Utjecaj biljnih ekstrakata na mikroalge u kulturi

Ribarić, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:719897

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

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

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Ana Ribarić

Utjecaj biljnih ekstrakata na mikroalge u kulturi

Završni rad

Osijek, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Završni rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

UTJECAJ BILJNIH EKSTRAKATA NA MIKROALGE U KULTURI

Ana Ribarić

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

Kratak sažetak završnog rada:
Cilj ovog rada bio je istražiti alelopatsko djelovanje juglona te ekstrakata listova pitomog oraha (*Juglans regia* L.) i čivitnjače (*Amorpha fruticosa* L.) na rast kultura i koncentraciju pigmenata u stanicama jednostanične zelene alge *Monoraphidium* cf. *contortum*. Istraživanjem je utvrđen pozitivan alelopatski učinak biljnih ekstrakata na alge te snažno negativno djelovanje juglona. Daljnja istraživanja alelopatskih biljnih spojeva i nove spoznaje o njihovom utjecaju na alge i vodene ekosustave mogli bi omogućiti korištenje alelokemikalija u kontroli štetnog cvjetanja alga i cijanobakterija te poslužiti kao potencijalna strategija u unaprjeđenju masovnog uzgoja alga.

Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: alelopatija, *Amorpha fruticosa* L., *Juglans regia* L., zelene alge, vodeni ekosustav

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

BASIC DOCUMENTATION CARD **Bachelor thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department of Biology

Undergraduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural sciences

Scientific Field: Biology

THE INFLUENCE OF PLANT EXTRACTS ON MICROALGAE IN CULTURE

Ana Ribarić

Thesis performed at: Department of Biology, Subdepartment of Water Ecology

Supervisor: Dubravka Špoljarić Maronić, PhD, Assistant Professor

Cosupervisor: Tanja Žuna Pfeiffer, PhD, Assistant Professor

Short abstract:

This research aimed at assessing the allelopathic influence of juglone and common walnut (*Juglans regia* L.) and false indigo bush (*Amorpha fruticosa* L.) leaf extracts on the growth and pigment concentration of unicellular green alga *Monoraphidium* cf. *contortum*. Results showed positive allelopathic effect of plant extracts on algae and strong negative effect of juglone. Further investigations on plant allelopathic compounds and their influence on algae and aquatic ecosystems could provide the use of allochemicals to control harmful algal and cyanobacterial blooms and also serve as potential strategy to improve microalgae cultivation.

Original in: Croatian

Key words: allelopathy, *Amorpha fructicosa* L., *Juglans regia* L., green algae, aquatic ecosystem

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

SADRŽAJ

1. UVOD.....1

1.1. Alelopatsko djelovanje biljaka.....1

1.2. Cilj završnog rada.....3

2. MATERIJALI I METODE.....4

2.1. Biljni materijal i priprema ekstrakata.....4

2.1.1. Čivitnjača (*Amorpha fruticosa* L.).....4

2.1.2. Pitomi orah (*Juglans regia* L.).....5

2.1.3. Priprema ekstrakata oraha i čivitnjače.....6

2.2. Uzgoj alga kulture *Monoraphidium* cf. *contortum*.....6

2.3. Tretman alga biljnim ekstraktima i juglonom.....8

2.4. Određivanje koncentracije stanica alga.....8

2.5. Određivanje koncentracije klorofila.....8

2.6. Statistička obrada podataka.....8

3. REZULTATI.....9

3.1. Koncentracija stanica *M.* cf. *contortum* nakon tretmana biljnim ekstraktima i juglonom.....9

3.2. Utjecaj tretmana biljnim ekstraktima i juglonom na koncentraciju klorofila u stanicama alga.....10

3.2.1. Koncentracija Chl-a.....10

3.2.2. Koncentracija Chl-b.....11

4. RASPRAVA.....12

5. ZAKLJUČAK.....14

6. LITERATURA.....15

1. UVOD

1.1. Alelopatsko djelovanje biljaka

Pojam alelopatija potječe od grčke riječi *allelon,* što znači uzajamno, međusobno, i grčke riječi *pathos* što znači trpjeti, patiti. Prema tome, alelopatija bi predstavljala negativan utjecaj jednog organizma na druge. Međutim, samo značenje je nešto složenije pa se tako pod pojmom alelopatija smatra pozitivan ili negativan, izravan ili neizravan učinak pojedine vrste (biljke, gljive ili mikroorganizma) na drugi organizam, stvaranjem kemijskih spojeva (alelokemikalija) koje se ispuštaju u okoliš (Rice 1984). Alelokemikalije pripadaju različitim skupinama kemijskih spojeva, a porijeklom su najčešće fenoli, flavonoidi, terpenoidi, alkaloidi, steroidi, ugljikohidrati i amino kiseline, dok često tek u kombinaciji mogu imati izraženije alelopatsko djelovanje (Ferguson i Rathinasabapathi 2003). Alelopatija se u biljaka javlja kao odgovor na promjenu okolišnih čimbenika, poput dostupnosti svjetla, hranjivih tvari, vode te prisustva kompetitora ili herbivora, a alelokemikalije mogu imati dvojaku ulogu: mogu inhibirati rast i razvoj drugih organizama ili samo djelovati kao signal za prisutnost kompetitora (Pierik i sur. 2004 navedeno u Zeman i sur. 2014). Ne postoji jedinstven način ili ciljno mjesto djelovanja za sve vrste alelokemikalija. Međutim, neki od osnovnih procesa na koje alelokemikalije utječu su dioba stanica, klijavost peludi, unos hranjivih tvari, fotosinteza i specifične enzimske reakcije (Ferguson i Rathinasabapathi 2003). Također, učinak se mijenja ovisno o izloženosti organizma fiziološkom ili okolišnom stresu te tijekom vegetacijske sezone, a alelokemikalije mogu biti prisutne u različitim dijelovima biljke, uključujući cvjetove, listove, stabljike, koru, korijenje i biljne ostatke, ali također i tlo te procjedne vode.

Jedan od najstarijih poznatih i najzanimljivijih alelopatskih učinaka uočen je kod oraha (*Juglans* spp.). Uzrokuje ga fenolni spoj juglon izoliran iz mnogih vrsta porodice oraha (Juglandaceae) uključujući i pitomi orah (*Juglans regia* L.) (Davis 1928; Rice 1984). Nalazi se u većim koncentracijama u listovima ovih biljaka. Kiša ispire juglon iz lišća prenoseći ga u tlo te ga na taj način susjedne biljke mogu apsorbirati putem korijenja (Rietveld 1983). Utvrđeno je toksično djelovanje spojeva oraha na zeljaste, ali i drvenaste biljke (Funk i sur. 1979; Rietveld 1983). Bezbojni, reducirani i neotrovni oblik juglona (hidrojuglon) se također nalazi u izobilju u lišću, ljusci plodova i korijenu oraha (Lee i Campbell 1969; Segura-Aguilar i sur. 1992).

Istraživanje alelopatskog djelovanja oraha pokazalo je različit učinak na pojedine biljne vrste. Primjerice, ekstrakti listova oraha i juglon nisu utjecali na klijavost sjemenki pšenice

(*Triticum vulgare*), ječma (*Hordeum vulgare*), kukuruza (*Zea mays*), rotkvice (*Raphanus sativus*), lubenice (*Citrullus lanatus*) i graha (*Phaseolus vulgaris*), dok je kod sjemenki krastavca (*Cucumis sativus*), rajčice (*Lycopersicon esculentum*), sjetvene grbice (*Lepidium sativum*) i lucerne (*Medicago sativa*) uočena smanjena klijavost i rast (Kocacë-Aliskan i Terzi 2001). Zanimljivo je da su u istom istraživanju ekstrakti listova oraha i juglon pospješili rast klijanaca dinje (*Cucumis melo*).

Kod čivitnjače (*Amorpha fruticosa* L.) je također zabilježen alelopatski učinak te je utvrđeno da na proizvodnju alelokemikalija ove vrste može utjecati velika vlažnost tla (Grbović i Topuzović 2015). Ekstrakti listova čivitnjače pokazali su fitotoksični učinak koji je štetno djelovao na klijanje sjemenki *T. aestivum* i bijele gorušice (*Sinapis alba*) (Pavićević 2013). Dokazano je da su za inhibiciju rasta korijena *T. aestivum* zaslužni fenolni spojevi ekstrakata čivitnjače, osobito flavonoidi (Hovanet i sur. 2015). Unatoč snažnom fitotoksičnom učinku, ekstrakti listova čivitnjače mogu imati i korisne primjene; čivitnjača je izvor antimikrobnih spojeva, uključujući polifenole, koji pokazuju dobru antimikrobnu aktivnost protiv Gram pozitivnih bakterija, a također u kombinaciji s pojedinim antibioticima pospješuju njihovo djelovanje (Hovanet i sur. 2015).

Općenito, alelopatski učinak nakon izvršenog tretmana ispituje se utvrđivanjem brojnosti stanica, određivanjem koncentracije pigmenata ili mjerenjem dužine izdanka i korijena te vaganjem klijanaca. Za tretman se obično koriste biljni ekstrakti napravljeni pomoću različitih otapala kao što su destilirana voda, etil-eter, metanol i etanol (Della Greca i sur. 1993; Kocacë-Aliskan i Terzi 2001; Pavićević 2013).

Osnovni cilj istraživanja alelopatije je primjena alelokemikalija u suzbijanju korova kako bi se smanjila uporaba sintetičkih herbicida. Također, nastoje se istražiti alelopatske interakcije radi smanjenja negativnog utjecaja alokemikalija na rast i prinos usjeva (Šćepanović i sur. 2007).

Alelopatski učinak također se može primijeniti i za suzbijanje masovnog razvoja alga i cijanobakterija u vodi te različitih vrsta mikroorganizama i beskralježnjaka. Dokazano je da ekstrakti korijena običnog iđirota (*Acorus calamus*) inhibiraju razvoj i širenje štetnih cijanobakterija roda *Microcystis* (Zhang i sur. 2016). Također, fenolni spojevi običnog sita (*Juncus effusus*) uzrokuju snažnu inhibiciju rasta zelene alge *Selenastrum capricornutum* te mogu toksično djelovati i na druge organizme, poput bakterija vrste *Agrobacterium tumefaciens* te malih beskralježnjaka, račića *Anemia salina* (Della Greca i sur. 1993).

1.2. Cilj završnog rada

Cilj istraživanja je ispitati učinak ekstrakata listova pitomog oraha (*Juglans regia* L.) i čivitnjače (*Amorpha fruticosa* L.) te juglona na rast kultura i koncentraciju pigmenata u stanicama jednostanične zelene alge *Monoraphidium* cf. *contortum*.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Biljni materijal i priprema ekstrakata

2.1.1. Čivitnjača (*Amorpha fruticosa* L.)

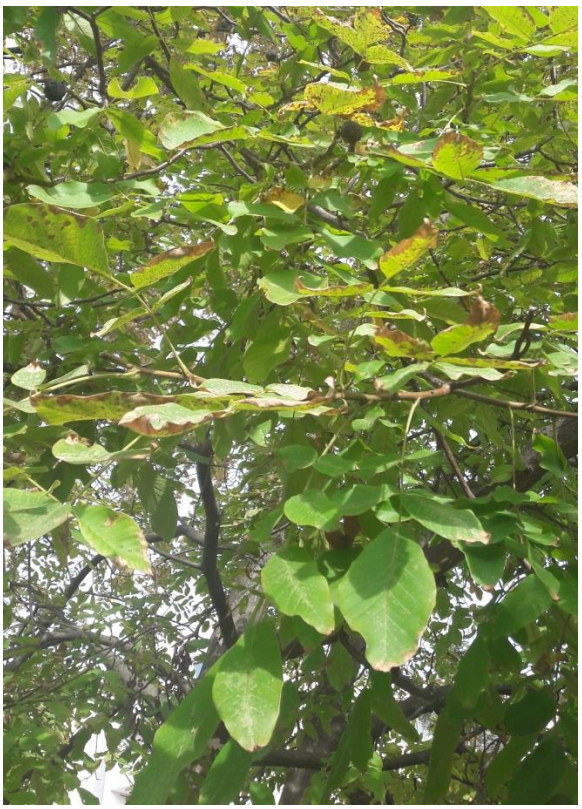
Čivitnjača (Slika 1) je listopadni grm iz porodice mahunarki (Fabaceae) s uspravnim izdancima bez trnja, visine 1 do 2 m, a može narasti i do 6 m. Potječe iz Sjeverne Amerike, a u Europu je unesena u 18. stoljeću kao ukrasna i medonosna biljka, a koristila se i za izradu pletenih predmeta i sprječavanje erozije tla. U Hrvatskoj se pojavila 50-ih godina 20. stoljeća (Nikolić i sur. 2014). Listovi ove biljke su neparno perasto sastavljeni, dugi do 30 cm, spiralno raspoređeni te imaju 9 do 25 liski (Kremer 2010). Liske su eliptičnog oblika, cjelovitog ruba i na kratkim peteljkama. Grane su šibolike, a mladi izbojci dlakavi. Kora je glatka i siva. Cvjetovi su dvospolni, skupljeni u uspravne metličaste cvatove. Pojedini cvijet ima jednu laticu plave do ljubičaste boje i deset žutonarančastih prašnika. Cvate od travnja do lipnja (Nikolić i sur. 2014). Plod je mahuna, zakrivljenog oblika i veličine 7 do 9 mm koja sadrži jednu ili dvije sjemenke, a razvija se u kolovozu (Kremer 2010). Zbog dobre klijavosti sjemenki, njihovog lakog širenja vjetrom i vodom te zbog brzog rasta, čivitnjača se na području Hrvatske smatra opasnim korovom te invazivnom vrstom (Nikolić i sur. 2014).



Slika 1: Čivitnjača (*Amorpha fruticosa* L.) (Fotografija: Zavod za ekologiju voda).

2.1.2. Pitomi orah (*Juglans regia* L.)

Pitomi orah (Slika 2) je listopadno drvo iz porodice Juglandaceae (orahovci). Potječe iz središnje i zapadne Azije (Lanzara i Pizzetti 1982). U Europi se većinom uzgaja zbog svojih plodova koji se koriste u prehrani. Stablo je visoko do 25 m i ima široko deblo promjera do 1,5 m koje se grana u prozračnu krošnju. Kora u mladosti bude glatka i siva, a kasnije tamna, debela i uzdužno ispucana. Listovi ove biljke su neparno perasto sastavljeni dužine 20 do 40 cm, izmjenično raspoređeni, sastavljeni od 5 do 9 liski dužine oko 12 cm (Kremer 2010). Liske su elipičnog oblika, na rubovima cjelovite i na vrhu ušiljene. Liske se nalaze na kratkim peteljkama, jedino je vršna liska veća i ima dužu peteljku. Orah je jednodomna biljka te ima jednospolne cvjetove. Ženski cvjetovi su pojedinačni ili dolaze po dva do četiri u skupinama, a muški cvjetovi, njih 100 do 150, skupljeni su u visećim macama. Cvate u travnju i svibnju, a oprašuje se anemofilijom. Plod je okrugla koštunica s jednom jestivom sjemenkom. Pojedini primjerci stabala oraha mogu živjeti i do 400 godina (Lanzara i Pizzetti 1982; Kremer 2010). Ispod oraha većinom ne rastu druge biljke jer u otpalim listovima i ljuskama sadrži prirodni herbicid juglon (5-hidroksi-1,4-naftokinon) (Segura-Aguilar 1992).



Slika 2: Pitomi orah (*Juglans regia* L.) (Fotografija: Zavod za ekologiju voda).

2.1.3. Priprema ekstrakata oraha i čivitnjače

U istraživanju su korišteni biljni ekstrakti napravljeni od listova čivitnjače i pitomog oraha ubranih u listopadu 2017. godine te tekući hranjivi medij (BBM, Bischoff i Bold, 1963). Listovi su sušeni u sušioniku na 70ºC tijekom 48 h. Za medij je pripremljeno 14 otopina hranjivih soli u odmjernim tikvicama prema točno naznačenim masama (g/100 mL dH_2O). Zatim je dodan odgovarajući volumen svake otopine i destilirane vode (Tablica 1). Potom je medij steriliziran u staklenim bocama u autoklavu. Ekstrakti listova dobiveni su miješanjem 10 g praha usitnjenih listova i 100 mL BBM-a te su ostavljeni na sobnoj temperaturi 24 h bez miješanja. Ekstrakti su zatim filtrirani kroz standardni filter papir te pod vakuumom kroz Whatman GF/F filtere (Whatman International Ltd., Engleska). Filtrat je korišten kao matična otopina za razrjeđenja ekvivalentna 0,01, 0,02 i 0,05 g biljnog materijala u 100 mL BBM-a.

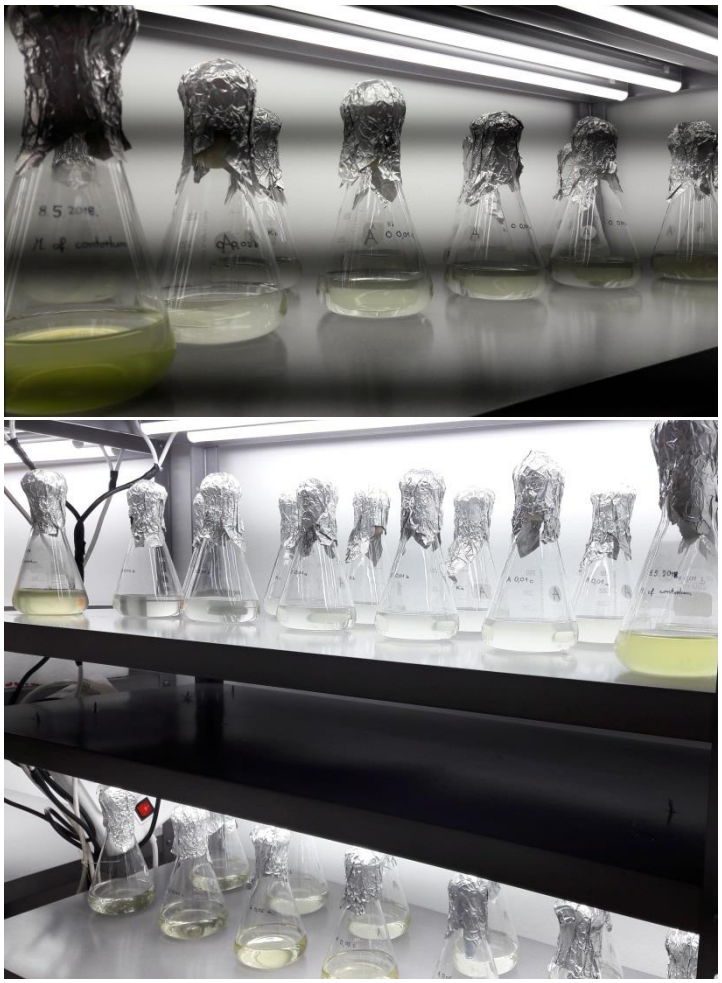
2.2. Uzgoj alga kulture *Monoraphidium* cf. *contortum*

U istraživanju je korištena kultura jednostanične zelene alge *M.* cf. *contortum* kupljena iz zbirke kultura autotrofnih organizama laboratorija Botaničkog instituta Češke akademije znanosti u Třeboňu te kultivirana u Laboratoriju za ekologiju alga, Zavoda za ekologiju voda Odjela za biologiju u Osijeku (Slika 3). Vrsta *Monoraphidium contortum* (Thuret) Komárková-Legnerova je slatkovodna zelena alga koja pripada porodici Selenastraceae (Guiry 2018). Rod *Monoraphidium* karakterizira ravan do sigmoidalni, blago zakrivljeni ili pak spiralno uvijeni oblik stanice, često s izduženim krajevima. Veličine stanica kreću se u rasponu 2-182 x 1-8 µm. Stanične stijenke su glatke, kloroplasti najčešće pojedinačni, a pirenoid obično nije prisutan. Razmnožavaju se nespolno, autosporama (Web 1).
Kulture su uzgajane u Erlenmeyerovim tikvicama od 250 mL u 100 mL BBM-a

Tablica 1. Sastav tekućeg hranjivog medija (Bischoff i Bold 1963).

	Matična otopina (g/100 mL dH_2O)	Količina potrebna za 1 L BBM
$NaNO_3$	2,5 g	10 mL
$CaCl_2$	0,33 g	10 mL
$MgSO_4$ x $7H_2O$	0,75 g	10 mL
K_2HPO_4	0,75 g	10 mL
KH_2PO_4	1,75 g	10 mL

NaCl	0,25 g	10 mL
Na_2EDTA KOH	5 g 3,1 g	1 mL
$FeSO_4$ x $7H_2O$ H_2SO_4 (96%)	0,498 g 0,1 mL	1 mL
H_3BO_3	1,142 g	1 mL
$ZnSO_4$ x $7H_2O$	0,882 g	1 mL
$MnCl_2$ x $4H_2O$	0,144 g	1 mL
Na_2MoO_4 x $2H_2O$	0,278 g	1 mL
$CuSO_4$ x $5H_2O$	0,157 g	1 mL
$CoCl_2$ x $6H_2O$	0,0404 g	1 mL



Slika 3: Kulture *M*. cf. *contortum* u uzgojnoj komori (Fotografija: Zavod za ekologiju voda).

2.3. Tretman alga biljnim ekstraktima i juglonom

Alge su tretirane u eksponencijalnoj fazi rasta ekstraktima čivitnjače i pitomog oraha koncentracijama ekvivalentnim 0,01, 0,02 i 0,05 g biljnog materijala na 100 mL BBM-a te 1 mM otopinom juglona. U kontrolne kulture je umjesto biljnih ekstrakata i juglona dodana ekvivalentna količina BBM-a te su uzgajane pri jednakim uvjetima. Tijekom eksperimenta, kulture su razmještene unutar uzgojne komore te ručno miješane. Uzorci stanica alga prikupljeni su nakon 72 h.

2.4. Određivanje koncentracije stanica alga

Za određivanje brojnosti, uzorci su fiksirani u 4%-tnoj otopini formaldehida te je koncentracija stanica alga utvrđena brojanjem u Bürker-Türkovoj komorici na invertnom mikroskopu. Koncentracija stanica izračunata je prema formuli: $x = \frac{x}{64}$ kojom se određuje broj stanica u 64 kvadratića komorice i preračunata u broj stanica u mm^3 te izražena za 1 mL kulture. Analiza je provedena u triplikatima.

2.5. Određivanje koncentracije klorofila

Koncentracija klorofila određena je nakon tretmana filtriranjem 10 mL uzorka pomoću vakuum sisaljke kroz MN GF-3 filtere (Macherey-Nagel, Njemačka). Filteri su nakon toga stavljeni u plastične kivete s čepom i pohranjeni u zamrzivač do daljnje obrade te naknadno homogenizirani u tarioniku s tučkom u 90%-tnom acetonu. Analiza je provedena u triplikatima. Ekstrakcija klorofila se odvijala tijekom 24 h u hladnjaku u mraku. Uzorci su potom centrifugirani 10 minuta na 3000 okr/min. Apsorbancija ekstrakata mjerena je spektrofotometrom S-200 (Boeco, Njemačka) pri 630, 645, 663 i 750 nm. Kao slijepa proba korišten je aceton. Koncentracije klorofila-a (Chl-a) i klorofila-b (Chl-b) izračunate su prema metodama SCOR-UNESCO (1966) te Strickland i Parsons (1972).

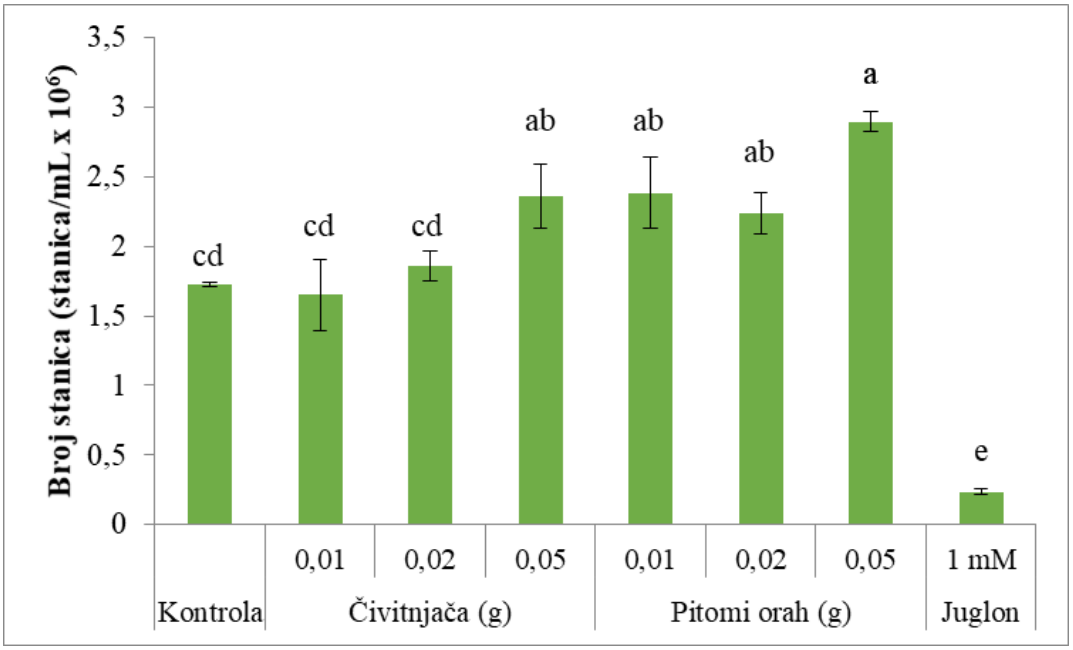
2.6. Statistička obrada podataka

Nakon provjere normalnosti podataka (Shapiro-Wilk W test) i ispitivanja homogenosti varijance (Levene test), korištena je analiza varijance (engl. *Analysis of Variance* - ANOVA) te Tukey HSD test (engl. *Honestly Significant Difference* - HSD) uz razinu značajnosti od 5%. Podaci su obrađeni u statističkom programu Statistica 13.3 (TIBCO Inc., SAD).

3. REZULTATI

3.1. Koncentracija stanica *M*. cf. *contortum* nakon tretmana biljnim ekstraktima i juglonom

Primijenjene koncentracije ekstrakata i juglon značajno su utjecali na rast alga (Slika 4). Biljni ekstrakti su stimulirali rast, dok je otopina juglona značajno inhibirala rast alga. Prosječan broj stanica u kontrolnim kulturama iznosio je 1,73 x 10^6 stanica/mL. U kulturama tretiranim ekstraktima čivitnjače, najviša koncentracija ekstrakta značajno je utjecala na povećanje broja stanica u odnosu na kontrolne kulture te je broj stanica iznosio 2,36 x 10^6 stanica/mL. Kod tretmana ekstraktima oraha, sve primijenjene koncentracije uzrokovale su značajnu stimulaciju rasta kultura u odnosu na kontrolu. Koncentracija stanica kretala se od 2,24 x 10^6 do 2,89 x 10^6 stanica/mL. 1 mM otopina juglona značajno je inhibirala rast alga u odnosu na kontrolu te je utvrđena vrlo mala koncentracija stanica (0,24 x 10^6 stanica/mL) (Slika 4).

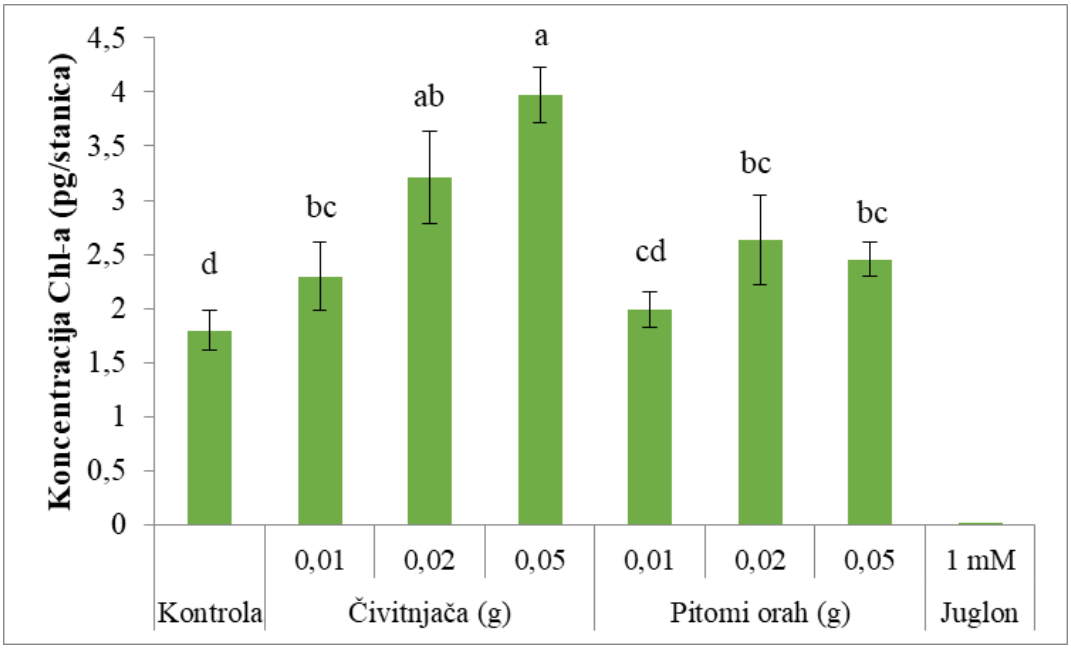


Slika 4: Koncentracija stanica *M*. cf. *contortum* nakon tretmana ekstraktima čivitnjače i pitomog oraha (0,01, 0,02, 0,05 g suhe tvari/100 mL) te otopinom juglona (1 mM). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajne (Tukey HSD, $p<0,05$).

3.2. Utjecaj tretmana biljnim ekstraktima i juglonom na koncentraciju klorofila u stanicama alga

3.2.1. Koncentracija Chl-a

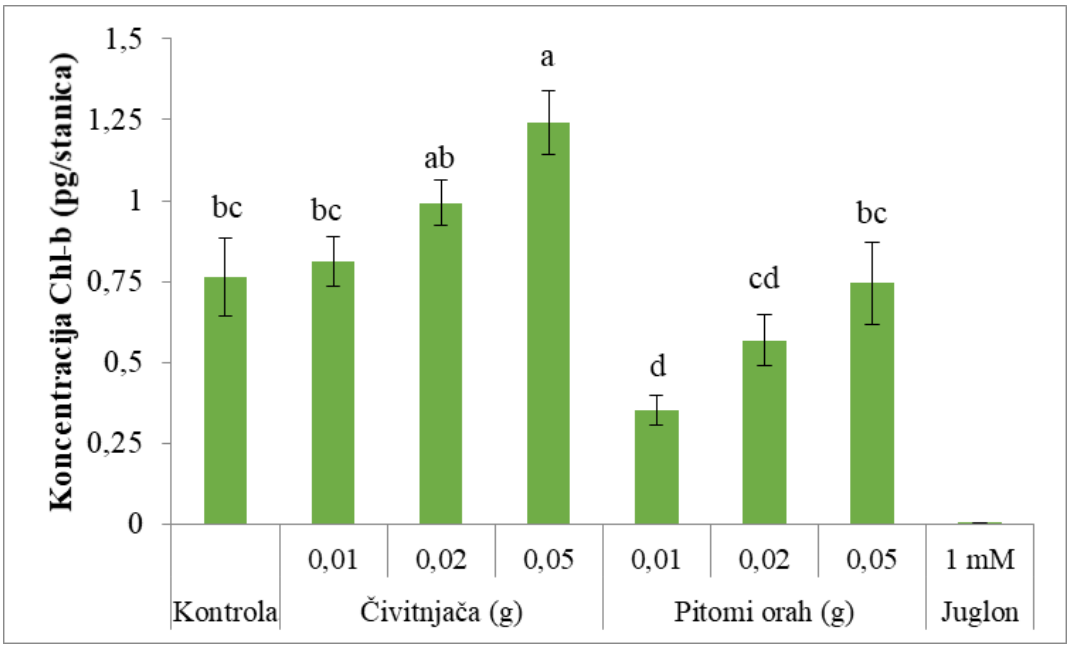
Nakon tretmana ekstraktima čivitnjače, utvrđene su statistički značajne razlike u koncentraciji Chl-a u odnosu na kontrolne kulture (Slika 5). U kontrolnim kulturama koncentracija Chl-a iznosila je 1,8 pg/stanica, dok su vrijednosti u kulturama tretiranim ekstraktima čivitnjače rasle s povećanjem koncentracije biljnog ekstrakta te su se kretale u rasponu od 2,3 pg/stanica do 3,97 pg/stanica. Izlaganje alga ekstraktima oraha uzrokovalo je statistički značajno povećanje koncentracije Chl-a u odnosu na kontrolne kulture, osim kod tretmana najnižom koncentracijom ekstrakta, gdje je koncentracija Chl-a iznosila 1,99 pg/stanica (Slika 5). U ostalim kulturama tretiranim ekstraktima oraha vrijednosti koncentracije Chl-a iznosile su 2,63 pg/stanica (0,02 g suhe tvari/100 mL) i 2,45 pg/stanica (0,05 g suhe tvari/100 mL). U kulturama tretiranim otopinom juglona (1 mM), koncentracija Chl-a je bila izrazito niska te ju nije bilo moguće točno utvrditi (Slika 5).



Slika 5: Koncentracija Chl-a u kulturama *M*. cf. *contortum* nakon tretmana ekstraktima čivitnjače i pitomog oraha (0,01, 0,02, 0,05 g suhe tvari/100 mL) te otopinom juglona (1 mM). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajne (Tukey HSD, $p<0,05$).

3.2.2. Koncentracija Chl-b

Koncentracije Chl-b mijenjale su se različito od koncentracija Chl-a (Slika 6). U kontrolnim kulturama koncentracija Chl-b iznosila je 0,76 pg/stanica. Izlaganje alga ekstraktima čivitnjače nije uzrokovalo statistički značajno povećanje koncentracije Chl-b u odnosu na kontrolne kulture, osim kod tretmana najvišom koncentracijom ekstrakta, gdje je koncentracija Chl-b iznosila 1,24 pg/stanica. U ostalim kulturama tretiranim ekstraktima čivitnjače koncentracija Chl-b iznosila je 0,81 pg/stanica (0,01 g suhe tvari/100 mL) i 0,99 pg/stanica (0,02 g suhe tvari/100 mL). Nakon tretmana ekstraktima oraha također nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolne kulture, osim kod tretmana najnižom koncentracijom ekstrakta, gdje je koncentracija Chl-b iznosila 0,35 pg/stanica. U ostalim kulturama tretiranim ekstraktima oraha vrijednosti koncentracije Chl-b iznosile su 0,57 pg/stanica (0,02 g suhe tvari/100 mL) i 0,74 pg/stanica (0,05 g suhe tvari. Kao i u slučaju koncentracije Chl-a, u kulturama tretiranim otopinom juglona (1 mM) koncentracija Chl-b je bila izrazito niska te ju nije bilo moguće točno utvrditi (Slika 6).



Slika 6: Koncentracija Chl-b u kulturama *M.* cf. *contortum* nakon tretmana ekstraktima čivitnjače i pitomog oraha (0,01, 0,02, 0,05 g suhe tvari/100 mL) te otopinom juglona (1 mM). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajne (Tukey HSD, $p<0,05$).

4. RASPRAVA

Ekstrakti listova čivitnjače (*Amorpha fruticosa* L.) i pitomog oraha (*Juglans regia* L.) pokazali su pozitivan alelopatski učinak na rast i koncentraciju pigmenata jednostanične zelene alge *Monoraphidium* cf. *contortum*, dok je juglon, spoj koji u primijenjenoj koncentraciji (1 mM) ima poznati negativni učinak na alge, djelovao inhibitorno na promatrane parametre. Povećanje broja stanica *M*. cf. *contortum* i koncentracije Chl-a bilo je izraženije pri višim koncentracijama biljnih ekstrakata. Također, više koncentracije ekstrakta čivitnjače uzrokovale su povećanje vrijednosti Chl-b u odnosu na kontrolu, dok su ekstrakti pitomog oraha uzrokovali smanjenje koncentracije ovog pigmenta.

Većina istraživanja djelovanja ekstrakata oraha i čivitnjače na biljne organizme pokazala su njihov negativan alelopatski učinak. Također, različiti biljni organi te stanište uzorkovanih biljaka, mogu utjecati na njihovu različitu alelopatsku aktivnost (Grbović i Topuzović 2015). Čivitnjača može imati snažan negativan učinak na brzinu klijanja i rast drugih biljaka, primjerice na bijelu gorušicu (*Sinapis alba* L.) (Csiszár 2009), dok u nekim slučajevima zbog manjeg ukupnog sadržaja fenola i flavonoida ima slabije alelopatsko djelovanje u usporedbi s drugim biljkama (npr. promjenjivi grašar (*Coronilla varia* L.), lucerna (*Medicago sativa* L.) i bijeli dud (*Morus alba* L.)) (Hovanet i sur. 2015). Hovanet i suradnici (2015) pokazali su da se fitotoksično djelovanje ekstrakata čivitnjače može povezati s velikim sadržajem flavonoida u njezinim listovima (10,35%) koji su poznati po svom alelopatskom učinku.

Istražen je alelopatski utjecaj oraha na prinos, rast, kemijska svojstva i sadržaj elemenata u listovima jagode (*Fragaria* x *anannasa* L.). Rezultati su pokazali inhibicijski učinak na rast, kao i smanjen prinos i težinu plodova te niži sadržaj hranjivih elemenata u odnosu na kontrolne biljke (Ercisli i suradnici 2005). Također, Terzi (2008) navodi kako juglon i kompost listova oraha imaju inhibirajući učinak na klijanje sjemenki krastavca (*Cucumis sativus* cv. Beith Aplha), dok kod klijanja sjemenki dinje (*Cucumis melo* cv. Galia) nije zabilježen inhibirajući učinak te je pretpostavka kako su ove biljke razvile mehanizam tolerancije na juglon. Smatra se da neke biljke imaju prirodnu zaštitu od negativnog učinka juglona te stvaraju enzime koji prevode juglon u manje otrovan hidrojuglon (Segura-Aguilar i sur. 1992; Matvienko i sur. 2001). Ovakav ili sličan mehanizam mogao bi također biti uzrok pozitivnog alelopatskog djelovanja ekstrakata oraha i čivitnjače na rast alga. Uz povećanu brojnost stanica i koncentraciju klorofila, veliku otpornost *M*. cf. *contortum* na tretmane biljnim ekstraktima potvrđuju i vrlo niske koncentracije produkata lipidne peroksidacije

utvrđene u stanicama alga (neobjavljeni podaci, Zavod za ekologiju voda), čija je koncentracija bila povišena jedino pri tretmanu juglonom. Općenito, posebno su rijetka istraživanja koja prate utjecaj ekstrakata oraha i samog juglona na cijanobakterije i alge, a utjecaj ekstrakta čivitnjače na ove organizme još nije istraživan. Tretman alga juglonom u našem istraživanju imao je puno snažniji učinak od tretmana ekstraktima oraha. Već je ranije utvrđeno (Kessler 1989) da primijenjena koncentracija juglona (10^{-3} M) snažno inhibira rast slatkovodnih zelenih alga vrsta *Closterium acerosum* Schrank, *Pandorina morum* Bory, *Micrasterias thomasiana* Arch., *Spirogyra grevilleana* Hass. i *Eudorina californica* Shaw. Fiziološko djelovanje juglona nije još u potpunosti istraženo, ali je poznato da ovaj spoj inhibira rast biljaka smanjujući stopu fotosinteze i respiracije (Hejl i sur. 1993) te uzrokuje oksidacijski stres (Segura-Aguilar i sur. 1992). Unatoč velikoj otpornosti slatkovodnih zelenih alga na učinak juglona, koncentracije u rasponu od 10^{-5} do 10^{-4} M mogu snažno utjecati na biološku raznolikost, a više koncentracije (10^{-4}-10^{-3} M) mogu potpuno inhibirati primarnu i sekundarnu produkciju te onemogućiti razvoj biljnih i životinjskih zajednica u nekom vodenom ekosustavu (Kessler 1989).

Alelopatija i alelokemikalije mogu također imati i korisnu primjenu za suzbijanje štetnog cvjetanja alga i cijanobakterija (Fawzy i sur. 2013; Zhang i sur. 2016), ali i kao kontrola bioloških kontaminanata u sustavima za masovnu proizvodnju alga čija se biomasa koristi u proizvodnji biogoriva (Bacellar Mendes i Vermelho 2013).

5. ZAKLJUČAK

Ekstrakti listova čivitnjače (*Amorpha fruticosa* L.) i pitomog oraha (*Juglans regia* L.) pokazali su pozitivan alelopatski učinak na rast kultura jednostanične zelene alge *Monoraphidium* cf. *contortum* i koncentraciju Chl-a. Više koncentracije ekstrakta čivitnjače uzrokovale su povećanje vrijednosti Chl-b u odnosu na kontrolu, dok su ekstrakti pitomog oraha uzrokovali smanjenje koncentracije ovog pigmenta. Otopina juglona imala je snažan negativan učinak na rast kultura, kao i na koncentraciju pigmenata u stanicama alga. Daljnja istraživanja alelopatskih biljnih spojeva i njihovog utjecaja na alge i vodene ekosustave mogu pomoći u kontroli štetnog cvjetanja alga i cijanobakterija te poslužiti u unaprjeđenju masovnog uzgoja alga.

6. LITERATURA

Bacellar Mendes, L. B., Vermelho, A. B. (2013) Allelopathy as a potential strategy to improve microalgae cultivation. Biotechnology for Biofuels 6: 152.

Csiszár, Á (2009) Allelopathic effects of invasive woody plant species in Hungary. Acta Silvatica & Lignaria Hungarica 5: 9-17.

Davis, E. F. (1928) The Toxic principle of *Juglans nigra* as identified with synthetic juglone, and its toxic effects on tomato and alfalfa plants. American Journal of Botany 15: 620.

Della Greca, M., Fiorentino, A., Monaco, P., Pinto, G., Pollio, A., Previtera, L. (1996) Action of antialgal compounds from *Juncus effusus* L. on *Selenastrum capricornutum*. Journal of Chemical Ecology 22: 587-603.

Ercisli, S., Esitken, A., Turkkal, C., Orhan, E. (2005) The allelopathic effects of juglone and walnut leaf extracts on yield, growth, chemical and PNE compositions of strawberry cv. Fern. Plant, Soil and Environment 51: 283-287.

Ferguson, J. J., Rathinasabapathi, B. (2003) Allelopathy: How Plants Suppress Other Plants. Horticultural Sciences Department, UF/IFAS Extension.

Funk, D. T., Case, P. J., Rietveld, W. J., Phares, R. E. (1979) Effects of juglone on the growth of coniferous seedlings. Forest Science 25: 452-454.

Grbović, F., Topuzović, M. (2015) The allelopathic activity of leaf and fruit leachates of introduced invasive *Amorpha fruticosa* L. 21st Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, Petnica (Srbija)

Hejl, A. M., Einhelling, F. A., Rasmussen; J. A. (1993) Effects of juglone on growth, photosynthesis and respiration. Journal of Chemical Ecology 19: 559-68.

Hovanet, M. V., Marinas, I. C., Dinu, M., Oprea, E., Chifiriuc, M. C., Stavropoulou, E., Lazar, V. (2015) The phytotoxicity and antimicrobial activity of *Amorpha fruticosa* L. leaves extract. Romanian Biotechnological Letters 20: 10670-10678.

Kessler, C. T. (1989) Effect of juglone on freshwater algal growth. Journal of Chemical Ecology 15: 2127-2134.

Kocacë-Aliskan, I., Terzi, I. (2001) Allelopathic effects of walnut leaf extracts and juglone on seed germination and seedling growth. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 76: 436-440.

Kremer, B. P. (2010) Bäume & Sträucher. Steinbachs Naturführer, Stuttgart.

Lanzara, P., Pizzetti, M. (1982) Drveće. Mladinska knjiga, Ljubljana.

Lee, K. C., Campbell, R.W. (1969) Nature and occurrence of juglone in *Juglans nigra* L. Horticultural Science 4: 297-298.

Matvienko, M., Wojtowicz, A., Wrobel, R., Jamison, D., Goldwasser, Y., Yoder, J. I. (2001) Quionone oxidoreductase message levels are differentially regulated in parasitic and nonparasitic plants exposed to allelopathic quinones. Plant Journal 25: 375-387.

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

Pavićević, M. (2013) Alelopatsko djelovanje ekstrakata listova običnog oraha i nekih invazivnih biljnih vrsta na klijanje pšenice (*Triticum aestivum* L.) i gorušice (*Sinapis alba* L.). Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.

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

Pilipović, A. (2018) Utjecaj selenita na rast i antioksidacijski odgovor zelene mikroalge *Monoraphidium* cf. *contortum* Diplomski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju, Osijek.

Rice E. L. (1984) Allelopathy. Academic Press, Orlando.

Rietveld, W. J. (1983) Allelopathic effects of juglone on germination and growth of several herbaceous and woody species. Journal of Chemical Ecology 9: 295-308.

SCOR-Unesco Working Group 17 (1966) Determination of photosynthetic pigments, in: Unesco (Ed.) Monographs on Oceanographic Methodology 1. Determination of photosynthetic pigments in sea-water. Unesco, Paris 11-18.

Segura–Aguilar, J., Hakman, I., Rydström, J. (1992) The effect of 5-OH-1,4 naphthoquinone on Norway Spruce seed during germination. Plant Physiology 100: 1955-1961.

Strickland, J. D., Parsons, T. R. (1972) A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada 167: 185-192.

Šćepanović, M., Novak, N., Barić, K., Ostojić, Z., Galzina, N., Goršić, M. (2007) Alelopatski utjecaj korovnih vrsta *Abutilon theophrasti* Med. i *Datura stramonium* L. na početni razvoj kukuruza. Agronomski glasnik 6: 459-472.

Terzi, I. (2008) Allelopathic effects of Juglone and decomposed walnut leaf juice on muskmelon and cucumber seed germination and seedling growth. African Journal of Biotechnology 7: 1870-1874.

Wu, Y., Cheng, X., Cai, Q., Lin., C. (2012) Allelopathic effects of twelve hedgerow plant species on seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). Advanced Materials Research 356-360: 2767-2773.

Zeman, S., Fruk, G., Jemrić, T. (2011) Alelopatski odnosi biljaka: pregled djelujućih čimbenika i mogućnost primjene. Glasnik zaštite bilja 34: 52-59.

Zhang, S.-H., Zhang, S.-Y., Li, G. (2016) *Acorus calamus* root extracts to control harmful cyanobacteria blooms. Ecological Engineering 94: 95-101.

Mrežne stranice:

Web 1. http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=43438 (preuzeto 30. lipnja 2018.)