

# Ekotoksikološki učinak natrijevog metasilikata na zelenu (*Hydra viridissima* Pallas, 1766) i smeđu hidru (*Hydra oligactis* Pallas, 1766)

---

Šimičev, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:772662>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Ana Šimičev

Ekotoksikološki učinak natrijevog metasilikata na zelenu (*Hydra viridissima*  
Pallas, 1766) i smeđu hidru (*Hydra oligactis* Pallas, 1766)

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

*Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za evoluciju, simbioze i molekularnu filogenetiku u Zoologijskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Gorana Kovačevića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### **EKOTOKSIKOLOŠKI UČINAK NATRIJEVOG METASILIKATA NA ZELENU (*Hydra viridissima* Pallas, 1766) I SMEĐU HIDRU (*Hydra oligactis* Pallas, 1766)**

Ana Šimičev

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Hidra je slatkovodni beskralježnjak iz koljena žarnjaka. Zelena se hidra ističe prisutnošću jednostaničnih endosimbiotskih algi u svojim gastrodermalnim mioepitelnim stanicama. Natrijev metasilikat sintetički je spoj koji kao rezultat antropogenog djelovanja dopijeva u okoliš te je poznavanje njegovog učinka na žive organizme važno za održivost ekosustava. U ovom radu istraživao se učinak natrijevog metasilikata na zelenu i smeđu hidru. Cilj istraživanja bio je odrediti postoji li razlika u toksičnosti spoja na dvije vrste hidri, te da li endosimbiotski odnos daje zelenoj hidri prednosti u odgovoru na nepovoljne uvjete okoliša. Hidre su tretirane s četiri koncentracije metasilikata te su tijekom tri dana promatrane morfološke, bihevioralne i reproduktivne promjene. Za analizu citološko - histoloških i morfometrijskih promjena izrađeni su standardni trajni preparati zelenih hidri. Utvrđeno je kako natrijev metasilikat u subletalnim koncentracijama u zelenih i smeđih hidri uzrokuje migraciju, smanjenu podražljivost, oštećenje lovki i promjenu oblika tijela. U zelenih je hidri štetan učinak najizraženiji bio prvi dan nakon tretiranja, a u smeđih hidri treći dan. Spoj je uzrokovao oštećenja staničnih slojeva i mezogleje te promjenu u položaju algi unutar stanica. Subletalne koncentracije natrijevog metasilikata izazvale su morfološka oštećenja i bihevioralne promjene u obje vrste hidri, a promjene su bile intenzivnije u smeđe hidre. S obzirom na to može se zaključiti kako endosimbiotske alge zelenoj hidri donose prednosti u prilagođavanju na uvjete u okolišu. Možemo zaključiti i kakav učinak bi ovaj spoj mogao imati na stanje vodenih ekosustava.

(49 stranice, 20 slika, 6 tablica, 33 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: topivi silikati, toksičnost, endosimbioza, slatkovodni ekosustavi

Voditelj: dr. sc. Goran Kovačević, izv. prof.

Neposredni voditelj: dr. sc. Romana Gračan

Ocjenitelji: dr. sc. Goran Kovačević, izv. prof.

dr. sc. Božena Mitić, prof.

dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.

Rad je prihvaćen:

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

### **ECOTOXICOLOGICAL EFFECT OF SODIUM METASILICATE ON GREEN (*Hydra viridissima* Pallas, 1766) AND BROWN HYDRA (*Hydra oligactis* Pallas, 1766)**

Ana Šimičev

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Hydra is a freshwater invertebrate from the phylum Cnidaria. In its gastrodermal myoepithelial cells green hydra harbours endosymbiotic unicellular algae. Sodium metasilicate is a synthetic compound which is released in the environment as a product of human activities. Therefore, knowing the effects it has upon living organisms is important for sustainability of ecosystems. The aim of this research was to determine its effects on green and brown hydra and to compare the changes in the two hydra species. Hydrams were treated with four concentrations of metasilicate and morphological, behavioral and reproductive changes were observed during the next three days. For cyto-histological analysis standard preparations of green hydra were made. The results have shown that sublethal concentrations of sodium metasilicate caused migration, reduced reactivity to mechanical stimuli, changes in body contraction and damage of tentacles. Effects were the strongest on the first day after treatment in green hydra and on the third day in brown hydra. The compound caused damage of cellular layers and mesoglea, and changed distribution of algae inside cells. Sublethal concentrations of sodium metasilicate caused morphological and behavioral changes in both species of hydra, and they were more intense in brown hydra. Green hydra showed better adaptability to unfavourable environmental conditions and we can conclude about the effect this metasilicate could have on aquatic ecosystems.

(49 pages, 20 figures, 6 tables, 33 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: soluble silicates, toxicology, endosymbiosis, freshwater ecosystems

Supervisor: Dr. Goran Kovačević, Assoc. Prof.

Assistant Supervisor: Dr. Romana Gračan

Reviewers: Dr. Goran Kovačević, Assoc. Prof.

Dr. Božena Mitić, Prof.

Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof.

Thesis accepted:

# Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Hidra.....	1
1.1.1. Filogenija i rasprostranjenost.....	1
1.1.2. Građa hidre.....	2
1.1.3. Razmnožavanje.....	4
1.2. Endosimbioza.....	6
1.3. Ekotoksikologija.....	7
1.4. Topivi silikati.....	9
1.5. Cilj istraživanja.....	11
2. Materijali i metode.....	12
3. Rezultati.....	14
4. Rasprava.....	36
5. Zaključak.....	40
6. Literatura.....	41

Životopis

# 1. UVOD

## 1.1. Hidra

Hidra je slatkovodni beskralješnjak iz koljena žarnjaka koji obitava na dnu voda stajaćica i sporih tekućica (Beach i Pascoe 1997). Prvi je put formalno spomenuta i opisana početkom 18. stoljeća u pismu koje je Antonie van Leeuwenhoek uputio Kraljevskom Društvu Ujedinjenog Kraljevstva opisavši ukratko njezinu građu, nesporno razmnožavanje i stanište na kojem živi. Pedesetak godina kasnije danski istraživač Abraham Trembley proučavao je regeneraciju, nesporno razmnožavanje i histološku građu hidre, a njegova su zapažanja i memoari pružili osnovu za ostala istraživanja na hidri u sljedećih 250 godina (Glauber i sur. 2010).

Dobivši naziv po mitološkom biću antičke Grčke, kojem nakon dekapitacije na istom mjestu izrastu dvije glave, velika sposobnost regeneracije hidre od samog je početka intrigirala znanstvenike i potpirivala njihov interes, a shodno tome i brojna istraživanja kojima je unaprijeđeno znanje i razumijevanje procesa u mnogim područjima biologije. Zbog kozmopolitske rasprostranjenosti i jednostavnog uzgoja, lako mjerljivih morfoloških, bihevioralnih i reproduktivnih promjena, te velike sposobnosti regeneracije, hidra se pokazala kao idealan eksperimentalni modalni organizam u razvojnoj i evolucijskoj biologiji te ekotoksikologiji (Quinn i sur. 2012).

### 1.1.1. Filogenija i rasprostranjenost

Rod *Hydra* spada u razred obrubnjaka (Hydrozoa), zajedno s rodovima slatkovodnih meduza (Limnocoela, Craspedacusta), koji pripada koljenu žarnjaka (Cnidaria). Žarnjaci su pretežno morski organizmi, no nekoliko desetaka vrsta živi u slatkim vodama, uključujući sve vrste hidri. Zato se smatra da su se sve živuće vrste hidri razvile iz jednog zajedničkog pretka koji je naselio slatkovodne ekosustave i započeo specijaciju (Kawaida i sur. 2010).

Novija molekularna istraživanja jezgrine i mitohondrijske DNA različitih sojeva hidri potvrđuju zapažanja promatranjem i analizom morfoloških karakteristika. Prema njima su sve vrste roda *Hydra* podijeljene u četiri skupine: viridissima, braueri, oligactis i vulgaris.

Morfološke karakteristike na kojima se uglavnom temelji determinacija hidri uključuju boju, prisutnost endosimbionata (zelena hidra), veličinu i izgled žarnih stanica te razvoj lovki u polipa. Unatoč tome, detaljnije razlike, potrebne za precizno određivanje vrste, nisu posve određene. Za precizniju klasifikaciju organizama unutar roda *Hydra* potrebna su daljnja molekularna istraživanja.

S obzirom na rasprostranjenost vrsta iz skupina *viridissima* i *vulgaris* po čitavom svijetu, smatra se da su te dvije grupe nastale prije razdvajanja kontinenata u mezozoiku. Grupe *oligactis* i *vulgaris* vjerojatno su se razvile nakon razdvajanja kontinenata na Lauraziju i Gondvanu, s obzirom na njihovu prisutnost samo na sjevernoj polutci (Kawaida i sur. 2010).

Hidre žive sesilnim načinom života, pričvršćene stopalom za kamen, list i grančicu. U nepovoljnim uvjetima dolazi do odvajanja od podloge i migracije.

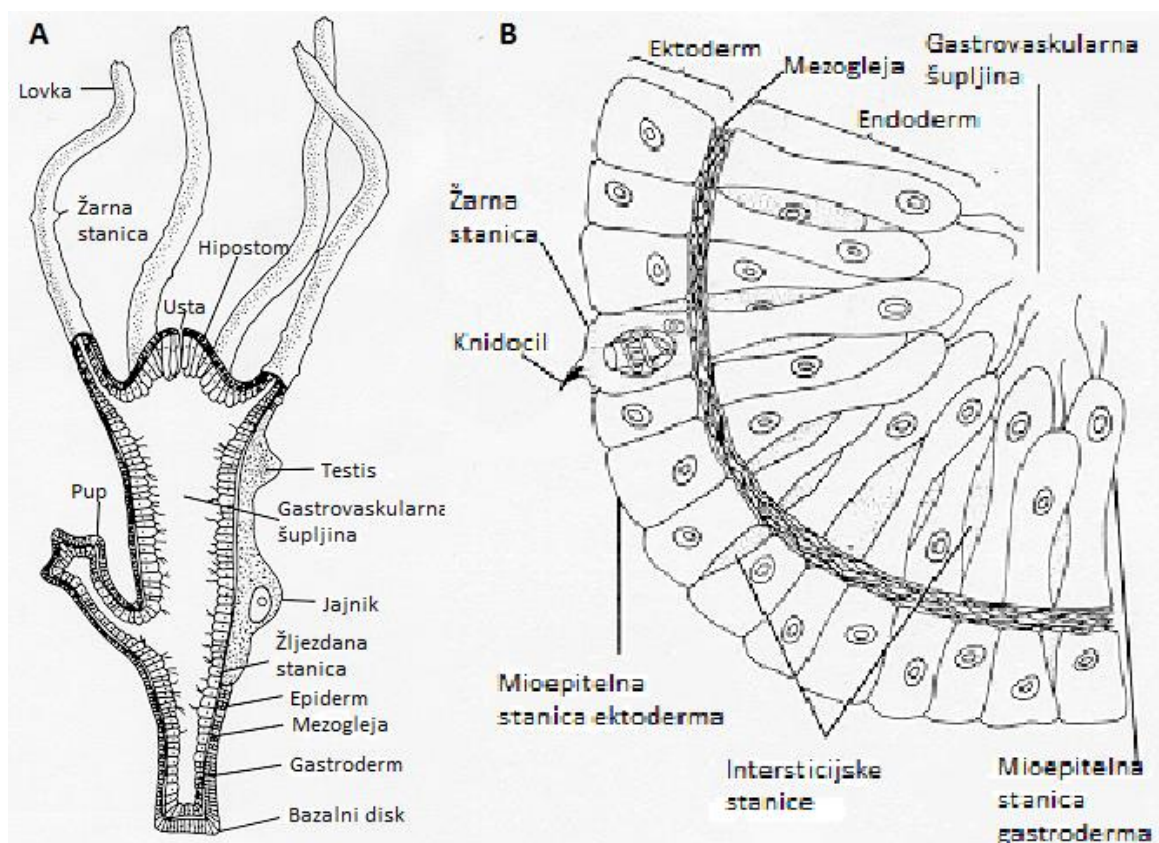
### 1.1.2. Građa hidre

Tijelo hidre cilindričnog je oblika, veličine od 2 do 5 mm. Podijeljeno je na tri regije. Vršni dio tijela čini glava: hipostom s ustima i lovkama. Ispod njega se nalazi gastralna regija s pupnom regijom, a bazalni dio čini stopalo kojim je hidra pričvršćena za podlogu (slika 1a).

Po prvi put u evoluciji, u žarnjaka se javlja organizacija stanica u tkiva, pa tako kod hidre nalazimo dva stanična sloja, vanjski, ektoderm i unutarnji, gastroderm (Glauber i sur. 2010). Između njih se nalazi nestanični sloj mezogleja, većim dijelom sastavljen od vode te kolagena, lipida i ugljikohidrata. Služi kao potpora tijelu i kao medij za migraciju stanica prilikom regeneracije (slika 1b).

Ektoderm i gastroderm građeni su od više tipova stanica. Bazu oba sloja čine mioepitelne stanice, između kojih su umetnuti ostali tipovi stanica. Svi tipovi osim mioepitelnih stanica razvijaju se iz nediferenciranih intersticijskih stanica. One su multipotentne i konstantno se dijele. Zbog toga tijelo hidre nikad nije statično. Stanice se stalno gibaju prema ekstremitetima i pupnoj regiji. Na taj način hidra se rješava starih stanica. Zahvaljujući neprestanoj diobi intersticijskih stanica, hidra je poznata kao organizam koji ne stari i ima iznimnu moć regeneracije (Bode 1996).





**Slika 1.** a: Građa tijela hidre. b: Građa staničnih slojeva u hidre. (preuzeto i prilagođeno prema <http://www.daviddarling.info/encyclopedia/H/Hydra.html>)

Mioepitelne stanice ektoderma predstavljaju barijeru između hidre i okoliša, održavaju homeostazu i štite hidru od vanjskih čimbenika. Osim toga, njihov bazalni dio sadrži kontraktilna vlakna koja se ponašaju poput mišića omogućavajući hidri kontrakcije tijela (Buzgariu i sur. 2015).

Žarne stanice ili knidocite poseban su tip stanica karakterističan za žarnjake, a po njima su žarnjaci i dobili ime. Njihova posebnost je prisutnost specijalnih stanica, žarnica (knida) u obliku sferične kapsule unutar koje se nalazi vodena otopina čiji najveći dio sastava čine otopljeni proteini, ioni kalcija i magnezija te različiti neurotoksini i hemolitički toksini. Na vrhu kapsule nalazi se poklopac s knidocilom, koji služi kao okidač za izbacivanja sadržaja. Osim toga, žarnice sadržavaju i bodežić koji izbacuju velikom brzinom na kemijski, mehanički ili električni podražaj. Žarne stanice imaju ulogu u obrani od predatora i hvatanju plijena (Weber i sur. 1987).

Živčani sustav hidre je primitivan i građen u obliku mreže bipolarnih i multipolarnih neurona umetnutih između epitelnih stanica ektoderma i gastroderma. Dva su osnovna tipa

živčanih stanica kod hidre: osjetilni neuroni, pri površini ektoderma i ganglioni pri bazi. Područje hipostoma i stopala sadrži veću gustoću živčanih stanica (Koizumi i Bode 1991).

Gastroderm je unutrašnji stanični sloj koji oblaže gastralnu šupljinu koja je ispunjena vodom te ima ulogu probavnog sustava i hidroskeleta. Građen je od gastrodermalnih mioepitelnih, zimogenih i živčanih stanica. Gastrodermalne mioepitelne stanice imaju dvojnju funkciju: unutrašnji dio stanica sadrži mišićna vlakna, dok vanjski ima apsorpcijsku funkciju. Zimogene stanice sadrže lizosome s probavnim enzimima koje izlučuju u gastralnu šupljinu u kojoj se odvija ekstracelularna probava.

### 1.1.3. Razmnožavanje

Izmjena spolnog i nespornog načina razmnožavanja zabilježena je u svih vrsta hidri (Habetha i sur. 2003). U povoljnim uvjetima okoliša i većinu vremena hidre se razmnožavaju nesporno, pupanjem. Na taj način u kratkom periodu nastaje veliki broj genetički identičnih organizama (Quinn i sur. 2012). Pupanje se odvija u gastralnoj regiji tijela hidre gdje se svaka tri do četiri dana stanični materijal udvostruči i tako nastane nova jedinka (slike 2 i 3) (Bell 1984).

Spolno razmnožavanje uključuje spolnu diferencijaciju hidri u muški, ženski ili dvospolni oblik (Kaliszewicz 2011). Zelena hidra je hermafrodit, dok je smeđa hidra odvojena spola (Karntarnut i Pascoe 2002). Spolne stanice nastaju iz intersticijskih stanica koje se nakupljaju ispod mioepitelnih stanica ektoderma te zajedno s njima tvore jajnike i testise. Do oplodnje dolazi u jajniku gdje se embrij i razvija prije nego što se odvoji od majke (slika 4).

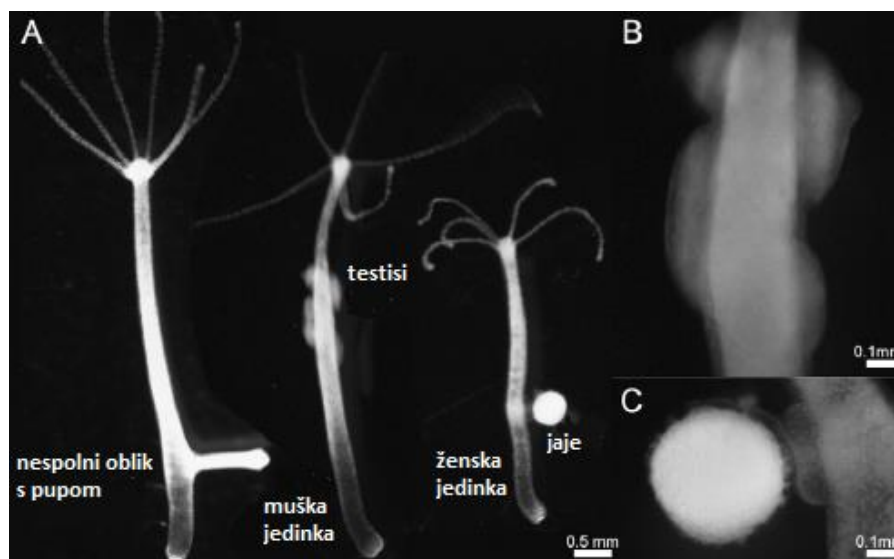


**Slika 2.** Nesporno razmnožavanje u zelene hidre (*Hydra viridissima* Pallas, 1766). Dino-Lite Digital Microscope. Fotografirala: Ana Šimičev.



**Slika 3.** Nesporno razmnožavanje u smeđe hidre (*Hydra oligactis* Pallas, 1766). Dino-Lite Digital Microscope. Fotografirala: Ana Šimičev.

Čimbenici koji uzrokuju prelazak hidri s nespornog na spolni način razmnožavanja nisu posve razjašnjeni (Habetha i sur. 2003). Dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je kako su pomanjkanje hrane, parcijalni tlak ugljikovog dioksida i gustoća populacije barem neki od čimbenika koji mogu inicirati gametogenezu (Bell 1984). Također je utvrđeno kako temperatura ima učinak na izmjenu spolnog i nespornog razmnožavanja, pa se tako *Hydra oligactis* spolno razmnožava pri nižim temperaturama (10 - 12 °C) (Quinn i sur. 2012). Time je dokazano kako postoji veza između uvjeta u okolišu i spolne diferencijacije hidri (Habetha i sur. 2003).



**Slika 4.** Spolna diferencijacija hidri (preuzeto i prilagođeno prema Kawaida i sur. 2010). A: nespolni oblik, muška jedinka s testisima, ženska jedinka s jajnikom. B: uvećani prikaz testisa. C: uvećani prikaz jajnika s oplođenim jajem.

## 1.2. Endosimbioza

Simbioza je suživot dvaju ili više različitih vrsta organizama. Sama riječ potječe od latinskih riječi *syn* – „sa“ i *bios* – „život“. Taj odnos može biti pozitivan za oba organizma, pa je u tom slučaju riječ o mutualizmu. Ako je odnos pozitivan za jedan, a neutralan za drugi organizam radi se o komenzalizmu, ako je pak pozitivan za jedan od organizama, a štetan za drugi, o parazitizmu.

Simbiotski odnosi imaju važnu ulogu u evoluciji, pružajući biološke prednosti i doprinoseći biološkoj raznolikosti (Kovačević i sur. 2009). Mnoge životinje domaćini su različitim simbiotskim organizmima poput bakterija, protista i gljiva te se njihova evolucija može promatrati kao evolucija zajednica tijesno povezanih organizama (Habetha i sur. 2003).

Endosimbioza je vrsta suživota kod kojeg jedan organizam živi unutar citoplazme drugog, te su u istoj citoplazmi domaćina prisutna dva ili više genoma različitog podrijetla. Prijenosom gena iz endosimbionta u jezgru domaćina povećava se varijabilnost i adaptivni potencijal domaćina. Među beskralješnjacima poznati su primjeri endosimbioze s fotosintetskim jednostaničnim algama. Primjeri endosimbioze u žarnjaka uključuju koralje,

koji žive u simbiozi s dinoflagelatima, te zelenu hidru i alge iz roda *Chlorella* (Habetha i sur. 2003).

Zelena hidra predstavlja klasičan primjer endosimbioze i popularan je modalni organizam u istraživanjima mehanizama i evolucije endosimbiotskih odnosa (Kovačević i sur. 2012). Ona u svojim gastrodermalnim mioepitelnim stanicama sadrži jednostanične alge iz roda *Chlorella*. Alge su smještene u bazalnom dijelu stanice, uz mezogleju, a od ostatka stanice odvojene su elementima staničnog kostura. Na taj način spriječen je doticaj s lizosomima i probava algi. Broj algi po stanici varira između 10 i 20, a svaka alga nalazi se unutar vlastitog simbiosoma (Campbell 1990). Korisnost tog odnosa za hidru proizlazi iz korištenja produkata fotosinteze algi (Kalafatić i sur. 1994), najčešće šećera maltoze, dok alge od hidre dobivaju aminokiseline i ostale produkte njenog metabolizma (Karntanut i Pascoe 2002).

Zelena hidra bolje podnosi duže periode pomanjkanja hrane u odnosu na nesimbiotske vrste hidri. Također, dokazano je kako je manje osjetljiva na štetan učinak nekih tvari, poput željeza, u odnosu na smeđu hidru (Kovačević i sur. 2016). No, rezultati istraživanja osjetljivosti različitih vrsta hidri na toksične tvari pokazali su kako je u nekim slučajevima zelena hidra ipak podložnija štetnom učinku. Razlog tome vjerojatno je učinak toksikanta na alge. Tvari kao što su pesticidi DDT i dieldrin, kadmij te bakar uzrokuju oštećenja algi pa u takvim slučajevima zelena hidra gubi prednosti endosimbiotskog odnosa. U slučaju drugih tvari, poput cinka, koje nisu toliko toksične za alge, štetan učinak na zelenu hidru manji je nego na nesimbiotske vrste hidri (Karntanut i Pascoe 2002).

### 1.3. Ekotoksikologija

Od industrijske revolucije do danas količina sintetski proizvedenih kemijskih tvari koje se koriste u različitim sferama ljudskih djelatnosti znatno se povećala. Istraživanje učinka takvih tvari donedavno se temeljilo na proučavanju štetnosti koje bi one, ili produkti njihovog raspada, mogli imati na ljudsko zdravlje. No, u posljednjih pedesetak godina sve se više pažnje posvećuje istraživanju njihovog učinka na ostale žive organizme i okoliš (Boxall 2004).

Ekotoksikologija se kao grana toksikologije razvila 60-ih godina 20. stoljeća iz studija koje su proučavale učinak pesticida na okoliš (Bhat 2013). Velike količine pesticida i ostalih tvari antropogenog podrijetla svakodnevno se akumuliraju u vodi, zraku i tlu. Mnoge od njih otporne su na kemijsku i fizičku degradaciju te dugo ostaju u okolišu (Kalafatić 1997). Kao takve, nakupljaju se u hranidbenim lancima te prenose vodom i zrakom daleko od izvora zagađenja. Takve tvari često imaju negativan učinak na žive organizme i predstavljaju opasnost za stabilnost ekosustava i bioraznolikost. Neki od štetnih učinaka na organizme uključuju izazivanje tumora, mutacija u DNA, poremećaja u embrionalnom razvoju ili imunološkom sustavu, oštećenja živčanog sustava, te poremećaje hormonalnog sustava. Ekotoksikologija, kao znanstvena disciplina koja se bavi proučavanjem učinka različitih tvari antropogenog podrijetla na strukturu i funkciju ekosustava, ima važnu ulogu u očuvanju i zaštiti prirode (Bhat 2013).

U novije vrijeme bioindikatorske vrste i biomonitoring postaju sve važnije metode procjenjivanja zdravlja nekog ekosustava. Osim klasičnim metodama mjerenja fizikalnih i kemijskih parametara, smatra se da monitoringom žive komponente ekosustava dobivamo širu sliku njegova stanja i procesa koji se odvijaju (Holt i Miller 2011).

Jedna od mana ekotoksikoloških istraživanja danas je činjenica da se većinom temelje na istraživanju zasebnog učinka pojedinih spojeva. S obzirom na to da se u okoliš ispušta mnogo različitih toksikanata, važno je uzeti u obzir njihovu interakciju i učinak koji proizlazi iz te interakcije (Boxall 2004).

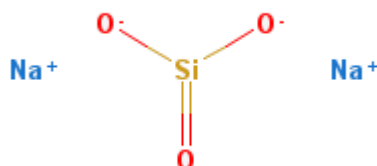
Većina ekotoksikoloških istraživanja danas fokusira se na smrtnost kao glavni pokazatelj toksičnosti, ne uzimajući u obzir suptilnije promjene u morfologiji i ponašanju organizama. Takve promjene uključuju poremećaje u rastu, razmnožavanju i ponašanju organizama i mogu imati važan utjecaj na odnose unutar ekosustava i njegovu stabilnost. U ovom istraživanju proučavao se učinak koji subletalne doze natrijevog metasilikata imaju na zelene i smeđe hidre, kao važnu komponentu bentičke zajednice slatkovodnih ekosustava.

Akvatički ekosustavi zbog izloženosti mnogim zagađivalima predstavljaju bitnu komponentu u zaštiti okoliša. Kemijske tvari iz tla i atmosfere, kao i komunalne i industrijske otpadne vode često završavaju upravo u rijekama, jezerima i moru (Bhat 2013). Hidra je sveprisutan stanovnik slatkovodnih ekosustava. S obzirom da je dio niže razine hranidbene mreže slatkovodnih stajaćica, promjene u populaciji hidri mogle bi imati značajne učinke na ostatak životne zajednice. Hidra ima ulogu i predatora i plijena unutar ekosustava. Hrani se

različitim zooplanktonom, dok je sama plijen primjerice plošnjacima. Kao takva, ima ekološku važnost u strukturiranju planktonske zajednice slatkovodnih ekosustava i predstavlja važnu indikatorsku vrstu u ekotoksikologiji (Quinn 2012).

## 1.4. Topivi silikati

Topivi silikati su razred sintetičkih tvari koje se u velikim količinama proizvode u Europi i svijetu. Imaju široku primjenu u građevinskoj i kozmetičkoj industriji te proizvodnji papira, detergenata i ljepila. Po kemijskom sastavu to su anorganske soli silicijevog dioksida i alkalijskih metala opće kemijske formule  $M_2O \cdot xSiO_2$  (Fawer i sur. 1999).



**Slika 5.** Kemijska struktura natrijevog metasilikata.

Otkrio ih je 1818. njemački kemičar i mineralog Johann Nepomuk von Fuchs. On je želeći pročistiti silicijsku kiselinu, otopio silicij dioksid ( $SiO_2$ ) u kalijevoj lužini. Dobio je vodenu otopinu kalijeveg silikata,  $K_2SiO_3(aq)$ , koja je imala svojstva slična staklu. Zato ju je i nazvao „vodenim staklom“. Danas se taj naziv upotrebljava za cijelu skupinu topivih silikata (Vail 1928).

Narednih dvanaest godina Fuchs je proveo proučavajući svojstva topivih silikata i razvijajući tehnologiju njihove proizvodnje te ideje o primjeni. U početku su upotrebljavani za zaštitu kazališnih pozornica od tada čestih katastrofalnih požara. Oko 1850. godine započinje masovna upotreba topivih silikata u proizvodnji sapuna. Osim toga, u to su se vrijeme koristili u kombinaciji s asfaltom za presvlačenje topova kao zaštita od korozije te impregnaciju drvenih brodova (Wills 1982).

U kozmetičkoj industriji služe kao inhibitori korozije spremnika kozmetičkih proizvoda. Najveći dio natrijevog metasilikata koristi se u bojama za kosu (80%), te koristi u ostalim preparatima za kosu i kremama za brijanje. Kalijev silikat i natrijev silikat koriste se i u šamponima, kremama i šminki. Prema izvještajima iz 1999. i 2000. godine, u Europi i Japanu nema restrikcija za upotrebu topivih silikata u kozmetičkoj industriji (Elmore 2005).

Glavna upotreba alkalijskih silikata je i u proizvodnji sapuna i detergenata. U detergentima imaju ulogu pufera i održavaju stalan pH, a zbog svojih alkalnih svojstava koriste se u saponifikaciji masti i ulja prilikom proizvodnje sapuna. Osim toga, koriste se u tretmanu vode za uklanjanje metala, kao ljepljiva, za zaštitu od požara i u preradi papira (Elmore 2005).

U prehrambenoj industriji natrijev metasilikat se koristi za procesuiranje hrane. Smatra se kako u onim koncentracijama u kojima se koristi ne predstavlja opasnost za ljudsko zdravlje te ga je američka Agencija za hranu i lijekove klasificirala kao „uglavnom bezopasnu tvar“ (Elmore 2005).

Dokazano je kako natrijev metasilikat inhibira neke enzime poput ureaze i invertaze, dok nema učinak na aktivnost enzima kao što su pepsin, tripsin, lipaza, katalaza i kolinesteraza. Spoj se pokazao kao korozivan te u dodiru s tkivima uzrokuje opekline (Elmore 2005).

Dosadašnja istraživanja toksičnosti natrijevog metasilikata uključuju pokuse na štakorima, psima i sisavcima. Prilikom izlaganja visokim koncentracijama, poput onih u mnogim detergentima, može doći do iritacije očiju, kože te probavnog i dišnog sustava. U pokusima su opaženi i otežano disanje i akutna depresija. U višim koncentracijama javljaju se lezije i krvarenja u probavnom i dišnom sustavu, te zatajenje bubrega, jetra, pluća i srca (Elmore 2005).



## 1.5. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti učinak subletalnih koncentracija natrijevog metasilikata na zelenu i smeđu hidru, prateći morfološke, bihevioralne i reproduktivne promjene. S obzirom na prisutnost endosimbionata u zelene hidre i prednosti koje joj taj odnos može donijeti u nepovoljnim uvjetima okoliša, željelo se utvrditi postoje li razlike u osjetljivosti između dvije vrste hidri, odnosno da li je zelena hidra otpornija na oštećenja uzrokovana natrijevim metasilikatom u odnosu na nesimbiotsku smeđu hidru. Na temelju razlika u učinku spoja na kontrakciju tijela, broj i dužinu lovki, podražljivost i migraciju jedinki zelenih i smeđih hidri, te analize citološko – histoloških preparata izvedeni su zaključci o prednostima endosimbioze i njenoj važnosti u evoluciji. Budući da je natrijev silikat spoj koji ima široku primjenu u industriji i da je hidra važan dio slatkovodnih ekosustava diljem svijeta, možemo zaključiti i kakav učinak bi ovaj spoj mogao imati na stanje vodenih ekosustava.

## 2. MATERIJALI I METODE

Pokus je izvođen u Laboratoriju za evoluciju, simbioze i molekularnu filogenetiku Zoologijskog zavoda u Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Korištene životinje uključuju zelenu hidru (*Hydra viridissima* Pallas, 1766) i smeđu hidru (*Hydra oligactis* Pallas, 1776). Smeđe hidre sakupljene su u potoku parka Maksimir u Zagrebu, a zelene hidre su za pokus korištene iz laboratorijskog uzgoja. Prije pokusa smeđe hidre su držane u staklenoj posudi s aeriranom vodom, u hladnjaku pri temperaturi od 10 °C. Hidre su hranjene ličinkama račića *Artemia salina* dva puta tjedno. Jedan sat nakon hranjenja mijenjana im je voda kako bi se osigurali povoljni uvjeti rasta u kulturi. Za pokus su birane jedinke bez pupova, podjednake veličine i razvojnog stadija.

U ovom pokusu hidre su tretirane s vodenim otopinama natrijevog metasilikata ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) koncentracija 0.050, 0.365, 0.380 i 0.390 g/L. Po svakoj koncentraciji kao i u kontroli korišteno je pet smeđih hidri i deset zelenih hidri. Pokus je trajao tri dana jer je toliko vremena potrebno da bi spoj prodro u sve slojeve hidre, te je izvođen dva puta na smeđim hidrama i tri puta na zelenima.

Istraživao se učinak natrijevog metasilikata na smrtnost, morfološku i histološku strukturu, migraciju, reakciju na podražaj i nesporno razmnožavanje hidri te njegov učinak na endosimbiotske alge u gastrodermalnim mioepitelnim stanicama zelene hidre.

Morfološke promjene praćene su svakodnevno tijekom pokusa pomoću svjetlosne lupe. One su uključivale promjene u broju, dužini i izgledu lovki, kontrahiranost i relaksiranost tijela, deformaciju stopala i izlučivanje sluzi.

Histološka analiza rađena je na jedinkama zelene hidre. One su fiksirane drugi i treći dan nakon postavljanja pokusa, a za fiksaciju je korišten Bouinov fiksativ (15 ml zasićene vodene otopine pikrinske kiseline, 5 ml 40% formalina i 1 ml ledene octene kiseline). Fiksacija je trajala 24 h. Nakon toga hidre su isprane u 70%-tnom etanolu i dehidrirane (80%, 96% i 100%-tni alkohol). Hidre su zatim isprane u kloroformu i u njemu ostavljene preko noći. Sljedeći dan isprane su u smjesi kloroforma i paraplata (1:1), 30 minuta pri 60 °C, te u čistom paraplata tri puta po 30 minuta. Nakon toga uklapane su u papirnate ladice. Paraplastni blokovi rezani su pomoću mikrotoma Thermo na rezove debljine 7  $\mu\text{m}$ . Nakon deparaplastiranja preparati su bojeni toluidinskim modrilom (otopljenim u acetatnom puferu, pH 5,6), isprani u 95%-tnom etanolu i dehidrirani u 100%-tnom etanolu. Nakon bistrenja u

ksilolu uklopljeni su u Canada balzam. Nakon sušenja pregledavani su pomoću Nikon Eclipse E600 mikroskopa pri povećanju od 1000x, a fotografije snimljene Nikon DXM1200 digitalnom kamerom.

Histo-morfološka mjerenja na preparatima od drugog dana pokusa rađena su pomoću računalnog programa za morfometrijsku analizu Ellipse version 2081 (ViDiTo, 2009). Morfometrijska obrada preparata obuhvatila je mjerenje površine i promjera stanica algi na uzorku od 100 stanica po koncentraciji i kontroli, dužinu i širinu mioepitelnih stanica ektoderma i gastroderma te debljinu mezogleje.

Statistička analiza izmjerenih parametara obuhvatila je određivanje aritmetičke sredine, standardne devijacije, minimalne i maksimalne vrijednosti te raspona. Srednje vrijednosti mjerenih parametara između kontrolne skupine te hidri tretiranih različitim koncentracijama natrijevog metasilikata uspoređene su t-testom ( $p \leq 0.05$ ) (<http://www.socscistatistics.com/tests/studentttest/Default2.aspx>).

Fotografije nespolnog razmnožavanja zelenih i smeđih hidri snimljene su Dino-Lite Digital Microscope kamerom.

### 3. REZULTATI

#### 3.1. Morfološke promjene zelene i smeđe hidre tretirane vodenim otopinama natrijevog metasilikata

Kako bi se utvrdio utjecaj natrijevog metasilikata na biologiju hidri, pet smeđih i deset zelenih hidri tretirano je s četiri različite koncentracije natrijevog metasilikata kroz tri dana.

Morfološke promjene praćene na zelenim i smeđim hidrama tijekom tri dana pokusa uključivale su oštećenja lovki (dužina lovki, broj lovki, potpuni gubitak lovki), promjene u kontrakciji tijela (promjene u kontrakciji/relaksaciji tijela) i deformacije stopala. Pratio se i udio hidri koji je migrirao na površinu te brzina reakcije na mehanički podražaj, odnosno brzina kontrakcije i relaksacije tijela nakon podraživanja hidri preparatorskom iglicom (normalna podražljivost pokazuje brzu kontrakciju i relaksaciju; usporena podražljivost pokazuje nešto sporiju kontrakciju i relaksaciju; spora podražljivost pokazuje sporu i slabu kontrakciju i relaksaciju; gotovo nikakva reakcija pokazuje jako slabu kontrakciju i relaksaciju, tj. nema reakcije). Rezultati su prikazani u tablicama 1-6.

##### 3.1.1. Kontrola

**Prvi dan** nakon postavljanja pokusa, zelene hidre u kontrolnoj skupini na podražaj preparatorskom iglicom reagirale su brzom kontrakcijom tijela, te brzim vraćanjem u relaksirano stanje. Oštećenja niti deformacije nisu bile prisutne. Došlo je do pupanja 13% jedinki. U 15% hidri došlo je do migracije na površinu.

U 50% smeđih hidri reakcija na podražaj bila je sporija nego u zelenih hidri. Ostale smeđe hidre su na podražaj reagirale brzo, kao i zelene. Izdužene lovke imalo je 50% hidri. Relaksacija tijela zabilježena je u 50% hidri.

**Drugi dan** nakon postavljanja pokusa u zelenih je hidri sve bilo isto kao i prvoga dana.

Reakcija na mehanički podražaj u smeđih se hidri dodatno usporila te je 50% hidri na podražaj reagiralo sporo, dok je ostalih 50% reagiralo usporeno. U odnosu na prvi dan, promjene na lovkama uključivale su redukciju dviju lovki do same baze u 10% jedinki.

**Treći dan** pokusa u zelenih hidri došlo je do migracije hidri s površine na dno posudice.

U smeđih je hidri zabilježena smrtnost od 10%. Došlo je do migracije 33% jedinki na površinu posudice. Smanjio se postotak relaksiranih hidri u odnosu na protekla dva dana te je iznosio 44%, dok je u 33% hidri došlo do pojačane kontrakcije tijela. Smanjio se postotak hidri s izduženim lovkaama na 44%. U 11% hidri došlo je do smanjenje broja lovki. Reakcija na podražaj se dodatno usporila te 12% hidri nije reagiralo na podražaj, dok je 70% hidri reagiralo sporo, te 10% hidri usporeno.

### 3.1.2. Promjene u zelene i smeđe hidre pri 0,05 g/L Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>

**Prvi dan** u zelenih je hidri došlo do migracije 17% jedinki na površinu. Izdužene lovke imalo je 70% hidri. U izgladu i podražljivosti zelenih hidri nisu zamijećene promjene u odnosu na kontrolu.

U smeđih je hidri došlo do migracije 10% jedinki na površinu i do izduživanja lovki u 10% hidri. Relaksirano tijelo zabilježeno je u 10% hidri.

**Drugi dan** dodatnih 3% hidri migriralo je na površinu posudice. U 17% jedinki došlo je do izduživanja lovki.

U 90% smeđih hidri došlo je do smanjenja podražljivosti u odnosu na prvi dan te je 50% hidri na podražaj reagiralo usporeno, dok je ostalih 50% reagiralo sporo. Postotak relaksiranih hidri povećao se za 20%. Dodatnih 20% hidri migriralo je na površinu.

**Treći dan** izduživanje lovki zabilježeno je u dodatnih 16% zelenih hidri.

U smeđih je hidri došlo do smanjenja podražljivosti. Gotovo nikakvu reakciju na podražaj pokazivalo je 20% jedinki, dok je 70% hidri na podražaj reagiralo spore te 10% hidri usporeno. U 10% hidri dvije su se lovke reducirale do same baze. Postotak relaksiranih hidri smanjio se za 20%, dok je kontrakcija tijela zabilježena u 30% hidri. Dodatnih 30% hidri migriralo je na površinu posudice.

### 3.1.3. Promjene u zelene i smeđe hidre pri 0,365 g/L Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>

**Prvi dan** 3% zelenih hidri je propupalo. Kontrakcija tijela zabilježena je u 6% hidri. U 3% hidri zabilježena je usporena reakcija na podražaj, dok je podražljivost u preostalim 97% bila normalna.

U svih smeđih hidri zabilježena je usporena reakcija na podražaj. Na površinu posudice migriralo je 10% jedinki. Relaksacija tijela zabilježena je u 50% hidri, dok je 10% hidri bilo kontrahirano.

**Drugog dana** u zelenih je hidri zabilježena smrtnost od 6%. Podražljivost se smanjila te je 66% hidri na podražaj reagiralo usporeno. Došlo je do redukcije triju lovki u 3% hidri, dok je u 7% hidri došlo do skraćivanja lovki. Nije zabilježena pojačana kontrahiranost tijela kod nijedne hidre za razliku od proteklog dana.

Reakcija na podražaj u smeđih hidri smanila se u odnosu na prvi dan te je 40% hidri na podražaj reagiralo sporo, dok je 60% hidri reagiralo usporeno. Lovke su izdužene u 60% jedinki te je u 10% hidri došlo do reduciranja triju lovki na 1/3 dužine.

**Trećeg dana** došlo je do redukcije triju lovki do same baze u 3% hidri, do redukcije dvije lovki u 3% zelenih hidri te do redukcije jedne lovke u također 3% hidri. Na površinu posudice migriralo je 7% jedinki te je 3% hidri propupalo.

U smeđih hidri 30% jedinki nije reagiralo na podražaj, dok su ostale reagirale sporo. Lovke su reducirane do same baze u 40% jedinki, 10% hidri imalo je reduciranu jednu lovku i još 10% dvije. Došlo je do kontrahiranja tijela u 40% hidri.

### 3.1.4. Promjene u zelene i smeđe hidre pri 0,38 g/L Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>

**Prvi dan** zelene hidre su na podražaj reagirale sporo i slabim kontrakcijama (43%). U 40% hidri je došlo do potpune redukcije svih lovki, 7% hidri imalo je četiri lovke, 3% hidri dvije lovke, dok su u 13% hidri lovke bile nejednoliko kontrahirane. Do promjene u kontrakciji tijela je došlo u 6% hidri, od čega je 3% bilo pojačano kontrahirano, a ostalih 3% relaksirano.

Sve smeđe hidre na podražaj su reagirale usporeno. U 10% hidri lovke su izdužene.

**Drugi dan** zelene hidre su na podražaj reagirale brže nego dan ranije. Kontrahiranoost tijela je bila prisutna u 3% hidri koje su imale oblik kuglice. Do potpune redukcije triju lovki došlo je u 13%, dok je do potpune redukcije dviju lovki došlo je u 10% hidri. Potpuni gubitak lovki zabilježen je u 3% hidri. Došlo je do izlučivanja sluzi u 23% jedinki. Iskrivljeno stopalo zabilježeno je u 13% hidri.

Reakcija na podražaj bila je brža u odnosu na dan ranije u 30% smeđih hidri, dok je u preostalih 70% reakcija na podražaj i dalje bila usporena. Tijelo je relaksirano u 70% hidri, dok je u 10% zabilježena kontrakcija tijela. U dodatnih 50% hidri došlo je do izduživanja lovki.

**Treći dan** tijelo je relaksirano u 3% hidri. Sporija reakcija na podražaj u odnosu na drugi dan zabilježena je u 3% hidri te su one reagirale usporeno, dok je preostalih 97% hidri na podražaj reagiralo brzom kontrakcijom i relaksacijom tijela. Lovke su se počele regenerirati kod hidri koje su drugi dan imale smanjeni broj. Povećan je broj hidri koje izlučuju sluz (33%).

U 10% smeđih hidri reakcija na podražaj bila je usporena, u 50% spora, dok 20% hidri na podražaj nije reagiralo. Lovke su gotovo potpuno reducirane u 20% smeđih hidri.

### 3.1.5. Promjene u zelene i smeđe hidre pri 0,39 g/L $\text{Na}_2\text{SiO}_3$

**Prvi dan** je zabilježena smrtnost u 3% zelenih hidri. Do potpunog gubitka lovki došlo je u 33% hidri. Smanjeni broj lovki imalo je 10% hidri, dok je skraćene lovke imalo također 10% hidri. Do relaksacije tijela došlo je u 7% hidri, dok je u 10% ono bilo kontrahirano. Deformacija stopala javila se u 10% hidri.

Reakcija na podražaj u 90% smeđih hidri bila je usporena te spora u ostalih 10%. U 10% hidri lovke su se reducirale na 1/3 dužine. Tijelo je relaksirano u 80% hidri i kontrahirano u 10%.

**Drugi dan** u zelenih je hidri zabilježena smrtnost od 3%. Došlo je do potpunog gubitka lovki u 7% hidri, do redukcije dviju lovki u 17%, do redukcije tri lovke u 10% hidri. Tijelo je relaksirano u dodatnih 3% hidri i kontrahirano u dodatnih 4%. Sluz je lučilo 22% hidri. Dodatnih 4% hidri migrirao je na površinu posudice.

Smrtnost smeđih hidri drugi dan bila je 10%. Normalna podražljivost zabilježena je u 33% hidri, dok je u 67% ona bila usporena. U 11% hidri zabilježene su tri lovke u fazi raspada. U

ostalnih su hidri lovke bile neoštećene. Tijelo dodatnih 23% hidri je kontrahirano. Migracija na površinu zabilježena je u 11% hidri.

**Treći dan** zabilježena je smrtnost 7% zelenih hidri. Reakcija na podražaj bila je spora u 35% hidri. Preostalih 65% na podražaj je reagiralo brzom kontrakcijom i relaksacijom tijela. Broj lovki smanjen je u dodatnih 6% hidri, a lovke su izdužene postotak u 14%. Sluz je izlučilo 23% hidri.

Smrtnost smeđih hidri treći dan bila je 22%. Usporena reakcija na podražaj zabilježena je u 90% hidri, dok je 10% hidri na podražaj reagiralo sporo. Došlo je do potpunog gubitka lovki u 29% hidri, dok je smanjeni broj lovki imalo 3% hidri više nego dan ranije. Na podlozi je ležalo 3% hidri više nego drugi dan.

Promjene na lovkama tijekom tri dana pokusa u zelenih hidri prikazane su u tablici 1, a one u smeđih hidri prikazane su u tablici 2. Ostale morfološke promjene u zelenih i smeđih hidri prikazane su u tablicama 3 i 4, dok su promjene podražljivosti iznijete u tablicama 5 i 6.



**Tablica 1.** Promjene na lovkaama u zelenih hidri tijekom obrade u otopinama natrijevog metasilikata.

<b>DAN 1.</b>				
<b>Koncentracija otopine natrijevog metasilikata (g/L)</b>	<b>Izdužene lovke (%)</b>	<b>Skraćene lovke (%)</b>	<b>Smanjeni broj lovki (%)</b>	<b>Potpuni gubitak lovki (%)</b>
Kontrola	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0
0,365	0	26	0	10
0,38	0	7	10	40
0,39	0	10	10	33
<b>DAN 2.</b>				
<b>Koncentracija otopine natrijevog metasilikata (g/L)</b>	<b>Izdužene lovke (%)</b>	<b>Skraćene lovke (%)</b>	<b>Smanjeni broj lovki (%)</b>	<b>Potpuni gubitak lovki (%)</b>
Kontrola	0	0	0	0
0,05	17	0	0	0
0,365	0	7	3	0
0,38	10	0	23	3
0,39	21	7	29	7
<b>DAN 3.</b>				
<b>Koncentracija otopine natrijevog metasilikata (g/L)</b>	<b>Izdužene lovke (%)</b>	<b>Skraćene lovke (%)</b>	<b>Smanjeni broj lovki (%)</b>	<b>Potpuni gubitak lovki (%)</b>
Kontrola	0	0	0	0
0,05	33	0	0	0
0,365	0	0	9	0
0,38	0	3	23	0
0,39	35	0	35	0

**Tablica 2.** Promjene na lovkaama u smeđih hidri tijekom obrade u otopinama natrijevog metasilikata.

<b>DAN 1.</b>				
<b>Koncentracija otopine natrijevog metasilikata (g/L)</b>	<b>Izdužene lovke (%)</b>	<b>Skraćene lovke (%)</b>	<b>Smanjeni broj lovki (%)</b>	<b>Potpuni gubitak lovki (%)</b>
Kontrola	50	0	0	0
0,05	70	0	0	0
0,365	0	0	0	0
0,38	10	0	0	0
0,39	0	10	0	0
<b>DAN 2.</b>				
<b>Koncentracija otopine natrijevog metasilikata (g/L)</b>	<b>Izdužene lovke (%)</b>	<b>Skraćene lovke (%)</b>	<b>Smanjeni broj lovki (%)</b>	<b>Potpuni gubitak lovki (%)</b>
Kontrola	50	0	0	0
0,05	70	0	0	0
0,365	60	0	0	0
0,38	60	0	0	0
0,39	0	22	0	0
<b>DAN 3.</b>				
<b>Koncentracija otopine natrijevog metasilikata (g/L)</b>	<b>Izdužene lovke (%)</b>	<b>Skraćene lovke (%)</b>	<b>Smanjeni broj lovki (%)</b>	<b>Potpuni gubitak lovki (%)</b>
Kontrola	44	0	11	0
0,05	70	0	10	0
0,365	0	10	10	40
0,38	0	0	0	20
0,39	0	0	14	29

**Tablica 3.** Morfološke promjene zelenih hidri tijekom obrade otopinama natrijevog metasilikata.

**DAN 1.**

Koncentracija otopine natrijevog metasilikata (g/L)	Smrtnost (%)	Pupanje (%)	Kontrakcija (%)	Relaksacija (%)	Deformacija stopala (%)	Migracija na površinu (%)
Kontrola	0	13	0	0	0	15
0,05	0	0	0	0	0	17
0,365	0	3	6	0	0	0
0,38	0	0	3	3	0	17
0,39	3	0	10	7	10	3

**DAN 2.**

Koncentracija otopine natrijevog metasilikata (g/L)	Smrtnost (%)	Pupanje (%)	Kontrakcija (%)	Relaksacija (%)	Deformacija stopala (%)	Migracija na površinu (%)
Kontrola	0	0	0	0	0	15
0,05	0	0	0	0	0	20
0,365	6	0	0	0	0	0
0,38	0	0	3	0	13	0
0,39	3	0	14	10	4	7

**DAN 3.**

Koncentracija otopine natrijevog metasilikata (g/L)	Smrtnost (%)	Pupanje (%)	Kontrakcija (%)	Relaksacija (%)	Deformacija stopala (%)	Migracija na površinu (%)
Kontrola	0	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	20
0,365	0	3	0	0	0	7
0,38	0	0	3	3	7	3
0,39	7	0	0	4	0	8

**Tablica 4.** Morfološke promjene smeđih hidri tijekom obrade otopinama natrijevog metasilikata.

**DAN 1.**

Koncentracija otopine natrijevog metasilikata (g/L)	Smrtnost (%)	Pupanje (%)	Kontrakcija (%)	Relaksacija (%)	Deformacija stopala (%)	Migracija na površinu (%)
Kontrola	0	0	0	50	0	0
0,05	0	0	0	10	0	10
0,365	0	0	10	50	0	10
0,38	0	0	0	0	0	0
0,39	0	0	10	80	0	0

**DAN 2.**

Koncentracija otopine natrijevog metasilikata (g/L)	Smrtnost (%)	Pupanje (%)	Kontrakcija (%)	Relaksacija (%)	Deformacija stopala (%)	Migracija na površinu (%)
Kontrola	0	0	0	50	0	0
0,05	0	0	0	80	0	30
0,365	0	0	0	70	0	10
0,38	0	0	10	70	0	0
0,39	10	0	33	67	0	11

**DAN 3.**

Koncentracija otopine natrijevog metasilikata (g/L)	Smrtnost (%)	Pupanje (%)	Kontrakcija (%)	Relaksacija (%)	Deformacija stopala (%)	Migracija na površinu (%)
Kontrola	10	0	33	44	0	33
0,05	0	0	30	60	0	60
0,365	0	0	40	30	0	10
0,38	0	0	10	50	0	0
0,39	22	0	0	43	0	0

**Tablica 5.** Podražljivost zelenih hidri tijekom obrade otopinama natrijevog metasilikata.

<b>DAN 1</b>				
Koncentracija otopine natrijevog metasilikata (g/L)	Normalna reakcija (%)	Usporena reakcija (%)	Spora reakcija (%)	Gotovo nikakva reakcija, nema reakcije (%)
Kontrola	100	0	0	0
0,05	100	0	0	0
0,365	97	3	0	0
0,38	57	3	40	0
0,39	59	0	41	0
<b>DAN 2</b>				
Koncentracija otopine natrijevog metasilikata (g/L)	Normalna reakcija (%)	Usporena reakcija (%)	Spora reakcija (%)	Gotovo nikakva reakcija, nema reakcije (%)
Kontrola	100	0	0	0
0,05	100	0	0	0
0,365	34	66	0	0
0,38	100	0	0	0
0,39	96	4	0	0
<b>DAN 3</b>				
Koncentracija otopine natrijevog metasilikata (g/L)	Normalna reakcija (%)	Usporena reakcija (%)	Spora reakcija (%)	Gotovo nikakva reakcija, nema reakcije (%)
Kontrola	100	0	0	0
0,05	100	0	0	0
0,365	100	0	0	0
0,38	97	3	0	0
0,39	65	0	35	0

(normalna reakcija prikazuje brzu kontrakciju i relaksaciju tijela; usporena reakcija prikazuje nešto sporiju kontrakciju i relaksaciju tijela u odnosu na reakciju kontrolnog uzorka; spora reakcija prikazuje sporu i slabu kontrakciju i relaksaciju tijela; gotovo nikakva reakcija prikazuje jako slabu kontrakciju i relaksaciju tijela, tj. nema reakcije)

**Tablica 6.** Podražljivost smeđih hidri tijekom obrade otopinama natrijevog metasilikata.

<b>DAN 1</b>				
Koncentracija otopine natrijevog metasilikata (g/L)	Normalna reakcija (%)	Usporena reakcija (%)	Spora reakcija (%)	Gotovo nikakva reakcija, nema reakcije (%)
Kontrola	50	50	0	0
0,05	90	0	10	0
0,365	0	100	0	0
0,38	0	100	0	0
0,39	0	90	10	0
<b>DAN 2</b>				
Koncentracija otopine natrijevog metasilikata (g/L)	Normalna reakcija (%)	Usporena reakcija (%)	Spora reakcija (%)	Gotovo nikakva reakcija, nema reakcije (%)
Kontrola	0	50	50	0
0,05	0	50	50	0
0,365	0	60	40	0
0,38	30	70	0	0
0,39	33	67	0	0
<b>DAN 3</b>				
Koncentracija otopine natrijevog metasilikata (g/L)	Normalna reakcija (%)	Usporena reakcija (%)	Spora reakcija (%)	Gotovo nikakva reakcija, nema reakcije (%)
Kontrola	0	44	44	12
0,05	0	10	70	20
0,365	0	0	70	30
0,38	20	10	50	20
0,39	0	0	100	0

(normalna reakcija prikazuje brzu kontrakciju i relaksaciju tijela; usporena reakcija prikazuje nešto sporiju kontrakciju i relaksaciju tijela u odnosu na reakciju kontrolnog uzorka; spora reakcija prikazuje sporu i slabu kontrakciju i relaksaciju tijela; gotovo nikakva reakcija prikazuje jako slabu kontrakciju i relaksaciju tijela, tj. nema reakcije)

### 3.2. Citološko-histološke promjene na zelenoj hidri izazvane natrijevim metasilikatom

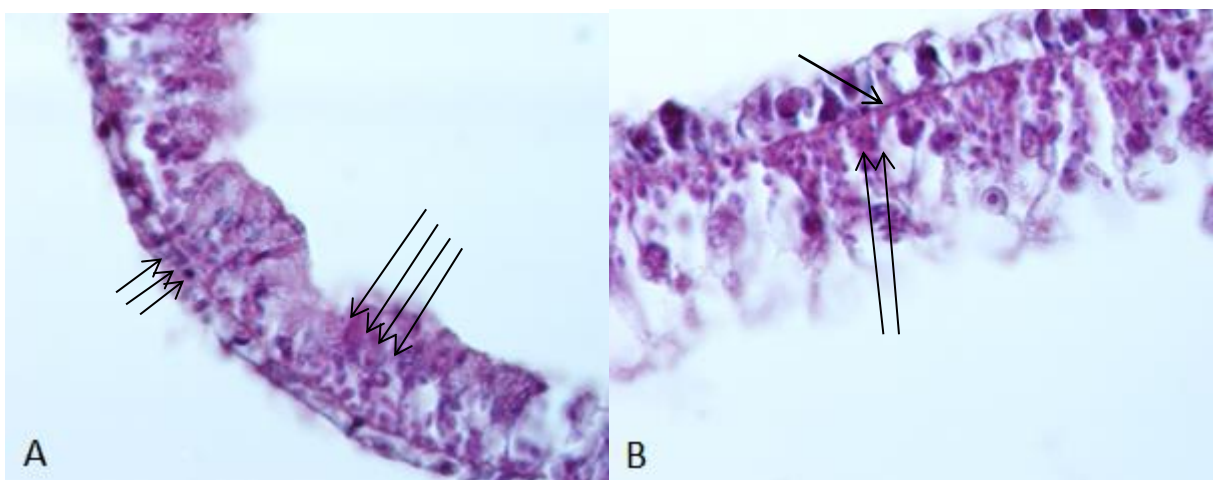
Kako bismo analizirali citološko – histološke promjene u građi hidre nakon obrade natrijevim metasilikatom, usporedili smo strukturu kontrolnih i obrađenih hidri. Hidre su uklopljene u paraplast, obojene i analizirane pod svjetlosnim mikroskopom.

U kontrolnih, neobrađenih jedinki stanični slojevi bili su neoštećeni i lako razlučivi, mezogleja neprekinuta i prisutni svi stanični tipovi. U bazalnom dijelu gastrodermalnih mioepitelnih stanica bile su vidljive alge, poredane jedna iznad druge u formacije nalik na pravilne stupiće (slika 6).

Minimalna debljina mezogleje iznosila je 0,18  $\mu\text{m}$ , a maksimalna debljina 0,66  $\mu\text{m}$ . Raspon izmjerenih vrijednosti bio je 0,48  $\mu\text{m}$ , a srednja vrijednost 0,30  $\mu\text{m}$  (slika 14).

Minimalna dužina mioepitelnih stanica ektoderma iznosila je 1,76  $\mu\text{m}$ , a maksimalna dužina 5,46  $\mu\text{m}$ . Raspon izmjerenih vrijednosti bio je 3,70  $\mu\text{m}$ , a srednja vrijednost 3,62  $\mu\text{m}$  (slika 15).

Minimalna dužina mioepitelnih stanica gastroderma iznosila je 4,41  $\mu\text{m}$ , a maksimalna dužina 11,45  $\mu\text{m}$ . Raspon izmjerenih vrijednosti bio je 7,04  $\mu\text{m}$ , a srednja vrijednost 6,05  $\mu\text{m}$ . Minimalna širina stanica gastroderma iznosila je 1,89  $\mu\text{m}$ , a maksimalna širina 5,29  $\mu\text{m}$ . Raspon izmjerenih vrijednosti bio je 3,4  $\mu\text{m}$ , a srednja vrijednost 3,22  $\mu\text{m}$  (slika 17).



Slika 6. Stanični slojevi (ektoderm i gastroderm) te međusloj mezogleja u kontrolnog uzorka zelene hidre, drugi dan nakon postavljanja pokusa. Uzorci su fiksirani, uklopljeni u paraplast i obojeni toluidinskim modrilom. a:

strelica – mezogleja, dvije strelice – alge unutar gastrodermalnih mioepitelnih stanica. b: tri strelice – ektoderm, četiri strelice – gastroderm. Povećanje 1000x.

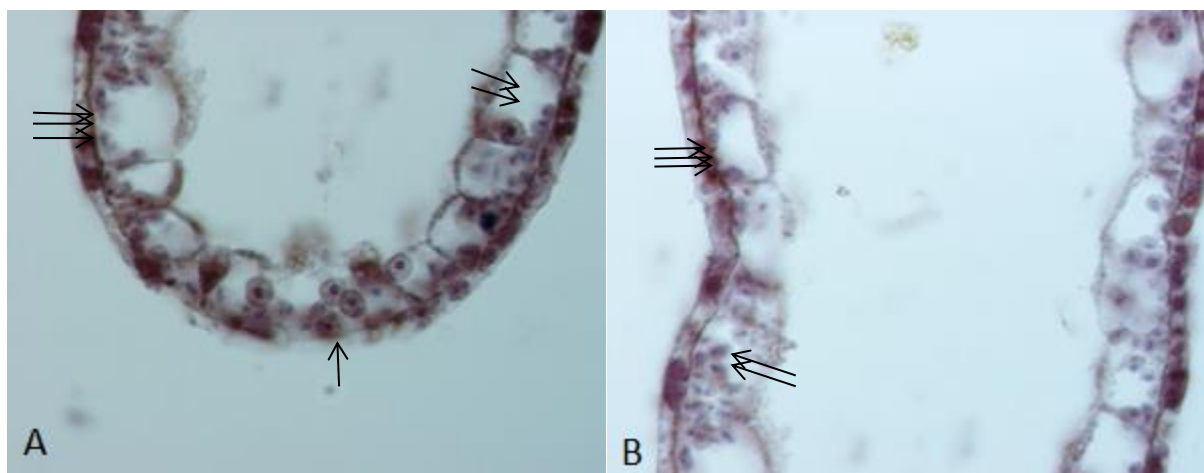
Citološko – histološka analiza zelenih hidri obrađenih 0,365 g/L otopinom natrijevog metasilikata pokazala je oštećenja ektoderma na pojedinim mjestima. Mezogleja je bila vidljiva i dobro definirana, osim na spomenutim mjestima oštećenja, gdje je dijelom bila naborana. Intersticijske stanice su bile prisutne u velikom broju. Gastroderm nije bio oštećen, te su duž cijelog tijela bile vidljive velike gastrodermalne mioepitelne stanice. Zimogene stanice nisu uočene. Alge su bile prisutne u manjem broju (slika 7).

Minimalna debljina mezogleje iznosila je 0,09  $\mu\text{m}$ , a maksimalna debljina 0,31  $\mu\text{m}$ . Raspon izmjerenih vrijednosti bio je 0,22  $\mu\text{m}$ , a srednja vrijednost 0,19  $\mu\text{m}$  (slika 10).

Minimalna dužina mioepitelnih stanica ektoderma iznosila je 0,7  $\mu\text{m}$ , a maksimalna dužina 2,56  $\mu\text{m}$ . Raspon izmjerenih vrijednosti bio je 1,86  $\mu\text{m}$ , a srednja vrijednost 1,46  $\mu\text{m}$  (slika 11).

Minimalna dužina mioepitelnih stanica gastroderma iznosila je 4,76  $\mu\text{m}$ , a maksimalna dužina 8,02  $\mu\text{m}$ . Raspon izmjerenih vrijednosti bio je 3,26  $\mu\text{m}$ , a srednja vrijednost 3,22  $\mu\text{m}$  (slika 12).

Minimalna širina mioepitelnih stanica gastroderma iznosila je 3,26  $\mu\text{m}$ , a maksimalna širina 9,69  $\mu\text{m}$ . Raspon izmjerenih vrijednosti bio je 6,43  $\mu\text{m}$ , a srednja vrijednost 6,37  $\mu\text{m}$  (slika 13).



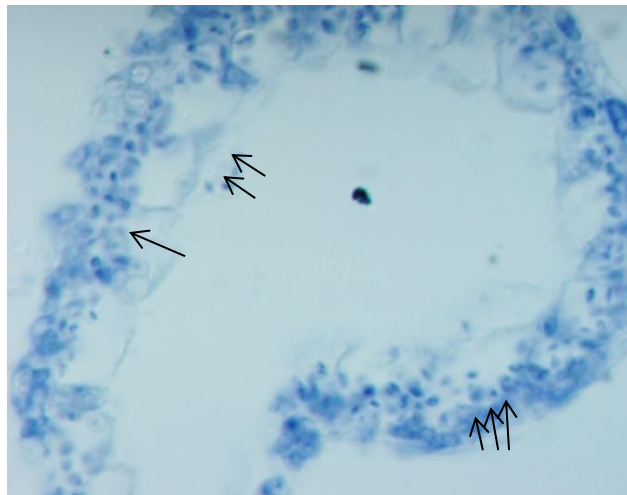
**Slika 7.** Stanični slojevi (ektoderm i gastroderm) te međusloj mezogleja u zelena hidre tretirane s 0,365 g/L  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ , drugi dan nakon postavljanja pokusa. Uzorci su fiksirani, uklopljeni u paraplast i obojeni toluidinskim modrilom (strelica – oštećenje ektoderma, dvije strelice – gastrodermalne mioepitelne stanice s malo algi, tri strelice – mezogleja). Povećanje 1000x.



Citološko – histološka analiza zelenih hidri obrađenih 0,38 g/L otopinom natrijevog metasilikata pokazala je da se stanični slojevi teško mogu razaznati, te reduciran i oštećen ektoderm koji je nedostajao na nekim mjestima. Mezogleja nije bila vidljiva. Stanice gastroderma su se teško mogle razlučiti jedna od druge. Gastroderm je bio u stanju raspadanja. Alge su bile vidljive, no nepravilno smještene unutar gastrodermalnih stanica. Manji broj algi bio je prisutan i u gastrovaskularnoj šupljini (slika 8). Zbog oštećenja staničnih slojeva, na preparatima iz ove koncentracije nije bilo moguće mjeriti debljinu mezogleje niti dužinu ektodermalnih mioepitelne stanice. Izmjerene su vrijednosti dužine i širine gastrodermalnih mioepitelne stanica.

Minimalna dužina mioepitelne stanice gastroderma iznosila je 3,92  $\mu\text{m}$ , a maksimalna vrijednost 7  $\mu\text{m}$ . Raspon izmjereih vrijednosti bio je 3,08  $\mu\text{m}$ , a srednja vrijednost 5,35  $\mu\text{m}$  (slika 12).

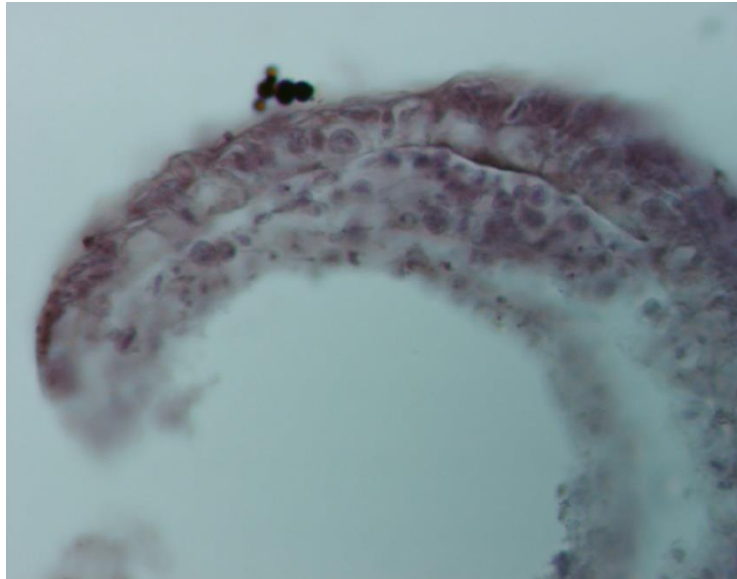
Minimalna širina mioepitelne stanice gastroderma iznosila je 3,17  $\mu\text{m}$ , a maksimalna vrijednost 8,46  $\mu\text{m}$ . Raspon izmjerenih vrijednosti bio je 5,26  $\mu\text{m}$ , a srednja vrijednost 5,36  $\mu\text{m}$  (slika 13).



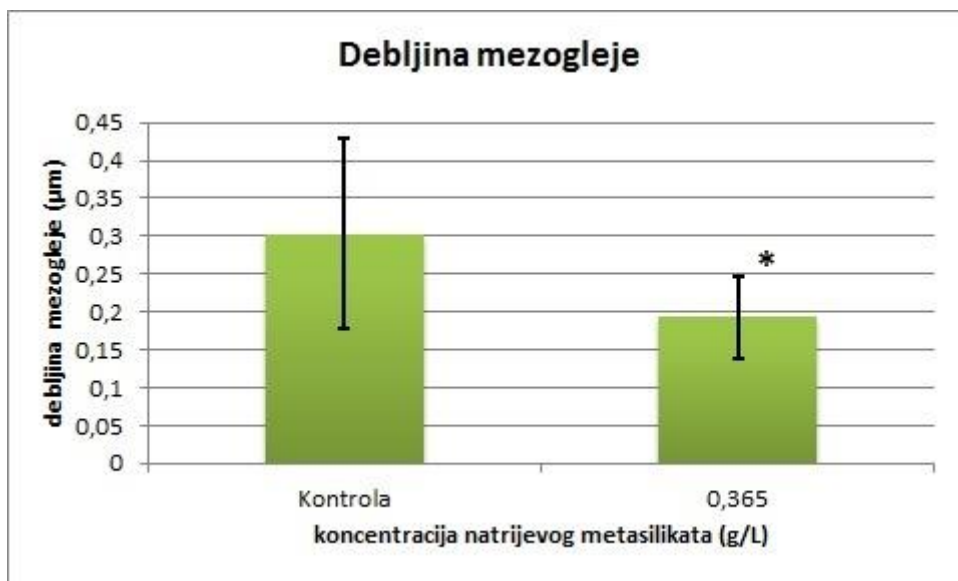
**Slika 8.** Stanični slojevi (ektoderm i gastroderm) te međusloj mezogleja u zelene hidre tretirane s 0,38 g/L  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ , drugi dan nakon postavljanja pokusa. Uzorak je fiksiran, uklopljen u paraplak i obojen toluidinskim modrilom (strelica – gastrodermalne mioepitelne stanice s nepravilno raspoređenim algama, dvije strelice – alge unutar gastrovaskularne šupljine, tri strelice – reducirani ektoderm). Povećanje 1000x.

Citološko – histološka analiza zelenih hidri obrađenih 0,39 g/L otopinom natrijevog metasilikata pokazala je tešku razlučivost staničnih slojeva. Mezogleja je bila vidljiva tek mjesimično. Gastrovaskularna šupljina je bila reducirana, a alge raspršene po cijelom tijelu hidre (slika 9).

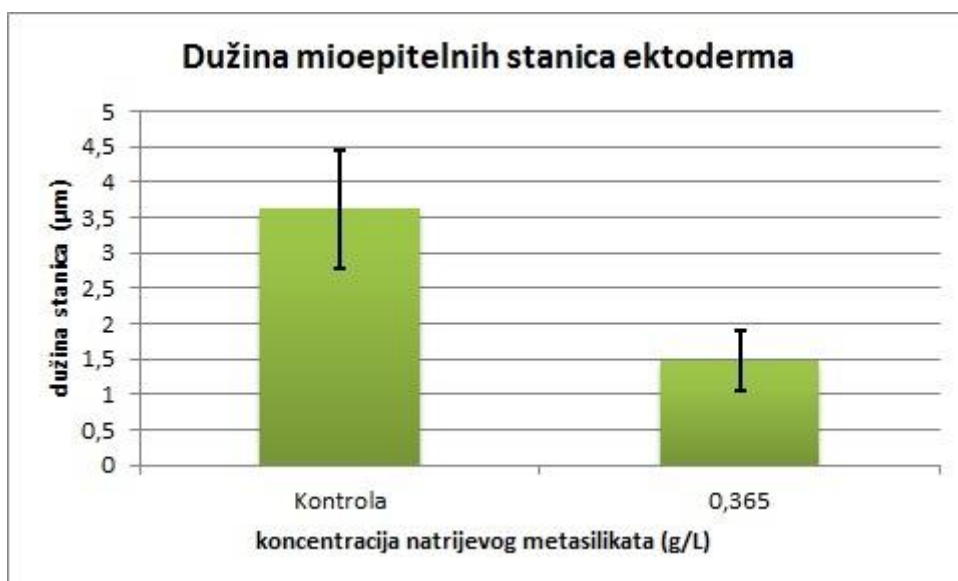
Mjerenja se nisu mogla izvršiti.



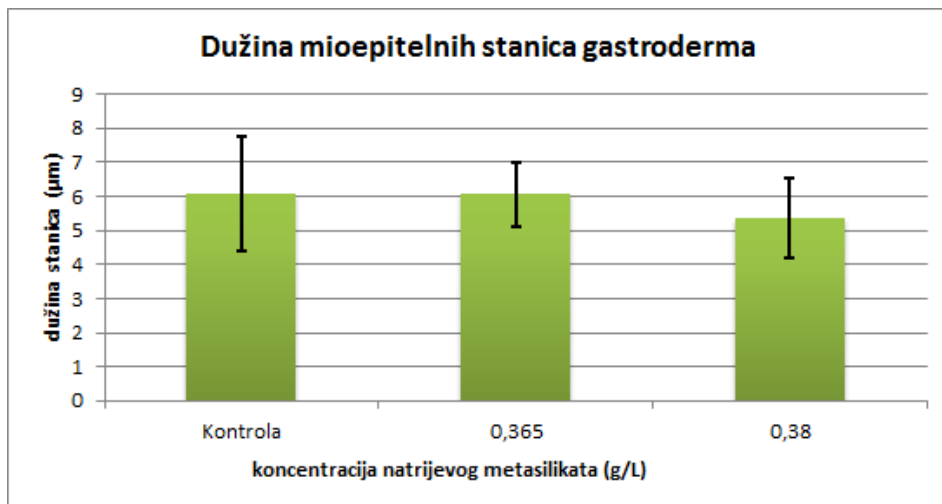
**Slika 9.** Preparat zelene hidre tretirane s 0,39 g/L  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ , drugi dan nakon postavljanja pokusa. Stanični slojevi (ektoderm i gastroderm) te međusloj mezogleja reducirani i teško razlučivi. **Uzorak je fiksiran, uklopljen u paraplant i obojen toluidinskim modrilom.** Povećanje 1000x.



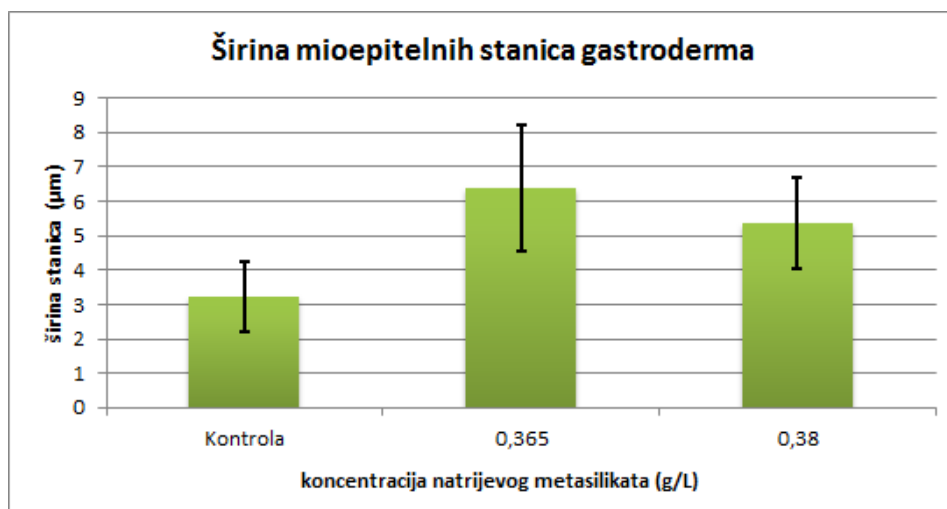
**Slika 10.** Debljina mezogleje ( $\mu\text{m}$ ) u neobrađenih hidri (kontrola) i zelenih hidri tretiranih s 0,365 g/L otopinom natrijevog metasilikata drugi dan nakon postavljanja pokusa (\* - statistička značajnost razlike,  $p \leq 0,05$ ).



**Slika 11.** Dužina mioepitelnih stanica ektoderma ( $\mu\text{m}$ ) u neobrađenih hidri (kontrola) i zelenih hidri tretiranih s 0,365 g/L otopinom natrijevog metasilikata drugi dan nakon postavljanja pokusa.



**Slika 12.** Dužina mioepitelnih stanica gastroderma ( $\mu\text{m}$ ) u neobrađenih hidri (kontrola) i zelenih hidri tretiranih s 0,365 i 0,38 g/L otopinama natrijevog metasilikata drugi dan nakon postavljanja pokusa.



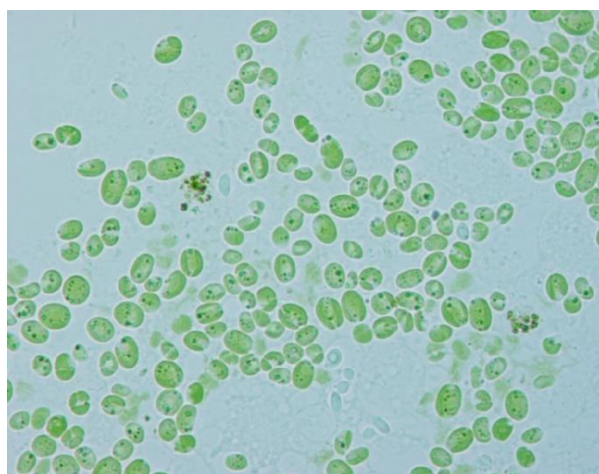
**Slika 13.** Širina mioepitelnih stanica gastroderma ( $\mu\text{m}$ ) u neobrađenih hidri (kontrola) i zelenih hidri tretiranih s 0,365 i 0,38 g/L otopinama natrijevog metasilikata drugi dan nakon postavljanja pokusa.

### 3.3. Citološke promjene na algama

Uspoređena je citološka analiza algi u zelenih hidri obrađenih različitim koncentracijama natrijevog metasilikata te zelenih hidri kontrolnog uzorka.

Analiza kontrolnog uzorka pokazala je da je minimalni promjer stanica algi u gastrodermalnim mioepitelnim stanicama zelenih hidri iznosio 1,45  $\mu\text{m}$ , a maksimalni promjer 3,39  $\mu\text{m}$ . Raspon izmjerenih vrijednosti bio je 1,94  $\mu\text{m}$ , a srednja vrijednost 2,44  $\mu\text{m}$ .

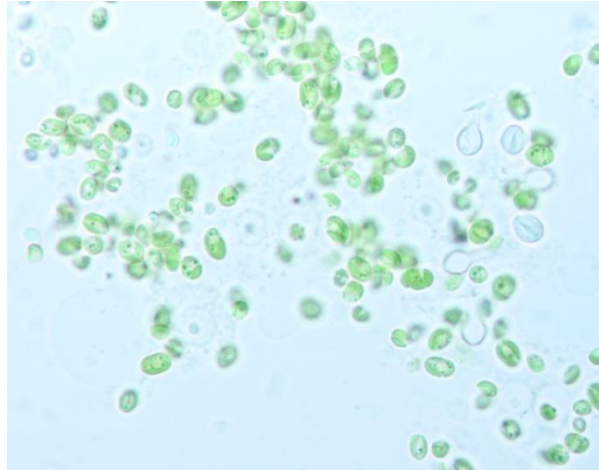
Minimalna površina stanice algi iznosila je 2,37  $\mu\text{m}$ , a maksimalna površina 5,94  $\mu\text{m}$ . Raspon izmjerenih površina bio je 3,57  $\mu\text{m}$ , a srednja vrijednost 4,16  $\mu\text{m}$ .



Slika 14. Alge roda *Chlorella* iz zelene hidre u neobrađenom kontrolnom uzorku, drugi dan nakon postavljanja pokusa. Povećanje 1000x.

Analiza algi *Chlorella* iz zelene hidre tretirane vodenom otopinom natrijevog metasilikata koncentracije 0,05 g/L  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  pokazala je da je minimalni promjer stanica algi iznosio je 1,63  $\mu\text{m}$ , a maksimalni promjer 3  $\mu\text{m}$ . Raspon izmjerenih vrijednosti bio je 1,37  $\mu\text{m}$ , a srednja vrijednost 2,42  $\mu\text{m}$ .

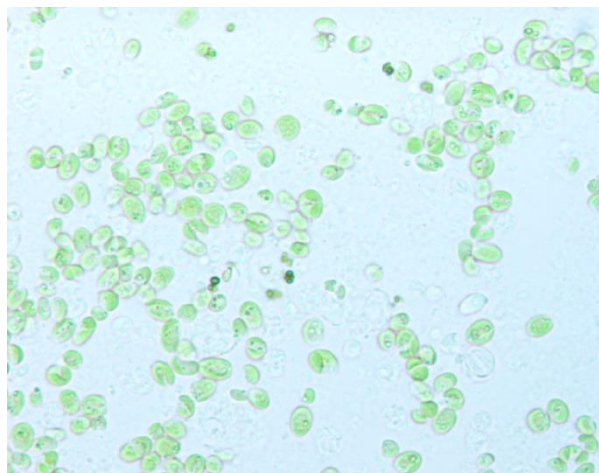
Minimalna površina stanica algi iznosila je 1,43  $\mu\text{m}$ , a maksimalna površina 5,25  $\mu\text{m}$ . Raspon izmjerenih vrijednosti bio je 3,82  $\mu\text{m}$ , a srednja vrijednost 3,20  $\mu\text{m}$ .



**Slika 15.** Alge roda *Chlorella* iz zelene hidre tretirane vodenom otopinom natrijevog silikata koncentracije 0,05 g/L, drugi dan nakon postavljanja pokusa. Povećanje 1000x.

Analiza algi *Chlorella* iz zelene hidre tretirane vodenom otopinom natrijevog metasilikata koncentracije 0,365 g/L  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  pokazala je da je minimalni promjer stanica algi iznosio 1,89  $\mu\text{m}$ , a maksimalni promjer 3,44  $\mu\text{m}$ . Raspon izmjerenih vrijednosti bio je 1,55  $\mu\text{m}$ , a srednja vrijednost 2,44  $\mu\text{m}$ .

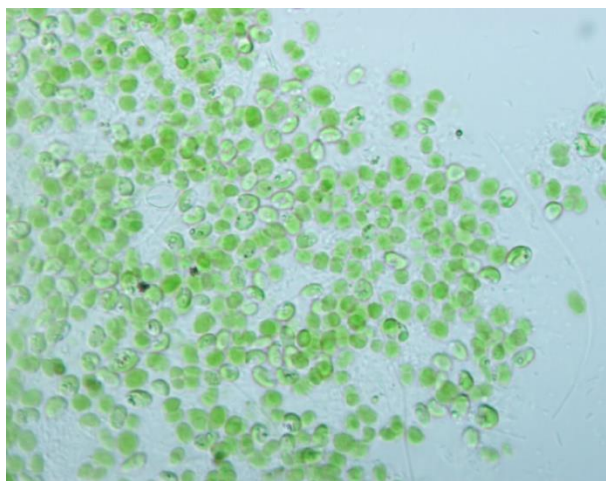
Minimalna površina stanica iznosila je 2,19  $\mu\text{m}^2$ , a maksimalna površina 5,72  $\mu\text{m}^2$ . Raspon mjerenih vrijednosti bio je 3,53  $\mu\text{m}^2$ , a srednja vrijednost 3,76  $\mu\text{m}^2$ .



**Slika 16.** Alge roda *Chlorella* iz zelene hidre tretirane vodenom otopinom natrijevog metasilikata koncentracije 0,365 g/L, drugi dan postavljanja pokusa. Povećanje 1000x.

Analiza algi *Chlorella* iz zelene hidre tretirane vodenom otopinom natrijevog metasilikata koncentracije 0,38 g/L Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> pokazala je da je minimalni promjer stanica bio 1,5 μm, a maksimalni promjer 3,04 μm. Raspon izmjerenih vrijednosti bio je 1,54 μm, a srednja vrijednost 2,03 μm.

Minimalna površina stanica algi iznosila je 1,47 μm, a maksimalna površina 4,03 μm. Raspon izmjerenih vrijednosti bio je 2,56 μm, a srednja vrijednost 2,46 μm.

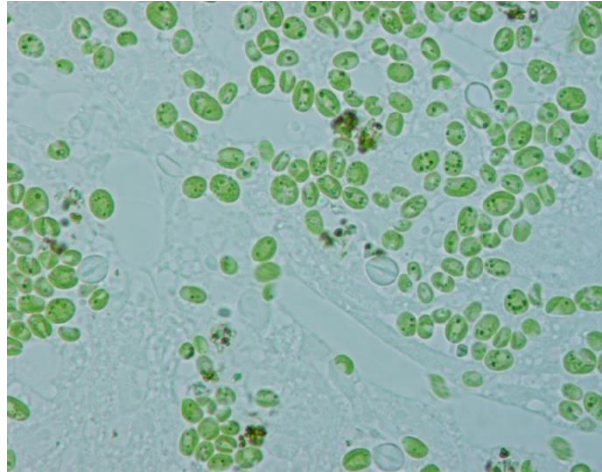


**Slika 17.** Alge roda *Chlorella* iz zelene hidre tretirane vodenom otopinom natrijevog metasilikata koncentracije 0,38 g/L, drugi dan postavljanja pokusa. Povećanje 1000x.

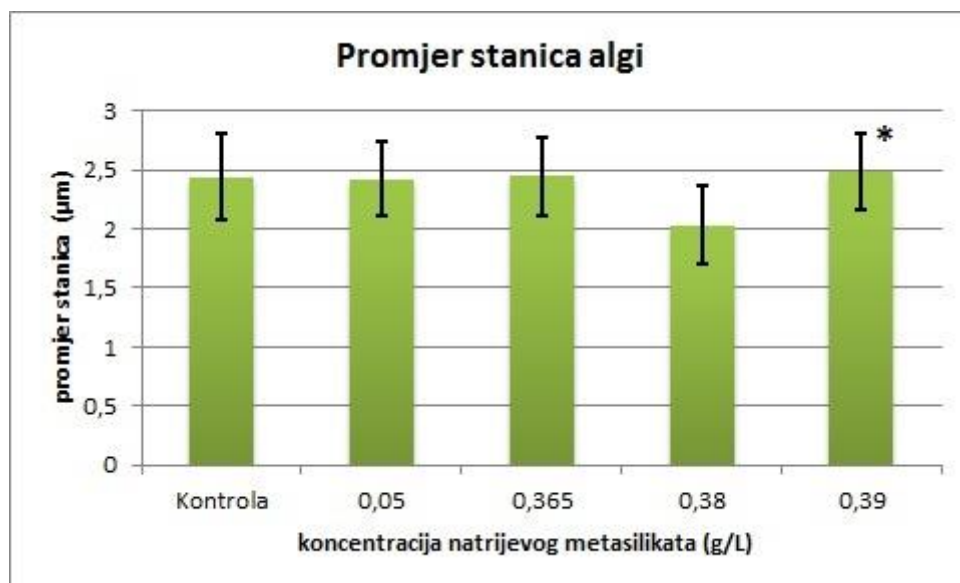
Analiza algi *Chlorella* iz zelene hidre tretirane vodenom otopinom natrijevog metasilikata koncentracije 0,39 g/L Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> pokazala je da je minimalni promjer stanica iznosio 1,72 μm, a maksimalni promjer 3,48 μm. Raspon izmjerenih vrijednosti bio je 1,76 μm, a srednja vrijednost 2,49 μm.

Minimalna površina stanica algi iznosila je 2,04 μm, a maksimalna površina 5,71 μm. Raspon izmjerenih vrijednosti bio je 3,67 μm, a srednja vrijednost 3,84 μm.



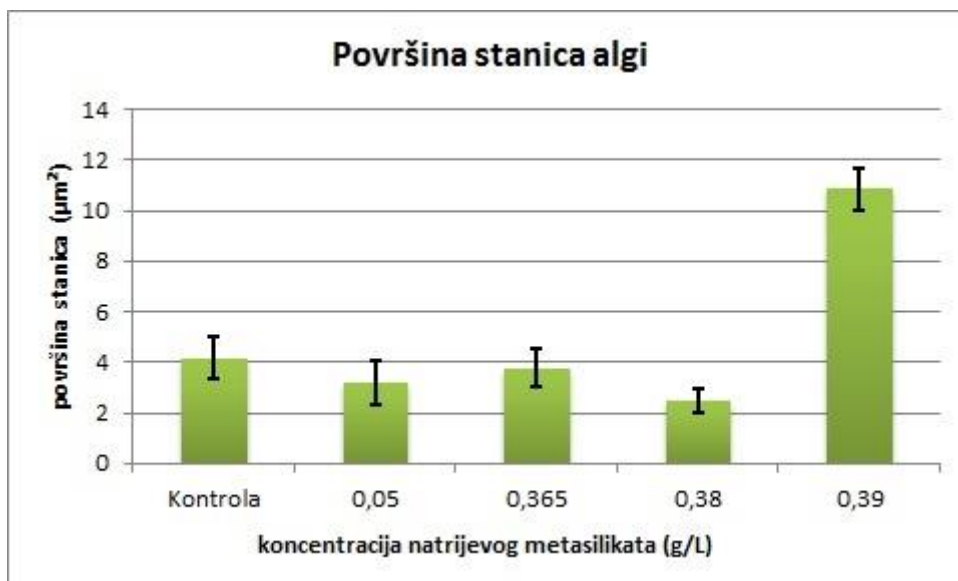


**Slika 18.** Alge roda *Chlorella* iz zelene hidre tretirane vodenom otopinom natrijevog metasilikata koncentracije 0,39 g/L, drugi dan postavljanja pokusa. Povećanje 1000x.



**Slika 19.** Promjer stanica ( $\mu\text{m}$ ) algi *Chlorella* u zelenih hidri obrađenih različitim koncentracijama natrijevog metasilikata drugi dan nakon postavljanja pokusa (kontrola – stanice neobrađenih hidri; 0,05, 0,365, 0,38, 0,39 – koncentracije natrijevog metasilikata (g/L); \* - statistička značajnost razlike u odnosu na kontrolu,  $p \leq 0,05$ ).





**Slika 20.** Površina stanica ( $\mu\text{m}^2$ ) algi *Chlorella* u zelenih hidri obrađenih različitim koncentracijama natrijevog metasilikata drugi dan nakon postavljanja pokusa (kontrola – stanice neobrađenih hidri; 0,05, 0,365, 0,38, 0,39 – koncentracije natrijevog metasilikata (g/L); \* - statistička značajnost razlike u odnosu na kontrolu,  $p \leq 0,05$ ).

## 4. RASPRAVA

U ovom je istraživanju po prvi put praćen učinak natrijevog metasilikata na zelenu i smeđu hidru. Željelo se odrediti kakve promjene toksikant uzrokuje te postoji li razlika u učinku na dvije vrste hidri. Različite vrste hidri razlikuju se u svojoj morfologiji, fiziologiji i ekologiji pa je stoga moguće da se razlikuju i u odgovoru na stresore kao što su različita zagađivala. S obzirom da zelena hidra živi u simbiotskom odnosu s algama iz roda *Chlorella*, željelo se utvrditi daje li joj takav odnos adaptivnu prednost u odgovoru na nepovoljne uvjete okoliša poput izloženosti različitim toksikantima. Istraživanjima učinka različitih organskih i anorganskih tvari na različite vrste hidri utvrđeno je kako razlike u osjetljivosti među hidrama postoje (Karntarnut i Pascoe 2002). Dosadašnja istraživanja pokazala su veću toleranciju zelene hidre prema određenim štetnim tvarima u odnosu na smeđu hidru (Kalafatić, 1997.). Ipak, u slučaju teških metala pokazala se osjetljivijom (Karntarnut i Pascoe 2002).

Dosadašnja istraživanja učinka natrijevog metasilikata na žive organizme uključuju pokuse izvođene uglavnom na sisavcima poput štakora, pasa i svinja. U tim pokusima zabilježeno je da izazivaju iritacije očiju, kože i dišnog sustava (Elmore 2005). Istraživanja na beskralješnjacima manje su brojna. Pokusi na spužvama (*Spongia*) pokazali su kako topivi silikati imaju pozitivan učinak na ekspresiju gena za jednu vrstu kolagena, prisutnog i u tijelu hidre (Pozzolini i sur. 2011). Kolagen je u hidri prisutan u nestaničnom sloju mezogleji pa je moguće da bi u slučaju dugotrajnog izlaganja hidre nižim koncentracijama ovog spoja moglo doći do promjena u sastavu mezogleje. Kratkotrajnim izlaganjem koncentracijama korištenima u ovom istraživanju zabilježeno je da pri višim koncentracijama spoj uzrokuje oštećenja mezogleje, dok je pri nižim koncentracijama ona bila neoštećena. Koncentracije 0,05 i 0,365 g/L  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  mogle bi biti podobne za daljnja istraživanja učinka dugotrajnog izlaganja hidri niskim koncentracijama natrijevog metasilikata na sastav mezogleje.

Poznato je da neki insekticidi uzrokuju brojne morfološke i citološko-histološke promjene na zelenim hidrama. U istraživanjima učinka insekticida Dimiline WP 25, Gamacide 20 i Primore WP 20 zabilježene promjene uključuju promjenu oblika tijela, skraćivanje lovki te oštećenja cijelih lovki i hipostomalne regije (Kalafatić i sur. 1994). Neke tvari, poput insekticida Gamacide 20, mogu imati vrlo snažan učinak na hidre i uzrokovati potpuno oštećenje pojedinih dijelova tijela (Kopjar i sur. 1994). Najveća oštećenja prilikom tretiranja hidri antibiotikom kloramfenikolom zabilježena su na lovkama. Slične promjene zabilježene su i prilikom izlaganja natrijevom metasilikatu. Lovke su građene od tankih epitelnih stanica

pa natrijev metasilikat, kao i ostale tvari, lako prodire u njih i oštećuje ih (Kovačević i sur. 2001). Snažniji učinak spoj je očekivano imao pri višim koncentracijama, u kojima je došlo do potpunog gubitka lovki, dok su u nižim koncentracijama promjene uključivale skraćivanje lovki te smanjenje njihova broja. Najintenzivniji učinak na zelene hidre zabilježen je odmah prvog dana pokusa te je u sljedeća dva dana došlo do regeneracije. U smeđih hidri najveća oštećenja lovki nastupila su tek treći dan. Pokus je trajao upravo tri dana iz razloga što je toliko vremena potrebno za prodiranje toksikanta u sve slojeve hidre, no čini se da postoji razlika u brzini prodiranja u tijelo zelene i smeđe hidre.

Kontrahiranje i relaksiranje tijela poznat je obrambeni mehanizam hidri u nepovoljnim uvjetima okoliša (Kovačević i sur. 2015). Veće promjene između relaksiranog i kontrahiranog oblika tijela primijećene su u smeđih hidri. Već u kontrolnoj skupini, smeđe su hidre pokazivale povećanu relaksaciju tijela. Uzrok tome mogla bi biti njihova veća osjetljivost na visoke temperature i/ili manjak kisika u posudicama u kojima su držane u odnosu na zelene hidre (Kovačević i Matulić 2013). U tom bi slučaju povećanje površine tijela relaksacijom mogao biti mehanizam kojim se nastoji povećati difuzija kisika u organizam. Do kontrakcije tijela dolazi isprva u višim, a treći dan, kada su i promjene na lovkama najintenzivnije, u svim koncentracijama. Pojačana kontrakcija tijela mehanizam je kojim hidre nastoje spriječiti ili smanjiti ulazak toksikanta u organizam (Kalafatić 1997). Također, dokazano je kako neke tvari djeluju kao inhibitori kolinesteraze, što uzrokuje produženo stanje kontrakcije tijela (Kalafatić i sur. 1991). S obzirom da je u ranijim istraživanjima pokazano kako natrijev metasilikat ima mali ili nikakav učinak na inhibiciju kolinesteraze (Elmore 2005), pojačana kontrakcija tijela je u ovom slučaju vjerojatno mehanizam smanjenja ulaska toksikanta u tijelo.

Smeđe i zelene hidre u kontrolnim skupinama reagirale su na mehanički podražaj preparatorskom iglicom brzom kontrakcijom i relaksacijom tijela. Dio smeđih hidri već je u kontroli pokazivao usporenu podražljivost. To bi moglo značiti kako su eksperimentalni uvjeti i prije dodavanja spoja štetnije utjecali na smeđu nego na zelenu hidru, što potvrđuje zapažanja da se zelena hidra bolje prilagođava promjenjivim uvjetima okoliša zahvaljujući svojim endosimbiontima te kako simbiotski odnosi imaju važnu ulogu u evoluciji povećavajući biološke prednosti (Kovačević i sur. 2009). Povećanje koncentracije natrijevog metasilikata uzrokovalo je smanjenje podražljivosti, odnosno sporiju kontrakciju i relaksaciju tijela, u obje vrste hidri. Učinak spoja na podražljivost zelenih hidri bio je manji u odnosu na smeđe hidre. Smatra se kako toksične tvari utječu na živčani sustav hidri i smanjuju njegovu

funkcionalnost (Kovačević i sur. 2015), a ovakvi rezultati podudaraju se s rezultatima dobivenima u istraživanju učinka željeza na zelene i smeđe hidre.

Migracija na površinu posudice zabilježena je u istraživanjima toksičnosti mnogih tvari, poput željeza i aluminija, na hidre (Kovačević i sur. 2007, 2015). Poznato je kako se u nepovoljnim uvjetima okoliša hidre često znaju odvojiti od podloge i migrirati u potrazi za povoljnijim mikro-okolišem (Kovačević i sur. 2015). I u slučaju natrijevog metasilikata došlo je do migracije hidri na površinu, i to u obje vrste, što ukazuje na njegovu toksičnost. Najveći postotak zelenih hidri migrirao je prvi dan pokusa, a u sljedeća se dva dana smanjio. Za razliku od toga, smeđe hidre su najviše migrirale treći dan i to pri nižim koncentracijama toksikanta. Pri višim koncentracijama u isto su vrijeme smeđe hidre imale najslabiju podražljivost te su vjerojatno bile preslabe za migraciju. Ovakav trend ukazuje na to da migracija može poslužiti kao mehanizam izbjegavanja štetnog učinka metasilikata samo pri nižim koncentracijama.

Ako se usporedi stanje veličinom većih smeđih hidri treći dan pokusa i veličinom manjih zelenih hidri prvi dan pokusa, kada je toksičnost za svaku vrstu hidri bila najizraženija, može se opaziti kako je učinak natrijevog metasilikata bio snažniji na smeđe hidre, pa se može pretpostaviti da bi prirodne populacije smeđih hidri bile više pogođene izlaganjem metasilikatu. Zelene hidre, iako s izraženim oštećenjima lovki prvi dan pokusa, zadržale su normalnu podražljivost, a kako se tijekom sljedeća dva dana može primijetiti i regeneracija lovki, te kako je ukupan postotak migrirajućih zelenih hidri manji nego u smeđih hidri, moglo bi se pretpostaviti da bi u prirodnim ekosustavima lakše podnijele izlaganje natrijevom metasilikatu od smeđih hidri. No, za provjeru takvih pretpostavki, bilo bi dobro pratiti učinak spoja na smeđe hidre u dužem vremenskom periodu da bi se provjerilo kako se smeđe hidre oporavljaju nakon trećeg dana u odnosu na zelene hidre.

Iako je poznato da neke tvari mogu imati stimulirajući učinak na pupanje, dok ga druge, poput kloramfenikola, teških metala i pesticida, mogu inhibirati, u ovom istraživanju nije zabilježen učinak natrijevog metasilikata na nespolno razmnožavanje (Kalafatić i sur. 1991, Kovačević i sur. 2001.). Najveći postotak smrtnosti zabilježen je pri najvišoj koncentraciji toksikanta u obje vrste hidri, no veći postotak smrtnosti zabilježen je u smeđih hidri.

Citološko-histološke promjene na zelenoj hidri uzrokovane natrijevim metasilikatom uključivale su oštećenja staničnih slojeva ektoderma i gastroderma te nestaničnog međusloja mezogleje. Spoj je uzrokovao stanjenje ektoderma te je na nekim mjestima došlo do njegova

prekinuća. Vanjski mukozni sloj bio je oštećen cijelom dužinom tijela. Mukozni sloj luče mioepitelne stanice ektoderma, a služi kao zaštita od nepovoljnih vanjskih utjecaja kao što je izloženost različitim štetnim tvarima. Slični efekti na ektoderm i mukozni sloj primijećeni su u dosadašnjim istraživanjima toksičnosti nekih tvari na hidre. Tako insekticid pirimicarb u zelenih hidri uzrokuje nestanak cjelokupnog mukoznog sloja, dok su u smeđih hidri oštećenja mjestimična (Kalafatić i Kopjar 1995). Učinak antibiotika kloramfenikola vidljiv je na oba stanična sloja koja grade tijelo hidre, dok se oko tijela hidre mogu primijetiti povećane količine sluzi, što predstavlja obrambeni mehanizam kojim se nastoji spriječiti ulazak štetne tvari u organizam ili mehanizam detoksifikacije (Kovačević i sur. 2001). Povećano lučenje sluzi zelenih hidri primijećeno je pri većim koncentracijama natrijevog metasilikata. Iz histoloških je preparata vidljivo kako štetan učinak spoja započinje s oštećenjima ektoderma i vanjskog mukoznog sloja te da se pri višim koncentracijama njegov štetan učinak širi i na gastroderm, pa tada dolazi i do učinka na alge, odnosno njihov položaj u gastrodermalnim stanicama. Dok se u kontrolnih hidri alge nalaze smještene u bazalnom dijelu stanice, u pravilnim formacijama nalik na stupiće, pri koncentraciji od 0,38 g/L došlo je do razbijanja pravilnih formacija i nepravilnog rasporeda algi. Takav je toksičan učinak na zelene hidre zabilježen i s pirimicarbom i kloramfenikolom (Kalafatić i Kopjar 1995, Kovačević i sur. 2001) te može se zaključiti kako je uzrok tome oštećenje staničnog kostura u gastrodermalnim stanicama. Pri još višoj koncentraciji (0,39 g/L) alge su bile razbacane po cijeloj hidri, ali učinak na (ultra)strukturu samih algi nije zamijećen pa bi se moglo pretpostaviti kako korištene koncentracije metasilikata znatnije ne narušavaju ovaj endosimbiotski odnos. To bi mogao biti uzrok nešto veće otpornosti zelene hidre na djelovanje ovog toksikanta.

## 5. ZAKLJUČAK

Zbog široke upotrebe natrijevog metasilikata i ostalih vrsta topivih silikata u kozmetičkoj industriji i proizvodnji detergenata te zbog velike osjetljivosti akvatičkih ekosustava, važno je poznavati učinak koji topivi silikati imaju na životne zajednice u slatkim vodama. Različite vrste hidri, kao važna komponenta bentičkih zajednica voda stajaćica, zbog lako mjerljivih morfoloških i bihevioralnih promjena predstavljaju dobar modalni organizam u ekotoksikologiji.

Istraživanjem učinka subletalnih koncentracija natrijevog metasilikata na zelene i smeđe hidre pokazalo se da spoj ima toksičan učinak na obje vrste hidri te da uzrokuje migraciju, morfološke promjene i oštećenja, te usporava reakciju na mehanički podražaj. Najintenzivnije promjene u zelenih su hidri zabilježene prvi dan pokusa, dok su u smeđih hidri one bile treći dan. Najveća oštećenja zabilježena su na lovkama te u smanjenju podražljivosti na mehanički podražaj u smeđih hidri. Usporedbom rezultata utvrđeno je kako spoj ima veću toksičnost za smeđe hidre. Budući da oštećenja algi nisu zamijećena i da do narušavanja endosimbiotskog odnosa dolazi tek dislokacijom algi, endosimbiotske alge bi mogle biti razlog zadržavanja vijabilnosti zelenih hidri. Zbog toga bismo mogli pretpostaviti kako bi zelena hidra u prirodnim staništima lakše podnijela kratkotrajno izlaganje natrijevom metasilikatu nego smeđa hidra. Za provjeru takvih pretpostavki, bilo bi dobro pratiti učinak spoja na smeđe hidre u dužem vremenskom razdoblju kako bi se utvrdilo kako se oporavljaju nakon trećeg dana pokusa. Daljnja istraživanja praćenjem ultrastrukturnih promjena zasigurno bi pridonijela detaljnijem razumijevanju učinka ovog spoja na beskralješnjake i alge.

Natrijev metasilikat u višim je koncentracijama uzrokovao oštećenja staničnih slojeva te nestaničnog međusloja, mezogleje. U budućim istraživanjima bilo bi dobro istražiti kakav učinak koncentracije 0,05 i 0,365 g/L  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  imaju na sastav mezogleje.

S obzirom na zapažene promjene u ovom istraživanju, može se zaključiti da prisutnost natrijevog metasilikata u ekosustavima u koncentracijama višim od 0,365 g/L ima direktan učinak na vijabilnost populacija zelenih i smeđih hidri te indirektan učinak na populacije ostalih organizama koji su trofičkim odnosima povezani s hidrama. Budući da se intenzitet oštećenja povećava s povišenjem koncentracije te da pri višim koncentracijama uzrokuje i smrtnost, više koncentracije bi u prirodi mogle imati znatniji učinak na brojnost populacije hidri.

## 6. LITERATURA

1. Beach M. J., Pascoe D. 1997. The role of *Hydra vulgaris* (Pallas) in assessing the toxicity of freshwater pollutants. *Wat. Res.* **32**, 101-106.
2. Bell G., Wolfe L. M. 1984. Sexual and asexual reproduction in a natural population of *Hydra pseudoligactis*. *Can. J. Zool.* **63**, 851-856.
3. Bhat S. 2013. Ecotoxicology and impact on biodiversity. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2**, 1-19.
4. Bode H. R. 1996. The interstitial cell lineage of hydra: a stem cell system that arose early in the evolution. *J. Cell Sci.* **109**, 1155-1164.
5. Boxall A. B. A. 2004. The environmental side effects of medication. *EMBO Rep.* **5**, 1110-1116.
6. Buzgariu W., Haddad H. A., Tomczyk S., Wenger Y., Galliot B. 2015. Multi-functionality and plasticity characterize epithelial cells in *Hydra*. *Tissue Barriers* **3**, 1-14.
7. Campbell R. D. 1990. Transmission of symbiotic algae through sexual reproduction in *Hydra*: movement of algae into the oocyte. *J. Tissue Cell* **22**, 137-147.
8. Elmore A. R. 2005. Final Report on Safety Assessment of Potassium Silicate, Sodium Metasilicate, and Sodium Silicate. *Int. J. Toxicol.* **24**, 103-117.
9. Fawer M., Concannon M., Rieber W. 1999. Life cycle inventories for production of sodium silicates. *Int. J. Life Cycle Assess.* **4**, 207-212.
10. Glauber K. M., Dana C. E., Steele R. E. 2010. *Hydra*. *Curr. Biol.* **22**, 964-965.
11. Habetha M., Anton-Erxleben F., Neumann K., Bosch T. 2003. The *Hydra viridis/Chlorella* symbiosis. Growth and sexual differentiation in polyps without symbionts. *Zoology* **106**, 101-108.
12. Holt E. A., Miller S. W. 2011. Bioindicators: Using organisms to measure environmental impacts. *Nature Education Knowledge* **2**, 1-10.
13. Kalafatić M. 1997. Regeneration and asexual reproduction of *Hydra oligactis* treated with different pesticides. *Biologia, Bratislava.* **52**, 475-480.
14. Kalafatić M., Kopjar N. 1995. Response of green hydra to pirimicarb. *Biologia* **50**, 289-292.
15. Kalafatić M., Žnidarić D., Kopjar N. 1994. The effect of insecticides upon green hydra. *Period. Biol.* **1**, 129-130.

16. Kalafatić M., Žnidarić D., Lui A., Wrischer M. 1991. Effects of insecticides (Dimiline WP 25, Torak EC 24 and Gamacide 20) on hydra (*Hydra vulgaris* Pallas). *Int. J. Dev. Biol.* **35**, 335-340.
17. Kaliszevich A. 2010. Interference of asexual and sexual reproduction in the green hydra. *Ecol. Res.* **1**, 147-152.
18. Karntanut W., Pascoe D. 2002. The toxicity of copper, cadmium and zinc to four different Hydra (Cnidaria: Hydrozoa). *Chemosphere* **47**, 1059-64.
19. Kawaida H., Shimizu H., Fujisawat T., Tachida H., Kobayakawa Y. 2010. Molecular phylogenetic study in genus Hydra. *Gene* **468**, 30-40.
20. Koizumi O., Bode H. R. 1991. Plasticity in the nervous system of adult Hydra. *J. Neurosci.* **11**, 2011-20.
21. Kopjar N., Kalafatić M., Žnidarić D. 1994. Combined effect of Gamacide 20 and UV irradiation on green hydra (*Hydra viridissima* Pallas). *Biologia* **49**, 371-375.
22. Kovačević G. 2012. Value of the Hydra model system for studying symbiosis. *Int. J. Dev. Biol.* **56**, 627-635.
23. Kovačević G., Matulić A. 2013. Effects of Quercetin on the Green Hydra (*Hydra viridissima* Pallas). *Int. J. Biol.* **5**, 57-63.
24. Kovačević, G., Kalafatić, M., Ljubešić, N., 2009. Effects of Norflurazon on Green and Brown Hydra. *Folia Biologica* **57**, 91-96.
25. Kovačević G., Kalafatić M., Ljubešić N., Šunjić H. 2001. The effect of chloramphenicol on the symbiosis between alga and hydra. *Biologia* **56**, 605-610.
26. Kovačević G., Želježić D., Horvatin K., Kalafatić M. 2007. Morphological features and comet assay of green and brown hydra treated with aluminium. *Symbiosis* **44**, 145-152.
27. Kovačević G., Gregorović G., Matijević A., Kalafatić M. 2015. Toxic effects of iron on green and brown hydra. *Curr. Sci.* **110**, 502-504.
28. Pozzolini M., Bruzone F., Berillin V., Mussino F., Cerrano C., Benatti U., Giovine M. 2011. Molecular characterization of a nonfibrillar collagen from the marine sponge *Chondrosia reniformis* Nardo 1847 and positive effects of soluble silicates on its expression. *J. Mar. Biotechnol.* **14**, 281-293.
29. Quinn B., Gagne F., Blaise C. 2012. *Hydra*, a model system for environmental studies. *Int. J. Dev. Biol.* **56**, 613-625.



30. Vail J. G. 1928. Soluble silicates in industry. The Chemical Catalog Company, New York.
31. Weber J., Klug M., Tardent P. 1987. Some physical and chemical properties of purified nematocysts of *Hydra attenuata* pall. (Hydozoa, Cnidaria). Comp. Biochem. Physiol. **3**, 855-862.
32. Wills J. H. 1982. A short history of the manufacture of soluble silicates in the United States. ACS Symposium series **194**, 3-15.
33. <http://www.daviddarling.info/encyclopedia/H/Hydra.html>. (10.8.2016.)

## ŽIVOTOPIS

Ime: Ana

Prezime: Šimičev

Datum i mjesto rođenja: 1.10.1988., Rijeka, Hrvatska

Adresa: Dubrovačka 6, 51000 Rijeka

Broj mobitela: 095 392 5375

E-mail adresa: asimicev@gmail.com

### Obrazovanje:

- 2010 – 2016      **Diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Zoologija**  
Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- 2007 – 2010      **Preddiplomski studij Znanosti o okolišu**  
Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- 2003 – 2007      **Prva sušačka hrvatska gimnazija, opći smjer**  
Rijeka

### Jezici:

- Engleski: aktivan govor, čitanje i pisanje
- Talijanski: osnove govora, čitanja i pisanja

### Rad na računalu:

- MS Office, GIS

### Ostale aktivnosti:

- Speleolog pripravnik - završena speleološka škola u SOPD „Željezničar“
- Član udruge Zeleni prozor – Udruga za međunarodnu suradnju na području zaštite okoliša i održivog razvoja
- Volonter u Eko centru Caput Insulae, Beli, Cres

