

# Učinak UVB-zračenja i norflurazona na zelenu hidru (Hydra viridissima Pallas, 1766) i smeđu hidru (Hydra oligactis Pallas, 1766)

---

Matijević, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:217:536389>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Ana Matijević

**Učinak UVB-zračenja i norflurazona na zelenu (*Hydra viridissima*  
Pallas, 1766) i smeđu hidru (*Hydra oligactis* Pallas, 1766)**

Diplomski rad



Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za evoluciju, simbioze i molekularnu filogenetiku u Zoologijskom zavodu i u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Gorana Kovačevića i izv. prof. dr. sc. Petre Korać i predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

## **Zahvala**

Najljepše zahvaljujem svojim mentorima izv. prof. dr. sc. Goranu Kovačeviću i izv. prof. dr. sc. Petri Korać na iskazanom povjerenju, pomoći, korisnim savjetima i podršci tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem i tehničarki Nadici Vincek na pomoći u tehničkom dijelu izrade rada.

Posebno se zahvaljujem dr.sc. Katarini Caput Mihalić na suradnji i pomoći u izradi mog diplomskog.

Najveća hvala mojoj Riti.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

Učinak UVB-zračenja i norflurazona na zelenu (*Hydra viridissima* Pallas, 1766) i smeđu hidru (*Hydra oligactis* Pallas, 1766)

ANA MATIJEVIĆ  
Rooseveltova trg 6, Zagreb

**SAŽETAK:** Postoje dokumentirana istraživanja o postojanju tumora na tijelu hidri, a ovo je prvo istraživanje gdje su jedinke hidre izlagane tretmanu UVB-zračenjem i/ili norflurazonu s namjerom da se izazovu tumori. Jedinke zelene hidre (*Hydra viridissima* Pallas, 1766) i jedinke smeđe hidre (*Hydra oligactis* Pallas, 1766) ili obje vrste zajedno izlagane su norflurazonu koncentracija  $2 \times 10^{-7}$  mol/L ili  $2 \times 10^{-6}$  mol/L. Dio hidri izložen je norflurazonu i zračen UVB-zračenjem valne dužine 254 nm 2 minute. Drugi dio pokusa je rađen tako da su hidrama dodane suspenzije slobodnoživuće alge *Chlorella vulgaris* (CV) i endosimbiotske alge *Mychonastes homosphaera* (CZ10) ili obje alge zajedno. Hidre s dodatkom algi su izlagane norflurazonu i zračene na isti način kao u prvom dijelu pokusa. Pratile su se morfološke promjene hidri: migracija, odgovor na mehanički podražaj, oblik tijela, oštećenje lovki, nesporno (pupanje) i spolno razmnožavanje te smrtnost. U eksperimentalnim posudicama s dodatkom algi pratile su se još boja otopine i prisustvo nakupina algi. Migracija hidri, promjena oblika tijela pretežno iz relaksiranog u kontrahirani oblik i spolno razmnožavanje bili su prvi znakovi izbjegavanja štetnog učinka UVB-zračenja ili norflurazona. Histološke promjene pratile su se svjetlosnim mikroskopom i brojale su se stanice ektoderma, gastroderma, intersticijske stanice, zimogene stanice i žarne stanice, a mjerena je i debljina mezogleje. Ugibale su samo zračene jedinke zelene hidre. Pri višoj koncentraciji norflurazona i u svim zračenim hidrama uočena su velika oštećenja u strukturi tkiva hidri. Zračenje je prouzročilo izrasline na lovkama i na tijelu hidre ili specifične rašljaste lovke.

(60 stranica, 24 slike, 3 tablice, 43 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: hidra, UVB-zračenje, norflurazon, simbioza, migracija, morfološke i histološke promjene, izrasline

Voditelj 1: izv. prof. dr. sc. Goran Kovačević

Voditelj 2: izv. prof. dr. sc. Petra Korać

Ocjenitelji: 1. izv. prof. dr. sc. Goran Kovačević

2. izv. prof. dr. sc. Petra Korać

3. prof. dr. sc. Božena Mitić

Rad prihvaćen: 19.09.2018.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

Effects of UVB-Radiation and Norflurazon in Green Hydra (*Hydra viridissima* Pallas, 1766)  
and Brown Hydra (*Hydra oligactis* Pallas, 1766)

ANA MATIJEVIĆ  
Roosevelt Square 6, Zagreb

**SUMMARY:** The occurrence of tumors on the body of hydra has already been reported in researches but this is the first study in which the individuals of symbiotic green hydra and non-symbiotic brown hydra were exposed to UVB-radiation and /or norflurazon in order to induce tumors. The individuals of green hydra (*Hydra viridissima* Pallas, 1766) and brown hydra (*Hydra oligactis* Pallas, 1766), either separately or both species together, were treated with norflurazon in concentrations of  $2 \times 10^{-7}$  mol/L or  $2 \times 10^{-6}$  mol/L. A group of hydra was treated with norflurazon and exposed to UVB-radiation with a wavelength of 254 nm for 2 minutes. The second part of the experiment was performed by adding suspensions of free-living algae *Chlorella vulgaris* (CV) or endosymbiotic *Mychonastes homosphaera* (CZ10) and both algae together. The group of hydra with algae suspension was treated with norflurazon and exposed to UVB-radiation in the same way as in the first part of the experiment. The following morphological changes of hydra were observed: migration, response to mechanical stimuli, body shape, damage to tentacles, asexual (budding) and sexual reproduction, and mortality. The experimental dishes with algae suspension were monitored for the change of solution color and the presence of algae blobs. Migration, change of body shape from relaxed to predominantly contracted, and sexual reproduction were identified as the first evasion signs of the deleterious effects of UVB-radiation and norflurazon. Histological changes were detected by light microscope, while ectoderm, gastroderm, interstitial, zymogen and cnidocyte cells were counted. The thickness of mesoglea was measured. Mortality was present in the individuals of green hydra that were exposed to UVB-radiation. Severe damage to the structure of hydra tissue was noted in hydra treated with high concentrations of norflurazon and in all hydra exposed to UVB-radiation. Radiation caused tissue growths on both tentacles and body of hydra as well as specific fork-shaped tentacles in hydra.

(60 pages, 24 figures, 3 tables, 43 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central biological library

Keywords: Hydra, UVB-radiation, norflurazon, symbiosis, migration, morphological and histological changes, tissue growth

Supervisor 1: dr. Goran Kovačević, Assoc. Prof.  
2: dr. Petra Korać, Assoc. Prof.

Reviewers 1: dr. Goran Kovačević, Assoc. Prof.  
2: dr. Petra Korać, Assoc. Prof.  
3: dr. Božena Mitić, Prof.

Thesis accepted: September 19, 2018

# SADRŽAJ

## 1. UVOD

1.1. Hidra	1
1.2. Histološka i citološka građa hidre	2
1.3. Zelena hidra <i>Hydra viridissima</i> Pallas i smeđa hidra <i>Hydra oligactis</i> Pallas	3
1.4. Norflurazon	5
1.5. UVB-zračenje	6
1.6. Evolucija tumora	7
1.7. Cilj istraživanja	8

## MATERIJAL I METODE

2.1. Materijal	9
2.2. Metode	9
2.3. Morfološke promjene	10
2.4. Morfometrija	10
2.5. Histološke promjene	11
2.6. Izolacija DNA	11
2.7. Lančana reakcija polimerazom i gel elektroforeza	12
2.8. Gel elektroforeza	13

## 3. REZULTATI

3.1. Morfološke promjene zelene i smeđe hidre	14
3.1.1. Migracija	14
3.1.2. Nesporno razmnožavanje (pupanje)	18
3.1.3. Odgovor na mehanički podražaj	23
3.1.4. Oštećenje lovki	29
3.1.5. Sporno razmnožavanje	34
3.1.6. Oblik tijela	36
3.1.7. Smrtnost	41
3.1.8. Prisutnost nakupina algi u posudicama	42

<b>3.2. Citološko-histološke promjene zelene i smeđe hidre tijekom pokusa</b>	<b>43</b>
<b>3.3. Razvoj testova za detekciju promjena onkogeni</b>	<b>50</b>
<b>4. RASPRAVA</b>	<b>51</b>
<b>5. ZAKLJUČAK</b>	<b>55</b>
<b>6. LITERATURA</b>	<b>56</b>
<b>7. ŽIVOTOPIS</b>	<b>60</b>



# 1. UVOD

## 1.1. Hidra

Hidra je slatkovodni beskralježnjak rasprostranjen po cijelom svijetu. Pripada koljenu Cnidaria (žarnjaci), razredu Hydrozoa (obrubnjaci), redu Hydrioda, porodici Hydridae. Ime Hydra potječe iz antičkih mitova. Tako se zvala neman kojoj bi na mjestu svake odsječene glave narasle dvije nove glave (Zamarovsky, 1985). Regenerativne sposobnosti hidre su izuzetne (Kalafatić i sur., 2001) te je hidra klasičan modelni organizam za razumijevanje fundamentalnih razvojnih procesa (Siebert i sur., 2007). Tijelo hidre je cilindričnog oblika. Na apikalnom kraju se nalazi hipostom s lovkama, u sredini je gastralna regija s pupnom regijom i na bazalnom kraju se nalazi stopalo (Slika 1).



a) Smeđa hidra



b) zelena hidra

**Slika 1.**

Žarnjaci su dobili ime po žarnicama ili nematocitama, jednim od najkompleksnije građenih i najtoksičnijih stanica u životinjskom svijetu. U tijelu hidre žarne stanice najgušće su rasprostranjene u lovkama i u području hipostoma. Uloga im je hvatanje plijena ili obrana. Sadrže neurotoksine kojima omamljuju žrtvu kao i bodežiće kojima žrtvu probadaju te je pomoću niti privuku hipostomu gdje se nalaze usta. Na usta se nastavlja probavna šupljina koja služi za izvanstaničnu probavu hrane pomoću zimogenih stanica koje luče probavne enzime u probavnu šupljinu. Hrana se probavlja i unutarstanično. Difuzijom hrana dopijeva u sve dijelove tijela hidre, dok kontrakcijama cijelog tijela izbacuje neprobavljene tvari kroz hipostom. Hidre se hrane bakterijama, algama, malim račićima i ličinkama kukaca koje lovkama prinose usnom otvoru.

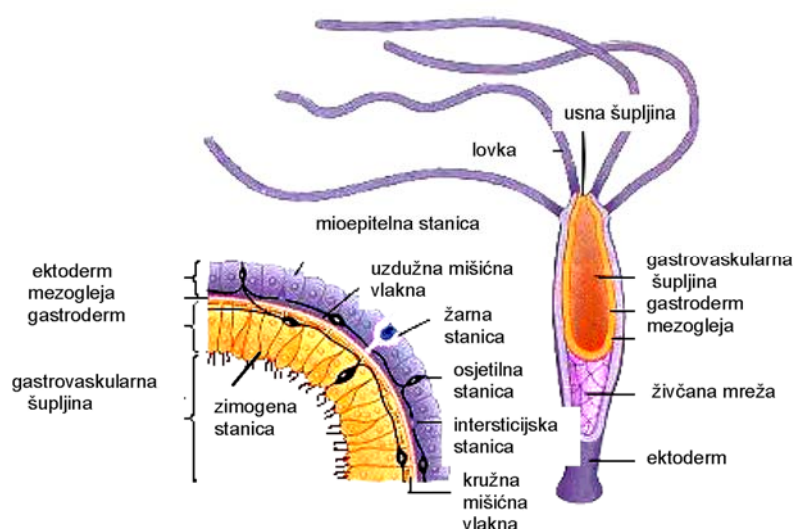
Difuzija se također koristi i za izmjenu plinova odnosno disanje životinje. Obitavalište hidri je slatkovodno dno stajaćica ili blagih tekućica, vodeno bilje i kamenje za koje su pričvršćene i uglavnom su sedentarni organizmi. Plutaju pomoću plinskog mjehurića kojeg

stvara bazalna ploča stopala. Ona drži hidru pričvršćenu za dno ili površinu biljke. Kretanje hidri omogućuju kontrakcije tijela kao i lovke. Faktori okoliša su glavni uzrok pokretanja i migracije hidri.

Hidre se razmnožavaju spolno i nesporno (Matoničkin, 1978). Nesporno razmnožavanje ili pupanje odvija se u probavnom dijelu koji obuhvaća pupnu regiju. Spolno razmnožavanje hidri je rjeđe i tada se formiraju muške i ženske gonade. Formiranje gonada stimuliraju faktori okoliša, poput temperature, pH medija, koncentracije O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> te gladovanja (Burnett, 1973, Kuznetsov i sur., 2001). Kod žarnjaka prvi puta nalazimo živčani sustav. To je jedan od najprimitivnijih živčanih sustava budući da su živčane stanice raspoređene jednako po čitavom tijelu i provode živčane impulse u svim smjerovima tijela (Burnett, 1973). Rezultat mehanički podražaja hidre je reakcija čitavog tijela, odnosno kontrahiranje tijela i lovki te višestruko smanjenje njihove duljine.

## 1.2. Histološka i citološka građa hidre

Tijelo hidre je troslojno, izgrađeno od ektoderma, mezogleje i gastroderma (Slika 2). Vanjski stanični sloj se naziva ektoderm, a građen je od mioepitelnih, intersticijskih i živčanih stanica, knidoblasta i knida. Osnovne stanice ektoderma su mioepitelne stanice koje sežu od površine ektoderma do mezogleje. Njihov apikalni dio je sekrecijski aktivan i proizvodi mukozni omotač koji štiti hidru od mehaničkih oštećenja i gubitka vode i soli iz tijela. Sekrecijska aktivnost je najveća u području stopala jer je tim dijelom tijela hidra pričvršćena za podlogu.



**Slika 2.** Prikaz histološko-citološke građe hidre (preuzeto s: [www.tutorvista.com](http://www.tutorvista.com))

Stanice između mioepitelnih stanica su intersticijske stanice koje tijekom embriogeneze nisu diferencirane, već su rezervne stanice kod kojih je pojačana mitotička aktivnost i imaju sposobnost diferenciranja u druge ektodermne stanice.

Žarnice stanice knidocite ili nematocite su stanice koje sadrže knidociste odnosno knide ili nematociste. Žarne i žljezdane stanice javljaju se usporedo s pojavom žarnjaka (Hwang i sur., 2007). Nematocite nastaju iz nematoblasta i podijeljene su prema funkciji u četiri skupine: penetrante, koje poput harpuna probadaju plijen, glutinante, koje svojom ljepljivošću hvataju plijen, volvente, koji su nalik užetu za hvatanje i ptihociste, koje nalazimo u združnim vrstama. Baterije su nakupine knida koje reagiraju na mehanički i kemijski mehanički podražaj. Živčane stanice su motorne, osjetne i neurosekretorne. Na hipostomu je opisan živčani prsten koji je sličan središnjem živčanom sustavu razvijenijih životinja te je statičan i stabilan u usporedbi s mrežastim živčanim sustavom (Koizumi, 2002).

Mezogleja nije građena od stanica i nalazi se između staničnih slojeva ektoderma i gastroderma. Želatinozne je građe i sadrži kolagen, lipide, proteine i ugljikohidrate. Mezogleja omogućuje prolaz hrane kao i migraciju stanica tijekom regeneracije (Žnidarić, 1970). Nastanku mezogleje doprinose i ektoderm i gastroderm (Zhang i sur., 2005). Voda je sastavni dio mezogleje i to u velikoj količini tako da mezogleja služi i kao potporanj hidri.

Probavnu šupljinu oblaže gastroderm koji se sastoji od gastrodermnih mioepitelnih stanica i zimogenih stanica. Bazalna membrana gastrodermnih mioepitelnih stanica je pričvršćena za mezogleju. U tom dijelu koji graniči s mezoglejom nalaze se kružno postavljena mišićna vlakna čijom se relaksacijom i kontrakcijom hidra opušta ili steže. Membrane apikalnog dijela stanica čine mikrovile koje kontrakcijom povećavaju površinu apsorpcije hrane. Zimogene stanice koje su vrčastog oblika nalaze se tanjim dijelom stanice vezane za mezogleju, a širi im strši u probavnu šupljinu. Sadrže granule ispunjene hidrolitičkim enzimima koje omogućuju izvanstaničnu probavu (Burnett, 1973). Sudjeluju u regeneraciji hidre tako da se dediferenciraju u gastrodermne intersticijske stanice koje se dalje dijele i diferenciraju u druge tipove stanica (Žnidarić, 1971).

### **1.3. Zelena hidra *Hydra viridissima* Pallas i smeđa hidra *Hydra oligactis* Pallas**

Zelena hidra (*Hydra viridissima* Pallas) i smeđa hidra (*Hydra oligactis* Pallas) morfološki i histološki anatomske imaju jednak plan građe. Zelena boja zelene hidre potječe od jednostaničnih algi (rod *Chlorella*) koje su smještene u gastrodermnim mioepitelnim stanicama hidre. U jednoj stanici nalazi se do 20 zelenih algi (Dunn, 1987, Holstein i Emschermann,

1995). Svaka alga nalazi se unutar jedne vakuolske membrane (O'Brien, 1982, Reisser i Wiessner, 1984).

Simbioza (grč. *syń* s, sa, *bíos* život) je dugotrajan tijesan suživot dviju ili više vrsta organizama koji pripadaju različito nazvanim kategorijama i žive u uskom odnosu većinu svog života. Zelena hidra i alga su u simbiotskom odnosu. Smatra se da su upravo simbiotski procesi imali važnu ulogu u postanku raznolikosti živog svijeta i evoluciji višestaničnosti (Margulis i Sagan, 2002). Sudionici te simbioze su bionti, a skup svih bionata određuje holobionta (Margulis, 1993). Hidra-holobiont uključuje najmanje 3 tipa organizma (hidra, bakterije i alge) koji svi dijele dugu koevoluciju i ovise jedan o drugome. Svaka vrsta hidre sadrži specifičnu mikrobnu zajednicu i sposobna ju je održati kroz dulje vremenske periode. Pomoću 16S rRNA-sekvenciranja dobiveni su podaci o dominantnim grupama mikroba za svaku vrstu ispitivanih hidri.

Hidra se koristi produktima fotosinteze koje proizvodi alga, dok alga od hidre dobiva dušikove i sumporove spojeve. Smeđa hidra ne tvori simbiotske odnose za razliku od zelene hidre (Burnett, 1973).

Smatra se da su predadaptacije hidre i alge odgovorne zašto određene vrste uspostavljaju, a druge ne, simbiotske odnose. Javlja se imunosna reakcija interakcijom glikoproteina na površini alge i receptora na hidri. Alge potiču stvaranje endocitoznih mikrovila na stanicama hidre. Nakon endocitoze alge ostaju u gastrodermnim i mioepitelnim stanicama hidre u vakuolama koje se nazivaju simbiosomi. U svakoj vakuoli nalazi se po jedna alga, a točan broj algi po jednoj stanici hidre ovisi o količini dušikovih spojeva koje alga dobiva od hidre. Međusobna interakcija gena hidre i alge je nužno da bi ti organizmi mogli živjeti u simbiozi. Svaka vrsta hidre sadrži specifičnu mikrobnu zajednicu i sposobna ju je održati kroz dulje vremenske periode. Alge su u gastrodermnim mioepitelnim stanicama hidre smještene u perialgalnom prostoru koji ima kiselu pH vrijednost. Taj dio stanice djelomično je odvojen od ostalog dijela stanice citoskeletom. U njemu nema veće intracelularne probave. Alge ispuštaju određenu količinu maltoze koja sprječava fuziju simbiosoma s lizosomima (Douglas, 1994).

Zelena hidra korištena za pokuse je u endosimbozi s algama roda *Chlorella*, razreda *Chlorophyceae* reda *Chlorococcales*. To su jednostanični slatkovodni organizmi koji su pojedinačno u planktonu ili na površini vlažnih objekata. Hidre mogu simbionta steći horizontalnim i vertikalnim prijenosom, što znači od roditelja ili iz okoliša. Vertikalni prijenos se obično događa nespolnim razmnožavanjem, iako moguće i spolnim razmnožavanjem. Oocite se diferenciraju iz grozdova intersticijskih matičnih stanica i razvijaju u jaje koje je pričvršćeno za majku. Simbiotske alge imaju i ulogu u poticanju oogeneze u hidre. Pri spolnom

razmnožavanju mlade jedinke mogu uzeti simbiote iz okoliša. To se događa probavnim putem. Hrane se biljojednim zooplanktonom koji u utrobi sadrži još žive alge. Nedavno je prvi puta pokazano da se endosimbiotske alge iz zelene hidre mogu izolirati i konstantno uzgajati u trajnim stabilnim laboratorijskim kulturama (Kovačević i sur., 2010a). Predloženo je općenito nesistematsko zajedničko ime za sve simbiotske zelene alge *Chlorella zagrebiensis* grupa Kovac. & Jelen. (Kovačević i sur., 2010a). U usporedbi sa slobodnoživućim srodnim algama, izolirane alge znatno su slabije prilagođene novonastalim uvjetima mikrookoliša. Ova činjenica upućuje na nedovršeni proces simbiogeneze između hidre i algalnog simbionta (Kovačević i sur., 2010b).

Endosimbioza hidre i alge govori u prilog endosimbiotskoj teoriji nastanka eukariotske stanice. Prema toj teoriji, plastidi, mitohondriji, a možda i bičevi razvili su se od bakterija koje su živjele u simbiozi s nekim jednostaničnim organizmom s jezgrom. Tijekom evolucije simbionti su izgubili samostalnost i dio njihovog genetičkog materijala je prenesen u jezgru domaćina. Dokaz ove teorije nalazimo u sličnosti bakterijske DNA s mitohondrijskom i kloroplastnom, postojanju enzima respiratornog lanca u membranama mitohondrija i kloroplasta i sličnosti bakterijskih, mitohondrijskih i kloroplastnih ribosoma. Kloroplasti i mitohondriji su kao i bakterije osjetljivi na antibiotike i druge ksenobiotike (Krajčović i sur., 1989)

#### **1.4. Norflurazon**

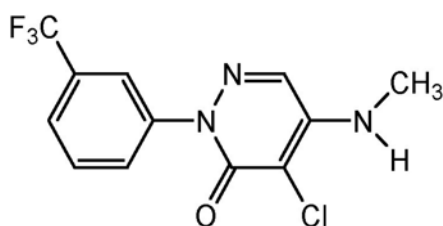
Pesticidi (lat. *pestis* štetnik, *caedere* ubiti) su prirodna ili sintetska sredstva kojima se ubijaju biljni ili životinjski nametnici na bazi selektivne toksičnosti. Njihovom upotrebom dobiva se bolji i kvalitetniji urod, međutim mnogi toksičnom djeluju na žive organizme. Nakon određenih neželjenih posljedica poput izazivanja alergijskih reakcija, citotoksičnosti, mutagenih i kancerogenih djelovanja, danas se svaki pesticid provjerava na test organizmu i utvrđuje srednja letalna doza, LD<sub>50</sub>. LD<sub>50</sub> je koncentracija nekog spoja po 1 kg tjelesne mase koja izaziva smrtnost u 50% tretiranih organizama (Erben i Lajtner, 1995). Direktivom 98/83 Europske komisije propisuje se koncentracija pojedinog pesticida u vodi za piće na 0,1 µg/L, a ukupna koncentracija svih pesticida na 0,5 µg/L. (Petrović i sur., 2013)

Herbicidi (lat. *herba* trava) su pesticidi koji služe za uništavanje korovnih biljaka i parazitskih cvjetnica. Kemijske su supstance organske ili anorganske. Mogu uništavati sve biljke ili samo određene vrste. Prema načinu djelovanja mogu biti kontaktni ili sistemski. Kontaktne herbicide razaraju dio biljke s kojim dođu u kontakt, a sistemski se apsorbiraju i prenose kroz biljku provodnim putevima, a svojim djelovanjem izazivaju fiziološke i morfološke promjene koje dovode do uginuća biljke (Barić i Ostojić, 2017). Mehanizam

djelovanja može biti narušavanje biokemijske ravnoteže biljaka, kočenje fotosinteze, inhibiranje sinteze neophodnih spojeva za rast i razvoj. Herbicidi dopijevaju u ekosustave, radi čega je bitno poznavati njihova toksična svojstva i istražiti njihovu štetnost za živi svijet .

Norflurazon je organski herbicid, po kemijskom sastavu derivat piridazina, odnosno piridazinona kemijske formule  $C_{12}H_9ClF_3N_3O$  (4-kloro-5-metil-2-( $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro/*m*/tolil)-3(2H)-piridazinon) (Slika 3). Molekulska masa norflurazona iznosi 303,54 g/mol, talište mu je na 177 +/- 3°C. Slabo je topljiv u vodi, a bolje u etanolu. Stabilan je u razrijeđenim kiselim ili bazičnim otopinama. Relativno je slabo pokretljiv u mineralnim tlima, slabije u tlima s puno organske tvari (Savin i Amador, 1998). Vrijeme poluraspada iznosi 38-731 dan. Zbog takvih osobina postoji opasnost da dospije u podzemne vode. Zabilježeni su takvi slučajevi u SAD-u (Thurman i sur., 2000).

Do sada su provedena brojna istraživanja ovog herbicida na raznim organizmima te je utvrđena njegova niska III kategorija toksičnosti (Maceljski i sur. 1997, Horvat i sur.. 2005). Akutna oralna doza LD<sub>50</sub> za štakora je 9 g/kg. Ne iritira kožu i oči, ali kod tretiranih životinja uzrokuje znatno povećanje jetre i štitnjače. Zbog rezultata na testovima toksičnosti norflurazon je klasificiran kao mogući ljudski kancerogen. Za vodene organizme utvrđeno je da je slabo do umjereno toksičan. Maksimalna dozvoljena doza norflurazona za čovjeka od 60 kg je 0,225 mg/dan (www.pmep.cce.cornell.edu).



**Slika 3.** Kemijska formula norflurazona (www.pmep.cce.cornell.edu)

## 1.5. UVB-zračenje

Sunčeva svjetlost sastoji se od ultraljubičastih ili UV-zraka, vidljivog spektra ili VIS te infracrvenog ili IR-a. Umjereno izlaganje suncu ima povoljan učinak na ljudski organizam jer potiče složeni mehanizam tvorbe vitamina D3. UVB-zračenje se koristi za liječenje kožnih bolesti, kao što je psorijaza (Čeović, 2008). Sunce je prirodni izvor UVB-zračenja, a ono se

može proizvoditi i različitim lampama. Prema valnim duljinama dijeli se u: UVA-zračenje (320-400 nm), UVB-zračenje (290-320nm) i UVC-zračenje (160-290nm). UVA-zračenje prodire u kožu, oštećujući stanice, ubrzano stari kožu te potiče većinu fotodinamskih reakcija. UVB-zračenje izaziva nakon 12 do 24 h crvenilo kože koje potiče tvorbu melanina oslobađajući tirozinazu, enzym važan za tvorbu melanina, a može izazvati i rak kože zbog oštećenja gena za obnovu stanica kože, odnosno ima mutageno djelovanje. Mutageni su tvari koje izazivaju mutacije, a UVB- zračenje je fizički mutagen. Izravno oštećuje DNA stvarajući pirimidinske dimere i 6-4 fotoprodukt. Neizravno djelovanje UVB-zračenja može prouzročiti upale, oksidacijski stres, deregulaciju staničnih signalnih puteva, imunosupresiju i kao krajnji rezultat rak kože.

Timinski dimeri se popravljaju mehanizmom foto reaktivacije kod bakterija, dok se kod čovjeka popravljaju mehanizmom izrezivanja.

UV-zračenje kod hidri izaziva oštećenja u području lovki, hipostoma i gastralne regije (Lui i Žnidarić, 1973, Kalafatić i sur., 2003).

## 1.6. Evolucija tumora

Tumor je nakupina stanica nekontroliranog rasta bez fiziološke funkcije. Tumori mogu biti benigni ili maligni. Maligni tumori su pronađeni kod gotovo svih organizama, pa tako i kod hidri (Domazet-Lošo i sur., 2014.). Onkogeni su geni uključeni u nastanak tumora. Nastaju mutacijom protoonkogeni, gena odgovornih za proliferaciju i rast stanice. Jedan od poznatih i dobro istraženih onkogeni je *MYC*. Mutirani oblik ovog gena nađen je kod mnogih malignih bolesti. Homolog gena *Myc* nađen je kod hidre i to geni *Myc1* i *Myc2* (Hartl i sur., 2014).

Dovoljna je jedna stanica u kojoj se dogode mutacije i koja izmakne mehanizmu kontrole staničnog ciklusa, kontaktne inhibicije i apoptotskim mehanizmima te počne proliferirati. Geni uključeni u uklanjanje takvih stanica zovu se tumor supresori i najpoznatiji je *TP53*. Mutacije u tumor supresorima također dovode do nastanka tumora. Nastanak tumora je u većini slučajeva dugotrajan proces koji ovisi o nestabilnosti genoma ali i o epigenetičkim čimbenicima. Metastaze odnosno stanice raka koje su se odvojile od matičnog tumora i krvotokom došle do zdravog organa te tamo započele nastanak novog tumora razlog su radi čega su maligni tumori jedan od glavnih uzroka smrtnosti u čovjeka.

## 1.7. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja ovog diplomskog rada bio je istraživanje učinka izlaganja hidri UVB-zračenju i/ili norflurazonu koji potencijalno mogu prouzročiti izrasline na njihovom tijelu. U istraživanju su za eksperimentalne životinje korištene dvije vrste hidri, simbiotska zelena hidra (*Hydra viridissima*) i nesimbiotska smeđa hidra (*Hydra oligactis*). Također sam željela utvrditi je li UVB-zračenje i tretman norflurazonom sinergistički izazivaju veća oštećenja DNA i organizma ili smrtnost hidri nego kad su izložene samo jednom od njih. Cilj je istražiti i suživot dviju vrsta hidri kada su zajedno izložene UVB-zračenju i/ili norflurazonu i postojanje razlika u njihovom ponašanju u odnosu na ponašanje kad je svaka vrsta obrađena posebno. Također je i cilj istražiti dolazi li do promjena u ponašanju ili morfoloških promjena ovih dviju vrsta hidri kada su tretirane sa UVB-zračenjem i/ili norflurazonom u prisutnosti algi, slobodnoživuće *Chlorella vulgaris* (CV) i izolirane endosimbiotske alge iz zelene hidre *Mychonastes homosphaera* (CZ10). Uz analize morfoloških promjena hidri, iz njih bi se pokušao umnožiti gen *Myc* metodom lančane reakcije polimerazom.



## 2. MATERIJAL I METODE

### 2.1. Materijal

Eksperimentalne životinje koje su korištene su zelena hidra (*Hydra viridissima* Pallas, 1766) i smeđa hidra (*Hydra oligactis* Pallas, 1766). Smeđa hidra uzorkovana je u jezerima u park šumi Maksimir dok je zelena hidra iz kulture na Zoologijskom zavodu PMF-a korištena za ovaj pokus. Životinje su uzgajane u laboratorijskim uvjetima od 22,4 °C pri dnevnom svjetlu. Čuvane su u aeriranoj vodi i hranjene ličinkama raka vrste *Artemia salina*. Tijekom izvođenja pokusa životinje nisu bile hranjene. Slobodnoživuće alge *Chlorella vulgaris* (CV) i endosimbiotske alge *Mychonastes homosphaera* (CZ10) su uzorkovane iz kulture na Zoologijskom zavodu PMF-a.

### 2.2. Metode

Hidre su obrađene norflurazonom u posudicama volumena 60 ml s 50 ml otopine norflurazona koncentracija  $2 \times 10^{-6}$  mol/L ili  $2 \times 10^{-7}$  mol/L. Kontrolna skupina je uzgajana u 50 ml akvarijske vode. U svaku posudu stavljeno je po 10 jedinki posebno zelene, posebno smeđe i po pet jedinki od svake vrste zajedno. Sve jedinke su ozračene UVB-zračenjem valne dužine 254 nm energije  $0,023 \text{ mW/cm}^2$  2 minute. Drugi dio pokusa napravljen je na isti način samo što hidre nisu zračene. Pokusi su izvedeni u triplicatu i hidre su praćene kroz tri dana. Pokus je izvođen i sa hidrama uz prisustvo algi i to tako da je po pet jedinki svake vrste hidri posebno stavljeno u posudu koja je napunjena s 50 ml akvarijske vode u kontrolnoj skupini ili otopinama norflurazona koncentracija  $2 \times 10^{-6}$  mol/L ili  $2 \times 10^{-7}$  mol/L. U posude gdje su obje vrste hidri bile zajedno stavljeno je po dvije jedinke od svake vrste i također napunjeno s 50 ml akvarijske vode ili identične koncentracije norflurazona. U svaku posudu je stavljena ekvivalentna količina slobodnoživuće alge *Chlorella vulgaris* (CV) ili endosimbiotske alge *Mychonastes homosphaera* (CZ10) ili obje alge zajedno. Svi uzorci su ozračeni UVB-zračenjem valne dužine 254 nm i energije  $0,023 \text{ mW/cm}^2$  2 minute. Pokus je napravljen još jednom sa istom količinom hidri i algi, ali bez zračenja. Kontrolni uzorci su bile hidre sa obje vrste algi posebno ili zajedno koje nisu bile tretirane norflurazonom ni zračene. Hidre su promatrane kroz tri dana (Tablica 1).

**Tablica 1.** Oznake uzoraka korištene tijekom pokusa

<b>Puni naziv uzorka</b>	<b>Oznaka uzorka</b>
Zelena hidra - kontrolni uzorak	ZK
Smeđa hidra - kontrolni uzorak	SK
Zelena i smeđa hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici	ZSK
Zelena hidra - zračena	ZR
Smeđa hidra - zračena	SR
Zelena i smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen	ZSR
Zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije $2 \times 10^{-7}$ mol/L	Z7
Smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije $2 \times 10^{-7}$ mol/L	S7
Zelena i smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije $2 \times 10^{-7}$ mol/L	ZS7
Zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije $2 \times 10^{-7}$ mol/L i zračena	Z7R
Smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije $2 \times 10^{-7}$ mol/L i zračena	S7R
Zelena i smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije $2 \times 10^{-7}$ mol/L i zračen	ZS7R
Zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije $2 \times 10^{-6}$ mol/L	Z6
Smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije $2 \times 10^{-6}$ mol/L	S6
Zelena i smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretirane norflurazonom koncentracije $2 \times 10^{-6}$ mol/L	ZS6
Zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije $2 \times 10^{-6}$ mol/L i zračena	Z6R
Smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije $2 \times 10^{-6}$ mol/L i zračena	S6R
Zelena i smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije $2 \times 10^{-6}$ mol/L i zračen	ZS6R
Slobodnoživuće alge <i>Chlorella vulgaris</i>	CV
Endosimbiotske alge <i>Mychonastes homosphaera</i> (CZ10)	CZ10
Slobodnoživuće alge <i>Chlorella vulgaris</i> i endosimbiotske alge <i>Mychonastes homosphaera</i> (CZ10)	CVCZ10

### 2.3. Morfološke promjene

Tijekom izvođenja pokusa životinje su promatrane pomoću svjetlosne lupe i to migracija hidri u eksperimentalnoj posudi, odgovor na mehanički podražaj mehaničkom iglicom, izgled tijela odnosno kontrahirani i relaksirani oblik, oštećenost lovki, nespolno (pupanje) i spolno razmnožavanje i smrtnost. U posudicama sa algama praćena je i boja otopine odnosno prisutnost i prisutnost nakupina algi u posudicama. Morfološke promjene i promjene u ponašanju eksperimentalnih životinja praćene su pomoću laboratorijske lupe.

### 2.4. Morfometrija

U biologiji se različiti test organizmi, beskralježnjaci i kralježnjaci, koriste za istraživanja i na njima se provode morfometrijska istraživanja. Ovom metodom moguće je mjeriti površinu stanica, njihovu širinu, dužinu, volumen i ostale stanične parametre. Najnoviju

primjenu morfometrije nalazimo u istraživanju simbiotskih odnosa (Handa i sur., 2006, Kovačević i sur., 2005, Muller-Parker i Pardy, 1987)

## 2.5. Histološke promjene

Histološke promjene izazvane tretmanom hidri analizirane su promatranjem pod svjetlosnim mikroskopom. Hidre su stavljene u Bouinov fiksativ za izradu histoloških preparata (15 ml zasićene vodene otopine pikrinske kiseline, 5 ml 40% formalina i 1 ml ledene octene kiseline), a zatim uklopljen u paraplast. Uklopljene jedinke rezane su pomoću mikrotoma na rezove debljine 4  $\mu\text{m}$ . Paraplast je uklonjen inkubacijom u ksilolu te su dehidrirani u seriji alkohola od višeg prema nižem (100%, 90%, 80%, 70%) do destilirane vode (3 x 10 min).

Nakon ispiranja u tekućoj vodi, rezovi su dehidrirani u rastućoj seriji alkohola (70%, 80%, 90% i 100%), prosvijetljeni u ksilolu 2 x 15 min. Preparati su obojani hemalaun eozinom i uklopljeni u »Kanada balzam«. Za snimanje mikrografa histoloških preparata korištena je digitalna kamera povezana s mikroskopom Olympus.

Morfometrija mezogleje je izvedena pomoću računalnog programa ImageJ dostupnog na internet adresi [www//imagej.nih.gov/ij](http://imagej.nih.gov/ij). Napravljeno je po 30 mjerenja mezogleje na odsječku dužine 100  $\mu\text{m}$ . Također su izbrojane stanice ektoderma i gastroderma, zimogene stanice, intersticijske stanice i žarne stanice u pet odsječaka dužine 100  $\mu\text{m}$

## 2.6. Izolacija DNA

Iz svih uzoraka hidri izolirana je DNA. Hidre su stavljene u Eppendorf epruvetu ( $V=1,5$  ml) i centrifugirane 300 rpm 5 min. Na talog je dodano 500  $\mu\text{l}$  destilirane vode i uzorak je kratko ispran. Nakon toga je uzorak centrifugiran 300 rpm 5 min., a na talog je dodano 100  $\mu\text{l}$  digestijskog pufera (50 mM Tris-pH 8.5, 1mM EDTA, 0,5% Tween 20) Hidre su macerirane laboratorijskom iglicom i dodano je 4  $\mu\text{l}$  otopine proteinaze K. Uzorci su inkubirani preko noći u termobloku na 37 °C, uz protresanje (300 rpm). Sljedeći dan kratkim centrifugiranjem epruveta talog je spušten na dno epruveta. Uzorak je zatim inkubiran 8 min na 95 °C da se inaktivira proteinaza K. Još jednom je uzorak kratko centrifugiran i nakon toga pohranjen na +4 °C. Iz pohranjenog uzorka izmjerena je koncentracija i određena čistoća izolirane DNA korištenjem spektrofotometrijskog uređaja NanoVue (GE Healthcare Life. Sciences, SAD) mjerenjem valnih duljina 260 i 280 i određivanjem njihovog omjera.

## 2.7. Lančana reakcija polimerazom i gel elektroforeza

Lančana reakcija polimerazom (PCR, od eng. *Polymerase Chain Reaction*) korištena je za umnažanje gena *Myc1* i *Myc2* kao pripreme za određivanje promjena u njihovim sekvencijama nakon opisanih tretmana. Potencijalne promjene detektirale bi se sekvenciranjem druge generacije u servisnoj ustanovi.

Za izradu početnica korištena je sekvencija referentnog genoma vrste *Hydra vulgaris* iz genske baze podataka GenBank koja se nalazi na internet adresi [www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/) (Tablica 2)

**Tablica 2.** Parovi početnica za umnožavanje gena *Myc1* i *Myc2* metodom lančane reakcije polimerazom.

		uzvodna početnica (5'→3')	nizvodna početnica (5'→3')	duljina fragmenta (pb)
<i>Myc1</i>	1.par	TCGAACGTTTTGTGTTGCAG	CATAACACATGCGCTCACGAA	2386
	2.par	TTTCGAACGTTTTGTGTTGCAG	GCTCACGAACAGGTTCCAAT	2376
	3.par	GTTTTGTGTTGCAGTGATGGT	CATGCGCTCACGAACAGGT	2373
	4.par	AACGTTTTGTGTTGCAGTGATG	CATGCGCTCACGAACAGG	2376
<i>Myc2</i>	1.par	ATTTGCGGAGTTCCCTGA	GCAAGAGACAAAAAGCGGGG	2680
	2.par	CCTCGAGCAGCGTATTTTCG	ACCCATCAAAGGCGGGAAAT	2921
	3.par	TGCGGAGTTCCCTGAATAG	AGCAAGAGACAAAAAGCGGG	2678
	4.par	GCGGAGTTCCCTGAATAGA	AAAGTGCACGTAAGTACC	2866
	5.par	TATTTGCGGAGTTCCCTGA	CAAAGGCGGGAAATCGAACT	2652
	6.par	AGATCCTCGAGCAGCGTATTT	TCAAAGGCGGGAAATCGAACT	2920
	7.par	CCAGCGTGGAAGTGGATACAG	CACCCATCAAAGGCGGGAA	2945
	8.par	TATTTGCGGAGTTCCCTGAA	CAAAGGCGGGAAATCGAACTT	2652
	9.par	TTATTTGCGGAGTTCCCTGA	TTATTTGCGGAGTTCCCTGA	2663
	10.par	CCTCGAGCAGCGTATTTTCGT	GGAACACCCATCAAAGGCGG	2926

Ukupni volumen reakcijske smjese za jedan uzorak je bio 15 µL. Korišteno je 7,5 µL komercijalno dostupne reakcijske smjese polimeraze, pufera, početnica, dNTP-a i boje potrebne za nanošenje uzoraka na gel (EmeraldAmp GT PCR Master Mix, TaKaRa), 1 µL DNA, i po 0,3 µL svake početnice jednoga para. U reakciji PCR korištena je negativna kontrola koja je sadržavala sve dijelove reakcijske smjese osim kalupa DNA. Uvjeti na kojima se odvijala reakcija PCR bili su: 98 °C tijekom 2 min, 40 ciklusa denaturacije na 98 °C tijekom 10 sek., prijanjanja početnica na temperaturama 50, 52, 54, 55 i 56 °C te elongacije na 72 °C tijekom 2,5 min. Nakon završne elongacije na 72 °C tijekom 5 min, umnoženi uzorci pohranjeni su na +4 °C do nanošenja na agarozni gel.

Korištena je i reakcijska smjesa ukupnog volumena 25  $\mu\text{L}$ , koja je sadržavala 2,5  $\mu\text{L}$  pufera AmpliTaqGloD-polimeraze, 2  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 0,5  $\mu\text{L}$  dNTP-ova (10 mM), po 1  $\mu\text{L}$  svake početnice pojedinog para, 0,25  $\mu\text{L}$  AmpliTaqGloD-polimeraze (ThermoFisherScientific, SAD), 17  $\mu\text{L}$  pročišćene destilirane vode i 2  $\mu\text{L}$  DNA-kalupa. Reakcijski uvjeti za ovu smjesu bili su: 95°C tijekom 5 min, 40 ciklusa denaturacije na 95 °C tijekom 30 sek, prijanjanja početnica na temperaturama 50, 52, 54, 55 i 56 °C te elongacije na 72 °C tijekom 2,5 min . Nakon završne elongacije na 72 °C tijekom 10 min, umnoženi uzorci pohranjeni su na +4 °C do nanošenja na agarozni gel.

## **2.8. Gel elektroforeza**

Uspješnost reakcije PCR provjeravana je elektroforezom u 2% agaroznom gelu. Gel se priredio tako da se izvagala agarozna i otopila u 1xTAE puferu. Agarozni gel se stavio u uređaj za elektroforezu. Uređaj za elektroforezu se spojio na protok struje 120 mV 30 min. Rezultati su bili vizualizirani pomoću UV-lampe.

## 3. REZULTATI

### 3.1 Morfološke promjene zelene i smeđe hidre

Zelena hidra (*Hydra viridissima*) i smeđa hidra (*Hydra oligactis*) obrađene su norflurazonom koncentracija  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i UVB-zračenjem. Morfološke promjene su praćene prvi dan pokusa nakon 24, 48 i 72 sata od početka pokusa. Promjene su praćene u posudicama sa svakom vrstom hidri posebno i u zajedničkoj posudici gdje su bile obje vrste hidri. Pokus je na isti način rađen i sa slobodnoživućom algom vrste *Chlorella vulgaris* (CV) i simbiotskom algom vrste *Mychonastes homosphaera* (CZ10) i kombinacijom ove dvije vrste (CVCZ10).

#### 3.1.1. Migracija

Kontrolni uzorci su bili pri dnu posudice na početku pokusa i svako odstupanje od tog položaja je praćeno kao migracija hidri.

**Prvog dana** pokusa je prema površini migriralo 3% jedinki kontrolnog uzorka smeđe hidre i 3% uzorka smeđe hidre koje su zraćene. U ostalim uzorcima tretiranim s obje koncentracije norflurazona i/ili zraćenim nije bilo migracija.

U uzorcima s dodatkom alge CV je prema površini migriralo 40% jedinki kontrolnog uzorka smeđe hidre, 100% uzorka zelene hidre i 80% smeđe hidre tretiranog norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L. U uzorcima s dodatkom algi CVCZ10 je prema površini migriralo 60% jedinki kontrolnog uzorka zelene hidre.

**Drugog dana** pokusa je prema površini migriralo 60% jedinki kontrolnog uzorka smeđe hidre, 13% kontrolnog uzorka smeđe hidre u miješanom uzorku i 6% uzorka smeđe hidre koje su zraćene, dok je u uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L prema površini migriralo je 53% jedinki uzorka smeđe hidre i 10% smeđe hidre u miješanom uzorku. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zraćenima je prema dnu posudice migriralo 3% jedinki smeđe hidre. U uzorcima više koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L je prema površini migriralo 56% jedinki uzorka smeđe hidre te 3% zelene hidre i 43% smeđe hidre u miješanom uzorku, a prema dnu je migriralo 3% jedinki smeđe hidre.

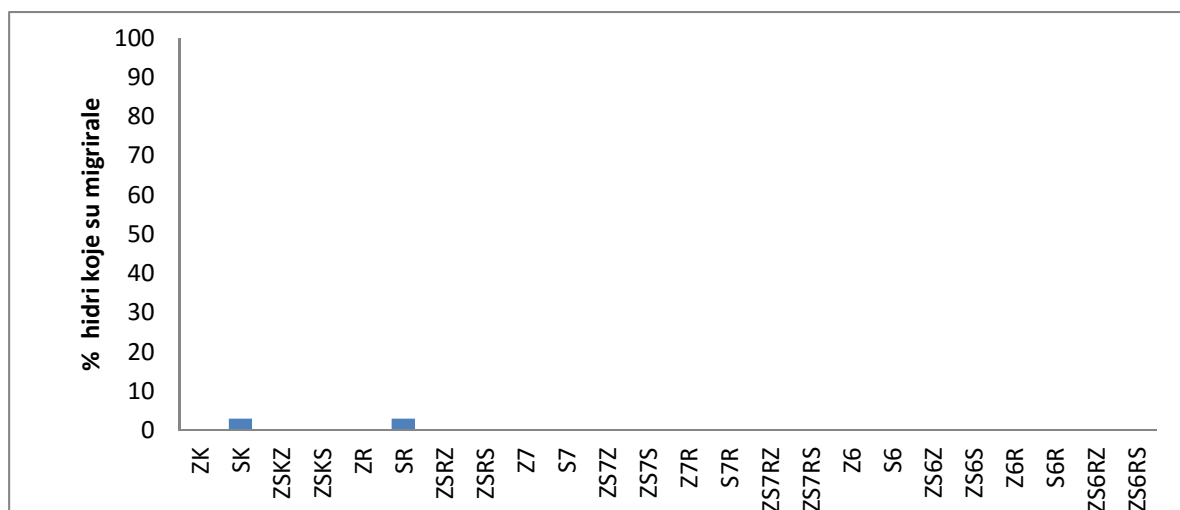
Uz dodatak alge CZ10 je prema površini migriralo 25% jedinki kontrolnog uzorka smeđe hidre u miješanom uzorku, 100% uzorka zelene hidre tretirane norflurazonom

koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i 80% uzorka zelene hidre tretirane norflurazonom koncentracijom  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračeno.

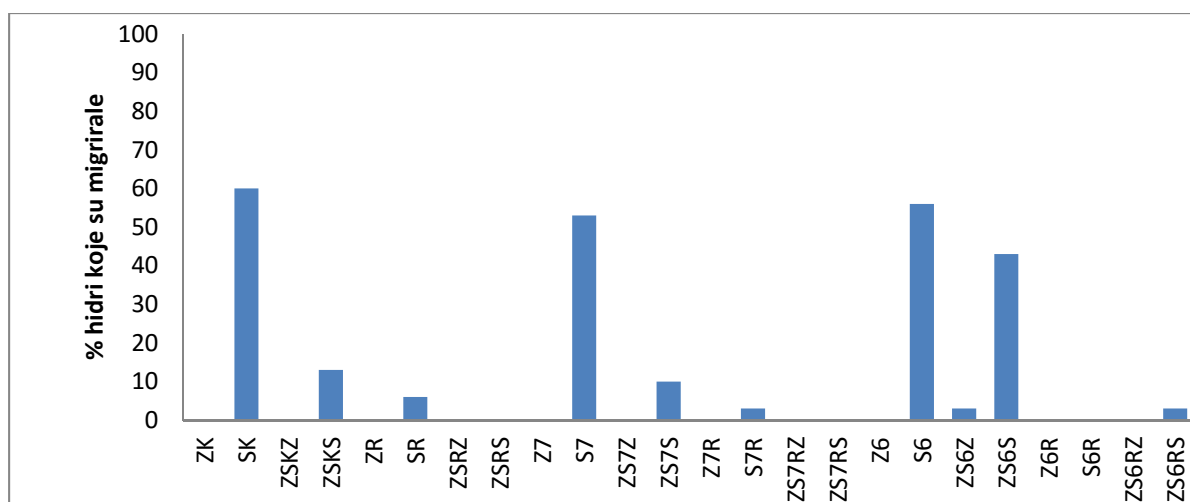
**Trećeg dana** je prema površini migriralo 56 % jedinki kontrolnog uzorka smeđe hidre i 13% jedinki zelene hidre u miješanom uzorku, dok je prema dnu migriralo 16% uzorka smeđe hidre koje su zračene i 16% smeđe hidre koje su zračene u miješanom uzorku. Hidre na dnu su bile okružene sa sluzi.

U uzorcima tretiranim norflurazonom niže koncentracije je prema površini migriralo 40% uzorka smeđe hidre te 10% zelene i 16% smeđe hidre u miješanom uzorku, a u kombinaciji sa zračenjem je prema dnu migriralo 13% uzorka smeđe hidre te 10% zelene i 10% smeđe hidre u miješanom uzorku. U uzorcima tretiranim norflurazonom više koncentracije je prema dnu migriralo 16% uzorka zelene hidre i 80% smeđe hidre te 13% zelene i 20% smeđe hidre u miješanom uzorku, dok je u kombinaciji sa zračenjem prema dnu migriralo 50% smeđe hidre i 16% smeđe hidre u miješanom uzorku, a hidre na dnu su bile okružene sa sluzi.

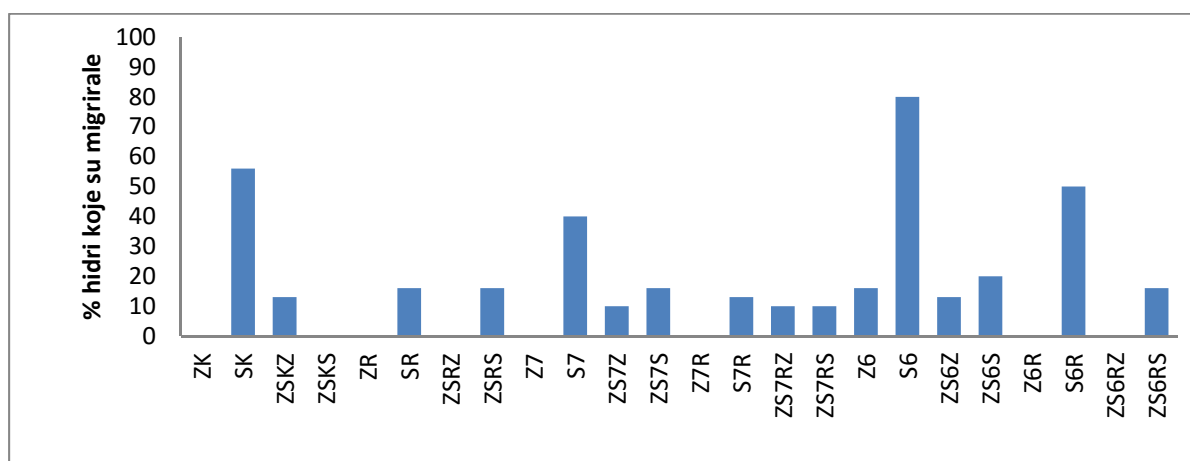
U uzorcima s dodatkom alge CV je prema površini migriralo 100% kontrolnog uzorka smeđe hidre, dok je u uzorcima s dodatkom alge CZ10 prema površini migriralo 100% uzorka zelene hidre tretirane norflurazonom niže koncentracije i 100% zelene hidre tretirane norflurazonom više koncentracije (Slike 4 i 5).



a)



b)

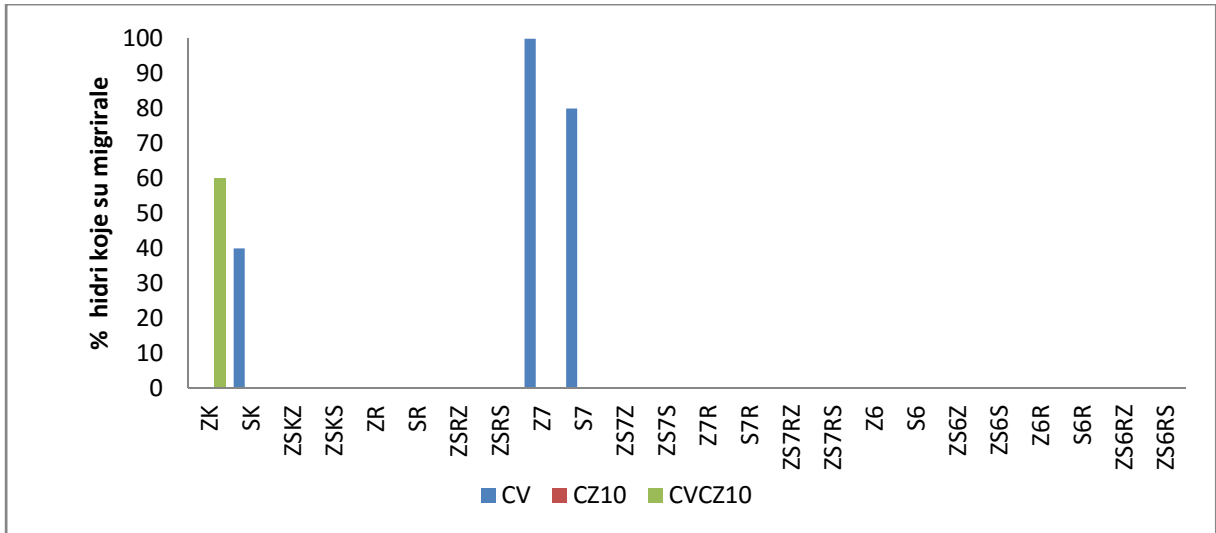


c)

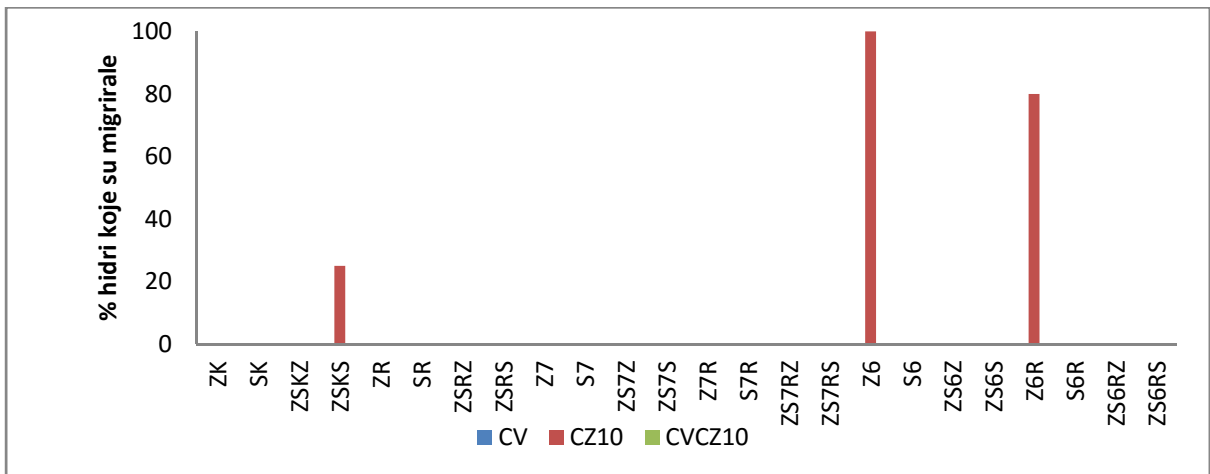
**Slika 4.** Migracija zelene i smeđe hidre a) prvog, b) drugog i c) trećeg dana pokusa nakon obrade norflurazonom i UVB-zračenjem.

ZK - zelena hidra - kontrolni uzorak, SK - smeđa hidra - kontrolni uzorak, ZSKZ - zelena hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, ZSKS - smeđa hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, ZR - zelena hidra - zračena, SR - smeđa hidra - zračena, ZSRZ - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, ZSRS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, Z7 - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, S7 - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7Z - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7S - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, Z7R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, S7R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, ZS7RZ - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, ZS7RS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, Z6 - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, S6 - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6Z - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretirane norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6S - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, Z7R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, S6R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, ZS6RZ - zelena - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen, ZS6RS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen

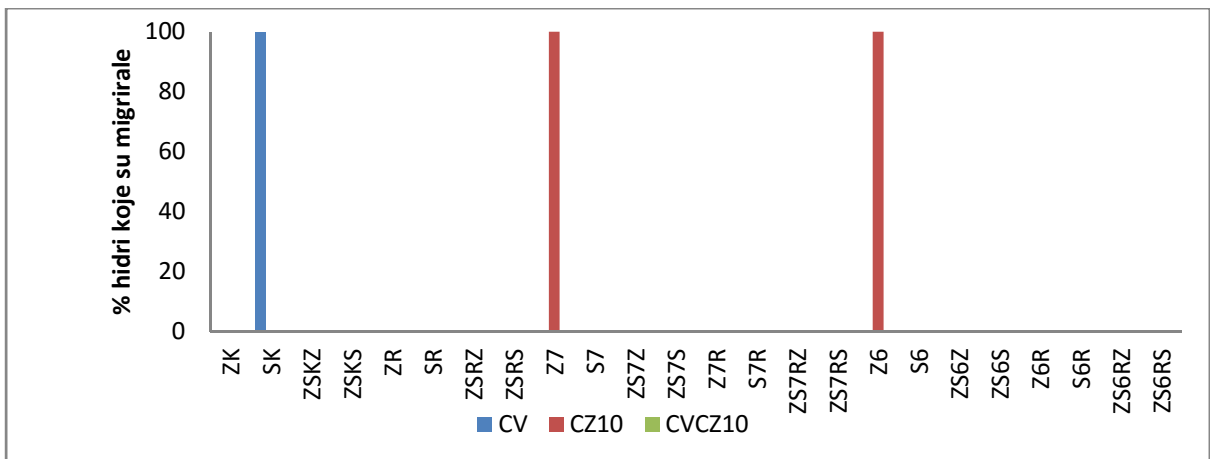




a)



b)



c)

## Slika 5. Migracija zelene i smeđe hidre s dodatkom algi a) prvog, b) drugog i c) trećeg dana pokusa nakon obrade norflurazonom i UVB-zračenjem.

ZK - zelena hidra - kontrolni uzorak, SK - smeđa hidra - kontrolni uzorak, ZSKZ - zelena hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, ZSKS - smeđa hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, ZR - zelena hidra - zračena, SR - smeđa hidra - zračena, ZSRZ - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, ZSRS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, Z7 - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, S7 - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7Z - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7S - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, Z7R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, S7R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, ZS7RZ - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, ZS7RS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, Z6 - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, S6 - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6Z - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretirane norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6S - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, Z7R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, S6R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, ZS6RZ - zelena - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen, ZS6RS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen, CV - slobodnoživuće alge *Chlorella vulgaris*, CZ10 - endosimbiotske alge *Mychonastes homosphaera* (CZ10), CVCZ10 - slobodnoživuće alge *Chlorella vulgaris* i endosimbiotske alge *Mychonastes homosphaera* (CZ10)

### 3.1.2. Nesporno razmnožavanje (pupanje)

Kod hidri obrađenim norflurazonom i zračenjem pratila se pojava pupova.

**Prvog dana** pokusa je pupalo 10% jedinki kontrolnog uzorka zelene hidre i 3% kontrolnog uzorka zelene hidre u miješanom uzorku, te 3% smeđe hidre u miješanom uzorku koji je zračen.

U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L je pupalo 10% zelene, 3% smeđe hidre te 3% zelene i 3% smeđe hidre u miješanom uzorku. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračenim je pupalo 10% jedinki zelene, 3% smeđe hidre te 3% zelene i 3% smeđe u miješanom uzorku. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L je pupalo 10% zelene hidre i 3% smeđe hidre u miješanom uzorku. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračenima je pupalo 13% jedinki zelene hidre, 6% smeđe hidre i 6% smeđe hidre u miješanom uzorku.

U uzorcima s dodatkom alge *Chlorella vulgaris* (CV) je pupalo 25% jedinki kontrolnog uzorka smeđe hidre u miješanom uzorku i 100% smeđe hidre u zračenom uzorku, u uzorku tretiranom norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L je pupalo 50% smeđe hidre u miješanom uzorku, a u uzorku tretiranom norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L je pupalo 20% jedinki smeđe hidre. U uzorcima s dodatkom alge *Mychonastes homosphaera* (CZ10) je pupalo 80% jedinki kontrolnog uzorka smeđe hidre, a u uzorcima tretiranima norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L je pupalo 60% jedinki u uzorku smeđe hidre. U uzorcima s dodatkom obiju vrsta algi je pupalo 40% jedinki kontrolnog uzorka smeđe hidre, 25% kontrolnog uzorka smeđe hidre u miješanom uzorku i 20% smeđe hidre u zračenom uzorku, dok je uzorcima tretiranima norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L pupalo 20% jedinki smeđe hidre, a u uzorcima

tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračenim je pupalo 25% jedinki smeđe hidre u miješanom uzorku. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L je pupalo 40% jedinki zelene hidre, 40% smeđe hidre te 25% smeđe hidre u miješanom uzorku, a u kombinaciji sa zračenjem je pupalo 25% smeđe hidre u miješanom uzorku.

**Drugog dana** pokusa je pupalo 6% jedinki kontrolnog uzorka smeđe hidre i 3% kontrolnog uzorka smeđe hidre u miješanom uzorku. U zračenim uzorcima je pupalo 16% uzorka smeđe hidre, 3% zelene i 10% smeđe hidre u miješanom uzorku.

U uzorcima tretiranim nižom koncentracijom norflurazona je pupalo 6% jedinki zelene hidre i 3% smeđe hidre u miješanom uzorku, a pri nižoj koncentraciji u kombinaciji sa zračenjem je pupalo 6% jedinki zelene i 6% smeđe hidre, te 10% zelene i 10% smeđe hidre u miješanom uzorku. U uzorcima tretiranim višom koncentracijom norflurazona je pupalo 3% zelene hidre, te 3% zelene i 10% smeđe hidre u miješanom uzorku, dok je u kombinaciji sa zračenjem je pupalo 16% jedinki zelene hidre, 16% smeđe hidre, te 6% smeđe hidre u miješanom uzorku.

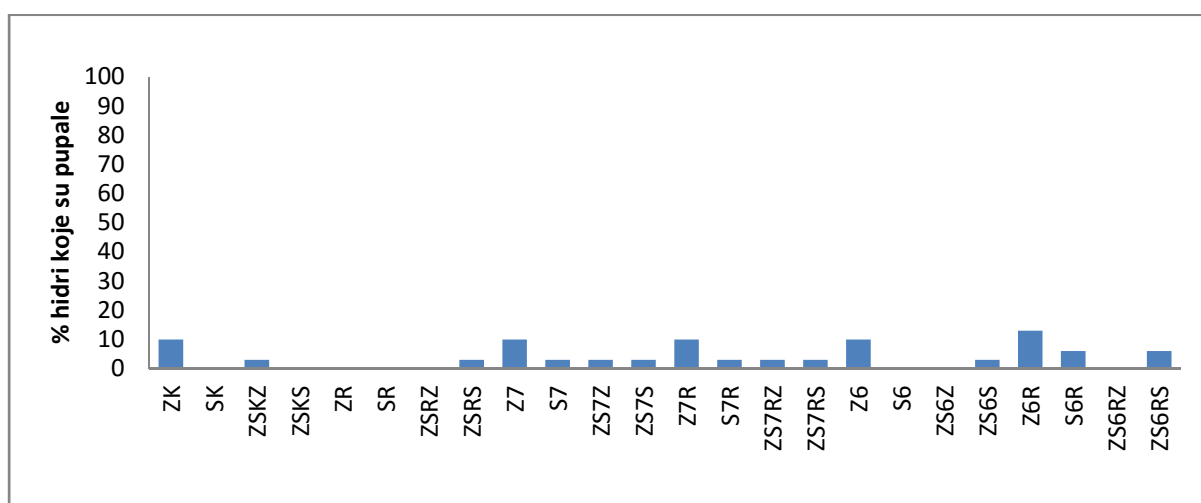
U uzorcima s dodatkom alge CV je pupalo 40% jedinki kontrolnog uzorka smeđe hidre i 50% kontrolnog uzorka smeđe hidre u miješanom uzorku. U zračenim uzorcima je pupalo 100% jedinki smeđe hidre i 50% smeđe hidre u miješanom uzorku. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L je pupalo 50% jedinki smeđe hidre u miješanom uzorku. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L je pupalo 20% jedinki smeđe hidre. U uzorcima s dodatkom alge CZ10 je pupalo 100% jedinki u kontrolnom uzorku smeđe hidre. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L je pupalo 80% jedinki smeđe hidre. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračenim je pupalo 20% jedinki smeđe hidre. U uzorcima s dodatkom algi CVCZ10 zajedno je pupalo 40% kontrolnog uzoraka smeđe hidre i 25% smeđe hidre u miješanom uzorku. U zračenim uzorcima je pupalo 20% smeđe hidre i 50% smeđe hidre u miješanom uzorku. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L je pupalo 20% jedinki smeđe hidre. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračenim je pupalo 25% jedinki smeđe hidre u miješanom uzorku. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L je pupalo 40% jedinki zelene hidre.

**Trećeg dana** pokusa je pupalo 3% jedinki kontrolnog uzorka zelene hidre i 16% smeđe, te 3% smeđe hidre u miješanom uzorku. U zračenim uzorcima je pupalo 10% jedinki smeđe hidre i 10% smeđe hidre u miješanom uzorku.

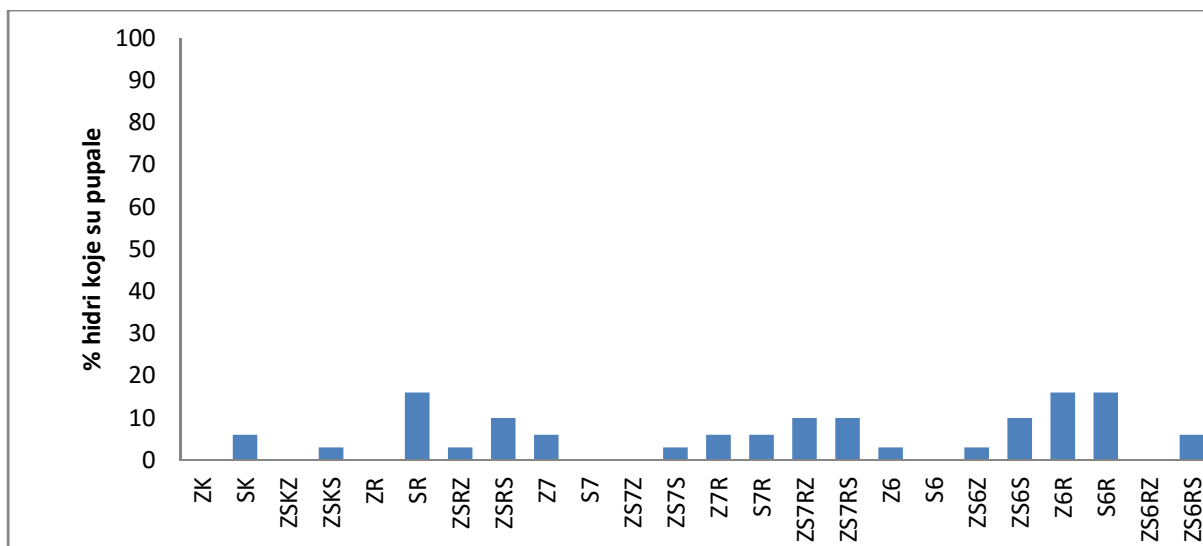
U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L je pupalo 3% uzorka smeđe i 6% smeđe hidre u miješanom uzorku. U uzorcima tretiranim norflurazonom

koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračenim je pupalo 3% jedinki zelene i 10% smeđe hidre, te 16% zelene i 10% smeđe u miješanom uzorku. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L je pupalo 6% jedinki zelene i 3% smeđe hidre te 3% smeđe u miješanom uzorku. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračenim je pupalo 3% jedinki zelene i 13% smeđe hidre te 6% smeđe hidre u miješanom uzorku.

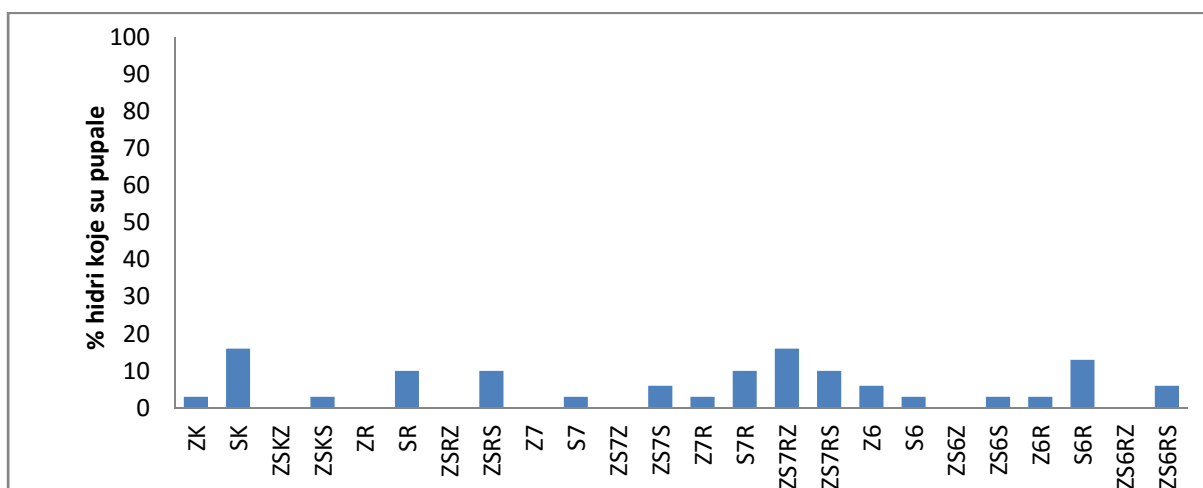
U uzorcima s dodatkom alge CV je pupalo 40% jedinki u kontrolnom uzorku smeđe hidre i 50% kontrolnog uzorka smeđe hidre u miješanom uzorku. U zračenim uzorcima je pupalo 100% smeđe hidre i 50% smeđe hidre u miješanom uzorku. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L je pupalo 50% jedinki smeđe hidre u miješanom uzorku. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračenim je pupalo 100% jedinki smeđe hidre. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L je pupalo 20% smeđe hidre. U uzorcima s dodatkom alge CZ10 je pupalo 100% jedinki kontrolnog uzorka smeđe hidre. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L je pupalo 80% jedinki smeđe hidre. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračeno je pupalo 20% jedinki smeđe hidre. U uzorcima s dodatkom algi CVCZ10 je pupalo 40% kontrolnog uzorka smeđe hidre i 25% smeđe hidre u miješanom uzorku. U zračenim uzorcima je pupalo 20% jedinki smeđe hidre i 50% jedinki smeđe hidre u miješanom uzorku. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L je pupalo 100% jedinki smeđe hidre. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračenim je pupalo 25% jedinki smeđe hidre u miješanom uzorku. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L je pupalo 40% jedinki zelene hidre (Slike 6 i 7).



a)



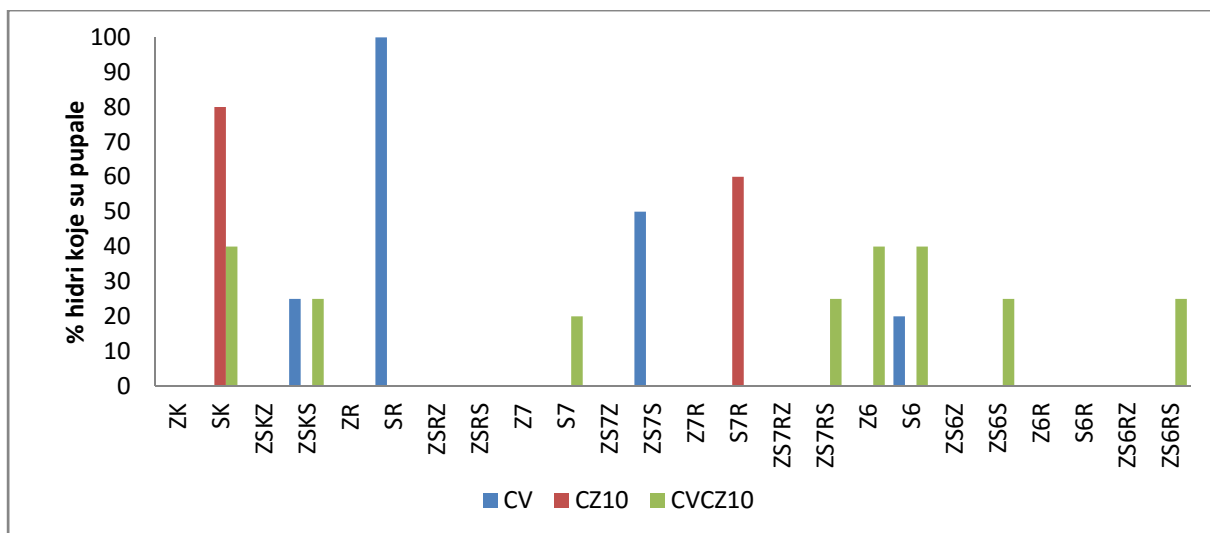
b)



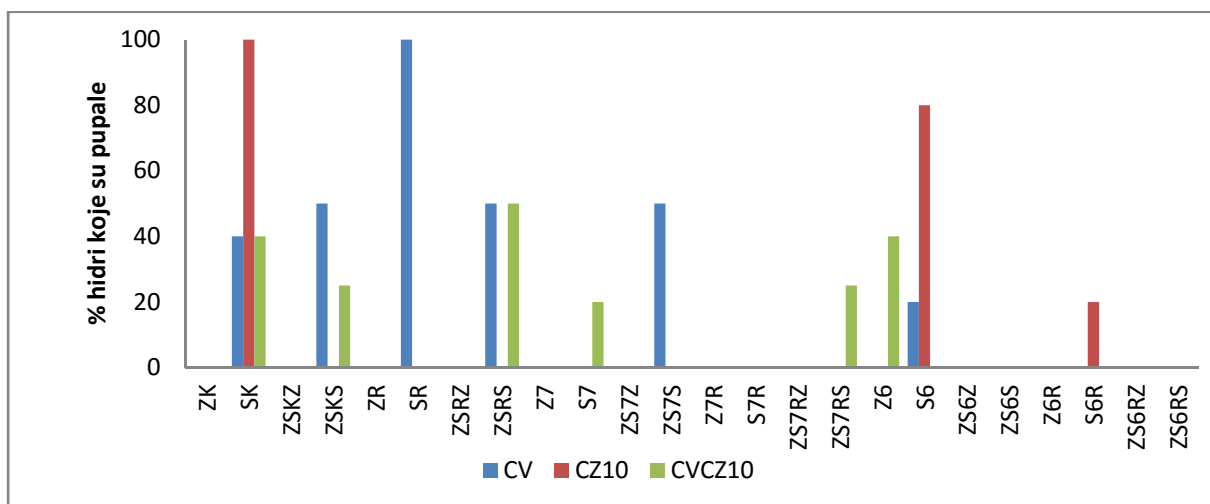
c)

**Slika 6.** Nesporno razmnožavanje (pupanje) zelene i smeđe hidre a) prvog, b) drugog i c) trećeg dana pokusa nakon obrade norflurazonom i UVB-zračenjem.

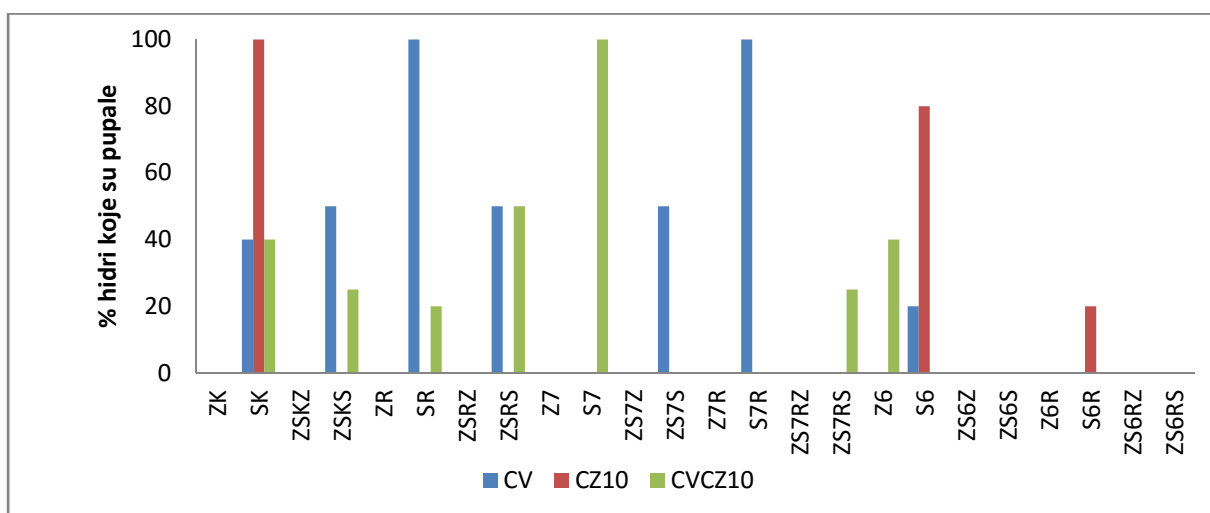
ZK - zelena hidra - kontrolni uzorak, SK - smeđa hidra - kontrolni uzorak, ZSKZ - zelena hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, ZSKS - smeđa hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, ZR - zelena hidra – zračena, SR- smeđa hidra – zračena, ZSRZ – zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, ZSRS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, Z7 - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, S7- smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7Z - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7S - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, Z7R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, S7R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, ZS7RZ - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, ZS7RS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, Z6 - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, S6 - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6Z - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretirane norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6S - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, Z7R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, S6R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, ZS6RZ - zelena - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen, ZS6RS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen



a)



b)



c)

**Slika 7.** Nesporno razmnožavanje (pupanje) zelene i smeđe hidre s dodatkom algi a) prvog, b) drugog i c) trećeg dana pokusa nakon obrade norflurazonom i UVB-zračenjem.

ZK - zelena hidra - kontrolni uzorak, SK - smeđa hidra - kontrolni uzorak, ZSKZ - zelena hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, ZSKS - smeđa hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, ZR - zelena hidra – zračena, SR- smeđa hidra – zračena, ZSRZ – zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, ZSRS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, Z7 - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, S7- smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7Z - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7S - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, Z7R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, S7R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, ZS7RZ - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, ZS7RS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, Z6 - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, S6 - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6Z - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretirane norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6S - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, Z7R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, S6R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, ZS6RZ - zelena - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen, ZS6RS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen' CV - slobodnoživuće alge *Chlorella vulgaris*, CZ10 - endosimbiotske alge *Mychonastes homosphaera* (CZ10), CVCZ10 - slobodnoživuće alge *Chlorella vulgaris* i endosimbiotske alge *Mychonastes homosphaera* (CZ10)

### 3.1.3. Odgovor na mehanički podražaj

Kod hidri obrađenih norflurazonom i zračenjem pratila se reakcija na mehanički podražaj

**Prvog dana** pokusa sve su jedinke kontrolnog uzorka reagirale na mehanički podražaj, a u zračenima uzorcima 43% jedinki zelene i 90% smeđe hidre te 50% jedinki smeđe hidre u miješanom uzorku reagiralo je na mehanički podražaj

U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L 100% jedinki zelene i smeđe hidre reagiralo je na mehanički podražaj. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L 63% jedinki zelene hidre i 33% smeđe te 100% jedinki u miješanom uzorku reagiralo je na mehanički podražaj.

U uzorcima s dodatkom alge *Chlorella vulgaris* (CV) 100% jedinki zelene i smeđe hidre u kontrolnim uzorcima reagiralo je na mehanički podražaj. U zračenim uzorcima 60% jedinki smeđe i 50% jedinki smeđe hidre u miješanom uzorku reagiralo je na mehanički podražaj. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L 100% jedinki zelene i smeđe hidre reagiralo je na mehanički podražaj. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračenim 60% jedinki smeđe hidre reagiralo je na mehanički podražaj. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L 100% jedinki zelene i smeđe hidre reagiralo je na mehanički podražaj. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračenim 40% jedinki smeđe hidre i 50% jedinki smeđih hidri u miješanom uzorku reagiralo je na mehanički podražaj. Uz dodatak alge *Mychonastes homosphaera* (CZ10) u kontrolnim uzorcima sve su jedinke reagirale na mehanički podražaj, a u zračenim uzorcima reagiralo je 60% jedinki smeđe hidre i 50% jedinki smeđe hidre u miješanom uzorku, dok su u uzorcima tretiranim norflurazonom niže koncentracije sve hidre reagirale na mehanički podražaj. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračenim 60%

jedinki smeđe hidre i 50% smeđe hidre u miješanom uzorku reagiralo je na mehanički podražaj. U nižoj koncentraciji norflurazona sve su hidre reagirale na mehanički podražaj, a u kombinaciji sa zračenjem 40% jedinki smeđe i 50% jedinki smeđih hidri u miješanom uzorku reagiralo je na mehanički podražaj. U uzorcima s dodatkom obje vrste algi sve su hidre u kontrolnim uzorcima reagirale na mehanički podražaj, a u zračenim uzorcima 60% jedinki smeđe i 50% jedinki smeđe hidre u miješanom uzorku reagiralo je na mehanički podražaj. I u uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L 100% jedinki zelene i smeđe hidre reagiralo je na mehanički podražaj, dok je u uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračenim 60% jedinki smeđe hidre i 50% jedinki smeđe hidre u miješanom uzorku reagiralo na mehanički podražaj. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L 100% jedinki zelene i smeđe hidre reagiralo je na mehanički podražaj, a u uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračenim 40% jedinki smeđe hidri i 50% jedinki smeđih hidri u miješanom uzorku reagiralo je na mehanički podražaj.

**Drugi dan** pokusa sve su hidre u kontrolnim uzorcima reagirale na mehanički podražaj. U zračenim uzorcima 6% jedinki zelene i 86% smeđe hidre te 50% smeđe hidre u miješanom uzorku reagiralo je na mehanički podražaj.

U uzorcima tretiranim nižom koncentracijom norflurazona 100% jedinki zelene i 96% smeđe hidre, te 100% zelene i smeđe u miješanom uzorku reagiralo je na mehanički podražaj, dok je u višoj koncentraciji 66% jedinki zelene i 16% smeđe, te 100% zelene i smeđe hidre u miješanom uzorku reagiralo na mehanički podražaj.

Uz dodatak algi vrste *Chlorella vulgaris* (CV) sve su hidre reagirale na mehanički podražaj, dok je u zračenim uzorcima 100 % jedinki smeđe i 50% jedinki smeđe hidre u miješanom uzorku reagiralo na mehanički podražaj. I u uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L sve su hidre reagirale na mehanički podražaj, a uz zračenje 100% jedinki smeđe hidre i 50% smeđe hidre u miješanom uzorku reagiralo je na mehanički podražaj. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L 100% jedinki zelene i smeđe hidre, i uz zračenje 40% jedinki zelene, 40% jedinki smeđe i 50% jedinki smeđe hidre u miješanom uzorku reagiralo je na mehanički podražaj.

U uzorcima s dodatkom alge CZ10 sve su hidre reagirale na mehanički podražaj, a u zračenim uzorcima 60% jedinki zelene, 100% smeđe te 50% smeđe hidre u miješanom uzorku reagiralo je na mehanički podražaj. U uzorcima tretiranim herbicidom niže koncentracije sve su hidre reagirale na mehanički podražaj, a uz zračenje 60% jedinki zelene, 100% smeđe te 50% smeđe u miješanom uzorku reagiralo je na mehanički podražaj. U višoj koncentraciji sve su hidre



reagirale na mehanički podražaj, a uz zračenje 40% jedinki zelene, 40% smeđe i 50% smeđe hidre u miješanom uzorku reagiralo je na mehanički podražaj.

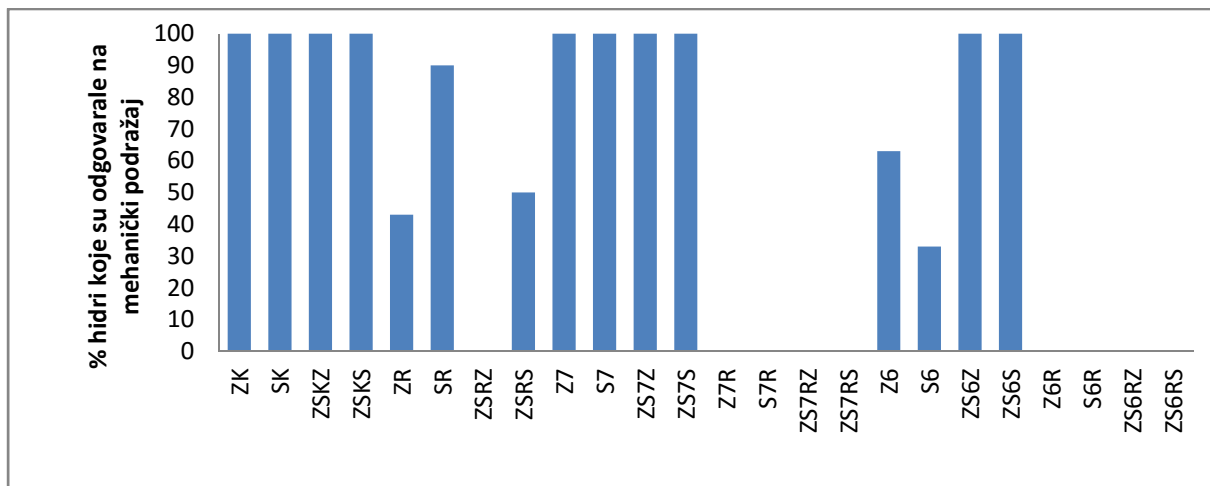
U uzorcima s dodatkom kombinacije algi svi su kontrolni uzorci reagirali na mehanički podražaj, dok je u zračenim uzorcima 60% jedinki zelene hidre, 50% smeđe hidre te 50% jedinki smeđe hidre u miješanom uzorku reagiralo na mehanički podražaj. U uzorcima s norflurazonom niže koncentracije sve su hidre reagirale na mehanički podražaj, a uz zračenje 60% jedinki zelene hidre, 100% smeđe te 50% smeđe u miješanom uzorku reagiralo je na mehanički podražaj. U višoj koncentraciji herbicida sve su hidre reagirale na mehanički podražaj, a uz dodatak zračenja 40% zelene, 100% smeđe i 50% smeđe hidre u miješanom uzorku je reagiralo na mehanički podražaj.

**Treći dan** pokusa sve su kontrolne hidre i hidre uz dodatak norflurazona niže koncentracije su reagirale na mehanički podražaj, a pri višoj koncentraciji 50% jedinki smeđe hidre u miješanom uzorku reagiralo je na mehanički podražaj.

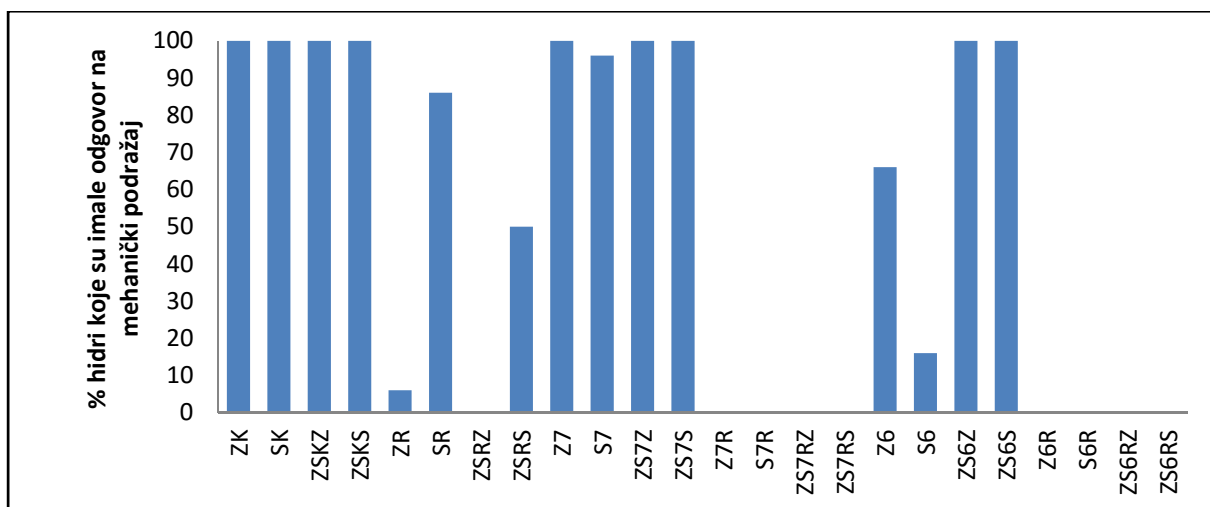
U uzorcima s dodatkom vrste *Chlorella vulgaris* (CV) sve su hidre u kontrolnim uzorcima reagirale na mehanički podražaj, u zračenim uzorcima 60% jedinki zelene, 100 % smeđe i 50% jedinki smeđe hidre u miješanom uzorku reagiralo je na mehanički podražaj, a u uzorcima tretiranim norflurazonom niže koncentracije sve su hidre reagirale na mehanički podražaj, dok je uz zračenje 60% jedinki zelene, 100% smeđe i 50% smeđe hidre u miješanom uzorku reagiralo na mehanički podražaj. U uzorcima tretiranim norflurazonom više koncentracije sve su hidre reagirale na mehanički podražaj, uz zračenje 40% jedinki zelene, 100% jedinki smeđe i 50% jedinki smeđe hidre u miješanom uzorku reagiralo je na mehanički podražaj. Uz dodatak vrste *Mychonastes homosphaera* (CZ10) sve su kontrolne hidre reagirale na mehanički podražaj, dok je u zračenim uzorcima 60% jedinki zelene, 100% smeđe hidre te 100% jedinki smeđe hidre u miješanom uzorku reagiralo na mehanički podražaj. U uzorcima tretiranim norflurazonom niže koncentracije sve su hidre reagirale na mehanički podražaj, a uz zračenje 60% jedinki zelene hidre, 100% smeđe te 50% smeđe u miješanom uzorku reagiralo je na mehanički podražaj. Uz nižu koncentraciju norflurazona sve su hidre reagirale na mehanički podražaj, a uz zračenje 40% jedinki zelene, 100% smeđe i 50% smeđe hidre u miješanom uzorku reagiralo je na mehanički podražaj.

Uz dodatak obje vrste algi sve su kontrolne hidre reagirale na mehanički podražaj, a u zračenim uzorcima 60% jedinki zelene hidre, 100% smeđe hidre te 100% jedinki smeđe hidre u miješanom uzorku je reagiralo na mehanički podražaj. Uz dodatak niže koncentracije norflurazona sve su hidre reagirale na mehanički podražaj, dok je uz zračenje 60% jedinki zelene, 100% smeđe te 100% zelene i smeđe u miješanom uzorku reagiralo na mehanički

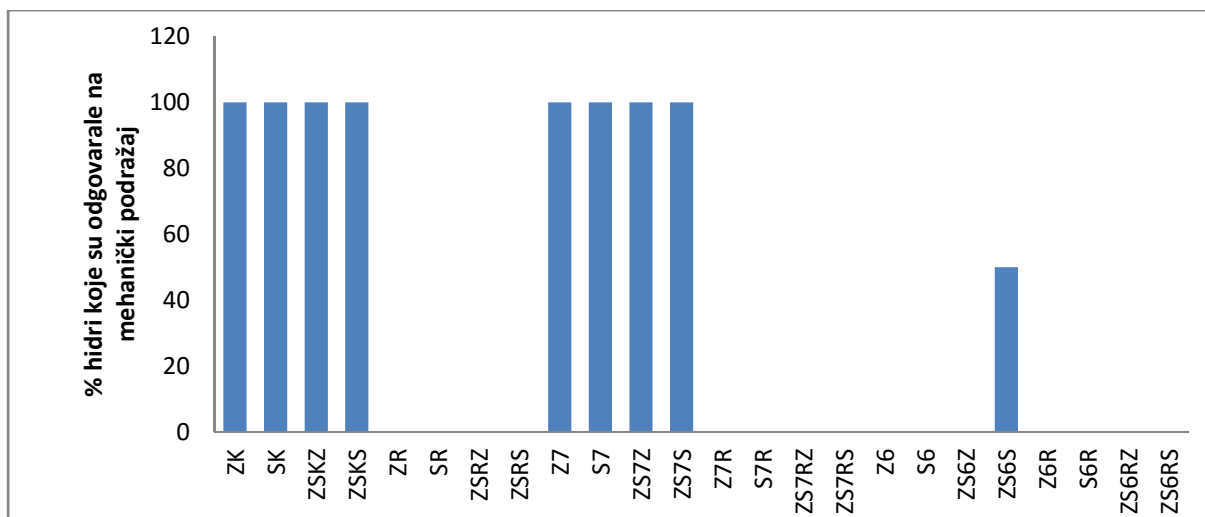
podražaj. Uz dodatak niže koncentracije, kao i uz zračenje sve su hidre reagirale na mehanički podražaj (Slike 8 i 9).



a)



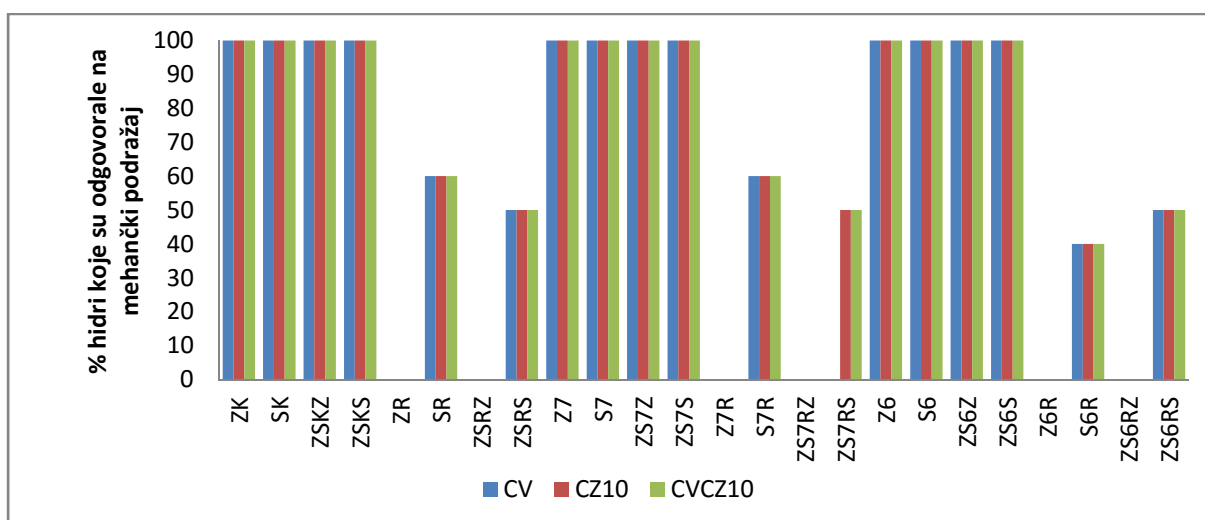
b)



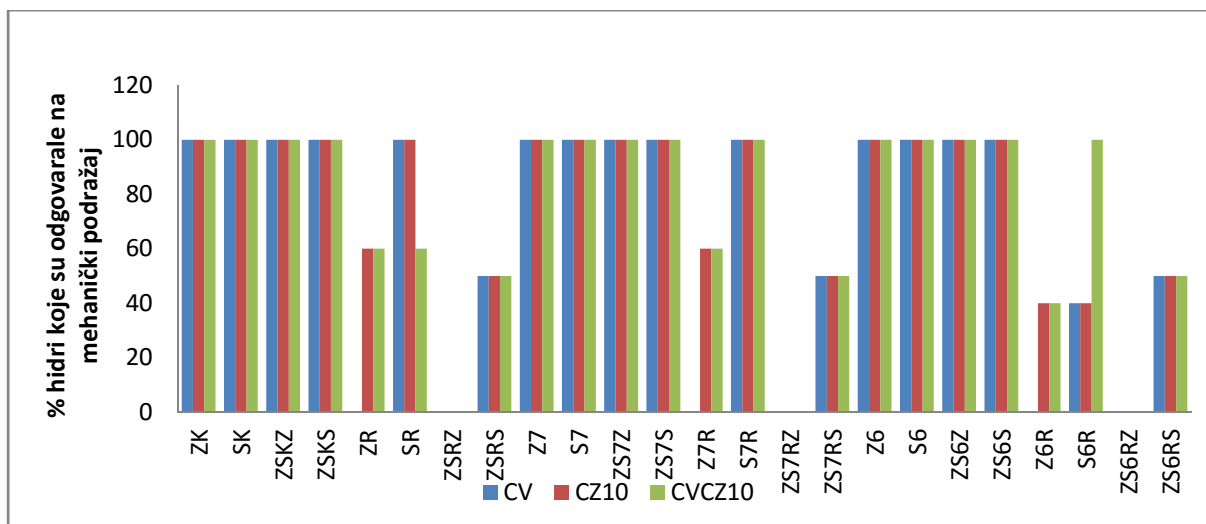
c)

**Slika 8.** Odgovor na mehanički podražaj zelene i smeđe hidre a) prvog, b) drugog i c) trećeg dana pokusa nakon obrade norflurazonom i UVB-zračenjem.

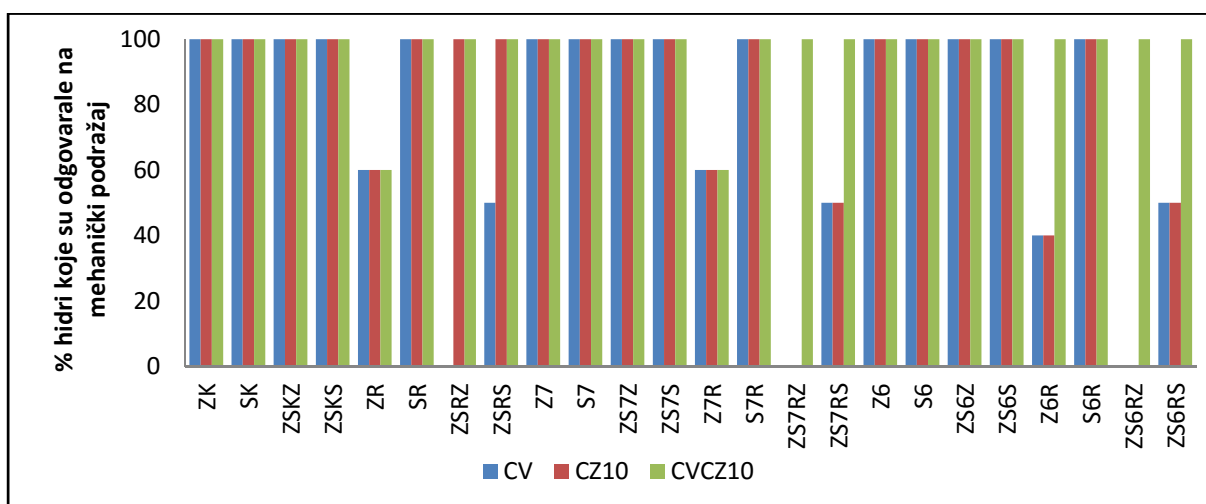
ZK - zelena hidra - kontrolni uzorak, SK - smeđa hidra - kontrolni uzorak, ZSKZ - zelena hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, ZSKS - smeđa hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, ZR - zelena hidra - zračena, SR - smeđa hidra - zračena, ZSRZ - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, ZSRS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, Z7 - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, S7 - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7Z - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7S - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, Z7R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, S7R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, ZS7RZ - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, ZS7RS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, Z6 - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, S6 - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6Z - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretirane norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6S - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, Z7R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, S6R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, ZS6RZ - zelena - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen, ZS6RS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen



a)



b)



c)

**Slika 9.** Odgovor na mehanički podražaj zelene i smeđe hidre s dodatkom algi a) prvog, b) drugog i c) trećeg dana pokusa nakon obrade norflurazonom i UVB-zračenjem.

ZK - zelena hidra - kontrolni uzorak, SK - smeđa hidra - kontrolni uzorak, ZSKZ - zelena hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, ZSKS - smeđa hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, ZR - zelena hidra - zračena, SR - smeđa hidra - zračena, ZSRZ - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, ZSRS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, Z7 - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, S7 - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7Z - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7S - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, Z7R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, S7R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, ZS7RZ - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, ZS7RS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, Z6 - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, S6 - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6Z - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretirane norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6S - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, Z7R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, S6R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, ZS6RZ - zelena - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen, ZS6RS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen, CV - slobodnoživuće alge *Chlorella vulgaris*, CZ10 - endosimbotske alge *Mychonastes homosphaera* (CZ10), CVCZ10 - slobodnoživuće alge *Chlorella vulgaris* i endosimbotske alge *Mychonastes homosphaera* (CZ10)

#### 3.1.4. Oštećenje lovki

Kod hidri obrađenih norflurazonom i zračenjem analizirana je pojava oštećenja lovki

**Prvog dana** pokusa u zračenim uzorcima 50% jedinki zelene hidre, 43% smeđe hidre i 36% zelene hidre u miješanom uzorku i uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračenim 70% jedinki zelene, 100 % smeđe i 100% zelene i smeđe u miješanom uzorku je imalo oštećene lovke. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračenim 100% jedinki zelene i smeđe hidre je imalo oštećene lovke.

U uzorcima s dodatkom alge CV 40% jedinki zelene i 20% smeđe hidre u zračenim uzorcima je imalo oštećene lovke. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračenim 100% jedinki zelene i 20% smeđe hidre je imalo oštećene lovke. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračenim 100% jedinki zelene i 60% smeđe te 100% jedinki u miješanom uzorku je imalo oštećene lovke. U uzorcima s dodatkom alge CZ10 100% jedinki zelene i 100% smeđe hidre u zračenim uzorcima je imalo oštećene lovke. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračenim 50% jedinki smeđe i 50% zelene u miješanom uzorku je imalo oštećene lovke. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračenim 100% jedinki zelene, 60% smeđe i 100% zelene i smeđe hidre u miješanom uzorku je imalo oštećene lovke. U uzorcima s dodatkom algi CVCZ10 sve jedinke zelene i 20% smeđe hidre u zračenim uzorcima je imalo oštećene lovke. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračenim 100% jedinki zelene i smeđe hidre u miješanom uzorku je imalo oštećene lovke. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračenim 100% jedinki zelene, 60% smeđe i 100% zelene i smeđe u miješanom uzorku je imalo oštećene lovke.

**Drugog dana** pokusa u zračenim uzorcima 90% jedinki zelene hidre i 40% smeđe hidre te 100% jedinki u miješanom uzorku je imalo oštećene lovke.

U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L 6% smeđe i 3% jedinki zelene hidre u miješanom uzorku je imalo oštećene lovke. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračenim 100% jedinki zelene hidre, 100% smeđe i 50% zelene u miješanom uzorku je imalo oštećene lovke. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračenim 53% jedinki zelene, 40% smeđe i 50 % zelene u miješanom uzorku je imalo oštećene lovke.

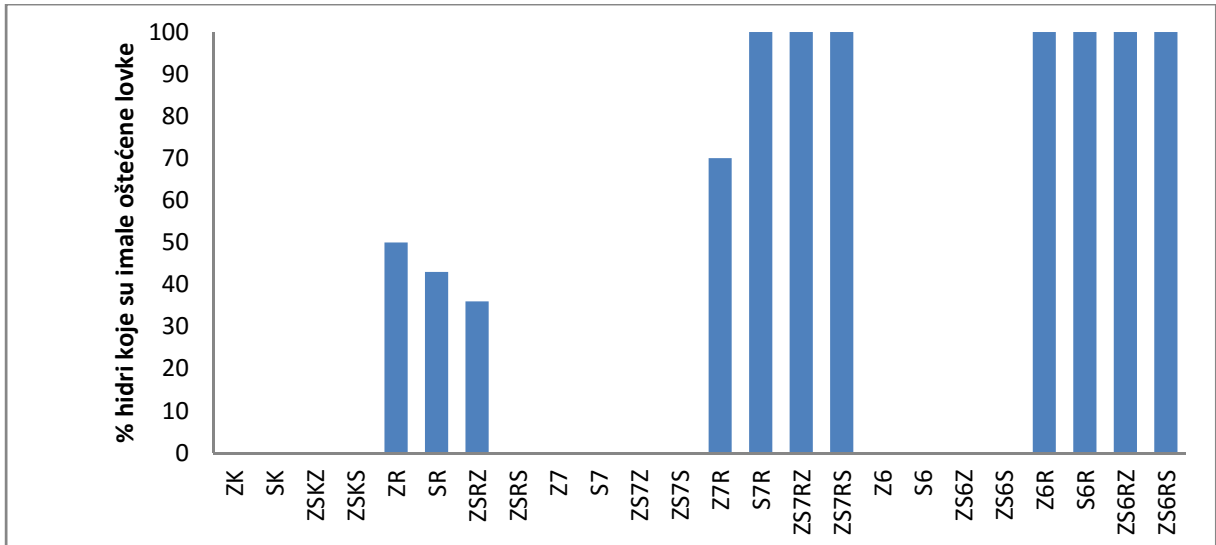
U uzorcima s dodatkom alge CV 40 % jedinki zelene i 20% smeđe hidre u zračenim uzorcima je imalo oštećene lovke. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračenim 60% jedinki zelene hidre imalo je oštećene lovke. U uzorcima tretiranim

norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračenim 60% jedinki zelenih i 20% smeđe te 50% jedinki u miješanom uzorku je imalo oštećene lovke. U uzorcima s dodatkom alge CZ10 60% jedinki zelene i 20% smeđe hidre u zračenim uzorcima je imalo oštećene lovke. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračenim 60% jedinki zelenih i 20% smeđih te 50% jedinki zelene hidre u miješanom uzorku je imalo oštećene lovke. U uzorcima s dodatkom algi CVCZ10 60% jedinki zelene i 20% smeđe hidre u zračenim uzorcima je imalo oštećene lovke. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračenim 50% jedinki zelene hidre u miješanom uzorku je imalo oštećene lovke. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračenim 60% jedinki zelenih i 20% smeđih te 50% jedinki zelene hidre u miješanom uzorku je imalo oštećene lovke.

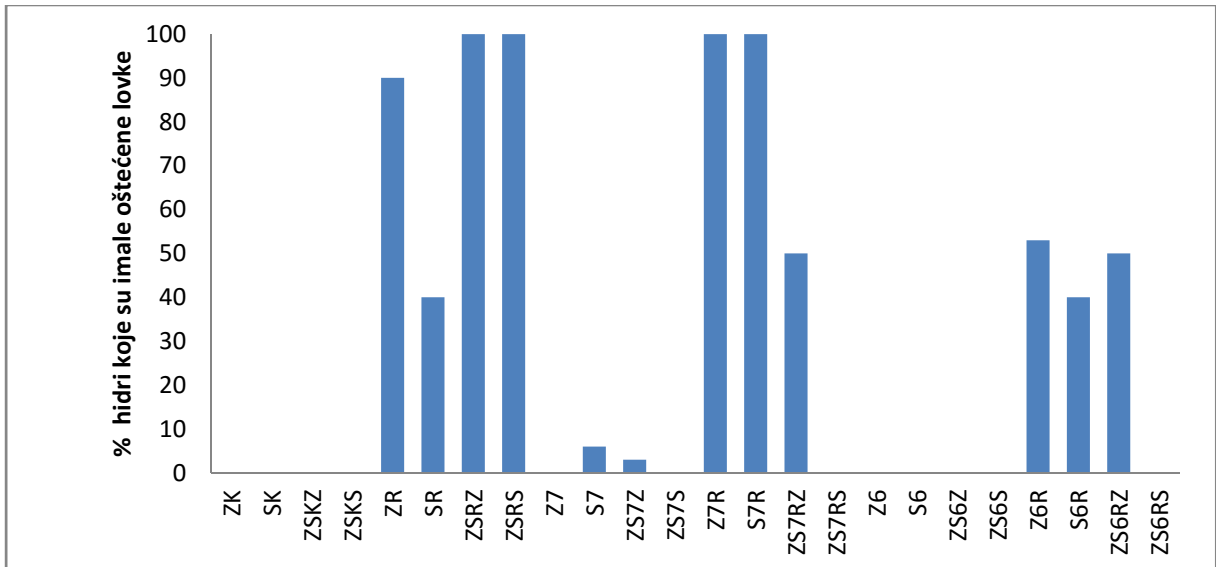
**Trećeg dana pokusa** 3% jedinki kontrolnog uzorka zelene i 3% smeđe hidre je imalo oštećene lovke. U zračenim uzorcima 100% jedinki zelene hidre 50% smeđe i 100% u miješanom uzorku je imalo oštećene lovke. Jedinke smeđe hidre u zračenom uzorku su imale izrasline na lovkama.

U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračenim 100% jedinki zelene i smeđe hidre je imalo oštećene lovke. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L 3% jedinki zelene hidre u miješanom uzorku je imalo rašljaste lovke. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračenim 100% jedinki zelene i smeđe hidre imalo je oštećene lovke.

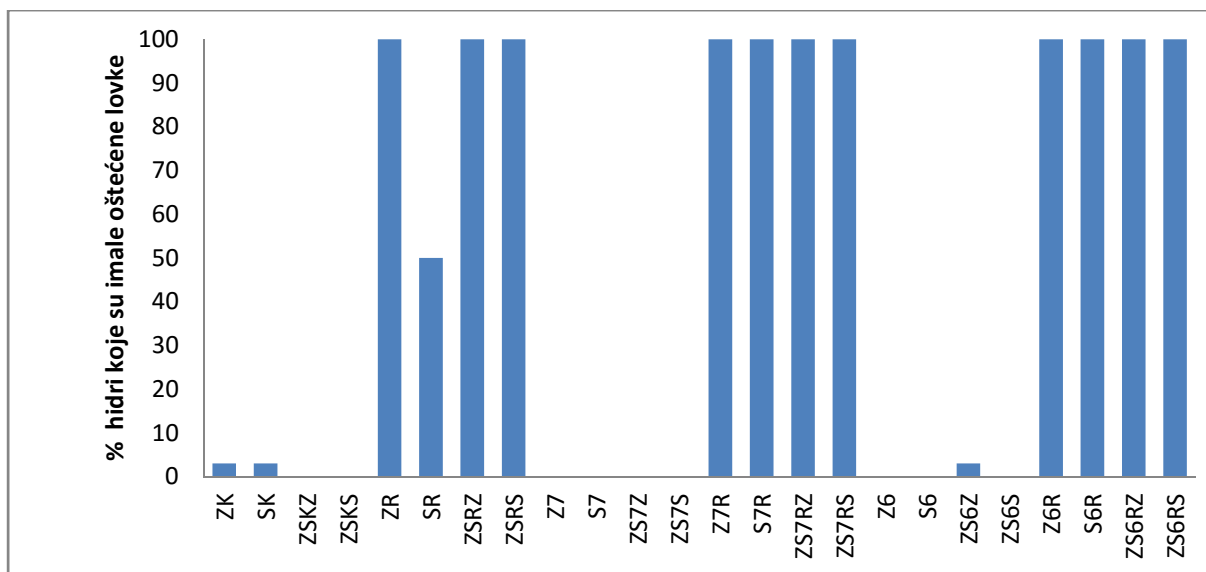
U uzorcima s dodatkom alge CV 20% jedinki smeđe hidre u zračenim uzorcima je imalo oštećene lovke. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračenim 60% jedinki zelene hidri je imalo oštećene lovke. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračenim 60% jedinki zelenih i 20% smeđih te 50% jedinki u miješanom uzorku je imalo oštećene lovke. U uzorcima s dodatkom alge CZ10 60% jedinki zelene i 20% smeđe hidre u zračenim uzorcima je imalo oštećene lovke. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračenim 60% jedinki zelenih i 20% smeđih te 50% jedinki zelene hidre u miješanom uzorku je imalo oštećene lovke. U uzorcima s dodatkom algi CVCZ10 60% jedinki zelene i 20% smeđe hidre u zračenim uzorcima je imalo oštećene lovke. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračenim 50% jedinki zelene hidre je imalo oštećene lovke. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračenim 60% jedinki zelenih i 20% smeđih te 50% jedinki zelene hidre u miješanom uzorku je imalo oštećene lovke (Slike 10 i 11).



a)



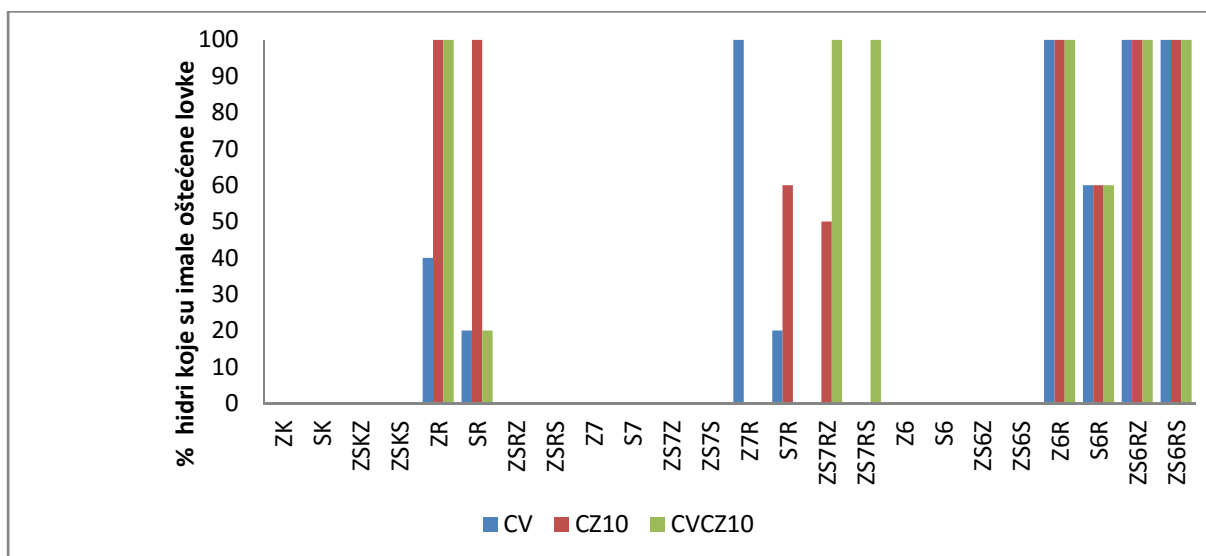
b)



c)

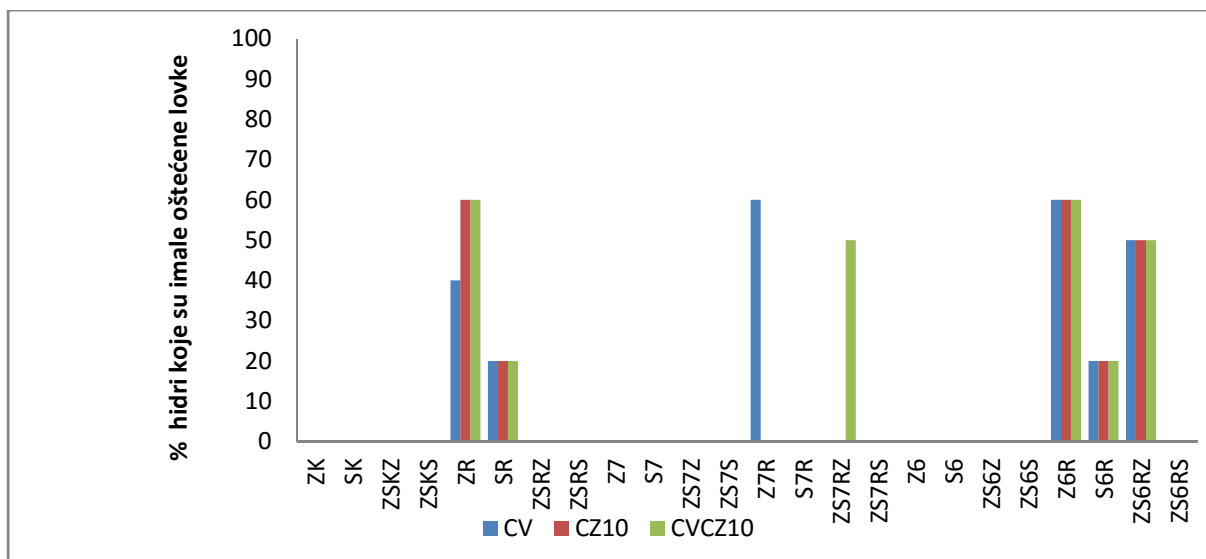
**Slika 10.** Oštećenje lovki kod zelene i smeđe hidre a) prvog, b) drugog i c) trećeg dana pokusa nakon obrade norflurazonom i UVB-zračenjem.

ZK - zelena hidra - kontrolni uzorak, SK - smeđa hidra - kontrolni uzorak, ZSKZ - zelena hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, ZSKS - smeđa hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, ZR - zelena hidra - zračena, SR - smeđa hidra - zračena, ZSRZ - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, ZSRS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, Z7 - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, S7 - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7Z - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, Z7R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, S7R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, ZS7RZ - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, ZS7RS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, Z6 - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, S6 - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6Z - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretirane norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6S - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, Z7R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, S6R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, ZS6RZ - zelena - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen, ZS6RS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen

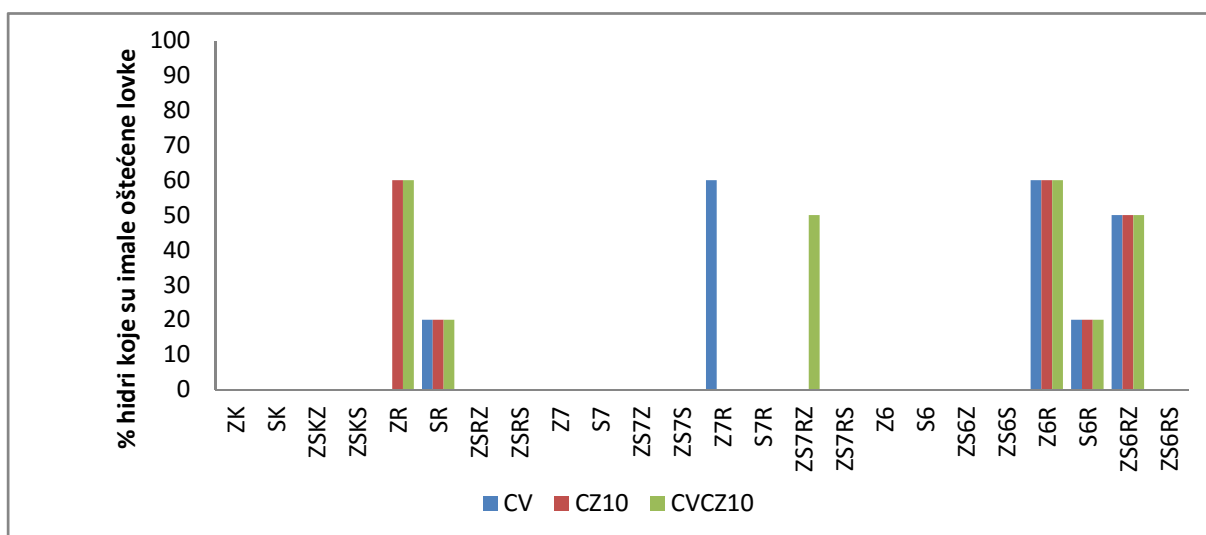


a)





b)



c)

**Slika 11.** Oštećenje lovki kod zelene i smeđe hidre s dodatkom algi a) prvog, b) drugog i c) trećeg dana pokusa nakon obrade norflurazonom i UVB-zračenjem.

ZK - zelena hidra - kontrolni uzorak, SK - smeđa hidra - kontrolni uzorak, ZSKZ - zelena hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, ZSKS - smeđa hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, ZR - zelena hidra - zračena, SR - smeđa hidra - zračena, ZSRZ - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, ZSRS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, Z7 - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, S7 - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7Z - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7S - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, Z7R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, S7R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, ZS7RZ - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, ZS7RS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, Z6 - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, S6 - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6Z - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretirane norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6S - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, Z7R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, S6R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, ZS6RZ - zelena - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen, ZS6RS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen, CV - slobodnoživuće alge *Chlorella vulgaris*, CZ10 - endosimbotske alge *Mychonastes homosphaera* (CZ10), CVCZ10 - slobodnoživuće alge *Chlorella vulgaris* i endosimbotske alge *Mychonastes homosphaera* (CZ10)

### 3.1.5. Spolno razmnožavanje

Jedna od morfoloških analiza hidri obrađenih norflurazonom i zračenjem obuhvatila je i analizu pojave spolnog razmnožavanja.

**Prvog dana** pokusa 10% kontrolnog uzoraka zelene hidre se spolno razmnožavalo, dok se u uzorcima tretiranim nižom koncentracijom norflurazona 3% jedinki zelene se hidre spolno razmnožavalo. Pri višoj koncentraciji norflurazona 16% jedinki zelene i 3% zelene hidre u miješanom uzorku se spolno razmnožavalo.

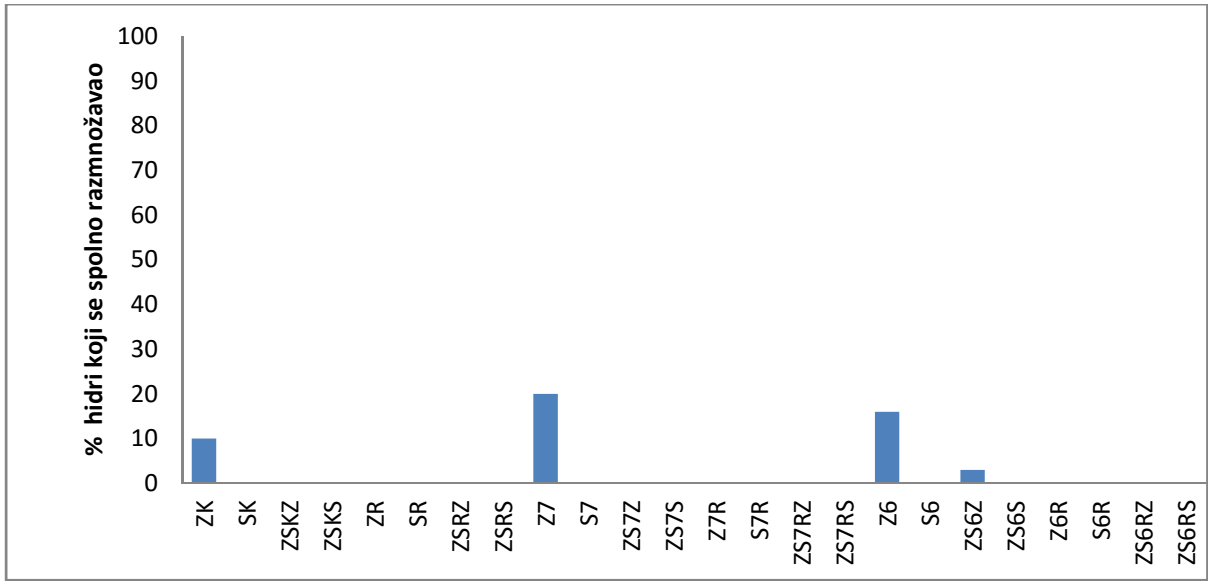
**Drugog dana** pokusa 20% kontrolnog uzoraka zelene hidre i 6% kontrolnih uzoraka zelene hidre u miješanom uzorku se spolno razmnožavalo. U zračenim uzorcima 6% zelene hidre u miješanom uzorku se spolno razmnožavalo.

U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L 10% smeđih hidri i 3% zelenih hidri u miješanom uzorku se spolno razmnožavalo. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračenim 10% jedinki zelene hidre, 6% smeđe i 3% zelene u zajedničkom uzorku se spolno razmnožavalo. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L 6% zelene hidre u miješanom uzorku se spolno razmnožavalo. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračenim 6% zelene hidre u miješanom uzorku se spolno razmnožavalo.

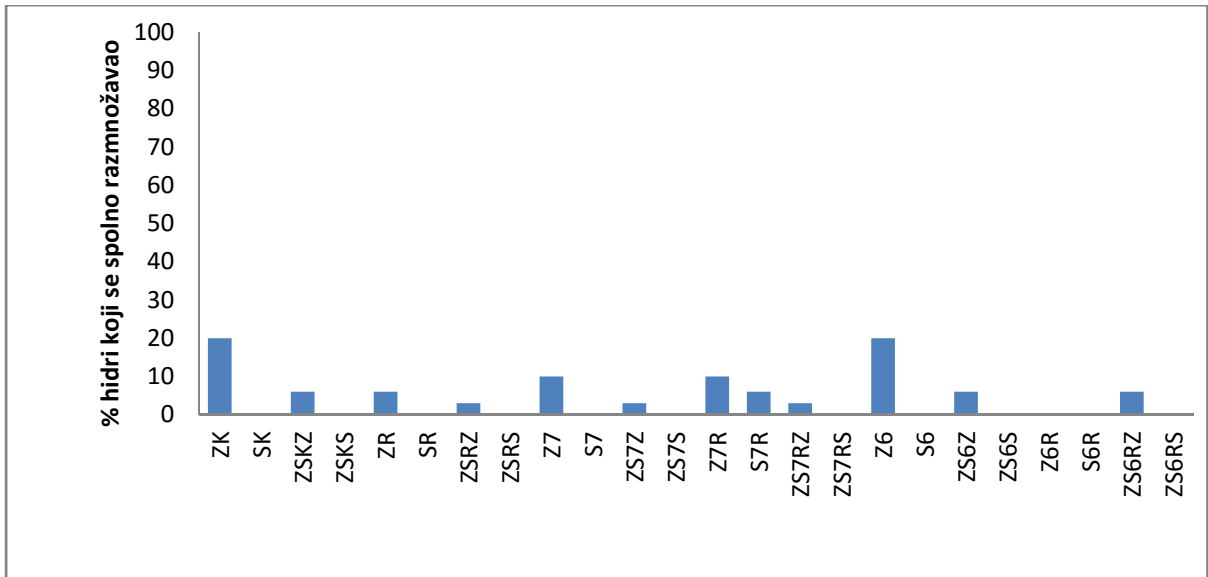
**Trećeg dana** pokusa 3% kontrolnog uzorku zelene hidre i 10% kontrolnog uzorka zelene hidre u miješanom uzorku se spolno razmnožavalo. U zračenim uzorcima 3% jedinki zelene hidre u miješanom uzorku se spolno razmnožavalo.

U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L 3% jedinki zelene hidre i 3% zelene hidre u miješanom uzorku se spolno razmnožavalo. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračenim 3% jedinki zelene hidre i 3% zelene hidre u miješanom uzorku se spolno razmnožavalo. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L 3% jedinki zelene hidre se spolno razmnožavalo. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračenim 3% jedinki zelene hidre u miješanom uzorku se spolno razmnožavalo (Slika 12).

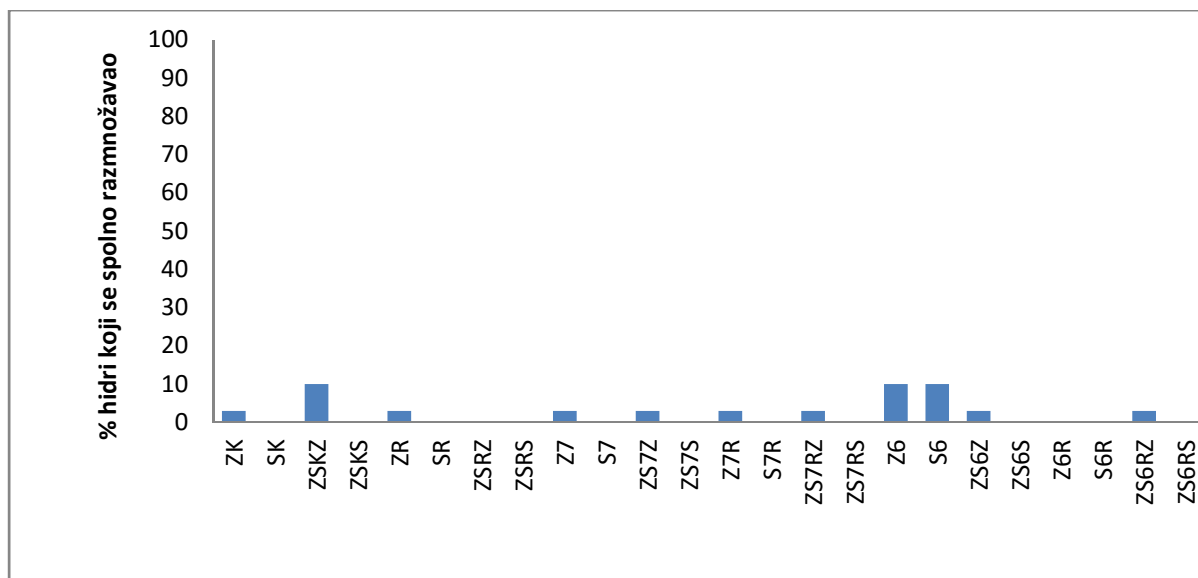
U uzorcima koji su bili tretirani s dodatkom algi hidre se nisu spolno razmnožavale.



a)



b)



c)

**Slika 12.** Spolno razmnožavanje zelene i smeđe hidre a) prvog, b) drugog i c) trećeg dana pokusa nakon obrade norflurazonom i UVB-zračenjem.

ZK - zelena hidra - kontrolni uzorak, SK - smeđa hidra - kontrolni uzorak, ZSKZ - zelena hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, ZSKS - smeđa hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, ZR - zelena hidra - zračena, SR - smeđa hidra - zračena, ZSRZ - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, ZSRS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, Z7 - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, S7 - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7Z - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7S - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, Z7R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, S7R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, ZS7RZ - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, ZS7RS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, Z6 - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, S6 - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6Z - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretirane norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6S - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, Z7R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, S6R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, ZS6RZ - zelena - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen, ZS6RS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen

### 3.1.6. Oblik tijela

Kod hidri se također promatrao oblik tijela. Svaki oblik tijela hidre koji je bio vidljivo relaksiran ili kontrahiran bilježen je kao promjena oblika tijela hidre uz napomenu o kojem se obliku radi.

**Prvog dana** pokusa 3% kontrolnog uzorka zelene hidre je bilo kontrahirano, a 10% kontrolnog uzorka zelene hidre u miješanom uzorku relaksirano. Zračeni uzorci zelene hidre su bili su 100% kontrahirani, a zračeni uzorci smeđe hidre 30% relaksirani u karakterističnom crvolikom obliku, te u miješanom uzorku 6% zelenih i 6% smeđe hidre je bilo relaksirano.

U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L 3% zelene hidre i 3% smeđe je bilo relaksirano, a pri koncentraciji  $2 \times 10^{-6}$  mol/L 3% jedinki zelene hidre je bilo relaksirano.

U uzorcima s dodatkom vrste *Chlorella vulgaris* (CV) 100% zračenih zelenih hidri i 50% zračenih zelenih hidri u miješanom uzorku je bilo kontrahirano. U uzorcima tretiranim norflurazonom niže koncentracije i zračenim 100% zelene hidre i 50% zelene hidre u miješanom uzorku je bilo kontrahirano, a 20% smeđe hidre izrazito deformirano. U uzorcima tretiranim norflurazonom više koncentracije i zračenim 100 % zelene hidre i 50 % zelene hidre u miješanom uzorku je bilo kontrahirano. U uzorcima s dodatkom vrste *Mychonastes homosphaera* (CZ10) i s dodatkom obje vrste algi zajedno rezultati su bili identični ali bez 20% smeđe hidre izrazito deformirane.

**Drugog dana** pokusa 100% zračenih jedinki zelene i 13% smeđe hidre je bilo kontrahirano.

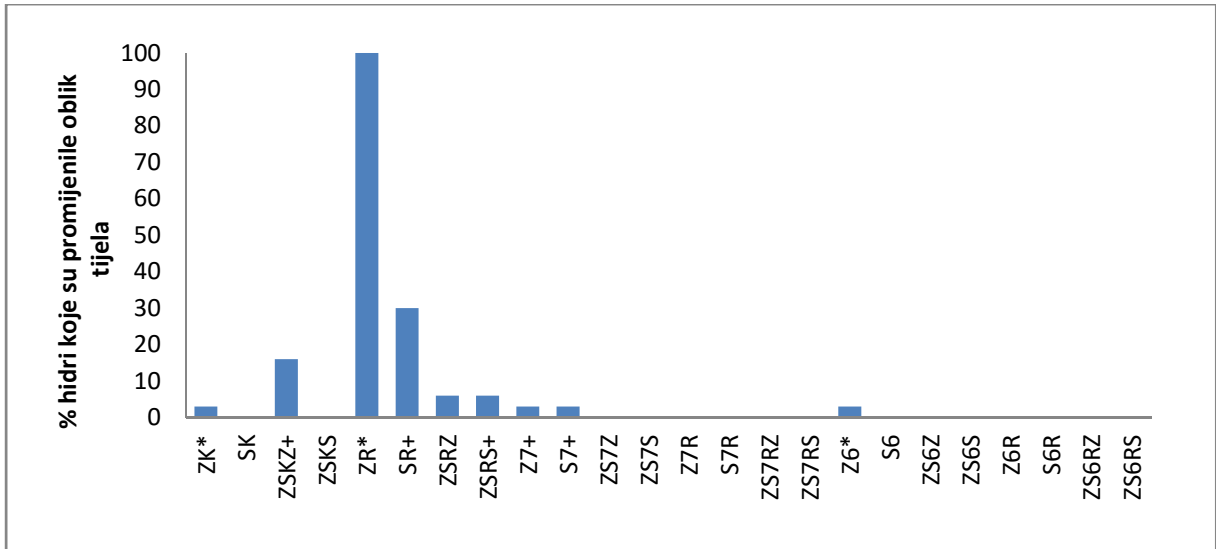
U uzorcima s norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračenim je bilo kontrahirano 63% zelene i 13% smeđe hidre, a pri koncentraciji  $2 \times 10^{-6}$  mol/L 3% jedinki zelene hidre je bilo kontrahirano. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračenim 16% jedinki zelene hidre je bilo relaksirano.

U uzorcima s dodatkom vrste *Chlorella vulgaris* (CV) je bilo 20% jedinki smeđe hidre tretirane norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračenim izrazito deformiranih.

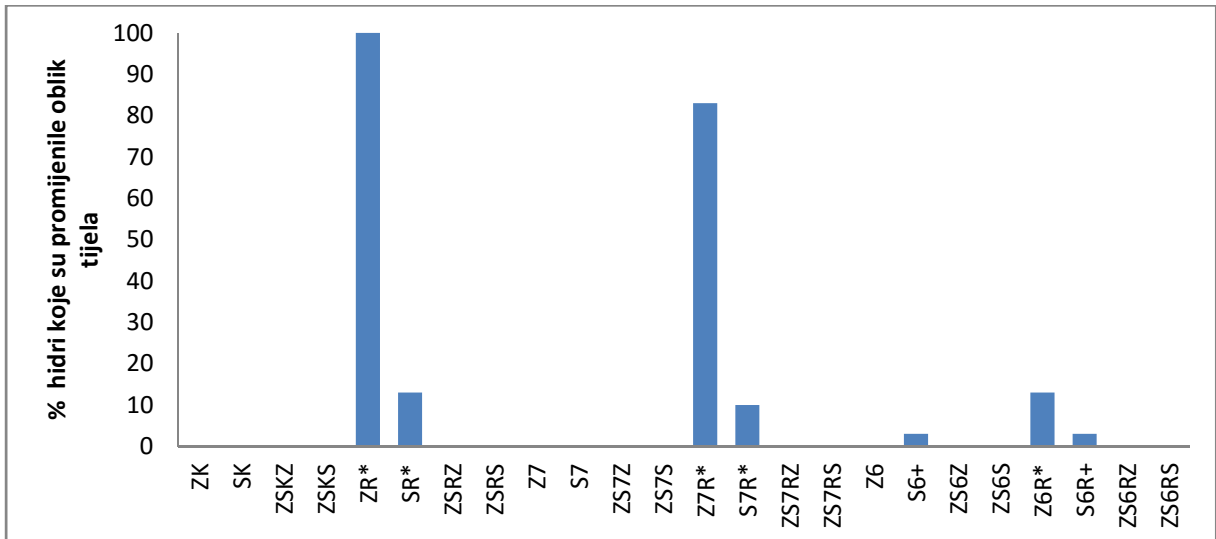
**Trećeg dana** pokusa 100% zračenog uzorka jedinki zelene i 50% zelene hidre u miješanom uzorku je bilo kontrahirano.

U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L 16% jedinki smeđe hidre je bilo relaksirano i izrazito izblijedjele boje. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračeno 100% zelenih hidri je bilo kontrahirano, a 3% smeđih relaksirano i izrazito izblijedjele boje. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračenim 80% jedinki zelene hidri i 50% zelene hidre u miješanom uzorku je bilo kontrahirano.

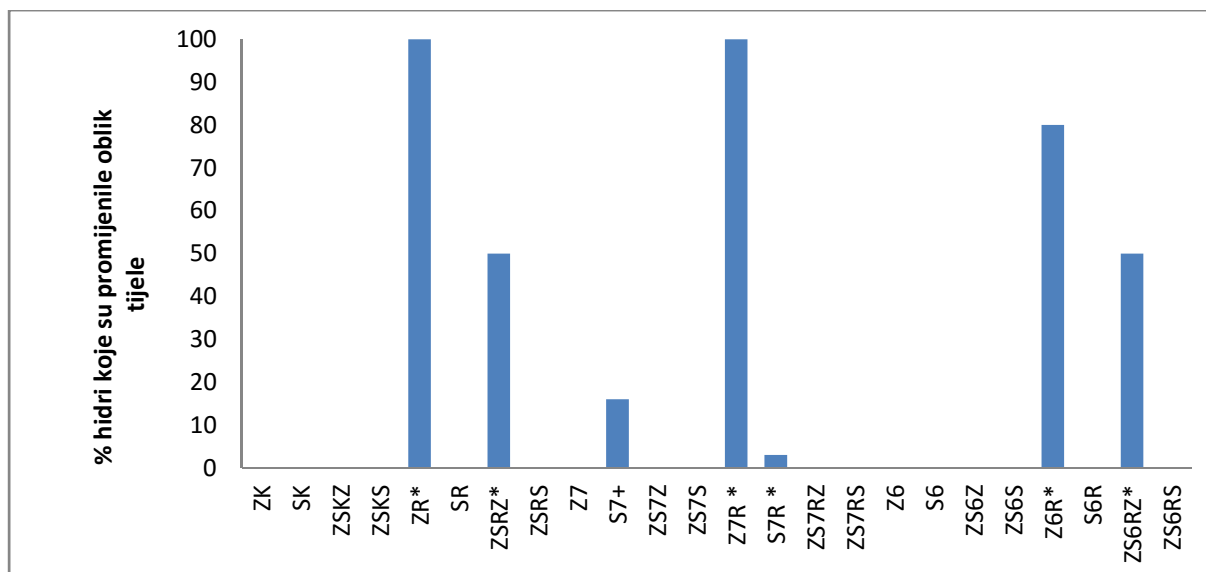
U uzorcima s dodatkom vrste *Chlorella vulgaris* (CV) je bilo 20% smeđe hidre tretirane norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračene izrazito deformirane (Slike 13 i 14).



a)



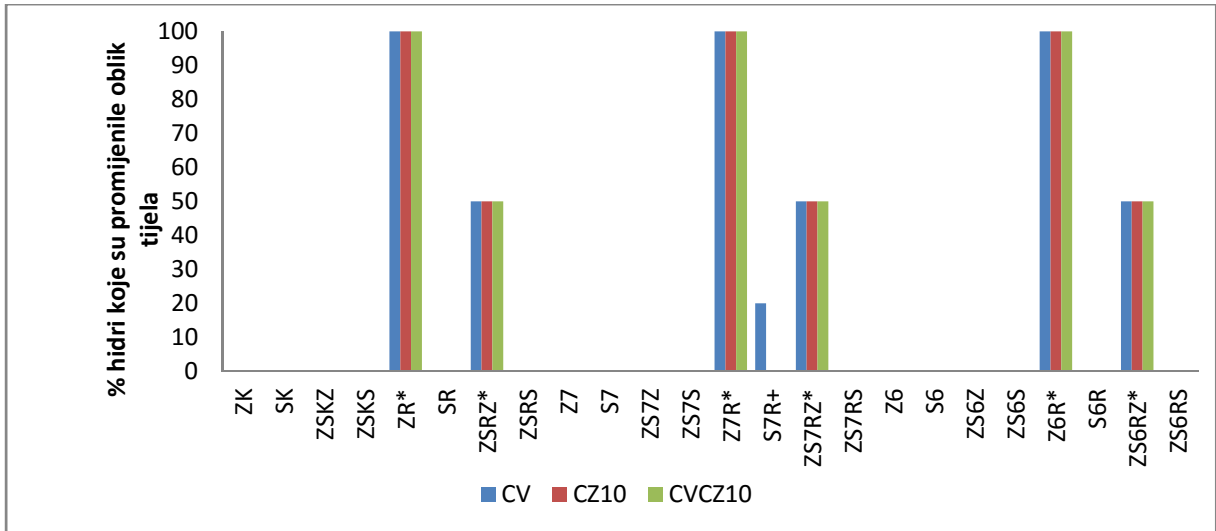
b)



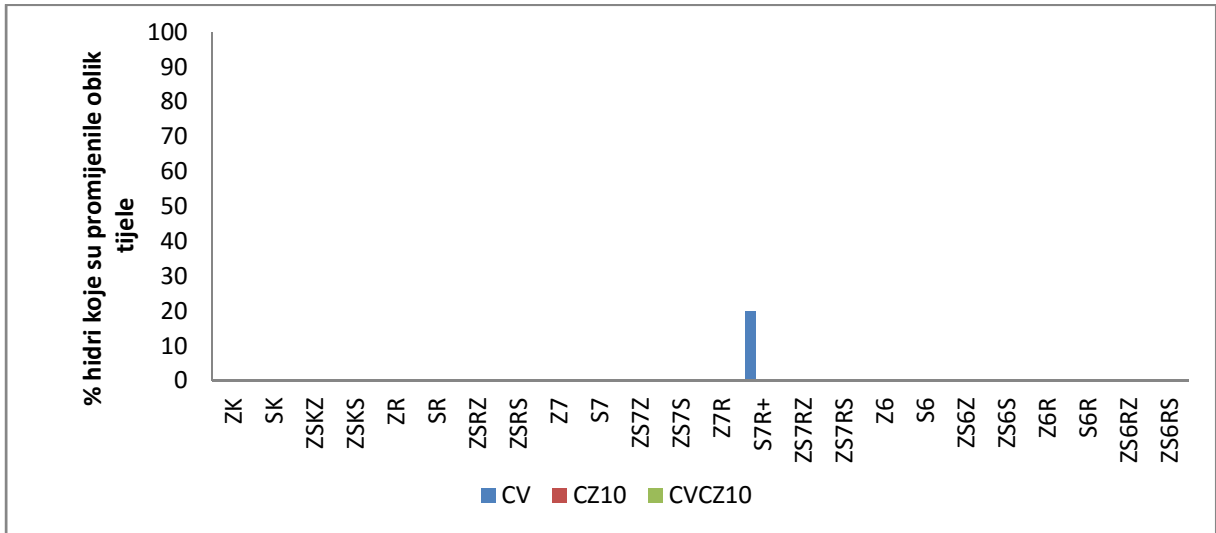
c)

**Slika 13.** Promjena oblika tijela zelene i smeđe hidre a) prvog, b) drugog i c) trećeg dana pokusa nakon obrade norflurazonom i UVB-zračenjem.

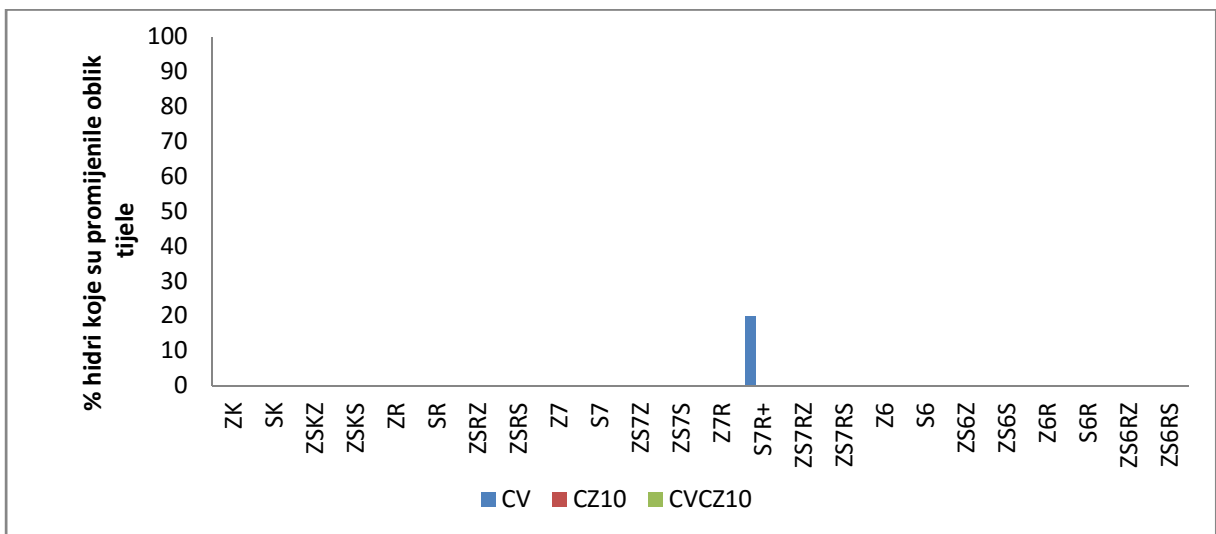
ZK - zelena hidra - kontrolni uzorak, SK - smeđa hidra - kontrolni uzorak, ZSKZ - zelena hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, ZSKS - smeđa hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, ZR - zelena hidra – zračena, SR- smeđa hidra – zračena, ZSRZ – zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, ZSRS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, Z7 - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, S7- smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7Z - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7S - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, Z7R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, S7R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, ZS7RZ - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, ZS7RS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, Z6 - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, S6 - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6Z - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretirane norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6S - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, Z7R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, S6R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, ZS6RZ - zelena - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen, ZS6RS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen, \*-kontrahirano, + - relaksirano



a)



b)



c)



**Slika 14.** Promjena oblika tijela zelene i smeđe hidre s dodatkom algi a) prvog, b) drugog i c) trećeg dana pokusa nakon obrade norflurazonom i UVB-zračenjem.

ZK - zelena hidra - kontrolni uzorak, SK - smeđa hidra - kontrolni uzorak, ZSKZ - zelena hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, ZSKS - smeđa hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, ZR - zelena hidra – zračena, SR- smeđa hidra – zračena, ZSRZ – zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, ZSRS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, Z7 - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, S7- smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7Z - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7S - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, Z7R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, S7R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, ZS7RZ - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, ZS7RS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, Z6 - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, S6 - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6Z - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretirane norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6S - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, Z7R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, S6R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, ZS6RZ - zelena - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen, ZS6RS - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen, CV - slobodnoživuće alge *Chlorella vulgaris*, CZ10 - endosimbiotske alge *Mychonastes homosphaera* (CZ10), CVCZ10 - slobodnoživuće alge *Chlorella vulgaris* i endosimbiotske alge *Mychonastes homosphaera* (CZ10), \*-kontrahirano, + -relaksirano

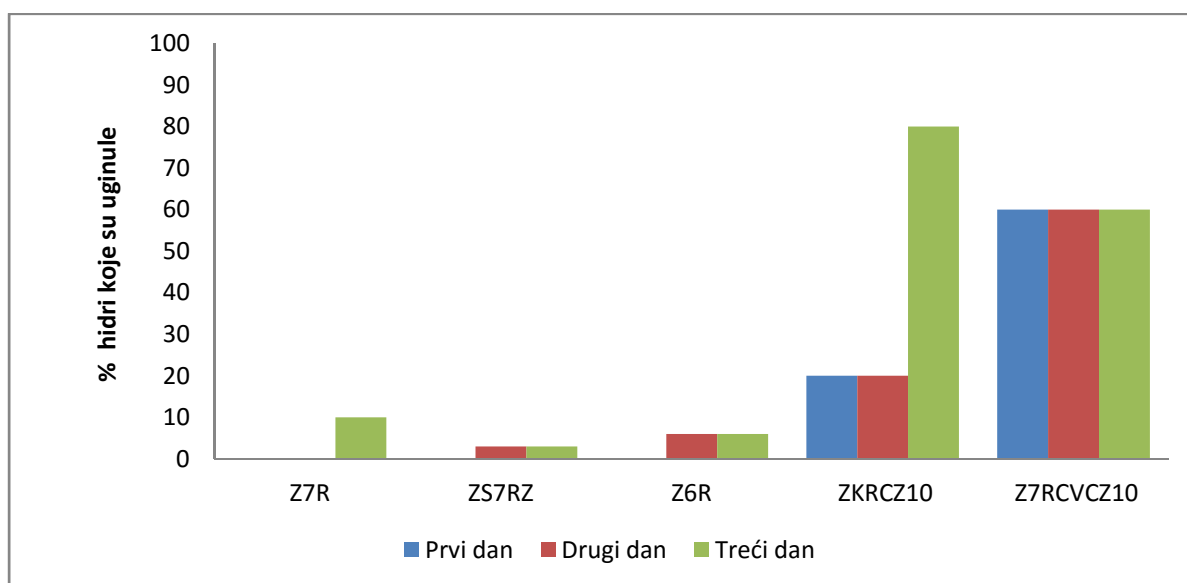
### 3.1.7. Smrtnost

Kod hidra se također promatrala smrtnost.

**Prvog dana** pokusa je uginulo 20% uzoraka zelene hidre koje su zračene i s dodatkom alge CZ10 i 60% zelene hidre tretirane norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračene s dodatkom algi CVCZ10.

**Drugog dana** pokusa je uginulo je 3% uzoraka zelene hidre u miješanom uzorku, tretirane norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračene i 6% zelene hidre tretirane norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračene.

**Trećeg dana** pokusa je uginulo 10% uzorka zelene hidre tretirane norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračene. U posudicama s dodatkom alge CZ10 uginulo je još 60% zelene hidre (Slika 15).



**Slika 15.** Smrtnost zelene i smeđe hidre prvog, drugog i trećeg dana pokusa nakon obrade norflurazonom i UVB-zračenjem.

Z7R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, ZS7RZ - zelena hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, Z6R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, CZ10ZKR - zelena hidra – zračena s dodatkom alge CZ10, CVCZ10Z7R - Z7R - zelena hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena s dodatkom algi CVCZ10

### 3.1.8. Prisutnost nakupina algi u posudicama

U kulturama hidri uzgajanih u prisustvu algi analizirana je prisutnost nakupina algi.

**Prvog dana** pokusa u uzorku s dodatkom alge CV u svim kontrolnim uzorcima zelene i smeđe hidre i zračenim uzorcima smeđe hidre bila je prisutnost nakupina algi. U zračenom miješanom uzorku bila je velika prisutnost nakupina.

U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L kao i zračenim bila je prisutnost nakupina u svim uzorcima, osim zelene hidre koja nije imala nakupina, ali je otopina bila zelene boje. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L bile su prisutne nakupine algi u uzorcima smeđe hidre i u uzorcima zelene hidre te u svim zračenim uzorcima. Otopina je bila zelene boje u uzorku smeđe hidre. U miješanom uzorku zelene i smeđe hidre bila je velika prisutnost nakupina.

U uzorku s dodatkom alge CZ10 bila je prisutnost nakupina u kontrolnim uzorcima zelene hidre i u miješanom uzorku, a nakupina nije bilo u uzorku smeđe hidre. U tom je uzorku otopina bila zelene boje. U zračenim uzorcima nakupine su bile prisutne u svima uzorcima. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L kao i zračenim bilo je prisutno nakupina u svim uzorcima, osim zračene smeđe hidre gdje je bila velika prisutnost nakupina. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračenim bilo je prisutno nakupina u svim u uzorcima, a u uzorku smeđe hidre boje otopine je bila zelena. Velika prisutnost nakupina je bila u miješanom uzorku tretiranom samo sa norflurazonom. U uzorku s dodatkom algi CVCZ10 je bila prisutnost nakupina u svim kontrolnim uzorcima. U zračenim uzorcima bila je prisutnost nakupina algi, a velika prisutnost nakupina je bila u uzorcima zelene hidre. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračenim bile su prisutne nakupine algi, osim u uzorku zelene hidre tretirane samo norflurazonom i zajedničkom uzorku zračenom gdje je bila velika prisutnost nakupina. U uzorcima tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračenim je bilo prisutno nakupina u svim u uzorcima, osim u uzorku zelene hidre tretirane samo norflurazonom gdje je bila velika prisutnost nakupina.

Drugi i treći dan pokusa nije bilo promjena

**Tablica 3. Prisutnost nakupina algi u posudicama**

Oznaka uzorka	Prvi dan			Drugi dan			Treći dan		
	CV	CZ	CVCZ	CV	CZ	CVCZ	CV	CZ	CVCZ
ZK	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SK	+	ZELENO -	+	+	ZELENO -	+	+	ZELENO -	+
ZSK	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ZR	++	+	++	++	+	++	++	+	++
SR	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ZSR	++	+	+	++	+	+	++	+	+
Z7	ZELENO -	++	++	ZELENO -	++	++	ZELENO -	++	++
S7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ZS7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Z7R	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S7R	+	++	+	+	++	+	+	++	+
ZS7R	+	+	++	+	+	++	+	+	++
Z6	+	+	++	+	+	++	+	+	++
S6	ZELENO+	ZELENO +	+	ZELENO +	ZELENO +	+	ZELENO +	ZELENO +	+
ZS6	++	++	+	++	++	+	++	++	+
Z6R	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S6R	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ZS6R	+	+	+	+	+	+	+	+	+

-nema nakupina, +prisutnost nakupina algi,++ velika prisutnost nakupina, ZELENO otopina je bila zelene boje

### 3.2. Citološko-histološke promjene zelene i smeđe hidre tijekom pokusa

U kontrolnom uzorku zelene i smeđe hidre stanični slojevi su bili pravilni i neoštećeni. Mezogleja zelene hidre bila je debljine 1,1  $\mu\text{m}$ , a smeđe hidre 1,9  $\mu\text{m}$ . Izbrojane su stanice na odsječku duljine 100  $\mu\text{m}$  u smeđe hidre: 25 stanica ektoderma, 24 stanica gastroderma, 14 zimogenih stanica, 32 intersticijskih i 10 žarnih stanica. Debljina mezogleje u miješanom uzorku bila je 1,3  $\mu\text{m}$ , za zelenu hidru i 1,6  $\mu\text{m}$  za smeđu hidru. U kontrolnom uzorku smeđe hidre u miješanom uzorku ektoderm je bio nemjerljiv, a intersticijske stanice nisu bile vidljive. Izbrojano je 27 stanica gastroderma, 13 zimogenih i 8 žarnih stanica. U zračenom ektoderm je bio iznmno oštećen, a na nekim dijelovima je nedostajao. Izmjerena je debljina mezogleje 0,8  $\mu\text{m}$  (Slika 16).



**Slika 16.** Zelena hidra zračena UVB-zračenjem treći dan pokusa; strelica pokazuje potencijalnu izraslinu na tijelu hidre.

U zračenom uzorku smeđe hidre dijelovi ektoderma su nedostajali, a u ostatku je bilo puno intersticijskih stanica i knida. Primijećeno je miješanje svih tipova stanica i pokušaj regeneracije. Mezogleja je bila debela, ali bez neke pravilnosti u debljini mezogleje. Izmjerena je debljina mezogleje 1,2  $\mu\text{m}$ . Zimogene stanice u gastrodermu su bile uništene i rasprsnute. One koje su uspjele migrirati nisu bile uništene i diferencirale se u druge tipove stanica, uz prisustvo žarnih stanica. Broj stanica ektoderma zbog razine oštećenja nije bilo moguće izbrojati. Izbrojano je 27 stanica gastroderma, 5 zimogenih, 30 intersticijskih i 5 žarnih stanica. Zračene zelene hidre u miješanom uzorku bile su reduciranog ektoderma, a u gastrodermalne stanicesu bile prazne. Gastroderm je bio u procesu regeneracije i primijećen je veliki broj intersticijskih stanica. Izbrojano je 26 stanica gastroderma, 18 zimogenih, 21 intersticijskih i 9 žarnih stanica.

Stanični slojevi u uzorku zelene hidre tretirane norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L bili su pravilni i jasno odvojeni. Ektoderm je na nekim mjestima bio nazubljen. Debljina mezogleje je bila 2,0  $\mu\text{m}$ . U uzorku smeđe hidre tretirane norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L su imale pravilne stanične slojeve. Izbrojano je 6 stanica u ektodermu, 22 u gastrodermu, 2 zimogene stanica i 6 žarnih stanica. Debljina mezogleje je bila 3,2  $\mu\text{m}$ . Zelene hidre u miješanom uzorku nisu imale jasno razlučiv ektoderm. U gastrodermu su bile prisutne zimogene i intersticijske stanice. Smeđe hidre u miješanom uzorku su imale veliku regeneraciju. Izbrojane su 2 zimogene stanice i 10 žarnih stanica. Zelene hidre tretirane norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračene imale su alge grupirane u stupiće uz membrane stanica, uz narušenu strukturu. Debljina mezogleje je bila 1,8  $\mu\text{m}$ . Smeđe hidre pri ovim uvjetima imale su

malo intersticijskih stanica. Veći broj zimogenih stanica je migrirao prema mezogleji koja je imala debljinu 2,2  $\mu\text{m}$ . Izbrojano je: 16 stanica ektoderma, 16 stanica gastroderma, 2 intersticijske stanice i 1 zimogena stanica. (Slika 17).



**Slika 17.** Smeđa hidra tretirana norflurazonom koncentracijom  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena UVB-zračenjem treći dan pokusa; strelica pokazuje pup hidre.

U miješanom uzorku pri ovim uvjetima smeđe hidre su u ektodermu imale puno regeneracije, stanični slojevi su bili dobre konzistencije, a u gastrodermu je bilo primijećeno oštećenje. Izbrojane su 4 stanice ektoderma, 10 gastroderma, 6 zimogene stanica, 11 intersticijskih i 6 žarnih stanica.

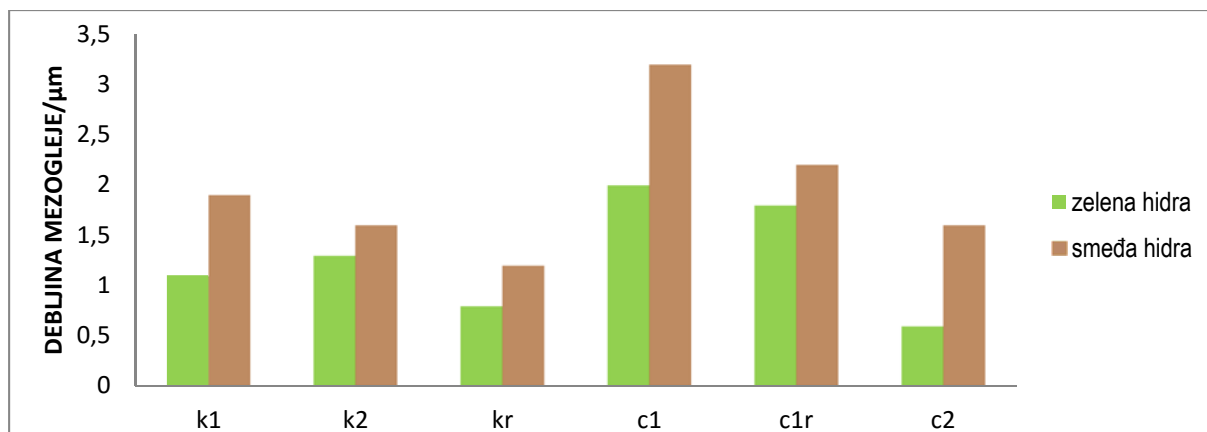
Zelena hidra tretirana norflurazonom koncentracijom  $2 \times 10^{-6}$  mol/L je imala oštećen ektoderm i reducirani gastroderm, mezogleja je bila tanka i jedva vidljiva, izmjerene debljine 0,6  $\mu\text{m}$  (Slika 18). Smeđa hidra tretirana norflurazonom koncentracijom  $2 \times 10^{-6}$  mol/L je bila oštećena i dolazilo je do miješanja staničnih slojeva. Debljina mezogleje je bila 1,6  $\mu\text{m}$ . Stanice na histološkim preparatima nisu bile mjerljive. U miješanom uzorku pri ovoj koncentraciji zelena hidra je imala gigantsku lovku u raspadanju. Pojavio se pokušaj pupanja kroz ovarij. Mezogleja je bila amorfn, stanice gastroderma su bile ogromne ili reducirane. Ektoderma na nekim mjestima uopće nije bilo, a na drugima je bi jako izražen. Smeđa hidra u miješanom uzorku imala je amorfne stanične slojeve sa ponegdje dobro vidljivom mezoglejom. Stanice koje su bile dobro vidljive bile su prazne. Izbrojano je 5 zimogenih stanica.



**Slika 18.** Zelena hidra u miješanom uzorku tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L treći dan pokusa; strelica pokazuje oštećenje lovki koje su poprimile oblik rašlji.

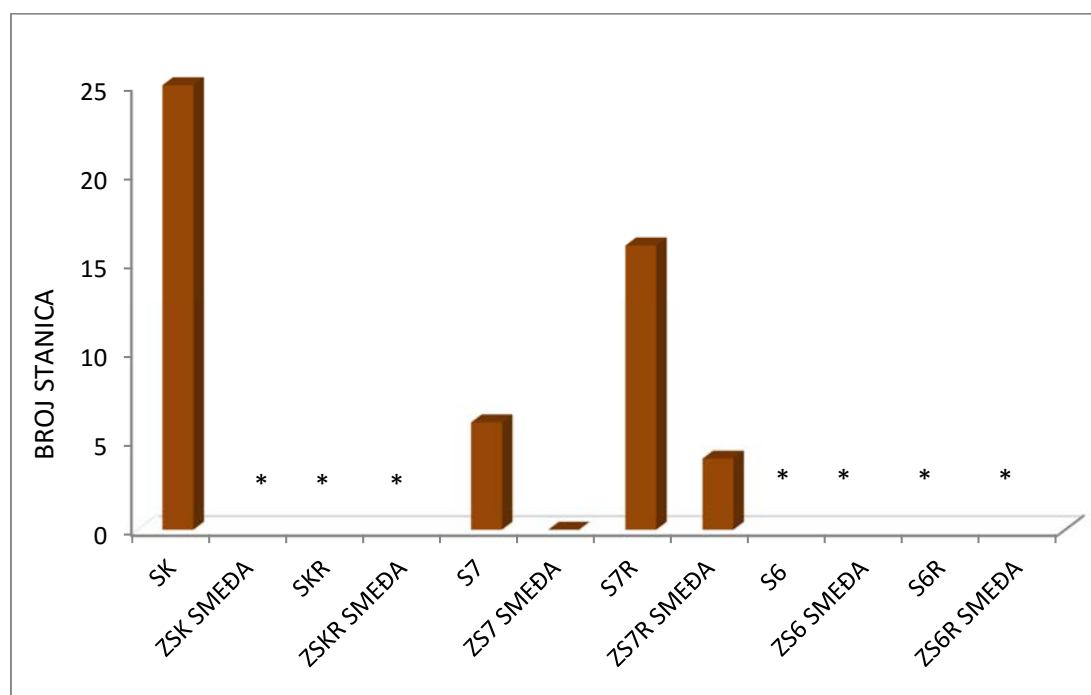
Uzorci zelene hidre tretirane norflurazonom koncentracijom  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračene su bile su jako oštećene i izmiješanih staničnih slojeva.

Smeđa hidra pri ovoj koncentraciji i zračena bila je izrazito oštećenih staničnih slojeva. Mezogleja je bila slabo vidljiva. U ektodermu su bile gomile intersticijskih stanica, a u gastrodermu zimogenih, ali toliko izmiješanih da nisu bile brojive. U miješanom uzorku pri ovim uvjetima zelena hidra je imala ektoderm u djelomičnoj regeneraciji sa praznim apikalnim dijelovima. Mezogleja je bila djelomično vidljiva, a u gastrodermu je bila amorfn masa stanica. Smeđa hidra u miješanom uzorku je imala intenzivnu regeneraciju u ektodermu. Mezogleja i gastoderm su bili oštećeni. U gastrodermu je bila masa amorfnih stanica (Slike 19-24).



**Slika 19.** Grafički prikaz debljine mezogleje u uzorcima zelene i smeđe hidre obrađene norflurazonom i UVB-zračenjem.

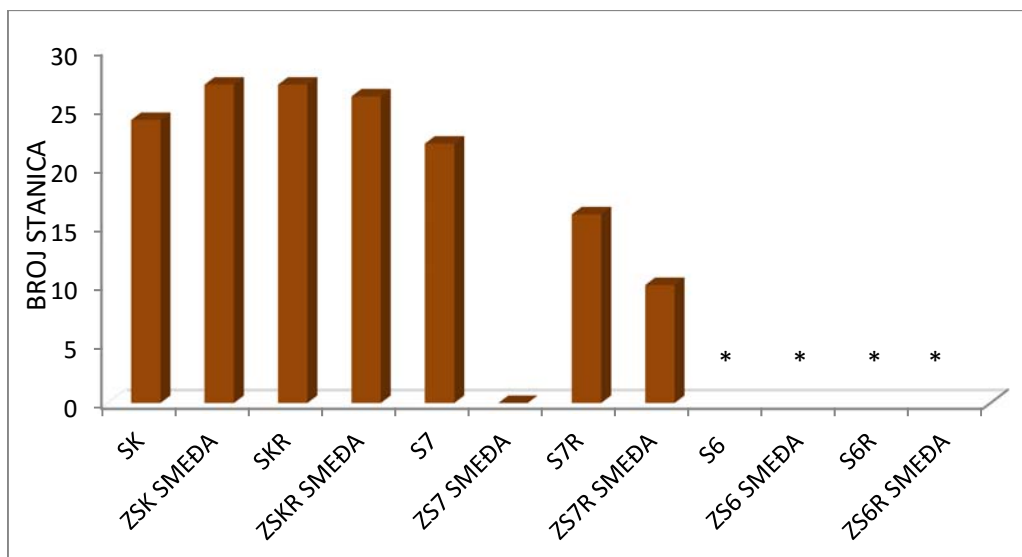
k1-kontrolni uzorak, k2-kontrolni uzorak u zajedničkoj posudi, kr-kontrolni uzorak zračen čime UVB-zračenjem, c1-uzorak tretiran otopinom norfluzona koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L  
 c1r- uzorak tretiran otopinom norfluzona koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L mol/L i zračen UVB-zračenjem, c2- uzorak tretiran otopinom norfluzona koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L



**Slika 20.** Broj stanica ektoderma hidre nakon obrade norflurazonom i UVB-zračenjem, stanice su izbrojane na odsječku dužine 100 μm.

SK - smeđa hidra - kontrolni uzorak, ZSK SMEĐA - smeđa hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, SKR- smeđa hidra – zračena, ZSKR SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, S7- smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7 SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, S7R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, ZS7R SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, S6 - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6 SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, S6R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, ZS6R SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen

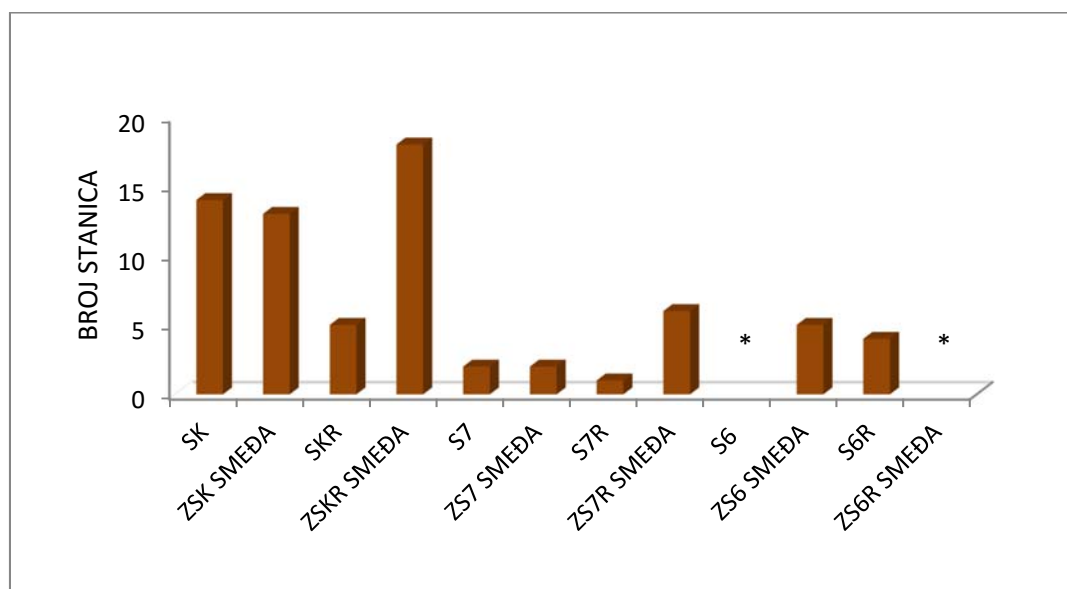
\*- označava uzorke u kojima stanice nije bilo moguće izbrojati



**Slika 21.** Broj stanica gastroderma hidre nakon obrade norflurazonom i UVB-zračenjem, stanice su izbrojane na odsječku dužine 100  $\mu\text{m}$ .

SK - smeđa hidra - kontrolni uzorak, ZSK SMEĐA - smeđa hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, SKR- smeđa hidra – zračena, ZSKR SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, S7- smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7 SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, S7R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, ZS7R SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, S6 - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6 SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, S6R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, ZS6R SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen

\*- označava uzorke u kojima stanice nije bilo moguće izbrojati



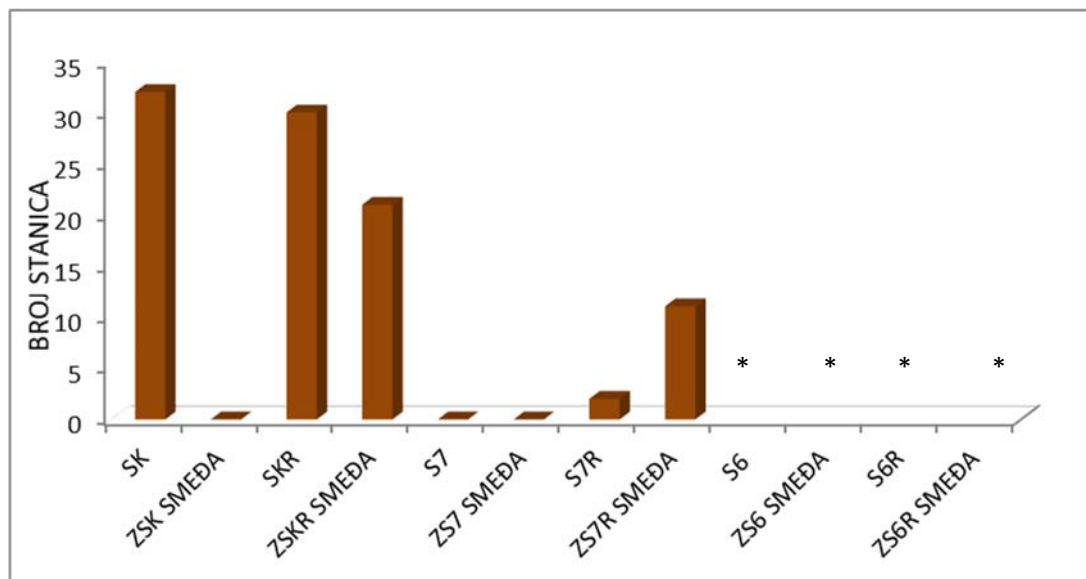
**Slika 22.** Broj zimogenih stanica hidre izbrojanih nakon obrade norflurazonom i UVB-zračenjem, stanice su izbrojane na odsječku dužine 100  $\mu\text{m}$ .

SK - smeđa hidra - kontrolni uzorak, ZSK SMEĐA - smeđa hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, SKR- smeđa hidra – zračena, ZSKR SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, S7- smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7 SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, S7R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, ZS7R SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, S6 - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6 SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, S6R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, ZS6R SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen



2x10-6 mol/L i zračena, ZS6R SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije 2x10-6 mol/L i zračen

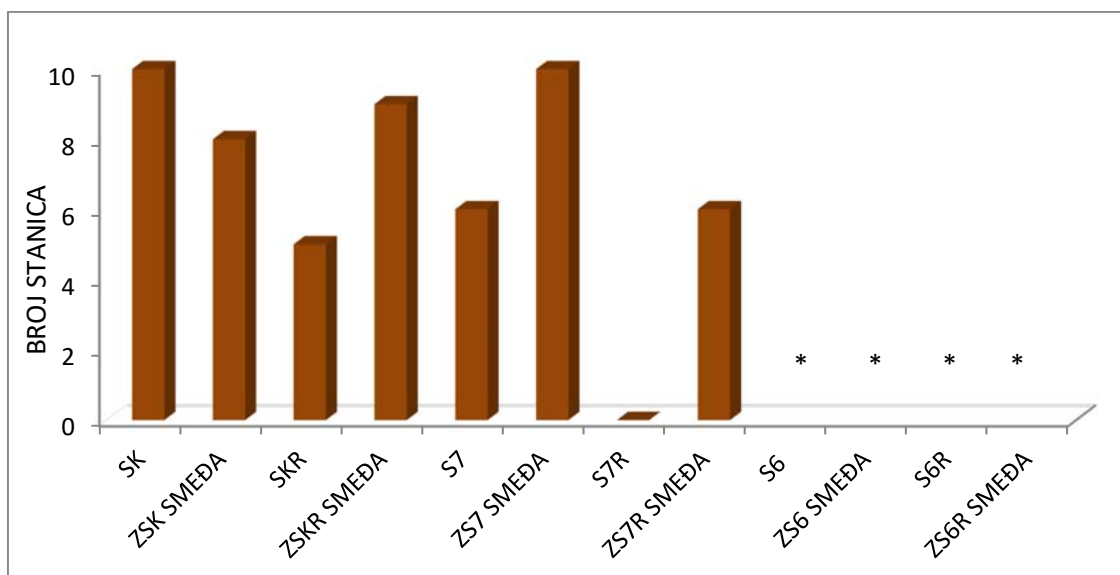
\*- označava uzorke u kojima stanice nije bilo moguće izbrojati



**Slika 23.** Broj intersticijskih stanica hidre nakon obrade norflurazonom i zračenjem, stanice su izbrojane na odsječku dužine 100 μm.

SK - smeđa hidra - kontrolni uzorak, ZSK SMEĐA - smeđa hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, SKR- smeđa hidra – zračena, ZSKR SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, S7- smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije 2x10-7 mol/L, ZS7 SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije 2x10-7 mol/L i zračen, S7R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije 2x10-7 mol/L i zračena, ZS7R SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije 2x10-7 mol/L i zračen, S6 - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije 2x10-6 mol/L, ZS6 SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije 2x10-6 mol/L i zračen, S6R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije 2x10-6 mol/L i zračena, ZS6R SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije 2x10-6 mol/L i zračen

\*- označava uzorke u kojima stanice nije bilo moguće izbrojati



**Slika 24.** Broj žarnih stanica hidre nakon obrade norflurazonom i UVB-zračenjem, stanice su izbrojane na odsječku dužine 100 μm.

SK - smeđa hidra - kontrolni uzorak, ZSK SMEĐA - smeđa hidra - kontrolni uzorak u zajedničkoj posudici, SKR- smeđa hidra – zračena, ZSKR SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici zračen, S7- smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, ZS7 SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, S7R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračena, ZS7R SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i zračen, S6 - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, ZS6 SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, S6R - smeđa hidra - tretirana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračena, ZS6R SMEĐA - smeđa hidra - uzorak u zajedničkoj posudici tretiran norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i zračen

\*- označava uzorke u kojima stanice nije bilo moguće izbrojati

### **3.3 Razvoj testova za detekciju promjena onkogeni**

Izolati DNA svih uzoraka bili su zadovoljavajućih koncentracija ( $c=80 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) i čistoća ( $A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0$ ) potrebnih za umnažanje lančanom reakcijom polimerazom. Korištenjem različitih početnica, vrsta polimeraze i uvjeta reakcija PCR-a nisu dobivena umnažanja željenih fragmenata oba istraživana gena.

## 4. RASPRAVA

Ovo je prvo dokumentirano istraživanje u kojem se utvrđenim mutagenom i toksičnim ksenobiotikom pokušalo izazvati izrasline na tijelu hidre. U ovom radu istražen je učinak dvije koncentracije vodene otopine norflurazona na endosimbiotsku zelenu hidru (*Hydra viridissima* Pallas, 1766) i slobodnoživuću smeđu hidru (*Hydra oligactis* Pallas, 1766). Istražen je i učinak UVB-zračenja na ove dvije vrste kao i sinergistički utjecaj otopine norflurazona i zračenja. Također je proučavan i utjecaj norflurazona i UVB-zračenja kada su u posudu s hidrama dodane i slobodnoživuće alge *Chlorella vulgaris* i endosimbiotske alge *Mychonastes homosphaera* kao i obje vrste zajedno. Uočeno je da izlaganje hidre norflurazonu i/ili UVB-zračenju izaziva promjene u ponašanju hidre, histomorfološka oštećenja, a u nekim slučajevima i smrtnost.

Migracija je način izbjegavanja nepovoljnih uvjeta u okolišu, tako su i hidre migrirale prema površini (Burnett, 1973) ili pri velikim oštećenjima ostale na samom dnu posudice. Najveća migracija prema površini uočena je kod smeđe hidre tretmanom s obje koncentracije norflurazona. Uzorci koji su bili zračeni pokazuju manji postotak migracije. Zelena hidra je više migrirala u posudicama gdje je bila zajedno sa smeđom hidrom. U posudicama s algama nalazimo bolju migraciju zelenih hidri neovisno o kojoj se vrsti alge radi. Migracija je uočena u tretiranim i zračenim uzorcima i to tako da su zelene hidre na neki način „bježale“ od algi i lijepile se na uspravni rub posude, dok su alge u više ili manje obliku nakupina bile na dnu. Smeđe hidre su uglavnom bile u položaju u kojem su se nalazile na početku pokusa. Migracija hidri prema površini i pronalasku povoljnijeg mikrookoliša je podrazumijevala da oštećenja nisu bila velika jer su se hidre mogle kretati u stupcu vode. Velika oštećenja su onemogućila kretanje hidri i radi toga su jako oštećeni uzorci bili na dnu. Prije ugibanja hidre su isključivo bile na dnu. U prirodnim staništima rijetko se nalazilo zelene i smeđe hidre na istom mjestu. Zelena i smeđa hidra su se i u mikrookolišu ponašale kao u prirodnom staništu odnosno prisustvo smeđe hidre je poticalo zelenu na veću migraciju. Simbiotska zelena hidra je migrirala, a prisustvo algi ju je na neki način poticalo na migraciju. Moguće je da je zelena hidra doživljavala obje vrste algi kao toksikant jer te alge nisu bile pogodne za uspostavu simbioze, u ovom slučaju. Veći broj jedinki smeđe hidre nego zelene je bio na dnu posudice i obje vrste su bile okružene sa dosta sluzi posebno zadnjeg dana pokusa. Sluz luče mioepitelne stanice ektoderma i to je način kako se hidre rješavaju toksikanta.

Stanice lovki su male i pločaste pa su najveća oštećenja zabilježena na lovkama i to kod obje vrste hidri u zračenim uzorcima. Zabilježene su i izrasline na lovkama ili su poprimile

rašljasti oblik. Isti trend oštećenja lovki od prvog dana koji se povećava k trećem u zračenim uzorcima je primijećen i u posudicama s algama. U posudicama sa slobodnoživućom algom oštećenje je bilo manje.

Kontrakcija i relaksacija su mehanizmi obrane od nepovoljnih uvjeta života (Žnidarić i sur., 1995). U zračenim uzorcima zelena hidra je imala kontrahirani izgled tijekom sva tri dana. Smeđa hidra je bila manje kontrahirana i brže se vraćala u relaksiran položaj u zračenom uzorku. Kontrakcije su posljedica reakcije difuznog živčanog sustava hidre pri čemu životinja cijelim tijelom reagira na mehanički podražaj u okolnom mediju i nepolarno ih provodi u svim smjerovima (Burnett, 1973). Kod malog postotka smeđih hidri tretiranih manjom koncentracijom norflurazona i/ili u zračenim primijećen je efekt izbjeljivanja jedinki. Taj učinak primijećen je i kod tretiranja smeđe hidre antibioticima (Kovačević i sur., 2001). Kontrahirani izgled imale su i zračene zelene hidre u posudicama s algama, a u nekim slučajevima i smeđa, ali samo prvog dana, sljedećih dna pokusa nije više bilo kontrahiranih oblika. Moguće je da je razlog tomu što i alge apsorbiraju UVB-zračenje i radi toga su hidre bile manje izložene UVB-zrakama. Primijećen je i mali broj jedinki smeđe hidre u zračenim uzorcima koje su bile izrazito deformirane. Takav izgled je potrajao tijekom cijelog pokusa. Takve hidre su imale i izrasline po tijelu.

Odgovor na mehanički podražaj iglicom dobar je parametar za mjerenje oštećenja živčanog sustava hidre. Tijekom pokusa odgovor na mehanički podražaj je bio slabiji u zračenim jedinki zelene hidre. Pri tretiranju samo norflurazonom veće koncentracije obje vrste hidre su imale loš odgovor na mehanički podražaj. U pokusu s algama najlošiji je odgovor prvog dana u svim posudicama sa zračenim uzorcima posebno zelene hidre. Površina zelene hidre je manja nego smeđe i moguće je da su radi toga bila veća oštećenja zelene hidre izložene UVB-zračenju jer toksikant može brže prodrijeti kroz tijelo zelene hidre.

Pupanje kao primjer nespornog razmnožavanja zabilježen u malom postotku kod svih uzoraka zelenih i smeđih hidri tretiranih norflurazonom i/ili zračenih. Pupanje je zabilježeno i u posudicama s algama bez posebne pravilnosti u odnosu na vrstu hidri, algi ili dan pokusa. Jedino je postotak jedinki koje su pupale po jednoj posudici bio veći nego u uzorcima bez algi. Hidre pupaju kada su povoljni uvjeti u okolišu tj. kada nema potrebe za izmjenom genetskog materijala. Ako gledamo samo ovo svojstvo, uvjeti su bili povoljniji u posudicama s algama. Spolno razmnožavanje zabilježeno je u nižem postotku kod skoro svih zelenih hidri i to najviše drugog dana, a tad je zabilježeno i kod smeđe hidre tretirane nižom koncentracijom norflurazona u malom postotku. Spolno razmnožavanje znači izmjenu genetskog materijala i

stvaranje novih svojstava u nepovoljnim uvjetima. Nije zabilježeno u posudicama s algama što ide u prilog zaključku da su u posudicama s algama bili bolji uvjeti za hidre.

Zračenje je izazvalo velika histološka oštećenja s izrazitim miješanjem staničnih slojeva. Kod zelene hidre narušena je bila simbioza i nađeni su prazni lumeni stanica. Kod smeđe hidre vide se velika oštećenja ektoderma što je i očekivano budući da je on prvi u kontaktu s UVB-zrakama. Kod tretmana norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L zabilježeno je da je mezogleja deblja nego kod kontrolnog uzorka, posebno u nezračenim zelenim i smeđim hidrama. Oštećenja nisu bila velika pa nije bilo potrebe za dijeljenjem stanica. Intersticijske i zimogene stanice nije bilo moguće izbrojati u uzorcima smeđe hidre tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i UVB-zračenjem što znači da je tada bilo najveće oštećenje u tkivu hidre. Smrtnost je zabilježena kod malog broja jedinki isključivo zelene hidre u posudicama bez algi. U posudicama sa algama zabilježena je veća smrtnost, ali ne kao u prijašnjim istraživanjima (Kovačević i sur., 2008). Smrtnost je bila isključivo u zračenim uzorcima. Zračenje je u svim uzorcima izazivalo veće oštećenje nego samo tretman norflurazonom. Radi čega u ovom istraživanju nije došlo do veće smrtnosti kod hidre mogli bi saznati sekvenciranjem genoma ove populacije i populacije koja je imala veću smrtnost i pronaći odgovor u eventualnoj genskoj varijabilnosti. Također bi mogli utvrditi i koliko je genetički identičnih jedinki (klonova) bilo pristuno u ovom istraživanju i istražiti da li baš te hidre imaju veću otpornost na norflurazon od jedinki koje ugibaju. Kod preživjelih tretiranih hidri trebalo bi istražiti i apoptozu u odnosu na kontrolu i vidjeti da li je ona povećana. To bi moglo pojasniti relativnu otpornost ove populacije hidri na UVB-zračenje i tretman norflurazonom.

U posudicama s algama je primijećeno da alge formiraju nakupine što je praćeno kroz sva tri dana. I slobodnoživuća i simbiotska alga u određenim posudicama su homogeno obojale otopinu u zeleno. U posudicama s obje vrste zajedno to nije uočeno. Najviše nakupina uočeno je u posudicama gdje su obje vrste bile zajedno, a u posudicama gdje je svaka vrsta algi bila posebno bilo je podjednako nakupina.

Rađena su različita istraživanja na test organizmima beskralježnjacima; hidrama (Kalafatić i Kopjar, 1995, Kalafatić, 1997), plošnjacima (Kovačević i sur., 2009), te kralježnjacima poput riba (Gregorović i sur., 2008) o utjecaju teških metala ili antibiotika na njih. Rezultati tih istraživanja potvrđuju da i dugotrajna izloženost dozvoljenim koncentracijama ili kratkotrajna izloženost većima koncentracijama od dozvoljene (Kovačević i sur., 2009) ostavljaju različita reverzibilna i ireverzibilna oštećenja u metaboličkim ili drugim procesima kod promatranih test životinja.

Veličina pojedinog organizma je jedna od ključnih karakteristika koja će utjecati na odgovor tog organizma na UVB-zračenje jer se ono apsorbira po jedinici površine. Radi toga je bilo za očekivati da će UVB-zračenje proizvesti puno veća oštećenja pa izazvati i veću smrtnost kod zelene hidre jer je on manja nego smeđa. Rezultati ovog pokusa nisu bili takvi, a pretpostavka je da je to bilo radi toga jer je zelena hidra simbiotski organizam holobiont.

Jedini dostupni referentni genom hidre je onaj vrste *Hydra vulgaris*. S obzirom na očekivanu evolucijsku očuvanost onkogeni *Myc1* i *Myc2* u rodu *Hydra*, kreirane su početnice za umnažanje tih gena u ispitivanim vrstama. Bez obzira na adaptaciju uvjeta umnažanja i ostalih varijabli lančane reakcije, polimerazom nije bilo moguće umnožiti navedene gene i sekvencirati ih. Slični radovi nisu nađeni u literaturi pa je jedini način detaljne analize mutacija genoma istraživanih vrsta sekvenciranje njihovih genoma *de novo*. Tako je kao dio ovog diplomskog rada bilo moguće procijeniti utjecaj UVB-zračenja i norflurazona samo na morfološkoj tj. citološkoj razini, a genetički dio ostaje kao mogućnost istraživanja u budućnosti.

## 5. ZAKLJUČAK

Biologija zelene i smeđe hidre proučavala se nakon obrade norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L i  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i UVB-zračenjem nakon 1-3 dana.

1. Zelena hidra se spolno razmnožavala u svim uvjetima uzgoja, a smeđa samo drugog dana pokusa tretmanom norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L što ukazuje na nepovoljne uvjete mikro-okoliša. Zelena hidra se bolje prilagođavala nepovoljnim uvjetima. U posudicama s algama nije došlo do spolnog razmnožavanja.
2. Nespolno razmnožavanje je zabilježeno u manjem broju u svim uvjetima tretmanima za obje vrste hidre podjednako.
3. Kao odgovor na tretman norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L smeđa hidra je migrirala više nego zelena, dok je migracija zelene hidre bila veća kada je bila u miješanom uzorku.
4. Najveća oštećenja su bila prisutna za obje vrste hidre pri sinergističom djelovanju norflurazona koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i UVB-zračenja.
5. Umnožavanje gena *Myc1* i *Myc2* pomoću početnica kreiranih na temelju referentnog genoma vrste *Hydra vulgaris* nije bilo moguće za istraživane vrste hidre.
6. Kod zelene hidre tretirane UVB-zračenjem uočene su potencijalne izrasline na tijelu i lovkama.
7. Debljina mezogleje je bila najtanja u zračenom uzorku zelene i smeđe hidre a najdeblja u tretmanu norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-7}$  mol/L za obje vrste što ukazuje da norflurazon može utjecati na promjenu debljine mezogleje hidre.
8. Intersticijske i zimogene stanice nije bilo moguće izbrojati u uzorcima smeđe hidre tretiranim norflurazonom koncentracije  $2 \times 10^{-6}$  mol/L i UVB-zračenjem što ukazuje na velika oštećenja tkiva smeđe hidre.

## 6. LITERATURA

Barić K., Ostojić Z. (2017): Herbicidi. U: Pregled sredstava za zaštitu bilja u Hrvatskoj za 2017. godinu. Glasilo biljne zaštite **1-2**: 225-285.

Burnett A.L. (1973): Biology of hydra. Academic Press, New York i London..

Čeović R., Pašić A., Lipozenčić J., Kostović K., Murat Sušić S., Skerlev M., Husar K. (2008): Fototerapija u liječenju dermatoza dječje dobi. Paediatr Croat **52**: 115.

Domazet-Lošo T., Klimovich A., Anokhi B., Anton-Erxleben F., Hamm Maillin J., Lange C., Bosch Thomas C.G. (2014): Naturally occurring tumours in the basal metazoan Hydra. Nat Commun **5**: 4222-4230.

Douglas A.E. (1994): Symbiotic Interactions. Oxford University Press Inc, Oxford i New York.

Dunn K. (1987): Growth of endosymbiotic algae in the green hydra, *Hydra viridissima*. J Cell Sci **88**: 571-578.

Erben R., Lajtner J. (1995): Akvatički testovi toksičnosti. Hrvatska vodoprivreda **28**: 30-32.

Gregorović G., Kralj-Klobučar N., Kopjar N. (2008): A histological and morphometric study on the tissue and cellular distribution of iron in carp *Cyprinus carpio* L. During chronic waterborne exposure. J Fish Biol **72**: 1841-1846.

Handa S., Nakahara M., Tsuboa H., Deguchi H., Masuda Y., Nakano T. (2006): *Choricystis minor* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) as a symbiont of several species of freshwater sponge. Hikkobia **14**: 365-373.

Hartl M., Glasauer S, Valovka T, Breuker K., Hobmayer B., Bister K. (2014): Hydra *Myc2*, a unique pre-bilaterian member of the myc gene family, is activated in cell proliferation and gametogenesis. Biol Open **25**: 397-407.



Holstein M., Emschermann P. (1995): Cnidaria: Hydrozoa, Kamptozoa. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Horvat T., Kalafatić M., Kopjar N., Kovačević G. (2005): Toxicity testing of herbicide norflurazon on an aquatic bioindicator species - the planarian *Polycelis felina* (Daly.). *Aquat toxicol* **73**: 342-352.

Hwang J.S., Ohyanagi H., Hayakwa S., Osato N., Nishimiya-Fujisawa C., Ikeo K., David C.N., Fujisawa T., Gojobori T. (2007): The evolutionary emergence of cell type-specific genes inferred from the gene expression analysis of *Hydra*. *PNAS* **104**: 14735-14740.

Kalafatić M., Kopjar N. (1995): Response of green hydra to pirimicarb. *Biol Bratislava* **50**: 289-292.

Kalafatić M. (1997): Regeneration and asexual reproduction of *Hydra oligactis* treated with different pesticides. *Biol Bratislava* **52**: 475-480.

Kalafatić M., Kovačević G., Ljubešić N., Šunjić H. (2001): Effects of ciprofloxacin on green hydra and endosymbiotic alga. *Period Biol* **103**: 267-272.

Kalafatić M., Kovačević G., Zupan I., Franjević D. (2003) Effect of repeated UV-irradiation on *Hydra oligactis* Pallas. *Period Biol* **105**: 171-175.

Lui A., Žnidarić D. (1973): The role of zygote cells in hydra exposed to ultraviolet light. *Z mikrosk anat Forsch* **87**: 367-376.

Koizumi O. (2002): Developmental neurobiology of hydra, a model animal of Cnidarians. *Can J Zool* **80**: 1678-1689.

Kovačević G., Ljubešić N., Kalafatić M. (2005): Newly described mechanisms in hydra-alga symbiosis. *U: Bosch TGC Bosch, Holstein T.W., David C.N. (ur.) Abstract book of the International Workshop Hydra and the Molecular Logic of Regeneration. Tutzing, DFG, 95.*

Kovačević G., Gregorović G., Kalafatić M., Jaklinović I. (2009): The Effect of Aluminium on the Planarian *Polycelis Felina* (Daly.). *Water Air Soil Pollut* **196**: 333-344.

Kovačević G., Franjević D., Jelenčić B., Kalafatić M. (2010a): Isolation and cultivation of endosymbiotic algae from green hydra and phylogenetic analysis of 18S rDNA sequences. *Folia Biol (Kraków)* **58**: 135-143.

Kovačević G., Kalafatić M., Jelenčić B., Franjević D. (2010b): Endosymbiotic alga as the stronger evolutionary partner in green hydra symbiosis. *J of Endocyt Cell Res* **20**: 13-15.

Kuznetsov S., Lyanguzowa M., Bosch T.C.G. (2001): Role of epithelial cells and programmed cell death in Hydra spermatogenesis. *Zoology* **104**: 25-31.

Krajčović J., Ebringer L., Polony J. (1989): Quinolones and coumarins eliminate chloroplasts from *Euglena gracilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **33**: 1883-1889.

Maceljčki M., Hrlec G., Ostojić Z.; Cvjetković B. (1997): Pregled sredstava za zaštitu bilja u Republici Hrvatskoj za 1997. godinu. *Glasnik zaštite bilja* **(3-4)**: 93-212.

Margulis L., Sagan D. (2002): *Acquiring Genomes: A Theory of the Origin of Species*, Basic Books, New York.

Matoničkin I. (1978): *Beskralješnjaci. Biologija nižih avvertebrata. Školska knjiga, Zagreb.*

Müller-Parker G., Pardy R.L. (1987): The green hydra symbiosis: analysis of a field population. *Biol Bull* **173**: 367-376.

O'Brien T.L. (1982): Inhibition of vacuolar membrane fusion by intracellular symbiotic algae in *Hydra viridis* (Florida strain). *J Exp Zool* **223**: 211-218.

Petrović M., Tomašić V., Macan J.; (2013) *Analitika okoliša, HINUS & Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, Hrvatska: 51-101.*

Reisser W., Wiessner W. (1984): Autotrophic eukaryotic freshwater. U: Linskens HF, Heslop-Harrison J (ur.) Cellular interactions, Encyclopedia of plant physiology (new series). Berlin, Heidelberg, New York, Springer 59-90.

Savin M.C. i Amador J.A. (1998): Mineralization of Norflurazon in a Cranberry Bog Soil: Laboratory Evaluations of Management Practices. J Environ Qual **27**:1234-1239

Siebert S., Anton-Erxleben F. and Bosch T.C.G. (2007): Cell type complexity in the basal metazoan Hydra is maintained by both stem cell based mechanisms and transdifferentiation. Dev Biol **313**: 13-24.

Thurman E. M., Bastian K. C., Mollhagen T. (2000): Occurrence of cotton herbicides and insecticides in playa lakes of the High Plains of West Texas. Sci Total Environ **248(2-3)**: 189-200.

Zamarovsky V. (1985): Junaci antičkih mitova. Školska knjiga, Zagreb.

Zhang X., Zhang J., Li L., Sarras MP. Jr (2005): Biogenesis of hydra mesoglea and its functions in regeneratio. U: Bosch TCG, Holstein TW, David CN (ur.) Abstract Book of the International Worksop Hydra and the Molecular Logic of Regeneratio. Tutzing, DFG, 22.

Žnidarić D. (1970): Comparison of the regeneratio of the hypostome with the budding process in Hydra littoralis. Roux Arch **166**: 45-53.

Žnidarić D. (1971): Regeneration of the foot. I *Hydra littoralis*. Z mikrosk anat Forsch **84**: 503-510.

Zacharias H., Anokhin B., Khalturin K. and Bosch T.C.G. (2004) Genome sizes and chromosomes in the basal metazoan Hydra. Zoology **107**: 219–227.

[www.tutorvista.com](http://www.tutorvista.com), pristupljeno 2010.

[www//imagej.nih.gov/ij](http://www//imagej.nih.gov/ij), pristupljeno svibanj, 2018.

[www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/) pristupljeno svibanj, 2017.

[www.pmp.cce.cornell.edu](http://www.pmp.cce.cornell.edu), pristupljeno svibanj, 2018.

## **ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 16.07.1974. u Senju gdje sam pohađala i osnovu školu. Maturirala sam 1992. u zagrebačkoj 10. gimnaziji (danas gimnazija Ivan Supek). Visoko zdravstveno učilište upisujem 1995., smjer laboratorijska dijagnostika koje završavam 1998. Pripravnički staž obavljam u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBCa Rebro 1999., a od 2000. sam i zaposlena u istoj ustanovi u hitnom laboratoriju do 2011. Iste godine i diplomirala sam na Biološkom odsjeku PMFa smjer profesor biologije i kemije. Od 2012.-2016. zaposlene sam u Odjelu za multidisciplinarnu primjenu kromatografije u KZLD KBCa Rebro. Dodiplomski studij molekularne biologije na PMFupisujem 2014. gdje sam trenutno apsolvent. Od 2017. zaposlena sam u Odjelu za citogenetiku KZLD KBCa Rebro.