonomskog sastava i broja jedinki mikrofita omogućit će bolji uvid u dinamiku razvoja i promjene sastava i strukture zajednica mikrofita izloženih utjecajima ekstrakata čivitnjače.

LITERATURA

Asaeda, T., Hong Son, D. (2000) Spatial structure and populations of a periphyton community: a model and verification. Ecological Modelling 133:195-207.

Azim, M. E., Asaeda, T. (2005) Periphyton structure, diversity and colonization. U: Azim, M. E., Verdegem, M. C. J., van Dam, A. A., Beveridge, M. C. M. (ur.) Periphyton: Ecology, exploitation and management. CABI Publishing, Wallingford, UK, str.1-33.

Azim, M. E., Beveridge, M. C. M., van Dam, A. A., Verdegem, M. C. J. (2005) Periphyton and aquatic production: an introduction. U: Azim, M.E., Verdegem, M. C. J., van Dam, A. A., Beveridge, M. C. M. (ur.) Periphyton: Ecology, Exploitation and Management. CABI Publishing, Wallingford, UK, str.1-13.

Baulch, H. M., Schindler, D. W., Turner, M. A., Findlay, D. L., Paterson, M. J., Vinebrooke, R. D. (2005) Effects of warming on bentic communities in a boreal lake: impliations of climate change. Limnology and Oceanography 50:1377-1392.

Bergey, E. A. (2008) Does rock chemistry affect periphyton accrual in streams? Hydrobiologia 614:141-150.

Burns, A., Ryder, D. S. (2001) Potential for biofilms as biological indicators in Australian riverine systems. Ecological Management & Restoration 2:53-63.

Carrias, J. F., Serre, J. P., Ngando, T. S., Amblard, C. (2002) Distribution, size and bacterial colonization of pico- and nano-detrital organic particles (DOP) in two lakes of different trophic status. Limnology and Oceanography 47-1202-1209.

Cattaneo, A., Kerimian, T., Roberge, M., Marty, J. (1997) Periphyton distribution and abundance on substrata of different size along a gradient of stream trophy. Hydrobiologia 354:101-110.

Cheng, L., Cao, X., Yu, X. (2017) Mechanism of growth inhibition effect of aquatic plants on water cyanobacteria. Insight: Biology 1:1-9.

Cui, X., Guo, J., Lai, C. S., Pan, M. H., Ma, Z., Guo, S., Liu, Q., Zhang, L., Ho, C. T., Bai, N. (2017) Analysis of bioactive constituents from the leaves of *Amorpha fruticosa* L. Journal of food and drug analysis 25:992-999.

Debenest, T., Pinelli, E., Coste, M., Silvestre, J., Mazzella, N., Madigou, C., Delmas, F. (2009) Sensitivity of freshwater periphytic diatoms to agricultural herbicides. Aquatic Toxicology 93:11–17.

Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., Pinelli, E. (2010) Effects of pesticides on freshwater diatoms. Reviews of environmental contamination and toxicology 203:87-103.

Glavaš, M. (2009) Ekonomski značaj amorfe (Amorpha fruticosa L.)/ Economic importance of Indigobush (*Amorpha fruticosa* L.). U: A. P. B. Krpan (ur.) Biological-Ecological and Energetic Characteristics of Indigobush (*Amorpha fruticosa* L.) in Croatia, Book of Abstracts and CD, M. Benko, p. 16/42, Zagreb.

Gross, E. M. (2003) Allelopathy of aquatic autotrophs. Critical Reviews in Plant Sciences 22:313-339.

Hoagland, K. D., Roemer, S. C., Rosowski, J. R. (1982) Colonization and community structure of two periphyton assemblages, with emphasis on the diatoms (Bacillariophyceae). American Journal of Botany 69:188-213.

Hootsmans, M. J. M., Blindow, I. (1994) Allelopathic limitation of algal growth by macrophytes. U: van Vierssen, W., Hootsmans, M., Vermaat, J. (ur.) Lake Veluwe, a Macrophyte-dominated System under Eutrophication Stress. Geobotany, Springer, Dordrecht, str.175-192.

Hutchinson, G. E. (1975) A Treatise on Limnology. Limnological Botany, John Wiley & Sons, New York.

Idžojtić, M., Poljak, I., Zebec, M., Perić, S. (2009) Biološka svojstva, morfološka obilježja i ekološki zahtjevi čivitnjače (*Amorpha fruticosa* L.); Biološko-ekološke i energetske značajke amorfe (*Amorpha fruticosa* L.) u Hrvatskoj, Znanstveni simpozij s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb.

Jakovljević, T., Halambek, J., Radošević, K., Hanousek, K., Gradečki P. M., Gaurina S. V., Radojčić R. I., De Marco A. (2015) The Potential Use of Indigobush (*Amorpha fruticosa* L.) as natural resource of biologically active compounds. The South East European Journal of Economics and Business 6:171-178.

Jančula, D., Suchomelová, J., Gregor, J., Smutná, M., Marsálek, B., Táborská, E. (2007) Effects of aqueous extracts from five species of the family Papaveraceae on selected aquatic organisms. Environmental Toxicology 22:480-486.

Larned, S. T. (2010) A prospectus for periphyton: recent and future ecological research. Journal of the North American Benthological Society 29:182-206.

Leão, P. N., Vasconcelos, M. S. D., Vasconcelos, V. M. (2009) Allelopathic activity of cyanobacteria on green microalgae at low cell densities. European Journal of Phycology 44:347-355.

Lu, Y., Wang, J., Yu, Y., Su, W., Kong, F. (2013) Inhibition of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze on Microcystis aeruginosa and isolation of the inhibition factors. Biotechnology Letters 35:1029-1034.

Meepagala, K. M., Schrader, K. K., Wedge, D. E., Duke, S. O. (2005) Algicidal and antifungal compounds from the roots of *Ruta graveolens* and synthesis of their analogs. Phytochemistry 66:2689-2695.

Meepagala, K. M., Sturtz, G., Wedge, D. E., Schrader, K. K., Duke, S. O. (2005) Phytotoxic and antifungal compounds from two Apiaceae species, *Lomatium californicum* and *Ligusticum hultenii*, rich sources of Z-ligustilide and apiol, respectively. Journal of Chemical Ecology 31:1567-78.

Nikolić, T. (2012) Alohtone biljke On-line. Flora Croatica Database. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb (http://hirc.botanic.hr/fcd/InvazivneVrste/).

Nikolić, T., Mitić, B., Boršić, I. (2014) Flora hrvatske: invazivne biljke. Alfa d.d., Zagreb.

Novak, N., Novak, M., Barić, K., Šćepanović, M., Ivič, D. (2018) Allelopathic potential of segetal and ruderal invasive alien plants. Journal of Central European Agriculture 19:408-422.

Novak, N., Kravaršćan, M. (2011) Invazivne strane korovne vrste u Republici Hrvatskoj. Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo, Zagreb.

Pierik, R., Whitelam, G. C., Voesenek, L. A., de Kroon, H., Visser, E. J. (2004.): Canopy studies on ethylene -intensitive Tobacco identify ethylene as a novel element in blue light and plant-plant signling. The Plant Journal 38:310-319

Shao, J., Li, R., Lepo, J. E., Gu, J. D. (2013) Potential for control of harmful cyanobacterial blooms using biologically derived substances: problems and prospects. Journal of Environmental Management 125:149-155.

Strickland, J. D. H., Parsons, T. R. (1972) A Practical Hand Book of Seawater Analysis. Fisheries Research Board of Canada Bulletin, 2nd ed., Ottawa.

Tank, J. L., Dodds, W. K. (2003) Nutrient limitation of epilitic and epixylic biofilms in ten North American streams. Freshwater Biology 48:1031-1049.

UNESCO (1966) Determination of photosynthetic pigment. Monographs on Oceanographic Methodology, SCOR/UNESCO, Paris.

Van Donk, E., Van de Bund, W. J. (2002) Impact of submerged macrophytes including charophytes on phyto- and zooplankton communities: allelopathy versus other mechanisms. Aquatic Botany 72:261-274.

Wood, P. J., Armitage, P. D. (1997) Biological effects of fine sediment in the lotic environment. Environmental Management 21:203-217.

Wu, T. G., Yu, M. K., Wang, G. G., Dong, Y., Cheng, X. R. (2012) Leaf nitrogen and phosphorus stoichiometry across forty-two woody species in Southeast China. Biochemical Systematics and Ecology 44:255–263.

Yan, R., Ji, H., Wu, Y., Kerr, P. G., Fang, Y. (2012) An investigation into the kinetics and mechanism of the removal of cyanobacteria by extract of *Ephedra equisetina* root. PLoS ONE 7(8): e42285.

Zeman, S., Fruk, G., Jemrić, T. (2011) Pregledni znanstveni rad Alelopatski odnosi biljaka: pregled djelujućih čimbenika i mogućnost primjene. Glasnik zaštite bilja 4/2011.

Žuna Pfeiffer, T. (2012) Naseljavanje i razvoj alga u obraštajnim zajednicama poplavnog područja Dunava. Doktorski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Institut Ruđer Bošković, Zagreb. Poslijediplomski sveučilišni interdisciplinarni (doktorski) studij Zaštita prirode i okoliša, Osijek.

Žuna Pfeiffer, T, Štolfa Čamagajevac, I., Špoljarić Maronić, D., Maksimović, I. (2018) Regulation of Photosynthesis in Algae Under Metal Stress. U: Singh, V. P., Singh, S., Singh, R., Prasad, S. M. (ur) Environment and Photosynthesis A Future Prospect. Studium Press (India) Pvt. Ltd., New Delhi, str. 261-286.