

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Antonija Matek

**Optimizacija umjetnog osvjetljenja u uzgoju laboratorijskih
kultura dijatomeja
Achnanthes elongata i *Poulinea lepidochelicola***

Zagreb, 2020.

Ovaj rad je izrađen u Botaničkom i Zoologijskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Sunčice Bosak i doc. dr. sc. Romane Gračan. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre Ekologije i zaštite prirode.

ZAHVALE

Zahvaljujem se dragoj mentorici i profesorici Sunčici Bosak na pomoći, savjetima i podršci koju mi je pružila tijekom preddiplomskog i diplomskog studija. Hvala ti na izvrsnom vodstvu kroz realizaciju eksperimenta i pisanje diplomskog rada. Sretna sam što si mi pružila priliku da sudjelujem u TurtleBIOME projektu i naučim puno novih vještina u laboratoriju i radu u timu. Najviše hvala na predivnom prijateljstvu koje smo putem stvorile.

Hvala mentorici i profesorici Romani Gračan na pomoći pri pisanju i usavršavanju diplomskog rada. Cijenim tvoje izdvojeno vrijeme provedeno tijekom čitanja mog diplomskog rada, i veliko hvala na mnogim tvojim savjetima koji su me dodatno obogatili sa znanjem o pisanju znanstvene i stručne literature.

Posebno hvala doktorantici Klari Filek za veliku pomoć pri učenju tehnike izolacije algi, i mnogih drugih tehnika u laboratoriju koje su mi bile potrebne za uspješno provođenje eksperimenta i pisanje diplomskog rada. Uvijek si detaljno odgovorila na sva moja pitanja i bila spremna dati informativan savjet. Osim što si me naučila puno o radu u laboratoriju, pomogla si mi i naučiti nove vještine u analizi podataka. Veliko hvala na ogromnom znanju koje si mi prenijela i koje će mi sigurno koristiti u daljnjem obrazovanju i poslu. Najviše ti se zahvaljujem na tvojemu vremenu koje si izdvojila za mene uz sve svoje obaveze, te na prijateljstvu i ugodnom druženju.

Također, zahvaljujem se svim ostalim članovima TurtleBIOME projekta koje nisam spomenula, a čiji je rad omogućio provođenje eksperimenta ovog diplomskog rada. Projekt „Mikrobiom glavate želve (*Caretta caretta*): uvid u epizoičke i endozoičke zajednice“ UIP – 2017-05-5635 je financirala Hrvatska zaklada za znanost (HRZZ).

I na kraju se želim zahvaliti svojoj obitelji i prijateljima. Tijekom pet godina školovanja na PMF-u naučila sam puno toga što me zanimalo o biologiji i ekologiji. Studirala sam ono što volim, i zahvaljujem se svojim roditeljima i sestrama što su mi to omogućili i što su me podržali. Hvala svim mojim prijateljima koji su mi dodatno razveselili i obogatili studentske dane.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

OPTIMIZACIJA UMJETNOG OSVJETLJENJA U UZGOJU LABORATORIJSKIH KULTURA DIJATOMEJA *ACHNANTHES ELONGATA* I *POULINEA LEPIDOCHELICOLA*

Antonija Matek
Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Dijatomeje su jednostanični fotoautotrofni eukariotski organizmi koji nastanjuju plankton i bentos slatkovodnih i morskih ekosustava. Zajednice epizojskih dijatomeja također nastanjuju površine životinja poput ptica, kitova, te slatkovodnih i morskih kornjača. Vrste *Achnanthes elongata* i *Poulinea lepidochelicola* su nedavno opisane nove vrste dijatomeja s oklopa morskih kornjača. Stoga je cilj ovog istraživanja bio utvrditi optimalno umjetno osvjetljenje za laboratorijski uzgoj monokultura dvije tek opisane vrste dijatomeja, izolirane s oklopa i kože glavate želve (*Caretta caretta*) iz Jadranskog mora. U eksperimentu su korištena 3 soja vrste *Achnanthes elongata* i 2 soja vrste *Poulinea lepidochelicola*. Za svaki soj inokulirana su 2 biološka replikata s poznatim brojem stanica. Kulture su smještene u zatvorenom sustavu komore za rast stanica u uvjetima LED svjetlosti dvije različite temperature: umjereno-bijele boje temperature 5000 K i bijele boje temperature 6500 K. Biološki replikati praćeni su 39-40 dana te je određivana njihova brojnost. Za sve ispitivane sojeve dobivene su krivulje rasta iz kojih su vidljive faza prilagođavanja, eksponencijalna faza, te faza mirovanja. Stope rasta svih sojeva bile su unutar intervala od 0,30 - 0,58 dioba po danu, a vremena udvostručenja populacija od 1,31-2,28 dana. Rezultati ovoga rada pokazuju da sojevi obje vrste dijatomeja postižu veću gustoću i bolji rast ukoliko se u laboratoriju uzgajaju pri umjereno-bijeloj LED svjetlosti temperature 5000 K.

(58 stranica, 24 slika, 6 tablica, 32 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: epizojske dijatomeje, temperatura svjetlosti, stopa rasta

Voditelji: Doc.dr.sc. Sunčica Bosak i doc.dr.sc. Romana Gračan

Ocjenitelji: 1. Doc. dr. sc. Sunčica Bosak

2. Doc. dr. sc. Romana Gračan

3. Doc. dr. sc. Tomislav Ivanković

Rad prihvaćen: 19. veljače 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

OPTIMIZATION OF ARTIFICIAL LIGHT IN THE CULTIVATION OF LABORATORY DIATOM CULTURES *Achnanthes elongata* AND *Poulinea lepidochelicola*

Antonija Matek
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Diatoms are photoautotrophic eukaryotic microorganisms that are inhabiting phytoplankton and phytobentos of freshwater and marine ecosystems. Epizoic diatom communities are found on animals such as birds, whales, freshwater and sea turtles. Species *Achnanthes elongata* and *Poulinea lepidochelicola* are newly described epizoic diatoms living on the carapaces of sea turtles. The aim of the research was to determine the optimal artificial light for the cultivation of monocultures of these recently described diatoms isolated from the carapace and skin of loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) from the Adriatic Sea. Three strains of *Achnanthes elongata* and two strains of *Poulinea lepidochelicola* were chosen for the experiments, and for each strain two biological replicates were used. The experiment started with a known number of cells inoculated for each replicate. Samples were placed in the closed culture room system with two different LED light illumination: the cold white light temperature 5000 K and warm white light temperature 6500 K. Biological replicates were observed for 39-40 days and diatom cells were counted. Growth curves were obtained that show different phases of growth: lag phase, exponential phase and stationary phase. The growth rates of all strains were within range of 0,30-0,58 division per day and doubling population times ranged between 1,31 and 2,28 days. Strains from both species grow better and achieve larger cell numbers under warm white light temperature 5000 K.

(58 pages, 24 figures, 6 tables, 32 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: epizoic diatoms, light temperature, growth rate

Supervisors: Dr. Sunčica Bosak, Asst. Prof. and Dr. Romana Gračan, Asst. Prof.

Reviewers: 1. Dr. Sunčica Bosak, Asst. Prof.

2. Dr. Romana Gračan, Asst. Prof.

3. Dr. Tomislav Ivanković, Asst. Prof.

Thesis accepted: 19 February 2020

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 DIJATOMEJE	1
1.1.1 Morfološke i fiziološke karakteristike dijatomeja.....	1
1.1.2 Životni ciklus	3
1.1.3 Rasprostranjenost i staništa dijatomeja.....	4
1.1.4 Epizojske dijatomeje morskih kornjača	5
1.1.5 Morfološke značajke vrsta dijatomeja <i>Poulinea lepidochelicola</i> Majewska, De Stefano & Van de Vijver i <i>Achnanthes elongata</i> Majewska & Van de Vijver	5
1.2 LABORATORIJSKI UZGOJ KULTURA ALGI	8
1.2.1 Povijesni razvoj tehnika uzgoja kultura algi	8
1.2.2 Recentne metode izolacije, uzgoja i pročišćavanja monokultura algi.....	8
1.3. UVJETI ZA RAST MIKROALGI U LABORATORIJU.....	11
1.3.1 Medij za rast stanica	11
1.3.2 Uvjeti uzgoja kultura - temperatura	12
1.3.3 Boja, intenzitet i ciklus svjetla.....	12
1.4 EKSPERIMENTALNA PRIMJENA MONOKULTURA MIKROALGI.....	15
1.4.1 Određivanje novih vrsta morfološkim i molekularnim analizama	15
1.4.2 Istraživanja utjecaja abiotičkih čimbenika na fiziologiju i ekologiju vrste.....	15
1.4.3 Eksperimentalne metode određivanja broja i biomase stanica u kulturi ...	16
1.5 CILJ ISTRAŽIVANJA	19
2. MATERIJALI I METODE	20
2.1 Uzimanje živih uzoraka za izolaciju	20
2.2 Izolacija stanica dijatomeja u monokulture.....	21
2.3 Tehnike čišćenja monokultura od neželjenih organizama	22
2.4 Definiranje sojeva i postavljanje komore za eksperiment	24
2.5 Postavljanje i provođenje eksperimenta.....	26
2.6 Metoda brojanja stanica i praćenje podataka	27
2.7 Izrada krivulja rasta i statistička analiza.....	30
3. REZULTATI	32
3.1 Slike živih stanica eksperimentalnih sojeva vrsta <i>Achnanthes elongata</i> i <i>Poulinea lepidochelicola</i>	32
3.2. Krivulje rasta eksperimentalnih sojeva za oba svjetlosna uvjeta	36
3.3 Eksponencijalni rast eksperimentalnih sojeva.....	39

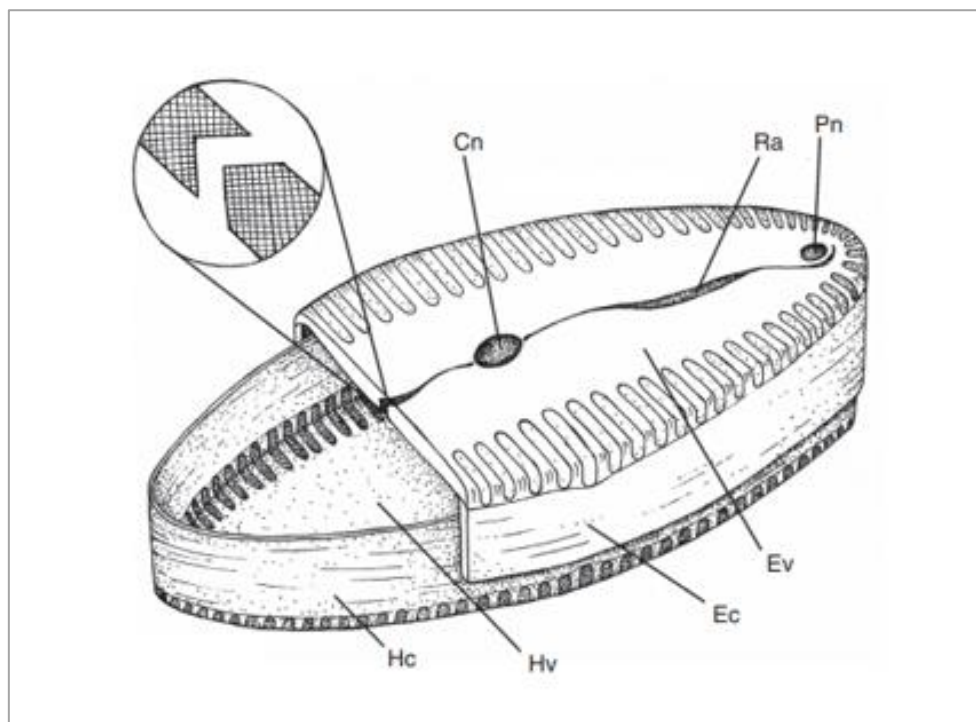
3.4	Stope rasta eksperimentalnih sojeva i statistička analiza	41
3.5	Gustoće stanica eksperimentalnih sojeva zadnji dan brojanja	45
4.	RASPRAVA	48
4.1.	Morfološke razlike i sličnosti sojeva vrsta <i>Achnanthes elongata</i> i <i>Poulinea lepidochelicola</i>	48
4.2	Usporedba faza krivulja rasta između eksperimentalnih sojeva	49
4.3	Utjecaji abiotičkih i biotičkih parametara na stope rasta dijatomeja	49
4.4	Optimalni svjetlosni uvjet za laboratorijski uzgoj dijatomeja	51
4.5	Čimbenici rasta eksperimentalnih sojeva.....	52
4.6	Utjecaj svjetlosnih uvjeta na gustoću stanica eksperimentalnih sojeva	53
5.	ZAKLJUČAK.....	54
6.	LITERATURA	55
7.	PRILOZI.....	58

1. UVOD

1.1 DIJATOMEJE

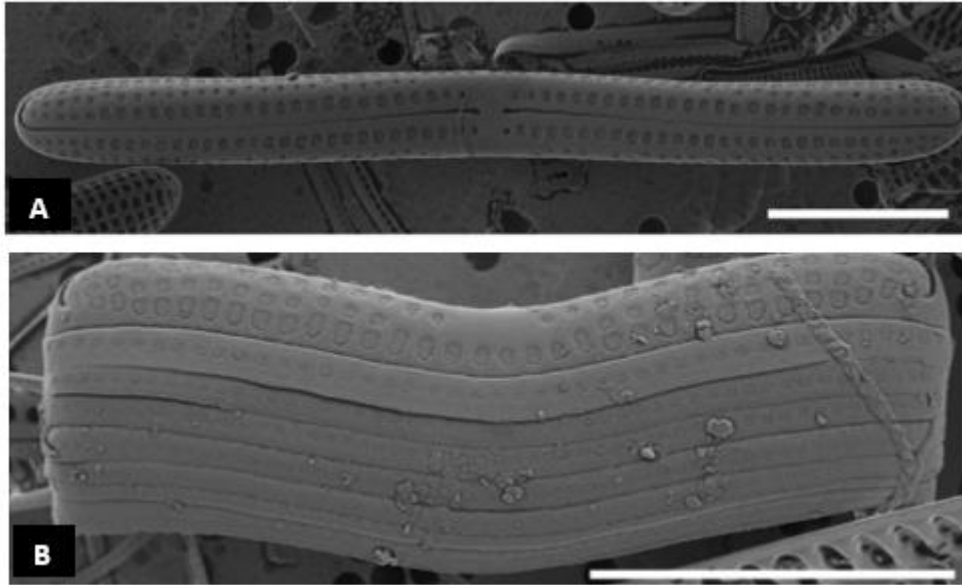
1.1.1 Morfološke i fiziološke karakteristike dijatomeja

Dijatomeje ili alge kremenjašice su jednostanični eukariotski organizmi koji posjeduju karakterističnu staničnu stijenku građenu od amornog silicija i organske osnovice ($\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$) koja se naziva frustula. Frustulu čine dvije valve: manja hipovalva (donja) i veća epivalva (gornja) između kojih se nalazi pojas (cingulum) kojeg tvori različit broj obruča (copulae) (Slika 1) (Round i sur. 1990).



Slika 1. Vanjski izgled penatne dijatomeje koja prikazuje hipovalvu (Hv) s hipocingulumom (Hc), epivalvu (Ev) s epicingulumom (Ec), središnji nodul (Cn), rafu (Ra) i vršni nodul (Pn). (Preuzeto i prilagođeno iz Kratošová i sur. 2014)

Na temelju simetrije dijatomeje dijelimo u dvije osnovne kategorije: penate i centrice. Penatne dijatomeje su bilateralno simetrične dok su centrice radijalno simetrične. Razlikujemo dva glavna položaja koje stanice dijatomeja zauzimaju s obzirom na promatrača: valvalni položaj koji omogućuje promatranje morfoloških struktura na površini valve (Slika 2A) i pleuralni položaj koji pokazuje strukture na pojasu te ukazuje na različite oblike valvi (Slika 2B). Primjerice stanice roda *Achnanthes* karakterizira savijenost valve u središnjem području, a stanice roda *Poulinea* imaju V-oblik (Round i sur. 1990).



Slika 2. Prikaz dva položaja dijatomeja s obzirom na promatrača: A) Valvalni položaj stanice vrste *Achnanthes elongata*, mjerka 10 μm , B) Pleuralni položaj stanice vrste *Achnanthes squaliformis*, mjerka 10 μm (preuzeto iz Majewska i sur. 2017)

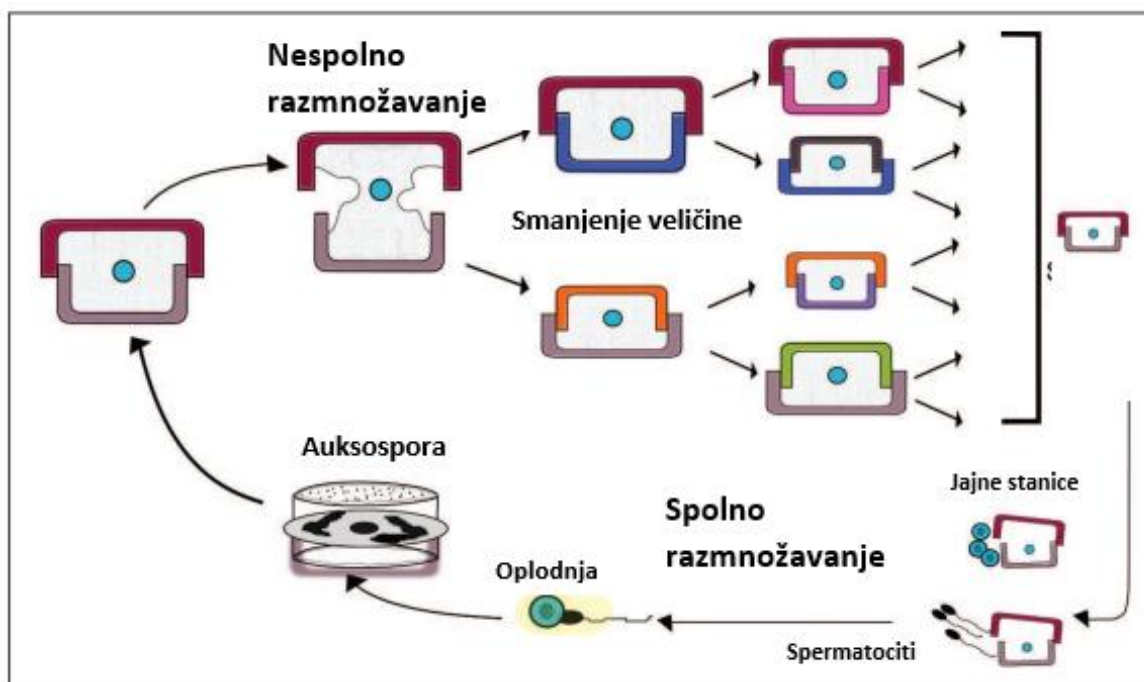
Morfološke karakteristike i njihov položaj s obzirom na ravnine i osi frustule su važna obilježja pri određivanju vrsta dijatomeja. Strukture frustule važne za determinaciju su pore, rafe, strije, rogovi, šiljci i druge specifične silikatne tvorbe. Vrste i rodovi se međusobno mogu razlikovati prema izgledu i obliku pora čije su detaljne strukture vidljive jedino pod elektronskim mikroskopom. Funkcija pora je omogućavanje izmjene tvari između stanica koja je onemogućena na dijelovima membrane koja je u potpunosti prekrivena silikatnom staničnom stijenkom. Areole su pore raspoređene u redovima koji stvaraju strije. Najčešće se formiraju u transapikalnoj ravnini bilateralno simetričnih penata, ili radijalno iz središnjeg nodula centrica. Za morfološku determinaciju bitna su i obilježja strija poput gustoće (broj strija unutar 10 μm duljine valve), orijentacija i broj redova areola. Između strija mogu se nalaziti rebra (*costae*) koja se definiraju kao produžena silikatna zadebljanja bez pora. Rafa je također determinirajuće obilježje karakteristično za penate. Sastoji se od dva rascjepa preko apikalne osi valve koji imaju svoj proksimalni i distalni kraj. Ti krajevi poprimaju različite oblike poput ravni, kukasti, ježičasti, blago zaobljeni itd, koji se koristi pri razlikovanju rodova i vrsta dijatomeja. Kroz rafu izlučuju organsku tvar koja ima ulogu u kretanju stanice po površini (Round i sur. 1990).

Dijatomeje su primarno fotosintetski organizmi, iako neke vrste mogu biti heterotrofne u uvjetima bez svjetlosti. Manje od 10 vrsta su obligatorni heterotrofi i spadaju u rodove *Nitzschia* i *Hantzschia* (Li i Volcani 1987). Posjeduju pigmente klorofil *a*, klorofil *c*₁, *c*₂ i *c*₃ te karotenoide. Karakterističan pigment je ksantofil fukoksantin koji je žuto-smeđe boje. Oblik i

broj plastida je bitan pri morfološkoj karakterizaciji vrsta. Centrice uglavnom imaju puno diskoidnih plastida na periferiji citoplazme ili radijalno raspoređenih oko jezgre, dok penate imaju najčešće jedan ili dva plastida (Round i sur. 1990).

1.1.2 Životni ciklus

U životnom ciklusu dijatomeja se izmjenjuju spolna i nesporna faza razmnožavanja (Slika 3). Nesporni ciklus ili vegetativno razmnožavanje diploidnih stanica odvija se mitozom. Prilikom stanične diobe, nova stanična stijenka hipoteke stanice kćeri se nadograđuje na staničnu stijenku epiteke stanice roditelja. Istovremeno hipoteka stanice roditelja postaje epiteka stanice kćeri na koju se nadograđuje stanična stijenka nove hipoteke. Vegetativno razmnožavanje uzrokuje smanjenje veličine stanica dijatomeja jer se sinteza staničnih stijenki uvijek provodi u okviru staničnih stijenki roditeljske stanice. Značajno smanjenje je vidljivo nakon nekoliko generacija. Za penatne dijatomeje je karakteristična promjena izduženo-linearnog oblika stanice u ovalno-kružni kao posljedica bržeg smanjenja širine stanice (Round i sur. 1990).



Slika 3. Životni ciklus dijatomeja: izmjena spolnog i nespornog razmnožavanja. (Preuzeto i prilagođeno iz Kale i Karthick 2015)

Spolni ciklus dijatomeja slijedi nakon što stanice dosegnu maksimalnu redukciju veličine te uključuje formiranje gameta procesom mejoze. S obzirom na vrstu gameta u spolnom ciklusu centrica nalazimo oogamiju koja podrazumijeva spajanje nepokretne ženske gamete (oogonijum) i pokretne muške gamete (spermatoцит), a kod penatnih dijatomeja izogamiju (anizogamiju). Izogamija je spajanje morfološki i fiziološki identične muške i

ženske gamete dok je anizogamija spajanje gameta koje su morfološki iste, ali fiziološki različite jer je jedna gameta pokretna, a druga ne. Spajanjem gameta nastaje auksospora koja stvara posebni omotač građen od organske tvari i silikata. Dijeli se uzastopnim mitotičkim diobama čime povećava veličinu, te formira hipoteku i epiteku čime nastaje diploidna stanica početne veličine karakteristične za vrstu koja je često nekoliko stotina puta veća od roditeljskih stanica. Osim navedenih karakterističnih načina spolnog razmnožavanja i stvaranja auksospore, kod nekih rodova prisutne su partenogeneza i autogamija (Round i sur. 1990).

1.1.3 Rasprostranjenost i staništa dijatomeja

Dijatomeje su široko rasprostranjene diljem svih vodenih i kopnenih staništa na Zemlji. U vodenom stupcu mora i slatkih voda nalaze se u eufotičkoj zoni do 200 m dubine gdje prodiere dovoljno svjetlosnog zračenja neophodnog za proces fotosinteze (Round i sur. 1990). Određena terenska istraživanja pokazala su uspješnost rasta dijatomeja i do 4000 m dubine, što ukazuje na prilagodbu fotosustava u uvjetima slabog osvjetljenja (Agusti i sur. 2015).

Rast dijatomeja ovisi o intenzitetu i boji svjetlosti, dostupnosti CO₂ i makronutrijenata poput nitrata, fosfata i silikata te prisutnosti metala u tragovima poput željeza koji može limitirati primarnu produkciju. Ograničavajući nutrijenti su neophodni za rast stanice, ali ih ima u najmanjoj koncentraciji unutar ekosustava. Općenito se smatra da u morskim ekosustavima nitrati ograničavaju primarnu produkciju, a u slatkovodnim ekosustavima je fosfat limitirajući nutrijent, osim Mediteranskog mora gdje je fosfat također limitirajući za rast primarnih proizvođača (Krom i sur. 1991). U svim staništima rast dijatomeja je ograničen koncentracijom silikata potrebnih za sintezu frustule (Round i sur. 1990).

Ovisno o tipu staništa, dijatomeje se dijele na planktonske i bentičke. Planktonske dijatomeje plutaju u vodenom stupcu dok bentičke dijatomeje žive pričvršćene na različitim površinama živih i neživih objekata. S obzirom na vrstu podloge razlikujemo epipelitičke zajednice koje se nalaze na površini sedimenta, endopelitičke žive u sedimentu, epipsamničke između zrnaca pijeska, epilitičke na kamenjima, epifitske na površini biljaka, a epizojske na površini životinja. Dijatomeje epipelona i endopelona migriraju iz površine u dubinu i obrnuto čime dolaze do svjetlosti tijekom nanosa novog sedimenta i izbjegavaju predatore. Epizojske zajednice pronađene su na mekušcima, rakovima, slatkovodnim trepetljikašima, nogama i perju morskih ptica (Croll i Holmes 1982), koži kitova (Denys 1997), a nedavno i na koži i oklopu slatkovodnih (Wetzel i sur. 2012) i morskih kornjača (Majewska i sur. 2015).

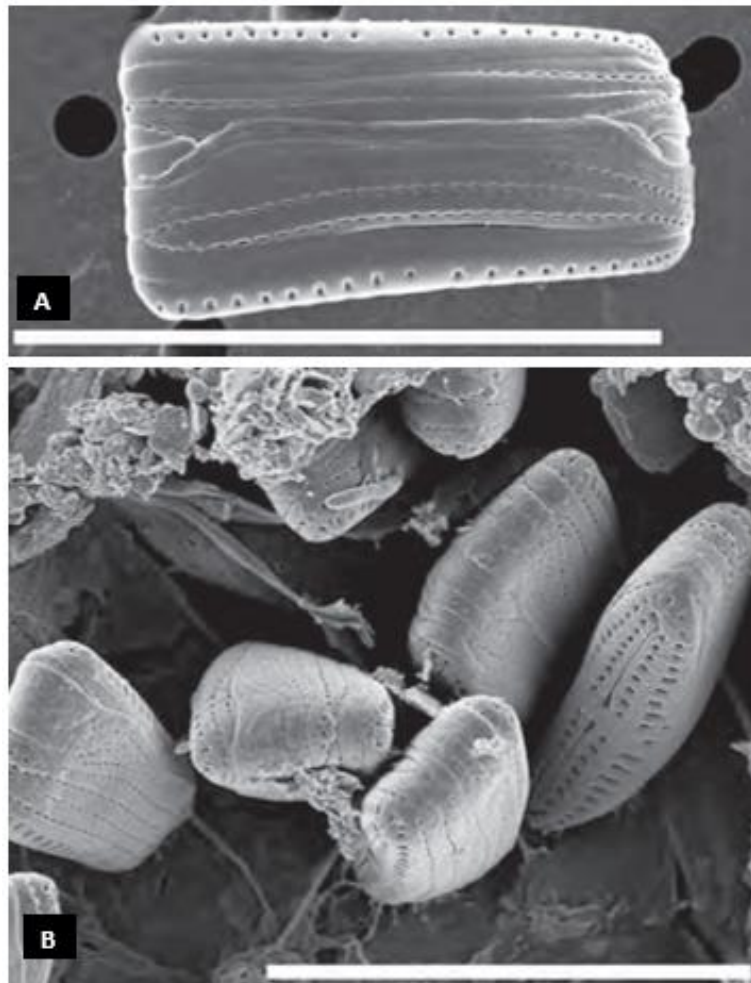
1.1.4 Epizojske dijatomeje morskih kornjača

Epizojska zajednica dijatomeja koja se nedavno počela intenzivnije istraživati nalazi se na morskim kornjačama. Wetzel i suradnici (2012) opisali su novu vrstu dijatomeje *Tursiocola podocnemicola* koja obitava na amazonskoj slatkovodnoj kornjači vrste *Podocnemis erythrocephala*. Time su također započeta istraživanja epizojske zajednice dijatomeja na oklopu i koži morskih kornjača. Robinson i suradnici (2016) dokazali su postojanje raznolike epizojske dijatomejske zajednice na svih 7 vrsta morskih kornjača. Istraživanja epibiontskog mikrobioma morskih kornjača daje nove uvide o njihovom zdravlju i ponašanju, te također omogućava determinaciju strukture tih specifičnih bentičkih populacija dijatomeja koje su do sada bile nepoznate znanstvenoj zajednici (Robinson i sur. 2016).

1.1.5 Morfološke značajke vrsta dijatomeja *Poulinea lepidochelicola* Majewska, De Stefano & Van de Vijver i *Achnanthes elongata* Majewska & Van de Vijver

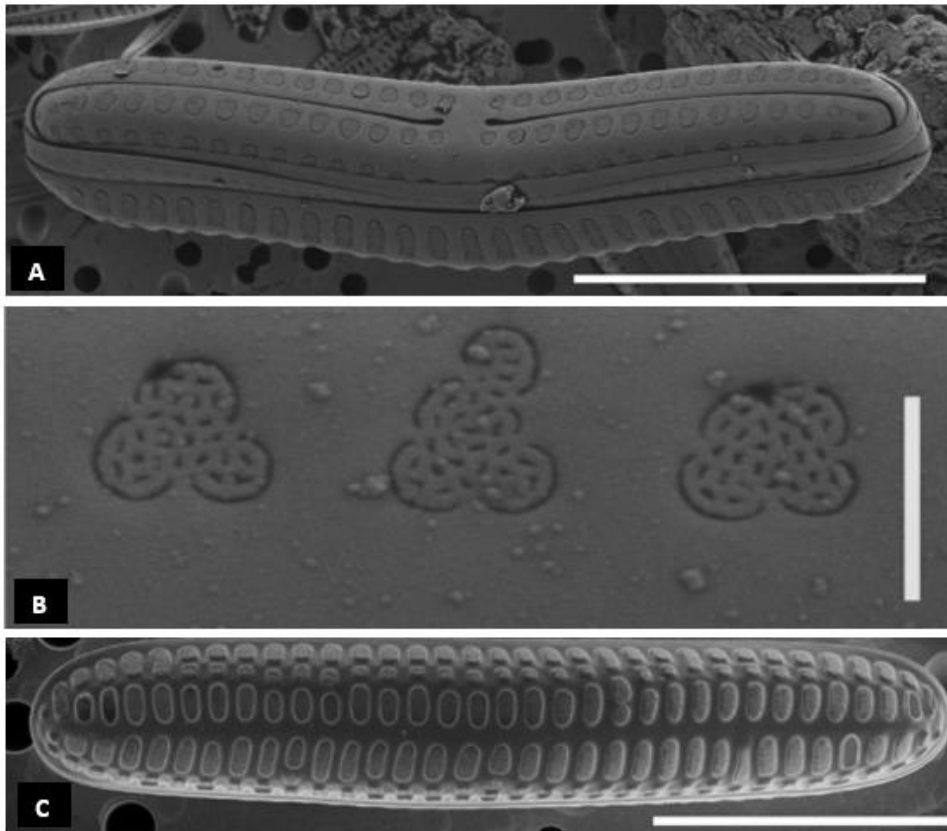
U ovom radu je proučavan utjecaj umjetne svjetlosti različite boje na rast sojeva dijatomeja vrsta *Poulinea lepidochelicola* i *Achnanthes elongata*. Ove vrste pripadaju bentičkoj zajednici, točnije epizojskoj zajednici dijatomeja te su opisane s oklopa morskih kornjača vrste *Lepidochelys olivacea* (pacifička maslinasta želva) na pacifičkoj obali Kostarike (plaža Ostional). *A. elongata* je novootkrivena vrsta za znanost unutar već postojećeg roda, dok *P. lepidochelicola* pripada novootkrivenom rodu (Majewska i sur. 2015). Obje vrste su penatne dijatomeje s bilateralnom simetrijom.

Stanice *Poulinea lepidochelicola* u pleuralnom položaju imaju oblik slova V, odnosno široki vrh koji se postepeno sužava prema suprotnom kraju (Slika 4A). U valvalnom položaju heteropolarne valve imaju vidljivu faciju (središnji hijalini dio stanice) te monoseriatne strije građene od jednog reda dviju transapikalno izduženih areola (Slika 4B). Pojas (cingulum) je građen od 12 kopula, te se na apikalnom dijelu prve i druge kopule nalazi septum (Majewska i sur. 2015).



Slika 4. Morfološke karakteristike dijatomeje *Poulinea lepidochelica*. A) Pleuralni položaj frustule pokazuje V-oblik stanice; mjerka 10 μm ; B) Stanice pričvršćene za podlogu; mjerka 10 μm . (Preuzeto iz Majewska i sur. 2015)

Epizojska dijatomeja *Achnanthes elongata* posjeduje heterovalvarnu frustulu savijenu na sredini transapikalne osi. Stanice posjeduju dvije različite valve, konveksnu valva bez rafe i konkavnu valvu s rafom. Rafidna valva ima uzak sternum, monoserijatne strije s dvije eliptične areole i red manjih areola koji se nalazi između strija na prijelazu s lica valve prema pojasu (Slika 5A). Areole imaju mrežasti izgled jer su ispunjene sitnim porama (kribratne areole; Slika 5B). Distalni krajevi rafe su kukasti, a proksimalni krajevi rafe su ravni (Slika 5A). Arafidna valva posjeduje monoserijatne strije unutar kojih se nalaze 3-4 kribratne areole (Slika 5C) (Majewska i sur. 2017).



Slika 5. Morfološke karakteristike dijatomeje *Achnanthes elongata*: A) Stanice u pleuralnom položaju; mjerka: 10 µm, B) Kribratne areole; mjerka 1 µm, C) Arafidna valva- pogled iznutra; mjerka 10 µm. (Preuzeto iz Majewska i sur. 2017)

Značajna karakteristika navedenih epizojskih dijatomeja je pričvršćavanje za podlogu pomoću sluzavih polisaharidinih stapki koje izlučuju kroz frustulu. Unutar populacije određene stanice vrste *P. lepidochelicola* izlučuju duge stapke kroz donji uzak pol stanice kojima se drže za podlogu. Ostale stanice se pomoću sluzi pričvršćuju jedna uz drugu, formirajući grumene. Međutim, ne stvaraju sve stanice nužno stapke te je njihova točna funkcija još uvijek nerazjašnjena (Majewska i sur. 2015). Stanice vrste *A. elongata* također izlučuju vrlo kratke sluzave stapke kroz apikalni vrh valve te se pričvršćuju za podlogu. U populaciji moguće je formiranje lanaca u kojima su stanice povezane sluzavim kratkim stapkama preko apikalnih vrhova valvi (Majewska i sur. 2017).

1.2 LABORATORIJSKI UZGOJ KULTURA ALGI

1.2.1 Povijesni razvoj tehnika uzgoja kultura algi

Dijatomeje i ostale mikroalge uzgajaju se u kontroliranim uvjetima u laboratoriju da bi imali dostupne eksperimentalne organizme za znanstvena istraživanja. Metode i tehnike za izolaciju i uzgoj mikroalgi počele su se razvijati krajem 19. i početkom 20. stoljeća.

Između 1890. i 1896. god. osmišljene su formule za otopine morske vode obogaćene nutrijentima, uzgojene su algalne kulture na agaru i monokulture algi bez kontaminacija (Andersen 2005). Bostwick H. Ketchum i Alfred C. Redfield su 1938. godine razvili metodu polukontinuiranog uzgoja algalnih kultura u mediju tako što su prikupili biomasu kultura u stacionarnoj fazi rasta, dodali novi medij i odvajanjem dijela populacije omogućili ulaz kulture u eksponencijalni rast i povećanje biomase. Ernst Georg Pringsheim je 1912. godine objavio knjigu "Pure Cultures of Algae" u kojoj je iznio sve značajne znanstvene radove o metodama uzgoja algalnih kultura i time pridonio fikologiji s velikom kolekcijom od 2000 kultura koje predstavljaju više od 400 vrsta algi (Andersen 2005). Od tada pa do danas je u cijelom svijetu ustanovljeno ukupno 27 velikih kolekcija monokultura algi (www.phycology.net/).

Tehnika centrifugiranja se prvi put uvodi 1927. godine te korištenje fototaksije pokretnih stanica u svrhu uzgoja akseničnih kultura. Luigi Provasoli i njegovi suradnici razvijaju umjetne podloge s dodacima vitamina i minerala, te su među prvima razvili metodu uporabe antibiotika u svrhu uzgoja akseničnih algalnih monokultura. M. Goldzweig-Shelubsky 1951. godine uspijeva u uzgoju akseničnih kultura rodova *Scenedesmus*, *Navicula* i *Euglena* pomoću tretmana penicilinom. Također se razvijaju temelji krioprezervacije, odnosno dugoročnog očuvanja algalnih kultura hlađenjem (Andersen 2005).

1.2.2 Recentne metode izolacije, uzgoja i pročišćavanja monokultura algi

Tijekom izolacije stanica mikroalgi iz prirodnog uzorka potrebno je utvrditi koje metode su najprikladnije s obzirom na vrstu alge, kako bi se izbjegla velika oštećenja stanica i onečišćenja monokulture s neželjenim organizmima. Također, potrebno je odabrati medij koji će podržati rast izoliranih stanica u veću monokulturu. Dodatno, potrebno je pratiti koliko je vremena prošlo od uzimanja okolišnih uzoraka koji se koriste u izolaciji. Neke vrste algi brzo odumiru, dok se druge vrste mogu primijetiti tek nakon nekog određenog vremena. Ukoliko je ciljavana vrsta za izolaciju poznata i istražena, mogu se pratiti točno određene specifične smjernice koje će omogućiti uspješnu izolaciju vrste (Andersen 2005).

Razvoj metoda uzgoja algi kroz 19. i 20. stoljeće nastavlja se i danas, te možemo napraviti temeljnu podjelu na tradicionalne i automatizirane tehnike. Tradicionalne tehnike uglavnom uključuju vještinu izolatora koji ručno izdvaja željenu vrstu alge iz okolišnog uzorka, ili koristi utjecaj fototaksije, gravitacije ili određene kemijske spojeve u svrhu izolacije. Za razliku od tradicionalnih tehnika, automatiziranu izolaciju provodi uređaj, a najčešće se koristi protočna citometrija, optičke hvataljke (eng. *optical tweezers*) i mikrofluidika. Jedna od često korištenih tradicionalnih tehnika je izolacija jedne stanice (eng. *single-cell isolation*) iz okolišnog uzorka. Potrebno je imati svjetlosni mikroskop, te je invertni najprikladniji s obzirom da ima dovoljno prostora između objektiva i uzorka za provođenje izolacije (Andersen 2005). Jedna od tehnika izolacije je serijsko nasađivanje obogaćenog okolišnog uzorka na agar. Inkubacijom agara potiče se rast kolonija koje se mogu uzgojiti u unutrašnjosti ili površini agara, što ovisi o vrsti alge i uvjetima koji odgovaraju njezinom rastu. Željene stanice se izoliraju iz kolonija i prebacuju u tekući medij. Sljedeća tehnika izolacije je metoda razrjeđenja kojom se izoliranje jedne stanice postiže razrjeđenjima uzorka. Upotrebljava se u slučaju kada je poznat broj stanica ciljane vrste u uzorku na temelju kojeg se izračuna volumen razrjeđenja za učinkovito dobivanje jedne stanice. Također se koristi u svrhu otkrivanja novih vrsta prisutnih u okolišnom uzorku. Jedna od tehnika je i selektivan rast u mediju, odnosno dodavanje tvari u okolišni uzorak koji potiču rast onih stanica koje se žele izolirati. Primjerice pri izolaciji dijatomeja moguće je dodavanje silikata što selektivno potiče njihov rast (Andersen 2005).

Metoda odvajanja algi centrifugiranjem i sedimentacijom se koristi kada je cilj odvojiti veće stanice algi od manjih. Centrifugiranje zahtjeva točno postavljanje parametara (centrifugalna sila, brzina i vrijeme) kako bi se spriječilo oštećenje stanica, te brzu dekantaciju koja sprječava pokretne stadije da migriraju između taloga i supernatanta. Sedimentacija je najprikladnija tehnika za odvajanje većih, težih i nepokretnih algalnih stanica. Uzorak se postavlja u vertikalnu bocu na neki vremenski period tijekom kojeg stanice tonu i stvaraju talog na dnu. Zatim se supernatant dekantira, a ukoliko je potrebno, postupak se može ponoviti sa stanicama na dnu (Andersen 2005).

Ostale specifične tradicionalne tehnike izolacije koriste se za ciljane vrste poznatih morfoloških i fizioloških obilježja. Izolacija fototaksijom se može koristiti za izolaciju pokretne dominantne vrste u uzorku koja će se izdvojiti od ostalih stanica negativnom ili pozitivnom fototaksijom. Metoda sonifikacije prikladna je za epifite koji se snažno prihvaćaju na površinu, jer ih nastale vibracije odvajaju u suspenziju iz koje ih je lako izolirati. Određene

vrste algi zahtijevaju protočnost vode, inače odumiru stoga ih je potrebno uzgajati u opremi koja omogućuje konstantno miješanje medija. To omogućuje uspješan rast ciljanih stanica i njihovu izolaciju. Izolacija se također može provesti dodavanjem određene tvari koja ubija neželjene alge i organizme, pa u kulturi ostaje samo ciljana vrsta. Primjerice germanijev dioksid ubija dijatomeje, a antibiotici cijanobakterije i bakterije (Andersen 2005).

Bez obzira na metodu izolacije algi, često je u monokulturi prisutno onečišćenje neželjenim organizmima. U svrhu dobivanja aksenične monokulture koriste se tehnike pročišćavanja. Pročišćavanje kulture može se provoditi selektivnim filtriranjem, diferencijalnim centrifugiranjem, sonifikacijom i vorteksiranjem, dilucijskim tehnikama, nasađivanjem na agar te tretmanima s antibioticima, drugim antimikrobnim tvarima i UV svjetlošću. Moguće je fizičko odvajanje onečišćenja pomoću mikropipete. Provjeravanje uspješnosti tehnike provodi se mikroskopiranjem, inokulacijom iz kulture u medij obogaćen tvarima koje podržavaju rast neželjenih organizama, nasađivanjem na podloge koje podržavaju rast stanica, molekularnim tehnikama i protočnom citometrijom (Andersen 2005).

Uzgoj izoliranih monokultura se provodi u zatvorenom sustavu (eng. *batch culture*) ili poluotvorenom sustavu (eng. *semicontinuos batch culture*). U zatvoreni sustav se medij dodaje samo jednom, što podrazumijeva ograničenu opskrbu kulture nutrijentima. Stoga će rast populacije biti limitiran na koncentraciju ograničavajućeg ekološkog čimbenika. Primjerice, dijatomeje će prestati rasti kada potroše sve silikate ili nitrata u mediju. Poluotvoreni sustav podrazumijeva kontinuirano dodavanje novog medija i odvajanja dijela biomase. Na taj način se populaciju u kulturi konstantno održava u eksponencijalnoj fazi rasta (Andersen 2005).

1.3. UVJETI ZA RAST MIKROALGI U LABORATORIJU

1.3.1 Medij za rast stanica

Mediji za uzgoj slatkovodnih i morskih algi se razlikuju zbog drugačijih okolišnih čimbenika u njihovom staništu. Stoga, pri izradi medija treba uzeti u obzir stanište iz kojeg su uzorci uzimani, te priskrbiti algama koje uzgajamo potrebne makronutrijente, vitamine i metale u tragovima. Kako bi se omogućila potpuna sterilnost medija u kojem su prisutni samo željeni spojevi, potrebno je autoklavirati svu staklenu opremu i filtere. Ovisno o tipu medija, potrebno je koristiti destiliranu vodu, agar ili tekući ekstrakt tla (Andersen 2005).

Za pripremu slatkovodnog ili morskog medija, može se uzorkovati voda sa staništa ili pripremiti u potpunosti umjetan medij. Vodu sa staništa potrebno je prethodno filtrirati, te je praktično uzorkovati oligotrofnu vodu dalje od obale u kojoj nema velike biomase fitoplanktona i sedimenta pa je filtriranje brže i lakše. Za pripremu umjetnog morskog ili slatkovodnog medija, koristi se destilirana voda u koju se zatim dodaju sve potrebne otopine koje sadrže komponente za obogaćivanje medija. Nutrijenti, vitamini i metali u tragovima se dodaju u prethodno pripremljenim zaliham. Veće zalihe omogućuju kontinuiranost u pripremi medija, bez potrebe da se svaki put mjeri potrebna koncentracija određenog nutrijenta ili vitamina. Precipitacija dodanih komponenti se sprječava dodavanjem pH pufera, te miješanjem otopine dok se ne otopi prije dodavanje druge. Zalihe se autoklaviraju kako bi se izbjegla onečišćenja s bakterijama i gljivama, a zatim se dodaju u filtriranu vodu (Andersen 2005).

Nutrijenti koji se dodaju su dušik u obliku natrijevog nitrata (NaNO_3) ili amonijaka (NH_3) i fosfor u obliku natrijevog fosfata ($\text{NaHPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) ili glicerol-3-fosfata ($\text{C}_3\text{H}_9\text{O}_6\text{P}$). Za laboratorijski uzgoj dijatomeja, potrebno je dodati i izvor silicija u obliku natrijevog silikata ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$). Željezo se dodaje u obliku kloridnih i sulfatnih soli jer ima ulogu enzimskog kofaktora i bitno je za proces fotosinteze jer gradi proteinske komplekse u lancu prijenosa elektrona te sudjeluje u sintezi klorofila i asimilaciji CO_2 u organsku tvar. Drugi metali u tragovima koji se dodaju u medij su cink, kobalt, mangan, selenij i nikal. U otopine tih soli dodaje se i kelator EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) (Andersen 2005) na koji se veže željezo čime se onemogućuje njegova precipitacija te ga se čini dostupnim algama, a kelacija drugih metala onemogućuje da njihova koncentracija u otopini postane otrovna za stanice. S obzirom na omjer koncentracija dodanog kelatora i metala, mediji se označavaju s f/2, f/4 pa sve do K. Primjerice f/2 medij ima omjer kelatora i metala 1:1, a u K mediju je taj omjer 10:1 (Barsanti i sur. 2006). Vitamini koji se dodaju u medij su vitamin B₁₂

(cijanokobalamin), vitamin B₁ (tiamin) i vitamin B₇ (biotin) (Andersen 2005). Za većinu vrsta algi nisu potrebna sva tri vitamina, no pokazalo se da dodavanje vitamina koji se ne iskorištavaju nije štetno za uzgoj kulture. Ipak, vitamin B₁₂ je najbitniji i potreban većini vrsta iz razloga što sudjeluje u metilaciji otrovnih teških metala (Barsanti i sur. 2006).

Izolirane stanice u mediju se postavljaju u komore koje su najčešći oblik zatvorenog sustava za inkubaciju laboratorijskih monokultura mikroalgi. Vrlo je bitno da je u komori postavljena odgovarajuća stalna temperatura i svjetlosni ciklus kako bi izolirane stanice uspješno povećavale biomasu i narasle u monokulturu. Najčešće je to odvojena soba u laboratoriju u kojoj su postavljeni svi navedeni uvjeti te ih je lako kontrolirati (Andersen 2005).

1.3.2 Uvjeti uzgoja kultura - temperatura

Postavljanje temperature u komori ovisi o staništu algi koje uzgajamo. U slučaju da vrsta uzgajane alge rasprostranjuje staništa ekstremnih temperaturnih uvjeta, poput polarnih ili tropskih geografskih širina, potrebno je postaviti veću, odnosno nižu temperaturu od optimuma. Vrste alge koje uglavnom nastanjuju umjereno topla i hladna područja imaju optimalnu temperaturu za rast između 20 °C i 24 °C. No većina vrsta će tolerirati i temperaturni interval između 16 °C i 27 °C. Ako uzgajana vrsta ne nastanjuje ekstremna staništa, malo niže ili više temperature od navedenih će značajno usporiti rast kulture, a ekstremno niske i visoke temperature su smrtonosne. Temperatura u komori se kontrolira s kvalitetnim klimatskim uređajem i prati na digitalnom termometru (Creswel 2010).

1.3.3 Boja, intenzitet i ciklus svjetla

Svjetlost je jedan od najznačajnijih čimbenika za uspješan rast izoliranih stanica u monokulturu. Čimbenici svjetlosti koje treba razmatrati su boja (spektar valnih duljina koje emitira), intenzitet i fotoperiod. U laboratorijskim komorama za rast stanica se najčešće koriste LED (eng. *light emitting diode*) lampe koje emitiraju svjetlost kada dovoljno jaka struja elektrona prođe kroz njih. Stvaraju veću količinu svjetlosti uz puno manji utrošak energije pa su energetske učinkovitije nego druge vrste žarulja poput fluorescentnih žarulja, žarulja sa žarnom niti ili halogenog osvjetljenja. Emitirana svjetlost LED žarulje ima uzak spektar valnih duljina između 400 nm i 700 nm. Navedeni spektar se naziva fotosintetski aktivno zračenje (eng. *photosynthetically active radiation*; PAR), čije fotone apsorbiraju pigmenti algi za provođenje fotosinteze. Druge vrste lampi emitiraju puno širi spektar vidljive

svjetlosti od kojeg 50% alge ne iskoriste. Stoga, LED lampe smanjuju energetske troškove i učinkovitije potiču rast algi (Pattanaik i sur. 2018).

Alge apsorbiraju različite valne duljine PAR-a s obzirom na pigmente koje sadrže kao što su klorofil *a*, klorofil *b*, klorofil c_1 , c_2 i c_3 itd. Primjerice dijatomeje uz klorofil *a* imaju dominantni klorofil c_1 , c_2 i c_3 , stoga će za njihov rast biti najučinkovitija svjetlost koja emitira valne duljine na kojima pigmenti imaju maksimum apsorpcije fotona. Za druge skupine algi to će biti valne duljine na kojima klorofil *a* i *b* imaju maksimalnu apsorpciju fotona. Klorofil *a* ima maksimalnu apsorpciju fotona svjetlosti valnih duljina 430 nm (ljubičasto-plava boja) i 660 nm (tamnocrvena boja). Klorofil *b* ima maksimalnu apsorpciju fotona svjetlosti valnih duljina 460 nm (plava boja) i 630 nm (crvena boja) (Pattanaik i sur. 2018). Klorofil c_1 ima maksimum apsorpcije fotona svjetlosti valnih duljina 444 nm, 577 nm i 626 nm. Klorofil c_2 ima maksimum apsorpcije fotona svjetlosti valnih duljina 447 nm, 580 nm i 627 nm. Klorofil c_3 ima maksimum apsorpcije fotona svjetlosti valnih duljina 452 nm, 585 nm i 525 nm (Fawley 1989).

LED bijela svjetlost ima određeni omjer crvenih i plavih valnih duljina, no postoje i jednobojne LED lampe koje emitiraju samo crvenu ili plavu svjetlost. Rezultati nekoliko različitih istraživanja pokazuju da LED bijela svjetlost s većim udjelom crvenih valnih duljina u odnosu na plave podržava veći rast biomase algi (Pattanaik i sur. 2018). Primjerice, Eltringham i Farag (2009) su uspoređivali rast biomase vrste *Chlorella vulgaris* u uvjetima fluorescentne svjetlosti i LED osvjetljenja te ustanovili najveću biomasu u uvjetima bijele LED svjetlosti omjera crvene i plave valne duljine 3:1. Također, pokazalo se da LED bijela svjetlost bolje utječe na rast algi u odnosu na jednobojnu crvenu ili plavu LED svjetlost (Pattanaik i sur. 2018).

Intenzitet svjetlosti je direktno proporcionalan s rastom algi (Pattanaik i sur. 2018), te se definira kao broj fotosintetski aktivnih fotona emitirane PAR svjetlosti. Intenzitet je gustoća protoka fotosintetski aktivnih fotona ili PPF (eng. *photosynthetic photon flux density*) te se izražava mjernom jedinicom $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Mjera je izvedena iz protoka fotosintetski aktivnih fotona PPF (eng. *photosynthetic photon flux*) koji je glavna mjera za PAR (Andersen 2005). Visok intenzitet svjetlosti ili PPF može uzrokovati oštećenja fotosintetskog aparata, dok nizak PPF može limitirati primarnu produkciju (Pattanaik i sur. 2018). Stoga se intenzitet svjetlosti LED lampi u komori postavlja između 30-60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, no to se može prilagođavati s obzirom na vrstu algi koja se uzgaja (Andersen 2005). Fotoperiod je također vrlo bitan čimbenik koji utječe na rast algi, stoga je u komori potrebno postaviti ciklus svjetla i tame.

Nekim vrstama algi odgovara stalno osvjetljenje, no većina vrsta ima učinkovitiji rast u uvjetima periodičnog izmjenjivanja svjetlosti i tame. Optimalni fotoperiodi su 16 sati svjetlosti i 8 sati tame, ili 12 sati svjetlosti i 12 sati tame (Andersen 2005).

1.4 EKSPERIMENTALNA PRIMJENA MONOKULTURA MIKROALGI

1.4.1 Određivanje novih vrsta morfološkim i molekularnim analizama

Uzgoj izoliranih stanica algi u monokulturu omogućuje eksperimentalni rad na pojedinoj specifičnoj klonalnoj populaciji te dobivanje dovoljno velikog broja stanica i biomase za uspješne molekularne i morfološke analize. Međutim, informacije o morfologiji često nisu dovoljne jer neke vrste mogu biti kriptične, ili ih je vrlo teško determinirati koristeći se samo morfološkim značajkama. Mnoge dijatomeje se međusobno razlikuju na temelju vrlo sitnih morfoloških detalja koje nije moguće učinkovito razlikovati uspoređivanjem mikroskopskih slika.

U taksonomskim analizama mikroalgi koristi se DNA barkodiranje vrsta koje daje uvid u molekularne informacije (DNA sekvence) određenih gena i povezuje te sekvence s imenom vrste i njenom morfologijom. Provodi se ekstrakcijom DNA iz monokulture i umnažanjem ciljanih gena u lančanoj reakciji polimerazom, te sekvenciranjem i usporedbom sekvence u bazama podataka. Kod dijatomeja se kao markeri najčešće koriste sekvence gena 18S rDNA (male podjedinice ribosoma) te gena *rbcL* (ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza oksigenaza). Ukoliko se dobiven slijed nukleotida ne nalazi u bazama podataka, on se unosi u bazu te povezuje s morfološkim informacijama i imenom vrste (Rivera i sur. 2018).

Analize okolišnih uzoraka provode se DNA metabarkodiranjem cijelog uzorka (Rivera i sur. 2018). Amplificiraju se željeni fragmenti genoma u uzorku koji odgovaraju DNA markerima poput gena 18S rDNA, *rbcL*, ili *cox1* koji se često koriste u istraživanjima algi (Evans i sur. 2007). Zatim se sekvenciraju dobiveni amplikoni te se bioinformatičkim i filogenetičkim analizama karakteriziraju operacijske taksonomske jedinice OTU (eng. *operational taxonomic units*) čije sekvence se uspoređuju i identificiraju u dostupnim bazama podataka (Rivera i sur. 2018).

1.4.2 Istraživanja utjecaja abiotičkih čimbenika na fiziologiju i ekologiju vrste

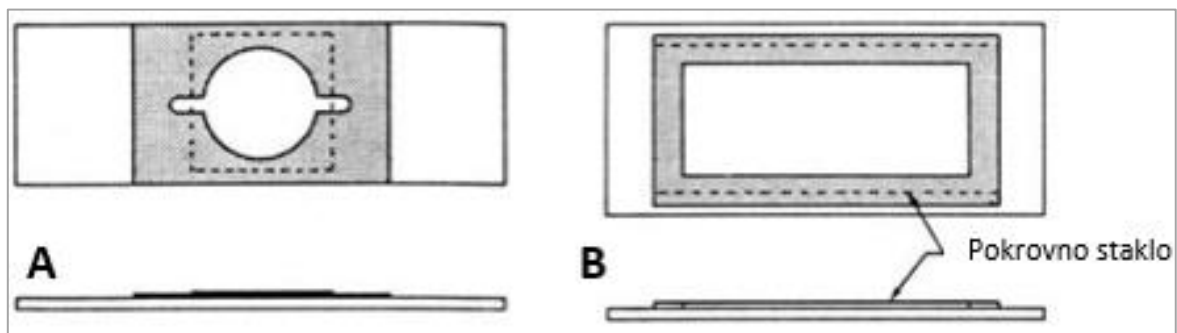
Osim u identifikaciji i taksonomiji vrsta, monokulture algi se koriste u eksperimentima u kojima se ispituje utjecaj različitih ekoloških čimbenika na fiziologiju i ekologiju algi. Primjerice moguće je ispitati utjecaj prisustva kemijskih elemenata i nutrijenata na rast i izgled stanica te utjecaj različite boje i intenziteta osvjetljenja na stopu rasta. Eksperimenti na monokulturama algi omogućuju dodatna istraživanja njihovih životnih ciklusa i čimbenika koji utječu na stvaranje cisti i njihovu germinaciju (Andersen 2005). Uzgoj monokultura se također uspješno primjenjuje u istraživanjima algi koje cvjetaju i stvaraju toksične spojeve

(Granéli i Turner 2006), te u akvakulturi gdje se mikroalge uzgajaju kao hrana za larve i zooplankton (Creswel 2010).

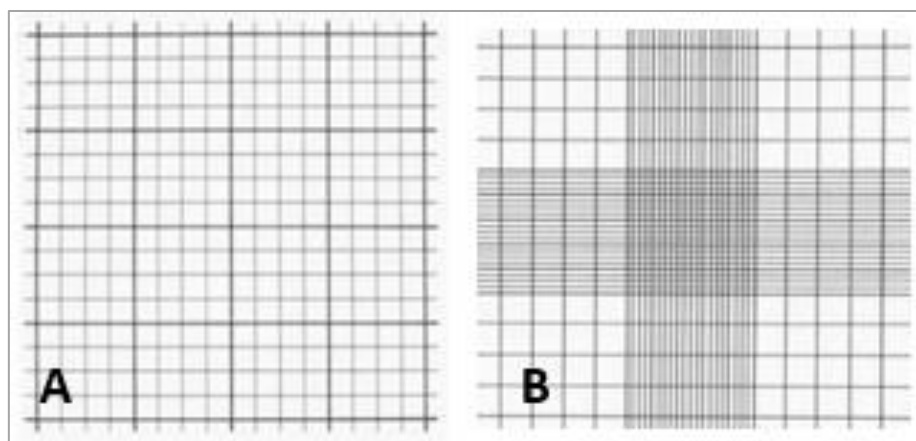
1.4.3 Eksperimentalne metode određivanja broja i biomase stanica u kulturi

Za brojanje stanica mikroalgi u kulturama se mogu koristiti različiti načini, osoba može brojati stanice pomoću svjetlosnog mikroskopa ili instrumenta koji služi za brojanje stanica (npr. Coulterov brojač ili protočni citometar). Kada se radi ručno brojanje stanica, obično se koriste komorice za brojanje stanica, koje imaju zadano mjerilo i dubinu, stoga je moguće izračunati prosječnu brojnost stanica u uzorku na temelju prosječne brojnosti stanica u zadanom volumenu komorice. Dubina komorice se odnosi na prostor između komorice i pokrovnice, te određuje volumen uzorka u kojem se stanice broje (Andersen 2005).

Postoji nekoliko tipova komorica: Sedgewick-Rafter, Palmer-Maloney, Speirs-Levy, hemocitometri dubine 0,2 mm i 0,1 mm te Petroff-Hausser komorice za brojanje. Razlikuju se prema obliku komorice koja može biti kružna ili pravokutna te prema zadanom mjerilu. Primjerice, Palmer-Maloney (Slika 6A) i Sedgewick-Rafter komorica (Slika 6B) nemaju mjerilo, Speirs-Levy ima Fuchs-Rosenthal mjerilo (Slika 7A) za precizno brojanje stanica veličine 5-75 μm , a preostala tri tipa imaju Neubauer mjerilo (Slika 7B) koje omogućuje precizno brojanje stanica manjih od 30 μm . Izbor komorice ovisi o veličini stanice i gustoći kulture algi koja se broji (Tablica 1) (Andersen 2005).



Slika 6. A) Palmer-Maloney kružna komorica za brojanje B) Sedgewick-Rafter pravokutna komorica za brojanje. (Preuzeto i prilagođeno iz Andersen 2005)



Slika 7. A) Fuchs-Rosenthal mjerilo prisutno na Speirs-Levy komorici za brojanje, B) Neubauer mjerilo prisutno na hemocitometrima dubine 0,2mm i 0,1mm te Petroff-Hausser komorici za brojanje. (Preuzeto iz Andersen 2005)

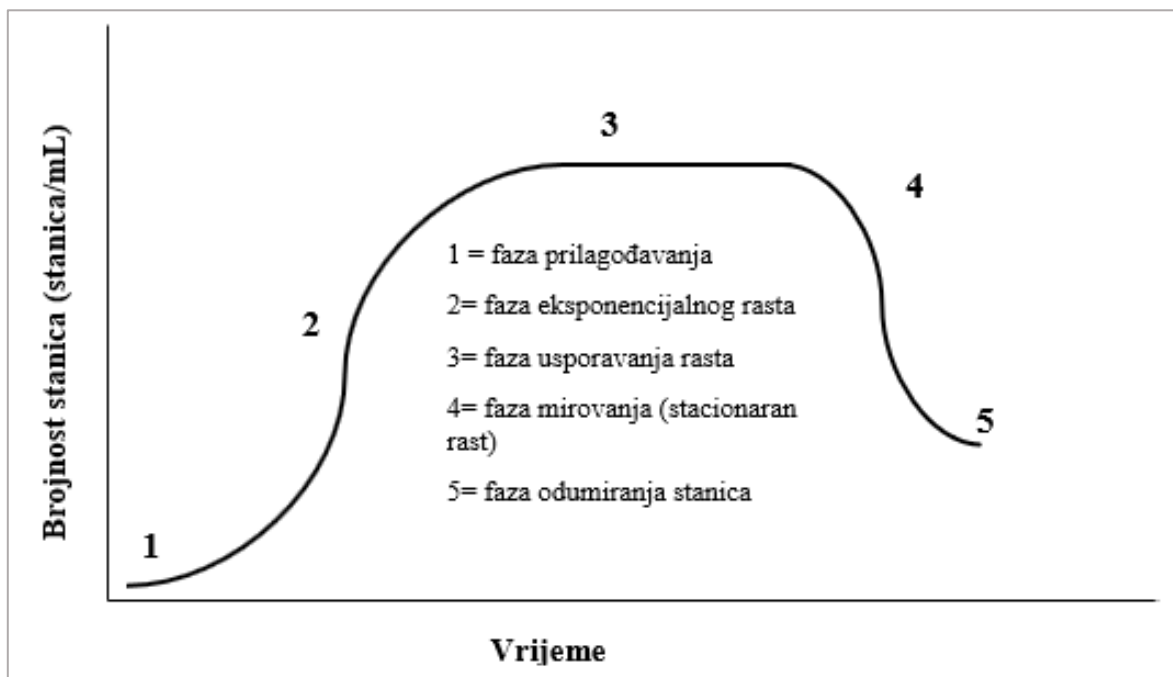
Tablica 1. Prikazani su tipovi komorica te interval veličina stanice (μm) i gustoće kulture (broj stanica/mL) unutar kojeg je određen tip najprikladniji za brojanje stanica. (Preuzeto i prilagođeno iz Andersen 2005)

Komorica za brojanje stanica	Veličina stanice (μm)	Gustoća kulture (broj stanica/mL)
Sedgwick-Rafter	50 - 500	$30 - 10^4$
Palmer-Maloney	5 - 150	$10^2 - 10^5$
Speirs-Levy	5 - 75	$10^4 - 10^6$
Hemocitometar (0,2 mm dubine)	5 - 75	$10^4 - 10^6$
Hemocitometar (0,1 mm dubine)	2 - 30	$10^4 - 10^7$
Petroff-Hausser	< 1 - 5	$10^6 - 10^8$

Pokretne stanice je potrebno zaustaviti prije brojanja dodavanjem formalina, glutaraldehida ili Lugolne otopine. Možemo brojati cijelu komoricu ili izabrati nekoliko nasumičnih područja koji su određeni mjerilom ili kvadratima određene veličine pri čemu se broj stanica preračunava na volumen komorice. Nakon brojanja, podaci se preračunavaju na cijeli volumen uzorka. Također, broj stanica može se utvrditi na temelju autofluorescencije klorofila koja se promatra epifluorescentnim mikroskopom ili automatiziranom metodom protočne citometrije koja je puno preciznija za brojanje pikofitoplanktona. Broj stanica omogućuje određivanje stope rasta monokulture. Stopa rasta može se odrediti pomoću drugih parametara koji koreliraju s brojem stanica, poput koncentracije ugljikohidrata, lipida, proteina, klorofila *a*, itd. Za određivanje stope rasta koriste se vrijednosti parametara

zabilježene tijekom eksponencijalne faze rasta monokulture. Faze rasta algi mogu biti vidljive na krivuljama koje izrađuju na temelju dobivenih podataka o koncentraciji parametara ili brojnosti stanica (Andersen 2005).

Rast monokulture algi ima 5 faza: faza prilagođavanja, faza eksponencijalnog rasta, faza usporavanja rasta, faza mirovanja i faza odumiranja (Slika 8). U prvoj fazi se stanice fiziološki prilagođavaju na medij u koji su inokulirane te nema značajnog rasta stanica. Drugu fazu obilježava značajan rast stanica koji je u linearnom odnosu s vremenom. Zatim slijedi usporavanje rasta uzrokovano smanjenjem nutrijenata ili nekog drugog limitirajućeg čimbenika. Stacionarnu fazu karakterizira stalna brojnost koja se ne mijenja značajno zbog postignute ravnoteže između stope rasta i ograničavanja diobe stanica. Zadnju fazu obilježava značajno smanjenje broja stanica i odumiranje kulture uzrokovano nedostatkom nutrijenata i CO₂, onečišćenjima, promjenom pH, sintezom otrovnih metabolita (Price i Farag 2013).



Slika 8. Shematski prikaz krivulje rasta s 5 faza rasta monokulture algi uzgajane u zatvorenom sustavu bez dodatnog unosa novog medija. (Preuzeto i prilagođeno iz Price i Farag 2013)

1.5 CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja ovog diplomskog rada je ispitati optimalne uvjete umjetne svjetlosti za uspješan uzgoj dijatomejskih kultura u laboratorijskim uvjetima čime se omogućuje i uspješno provođenje budućih laboratorijskih istraživanja na epizojskim vrstama dijatomeja *Achnanthes elongata* i *Poulinea lepidochelicola*. Eksperiment je proveden na pet različitih sojeva dviju vrsta laboratorijskih kultura dijatomeja pri različitim uvjetima svjetlosti: (1) LED svjetlost bijele boje temperature 6500 K ili 2) LED svjetlost umjereno-bijele boje temperature 5000 K. Specifični ciljevi istraživanja bili su optimizirati metodu brojanja stanica, utvrditi krivulje rasta za sve sojeve te utvrditi da li postoji statistički značajna razlika u brojnosti stanica između svjetlosnih uvjeta.

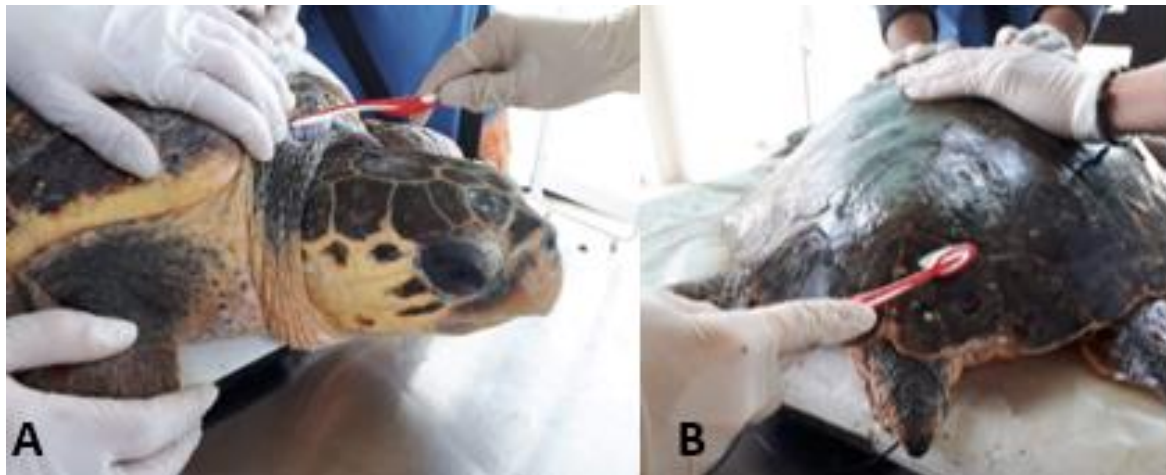
Postavljene su sljedeće hipoteze:

1. Rast sojeva obje vrste dijatomeja, *A. elongata* i *P. lepidochelicola*, je veći pri umjereno-bijelom svjetlu temperature 5000 K.
2. Razlika u povećanju brojnosti između različitih sojeva dijatomejskih vrsta *A. elongata* i *P. lepidochelicola* u uvjetima toplije bijele boje svjetlosti određene temperaturom 5000 K je statistički značajna.
3. Razlika u povećanju brojnosti između različitih sojeva dijatomejskih vrsta *A. elongata* i *P. lepidochelicola* u uvjetima hladnije bijele svjetlosti određene temperaturom 6500 K je statistički značajna.

2. MATERIJALI I METODE

2.1 Uzimanje živih uzoraka za izolaciju

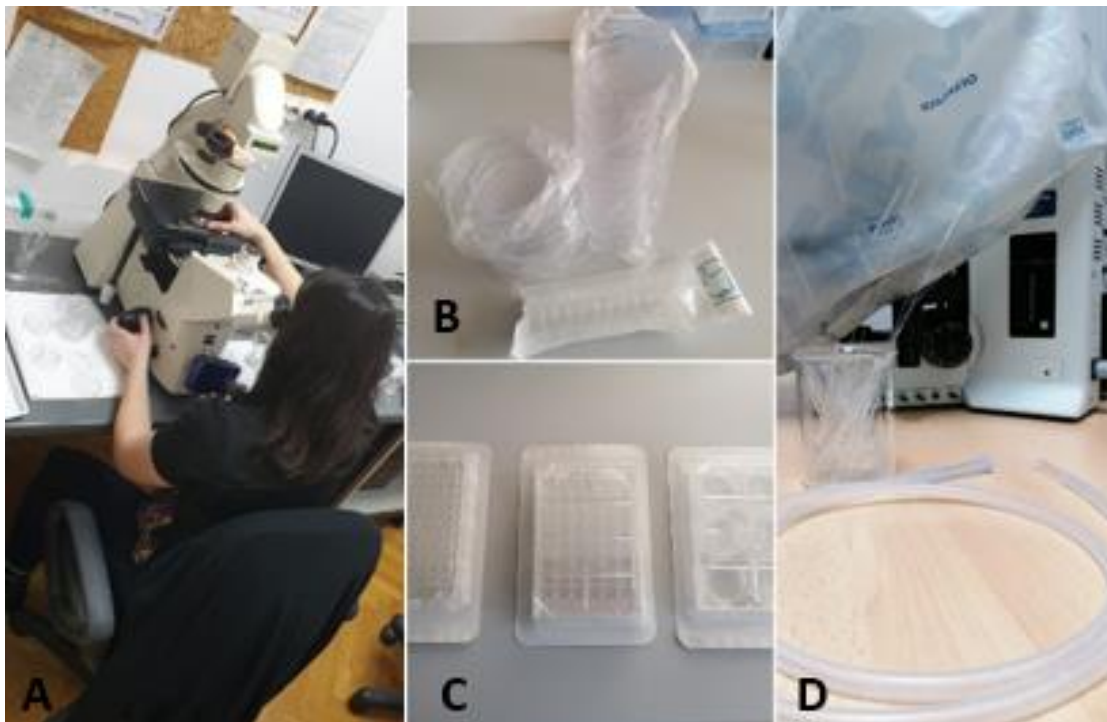
Živi uzorci dijatomejskog biofilma uzeti su pomoću čiste četkice za zube s oklopa i kože vrata glavate želve (*Carreta carreta*) imena Iracus iz Klinike za morske kornjače, Sveučilišta u Bariju, Italija (Slika 9). Iracus je pregledan pri dolasku u Kliniku te je zaključeno da se radi o odrasloj jedinci ženskog spola širine oklopa 66,5 cm, duljine oklopa 72 cm i težine 45,6 kg. Kornjača je pronađena u koči na dubini od 40 m i 5 km udaljeno od obale grada Bisceglie. U Klinici je zadržana 24 h, nakon čega je vraćena u prirodno stanište. Četkicom sastrugani uzorci s kože i oklopa Iracusa su u Klinici spremljeni u filtriranu morsku vodu, te transportirani do Laboratorija za algologiju, Biološki odsjek PMF-a u Zagrebu. Uzorci su pri dolasku u laboratorij prebačeni u obogaćeni Guillard f/2 medij i stavljeni u komoru za inkubaciju stanica. Guillard f/2 medij se sastoji od sterilne morske vode, osnovnih hranjivih soli poput nitrata i fosfata, silikata, te metala u tragovima, vitamina B₁₂, B₁ i vitamina H (Guillard 1975), a detaljan opis sastava i pripreme medija naveden je u prilogu (Tablica P1). Pripremljeni medij je prethodno tretiran u autoklavu kako bi se izbjegla onečišćenja s gljivama, bakterijama ili drugim neželjenim organizmima. U daljnjim postupcima izolacije, uzgoja i pročišćavanja monokultura koristio se isti autoklavirani f/2 medij.



Slika 9. Uzimanje okolišnog uzorka s kože (A) i oklopa (B) glavate želve Iracus u rehabilitacijskoj klinici za morske kornjače na odsjeku za Veterinu, Sveučilišta u Bariju, Italija. (Izvor slika: dr. vet med. Adriana Trotta).

2.2 Izolacija stanica dijatomeja u monokulture

Monokulture sojeva dijatomeja sam uzgojila metodom izolacije jedne stanice koju sam provela korištenjem invertnog svjetlosnog Olympus CKX41 mikroskopa (Slika 10A), petrijevki (Slika 10B), višejažičnih pločica (Slika 10C), te mikropipete i plastične duge cijevi (Slika 10D). Mikropipete za hvatanje i izolaciju dijatomeja sam izradila korištenjem staklenih Pasteur pipeta čiji se vrhovi izdužuju na plameniku. Vršni dio staklene Pasteur pipete sam stavila iznad plamena i rotirala dok staklo postane mekano, zatim vrh pipete naglo izdužila u tanku liniju. Izduženi vrh sam pravilno slomila na mjestu gdje želim da bude mali otvor za usis stanice. Za postupak izolacije stanica sam pripremila veći broj mikropipeta. Za izolaciju i uzgoj monokultura koristila sam petrijeve zdjelice raznih veličina, višejažične ploče s 6, 24, 46 ili 96 jažica i bočice za uzgoj kultura površine 25 cm² i 75 cm². Uspješno rastuće čiste monokulture sam prebacila u Falcon bočice od 15 mL i 50 mL u uvjete smanjene svjetlosti u svrhu dugoročnog očuvanja za buduće analize. Zamotane su u foliju i postavljene u klima komoru.



Slika 10. Oprema za izolaciju jedne stanice dijatomeja za monokulturu: A) invertni svjetlosni mikroskop, B) petrijeve zdjelice, C) višejažične ploče, D) Pasteur pipete i plastična cijev – pribor za usisavanje stanica.

U svaku stranu duge plastične cijevi stavila sam po jedan plastičan nastavak. Jednu stranu cijevi s nastavkom sam povezala s mikropipetom, a druga strana mi je služila za kontroliranje usisa ustima kojim uvlačim stanicu u mikropipetu. Tijekom izolacije potrebno je usisati kapljicu medija u vrh mikropipete kako bi usisna sila bila slabija što omogućuje

preciznije izvlačenje željene stanice. Iz okolišnog uzorka sam uzela manji dio i razrijedila u f/2 mediju, te tako pripremljen uzorak koristila u daljnoj izolaciji stanica.

Koristila sam se dvjema tehnikama izolacije kako bih povećala vjerojatnost izolacije jedne stanice iz okolišnog uzorka. Prvom tehnikom sam odvajala jednu stanicu u kapljicu medija, a drugom tehnikom sam do jedne željene stanice dolazila serijskim dilucijama kroz više jažica. Prva tehnika temelji se na tome da se izolirane stanice mikropipetom isisaju u petrijevu zdjelicu ili višejažične pločice. U petrijevoj zdjelici sam pripremila nekoliko kapljica čistog medija u koji se ubacuje izolirana stanica. Zatim sam kapljicu u kojoj je uspješno izolirana samo jedna stanica prebacila u novu petrijevku ili jažicu i dodala medij. Postupak sam ponovila nekoliko puta kako bi povećala broj izolata i vjerojatnost izolacije željene stanice iz okolišnih uzoraka koji sadrže više različitih vrsta dijatomeja.

Druga tehnika izolacije temelji se na uzimanju nekoliko željenih stanica iz okolišnih uzoraka koje se prebacuju u jednu jažicu na višejažičnoj pločici od 46 jažica. Stanice sam prebacivala iz prve jažice u drugu, treću itd. kako bi napravila nekoliko serijskih razrjeđenja. Time se povećava vjerojatnost pronalaska samo jedne stanice bez onečišćenja s drugim eukariotskim organizmima. Izolirane stanice sam ostavila dva do tri dana u komori za uzgoj stanica s 12 h dugim fotoperiodom i stalne temperature od 19 °C. Uspješnost izolacije sam provjeravala promatranjem pod svjetlosnim mikroskopom. Ukoliko su se u izolatima monokultura pojavile neželjene stanice, postupak izolacije jedne stanice iz petrijevki i višejažičnih pločice sam ponavljala do uspješne izolacije monokulture.

2.3 Tehnike čišćenja monokultura od neželjenih organizama

Utvrđene monokulture koje uz željene stanice imaju i druge eukariotske organizme poput bičaća, ameba itd se pročišćavaju tehnikom serijskih razrjeđenja. Najčešće prisutni organizmi u kulturi su bili bičaći koji su se nalazili vrlo blizu stanica dijatomeja, te ih nije lako odvojiti iz monokulture. Stoga sam koristila dvije tehnike pročišćavanja s kojima sam povećavala vjerojatnost odvajanja bičaća i drugih eukariotskih organizama iz monokulture.

Prva tehnika se temelji na izolaciji nekoliko stanica iz monokulture mikropipetom koje se prebacuju u višejažičnu pločicu s 6, 24, 46 ili 96 jažica. Uzorak iz prve jažice sam razrijedila u volumenu druge jažice koji sam zatim razrijedila u volumenu treće jažice i tako uzastopno do kraja pločice. Veći broj serijskih razrjeđenja povećava vjerojatnost pojave željene stanice u jažici bez prisutnosti drugih organizama. Druga tehnika čišćenja dobivenih monokultura je formiranje kapljica medija u petrijevoj zdjelici. Stanice iz monokultura s eukariotima sam prebacila u kapljice, istovremeno gledajući pod mikroskopom kretanje

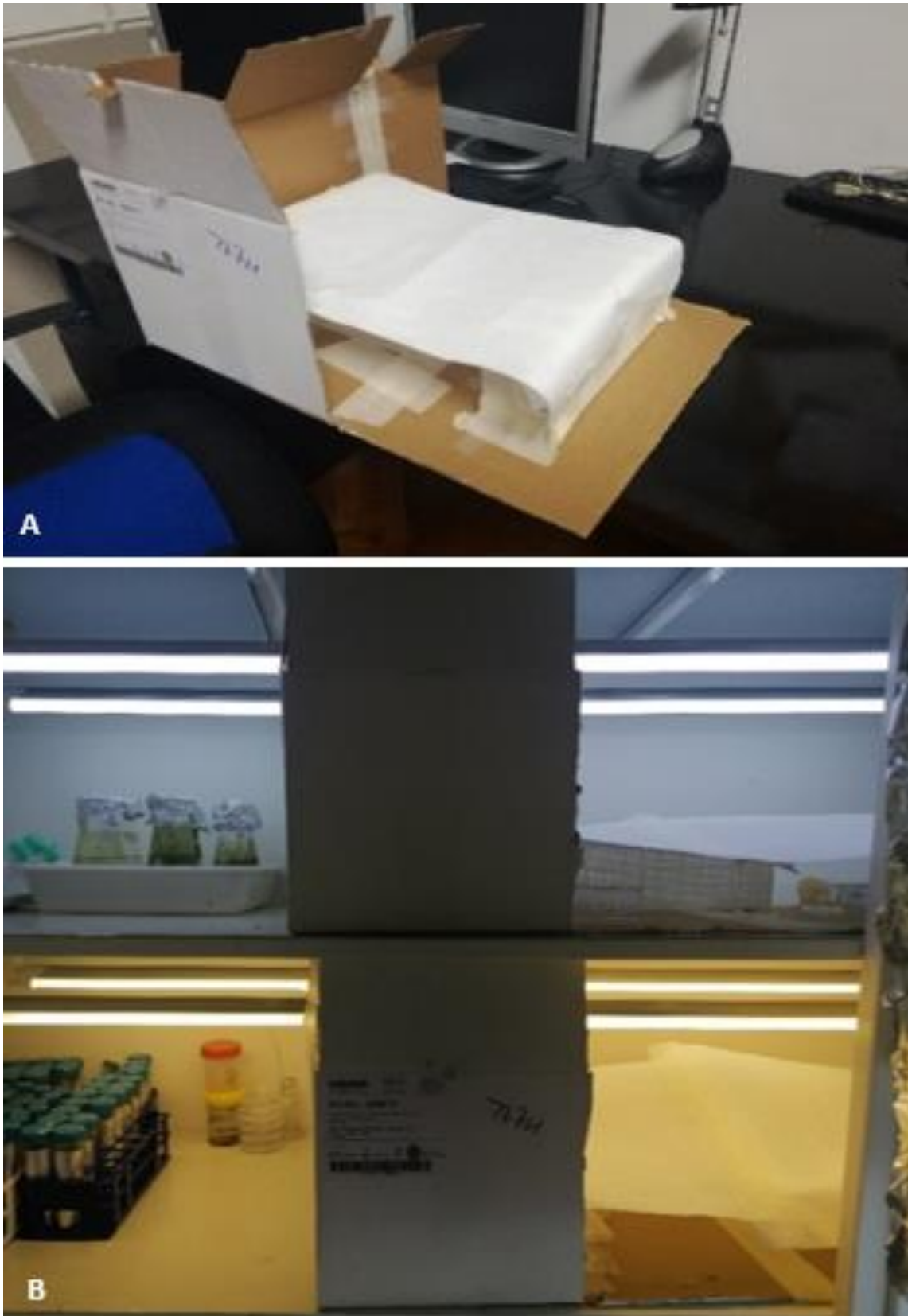
2. MATERIJALI I METODE

stanica iz vrhova mikropipete. Na taj način sam uspješno uočila trenutak prijelaza željene stanice u medij, bez prisutnosti drugih organizama.

2.4 Definiranje sojeva i postavljanje komore za eksperiment

Prethodnim molekularnim i morfološkim analizama definirano je ukupno 17 monokultura vrste *Achnanthes elongata* i 4 monokultura vrste *Poulinea lepidochelicola*, sve izolirane iz dva uzorka strugotina kože i oklopa (TB89 i TB90) s kornjače *Iracus*. Prvi korak u provođenju eksperimenta je bio testiranje i odabir pogodnih monokultura koje ću koristiti u daljnjim postupcima, te sam 21 monokulturu iz uvjeta mraka prebacila u bočice za uzgoj površine 25 cm². Na temelju praćenja morfoloških promjena i stanja stanica u bočicama, odabrala sam 5 sojeva za laboratorijsko istraživanje koji pokazuju svojstva čiste monokulture bez drugih organizama i zdrave nedeformirane stanice. Tri soja vrste *Achnanthes elongata* su označena oznakama PMFTB0052, PMFTB0053 i PMFTB0054, a dva soja vrste *Poulinea lepidochelicola* označene su oznakama PMFTB0073 i PMFTB0077. Potom sam slikala žive stanice odabranih sojeva svjetlosnim mikroskopom Zeiss AxioVision V2 na povećanjima 200×, 400×, i 1000×. Odabrane slike sam obradila u programu Zeiss Zen 2.5 Pro.

Prije početka eksperimenta sam postavila sustav za inkubaciju sojeva. U komoru za uzgoj stanica sam postavila zatvoreni sustav u kojem su bočice u kojima su se nalazile monokulture ograđene od raspršene svjetlosti, te je izvor svjetlosti ograničen na LED lampe postavljene direktno iznad kultura. Sustav sam izradila ručno iz kartonske kutije koja je imala ravnu horizontalnu plohu i dvije bočne vertikalne plohe (Slika 11A). Na horizontalnoj ploči ogradila sam područje za kulture s dva plastična držača za Falcon bočice. Na držače sam zalijepila tanak papir koji je uvijek na istoj visini s obzirom na sojeve. Na tankom papiru je izmjeren intenzitet svjetlosti koji dopire do monokultura, te iznosi 15 μmol/m²s. Za svaku policu dizajnirala sam po jedan zatvoreni sustav u kojem je raslo odabranih 5 sojeva monokultura. Sustave sam postavila na police komore i ogradila pomoću kartonske plohe koja izolira prednju stranu sustava od raspršene svjetlosti. Eksperiment se provodio na dvjema policama komore od kojih je jedna osvijetljena s LED lampom bijele svjetlosti temperature 6500 K, a druga sa LED lampom umjerene bijele svjetlosti temperature 5000 K (Slika 11B). Model LED lampi je T8, te ima 10 W snage i 800 LM svjetlosnog toka.



Slika 11. Zatvoreni sustav komore za uzgoj laboratorijskih kultura dijatomeja: A) Ograđena ploha sa plastičnim držačima i papirom ispod kojeg se postavljaju sojevi, B) Umjetno osvjetljenje u komori: gornja polica je osvijetljena s LED lampom bijele boje temperature 6500K, a donja polica s LED lampom umjerenobijele boje temperature 5000K

2.5 Postavljanje i provođenje eksperimenta

Postavljanje eksperimenta temelji se na optimizaciji uzoraka i određivanju volumena inokulata za eksperimentalne sojeve. Optimizaciju uzoraka sam provela prije početka eksperimenta. Temelji se na određivanju točnog broja stanica koji će se inokulirati u sojeve koji će biti brojani. Na taj način je poznat početni broj stanica u svim eksperimentalnim sojevima i učinkovito se prati njihov rast na krivuljama kroz sve faze.

Proizvoljno sam odabrala tri broja stanica: 10, 100 i 200 st/cm². Za svaki od 5 eksperimentalnih sojeva inokulirala sam po 3 testna uzorka. Izračunala sam koliki mora biti volumen inokulata da bih u testne uzorke prenijela točno 10, 100 i 200 st/cm². Za izračun sam koristila jednadžbe:

$$V_1 \times c_1 = V_2 \times c_2 \quad (2.1)$$

$$V_1 = c_2 / c_1 \quad (2.2)$$

Dobila sam volumen inokulata V_1 s obzirom na c_1 koji je prosječni broj stanica u 1 mL monokulture iz koje uzimam inokulat, c_2 koji iznosi 10, 100 ili 200 st/cm² i V_2 koji je konstantan i iznosi 1 mL. Inokulat sam uzela iz monokultura sojeva i unijela u 100 mL medija bočice površine 75 cm².

Uzorci su rasli 6 dana u komori nakon čega sam ih brojala i odredila prosječnu brojnost stanica po cm² kako bih mogla uočiti koliku gustoću postignu s obzirom na inokulirani broj stanica od 10, 100 i 200 st/cm². Na temelju subjektivne procjene, u eksperimentalne sojeve PMFTB0073, PMFTB0077, PMFTB0053 i PMFTB0052 sam inokulirala 50 st/cm², a u eksperimentalni soj PMFTB0054 sam inokulirala 10 st/cm².

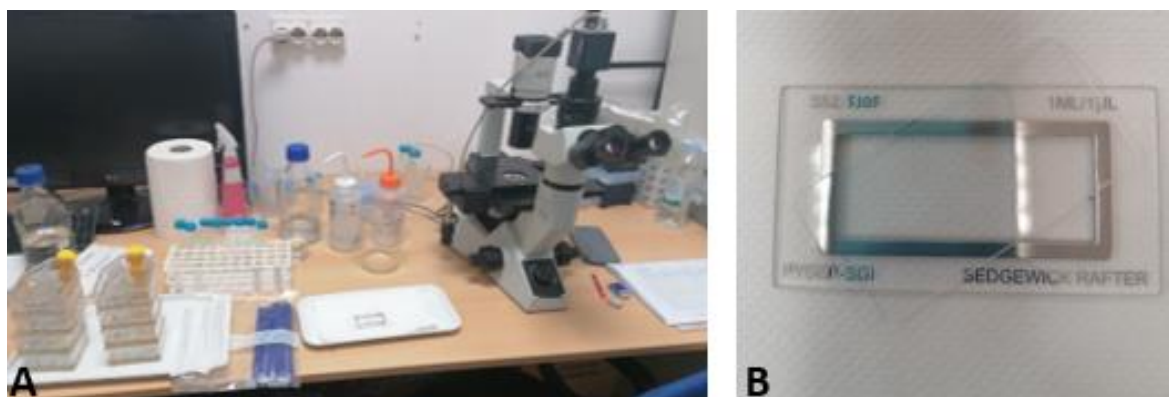
Prije određivanja volumena inokulata za eksperimentalne sojeve, postavila sam monokulture sojeva u uvjete smanjenog osvjetljenja 24 h. Volumen inokulata (V_1) sam odredila prema jednadžbama 2.1 i 2.2 u kojima je c_1 prosječna brojnost stanica u 1 mL monokulture soja nakon 24 h uvjeta smanjenog osvjetljenja, c_2 iznosi 50 st/cm², odnosno 10 st/cm² i konstantan V_2 iznosi 1 mL. Stanice sam inokulirala iz monokulture u 100 mL medija bočice površine 75 cm². Inokulirana 4 biološka replikata za svaki eksperimentalni soj, od kojih sam dva replikata postavila pod LED lampu bijele svjetlosti temperature 6500 K, a druga dva pod LED lampu umjereno-bijele svjetlosti temperature 5000 K.

Sveukupno, laboratorijsko istraživanje obuhvaća praćenje brojnosti stanica u 20 uzoraka, odnosno u 5 različitih sojeva monokultura s 2 biološka replikata pod 2 različita svjetlosna uvjeta. S obzirom na broj uzoraka, eksperiment sam provela u dva dijela. U prvom dijelu sam brojala sojeve PMFTB0073 i PMFTB0054. Brojala sam ih svakog dana, a pred

ulazak u stacionarnu fazu sam ih brojala svaka dva dana. U stacionarnoj fazi sam ih brojala svaka 4 dana do 39. dana, ujedno i zadnjeg dana brojanja. Ulaskom navedenih sojeva u stacionarnu fazu, započela sam drugi dio eksperimenta u kojem sam inokulirala PMFTB0077, PMFTB0052 i PMFTB0053 u biološke replikate. Uzorke sam brojala svaki drugi dan do 30. dana, i zatim opet zadnji 40. dan vremenskog perioda brojanja.

2.6 Metoda brojanja stanica i praćenje podataka

Istu tehniku brojanja sam koristila za određivanje početnog broja stanica po cm^2 , volumena inokulata i praćenje brojnosti stanica eksperimentalnih sojeva kroz faze rasta. Brojanje stanica provela sam pomoću invertnog svjetlosnog mikroskopa Olympus CKX41 i Sedgewick-Rafter komorice za brojanje stanica. Ostala korištena oprema su strugači za odvajanje biomase s površine, Falcon bočice volumena 15 mL i plastične Pasteur pipete za razrjeđivanje, laboratorijske staklene čaše, destilirana voda i etanol za ispiranje komorice između svakog brojanja (Slika 12A). Sedgewick-Rafter komorica ima rešetku s 1000 kvadrata veličine 1 mm^2 , a dubina između pokrovnice i dna komorice je 1 mm. Površina komorice je 1000 mm^2 ($50 \times 20 \text{ mm}$), a volumen komorice je 1 mL (Slika 12B).

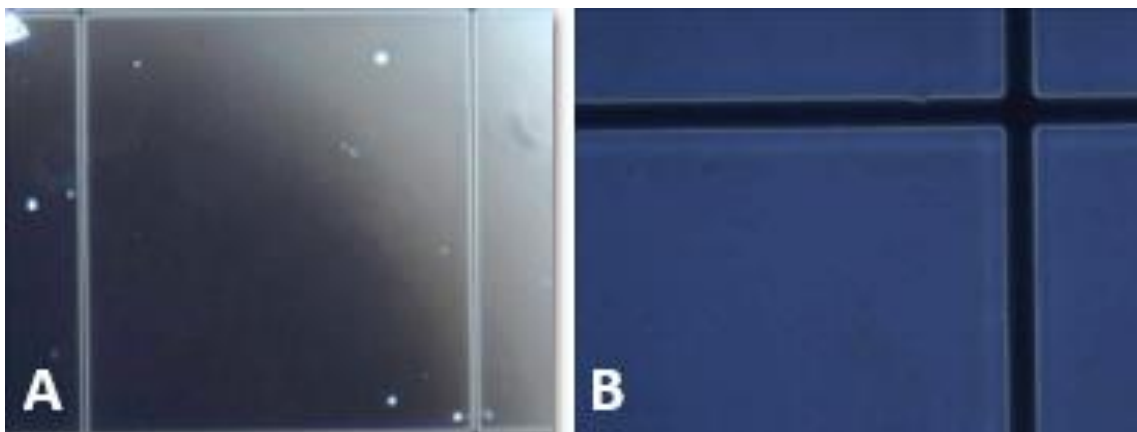


Slika 12. A) Radni prostor za brojanje uzoraka s uzorcima, svom potrebnom opremom i kemikalijama, B) Sedgewick-Rafter komorica za brojanje stanica

Pokrovnicu se postavlja dijagonalno nad komoricu tako da su nasuprotni kutovi komorice slobodni. Plastičnom Pasteur pipetom se uzima 1 mL uzorka za brojanje te se ispusti u komoricu kroz jedan od slobodnih kutova. Prije uzimanja uzorka, provodi se struganje biofilma u bočici za uzgoj pomoću strugača. Bočica se nakon toga jako protrese, čime se omogućuje ravnomjerna raspodjela stanica u stupcu medija. U uzorku ne smije biti mjehurića zraka kako bi se osigurao precizan volumen od 1 mL, što je bitno za točnost daljnjih preračuna brojnosti. Stanice se broje pomoću ručnog brojača metodom nasumičnih kvadrata. U vidnom polju vidljivi su kvadrati (eng. *Whipple field*) unutar kojih se broje

2. MATERIJALI I METODE

stanice (slika 13A), te se odabire 10 nasumičnih kvadrata iz kojih se preračuna prosječna brojnost stanica u 1 mL uzorka.



Slika 13. Prikaz kvadratića Sedgwick-Rafter komorice pod svjetlosnim mikroskopom: A) Povećanje 40× B) Povećanje 200×

Stanice iz svakog uzorka sam brojala tri puta, stoga svaki biološki replikat uključuje 3 tehnička replikata. Prije brojanja potrebno je pogledati cijelu komoricu na manjim povećanjem i razmotriti distribuciju stanica. Stanice sam brojala na povećanju 200× (Slika 13B). Nasumično odabran kvadrat sam postavila u gornji lijevi kut vidnog polja te sam postepenim pomicanjem vidnog polja po horizontalnoj i zatim vertikalnoj ravni pobrojala sve stanice unutar kvadrata. Brojala sam sve stanice unutar kvadrata, te na gornjoj i desnoj rubnoj liniji kvadrata.

Na temelju brojnosti stanica iz 10 kvadrata izračunala sam prosječan broj stanica po formuli: $n_1 + \dots + n_{10} / 10$ gdje je n broj stanica u odgovarajućem kvadratu. Zatim sam izračunala prosječnu brojnost stanica u 1 mL uzorka prema formuli: $N \times 1000 \text{ mm}^3$ gdje je N prosječna brojnost stanica u kvadratu, a 1000 mm^3 je volumen komorice. Tu vrijednost sam zatim dijelila s 75 cm^2 i dobila broj stanica po cm^2 uzorka. Iz srednje vrijednosti tri tehnička replikata pomnoženom s trenutnim volumenom cijelog uzorka, izračunala sam prosječnu brojnost stanica u cijelom volumenu. Dijeljenjem te vrijednosti s 75 cm^2 , dobiva se prosječna brojnost stanica po cm^2 za cijeli uzorak. U slučaju kada je gustoća stanica u kulturi bila prevelika, razrijedila sam 1 mL uzorka u odabranom volumenu medija, te srodno tome definirala faktor razrjeđenja prema formuli: konačni volumen/inicijalni volumen. U slučaju razrjeđivanja, sve vrijednosti prosječne brojnosti stanica sam množila s faktorom razrjeđenja. Između svakog brojanja sam isprala komoricu i pokrovnicu u etanolu i destiliranoj vodi. Nakon završetka brojanja, komoricu sam očistila u Kemex deterdžentu, isprala u etanolu i destiliranoj vodi i temeljno osušila.

2.7 Izrada krivulja rasta i statistička analiza

Na temelju prosječne brojnosti stanica po cm^2 cijelog uzorka, u programu Microsoft Excel 2016 napravila sam krivulje rasta za sve sojeve. Pomoću krivulja pratila sam faze rasta za svaki eksperimentalni soj. Stanice sam brojala sve dok kultura ne dosegne stacionarnu fazu rasta u kojoj nema značajnog porasta brojnosti. Krivulje rasta sam izradila za svaki biološki replikat za obje vrste LED svjetlosti. U tablici za praćenje podataka o brojnosti upisivala sam podatke o brojnosti u nasumično odabranih 10 kvadrata komorice, prosječnu brojnost po kvadratu i prosječnu brojnost u 1 mL za svaki tehnički replikat.

Istovremeno sam u novu tablicu unijela preračunate prosječne brojnosti po cm^2 iz brojnosti po mL za svaki tehnički replikat. Za svaki biološki replikat sam izračunala srednju vrijednost (avg.), standardnu devijaciju (st.dev.) i standardnu pogrešku srednje vrijednosti (SE) brojnosti iz tri tehnička replikata. Kako bih lakše pratila podatke, unijela sam kratice za sojeve u tablice. Kratice sadržavaju informaciju o svjetlosnom uvjetu (umjereno-bijela LED "U" ili bijela LED "B"), vrsti (*Achnanthes elongata* "A" ili *Poulinea lepidochelicola* "P"), soju ("73, 77, 54, 53 ili 52") i broju biološkog replikata (1 ili 2). Primjerice za prvi biološki replikat soja PMFTB0073 pri umjereno-bijeloj LED svjetlosti oznaka je UP731, a za drugi biološki replikat soja PMFTB0054 pri bijeloj LED svjetlosti oznaka je UA542. Izradila sam grafički prikaz srednje vrijednosti i standardne pogreške tehničkih replikata, i time uočila nekoliko ekstremnih vrijednosti koje sam uklonila iz tablice i daljnjih analiza radi reprezentativnijeg grafičkog prikaza podataka.

Iz skupa podataka s eliminiranim ekstremnim vrijednostima brojnosti stanica, ponovno sam izračunala avg, st.dev. i SE iz tehničkih replikata za svaki biološki replikat i avg., st.dev. i SE za svaki soj iz njegovih pripadajućih bioloških replikata. Na temelju podataka sam izradila krivulje rasta sojeva unutar zadanog vremenskog perioda koje prikazuju srednje vrijednosti stanica sa standardnom pogreškom brojnosti za svaki dan brojanja. Iz dobivenih krivulja rasta izradila sam grafički prikaz linearnih trend linija za svaki eksperimentalni soj iz kojih se jasno mogu usporediti eksponencijalne faze rasta istih sojeva koji su rasli pod različitim svjetlosnim uvjetima.

Na temelju brojnosti stanica po cm^2 u eksponencijalnoj fazi rasta sojeva, izračunala sam stope rasta (μ_1 ("mi")) i vrijeme udvostručenja populacije za sve sojeve (T_1). Izradila sam dodatne dvije krivulje rasta koje prikazuju brojnost stanica po cm^2 svih bioloških replikata s uklonjenim ekstremnim vrijednostima. Na temelju podataka iz eksponencijalne faze rasta

dobila sam stope rasta (μ_2) i vrijeme udvostručenja populacije za sve biološke replikate sojeva (T_2). Navedeni izračuni provedeni su prema jednadžbama:

$$\mu = \ln(N_2) - \ln(N_1) / \Delta t \quad (2.3)$$

$$T = \ln(2) / \mu \quad (2.4)$$

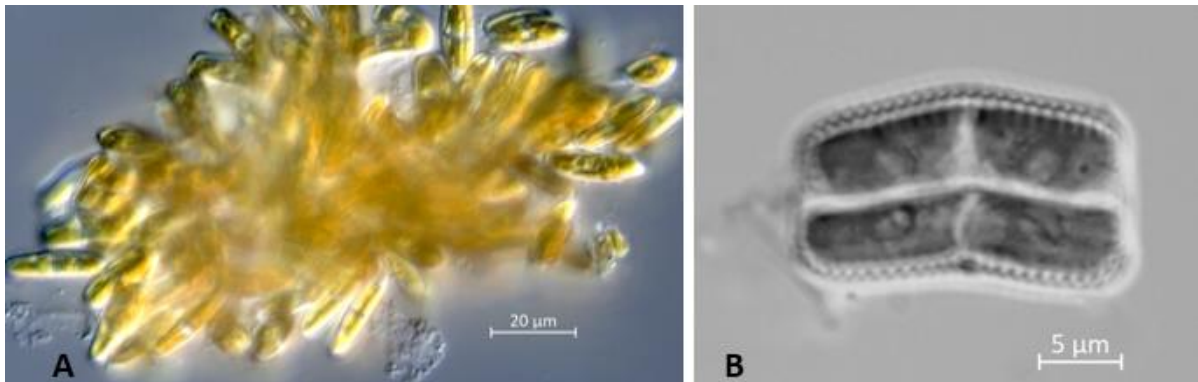
Vrijednosti T_1 i T_2 sam odabrala kao parametre za opis stope rasta populacije izražen u danima, te sam navedene vrijednosti unosila u statističku analizu koja je provedena pomoću t-testa u Excel programu. T-testom sam analizira značajnost razlike za: (1) T_1 sojeva vrste *A. elongata* i *P. lepidochelicola* između umjereno-bijele i bijele LED svjetlosti, (2) T_2 između bioloških replikata sojeva vrste *A. elongata* i *P. lepidochelicola* pri umjereno-bijeloj LED svjetlosti i (3) T_2 između bioloških replikata sojeva vrste *A. elongata* i *P. lepidochelicola* pri bijeloj LED svjetlosti. Izradila sam kutijaste dijagrame u svrhu usporedbe postignute gustoće stanica za sve biološke replikate sojeva vrste *A. elongata* i vrste *P. lepidochelicola* pri umjereno-bijeloj LED svjetlosti i bijeloj LED svjetlosti, te neovisno o uvjetu osvjetljenja.

3. REZULTATI

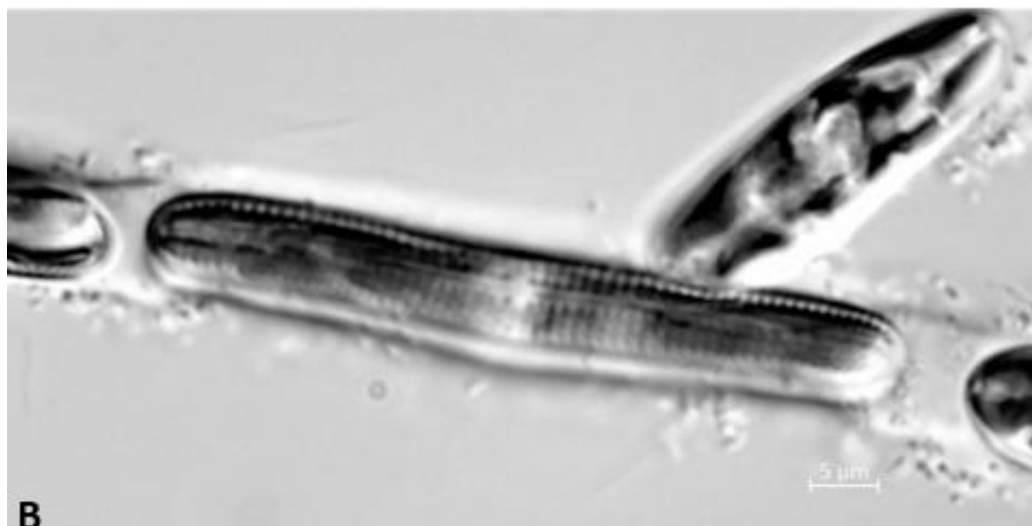
3.1 Slike živih stanica eksperimentalnih sojeva vrsta *Achnanthes elongata* i *Poulinea lepidochelicola*

Morfološka analiza eksperimentalnih sojeva vrste *Achnanthes elongata* (PMFTB0052 (Slika 14), PMFTB0053 (Slika 15) i PMFTB0054 (Slika 16)) i vrste *Poulinea lepidochelicola* (PMFTB0073 (Slika 17) i PMFTB0077 (Slika 18)) pokazala je da se sojevi iste vrste međusobno morfološki vidljivo ne razlikuju. Na slikama su dobro vidljivi kloroplasti i sluzavi ovoji oko stanica, te slabije vidljivi određeni dijelovi frustule. Vidljivim sluzavim ovojem stanice se pričvršćuju za podlogu, te se međusobno povezuju u lance i grumene.

Na Slikama 14., 15. i 16. vidljivo je da se glavna morfološka razlika očituje u duljini stanica, odnosno stanice soja PMFTB0052 su kraće od stanica sojeva PMFTB0053 i PMFTB0054. Stanice soja PMFTB0052 formiraju grumene, dok stanice sojeva PMFTB0053 i PMFTB0054 formiraju lance. Također, stanice soja PMFTB0054 su blago dulje od stanica soja PMFTB0053. Bez obzira na manje morfološke razlike, navedeni sojevi pokazuju morfološke karakteristike vrste *A. elongata*. Nisu vidljive razlike u morfologiji stanica i položaju kloroplasta između sojeva PMFTB0073 i PMFTB0077 (Slike 17 i 18). Stanice pokazuju V-oblik stanice i rubni položaj kloroplasta, te morfološke karakteristike vrste *P. lepidochelicola*.



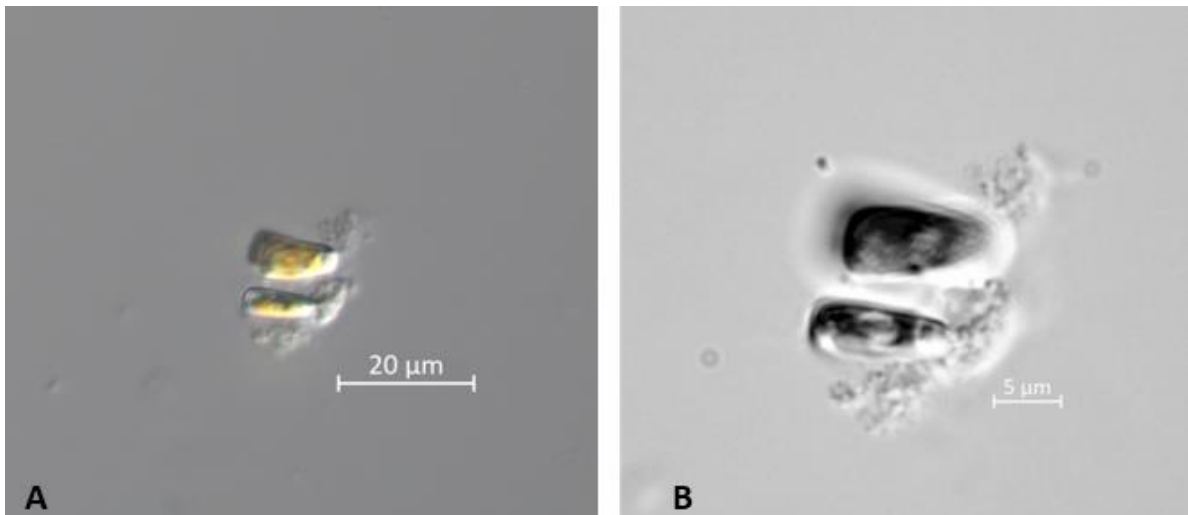
Slika 14. Žive stanice vrste *Achmanthes elongata* soja PMFTB0052: A) Grupa stanica. B) Jedna stanica prikazana s pleuralne strane. Vidljivi su kloroplasti (tamno) te dio strija na rubovima (svijetle crte).



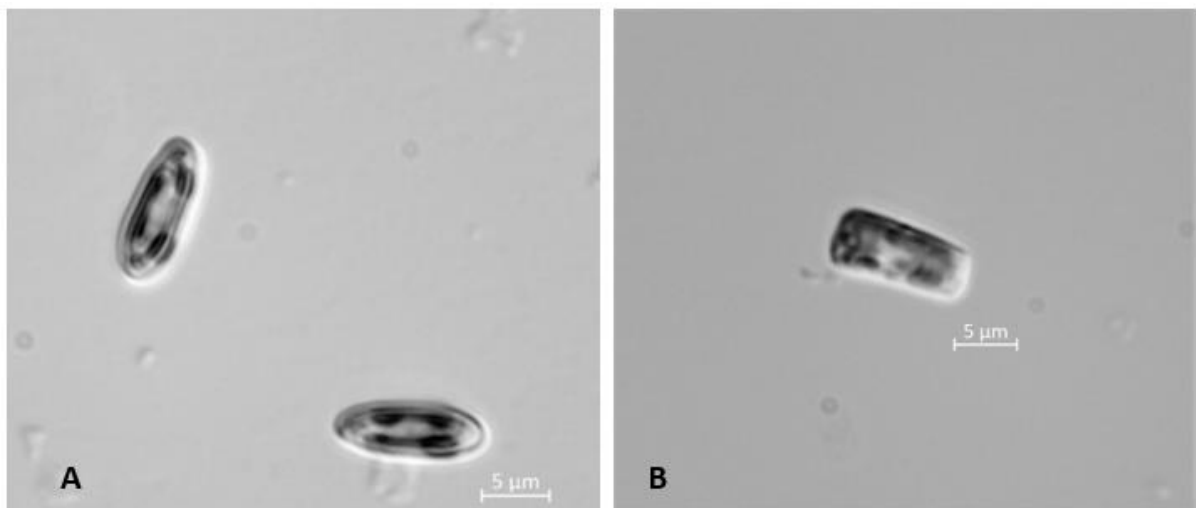
Slika 15. Žive stanice vrste *Achmanthes elongata* soja PMFTB0053: A) Lanac stanica, povezan sluzavim kratkim stapkama. B) Jedna stanica prikazana s valvalne strane. Vidljivi su kloroplasti (tamno), te strije i rafa frustule (svijetle crte)



Slika 16. Žive stanice vrste *Achnanthes elongata* soja PMFTB0054: A) Lanac stanica, povezan sluzavim kratkim stapkama; B) Stanice prikazane s valvalne strane. Vidljivi su kloroplasti (tamno)



Slika 17. Žive stanice vrste *Poulinea lepidochelicola* soja PMFTB0073: A) Dvije stanice prikazane s pleuralne strane. Vidljiv V oblik stanice i pričvršćivanje na substrat preko užeg donjeg dijela stanice, B) Dvije stanice prikazane s pleuralne strane. Vidljivi su kloroplasti (tamno).

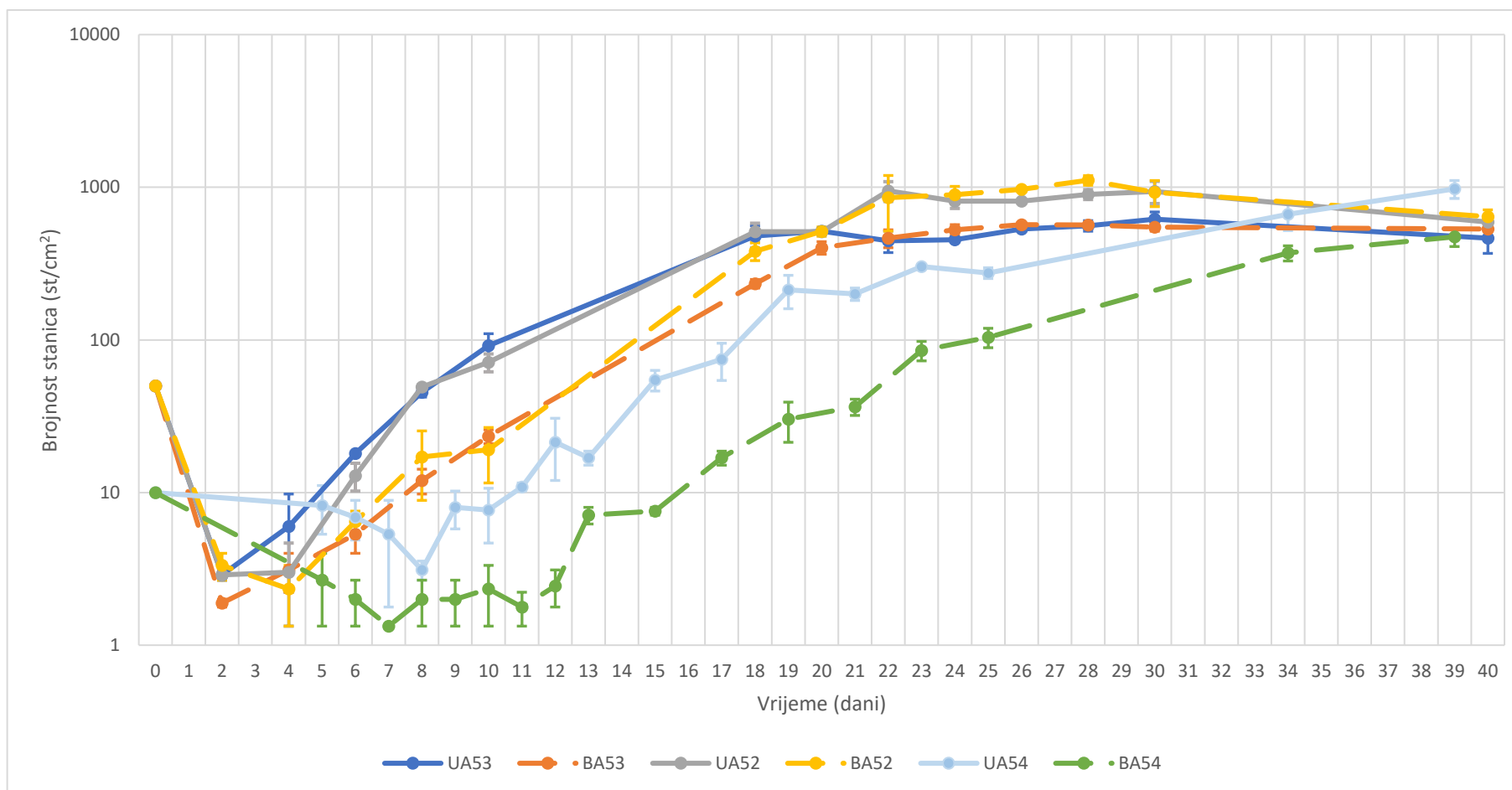


Slika 18. Žive stanice vrste *Poulinea lepidochelicola* soja PMFTB0077: A) Dvije stanice prikazane s valvalne strane. Vidljivi kloroplasti (tamno) i rubovi frustule. B) Stanica prikazana s pleuralne strane. Vidljivi su V oblik stanice i kloroplasti (tamno).

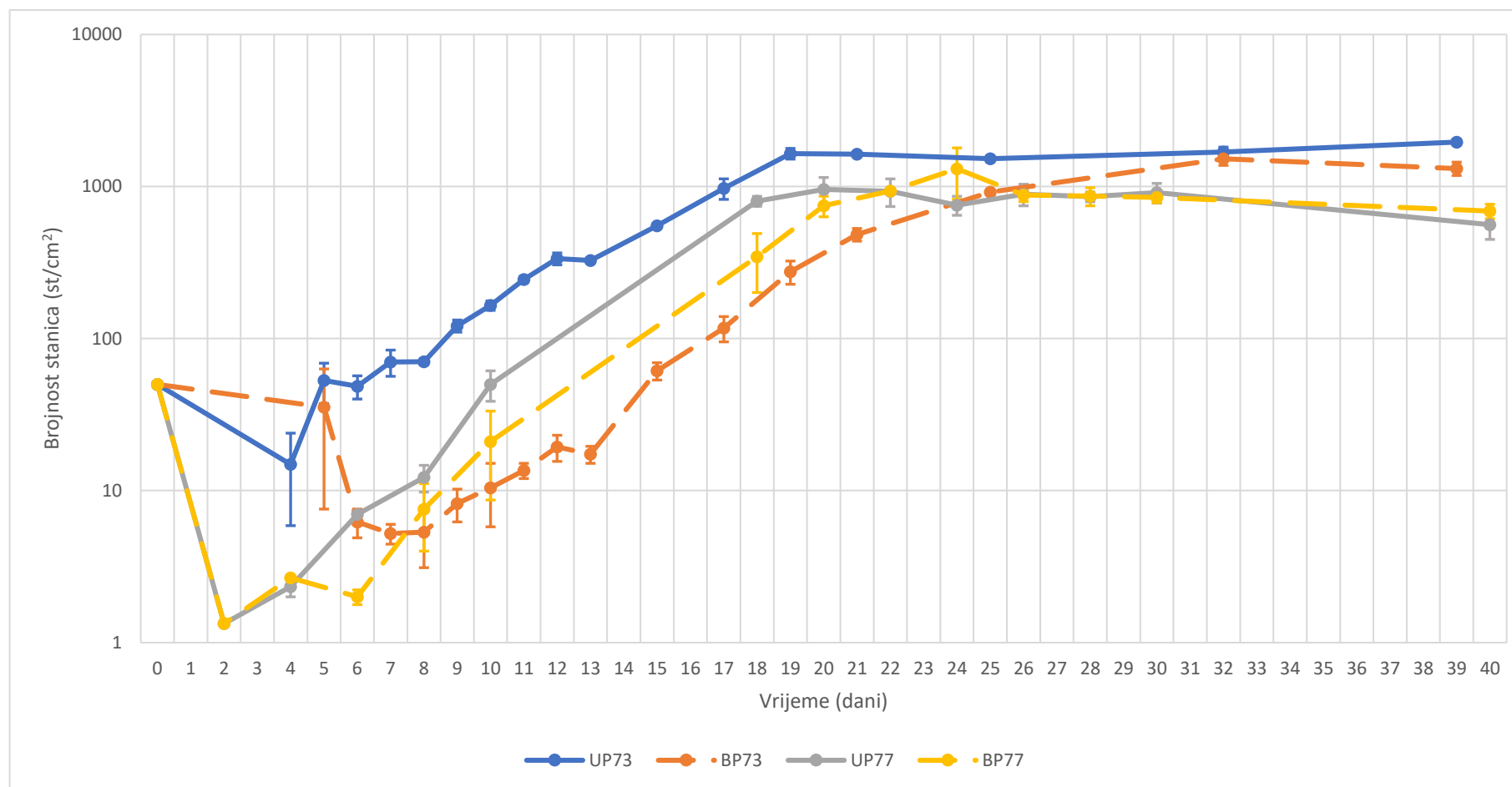
3.2. Krivulje rasta eksperimentalnih sojeva za oba svjetlosna uvjeta

Krivulje rasta vrste *Achnanthes elongata* (sojevi PMFTB0052, PMFTB0053, PMFTB0054) prikazane su na Slici 19., a za vrstu *Poulinea lepidochelicola* (sojevi PMFTB0073, PMFTB0077) na Slici 20. Svi sojevi u rezultatima (tablice i grafički prikazi) označeni su s kraticama za sojeve koje su objašnjene u poglavlju 2.7. Krivulje predstavljaju srednje vrijednosti brojnosti stanica po cm^2 sa standardnom pogreškom iz bioloških replikata svakog eksperimentalnog soja u uvjetima umjereno-bijele LED svjetlosti temperature 5000 K i bijele LED svjetlosti temperature 6500 K. Vremenski period brojanja za sojeve PMFTB0073 i PMFTB0054 je 39 dana, a za sojeve PMFTB0077, PMFTB0052 i PMFTB0053 je 40 dana.

Grafovi ne uključuju ekstremne vrijednosti koje su prethodno eliminirane, međutim prikazane su na grafičkim prikazima krivulja rasta bioloških replikata sojeva u prilogu (Slike P1-P4). Također su prikazane i dodatno izrađene krivulje rasta svih bioloških replikata sojeva vrste *A. elongata* i *P. lepidochelicola* s uklonjenim ekstremnim vrijednostima (Slike P5 i P6), na temelju kojih je izračunato vrijeme udvostručenja populacije (T_2) bioloških replikata u svrhu statističke usporedbe sojeva.



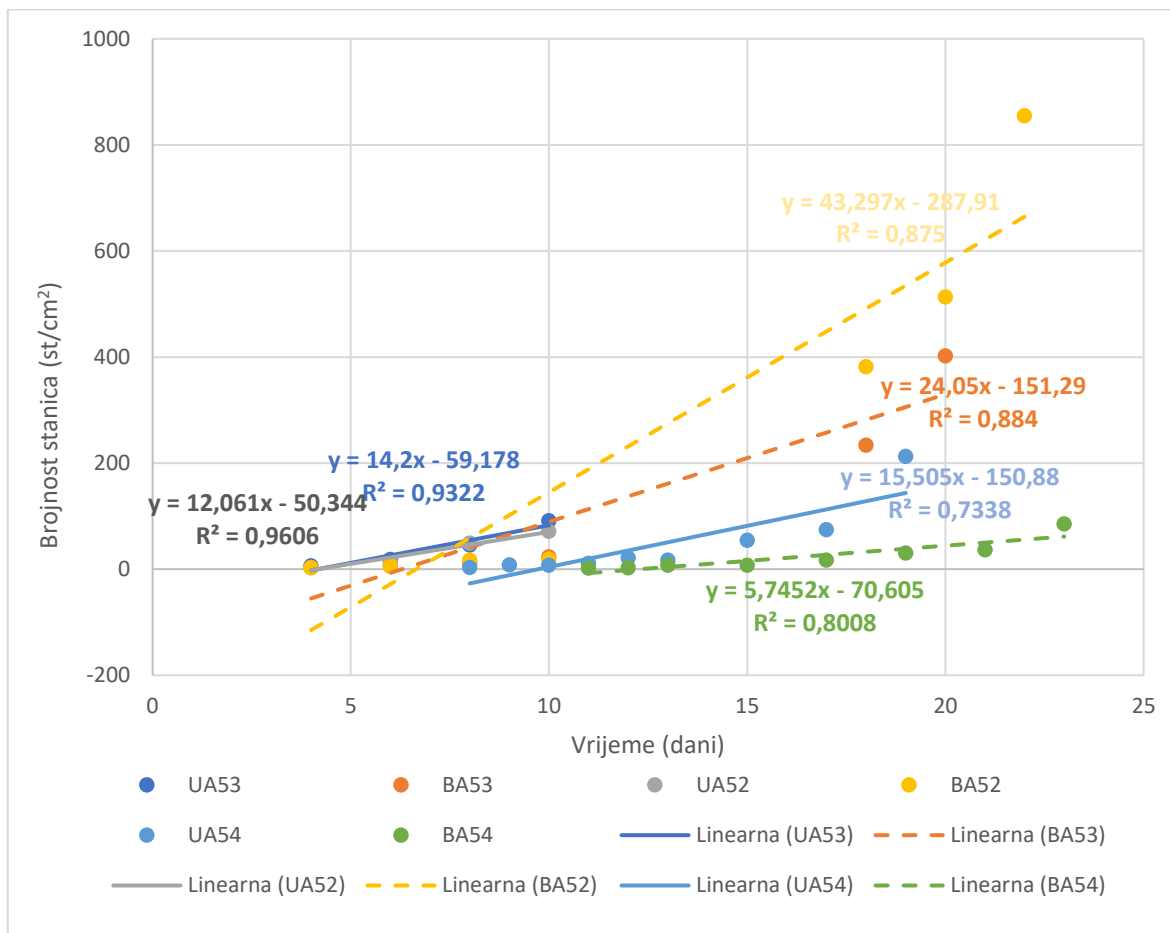
Slika 19. Krivulje rasta sojeva vrste *Achmanthes elongata*: PMFTB0053 (UA53, BA53), PMFTB0052 (UA52, BA52) i PMFTB0054 (UA54, BA54) u oba svjetlosna uvjeta. Pune linije predstavljaju rast brojnosti stanica sojeva u uvjetima umjereno-bijele LED svjetlosti temperature 5000 K (oznaka "U"), a isprekidane linije predstavljaju rast brojnosti stanica sojeva u uvjetima bijele LED svjetlosti temperature 6500 K (oznaka "B"). Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti dva biološka replikata s iskazanom standardnom pogreškom (SE). Os y prikazana je logaritamskom skalom.



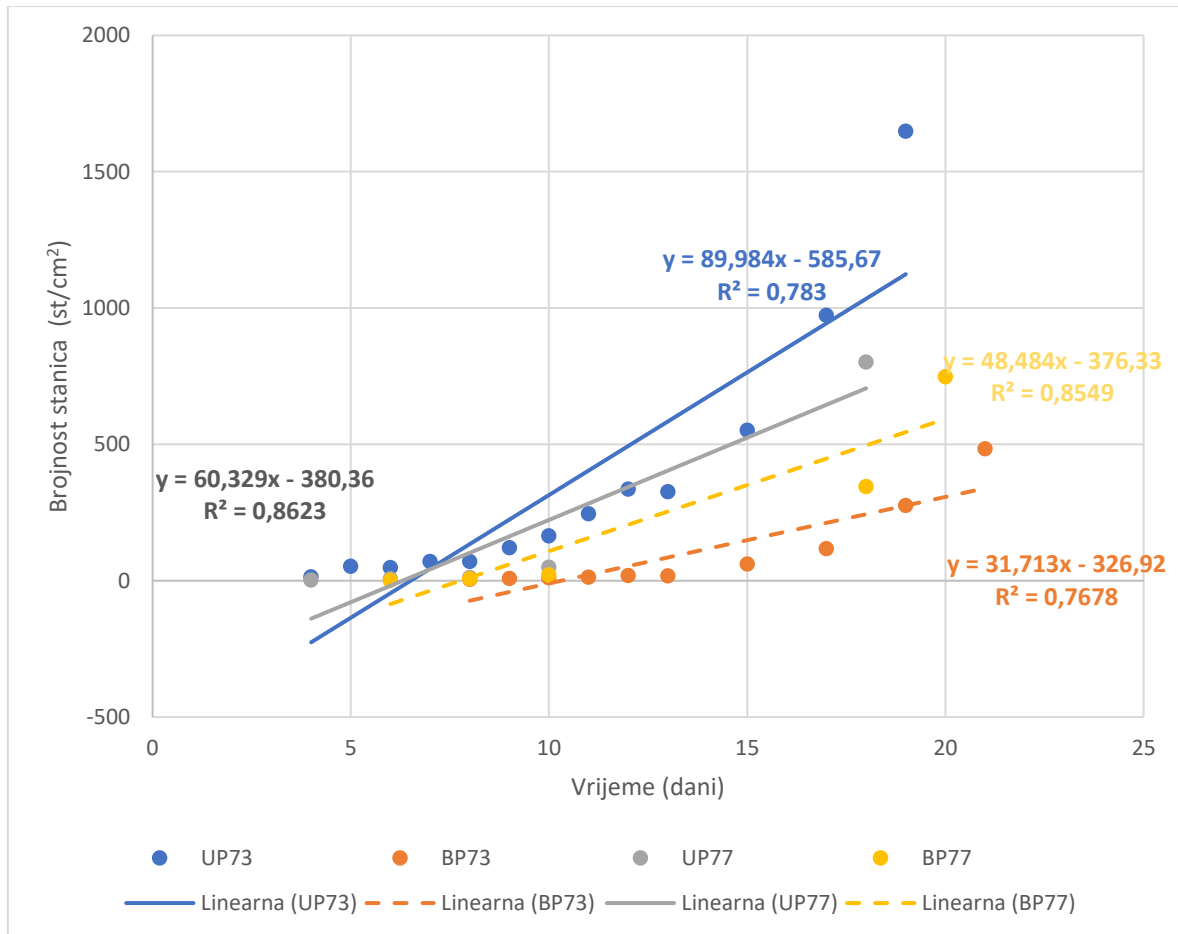
Slika 20. Krivulje rasta sojeva vrste *Poulinea lepidochelica*: PMFTB0073 (UP73, BP73) i PMFTB0077 (UP77, BP77) u oba svjetlosna uvjeta. Pune linije predstavljaju rast brojnosti stanica sojeva u uvjetima umjereno-bijele LED svjetlosti temperature 5000 K (oznaka "U"), a isprekidane linije predstavljaju rast brojnosti stanica sojeva u uvjetima bijele LED svjetlosti temperature 6500 K (oznaka "B"). Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti dva biološka replikata s iskazanom standardnom pogreškom (SE). Os y prikazana je logaritamskom skalom.

3.3 Eksponecijalni rast eksperimentalnih sojeva

Iz krivulja rasta eksperimentalnih sojeva izvedene su trend linije u Excel programu na temelju srednjih vrijednosti brojnosti stanica po cm^2 . Trend linije su prikazane na Slikama 21 i 22, te predstavljaju točke vremenskog perioda tijekom kojih je brojnost sojeva rasla eksponencijalno, što je na krivuljama rasta vidljivo kao linearan odnos između brojnosti stanica (y os) i vremena (x os) (Slike 19 i 20). Uz svaku liniju nalazi se pripadajuća jednadžba linearne funkcije.



Slika 21. Eksponecijalni rast sojeva PMFTB0052 (UA52, BA52), PMFTB0053 (UA53, BA53) i PMFTB0054 (UA54, BA54) vrste *Achnanthes elongata*. PUNE crte predstavljaju trend linije sojeva u uvjetima umjereno-bijele LED svjetlosti temperature 5000 K, a isprekidane crte predstavljaju trend linije sojeva u uvjetima bijele LED svjetlosti temperature 6500 K. Uz svaku liniju navedena je jednadžba linearne funkcije trend linije.



Slika 22. Eksponencijalni rast sojeva PMFTB0073 (UP73, BP73) i PMFTB0077 (UP77, BP77) vrste *Poulinea lepidochelicola*. Pune crte predstavljaju trend linije sojeva u uvjetima umjereno-bijele LED svjetlosti temperature 5000 K, a isprekidane crte predstavljaju trend linije sojeva u uvjetima bijele LED svjetlosti temperature 6500 K. Uz svaku liniju navedena je jednadžba linearne funkcije trend linije.

3.4 Stope rasta eksperimentalnih sojeva i statistička analiza

Stope rasta (μ_2) i vremena udvostručenja populacija (T_2) za sve biološke replikate svih eksperimentalnih sojeva prikazani su u Tablici 2. Za vrstu *Poulinea lepidochelica* postoji razlika u μ_2 i T_2 između svih bioloških replikata koji su rasli pri umjereno-bijeloj LED svjetlosti. Biološki replikati soja PMFTB0077 pokazuju puno veću stopu rasta i brže vrijeme udvostručenja populacije u odnosu na biološke replikate soja PMFTB0073. Između prvog i drugog biološkog replikata svakog soja postoji manja razlika. Isti rezultati su dobiveni za biološke replikate sojeva vrste *P. lepidochelica* koji su rasli pri bijeloj LED svjetlosti. Biološki replikati sojeva vrste *Achnanthes elongata* se također međusobno razlikuju u μ_2 i T_2 pri oba svjetlosna uvjeta, te su vidljive manje razlike između prvog i drugog replikata za svaki soj. Najveću stopu rasta i najbrže vrijeme udvostručenja populacije pokazuju prvi biološki replikat soja PMFTB0053 i drugi biološki replikat soja PMFTB0052 pri umjereno-bijeloj LED svjetlosti (Tablica 2).

Tablica 2. Stope rasta (μ_2) i vrijeme udvostručenja populacije (T_2) za sve biološke replikate eksperimentalnih sojeva laboratorijskih kultura dijatomeja. N_1 - prosječna brojnost po cm^2 prvi dan vremenskog perioda (t_1), N_2 - prosječna brojnost po cm^2 zadnji dan vremenskog perioda (t_2), Δt - vremenski period eksponencijalne faze rasta brojnosti soja

Oznaka sojeva	N_1	N_2	t_1 (dan)	t_2 (dan)	Δt (dani)	μ_2 (dioba po danu)	T_2 (dani)
UP731	56,89	1514,67	6	19	13	0,25	2,75
UP732	40,00	1781,33	6	19	13	0,29	2,37
UP771	2,00	862,22	4	18	14	0,43	1,60
UP772	2,67	741,33	4	18	14	0,40	1,72
UA541	3,56	264,89	8	19	11	0,39	1,77
UA542	1,78	160,00	7	19	12	0,37	1,85
UA531	2,22	73,33	4	10	6	0,58	1,19
UA532	9,78	109,78	4	10	6	0,40	1,72
UA521	4,67	80,89	4	10	6	0,48	1,46
UA522	1,33	61,78	4	10	6	0,64	1,08
BP731	7,56	529,78	8	21	13	0,33	2,12
BP732	3,11	437,33	8	21	13	0,38	1,82
BP771	1,78	632,00	6	20	14	0,42	1,65
BP772	2,22	864,00	6	20	14	0,43	1,63
BA541	1,33	39,11	10	19	9	0,38	1,85
BA542	1,33	97,78	11	23	12	0,36	1,94
BA531	2,22	248,89	4	18	14	0,34	2,06
BA532	4,00	218,67	6	18	12	0,33	2,08
BA521	3,33	26,67	4	10	6	0,35	2,00
BA522	1,33	330,67	4	18	14	0,39	1,76

Stope rasta (μ_1) i vremena udvostručenja populacija (T_1) za svaki eksperimentalni soj ovisno o svjetlosnom uvjetu su prikazani u Tablici 3. Vidljivo je da svi sojevi vrste *Achnanthes elongata* pokazuju veću stopu rasta i brže vrijeme udvostručenja populacije pri umjereno-bijeloj LED svjetlosti u odnosu na sojeve koji su rasli pri bijeloj LED svjetlosti. Za vrstu *Poulinea lepidochelicola* također postoji razlika u μ_1 i T_1 sojeva između svjetlosnih uvjeta. Vidljiva je veća stopa rasta soja PMFTB0073 i brže vrijeme udvostručenja populacije soja PMFTB0077 pri bijeloj LED svjetlosti.

Tablica 3. Stope rasta (μ_1) i vrijeme udvostručenja populacije (T_1) za sve eksperimentalne sojeve laboratorijskih kultura dijatomeja. N_1 - prosječna brojnost po cm^2 prvi dan vremenskog perioda (t_1), N_2 - prosječna brojnost po cm^2 zadnji dan vremenskog perioda (t_2), Δt - vremenski period eksponencijalne faze rasta brojnosti soja

Oznaka sojeva	N_1	N_2	t_1 (dani)	t_2 (dani)	Δt (dani)	μ_1 (dioba po danu)	T_1 (dani)
UA53	6,00	91,56	4	10	6	0,45	1,53
BA53	3,11	402,00	4	20	16	0,30	2,28
UA52	3,00	71,33	4	10	6	0,53	1,31
BA52	2,33	855,11	4	22	18	0,33	2,11
UA54	3,11	212,44	8	19	11	0,38	1,81
BA54	1,78	85,33	11	23	12	0,32	2,15
UP73	14,87	1648,00	4	19	15	0,31	2,21
BP73	5,33	483,56	8	21	13	0,35	2,00
UP77	2,33	801,78	4	18	14	0,42	1,66
BP77	2,00	748,00	6	20	14	0,42	1,64

Značajnost svih uočenih razlika testirana je statističkom analizom koja je provedena t-testom iz vrijednosti T_1 i T_2 . Rezultati analize su p-vrijednosti koje odgovaraju trima testnim skupinama: (1) razlika T_1 sojeva *Achnanthes elongata* i *Poulinea lepidochelicola* između svjetlosnih uvjeta (Tablica 4), (2) razlika T_2 između bioloških replikata sojeva *A. elongata* i *P. lepidochelicola* pri umjereno-bijeloj LED svjetlosti (Tablica 5) i (3) razlika T_2 između bioloških replikata sojeva *A. elongata* i *P. lepidochelicola* pri bijeloj LED svjetlosti (Tablica 6). Statistički značajne p-vrijednosti su manje od α ("alpha") vrijednosti koja iznosi 0,05. Sojevi PMFTB0054, PMFTB0053 i PMFTB0052 vrste *A. elongata* se značajno razlikuju u vremenu udvostručenja populacije (T_1) između različitih svjetlosnih uvjeta, dok za vrstu *P. lepidochelicola* nema značajne razlike u vremenu udvostručenja populacije sojeva PMFTB0077 i PMFTB0073 između različitih svjetlosnih uvjeta (Tablica 4). Također, nema značajne razlike u T_2 između bioloških replikata sojeva vrsta *A. elongata* i *P. lepidochelicola* pri umjereno-bijeloj LED svjetlosti (Tablica 5), niti između sojeva obje vrste pri bijeloj LED svjetlosti (Tablica 6).

Tablica 4. Statistička analiza razlika u stopama rasta između umjereno-bijele i bijele LED svjetlosti za vrste *Achnanthes elongata* (sojevi PMFTB0054, PMFTB0053 i PMFTB0052) i *Poulinea lepidochelicola* (sojevi PMFTB0077 i PMFTB0073). T-test pokazuje značajnu razliku pri p vrijednosti <0,05, označeno podebljanim fontom.

Vrste dijatomeja	Eksperimentalni sojevi	p-vrijednost
<i>Achnanthes elongata</i>	PMFTB0054, PMFTB0053 i PMFTB0052	0,01
<i>Poulinea lepidochelicola</i>	PMFTB0077 i PMFTB0073	0,38

Tablica 5. Statistička analiza razlika u stopama rasta pri bijeloj LED svjetlosti između bioloških replikata vrsta *Achnanthes elongata* (sojevi PMFTB0054, PMFTB0053 i PMFTB0052) i *Poulinea lepidochelicola*

Vrste dijatomeja	Biološki replikati sojeva	p-vrijednost
<i>Achnanthes elongata</i>	PMFTB0054 i PMFTB0053	0,08
<i>A. elongata</i>	PMFTB0054 i PMFTB0052	0,47
<i>A. elongata</i>	PMFTB0053 i PMFTB0052	0,18
<i>Poulinea lepidochelicola</i>	PMFTB0073 i PMFTB0077	0,07

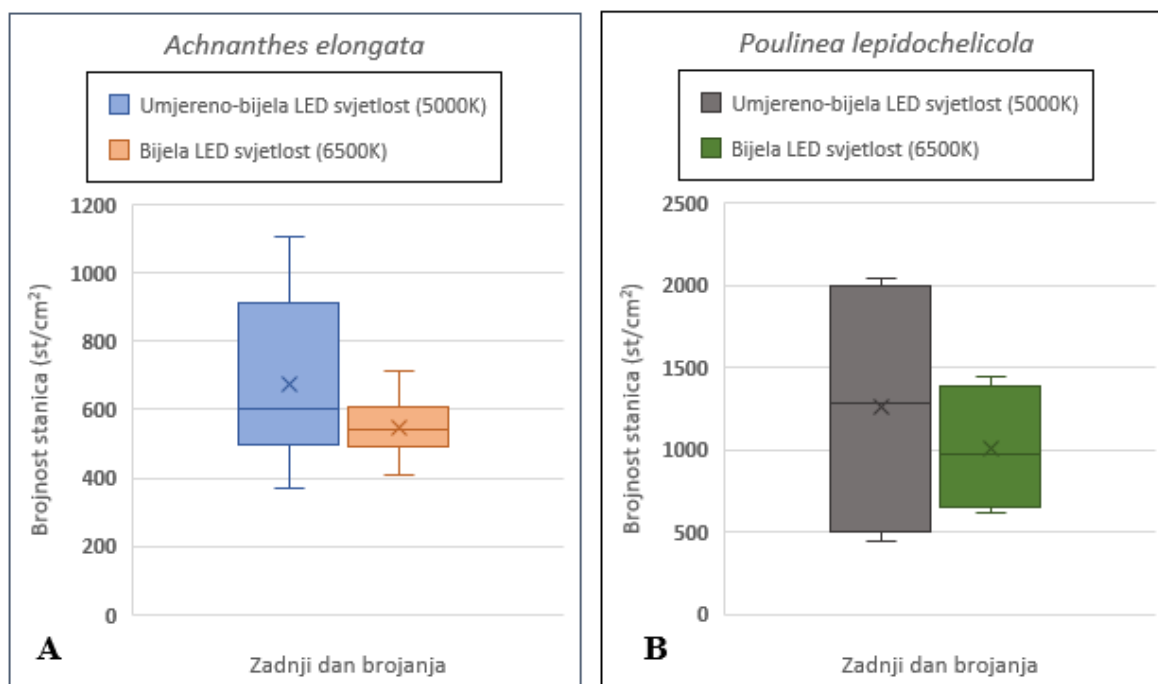
(sojevi PMFTB0077 i PMFTB0073). T-test ne pokazuje značajne razlike.

Tablica 6. Statistička analiza razlika u stopama rasta pri umjereno-bijeloj LED svjetlosti između bioloških replikata vrsta *Achnanthes elongata* (sojevi PMFTB0054, PMFTB0053 i PMFTB0052) i *Poulinea lepidochelicola* (sojevi PMFTB0077 i PMFTB0073). T-test ne pokazuje značajne razlike.

Vrste dijatomeja	Biološki replikati sojeva	p-vrijednost
<i>Achnanthes elongata</i>	PMFTB0054 i PMFTB0053	0,21
<i>A. elongata</i>	PMFTB0054 i PMFTB0052	0,11
<i>A. elongata</i>	PMFTB0053 i PMFTB0052	0,31
<i>Poulinea lepidochelicola</i>	PMFTB0073 i PMFTB0077	0,14

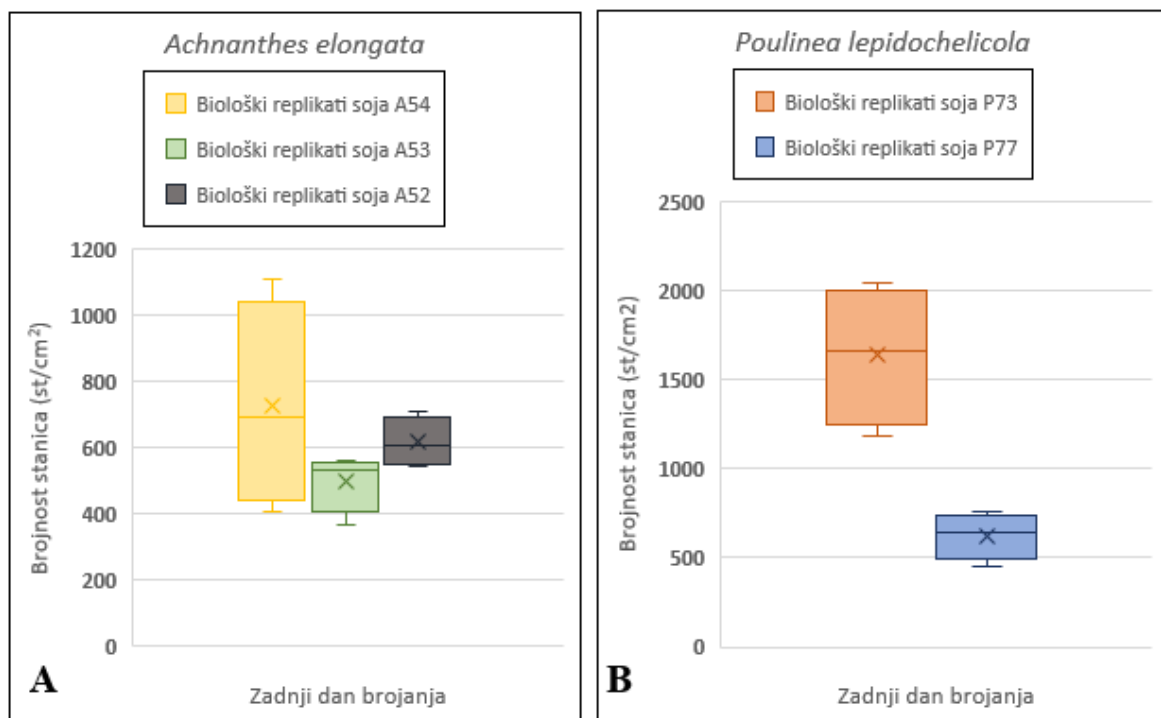
3.5 Gustoće stanica eksperimentalnih sojeva zadnji dan brojanja

Sojevi PMFTB0054 (vrsta *Achnanthes elongata*) i PMFTB0073 (vrsta *Poulinea lepidochelicola*) brojani su 39 dana, a sojevi PMFTB0052 i PMFTB0053 (vrsta *A. elongata*) te PMFTB0077 (vrsta *P. lepidochelicola*) brojani su 40 dana. Zadnji 39. dan i 40. dan određene su gustoće stanica za sve sojeve i vrijednosti su uspoređene između svjetlosnih uvjeta za sve biološke replikate sojeva vrste *A. elongata* (Slika 23A) i sojeva vrste *P. lepidochelicola* (Slika 23B). Na Slici 23A vidljivo je da biološki replikati sojeva vrste *A. elongata* pokazuju širi raspon podataka oko medijana pri svjetlosti topline 5000 K u odnosu na svjetlost topline 6500 K. Širi raspon podataka ukazuje na to da su biološki replikati varijabilniji u doseg u gustoće u fazi mirovanja, dok biološki replikati vrste *A. elongata* pri svjetlosti topline 6500 K dosežu međusobno sličnu gustoću što se očituje u užem rasponu podataka oko medijana. Isto je vidljivo na Slici 23B, gdje biološki replikati sojeva vrste *P. lepidochelicola* pri svjetlosti topline 5000 K pokazuju širi raspon podataka oko medijana. Također vidljivo je na oba grafa da biološki replikati vrste *A. elongata* i vrste *P. lepidochelicola* dosežu veću gustoću zadnji dan faze mirovanja pri svjetlosti topline 5000 K. Medijan sojeva vrste *A. elongata* pri svjetlosti topline 5000 K iznosi 600 st/cm², u odnosu na sojeve pri svjetlosti topline 6500 K koji iznosi 542 st/cm². Medijan sojeva vrste *P. lepidochelicola* pri svjetlosti topline 5000 K iznosi 1278 st/cm², dok za uvjet svjetlosti topline 6500 K iznosi 973 st/cm².



Slika 23. Gustoća stanica zadnji dan brojanja (39-40 dan) svih bioloških replikata sojeva pri različitim svjetlosnim uvjetima za vrstu A) *Achnanthes elongata*, B) *Poulinea lepidochelicola*.

Uspoređene su gustoće stanica sojeva zadnji dan brojanja između svih bioloških replikata sojeva vrste *A. elongata* (Slika 24A) te između svih bioloških replikata sojeva vrste *P. lepidochelicola* (Slika 24B). Dakle, neovisno o svjetlosnom uvjetu postoje razlike u postignutoj gustoći stanica između sojeva. Graf na Slici 24A pokazuje da biološki replikati soja PMFTB0054 vrste *A. elongata* ima najširi raspon podataka oko medijana, te dosežu najveću brojnost stanica po cm^2 zadnji dan faze mirovanja. Biološki replikati sojeva PMFTB0053 i PMFTB0052 su pokazali sličniji trend u brojnosti stanica u zadnjem danu, s tim da je medijan soja PMFTB0053 iznosi 533 st/cm^2 , a medijan soja PMFTB0052 iznosi 606 st/cm^2 (Slika 24A). Razlika u gustoći populacije između sojeva vidljiva je i na Slici 24B, gdje biološki replikati soja PMFTB0073 vrste *P. lepidochelicola* više variraju oko medijana i postižu veću brojnost po cm^2 od bioloških replikata soja PMFTB0077 koji ima užu raspon podataka oko medijana. Medijan soja PMFTB0073 iznosi 1663 st/cm^2 , a medijan soja PMFTB0077 iznosi 644 st/cm^2 .



Slika 24. Gustoća stanica zadnji dan brojanja (39.-40. dan) svih bioloških replikata sojeva neovisno o svjetlosnom uvjetu za vrstu A) *Achnanthes elongata*, B) *Poulinea lepidochelicola*.

4. RASPRAVA

4.1. Morfološke razlike i sličnosti sojeva vrsta *Achnanthes elongata* i *Poulinea lepidochelicola*

Pregled živih stanica eksperimentalnih sojeva pokazao je da sojevi PMFTB0052, PMFTB0053 i PMFTB0054 (Slike 14, 15 i 16) morfološki odgovaraju opisu vrste *Achnanthes elongata* (Majewska i sur. 2017). Na stanicama je vidljiva savijenost u centralnom području frustule (Slika 14), sojevi pokazuju izduženost stanica te je vidljiv karakterističan sluzavi ovoj kojim se stanice spajaju u lance (Majewska i sur 2017). Sojevi se međusobno razlikuju u duljini stanica, te soj PMFTB0052 pokazuje tendencije za stvaranje grumena, umjesto lanaca između stanica.

Prema Slikama 17. i 18., sojevi PMFTB0073 i PMFTB0077 morfološki odgovaraju vrsti *Poulinea lepidochelicola*. Sukladno opisu vrste koju su izložili Majewska i suradnici (2015) u svome radu, vidljiv je karakterističan V-oblik stanice, odnosno širi gornji kraj stanice koji se postupno sužava prema donjem kraju (Slika 17B). U odnosu na slike izrađene elektronskom mikroskopijom (Majewska i sur. 2015) na sojevima u ovom radu (Slike 17 i 18) nisu vidljive karakteristična fascija na heteropolarnoj valvi i pregrada na cingulumu iz razloga što su uzorci promatrani svjetlosnim mikroskopom. Ipak, vidljiv je sluzavi ovoj s kojim se pričvršćuju na podlogu preko užeg dijela stanice koji su Majewska i suradnici (2015) naglasili kao glavnu značajku roda *Poulinea* i vrste *P. lepidochelicola*.

4.2 Usporedba faza krivulja rasta između eksperimentalnih sojeva

Eksperimentalni sojevi navedenih dviju vrsta brojani su u vremenskom periodu od 39, odnosno 40 dana, a dobivene krivulje rasta (Slike 19 i 20) jasno pokazuju fazu prilagođavanja, fazu eksponencijalnog rasta i fazu mirovanja. Stanice nisu ušle u fazu odumiranja. Sukladno istraživanjima autora Price i Farag (2013), u fazi prilagođavanja brojnost stanica je jako varijabilna, te u eksponencijalnoj fazi kreće u ubrzani rast linearan s vremenom. Svi sojevi ulaze u stacionarnu fazu gdje brojnost stanica postaje stabilna te se značajno ne povećava niti smanjuje.

Eksponencijalni rast je detaljnije prikazan pomoću trend linija. Vidljivo je da linije različitih eksperimentalnih sojeva vrste *Achnanthes elongata* (Slika 21) i vrste *Poulinea lepidochelicola* (Slika 22) imaju različite nagibe. Jasno je da se sojevi jedne vrste unutar svjetlosnog uvjeta i između uvjeta blago razlikuju u trajanju eksponencijalne faze. Trajanje vremenskog perioda eksponencijalne faze (Δt) svih eksperimentalnih sojeva varira od 6. do 18. dana. (Tablica 3). Slike 19 i 20 pokazuju da sojevi vrste *A. elongata* i vrste *P. lepidochelicola* imaju relativno usklađen ulazak i izlazak iz eksponencijalne faze, iako je vidljiv raniji ulazak u eksponencijalnu fazu za sojeve koji su rasli pri LED svjetlosti temperature 5000 K.

4.3 Utjecaji abiotičkih i biotičkih parametara na stope rasta dijatomeja

Usporedbe nagiba trend linija i vrijednosti iz Tablica 2 i 3 potvrđuju razlike u stopama rasta i vremenu udvostručenja populacija eksperimentalnih sojeva između svjetlosnih uvjeta, te između bioloških replikata sojeva unutar istog svjetlosnog uvjeta. Uočene razlike ipak nisu potvrđene statističkom analizom, osim za sojeve vrste *Achnanthes elongata* između dva svjetlosna uvjeta (Tablica 4). Iz Tablice 3 vidljivo je da se stope rasta svih eksperimentalnih sojeva nalaze unutar intervala od 0,30 - 0,58 dioba po danu, a vremena udvostručenja populacija imaju raspon od 1,31-2,28 dana.

Navedeni rezultati pokazuju sličnost s vrijednostima dobivenim u istraživanju bentičkih dijatomeja u slatkovodnim ekosustavima (Morin i Coste 2008). Uspoređene su stope rasta i vremena udvostručenja populacija za 13 vrsta bentičkih slatkovodnih dijatomeja između eksperimentalnog mikrokozmosa i terenskih podataka. Rezultati u eksperimentalnim uvjetima pokazuju interval stopa rasta od 0,06 do 0,17 dioba po danu, s jednim ekstremom od 0,27 dioba po danu koji je zabilježen kod vrste *Navicula seminulum*. S druge strane, rezultati istraživanja u prirodnim uvjetima za iste vrste pokazuju interval od 0,26 do 0,41 dioba po danu s ekstremima od 0,10 i 0,17 dioba po danu. Sojevi PMFTB0053 i PMFTB0052 pri

umjereno-bijeloj LED svjetlosti imaju veće stope rasta u odnosu na najveće stope rasta zabilježene u terenskom istraživanju od 0,41 dioba po danu za vrste *Nitzschia acicularis* i *Gomphonema parvulum*, što ukazuje na to da se eksperimentalni sojevi vrsta *A. elongata* i *P. lepidochelicola* dijele brže od navedenih vrsta u prirodnom staništu. Najbrže vrijeme udvostručenja populacije je također zabilježeno u prirodnim uvjetima, te iznosi 1,74 dana za vrstu *N. acicularis* i 1,71 dana za vrstu *G. parvulum*, što je usporedivo s brzim rastom eksperimentalnih sojeva u ovom istraživanju (Tablica 3). Prema Morin i Coste (2008), većina bentičkih dijatomeja ulazi u eksponencijalnu fazu rasta unutar 3 tjedna, što je pokazano i za sojeve istraživane u sklopu ovog diplomskog rada.

Bentičke dijatomeje pokazuju slične stope rasta, no postoje razlike u odgovoru na svjetlost između bentičkih i planktonskih vrsta dijatomeja. Dodatno, promjena intenziteta svjetlosti također ima utjecaj na povećanje ili smanjenje stopa rasta dijatomeja. Autori Gilstad i Sakshaug (1990) su istraživali stope rasta 10 odabranih vrsta planktonskih dijatomeja koje su rasle pod halogenim i fluorescentnim žaruljama pri različitim intenzitetima svjetlosti i duljinama dana. Rezultati su pokazali povećanje stope rasta dijatomeja sukladno povećanju duljine dana i intenziteta svjetlosti od 3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ do 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. U uvjetima fotoperioda od 10 h svjetla i 14 h tame, te intenziteta svjetlosti od 18 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, najveća izmjerena stopa rasta je 0,17 dioba po danu za kulturu vrste *Nitzschia grunowii*, a najmanja stopa rasta je 0,07 dioba po danu za vrstu *Thalassiosira bioculata*. Obje izmjerene vrijednosti su znatno manje od najniže izmjerene stope rasta od 0,30 dioba po danu za soj PMFTB0053 pri bijeloj LED svjetlosti u uvjetima 12 h dugog fotoperioda i intenziteta svjetlosti od 15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Navedeni rezultati pokazuju da eksperimentalni sojevi bentičkih vrsta *A. elongata* i *P. lepidochelicola* rastu brže od drugih istraživanih planktonskih vrsta dijatomeja.

Autori Lewis i Johnson (2002) su istraživali utjecaj gustoće stanica, temperature i intenziteta svjetlosti na rast i stvaranja stalaka u kulturi vrste *Achnanthes longipes*. Kulture su rasle u uvjetima bijele fluorescentne svjetlosti u fotoperiodu od 12 h. Izložene su intervalu temperature 18-20 °C i intenziteta svjetlosti 60-100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Sukladno istraživanju autora Gilstad i Sakshaug (1990), zabilježeno je povećanje stope rasta pri povećanju intenziteta svjetlosti. Također, temperatura je jedan od abiotičkih parametara koji utječu na stopu rasta dijatomeja. Rezultati istraživanja pokazuju veće stope rasta vrste *A. longipes* pri višim temperaturama, s optimalnom temperaturom od 26 °C nakon koje slijedi pad stope rasta. Maksimalna stopa rasta izražena kao vrijeme udvostručenja populacije je 1,2 dana za uvjet intenziteta i 1,3 dana za uvjet temperature (Lewis i Johnson 2002), što je sukladno najbržem

vremenu udvostručenja populacije soja PMFT0052 pri umjereno-bijeloj LED svjetlosti (Tablica 3). Generalno, eksperimentalni sojevi vrsta *A. elongata* i *P. lepidochelicola* pri oba svjetlosna uvjeta pokazuju sporiji rast u odnosu na kulture vrste *A. longipes* pri bijeloj fluorescentnoj svjetlosti. U istraživanju bentičkih dijatomeja iz estuarija također je pokazano da se stope rasta povećavaju sukladno povećanju temperature i intenziteta svjetlosti (Admiraal 1977). Stope rasta su izražene kao vremena udvostručenja populacija koje su kod sve 4 istraživane vrste iznosile manje od 2,5 dana, što je generalno brži rast u odnosu na rast eksperimentalnih sojeva (Tablica 3). Kultura vrste *Nitzschia sigma* je rasla najbrže sa vremenom udvostručenja populacije od 0,18 dana izmjenom pri temperaturi 12 °C, te fotoperiodu od 4 h svjetla i 20 h tame. Najsporiji rast zabilježen je kod vrste *Nitzschia cf. dissipata* i iznosi 2,22 dana (Admiraal 1977).

Rast dijatomeja ovisi i o biotičkim parametrima. Windler i Leinweber (2005) su proveli istraživanje utjecaja prisutnosti bakterija na rast bentičke dijatomeje vrste *Achnantheidium minutissimum* i stvaranje biofilma unutar monokulture. Uspoređivane su stope rasta između kseničnih (bakterije prisutne) i akseničkih (nema bakterija) monokultura koje su bile izložene 12 h dugom fotoperiodu pri svjetlosnom intenzitetu 20-50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Aksenične monokulture su izlazile iz ekspanzionalne faze ranije od kseničnih monokultura, što je pokazatelj utjecaja biotičkih parametara na rast monokultura. Ksenične kulture vrste *A. minutissimum* ulaze u ekspanzionalnu fazu nakon 5. dana, te u fazu mirovanja ulaze nakon 15. dana što je usporedivo sa sojevima vrste *A. elongata* koje su rasle pri umjereno-bijeloj LED svjetlosti temperature 5000 K.

4.4 Optimalni svjetlosni uvjet za laboratorijski uzgoj dijatomeja

Eksperimentalni sojevi PMFTB0054, PMFTB0053 i PMFTB0052 dijatomeje vrste *Achnanthes elongata* pri umjereno-bijeloj LED svjetlosti temperature 5000 K imaju značajno brže vrijeme udvostručenja populacije i veću stopu rasta u odnosu na iste sojeve koji su rasli osvijetljeni pomoću bijele LED svjetlosti temperature 6500 K. U Tablici 3 je vidljivo da navedeni sojevi pri svjetlosti temperature 5000 K imaju puno kraći vremenski period ekspanzionalnog rasta od istih sojeva pri svjetlosti temperature 6500 K, što je posljedica bržeg rasta i ulaska u fazu mirovanja.

Razlika u stopama rasta za sojeve vrste *Poulinea lepidochelicola* nije potvrđena statističkom analizom, no usporedbom krivulja rasta istraživanih dijatomeja u dva svjetlosna uvjeta vidljivo je da obje vrste dijatomeja u ekspanzionalnoj fazi rasta bolje reagiraju na umjereno-bijeloj LED svjetlosti, posebice vrsta *A. elongata*. S obzirom da se laboratorijski

pokusi i analize provode za vrijeme eksponencijalnog rasta kada su vrste najosjetljivije na podražaje i okolišne uvjete, ovaj rad pokazuje da bi držanje kultura pri umjereno-bijeloj LED svjetlosti temperature 5000 K bio optimalni svjetlosni uvjet za ove vrste.

4.5 Čimbenici rasta eksperimentalnih sojeva

Jedna od mogućih uzroka sporijeg rasta sojeva vrste *Achnanthes elongata* pri bijelom LED osvjetljenju temperature 6500 K je dulja prilagodba fotosustava stanica u fazi prilagođavanja tijekom rasta. Bijela LED svjetlost ima manji udio crvenih valnih duljina u odnosu na plave, za razliku od umjereno-bijele LED svjetlosti koja ima veći udio crvene valne duljine (<https://www.waveformlighting.com/art-painting/difference-between-5000k-and-6500k-bulbs>). S obzirom da stanice sojeva vrste *A. elongata* pri bijeloj LED svjetlosti pokazuju statistički značajno sporiji rast, moguće je da manjak crvenih valnih duljina u odnosu na plave valne duljine ima značajni utjecaj na fotosustav ove vrste i njezin rast.

Sličan efekt su zabilježili Pattanaik i suradnici (2018) koju su u svom radu naveli nekoliko istraživanja koja ukazuju da veći udio crvene valne duljine u LED osvjetljenju potiče rast biomase algi. Primjerice, istraživanje koje su proveli Tran i suradnici (2015) na algi roda *Heamococcus lacustris* pokazuje da je rast stanica najveći u uvjetima LED osvjetljenja s crvenim i plavim valnim duljinama omjera 3:1, u odnosu na druge tipove osvjetljenja poput jednobojne LED svjetlosti (crvene ili plave) ili fluorescentnog osvjetljenja. Također, Koc i suradnici (2012) uzgajali su stanice roda *Chlorella kessleri* u uvjetima crvenog i plavog LED osvjetljenja. Najveća biomasa stanica je izmjerena u uvjetima crvenog LED osvjetljenja, dok su najveće stanice izmjerene u uvjetima plavog LED osvjetljenja.

S druge strane, stanice sojeva vrste *Poulinea lepidochelicola* pri bijeloj LED svjetlosti prate stopu rasta istih sojeva pri umjereno-bijeloj LED svjetlosti što se može objasniti boljom prilagodbom fotosustava na manjak crvenih valnih duljina tijekom početne faze prilagođavanja. Ipak, sojevi koji su rasli pri bijeloj LED svjetlosti ulaze kasnije u eksponencijalnu fazu što je pokazatelj duže faze prilagođavanja u odnosu na iste sojeve pri umjereno-bijeloj LED svjetlosti. Generalno, sojevi vrsta *A. elongata* i *P. lepidochelicola* pokazali su drugačije reakcije na izloženost različitim svjetlosnim uvjetima. Vrste su izolirane s iste morske kornjače, stoga je moguće da izloženost specifičnom staništu uzrokuje različiti razvoj fiziološke sposobnosti prilagodbe na osvjetljenje. Prilagodbe fotosustava na različiti udio valnih duljina i mogući uzroci različite fiziološke prilagodbe vrsta epizojskih dijatomeja koje dijele isto stanište, ostaju otvorena pitanja za daljnja istraživanja.

4.6 Utjecaj svjetlosnih uvjeta na gustoću stanica eksperimentalnih sojeva

Između svjetlosnih uvjeta postoje značajne razlike između stopa rasta za sojeve vrste *Achnanthes elongata* i neznčajne razlike između stopa rasta za sojeve vrste *Poulinea lepidochelicola*. Ipak, za obje vrste je jasno vidljivo da se pri umjereno-bijeloj svjetlosti temperature 5000 K postiže veća gustoća zadnji dan faze mirovanja, što je usporedivo s rezultatima istraživanja koja su Pattanaik i suradnici (2018) opisali u svome radu. Također, neovisno o svjetlosnom uvjetu postoje razlike u gustoći stanica između sojeva iste vrste što ukazuje na moguće fiziološke razlike među sojevima (Slike 24A i 24B)

Usporedbe između svjetlosnih uvjeta pokazuju da, bez obzira na moguće fiziološke razlike, sojevi iste vrste drugačije reaguju na različitu svjetlost (Slike 23A i 23B). Zadnji dan faze mirovanja sojevi obje vrste pri umjereno-bijelom LED osvjetljenju temperature 5000 K postižu veću brojnost stanica u odnosu na bijelu LED svjetlost temperature 6500 K. Navedeni rezultati ukazuju na to da je LED umjereno-bijela svjetlost temperature 5000 K optimalna za laboratorijski uzgoj dijatomeja.

5. ZAKLJUČAK

Ovim diplomskim radom ostvareni su postavljeni ciljevi istraživanja, odnosno optimizirana je metoda brojanja stanica, izrađene su krivulje rasta za sojeve epizojskih dijatomeja vrste *Achnanthes elongata* i *Poulinea lepidochelicola* i provedene su statističke analize stopa rasta istih eksperimentalnih sojeva između različitih svjetlosnih uvjeta i različitih eksperimentalnih sojeva unutar istog svjetlosnog uvjeta.

Specifični zaključci vezani za postavljene hipoteze su:

1. Rast sojeva obje vrste dijatomeja, *A. elongata* i *P. lepidochelicola* je veći pri umjereno-bijelom svjetlu temperature 5000 K
2. Razlika u povećanju brojnosti između različitih sojeva dijatomejskih vrsta *A. elongata* i *P. lepidochelicola* u uvjetima toplije bijele boje svjetlosti određene temperaturom 5000 K nije statistički značajna
3. Razlika u povećanju brojnosti između različitih sojeva dijatomejskih vrsta *A. elongata* i *P. lepidochelicola* u uvjetima hladnije bijele svjetlosti određene temperaturom 6500 K nije statistički značajna

S obzirom na postavljene hipoteze, možemo zaključiti da unutar istog svjetlosnog uvjeta nema razlike u stopama rasta između različitih sojeva, no između svjetlosnih uvjeta postoji razlika u rastu i gustoći istih sojeva. Na temelju usporedbe istih sojeva obje vrste između svjetlosnih uvjeta može se zaključiti da je umjereno-bijela LED svjetlost temperature 5000 K optimalnija za laboratorijski uzgoj dijatomeja od bijele LED svjetlosti temperature 6500 K. Bez obzira što ne postoji statistički značajna razlika u stopama rasta eksponencijalne faze sojeva vrste *P. lepidochelicola* između svjetlosnih uvjeta, iz krivulja rasta i usporedbi postignutih gustoća stanica vidljivo je da sojevi postižu veću gustoću i ulaze ranije u eksponencijalnu fazu rasta pri LED svjetlosti temperature 5000 K. Isto je vidljivo i za sojeve vrste *A. elongata*, za koje dodatno postoji i značajno veća stopa rasta pri umjereno-bijeloj LED svjetlosti temperature 5000 K

6. LITERATURA

1. Admiraal, W. 1977. Influence of light and temperature on the growth rate of estuarine benthic diatoms in culture. *Marine Biology*. 39: 1-9
2. Agusti, S., González-Gordillo, J., Vaqué, D., Estrada, M., Cerezo, M. I., Salazar, G., Gasol, J.M. i Duarte, C.M. 2015. Ubiquitous healthy diatoms in the deep sea confirm deep carbon injection by the biological pump. *Nature Communications*. 6: 7608
3. Andersen, R.A. 2005. *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press. str. 565
4. Barsanti, L. i Gualtieri, P. 2006. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Taylor & Francis Group. str. 302
5. Creswel, L. 2010. *Phytoplankton culture for aquaculture feed*. SRAC Publication. 5004: 1-16
6. Croll., D.A. i Holmes, R.W. 1982. A note on the occurrence of diatoms on the feathers of diving seabirds. *The Auk*. 99(4): 765-766
7. Denys, L. 1997. Morphology and taxonomy of epizoic diatoms *Epiphthalaina* and *Tursiocola* on a sperm whale *Physeter macrocephalus* stranded on the coast of Belgium. *Diatom Research*. 12(1): 1-18
8. Eltringham, D. i Faraf, I.H. 2009. LED technology for energy efficient microalgae growth. *Renewable and Sustainable Energy*. 13(8): 2175-2180
9. Evans, K.M, Wortley, A.H., i Mann, D.G. 2007. An assessment of potential diatom “Barcode” genes (*cox1*, *rbcL*, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta). *Protist*. 158(3): 394-364
10. Fawley, M.W. 1989. A new form of chlorophyll *c* involved in light-harvesting. *Plant Physiology*. 91: 727-732
11. Gilstad, M. i Sakshaug, E. (1990) Growth rates of ten diatom species from the Barents Sea at different irradiances and day lengths. *Marine Ecology Progress Series*. 64:169-173
12. Granéli, E. i Turner, J.T. 2006. *Ecology of harmful algae*. Springer. str. 387
13. Kale, A. i Karthick, B. 2015. The diatoms: big significance of tiny glass houses. *Resonance- Indian Academy Of Sciences*. 20(10): 919-930
14. Koc., C., Anderson, G.A., i Kommareddy, A. 2012. Use of red and blue light-emitting diodes (LED) and fluorescent lamps to grow microalgae in a photobioreactor. *The Israeli journal of aquaculture – Bamidgeh*. 65(1): 1-8

15. Kratošová, G., Vávra, I., Horská, K., Zivotský, O., Neřmcová, Y., Bohunická, M., Slabotinský, J., Rosenbergová, K., Kadilak, A. i Schröfel, A. 2014. Synthesis of metallic nanoparticles by diatoms – prospects and applications. *Green Biosynthesis of Nanoparticles: Mechanisms and Applications*. str. 63-80.
16. Lewis, R.J., Johnson, L.M i Hoagland, K.D. 2002. Effects of cell density, temperature, and light intensity on growth and stalk production in the biofouling diatom *Achnanthes longipes* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*. 38: 1125-1131
17. Li, C.W i Volcani, B.E. 1987. Four new apochlorotic diatoms. *British Phycological Journal*. 22(4): 375-382
18. Majewska, R., De Stefano, M., Ector, L., Bolaños, F., Frankovich, T.A., Sullivan, M.J., Ashwort, M.P., i Van de Vijver B. 2017. Two new epizoic *Achnanthes* species (Bacillariophyta) living on marine turtles from Costa Rica. *Botanica Marina* 60(3): 303-318
19. Majewska, R., Kociolek, J.P., Thomas Evan, W., De Stefano, M., Santoro, M., Bolaños, F. i Van de Vijver, B. 2015. *Chelonicola* and *Poulinea*, two new gomphonemoid diatom genera (Bacillariophyta) living on marine turtles from Costa Rica. *Phytotaxa*. 233(3): 236-250
20. Morin, S., Coste, M., i Delmas, F. 2008. A comparison of specific growth rates of periphytic diatoms of varying cell size under laboratory and field conditions. *Hydrobiologia*. 614: 285–297
21. Pattanaik, A., Behari Sukla, L., i Pradhan, D. 2018. Effect of LED lights on the growth of microalgae. *Inglomayor*. 14: 14-24
22. Price, K. i Farag, I.H. 2013. Resources conservation in microalgae biodiesel production. *International Journal of Engineering and Technical Research*. 1(8): 49-56
23. Rivera, S.F, Vasselon, V., Ballorain, K., Carpentier, A., Wetzel, C.E., Ector, L., Bouchez, A., i Rimet, F. 2018. DNA metabarcoding and microscopic analyses of sea turtles biofilms: complementary to understand turtle behavior. *PLoS ONE*. 13(4): e0195770
24. Robinson, N.J., Majewska, R., Lazo-Wasem, E.A., Nel, R., Paladino, F.V., Rojas, L., Zardus, J.D. i Pinou, T. 2016. Epibiotic diatoms are universally present on all sea turtle species. *PLoS ONE*. 11(6):e0157011
25. Round, F.E., Crawford, R.M, i Mann, D.G. 1990. *Diatoms: biology and morphology of the genera*. Cambridge University Press. str. 744

26. Tofilovska, S., Wetzel, C.E, Ector, L. i Levkov, Z. 2014. Observation on *Achnanthes* Bory sensu stricto (Bacillariophyceae) from subaerial habitats in Macedonia and comparison with the type material of *A. coarctata* (Brébisson ex W. Smith) Grunow, *A. coarctata* var. *sinaensis* Hustedt and *A. intermedia* Kützing. *Fottea* 14: 15–42
27. Toyoda, K., Cox, E.J, Sims, P.A, i Williams, D.M. 2005. The typification of *Achnanthes* Bory based on *Echinella stipitata* Lyngbye, with an account of the morphology and fine structure of Lyngbye's species. *Diatom Research*. 20: 375–386
28. Tran, H.L., Lee, K.H., i Hong, C.H. 2015. Effects of LED irradiation on the growth and astaxanthin production of *Haematococcus lacustris*. *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 12(2): 1167-1173
29. Wetzel, C.E., Van de Vijver, B., Cox, E. J., Bicudo, D.C. i Ector, L. 2012. *Tursiocola podocnemicola* sp. nov., a new epizoic freshwater diatom species from the Rio Negro in the Brazilian Amazon Basin. *Diatom Research*. 27(1): 1-8
30. Windler, M., Leinweber, K., Bartulos, C.R., Philipp, C. i Kroth, P.G. 2015. Biofilm and capsule formation of the diatom *Achnantheidium minutissimum* are affected by a bacterium. *Journal of Phycology*. 51: 343-355

Izvori s interneta:

31. <http://www.phycology.net/> (Preuzeto: 21.01.2020.)
32. <https://www.waveformlighting.com/art-painting/difference-between-5000k-and-6500k-bulbs> (Preuzeto: 20.01.2020.)

7. PRILOZI

Lista priloga

Tablica P1. Sastav Guillard f/2 medija za izolaciju i uzgoj kultura dijatomeja.

Slika P1. Krivulje rasta sojeva vrste *Poulinea lepidochelicola* pri umjereno-bijeloj LED svjetlosti: **A)** Soj PMFTB0073, biološki replikat 1 **B)** Soj PMFTB0073, biološki replikat 2, **C)** Soj PMFTB0077, biološki replikat 1, **D)** Soj PMFTB0077, biološki replikat 2. Prikazane su srednje vrijednosti iz 3 tehnička replikata sa standardnom pogreškom (SE).

Slika P2. Krivulje rasta sojeva vrste *Poulinea lepidochelicola* pri bijeloj LED svjetlosti: **A)** Soj PMFTB0073, biološki replikat 1 **B)** Soj PMFTB0073, biološki replikat 2, **C)** Soj PMFTB0077, biološki replikat 1, **D)** Soj PMFTB0077, biološki replikat 2. Prikazane su srednje vrijednosti iz 3 tehnička replikata sa standardnom pogreškom (SE).

Slika P3. Krivulje rasta sojeva vrste *Achnanthes elongata* pri umjereno-bijeloj LED svjetlosti: **A)** Soj PMFTB0054, biološki replikat 1 **B)** Soj PMFTB0054, biološki replikat 2, **C)** Soj PMFTB0052, biološki replikat 1, **D)** Soj PMFTB0052, biološki replikat 2, **E)** Soj PMFTB0053, biološki replikat 1, **F)** Soj PMFTB0053, biološki replikat 2. Prikazane su srednje vrijednosti iz 3 tehnička replikata sa standardnom pogreškom (SE).

Slika P4. Krivulje rasta sojeva vrste *Achnanthes elongata* pri bijeloj LED svjetlosti: **A)** Soj PMFTB0054, biološki replikat 1 **B)** Soj PMFTB0054, biološki replikat 2, **C)** Soj PMFTB0052, biološki replikat 1, **D)** Soj PMFTB0052, biološki replikat 2, **E)** Soj PMFTB0053, biološki replikat 1, **F)** Soj PMFTB0053, biološki replikat 2. Prikazane su srednje vrijednosti iz 3 tehnička replikata sa standardnom pogreškom (SE).

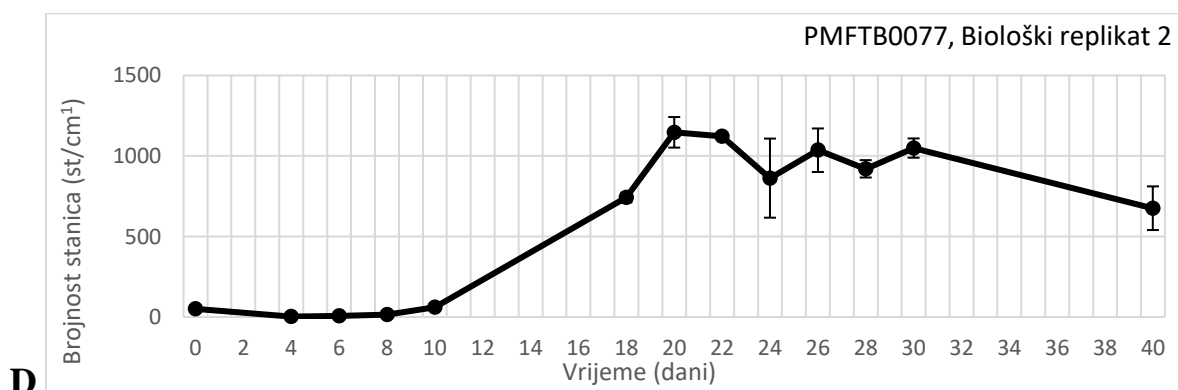
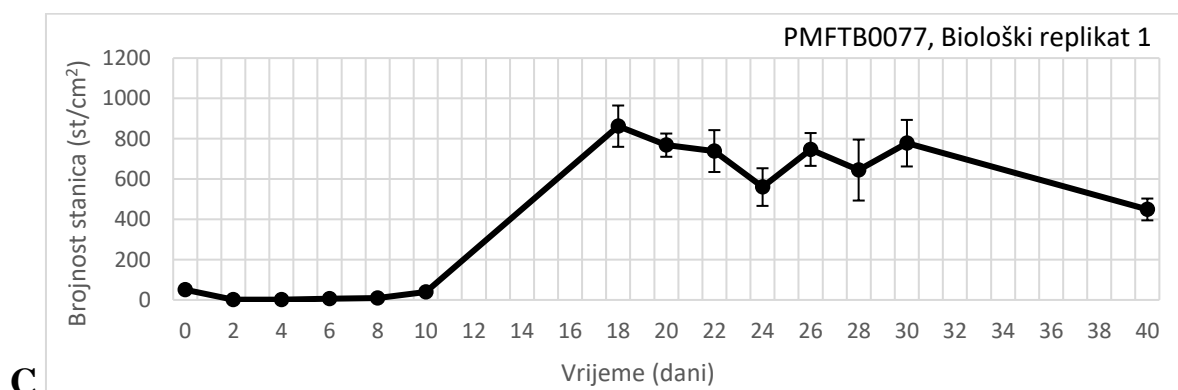
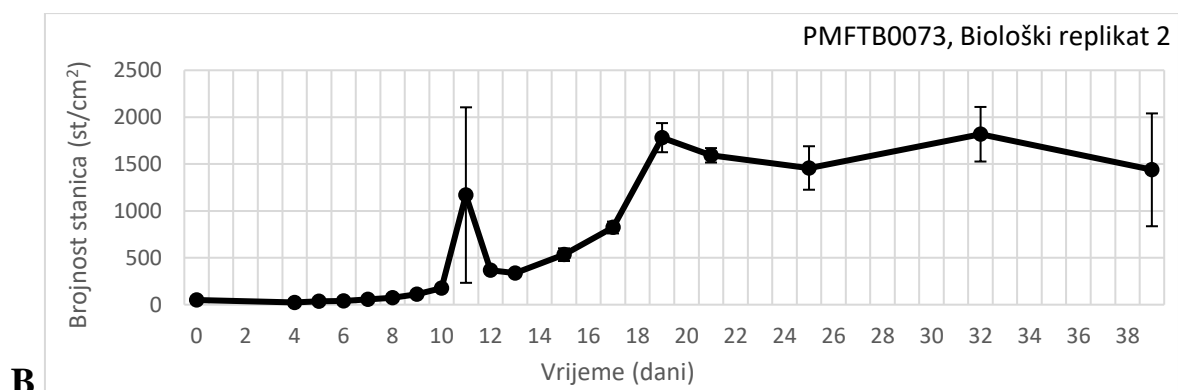
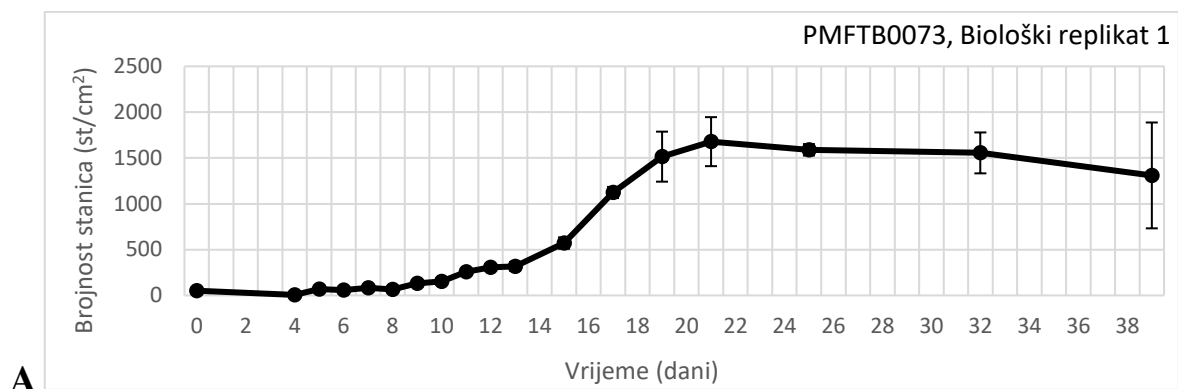
Slika P5. Krivulje rasta svih bioloških replikata sojeva vrste *Achnanthes elongata* pri umjereno-bijeloj ("U"; pune crte) i bijeloj ("B"; isprekidane crte) LED svjetlosti. Prikazane su srednje vrijednosti iz 3 tehnička replikata sa standardnom pogreškom (SE) nakon uklanjanja ekstremnih vrijednosti. Os y je prikazana logaritamskom skalom.

Slika P6. Krivulje rasta svih bioloških replikata sojeva vrste *Poulinea lepidochelicola* pri umjereno-bijeloj ("U"; pune crte) i bijeloj ("B"; isprekidane crte) LED svjetlosti. Prikazane su srednje vrijednosti iz 3 tehnička replikata sa standardnom pogreškom (SE) nakon uklanjanja ekstremnih vrijednosti. Os y je prikazana logaritamskom skalom.

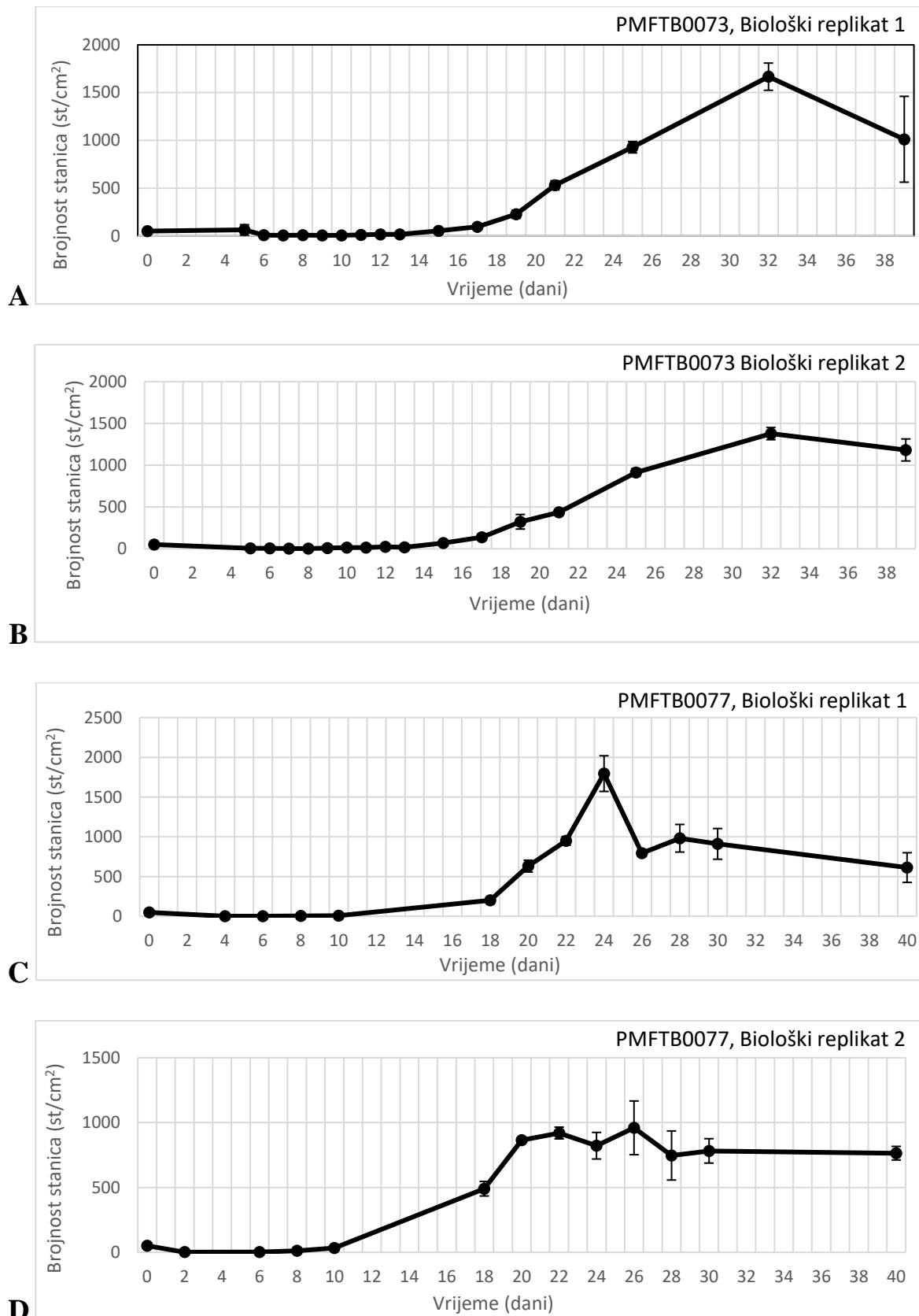
Tablica P1. Sastav Guillard f/2 medija za izolaciju i uzgoj kultura dijatomeja.

GUILLARD F/2 MEDIJ
1. Mikronutrijenti - 10mL dH₂O.
1,8 g MnCl ₂ × 4 H ₂ O
0,22 g ZnSO ₄ × 7H ₂ O
0,098 g CuSO ₄ × 5H ₂ O
0,1 g CoCl ₂ × 6 H ₂ O
2. Makronutrijenti - 50 mL H₂O
3,75 g NaNO ₃
1,5 g Na ₂ SiO ₃ x 9 H ₂ O
0,8 g NaH ₂ PO ₄ x 9 H ₂ O
3. Metali u tragovima i EDTA - 50 mL H₂O
0,1575 g FeCl ₃ x 6 H ₂ O
0,218 g NaEDTA x 2 H ₂ O
4. Vitamini B₁₂ i H - 50 mL H₂O
10 mg B ₁₂
10 mg H
PRIPREMA MEDIJA
U 1L filtrirane i autoklavirane morske vode dodaje se po 1 mL svake otopine mikronutrijenata, 1 mL svake otopine makronutrijenata, 1mL svake otopine metala u tragovima te 0,5 mL svake otopine vitamina.

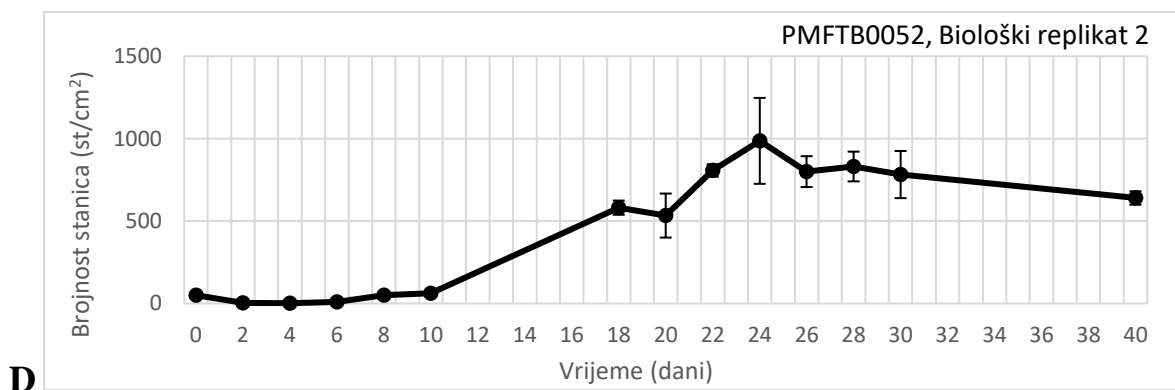
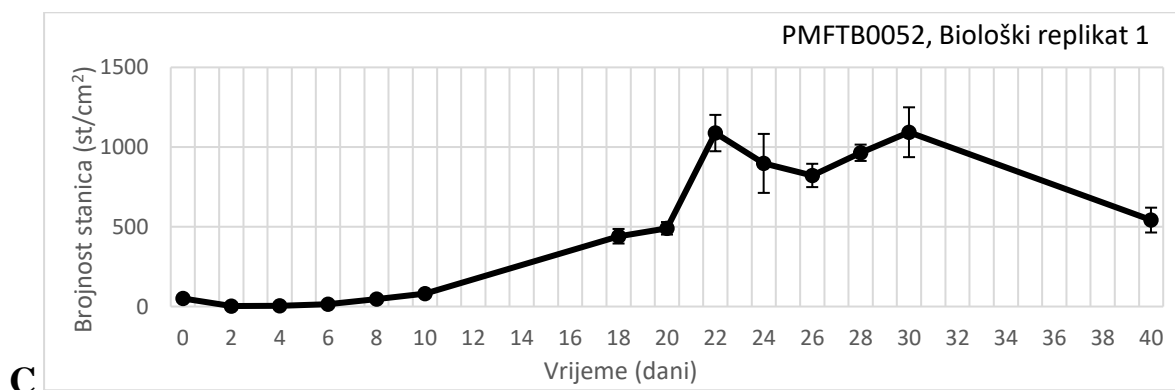
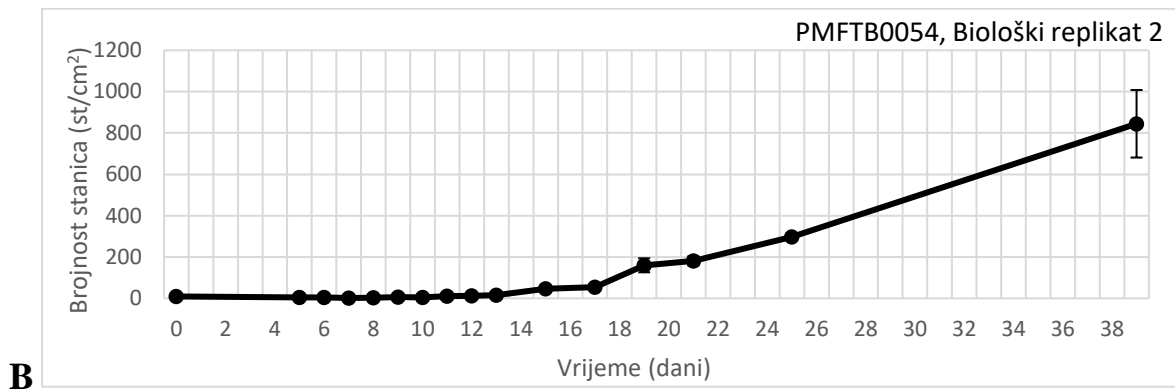
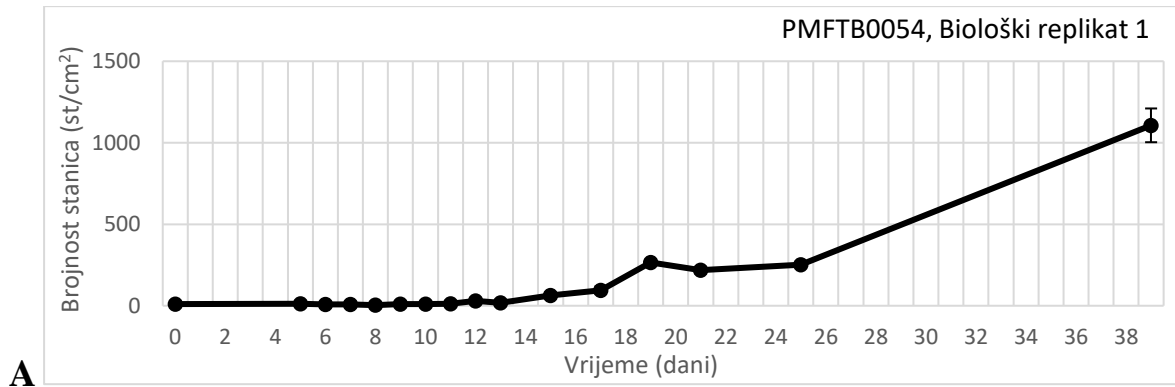
*Komponente medija pripremaju se u odvojenim otopinama, te su navedene mase u gramima za mikronutrijente, makronutrijente, metale u tragovima, EDTA te vitamine B₁₂ i H koje treba dodati u navedene volumene destilirane vode za pripremu otopina. Navedeni su volumeni otopina komponenti koji se dodaju u 1 L filtrirane i autoklavirane morske vode u svrhu pripreme f/2 medija.

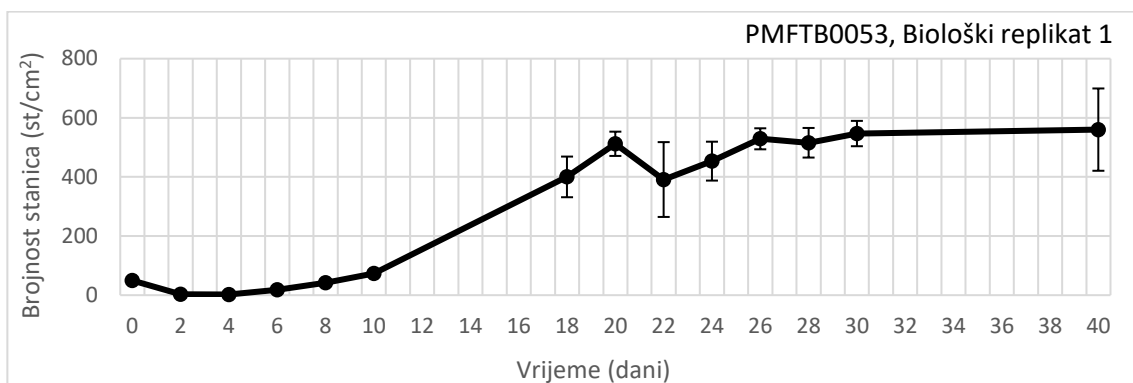
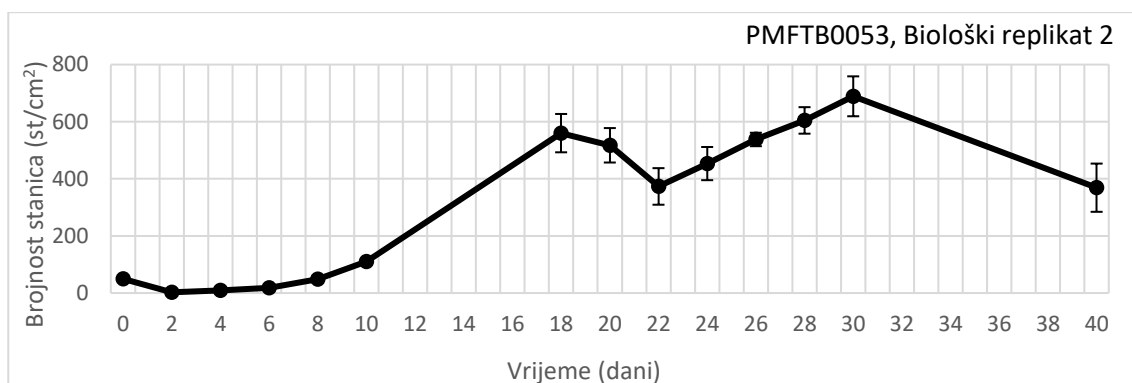


Slika P1. Krivulje rasta sojeva vrste *Poulinea lepidochelicola* pri umjereno-bijeloj LED svjetlosti: **A**) Soj PMFTB0073, biološki replikat 1 **B**) Soj PMFTB0073, biološki replikat 2, **C**) Soj PMFTB0077, biološki replikat 1, **D**) Soj PMFTB0077, biološki replikat 2. Prikazane su srednje vrijednosti iz 3 tehnička replikata sa standardnom pogreškom (SE).

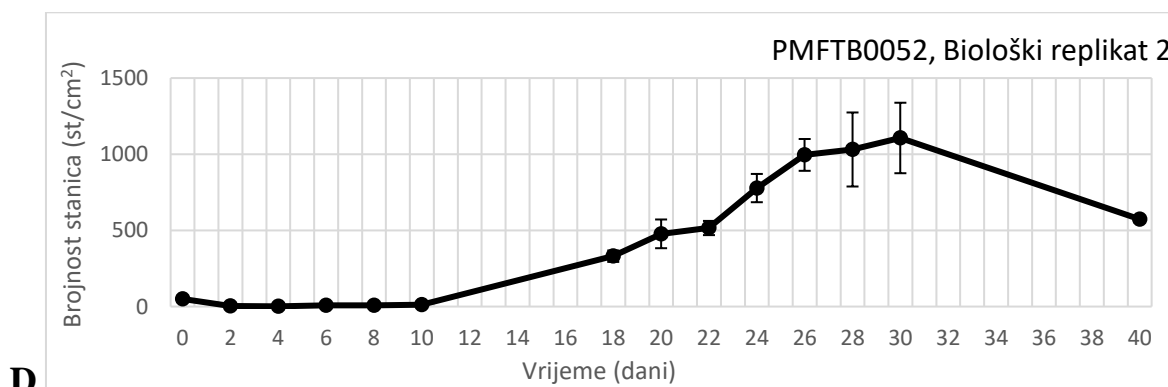
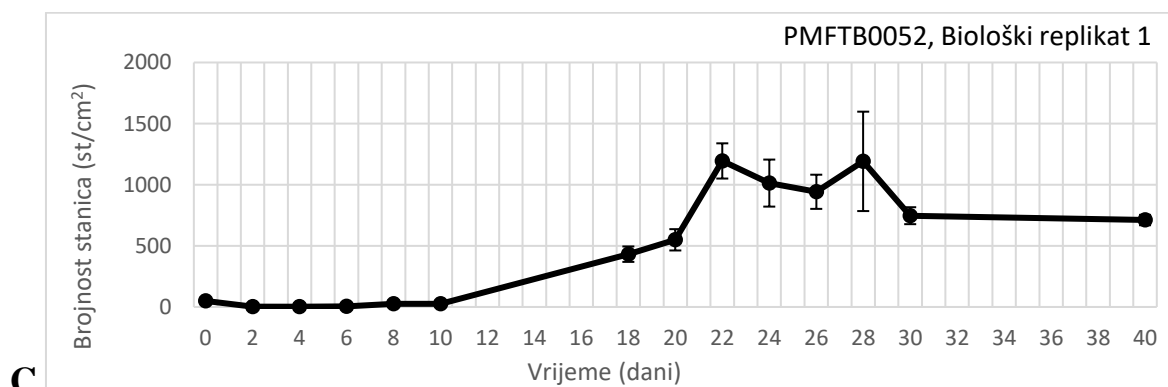
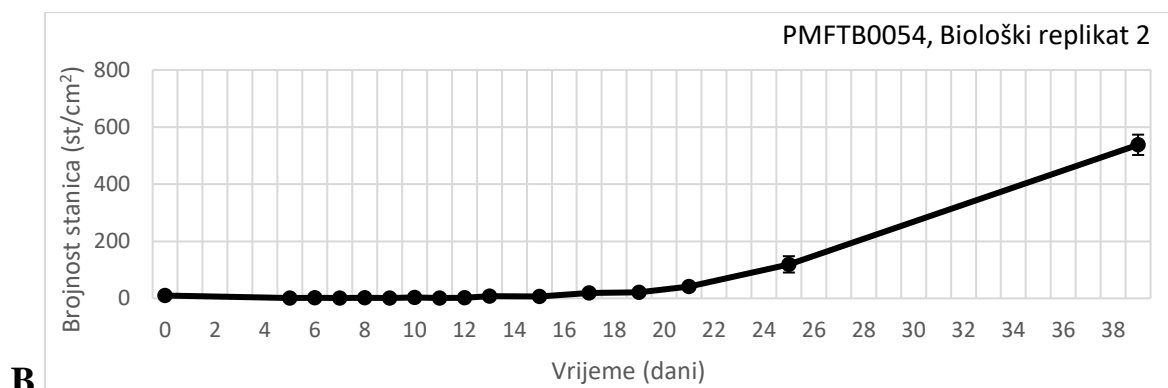
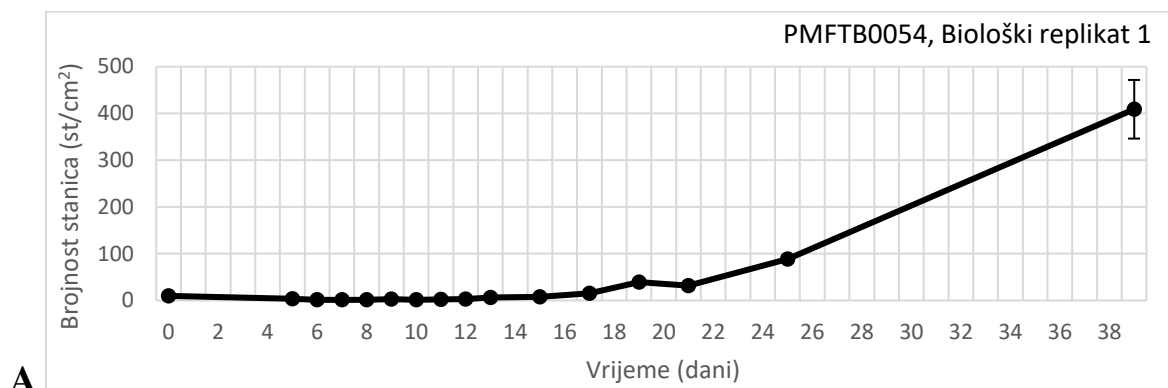


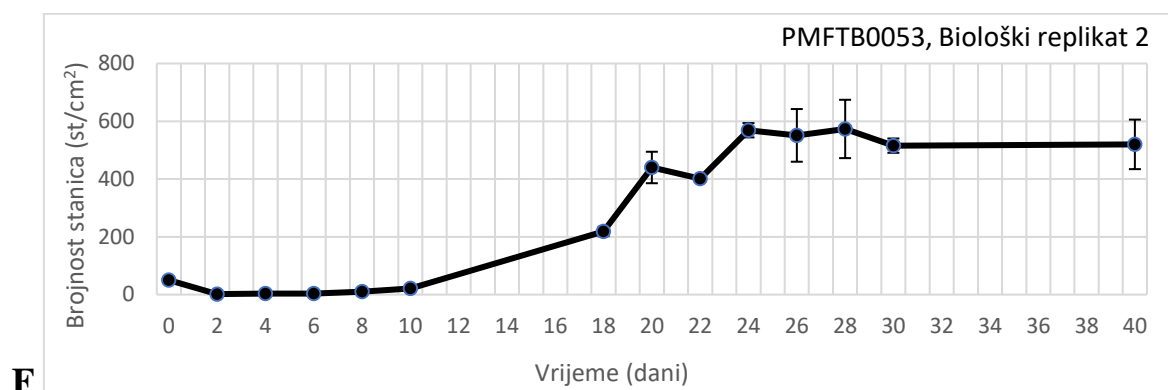
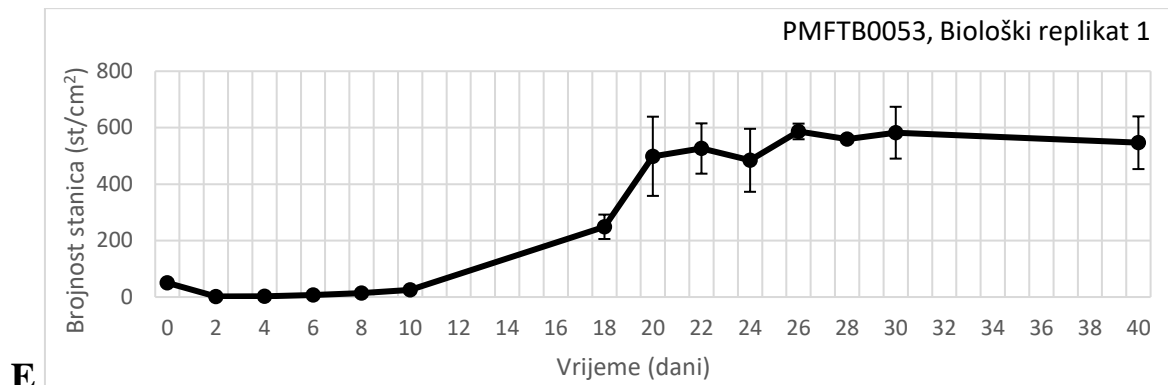
Slika P2. Krivulje rasta sojeva vrste *Poulinea lepidochelica* pri bijeloj LED svjetlosti: **A**) Soj PMFTB0073, biološki replikat 1 **B**) Soj PMFTB0073, biološki replikat 2, **C**) Soj PMFTB0077, biološki replikat 1, **D**) Soj PMFTB0077, biološki replikat 2. Prikazane su srednje vrijednosti iz 3 tehnička replikata sa standardnom pogreškom (SE).



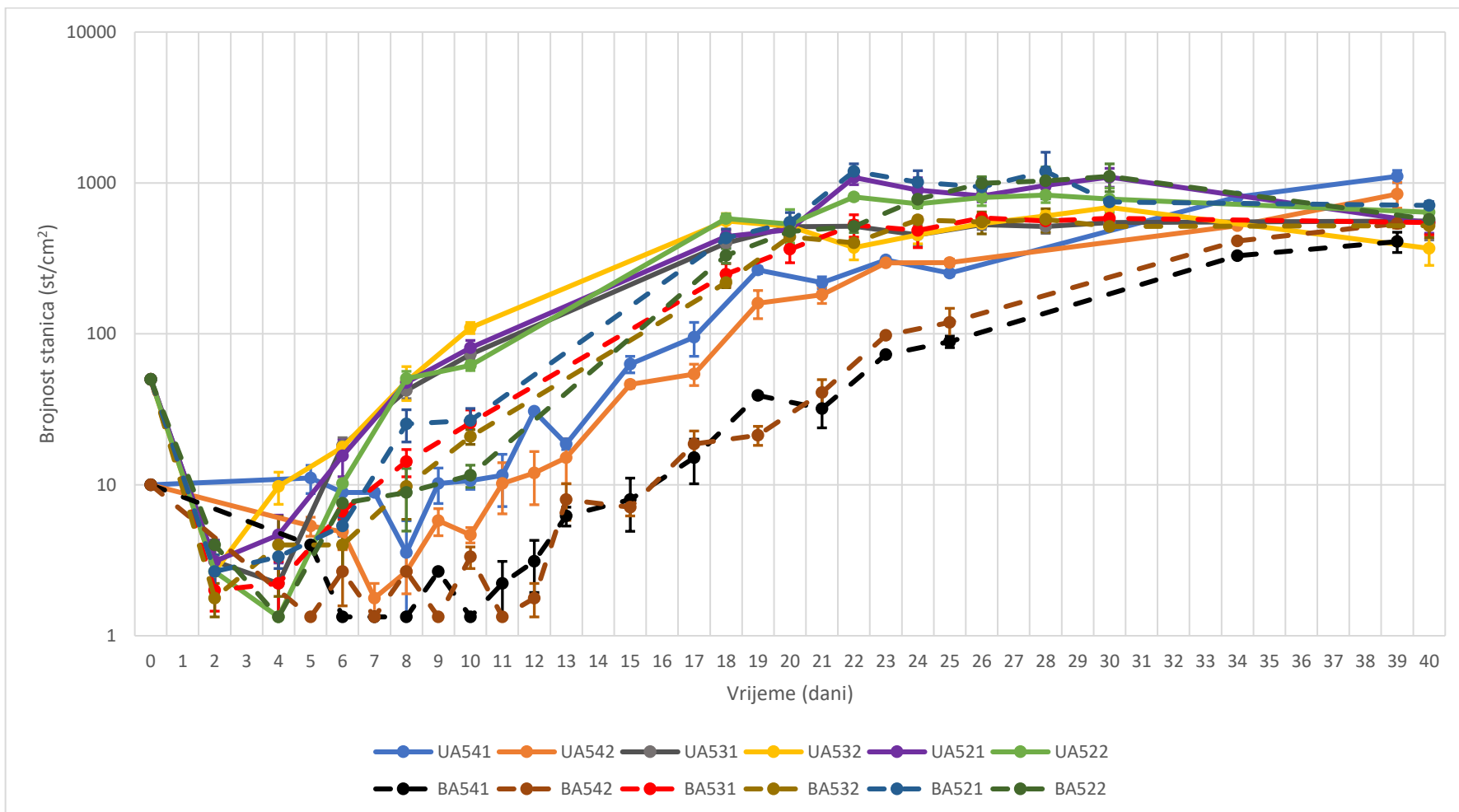
E**F**

Slika P3. Krivulje rasta sojeva vrste *Achnanthes elongata* pri umjereno-bijeloj LED svjetlosti: **A)** Soj PMFTB0054, biološki replikat 1 **B)** Soj PMFTB0054, biološki replikat 2, **C)** Soj PMFTB0052, biološki replikat 1, **D)** Soj PMFTB0052, biološki replikat 2, **E)** Soj PMFTB0053, biološki replikat 1, **F)** Soj PMFTB0053, biološki replikat 2. Prikazane su srednje vrijednosti iz 3 tehnička replikata sa standardnom pogreškom (SE).

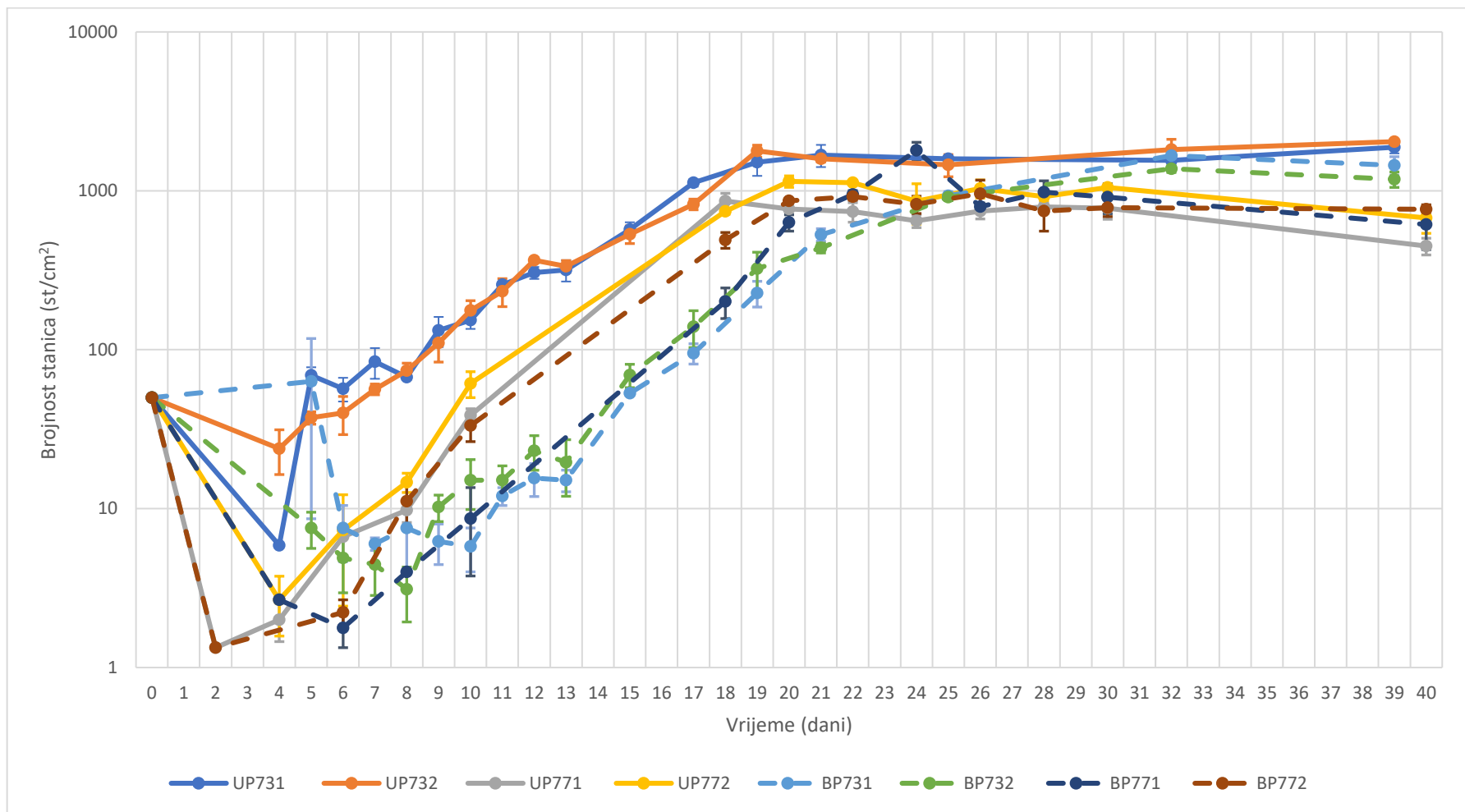




Slika P4. Krivulje rasta sojeva vrste *Achnanthes elongata* pri bijeloj LED svjetlosti: A) Soj PMFTB0054, biološki replikat 1 B) Soj PMFTB0054, biološki replikat 2, C) Soj PMFTB0052, biološki replikat 1, D) Soj PMFTB0052, biološki replikat 2, E) Soj PMFTB0053, biološki replikat 1, F) Soj PMFTB0053, biološki replikat 2. Prikazane su srednje vrijednosti iz 3 tehnička replikata sa standardnom pogreškom (SE).



Slika P5. Krivulje rasta svih bioloških replikata sojeva vrste *Achnanthes elongata* pri umjereno-bijeloj ("U"; pune crte) i bijeloj ("B"; isprekidane crte) LED svjetlosti. Prikazane su srednje vrijednosti iz 3 tehnička replikata sa standardnom pogreškom (SE) nakon uklanjanja ekstremnih vrijednosti. Os y je prikazana logaritamskom skalom.



Slika P6. Krivulje rasta svih bioloških replikata sojeva vrste *Poulinea lepdiochelicola* pri umjereno-bijeloj ("U"; pune crte) i bijeloj ("B"; isprekidane crte) LED svjetlosti. Prikazane su srednje vrijednosti iz 3 tehnička replikata sa standardnom pogreškom (SE) nakon uklanjanja ekstremnih vrijednosti. Os y je prikazana logaritamskom skalom.

ŽIVOTOPIS

Antonija Matek

e-mail: antonija.matek@gmail.com

OBRAZOVANJE

Institucija	Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
Program	Diplomski studij Ekologije i zaštite prirode
Datum	(listopad 2017. – veljača 2020.)
Institucija	Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
Program	Preddiplomski studij Biologije
Datum	(listopad 2014. – rujan 2017.)

PRAKSA

Institucija	Zavod za algologiju, PMF Zagreb
Opis	Diplomant na TurtleBIOME projektu -rad na kulturama dijatomeja
Datum	(veljača 2019. – veljača 2020.)
Institucija	Zavod za algologiju, PMF Zagreb
Opis	Laboratorijska stručna praksa -rad na kulturama dijatomeja
Datum	(listopad 2018. – veljača 2019.)
Institucija	Zavod za zoologiju, PMF Zagreb
Opis	Izolacija beskrležnjaka iz uzoraka sa Plitvičkih jezera
Datum	(veljača 2016)

RADNO ISKUSTVO

Poslodavac	Ekutak j.d.o.o
Opis	Novinar, pisanje članaka na engleskom jeziku
Datum	(studeni 2018-veljača 2020.)
Poslodavac	Dm-drogerie markt d.o.o
Opis	Prodavačica i blagajnica
Datum	(srpanj 2018. - kolovoz 2018.)
Poslodavac	Metallica d.o.o, Natura Croatica d.o.o
Opis	Sezonski poslovi u ugostiteljstvu

Datum (2014.-2017.)

EDUKACIJA, KONGRESI I RADIONICE:

2019.	Tehnička podrška na kongresu "7th European Phycological Congress"
2019.	Sudjelovanje na LEAP summit
2019.	Edukacija o financijskoj pismenosti, OVB Allfinanz d.o.o
2019.	Edukacija o društvenom poduzetništvu u udruzi OAZA
2017.	Edukacija o mikrobnjoj ekologiji na kongresu: "15th Symposium on Aquatic Microbial Ecology"
2017.	Aktivni sudionik projekta LoLADRIA 2017
2017.	Pisanje projekata u udruzi ZAMISLI
2016.	Edukacija o primjeni mikroorganizama u industriji i okolišu na kongresu: "Symposium on Power of Microbes in Industry and Environment"
2016.-2018.	Organizacija radionice na Noći biologije na PMF-u, Zagreb
2016.	Populariziranje znanosti na radionici Znanstveni kutak (Interliber)
2016.	Praktično usvajanje znanja o održivosti (Škola održivosti, Zelena akcija)

VJEŠTINE

Strani jezici	Engleski (razumijevanje C1, govor C1, pisanje C1, čitanje C1) Talijanski (razumijevanje A1, govor A1, pisanje A1, čitanje A1)
Računalne vještine	MS office paket, LaTeX, R, Statistica, Grapher, QGIS, Ocean data view, AliView, FigTree i Mega
Ostalo	Osnovno znanje u pisanju radnog i financijskog plana za prijave projekata
