

Djelovanje propikonazola i klorantraniliprola na obraštaj tla cijanobakterijom *Cylindrospermum* sp.

Ivanković, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:181:720795>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Diplomski sveučilišni studij Zaštite prirode i okoliša

Luka Ivanković

**Djelovanje propikonazola i klorantraniliprola na obraštaj tla
cijanobakterijom *Cylindrospermum* sp.**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Diplomski rad

Diplomski sveučilišni studij Zaštite prirode i okoliša

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

Djelovanje propikonazola i klorantraniliprola na obraštaj tla cijanobakterijom *Cylindrospermum* sp.

Luka Ivanković

Rad je izrađen: Odjel za biologiju, Zavod za kvantitativnu ekologiju

Mentor: dr. sc. Goran Palijan, docent

Kratak sažetak diplomskog rada: Tretiranjem poljoprivrednih površina pesticidima utječemo i na organizme koji nisu ciljani njihovom aplikacijom. Cilj ovog rada je ustanoviti utjecaj dvaju pesticida Bumper 25 ec (propikonazol) i Coragen 20 sc (klorantraniliprol) na rast terestričke cijanobakterije *Cylindrospermum* sp. Bumper 25 je triazolni fungicid i sadrži aktivnu tvar propikonazol dok je Coragen 20 sc diamidni insekticid koji sadrži aktivnu tvar klorantraniliprol. Korištena su dva supstrata, glejno tlo odakle je cijanobakterija izolirana i umjetno tlo. Pesticidi su korišteni u koncentracijama 0.2, 0.04, 0.02 i 0.008 $\mu\text{g ml}^{-1}$ za klorantraniliprol i 0.625, 0.125, 0.0625 i 0.0025 $\mu\text{g ml}^{-1}$ za propikonazol. Rast se odvijao u fotobioreaktoru pri sobnoj temperaturi i konstantnoj vlažnosti. Nakon tjedan dana inkubacije mikrokozmosi su uzorkovani te su mjereni sljedeći parametri: koncentracija klorofila a, ukupna količina ugljikohidrata, mikrobiološka aktivnost i sposobnost stvaranja biofilma. Propikonazol pri koncentracijama BC1, BC4 na glejnom tlu i BC4 na umjetnom tlu ima pozitivan utjecaj na rasta cijanobakterije. Međutim djelovanjem klorantraniliprola uočen je pozitivan rast cijanobakterije pri svim koncentracijama na umjetnom tlu i CC1, CC3 te CC4 na glejnom tlu. Pri kratkotrajnom izlaganju određeni pesticidi mogu poslužiti kao izvor dodatnih hranjivih tvari cijanobakterijama što može rezultirati povećanim rastom.

Broj stranica: 52

Broj slika: 24

Broj tablica: 3

Broj literaturnih navoda: 58

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: *Cylindrospermum* sp., cijanobakterije, pesticidi, klorantraniliprol, propikonazol

Datum obrane: 25.09.2019.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Branimir K. Hackenberger

2. dr. sc. Goran Palijan, doc.

3. dr. sc. Vesna Peršić, doc.

4. izv. prof. dr. sc. Davorka K. Hacenberger

Rad je pohranjen u: knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Biology

Master thesis

Graduate university study programme in Nature and Environmental Protection

Scientific Area: Natural Sciences

Scientific Field: Biology

**The effects of propiconazole and chlorantraniliprole on terrestrial cyanobacterium
Cylindrospermum sp.**

Luka Ivanković

Thesis performed at: Department of Biology, Subdepartment of quantitative ecology

Supervisor: Goran Palijan, PhD, Assistant Professor

Short abstract: Pesticide treatment of agricultural land also affects organisms that are not targeted by their application. The aim of this study was to establish effects of two pesticides Bumper 25 ec (propiconazole) and Coragen 20 sc (chlorantraniliprol) on the growth of the terrestrial cyanobacteria *Cylindrospermum* sp. Bumper 25 ec is triazolic fungicid with active substance propiconazole and Coragen 20 sc is diamidic insecticid with active substance klorantraniliprol. Two substrates were used, gley soil type from which the cyanobacteria was isolated and aritificial soil. The pesticides concentrations of 0.2, 0.04, 0.02 and 0.008 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for chlorantraniliprol and 0.625, 0.125, 0.0625 and 0.0025 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for propiconazole was used. Growth was carried out in photobioreactor at room temperature and at constant humidity. After one week incubation microcosms were sampled and soil chlorophyll a concentration, total carbohydrates, microbial activity and biofilm formation were measured. Propiconazole at concentrations of BC1, BC4 on gley soil and BC4 on artificial soil has a positive effect on the growth of cyanobacteria. However, application of chlorantraniliprol showed a positive growth of cyanobacteria at all concentrations on artificial soil and CC1, CC3 and CC4 on the gley soil. On short-term exposure, certain pesticides can serve as a source of additional nutrients to cyanobacteria, which can result in increased growth.

Number of pages: 52

Number of figures: 24

Number of tables: 3

Number of references: 58

Original in: Croatian

Key words: *Cylindrospermum* sp., cyanobacteria, pesticides, chlorantraniliprol, propiconazole

Date of thesis defence: 25.09.2019.

Reviewers:

1. prof. dr. sc. Branimir K. Hackenberger

2. dr. sc. Goran Palijan, doc.

3. dr. sc. Vesna Peršić, doc.

4. izv. prof. dr. sc. Davorka K. Hacenberger

Thesis deposited in: the Library of the Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek and in the National and University Library in Zagreb in electronic form. It is also available on the website of theDepartment of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek.

Ovaj rad je izrađen u okviru projekta „Različiti učinci okolišno relevantnih mješavina metal temeljenih nanočestica i pesticida nafaunu tla: Nove smjernice za procjenu rizika (DEFENSoil)“ financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost (IP-09-2014-4459); voditelj projekta prof. dr. sc. Branimir K. Hackenberger.

Zahvaljujem se mentoru, doc. dr. sc. Goranu Palijanu na ukazanom povjerenju, prenesenom znanju i konstruktivnim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se i kolegama i prijateljima koji su na bilo koji način doprinijeli izradi ovog rada.

Posebna zahvala pripada mojoj djevojci Dori koja mi je bila veliki motivator i podrška u svim trenucima.

Velika hvala mojim roditeljima, bratu, baki Vesni i užoj obitelji na savjetima, razumijevanju i svim odricanjima tijekom mog studija.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Biologija Cijanobakterija (= Cyanophyta)	1
1.1.1. Povijest	1
1.1.2. Stanična struktura cijanobakterija	1
1.1.3. Morfologija i klasifikacija	3
1.2. Staništa	3
1.2.1. Vodena staništa.....	4
1.2.2. Kopnena staništa.....	4
1.3. Primjena cijanobakterija.....	6
1.3.1. Bioenergija	6
1.3.2. Prirodna gnojiva	7
1.3.3. Prirodni pesticidi	8
1.4. Značajke roda <i>Cylindrospermum</i>	8
1.5. Cilj.....	11
2. Materijali i metode	12
2.1. Priprema eksperimenta i izolacija obraštaja	12
2.2. Standardizacija pripreme cijanobakterijskog inokulata.....	13
2.3. Uzgojni uvjeti	13
2.4. Fizikalna i kemijska svojstva pesticida	15
2.4.1. Propikonazol.....	15
2.4.2. Klorantraniliprol	16
2.5. Dizajn eksperimenta	17
2.6. Koncentracije klorofila a u tlu.....	18
2.7. Sposobnost stvaranja biofilma (kristal violet test, eng. biofilm forming ability-BFA).....	19
2.8. Mikrobiološka aktivnost (FDA test - Fluorescein diacetate).....	21
2.9. Ukupna količina ugljikohidrata	22
2.10. Obrada podataka.....	23
3. Rezultati	25
3.1. Klorantraniliprol (prvi eksperiment)	25
3.1.1. Koncentracija klorofila a	25
3.1.2. Kristal violet test	27
3.1.3. FDA test	28
3.1.4. Ukupna količina ugljikohidrata	29

3.2. Propikonazol (prvi eksperiment)	30
3.2.1. Koncentracija klorofila a	30
3.2.2. Kristal violet test	31
3.2.3. FDA test	33
3.2.4. Ukupna količina ugljikohidrata	34
3.3. Klorantraniliprol (drugi eksperiment)	35
3.3.1. Koncentracija klorofila a	35
3.3.2. Kristal violet test	36
3.3.3. FDA test	38
3.4. Propikonazol (drugi eksperiment)	39
3.4.1. Koncentracija klorofila a	39
3.4.2. Kristal violet test	40
3.4.3. FDA test	42
4. Rasprava	43
4.1. Klorantraniliprol	44
4.2. Propikonazol	45
5. Zaključak	47
6. Literatura	48

1.Uvod

1.1. Biologija Cijanobakterija (= Cyanophyta)

1.1.1. Povijest

Starost Zemlje procjenjuje se na 4,5 milijardi godina, a pojava bakterije na 3,8 – 3,5 milijardi godina. Postoje razni fosilni dokazi o takvom ranom razvoju života na Zemlji. Stromatoliti (grč. στρώμα = pokrivač, λίθος = kamen) su stijene slojevite strukture čiji je karakterističan izgled nastao rastom i metaboličkom aktivnosti cijanobakterija i ostalih mikroorganizama koji pripadaju domeni Bacteria. Fosili cijanobakterija pronađeni u Australiji predstavljaju najstarije fosilne nalaze koji datiraju još od prije 3,5 milijardi godina (Seckbach i J. Stal, 2007; Tice i Lowe, 2004). Cijanobakterije su fotosintetski prokarioti za koje se smatra da su prvi vršili proces fotosinteze. Na početku se proizvedeni kisik vezao za otopljeno željezo u oceanima stvarajući netopljive željezove okside, najčešće magnetit i hematit koji su se taložili stvarajući prepoznatljive slojeve u sedimentnim stijenama. Geološki dokazi pokazuju kako oksigenacija atmosfere počinje tek prije 2,3 milijarde godina, te da je sve do prije 2 milijarde godina atmosfera bila bez kisika (Stal, 2013). Cijanobakterije su dakle zaslužne za obogaćivanje praatmosfere kisikom, što je omogućilo daljnju evoluciju organizama. Zbog brojnosti fosilnih nalaza cijanobakterija u razdoblju od 2,5 – 0,57 milijardi godina Proterozoik se navodi kao „Doba cijanobakterija“ (Schopf i Walter, 1982).

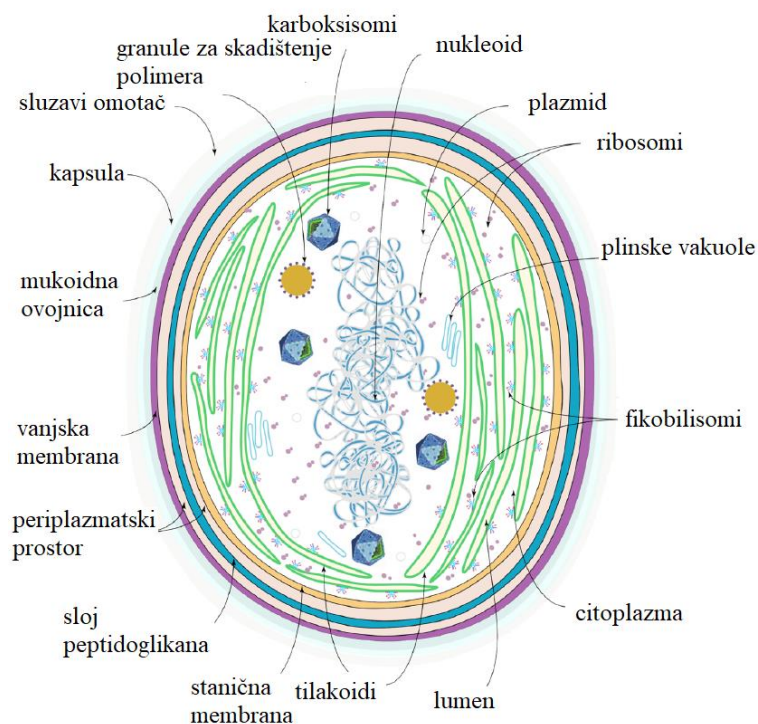
Zanimljivo je da se morfologija cijanobakterija nije značajnije promijenila od trenutka kada su se pojavile na Zemlji (Seckbach i J. Stal, 2007). Osim toga cijanobakterije su imale vremena za diverzifikaciju i prilagodbu prema svim novo nastalim staništima koja su se tada pojavila na Zemlji. Uz proces fotosinteze i fiksaciju CO₂ određene skupine cijanobakterija mogu fiksirati N₂ što predstavlja sudjelovanje u dva važna biogeokemijska ciklusa. Cijanobakterije se smatraju jednim od važnijih organizama koji su značajno formirali ekološke uvjete na za Zemlji. Prema tome cijanobakterije se smatraju pionirima života na Zemlji.

1.1.2. Stanična struktura cijanobakterija

Stanična građa cijanobakterija je jednostavnija od eukariota, ali isto tako se razlikuju od građe jednostavnijih bakterija i arhea. Stanična stjenka sastoji se od vanjske membrane koja je bogata lipopolisaharidima i predstavlja zaštitnu membranu. Zatim unutarnja membrana od peptidoglikana ili mureina koja stanici daje čvrstoću, a sastoji se od polimera N-acetil-muraminske kiseline i N-acetil-glukozamina. Unutarnja i vanjska membrana odvojene su

periplazmom. Za razliku od gram negativnih bakterija sloj peptidoglikana kod cijanobakterija je pet puta deblji. Osim toga cijanobakterijske stanice mogu biti obavijene različitim tipovima slojeva; sluzavi omotač, kapsula ili plašt. Kemijska analiza pokazuje da se ti slojevi uglavnom sastoje od ugljikohidrata koji se proizvode i izlučuju van stanice te se nazivaju egzopolisaharidi ili ekstracelularni polisaharidi (EPS). Slojevi EPS-a koji ostaju u neposrednoj blizini stanične površine nazivamo kapsularnim polisaharidima (CPS, eng. capsular polysaccharides), osim toga razlikujemo i oslobođene polisaharide (RPS, eng. released polysaccharides) koje stanice otpuštaju u okolni prostor (Kumar i sur., 2018).

Unutar stanične membrane koja je od stanične stijenke odvojena periplazmatksim prostorom nalazi se citoplazma s tilakoidima, plinskim vakuolama, granulama za skladištenje polimera, karboksisomima i genetičkim materijalom (Slika 1.). Tilakoidi su intracelularne membrane u kojima se odvija fotosinteza, one zauzimaju veći dio perifernog dijela citoplazme i raspoređeni su u nizu koncentričnih cilindara. Uz tilakoide nalazimo i fikobilisome koji predstavljaju antenalne komplekse koji apsorbiraju onaj dio spektra koji ne mogu klorofil a i karotenoidi. Karboksisomi sadržavaju enzim Rubisco (1,5-bifosfat karboksilazu-oksigenazu) (Noreña-Caro i Benton, 2018).



Slika 1. Stanična struktura cijanobakterija (preuzeto iz Noreña-Caro i Benton, 2018)

1.1.3. Morfologija i klasifikacija

Do nedavno su cijanobakterije identificirane i kategorizirane samo prema morfološkim osobinama kao što su dimenzija, oblik, boja, vrsta grananja i sadržaj stanice. Cijanobakterije mogu biti jednostanične, kolonijalne ili filamentozne. Rippka i sur. (1979) predlažu podjelu cijanobakterija na 5 odjeljaka, na osnovu toga nomenklatura cijanobakterija nije podijeljena na redove već na pododjeljke I (= Chroococcales), II (= Pleurocapsales), III (= Oscillatoriales), IV (= Nostocales) i V (= Stigonematales). Jednostanične cijanobakterije grupirane su u pododjeljke I i II. U pododjeljku I reprodukcija cijanobakterija odvija se dvojnog diobom dok one u pododjeljku II mogu podijeliti i mnogostrukom diobom stvarajući mnoštvo baecita, stanica kćeri iz kojih se razvijaju odrasle stanice. U pododjeljke III-V smještene su filamentozne cijanobakterije.

Filamentozne cijanobakterije čiji se trihomi sastoje samo od vegetativnih stanica (npr. Oscillatoriales) smještene su u pododjeljak III. U pododjeljcima IV i V obuhvaćene su filamentozne cijanobakterije koje imaju mogućnost diferencijacije stanica, stvarajući heterocite koje im omogućuju fiksaciju N_2 . Nadalje ove filamentozne cijanobakterije mogu razviti akinete koje im omogućuju preživljavanje u nepovoljnim uvjetima (produljena razdoblja bez vode, hladnoća, nedostatak hranjivih tvari, promjena pH). Akinete su obično veće od vegetativnih stanica i sadržavaju veliku količinu pohranjenih hranjivih tvari vidljivih kao granule (Kaplan-Levy i sur., 2010). Osim toga filamentozne cijanobakterije mogu stvarati hormogonij koji im služi u reprodukciji. Hormogonij predstavlja najčešće pokretni fragment trihoma oslobođen od nepokretnog roditeljskog trihoma. Oslobođanje hormogonija ili fragmentacija može se odvijati na području nekridija (mrtvih stanica) koje se pojavljuju kod nekih vrsta (npr. *Lyngbya aestuarii*, *Oscillatoria princeps*) (Kothari, Vaughn i Garcia-Pichel, 2013). Nova istraživanja ističu i predlažu novu reviziju klasifikacije na osnovi taksonomije korištenjem polifaznog pristupa. Pri čemu se obuhvaćaju molekularni, stanični, ekološki i morfološki podaci s ciljem postizanja boljih i objektivnih zaključaka o srodstvenim odnosima među vrstama (Dvorak i sur., 2017; Komarek i sur., 2014).

1.2. Staništa

Do 2013. godine opisano je 2,698 vrsta cijanobakterija, a pomoću „Gompertz“ modela njihova brojnost procjenjuje se na 6,280 vrsta (Nabout i sur., 2013). Cijanobakterije su jedna od najraznolikijih i široko rasprostranjenih organizama koji su evoluirali tijekom ranog

prekambrijskog razdoblja. Tijekom tog dugog postojanja kolonizirale su gotovo sva slatkovodna, morska i kopnena staništa. Zahvaljujući fleksibilnom metabolizmu, mnoge cijanobakterije pojavljuju se u ekstremnim staništima u kojima život mnogih drugih organizama nije zamisliv zbog biotičkih i abiotičkih uvjeta koji u takvim staništima prevladavaju. U područjima kao što su pustinje, geotermalni izvori (do oko 70 ° C), hipersalina jezera, arktičke doline pronađene su mnoge vrste cijanobakterija koje najčešće preživljavaju u konzorcijima s drugim algama i bakterijama (Komárek i Johansen, 2015a).

1.2.1. Vodena staništa

Cijanobakterije su neizostavan i vrlo bitan dio fitoplanktonskih zajednica oceana, mora, estuarija, rijeka i jezera. One imaju vrlo značajnu ulogu u morskom ciklusu ugljika i dušika. Nedostatak dušika u eufotičnoj zoni obuhvaća velikim djelom sve svjetske oceane, prema tome planktonske cijanobakterije s mogućnošću fiksiranja dušika učinkovito osvajaju takve ekološke niše (Bristow i sur., 2017). Površinska cvjetanja rodova *Trichodesmium* i *Richelia* mogu obuhvatiti površinu od nekoliko tisuća kilometara kvadratnih i to u oligotrofnim vodama gdje je dostupnost nutrijenata svedena na minimum. S druge strane postoje cijanobakterije veličine od 5 - 20 µm (nanoplankton) i manje od 5 µm (pikoplankton npr. *Synechococcus*, *Synechocystis* i *Prochlorococcus*) koje ne mogu fiksirati dušik, ali odlično rastu u dubljim dijelovima pri lošijem osvjetljenju gdje su im u konačnici osigurane potrebe za dušikom i ostalim nutrijentima (Paerl, 2013). Mogućnost regulacije plovnosti pomoću plinskih vakuola te utjecaj klimatskih i meteoroloških uvjeta koji utječu na stratifikaciju i miješanje vodenih sustava, glavni su razlozi za pojavnost površinskih cvjetanja cijanobakterija. Takva površinska cvjetanja najčešće utječu negativno na vodene ekosustave, druge organizme i ljudsko zdravlje zbog povećanog trošenja kisika u zonama cvjetanja, i stvaranja toksičnih sekundarnih metabolita (cijanotoksina) (Paerl i Otten, 2013). Evolucija različitih fizioloških, morfoloških i ekoloških strategija omogućile su cijanobakterijama da u ovakvim staništima bolje optimiziraju mogućnost fiksacije dušika, sekvestracije nutrijenata i fotosinteze.

1.2.2. Kopnena staništa

Iako cijanobakterije najčešće povezujemo s vodenim staništima one obitavaju i u različitim tipovima tala, bilo ispod ili iznad površine samog tla. Kako i u vodenim staništima tako i u mnogim tlima cijanobakterije predstavljaju važnu komponentu. Veliku brojnost vrsta možemo pronaći u područjima koja su vlažna, odnosno nalaze se više ili manje pod vodom. Među najvažnijim okolišnim faktorima koji utječu na pojavnost i brojnost vrsta u tlu su

dostupnost svjetla, pH, količina vode, prisutnost dušikovih spojeva i prisutnost pesticida (Whitton, 2007).

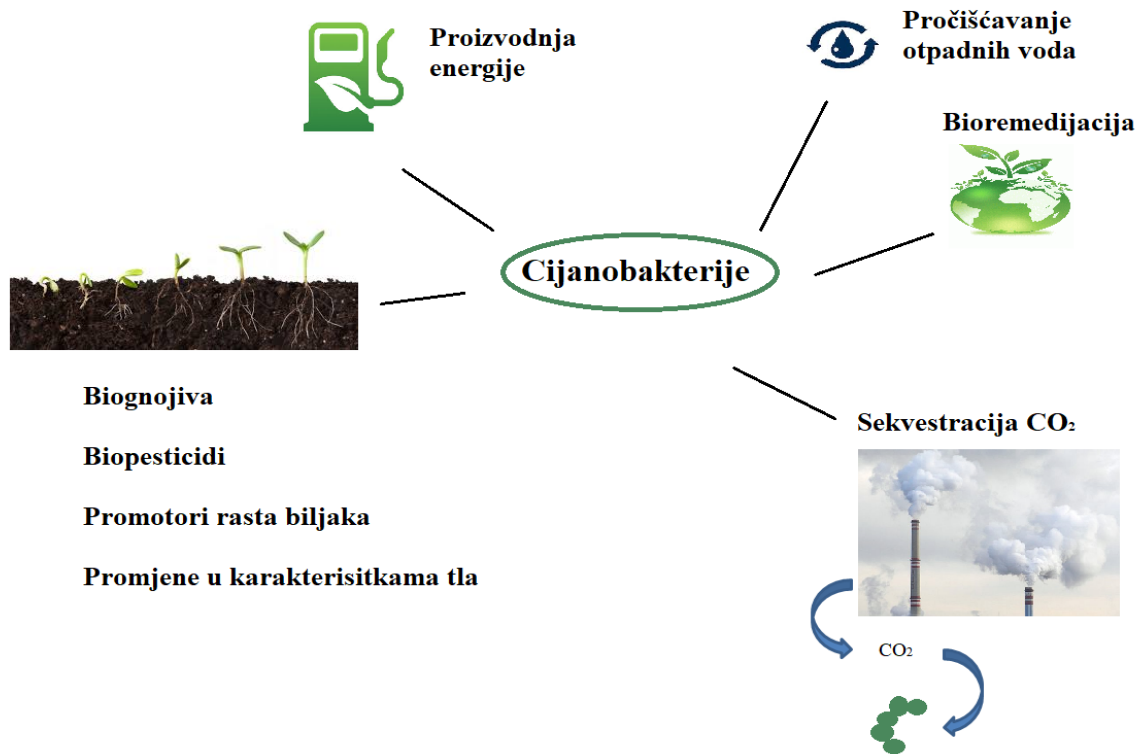
Mnoge terestričke vrste imaju plašt ili sluzavi omotač koji se sastoji od ekstracelularnih polisaharida (EPS). EPS imaju adhezivna svojstva kojima agregiraju čestice tla te se cijanobakterije na tlu mogu najčešće naći u obliku površinskog obraštaja ili kore. Takva adhezivna svojstva smanjuju eroziju (Sepehr i sur., 2019). Obraštaji su tamnijeg obojenja zbog prisutnosti smeđeg pigmenta scitonemina. Scitonemin je dimerni indol fenolni pigment, nalazi se u omotačima mnogih vrsta cijanobakterija i posjeduje snažna svojstva apsorpcije ultraljubičastog (UV) zračenja. Njegova apsorpcija omogućava cijanobakterijama preživljavanje pri velikoj insolaciji bez negativnog utjecaja na fotosintezu (Jones i sur., 2011). Razvoj tolerancije na sušu je bitno svojstvo cijanobakterija. Ipak, reaktivacija neto fotosinteze nakon razdoblja suše uvelike ovisi o prisutnosti vode (Büdel, 2011). Rodovi koji mogu preživjeti duže periode bez vode su *Anabena*, *Aulosira*, *Cylindrospermum*, *Fischerrella*, *Lyngbya*, *Nostoc*, *Plectonema* i *Stigonema* (Whitton, 2007). Cijanobakterije ovakve periode preživljavaju nakupljanjem visokih koncentracija šećera (trehaloza, sukroza i glukozilglicerola) koji se ponašaju kao osmoprotektanti, a pri čemu nema negativnog utjecaja na enzime i metaboličku aktivnost (Büdel, 2011). Istraživanja pokazuju kako cijanobakterijama uglavnom odgovaraju neutralna i bazična tla, padom pH ispod 6 pojava cijanobakterijskih vrsta opada dok je ispod pH 5 uočena potpuna odsutnost (Dooley i Houghton, 1973).

Procjenjuje se da bi do kraja 2050. godine broj stanovništva trebao preći 9.6 milijardi. Zbog toga bi se proizvodnja usjeva trebala povećati za 50% (Pathak i sur., 2018). Mnoge poljoprivredne površine su već sada pod velikim djelovanjem pesticida kako bi se smanjilo djelovanje štetnika i održala visoka stopa prinosa. Pesticidi su toksične tvari, a s obzirom na ciljano skupinu djelovanja možemo ih podijeliti na herbicide, insekticide, fungicide, rodenticide i dr. (web 1.). Kako pesticidi i njihovi ostaci postaju sve prisutni u okolišu, oni dolaze u kontakt i s drugim ne ciljanim organizmima čineći dodatnu štetu svim sastavnim organizmima tla što u konačnici dovodi do promjena u ekosustavima tla. Poznato je da korištenje pesticida utječe ne promjene u sastavu mikrobnih zajednica (Petric i sur., 2016; Petrić i sur., 2011). Smanjena stopa nitrifikacije, denitrifikacije, oksidacije metana i veća osjetljivost mikrobne zajednice samo su jedna od negativnih aspekata koje su rezultat smanjenja mikrobne bioraznolikosti (Feld i sur., 2015). Terestričke cijanobakterije su također prepoznate kao važne sastavnice mikroflore tla koje utječu na plodnost tla (McCann i Roy

Cullimore, 1979). S druge strane utvrđen je širok spektar djelovanja herbicida, insekticida i fungicida na cijanobakterije tla, zbog čega se cijanobakterije svrstavaju u neciljne organizme koje je potrebno pratiti (Padhy, 1985; Pipe, 1992).

1.3. Primjena cijanobakterija

Cijanobakterije su posljednjih godina privukle veliku pažnju zbog svojih mogućih primjena u biotehnologiji. Širok spektar biološki aktivnih spojeva, prepoznati su kao potencijalni biopesticidi, biognojiva, stimulatori rasta biljaka koji bi mogli biti važan dio u razvoju ekološki prihvatljivih i održivih poljoprivrednih praksi. Osim toga biomasa se može koristiti za proizvodnju energije, a pojedine vrste cijanobakterija pokazuju obećavajuća svojstva u uklanjanju različitih onečišćivača iz industrijskih postrojenja (Yadav i sur., 2017) (Slika 2.).



Slika 2. Mogućnosti primjene cijanobakterija (modificirano i preuzeto iz Yadav i sur., 2017)

1.3.1 Bioenergija

Prednost proizvodnje cijanobakterijske biomase kao izvora energije je sekvestracija ugljika. Za svoj rast cijanobakterije fotosintezom uklanjaju CO₂ iz atmosfere te se pritisak

koncentracije CO₂ na okoliš smanjuje. Prenamjenom biomase dobivamo korisne proizvode kao što su etanol, vodik, metan. Izgaranjem sirove biomase može se dobiti toplinska energija i proizvesti električna. Iako se na taj način CO₂ ponovno otpušta u atmosferu, pritisak na okoliš je manji zbog zatvorenog ciklusa ugljika. Za razliku od ostalih kopnenih biljaka koje također sudjeluju u sekvestraciji ugljika, cijanobakterije su pokazale 10-50 posto bržu stopu fiksacije CO₂ (Singh i sur., 2016). Istraživanja pokazuju da dovođenje dimnog plina u uzgojne sustave može povećati fiksaciju CO₂, te povećati količinu biomase kod vrsta *Synechococcus aquatilis*, *Anabaena* sp. i *Spirulina* sp. (Yadav i sur., 2017). Cijanobakterije su u stanju pretvoriti 10% sunčeve energije u biomasu dok druge alge i poljoprivredne kulture (kukuruz, šećerna trska) mogu pretvoriti tek 1 do 5% (Singh i sur., 2017). Cijanobakterije sadrže znatne količine lipida; primarno locirane u membranama tilakoida. Genetski inženjering metaboličkih puteva cijanobakterija unazad deset godina doveo je do proizvodnje različitih industrijski korisnih tvari kao što su 2,3-butandiol, aceton 1-butanol, etilen, etanol, masne kiseline, izobutiraldehid, izobutanol, 2-metil-1-butanol i izopren (Nozzi i sur., 2013).

1.3.2. Prirodna gnojiva

Moderna poljoprivreda u velikoj mjeri ovisi o gnojivima kojima se potiču prinosi usjeva kako bi se postigla ekonomska isplativost i zadovoljila potražnja. Prekomjerno korištenje anorganskih gnojiva ima ozbiljan utjecaj na ljudsko zdravlje i okoliš. Zbog toga se istraživanja gnojiva usredotočuju na razvoj mikroorganizama kao ekološki prihvatljivog tipa gnojiva koji predstavlja put prema održivoj poljoprivredi. Poboljšana solubilizacija i mobilnost hranjivih tvari, zatim mogućnost kompleksiranja teških metala i ksenobiotika čime ograničavaju njihovu mobilnost i transport u biljke, poboljšanje fizikalno-kemijskih parametara tla, mineralizacija jednostavnijih organskih molekula kao što su aminokiseline samo su neke od značajki zbog kojih se cijanobakterije smatraju poželjnim kandidatima u proizvodnji prirodnih gnojiva (Chamizo i sur., 2018).

Kod tretiranja poljoprivrednih površina riže najčešće se koriste konzorciji dviju ili više autohtonih cijanobakterija zbog povećanog kapaciteta fiksacije dušika. Fiksirani dušik može se osloboditi u obliku amonijaka, polipeptida, slobodnih aminokiselina, vitamina i tvari sličnih auksinu, bilo sekrecijom ili mikrobnom razgradnjom nakon stanične smrti. Zbog toga neke cijanobakterije kao što su *Nostoc* sp, *Anabaena* sp, *Cylindospermum* sp, *Scytonema*

hofmanni pokazuju sposobnost stvaranja fitohormona (giberlini, indol-3-oacetna kiselina) promovirajući rast biljaka (Singh i sur., 2016; Win i sur., 2018).

Osim fiksacije dušika, cijanobakterije također doprinose mobilizaciji anorganskog fosfata putem izlučivanja organskih kiselina i izvanstaničnih fosfataza (Singh i sur., 2017). Cijanobakterije otapaju i mobiliziraju netopive organske fosfate i poboljšavaju dostupnost fosfora biljkama. Uz sve navedeno cijanobakterije sekrecijom ekstracelularnih polisaharida utječu i na agregaciju čestica tla što omogućava bolju akumulaciju organske tvari i povećavaju zadržavanje vode u tlu. Primjena bioloških gnojiva na bazi cijanobakterija mogla bi zadovoljiti potrebe održive poljoprivrede imajući u vidu zdrav okoliš i ekonomsku profitabilnost (Chamizo i sur., 2018).

1.3.3. Prirodni pesticidi

Cijanobakterije su poznate po cijanotoksinima, no takvi se spojevi ne moraju nužno negativno karakterizirati. Cijanotoksini predstavljaju širok spektar različitih bioaktivnih tvari koje mogu služiti kao inhibitori rasta drugih mikroorganizama kao što su bakterije, gljivice, virusi pa čak i nekih viših organizama kao beskralježnjaci, ribe, rakovi, ptice i sisavci (Singh i sur., 2017). Biološki aktivne supstance cijanobakterija po svom kemijskom sastavu mogu biti poliketidi, amidi, alkaloidi, masne kiseline, indoli i lipopeptidi. Stoga postoji potencijal njihovog korištenja u poljoprivredi kao insekticidi, herbicidi, algicidi i fungicidi. Anatoksin, mikrocistin i cilindrospermopsin su dobro proučeni cijanotoksini koje proizvode rodovi *Cylindrospermopsis* i *Microcystis*. Istraživanja tih toksina na larvama komaraca pokazuju smrtnost veću od 50% (Berry i sur., 2008). Najbolja fungicidna svojstva ima vrsta *Nostoc muscorum* koji inhibira in vitro rast gljivičnih biljnih patogenata kao što je *Sclerotinia sclerotiorum* (bijela trulež) i *Rhizoctonia solani* (smeđa trulež korijena), te cijanobakterija *Fischerella muscicola* koja proizvodi fišerelin. Fišerelin pokazuje antifungalnu aktivnost protiv nekoliko biljnih patogenih gljiva kao što su *Uromyces appendiculatus* (smeđa hrđa), *Erysiphe graminis* (pepelnica), *Phytophthora infestans* i *Pyricularia oryzae* (Yadav i sur., 2017).

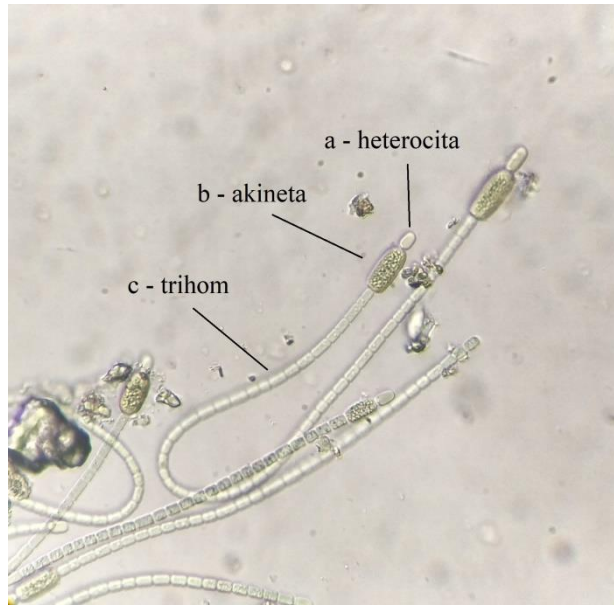
1.4. Značajke roda *Cylindrospermum*

Taksonomski, rod *Cylindrospermum* Kützing ex Bornet i Flahault (1886) pripada redu Nostocales (Tablica 1.). Unutar roda nalaze se 52 vrste koje su opisane kao bentoski, epifitski i epilitski organizmi pronađeni u vodenim i terestričkim staništima (slatkovodne vode, pustinje, močvarna tla, rižina polja) (web 2., Komárek i Johansen, 2015b; Shariatmadari i

Riahi, 2012). To su filamentozne cijanobakterije koje formiraju akinete i heterocite, zbog toga mogu preživjeti duža razdoblja nepovoljnih uvjeta te fiksirati atmosferski dušik. Filamenti (Slika 3.) su blago zakrivljeni ili nepravilno namotani, obično su cilindrični cijelom svojom dužinom. Filamenti su obavijeni finom, bezbojnom, homogenom i difuznom sluzavom ovojnicom. Trihomi su simetrični, obično blago suženi na dijelovima gdje se stanične stijenke dviju stanica dodiruju (a). Stanice su cilindrične, nešto veće dužine u odnosu na širinu, blijedog ili svijetloplavkastozelenog ili sivkastog obojenja, ponekad prisutna granuliranost stanica. Heterocite se isključivo nalaze samo na terminalnim dijelovima filamenata, te se razvijaju iz krajnjih stanica. Oblik heterocita varira od elipsoidnog, ovoidnog ili stožastog. Akinete su elipsoidne, razvijaju se samo u neposrednoj blizini heterocita na oba kraja filameta, ovisno od vrste do vrste akinete mogu biti solitarne ili u redovima do 7 komada (Komárek i Johansen, 2015a). Dioba stanica javlja se kroz cijeli trihom, a razmnožavanje se odvija pomoću akineta ili fragmentacijom trihoma u hormogonij. U mnogim radovima ističe se potencijalna opasnost za ekološke sustave jer je potvrđeno da se unutar roda nalaze vrste koje sintetiziraju toksičnu tvar anatoksin-a koji se ponaša kao nervni otrov, te hlapljive organske spojeve kao što je geosmin koji rezultira neugodnim mirisom i može utjecati na kvalitetu života (Humbert, 2009; S Dow i K Swoboda, 2007; Sivonen i Jussi, 2015).

Tablica 1. Prikaz taksonomije roda *Cylindrospermum* (web 3.)

Carstvo	Bacteria
Kraljevstvo	Eubacteria
Koljeno	Cyanobacteria
Razred	Cyanophyceae
Red	Nostocales
Porodica	Nostocaceae
Rod	<i>Cylindrospermum</i>



Slika 3. Mikroskopski prikaz filameta *Cylindrospermum* sp. s karakterističnim dijelovima (a - heterocita, b - akineta, c - trihom). Fotografirao Luka Ivanković (7.5.2019.)

1.5. Cilj

Provjeriti utjecaj propikonazola i klorantraniliprola na rast cijanobakterije. Utvrditi mogućnost uzgoja cijanobakterije na umjetnom tlu.

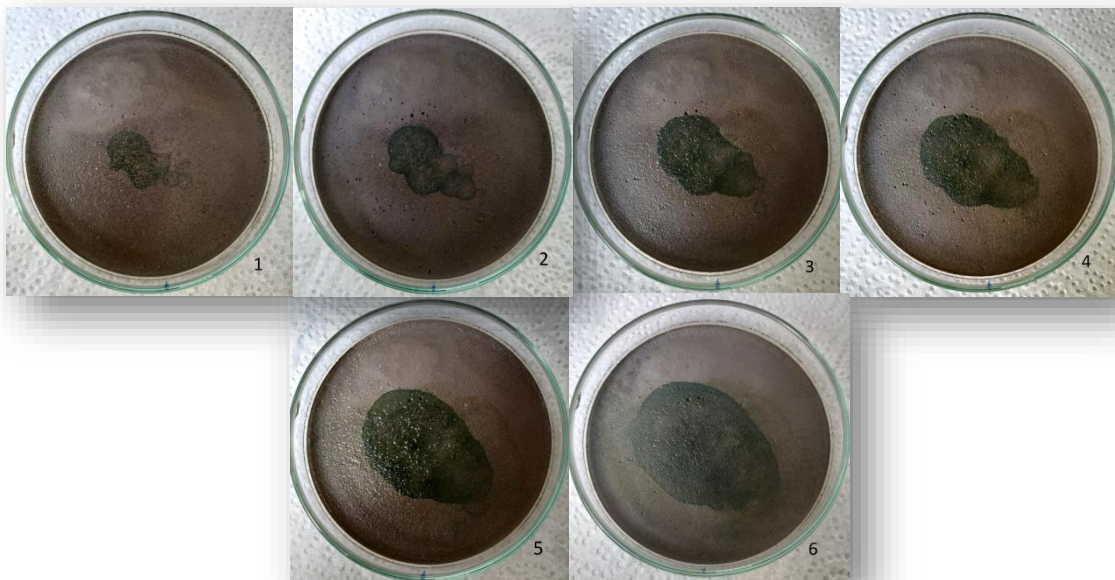
2. Materijali i metode

2.1. Priprema eksperimenta i izolacija obraštaja

Uzet je uzorak površinskog dijela (do 30 cm) glejnog tla u parku prirode Kopački rit. Uzorak tla je transportiran u laboratorij na Odjel za Biologiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. U prethodno steriliziranu petrijevku zdjelicu odvojili su se manji grumeni tla te se cijela petrijevka zalila sa destiliranom vodom pomoću boce s raspršivačem. Tlo je bilo pri konstantnom osvjetljenju, te je zalijevano po potrebi. Nakon tjedan dana primijećen je makroskopski zelenkasti obraštaj za kojeg je utvrđeno da se sastoji od cijanobakterije *Cylindrospermum* sp.

U eksperimentima su korištena dva tipa tla, glejno tlo i umjetno tlo koje se sastoji od 10% treseta, 20% gline (udio kaolinita veći od 30%), 69% industrijskog pijeska i 1 % čini (CaCO_3). Dio uzorkovanog tla je stavljen u sušionik pri 55 ± 5 °C preko noći, zatim je osušeno tlo usitnjeno u tarioniku, a pomoću sita su se odvojile krupnije nečistoće (kamenčići, korijenje...) i dobila praškasta struktura tla.

U staklenu petrijevku dodano je 4 g obrađenog glejnog tla, petrijevke sa tlom su sterilizirane u autoklavu te je dodano 4 ml destilirane sterline vode (dsH_2O). Zatim je dio cijanobakterijskog obraštaja izoliran iz matičnog supstrata, ispran u dsH_2O i presađen u sterlinu petrijevku nakon čega se pratio rast (Slika 4.).



Slika 4. Prikaz rasta cijanobakterijskog obraštaja po danima. Fotografirao Luka Ivanković (20.6.2019.)

2.2. Standardizacija pripreme cijanobakterijskog inokulata

Nakon 20-ak dana, kada je cijanobakterijski obraštaj prekrrio cijelu površinu tla unutar staklene petrijevke slijedi odvajanje, ispiranje i usitnjavanje obraštaja. Odvajanje se vrši pomoću sterilne špatule i dio po dio „krpastog“ materijala odvaja od površine tla i stavlja u petrijevku sa dsH₂O. Kroz tri petrijevke se obraštaj ispere od čestica (Slika 5.). Zatim se na analitičkoj vagi odvažuje masa potrebna za daljnji korak. U prvom eksperimentu odvagano je 0.78 g cijanobakterijskog materijala, a u drugom 0.2 g. Nakon toga slijedi usitnjavanje materijala pomoću sita i staklenog tučka i dodavanje 175 ml dsH₂O u staklenu čašu kako bi se dobila homogena suspenzija cijanobakterijskog inokulata.



Slika 5. Ispiranje cijanobakterijskog materijala. Fotografirao Luka Ivanković (12.6.2019)

Iz suspenzije cijanobakterijskog materijala odpipetirano je 14 ml u deset 15 ml falkonica, zatim se u svaku falkonicu dodavao odgovarajuća količina pesticida s obzirom na tretmane koji su se koristili u eksperimentu. U falkonicama su tada priređeni alikvoti s jednakom količinom cijanobakterijskog materijala i odgovarajućom količinom pesticida. Kod postupka pipetiranja jednolično je dodavano u svaku falkonicu (3 ml, 3 ml, 3 ml, 3 ml, 1 ml, 1 ml), te je između svakog pipetiranja početna suspenzija promiješana, a pipetiranje je obavljeno iz jednakog stupca suspenzije.

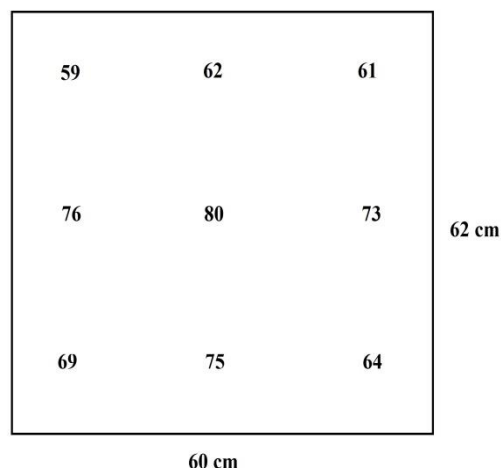
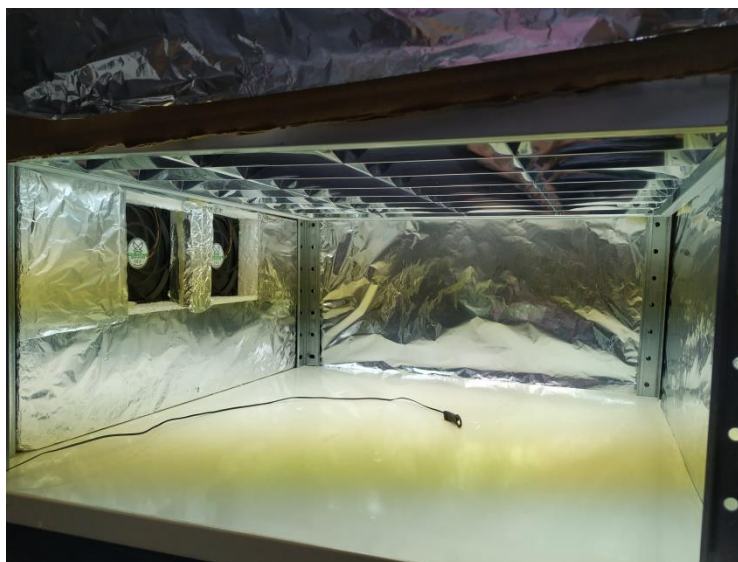
2.3. Uzgojni uvjeti

Rast cijanobakterije odvija se u polipropilenskim posudama u koje je prethodno dodano 1 g obrađenog glejnog tla ili umjetnog tla. Polipropilenske posude postavljene su između dvije staklene ploče te se formira jedna uzgojna „ploča“ (Slika 6.). Na rubnim dijelovima „ploče“ nalaze se manji polipropilenski čepovi u koje se dodaje voda kako bi se isparavanje vode smanjilo i povećala vlaga unutar „ploče“.



Slika 6. Slika uzgojne „ploče“. Fotografirao Luka Ivanković (23.5.2019)

Nakon što se dodaju odgovarajući tretmani u posude, „ploče“ se stavljaju u priručni fotobioreaktor. Dimenzije fotobioreaktora su 62x26x60 cm (Slika 7.). Gornja ploha fotobioreaktora sastoji se od 4 neonske cijevi, a bočne stranice su obložene alufolijom te su s jedne bočne strane ugrađena 2 ventilatora od 120 mm (Scythe, model SY1212SL12L, Kina) kako bi se smanjilo zagrijavanje unutrašnjosti. Temperatura unutar fotobioreaktora je mjerena pomoću digitalnog termometra (Auriol) te je iznosila 25 ± 2 °C , a intenzitet svjetlosti varirao je od 59 do 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ s obzirom na položaj izmjerenih točaka (Slika 7.). Intenzitet svjetlosti izmjeren je pomoću Quantitherm senzora (Hasatech instruments, King's Lynn, Ujedinjeno Kraljevstvo).



Slika 7. Lijevo, unutrašnjost priručnog fotobioreaktora, desno tlocrt sa vrijednostima intenziteta svjetlosti izmjerenih točaka (mjerna jedinica, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Fotografirao Luka Ivanković (20.7.2019)

2.4. Fizikalna i kemijska svojstva pesticida

U ovome radu korištena su dva komercijalna pesticida (Tablica 2.)

Tablica 2. Popis pesticida korištenih u radu

Komercijalni pesticid	Kategorija proizvoda	Aktivni sastojak	Koncentracija aktivnog sastojka
Bumper 25 ec (Chromos agro d.o.o Zagreb)	Fungicid	Propikonazol	250 g/L
Coragen 20 sc (Agro chem d.o.o Zagreb)	Insekticid	Klorantraniliprol	200 g/L

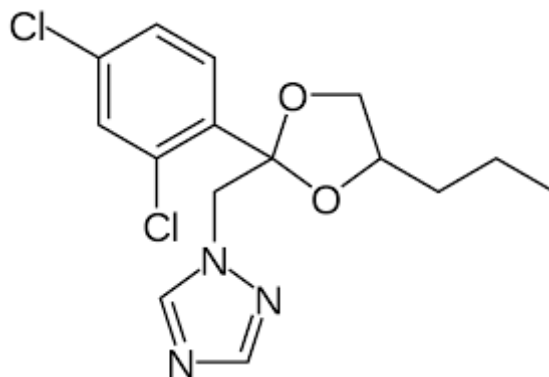
2.4.1. Propikonazol

Propikonazol je triazolni fungicid koji pripada demetilacijsko inhibitornim fungicidima. Inhibira biosintezu ergosterola što utječe na normalno odvijanje membranskih procesa što rezultira inhibicijom rasta gljivica (Calonne i sur., 2010).

Kemijska formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2$

Kemijski naziv prema IUPAC-u: 1-[[2-(2,4-diklorofenil)-4-propil-1,3-dioksolan-2-il]metil]-1,2,4-triazol

Strukturna formula:



Molekularna masa: 342,2 g/mol

Topivost u vodi: 100 mg/L (25°C)

CAS broj: 60207-90-1

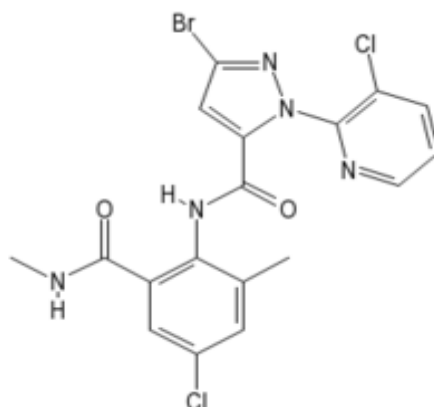
2.4.2. Klorantraniliprol

Klorantraniliprol je diamidni insekticid koji aktivira receptore rijanodina kod insekata unutar sarkoplazmatskog retikuluma što rezultira oštećenom regulacijom mišićne kontrakcije (Sattelle, Cordova i Cheek, 2008). Kanali receptora za rijanodin reguliraju oslobađanje unutarnjih zaliha kalcija i važni su u kontrakciji mišića. Trajno oslobađanje razine kalcija unutar citosola dovodi do kontrakcije mišića, paralize i eventualne smrti organizma.

Kemijska formula: $C_{18}H_{14}BrCl_2N_5O_2$

Kemijski naziv prema IUPAC-u: 5-bromo-N-[4-kloro-2-metil-6-(metilkarbamoil)fenil]-2-(3-kloropiridin-2-il)pirazol-3-karboksamid

Strukturna formula:



Molekularna masa: 483,15 g/mol

Topivost u vodi: 0.9-1.0 mg/L (20°C pH = 7)

CAS broj: 500008-45-7

2.5. Dizajn eksperimenta

Pripremljeni homogenizirani cijanobakterijski materijal u alikvotima se miješa s određenom koncentracijom pesticida. U eksperimentu su korišteni klorantraniliprol (Coragen - CC_n) i propikonazol (Bumper - BC_n) u četiri koncentracije (Tablica 3). Priređene koncentracije su C1 – 5 x manja koncentracija od preporučene uporabe, C2 -2 x manja koncentracija od preporučene uporabe, C3 – preporučena koncentracija, C4 - 5 x veća koncentracija od preporučene uporabe. Uz to je pripremljena pozitivna (KOp) i negativna kontrola (KO). Negativna kontrola je prije inokulacije sterilizirana u autoklavu. Uzgojne „ploče“ s polipropilenskim posudama i tlom se neposredno prije inokuliranja steriliziraju u autoklavu, a zatim se od svakog priređenog tretmana dodaje po 1 ml cijanobakterijske suspenzije unutar laminara. Svi tretmani priređeni su u triplikatu za svaki tip tla. Razvoj se odvija 7 dana u fotobioreaktoru (fotoperiod dan/noć, 16h/8h), a s obzirom da je intenzitet osvjetljenja različit, svaki se dan „ploče“ pomiču za jedno mjesto u desno kako bi se ujednačio intenzitet osvjetljenja. Nakon 7 dana mjere se četiri parametra; koncentracija klorofila a u tlu, mikrobiološka aktivnost (FDA test), sposobnost stvaranja biofilma (Kristal violet test) i ukupni ugljikohidrati u tlu.

Tablica 3. Priređene koncentracije pesticida

Naziv pesticida	Coragen 20sc	Bumper 25ec
C1	0,008 $\mu\text{g ml}^{-1}$	0,0025 $\mu\text{g ml}^{-1}$
C2	0,02 $\mu\text{g ml}^{-1}$	0,0625 $\mu\text{g ml}^{-1}$
C3	0,04 $\mu\text{g ml}^{-1}$	0,125 $\mu\text{g ml}^{-1}$
C4	0,2 $\mu\text{g ml}^{-1}$	0,625 $\mu\text{g ml}^{-1}$

2.6. Koncentracije klorofila a u tlu

Pribor i kemikalije koje su potrebne za određivanje koncentracije klorofila a u tlu:

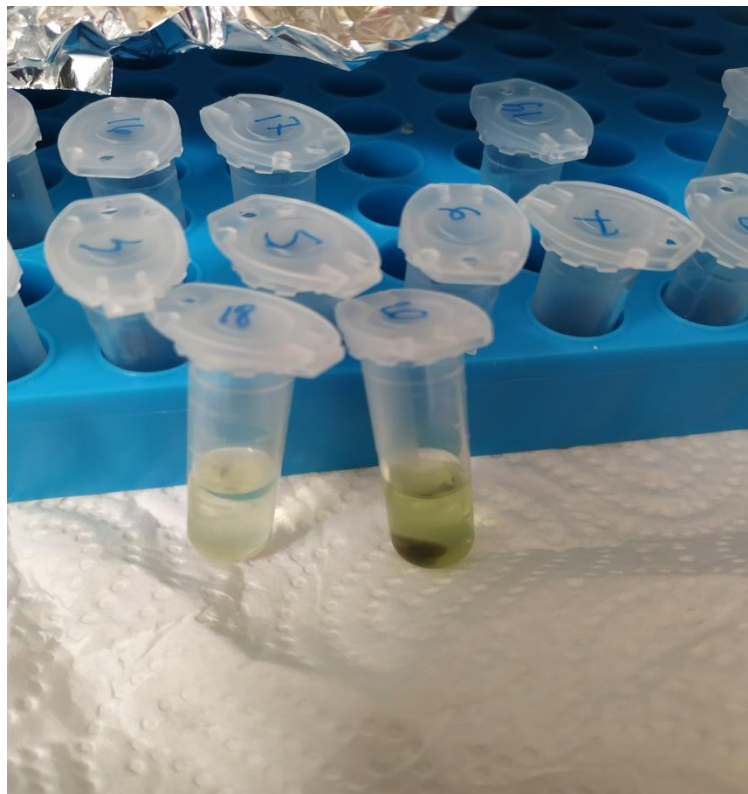
- falkonice volumena 15 ml
- etanol (96 %- tni)
- mikro epruvete volumena 2 ml
- mikropipete od 1 ml,
- nastavci za mikropipete
- CaCO_3
- vodena kupelj
- tresilica
- centrifuga
- rukavice
- 2 kivete
- Spektrofotometar

Ostatak osušenog tla iz polipropilenskih posuda se usitni pomoću špatule, odvaži i stavi u 15 ml falkonice. Nakon toga se u čašu doda 60 ml 96%-tnog etanola i na vrh špatule CaCO_3 kako bi se povećao pH i spriječila prijevremena degradacija klorofila. S obzirom na masu uzorka tla doda se određena količina etanola u omjeru 1:2 kako bi ekstrakcija bila ujednačena u svim uzorcima. Uzorci u falkonicama se stavljaju u vodenu kupelj na 80°C i 15 min te još 5 min dok traje ključanje. Poslije se uzorke ostavi 10 min na sobnoj temperaturi da se ohlade, a onda na tresilicu na 20 min i 250 oum. Stativ sa uzorcima treba prekriti sa alufolijom kako bi se spriječila degradacija klorofila. Zatim se uzorci otpipetiraju u mikro epruvete (Slika 8.) i slijedi centrifugiranje 6000 G, 5 min. Absorbanca supernatanta se mjeri pri 665 nm (slijepa proba je etanol + CaCO_3).

Nadalje, za utvrđivanje koncentracije klorofila a u uzorku koristimo formulu (Castle i sur., 2011, Ritchie, 2006):

$$\text{Klorofil a} = (E_{\lambda} \times (\text{Abs}_{665}) \times V) / (\text{g soil}^{-1}) \times L$$

E_{λ} je koeficijent u spektrofotometrijskim jednadžbama za izračunavanje koncentracije klorofila a kod cijanobakterija. E_{λ} iznosi 11.4062. Abs_{665} je absorbanca izmjenog uzorka. V je volumen otapala koji smo koristili (ml), g soil je masa uzorka iz kojeg smo ekstrahirali klorofil (g) i L je duljina puta svjetla u korištenoj kiveti (mm).



Slika 8. Mikro epruvete s ekstrahiranim klorofilom u etanolu. Fotografirao Luka Ivanković (14.5.2019.).

2.7. Sposobnost stvaranja biofilma (kristal violet test, eng. biofilm forming ability-BFA)

Pribor i kemikalije koje su potrebne za BFA test:

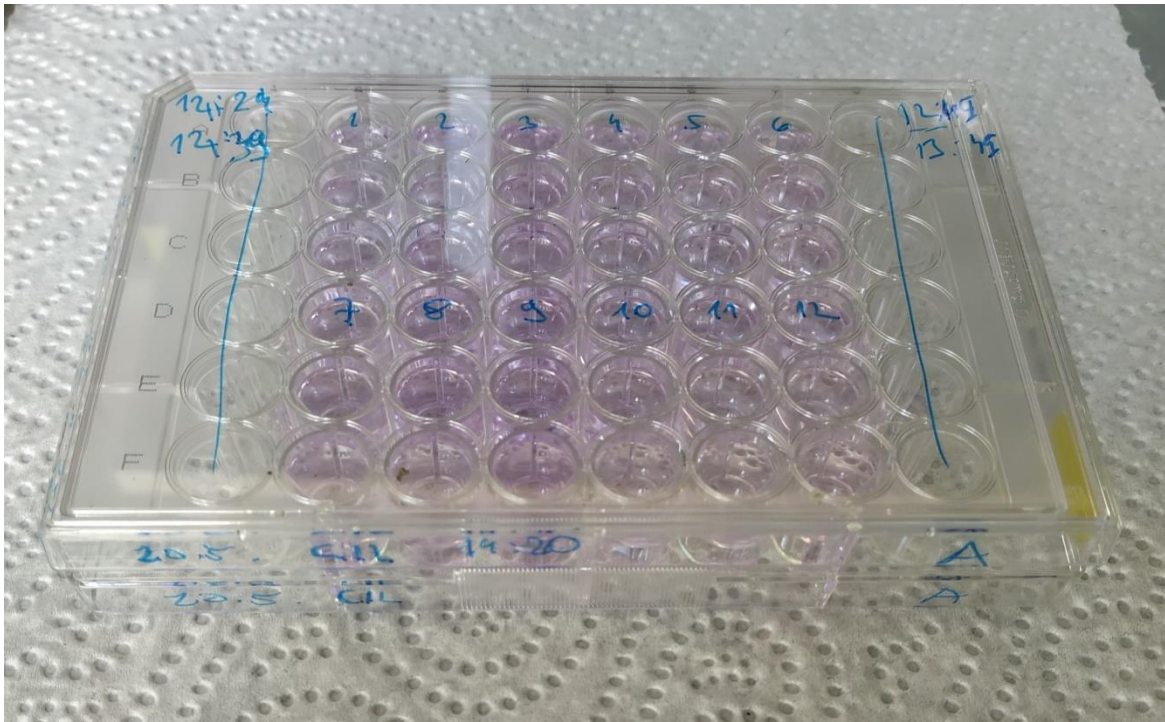
- 300 μl suspenzije tla
- analitička vaga
- upaljač
- mikro epruvete volumena 2 ml

- špatula
- 48 - well plate (mikropločice)
- mikropipete od 1 ml, 50 μ l,
- nastavci za mikropipete
- multistep pipeta
- bunsenov plamenik
- glukoza (400 mg/ml)
- bujon
- M63 medij
- $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (1 M)
- sterilna destilirana voda
- kristal violet boja
- etanol (96 %- tni)
- rukavice
- 2 kivete
- spektrofotometar

Nakon 7 dana razvoja, u sterline mikro epruvete (2 ml) odvaže se 305 ± 5 mg tla iz posude, između svakog uzimanja uzorka, špatula se očisti 96% - tni etanolom, te prođe kroz plamen kako bi se spriječila kontaminacija. Zatim se doda 500 μ l dsH_2O . Vorteksiranje 5 sec. U 48 - well plate (mikropločice) dodajemo po 100 μ l hranjivog medija (300 μ l glukoza + 600 μ l bujon + 12 ml M63 + 120 μ l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$). Od suspenzije 500 μ l uzima se po 100 μ l te se nasaduje u 48 - well plate (mikropločice). Nakon nasadivanja, mikropločice se ostave 24 sata na inkubaciji na sobnoj temperaturi (25°C). Nakon 24 sati inkubacije, uzorci iz mikropločica se isperu da se višak stanica koje nisu pričvršćene na stijenke jažice odstrane. Ispiranje se odvija tako da se sukcesivno u 3 prethodno napunjene posude s vodom urone pod kosinom i isprazne naglim okretanjem mikropločice, zatim se isprane jažice bojaju sa po 225 μ l boje, kristal violet. Bojanje traje 15 minuta. Tijekom tih 15 minuta, ukoliko je došlo do formiranja biofilma na stijenkama jažica, dolazi do njegova bojanja. Nakon 15 minuta višak boje u mikropločicama se ispere isto kao u prethodnom koraku.

Nakon sušenja u jažice mikropločica dodaje se 1 ml 96 % etanola (Slika 9.). U ovom koraku dolazi do odbojavanja stijeni jažica, na kojima se tijekom inkubacije od 24 sati, trebao formirati biofilm. Odbojavanje traje 1 sat. Jače obojenje etanola u jažicama predstavlja veću

količinu razvijenog biofilma na stijenkama. Uzorak iz jažica se otpipetira u kivete i mjeri se absorbanca pri 588 nm pomoću spektrofotometra (slijepa proba je čisti 96 % etanol).



Slika 9. 48 - well plate (mikropločica, odbojavanje jažica). Fotografirao Luka Ivanković (13.5.2019.)

2.8. Mikrobiološka aktivnost (FDA test - Fluorescein diacetate)

Pribor i kemikalije koje su potrebne za FDA test:

- 200 μ l suspenzije tla (aliquot od prije pripremljene suspenzije tla)
- mikro epruvete volumena 2 ml
- multistep pipeta
- mikropipete od 1 ml, 100 μ l,
- nastavci za mikropipete
- bunsenov plamenik
- rukavice
- 2 kivete
- spektrofotometar
- inkubator

- tresilica
- centrifuga
- flourescein diacetat (250 µg/ml)
- kalij-fosfatni pufer (pH = 7,5 ,70 mM)

Od početne suspenzije u mikro epruvetama ostaje 200 µl, u suspenziju tla prvo se dodaje kalij-fosfatni pufer, 800 µl, a zatim 40 µl FDA. Nakon toga slijedi vorteksiranje mikro epruveta 5 sec i inkubacija pri 30°C. Za vrijeme inkubacije od 30 min uzorci se nalaze na tresilici pri brzini od 200 rpm. Nakon 30 min reakcija se zaustavlja sa 800 µl mješavine klorofom/metanola u omjeru 1:2 i slijedi centrifugiranje od 4 minute pri 13684 x g, te mjerenje apsorbance supernatanta pri 490 nm (slijepa proba je kalij-fosfatni pufer).

Ova metoda zasniva se na hidrolizi bezbojnog FDA u žutozelenkasti flourescein. Razni enzimi kao što su proteaze, lipaze i esteraze utječu na hidrolizu FDA, stoga jače obojenje rezultat je veće mikrobiološke aktivnosti.

2.9. Ukupna količina ugljikohidrata

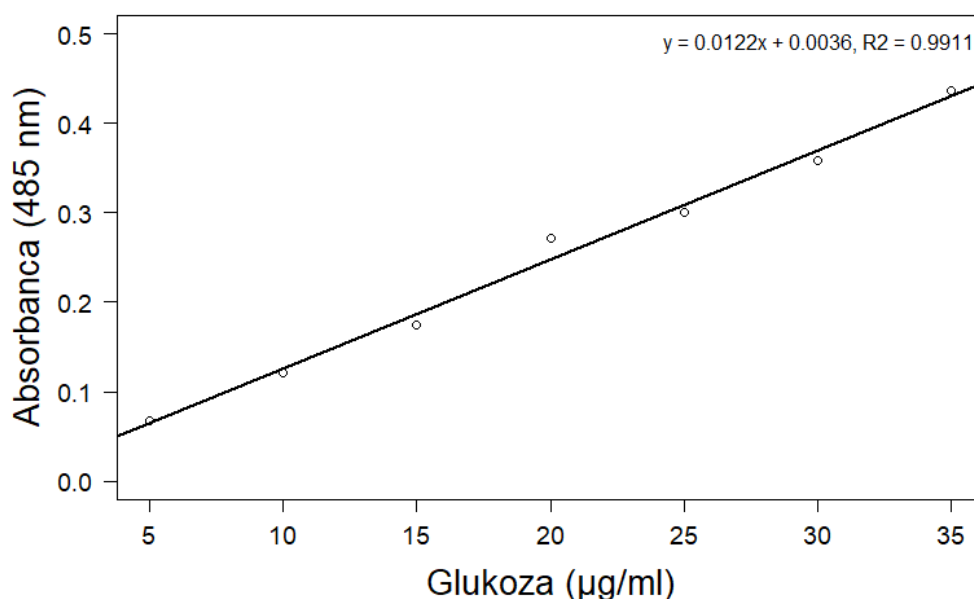
Pribor i kemikalije koje su potrebne za određivanje ukupne količine ugljikohidrata:

- 5 mg tla
- falkonice volumena 15 ml
- multistep pipeta
- mikropipete od 1 ml
- nastavci za mikropipete
- fenol (5%-tni)
- koncentrirana sulfatna kiselina (95% -tna)
- glukoza
- sterilna destilirana voda
- rukavice
- 2 kivete
- centrifuga
- spektrofotometar

Iz svakog uzorka odvaži se 5 mg tla u 15 ml falkonicu, zatim se doda 1 ml dsH₂O pa 1 ml 5%-og fenola i zatim se brzo doda 5 ml konc. sulfatne kiseline. Uzorci se u falkonicama ručno promiješaju i ostave da odstoje sat vremena na sobnoj temperaturi. Nakon sat vremena slijedi centrifugiranje 10 min pri 3000 G, te se absorbanca supernatanta uzorka mjeri pri 485 nm (slijepa proba se sastoji od 1 ml dsH₂O, 1 ml fenola i 5 ml konc. sulfatne kiseline).

Osnovno načelo ove metode je da ugljikohidrati, kada se dehidriraju u reakciji s koncentriranom sulfatnom kiselinom, stvaraju furfuralne derivate. Daljnja reakcija između furfuralnih derivata i fenola razvija smeđu boju koja se može detektirati.

Kako bi mogli usporediti absorbance mjerenih uzoraka priprema se standardna krivulja (Slika 10.). Razrjeđivanjem standardne otopine glukoze pripremljene su otopine koncentracija 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml, 25 µg/ml, 30 µg/ml, 35 µg/ml.



Slika 10. Grafički prikaz standardne krivulje

2.10. Obrada podataka

Podaci su obrađeni pomoću statističkog softvera R 3.1.4 (R Core Team 2016) pod Windows 10 operativnim sustavom. Za testiranje normalne distribucije korišten je Shapiro-Wilk test, nulta hipoteza ovog testa je, da je distribucija podataka normalna. Bartlett-ov test korišten je za testiranje homogenosti varijance uzoraka. Ukoliko su ove dvije pretpostavke

valjane, nadalje je korištena jednofaktorska analiza varijance (engl. One-way ANOVA) kako bi se utvrdilo postoji li razlika između skupina uzoraka gdje postoji samo jedna nezavisna varijabla u podacima. Nakon toga je korišten je Dunett-ov post hoc test, ako ANOVA pokaže da postoji razlika među skupinama uzoraka. Dunett-ov test predstavlja modificirani t-test koji je dizajniran za uspoređivanje svake eksperimentalne skupine sa kontrolnom skupinom.

S druge strane ukoliko Shapiro-Wilk test pokaže odstupanje od normalne distribucije, tada se za testiranje koriste neparametarski testovi, za homogenost varijance uzoraka koristi se Fligner-Killen test, a za utvrđivanje razlike među skupinama Kruskal-Wallis test, te na kraju Xin Gao post hoc testom je utvrđeno koja se skupina uzoraka statistički značajno razlikuje od kontrole. Osim toga korišten je i t-test. Grafički prikazi su također izrađeni u R-u.

3. Rezultati

Prvi eksperiment trajao je od 13. svibnja do 20. svibnja i za pripremu inokulata korišteno je 0,78 g cijanobakterijskog materijala, drugi eksperiment trajao je od 12. lipnja do 19. lipnja te je korišteno 0,2 g cijanobakterijskog materijala za pripremu inokulata. U oba eksperimenta određivali su se sljedeći parametri: koncentracija klorofila a u tlu, sposobnost stvaranja biofilma (kristal violet test) i mikrobiološka aktivnost (FDA test). Samo u prvom eksperimentu se određivala i ukupna količina ugljikohidrata jer su rezultati poprimali vrijednosti koje su puno veće nego što su bili prilikom izrade standardne krivulje te se nisu mogli izvući logički zaključci nakon obrade podataka. Prvo su prikazani rezultati za prvi, a onda za drugi eksperiment. Osim toga za svaki test i pesticid usporedno su prikazani podaci za A - glejno tlo i B - umjetno tlo.

3.1. Klorantraniliprol (prvi eksperiment)

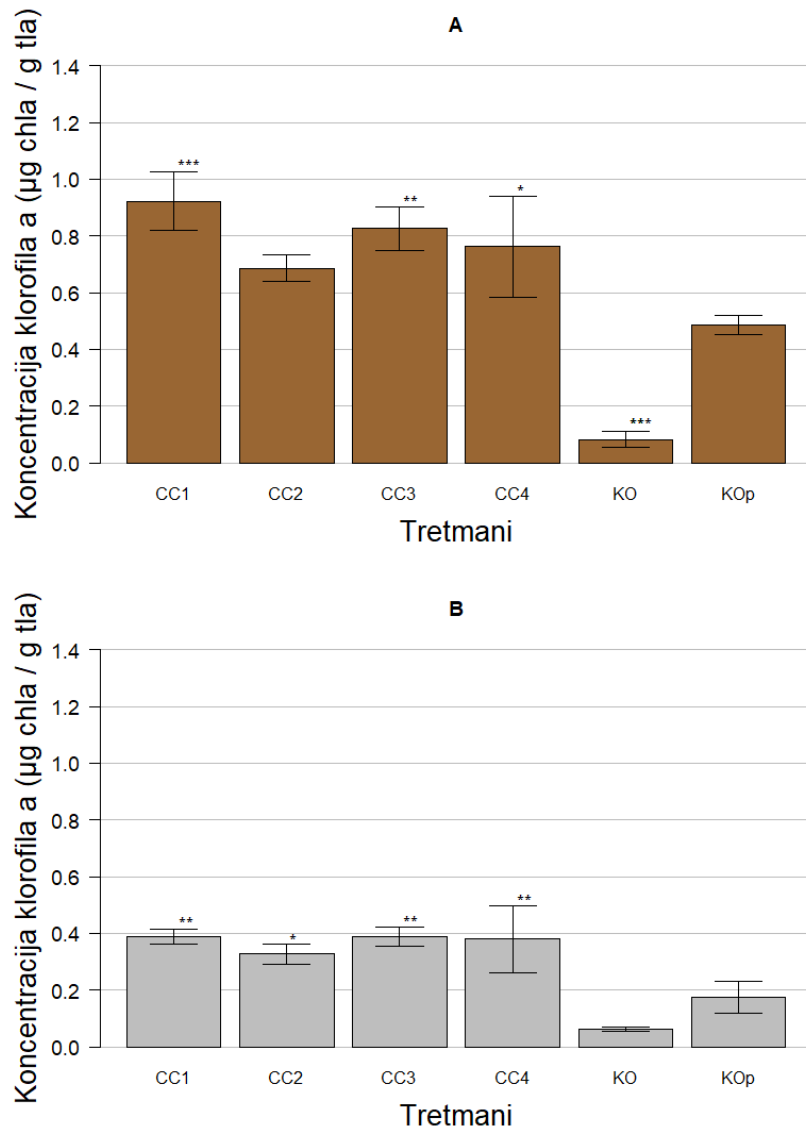
Tretmani su pripremljeni u triplikatu na A – glejnom tlu i B – umjetnom tlu te su sastavljeni od: KO – kontrola sa autoklaviranim inokluatom bez pesticida, KOp - pozitivna kontrola sa inokluatom bez pesticida, CC1- inokulat + 5 x manja koncentracija klorantraniliprola od preporučene uporabe, CC2 - inokulat + 2 x manja koncentracija klorantraniliprola od preporučene uporabe, CC3 - inokulat + preporučena koncentracija klorantraniliprola, CC4 - inokulat + 5 x veća koncentracija klorantraniliprola od preporučene uporabe.

3.1.1. Koncentracija klorofila a

Analizom uzoraka glejnog tla ANOVA testom je utvrđeno da postoji statistički značajna ($p=0,05$) razlika u srednjim vrijednostima koncentracije klorofila, te je Dunnet post hoc testom vidljiva razlika između skoro svih tretmana u odnosu na KOp. Statistički značajne razlike nema između KOp i CC2. Srednje vrijednosti koncentracije klorofila iznose: CC1 ($0,922 \mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$), CC2 ($0,686 \mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$), CC3 ($0,826 \mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$), CC4 ($0,763 \mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$), KO ($0,083 \mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$), KOp ($0,486 \mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$) (Slika 11. A).

Na umjetnom tlu vrijednosti su nešto niže, ali je utvrđena statistički značajna razlika između KOp i svih ostalih tretmana. Srednje vrijednosti koncentracije klorofila iznose: CC1 ($0,388 \mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$), CC2 ($0,327 \mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$), CC3 ($0,387 \mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$), CC4 ($0,380 \mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$), KO ($0,062 \mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$), KOp ($0,175 \mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$) (Slika 11. B). Rast cijanobakterije na umjetnom tlu

je slabiji od rasta na glejnom tlu. Analizom srednjih vrijednosti koncentracije klorofila a kod pozitivnih kontrola umjetnog (Slika 11. B) i glejnog tla (Slika 11. A), t-testom je utvrđena statistički značajna razlika.

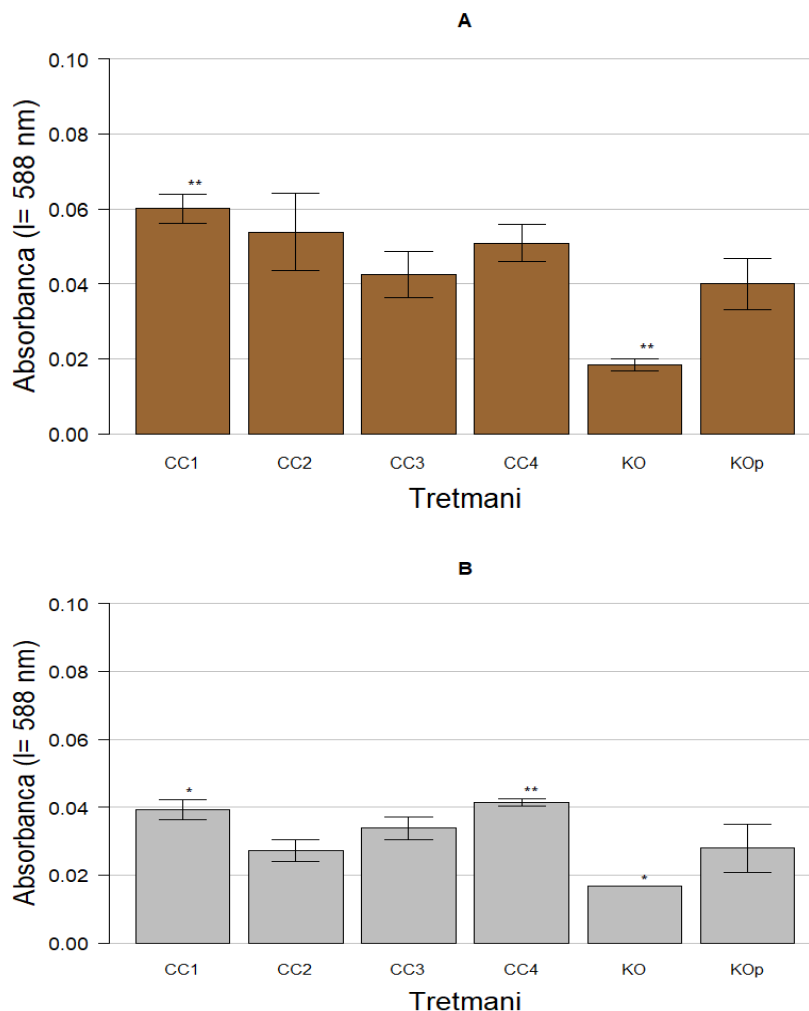


Slika 11. Grafički prikaz srednjih vrijednosti koncentracije klorofila a s pripadajućim standardnim devijacijama ($n = 3$) na A - glejnom tlu i B - umjetnom tlu. Zvezdicom su označene statistički značajne razlike tretmana u odnosu na pozitivnu kontrolu (KOp) ($*=p \leq 0,05$, $** = p \leq 0,01$, $*** = p \leq 0,001$)

3.1.2. Kristal violet test

Na glejnom tlu utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u stvaranju biofilma između KOp i tretmana CC1 i KO. Srednje vrijednosti izmjerenih absorbanci iznosile su: CC1 (0,060), CC2 (0,054), CC3 (0,042), CC4 (0,051), KO (0,018), KOp (0,040) (Slika 12. A).

S druge strane izmjerene srednje vrijednosti absorbanci umjetnog tla iznosile su: CC1 (0,039), CC2 (0,027), CC3 (0,034), CC4 (0,041), KO (0,017), KOp (0,028) (Slika 12. B), a obradom podataka utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u stvaranju biofilma između KOp i tretmana CC1, CC4 te KO.

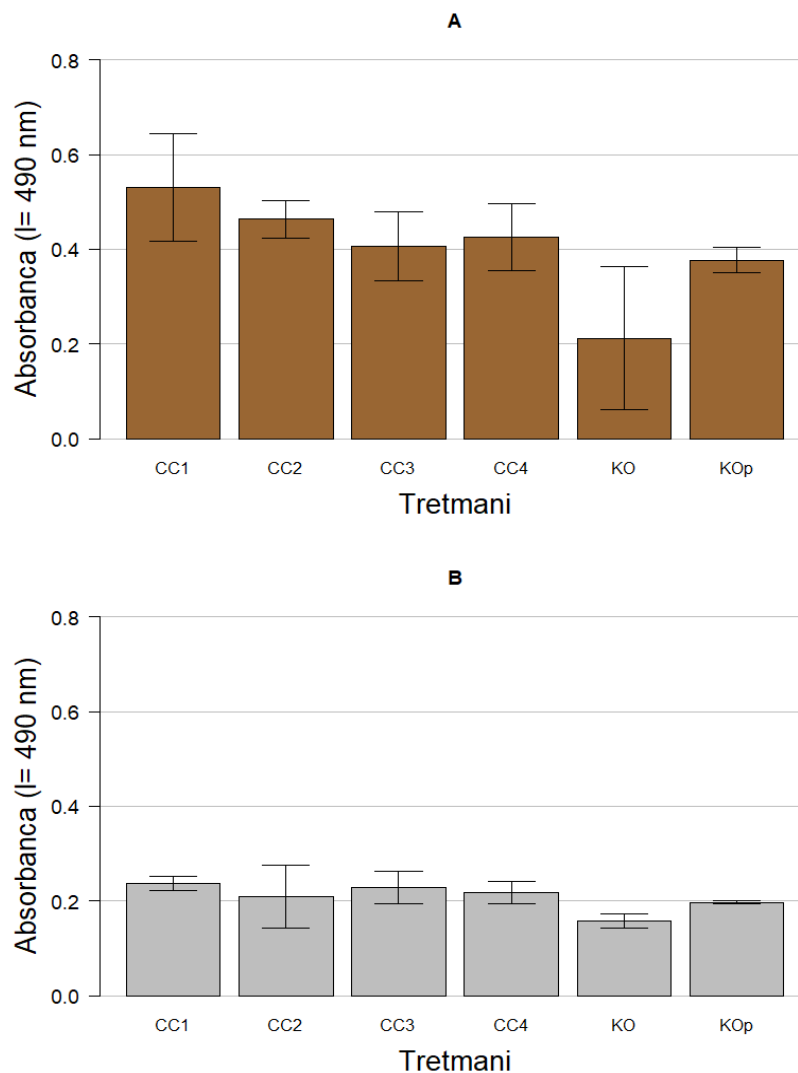


Slika 12. Grafički prikaz srednjih vrijednosti absorbanci kristal violet testa s pripadajućim standardnim devijacijama ($n = 3$) na A - glejnom tlu i B - umjetnom tlu. Zvezdicom su označene statistički značajne razlike tretmana u odnosu na pozitivnu kontrolu (KOp) (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$)

3.1.3. FDA test

Iako su vidljive veće srednje vrijednosti tretmana CC1 i CC2 u odnosu na KOp, nije uočena statistički značajna razlika među tretmanima. Izmjerene su sljedeće vrijednosti absorbanci: CC1 (0,530), CC2 (0,463), CC3 (0,407), CC4 (0,426), KO (0,212), KOp (0,377)(Slika 13. A).

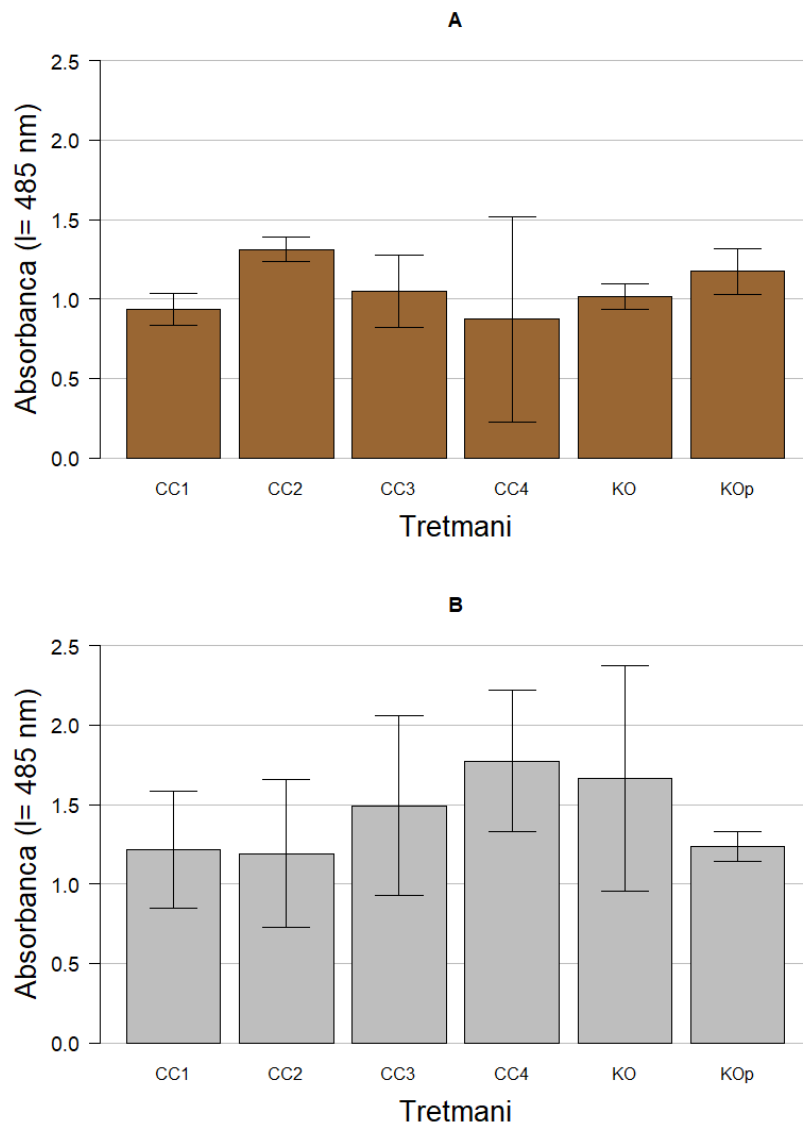
Na umjetnom tlu su podjednake srednje vrijednosti absorbanci mikrobiološke aktivnosti te nije utvrđena statistički značajna razlika u mikrobiološkoj aktivnosti između tretmana. Utvrđene su sljedeće srednje vrijednosti absorbanci: CC1 (0,237), CC2 (0,209), CC3 (0,229), CC4 (0,217), KO (0,158), KOp (0,197) (Slika 13. B).



Slika 13. Grafički prikaz srednjih vrijednosti absorbanci FDA testa s pripadajućim standardnim devijacijama (n = 3) na A - glejnom tlu i B - umjetnom tlu.

3.1.4. Ukupna količina ugljikohidrata

Određivanjem ukupne količine ugljikohidrata nisu uočene statističke značajne razlike među srednjim vrijednostima absorbanci tretmana ni na glejnom ni na umjetnom tlu. Na glejnom tlu vrijednosti su iznosile: CC1 (0,932), CC2 (1,312), CC3 (1,048), CC4 (0,872), KO (1,017), KOp (1,173), a na umjetnom tlu: CC1 (1,215), CC2 (1,191), CC3 (1,493), CC4 (1,773), KO (1,662), KOp (1,237) (Slika 14.).



Slika 14. Grafički prikaz srednjih vrijednosti absorbanci ukupne količine ugljikohidrata s pripadajućim standardnim devijacijama (n = 3) na A - glejnom tlu i B - umjetnom tlu.

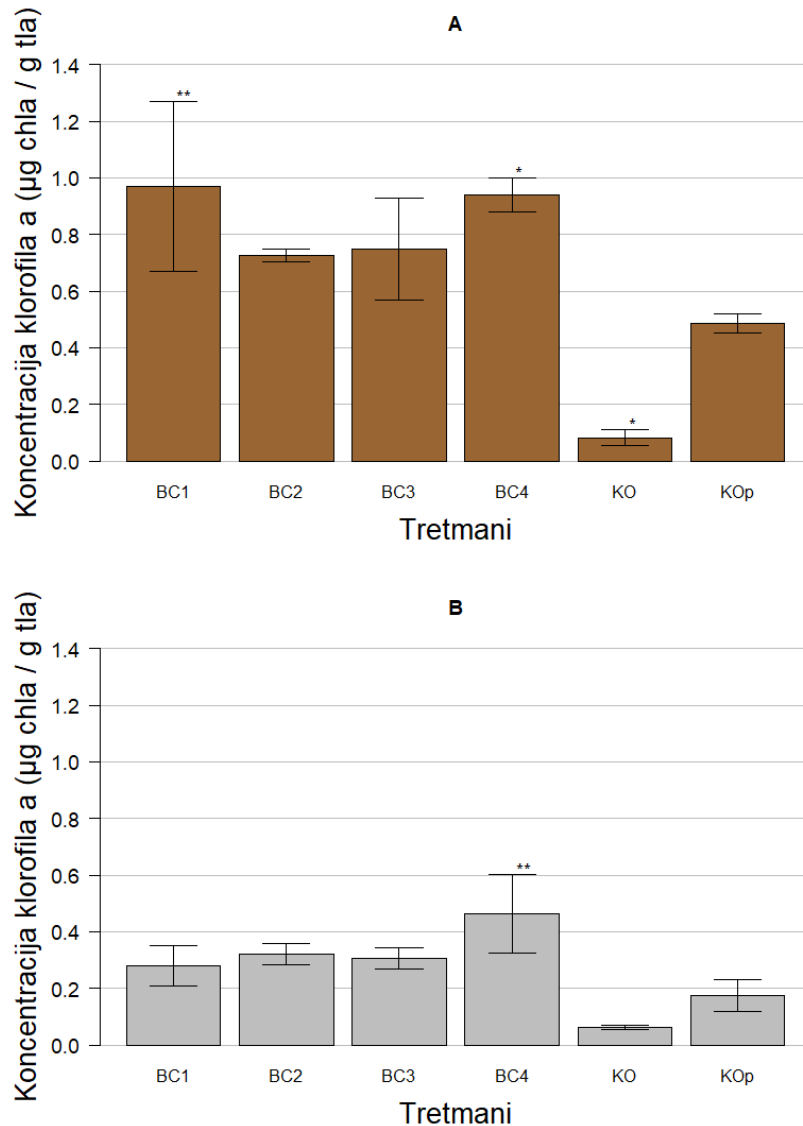
3.2. Propikonazol (prvi eksperiment)

Tretmani su postavljeni u triplicate na A – glejnom tlu i B – umjetnom tlu te su sastavljeni od: KO – kontrola sa autoklaviranim inokluatom bez pesticida, KOp - pozitivna kontrola sa inokulatom bez pesticida, BC1- inokulat + 5 x manja koncentracija propikonazola od preporučene uporabe, BC2 - inokulat + 2 x manja koncentracija propikonazola od preporučene uporabe, BC3 - inokulat + preporučena koncentracija propikonazola, BC4 - inokulat + 5 x veća koncentracija propikonazola od preporučene uporabe.

3.2.1. Koncentracija klorofila a

ANOVA je pokazala kako postoji statistički značajna ($p=0,05$) razlika u srednjim vrijednostima koncentracije klorofila, te je Dunnet post hoc testom utvrđena razlika između BC4 tretmana u odnosu na KOp. Srednje vrijednosti koncentracije klorofila iznose: BC1 ($0,969 \mu\text{g}_{\text{chla}}/\text{g}_{\text{tla}}$), BC2 ($0,726 \mu\text{g}_{\text{chla}}/\text{g}_{\text{tla}}$), BC3 ($0,748 \mu\text{g}_{\text{chla}}/\text{g}_{\text{tla}}$), BC4 ($0,939 \mu\text{g}_{\text{chla}}/\text{g}_{\text{tla}}$), KO ($0,083 \mu\text{g}_{\text{chla}}/\text{g}_{\text{tla}}$), KOp ($0,486 \mu\text{g}_{\text{chla}}/\text{g}_{\text{tla}}$)(Slika 15. A).

Na umjetnom tlu vrijednosti su nešto niže (Slika 15. B), ali je utvrđena statistički značajna razlika Dunnet post hoc testom pri koncentraciji BC4 u odnosu na KOp. Srednje vrijednosti koncentracije klorofila iznose: BC1 ($0,281 \mu\text{g}_{\text{chla}}/\text{g}_{\text{tla}}$), BC2 ($0,320 \mu\text{g}_{\text{chla}}/\text{g}_{\text{tla}}$), BC3 ($0,306 \mu\text{g}_{\text{chla}}/\text{g}_{\text{tla}}$), BC4 ($0,464 \mu\text{g}_{\text{chla}}/\text{g}_{\text{tla}}$), KO ($0,062 \mu\text{g}_{\text{chla}}/\text{g}_{\text{tla}}$), KOp ($0,175 \mu\text{g}_{\text{chla}}/\text{g}_{\text{tla}}$).

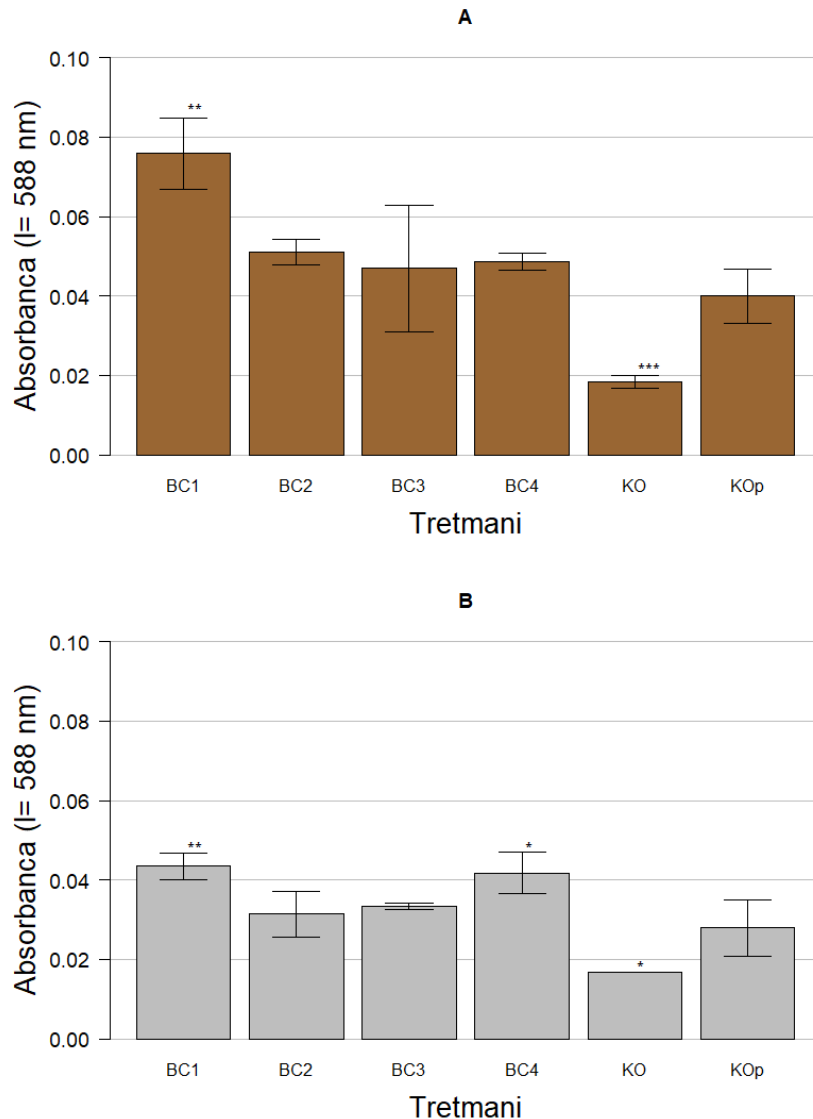


Slika 15. Grafički prikaz srednjih vrijednosti koncentracija klorofila a s pripadajućim standardnim devijacijama ($n = 3$) na A - glejnom tlu i B - umjetnom tlu. Zvezdicom su označene statistički značajne razlike tretmana u odnosu na pozitivnu kontrolu (KOp) ($* = p \leq 0,05$, $** = p \leq 0,01$)

3.2.2. Kristal violet test

Srednje vrijednosti absorbanci kristal violet testa na glejnom tlu iznosile su: BC1 (0,076), BC2 (0,051), BC3 (0,047), BC4 (0,049), KO (0,018), KOp (0,040) te je obradom podataka uočena statistički značajna razlika ($p < 0,05$) kod tretmana BC1 i KO u odnosu na KOp (Slika 16. A).

Na umjetnom tlu (Slika 16. B) utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između BC1, BC4 i KO u odnosu na KOp, a izmjerene absorbance srednjih vrijednosti absorbanci kristal violet testa iznosile su: BC1 (0,043), BC2 (0,031), BC3 (0,033), BC4 (0,042), KO (0,017), KOp (0,028).

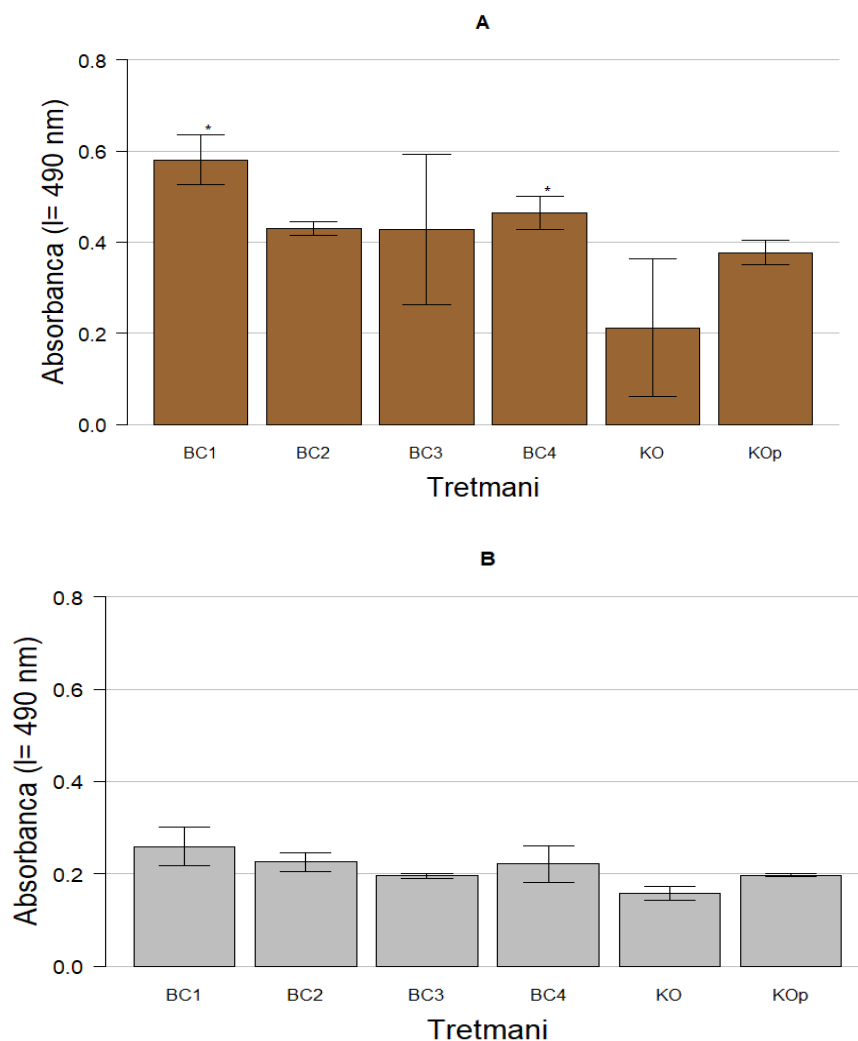


Slika 16. Grafički prikaz srednjih vrijednosti absorbanci kristal violet testa s pripadajućim standardnim devijacijama ($n = 3$) na A - glejnom tlu i B - umjetnom tlu. Zvezdicom su označene statistički značajne razlike tretmana u odnosu na pozitivnu kontrolu (KOp) (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$)

3.2.3. FDA test

Kruskal-Wallis testom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika ($p=0,05$), a Gao Xin post hoc testom ta razlika uočena je pri koncentracijama BC1 i BC4 u odnosu na pozitivnu kontrolu. Izmjerene srednje vrijednosti absorbanci mikrobiološke aktivnosti na glejnom tlu iznose: BC1 (0,580), BC2 (0,430), BC3 (0,427), BC4 (0,464), KO (0,212), KOp (0,377) (Slika 17. A).

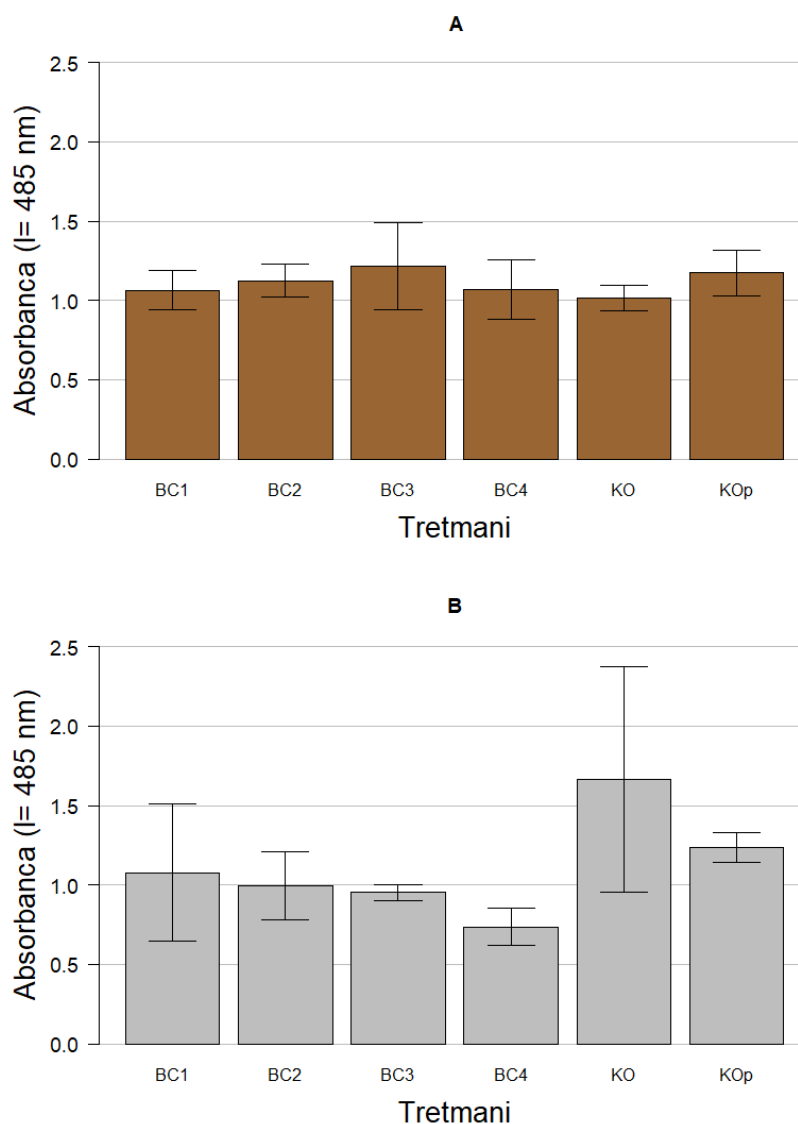
Kao i kod klorantraniliprola na umjetnom tlu nije utvrđena statistički značajna razlika ($p=0,05$), a srednje vrijednosti izmjerenih absorbanci iznosile su: BC1 (0,259), BC2 (0,225), BC3 (0,195), BC4 (0,221), KO (0,158), KOp (0,197) (Slika 17. B).



Slika 17. Grafički prikaz srednjih vrijednosti absorbanci FDA testa s pripadajućim standardnim devijacijama ($n = 3$) na A - glejnom tlu i B - umjetnom tlu. Zvezdicom su označene statistički značajne razlike tretmana u odnosu na pozitivnu kontrolu (KOp) ($* = p \leq 0,05$)

3.2.4. Ukupna količina ugljikohidrata

Analizom srednjih vrijednosti absorbanci ukupne količine ugljikohidrata nisu uočene statistički značajne razlike ni na glejnom ni na umjetnom tlu. Na glejnom tlu vrijednosti su iznosile: BC1 (1,063), BC2 (1,123), BC3 (1,217), BC4 (1,067), KO (1,017), KOp (1,173), a na umjetnom tlu: BC1 (1,078), BC2 (0,995), BC3 (0,952), BC4 (0,736), KO (1,662), KOp (1,237) (Slika 18.).



Slika 18. Grafički prikaz srednjih vrijednosti absorbanci ukupne količine ugljikohidrata s pripadajućim standardnim devijacijama (n = 3) na A - glejnom tlu i B - umjetnom tlu

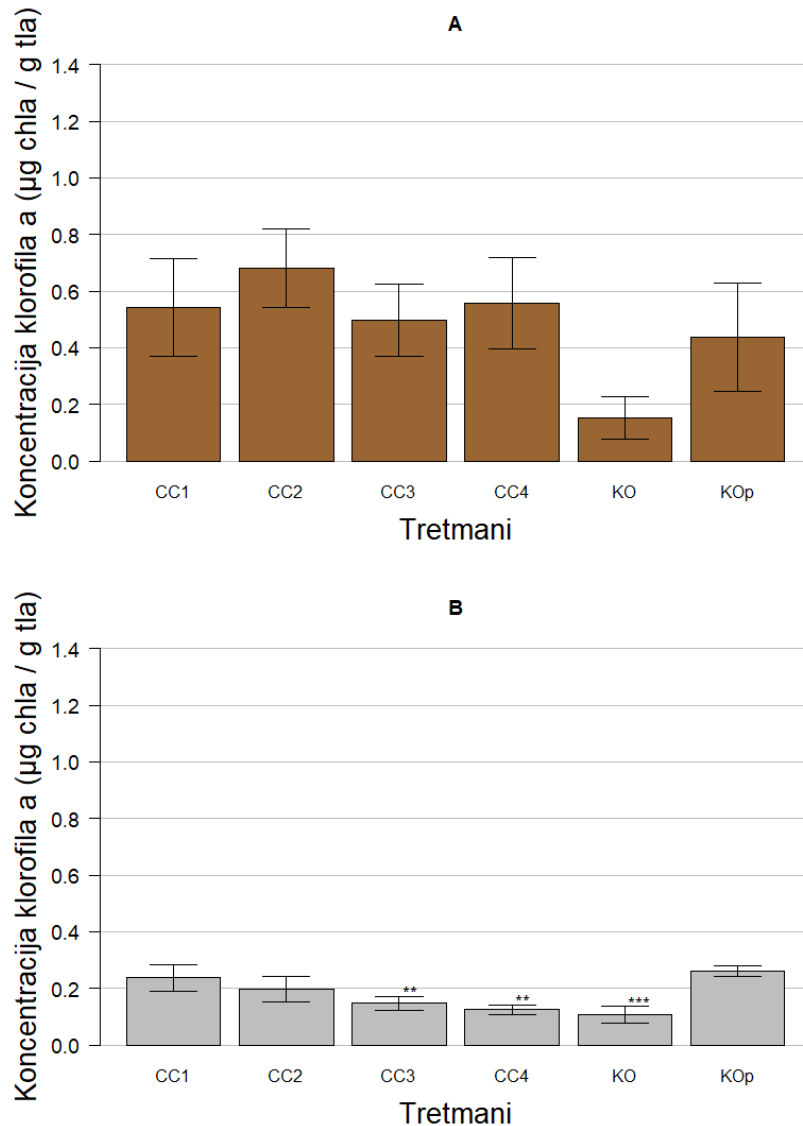
3.3. Klorantraniliprol (drugi eksperiment)

Tretmani su pripremljeni na identičan način kao u prethodnom eksperimentu jedino je razlika u količini cijanobakterijskog materijala za pripremu inokulata. Tri ponavljanja po uzorku na A – glejnom tlu i B – umjetnom tlu te su sastavljeni od: KO – kontrola sa autoklaviranim inokluatom bez pesticida, KOp - pozitivna kontrola sa inokulatom bez pesticida, CC1- inokulat + 5 x manja koncentracija klorantraniliprola od preporučene uporabe, CC2 - inokulat + 2 x manja koncentracija klorantraniliprola od preporučene uporabe, CC3 - inokulat + preporučena koncentracija klorantraniliprola, CC4 - inokulat + 5 x veća koncentracija klorantraniliprola od preporučene uporabe.

3.3.1. Koncentracija klorofila a

Mogu se primijetiti veće srednje vrijednosti koncentracije klorofila a kod tretmana CC1, CC2 i CC4, ali obradom podataka nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na pozitivnu kontrolu. Srednje vrijednosti koncentracije klorofila iznosile su: CC1 (0,542 $\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$), CC2 (0,682 $\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$), CC3 (0,497 $\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$), CC4 (0,558 $\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$), KO (0,152 $\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$), KOp (0,436 $\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$) (Slika 19. A).

Na umjetnom tlu, kod svih tretmana su srednje vrijednosti koncentracije klorofila a manje u odnosu na pozitivnu kontrolu te je utvrđena statistički značajna razlika između KOp i CC3, CC4 i KO tretmana. Srednje vrijednosti koncentracije klorofila iznose: CC1 (0,237 $\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$), CC2 (0,196 $\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$), CC3 (0,147 $\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$), CC4 (0,125 $\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$), KO (0,106 $\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$), KOp (0,262 $\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$) (Slika 19. B).

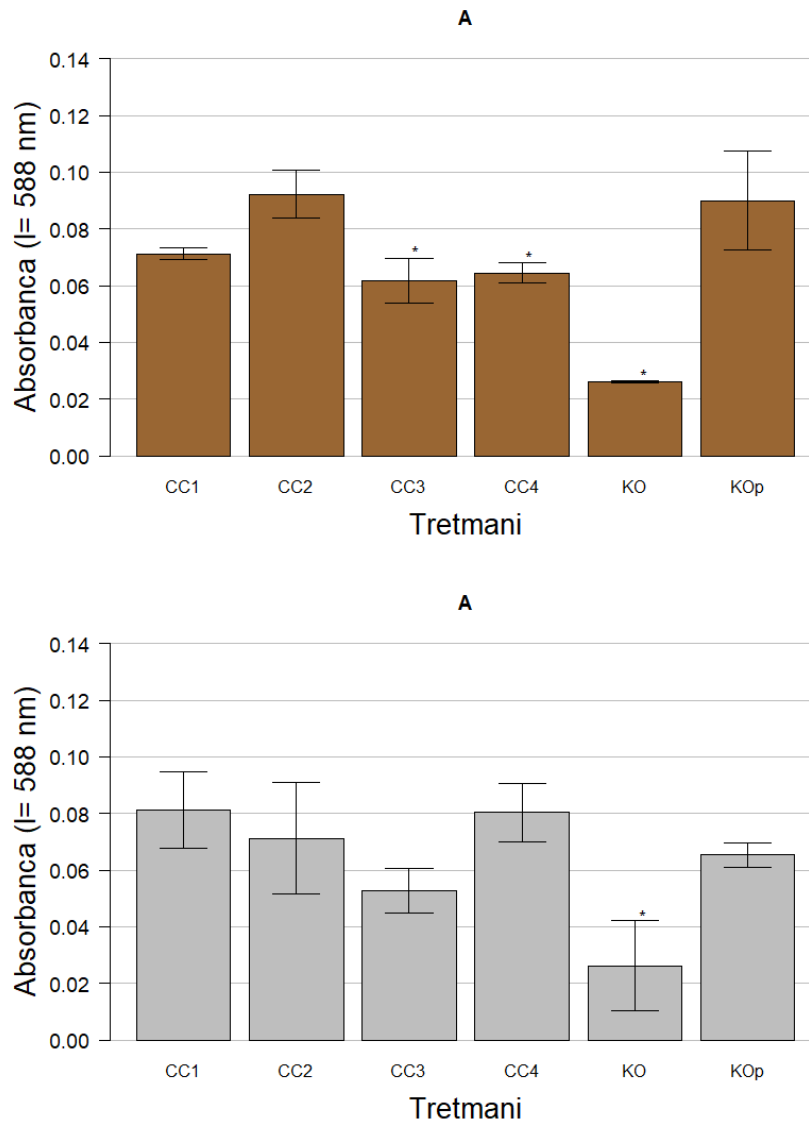


Slika 19. Grafički prikaz srednjih vrijednosti koncentracija klorofila a s pripadajućim standardnim devijacijama ($n = 3$) na A - glejnom tlu i B - umjetnom tlu. Zvezdicom su označene statistički značajne razlike tretmana u odnosu na pozitivnu kontrolu (KOp) (** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$)

3.3.2. Kristal violet test

Kruskal-Wallis testom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u stvaranju biofilma. Gao Xin post hoc testom uočena je statistički značajna razlika kod tretmana CC3, CC4 i KO u odnosu na KOp. Srednje vrijednosti izmjerenih absorbanci kristal violet testa iznosile su: CC1 (0,071), CC2 (0,092), CC3 (0,062), CC4 (0,064), KO (0,026), KOp (0,090) (Slika 20. A).

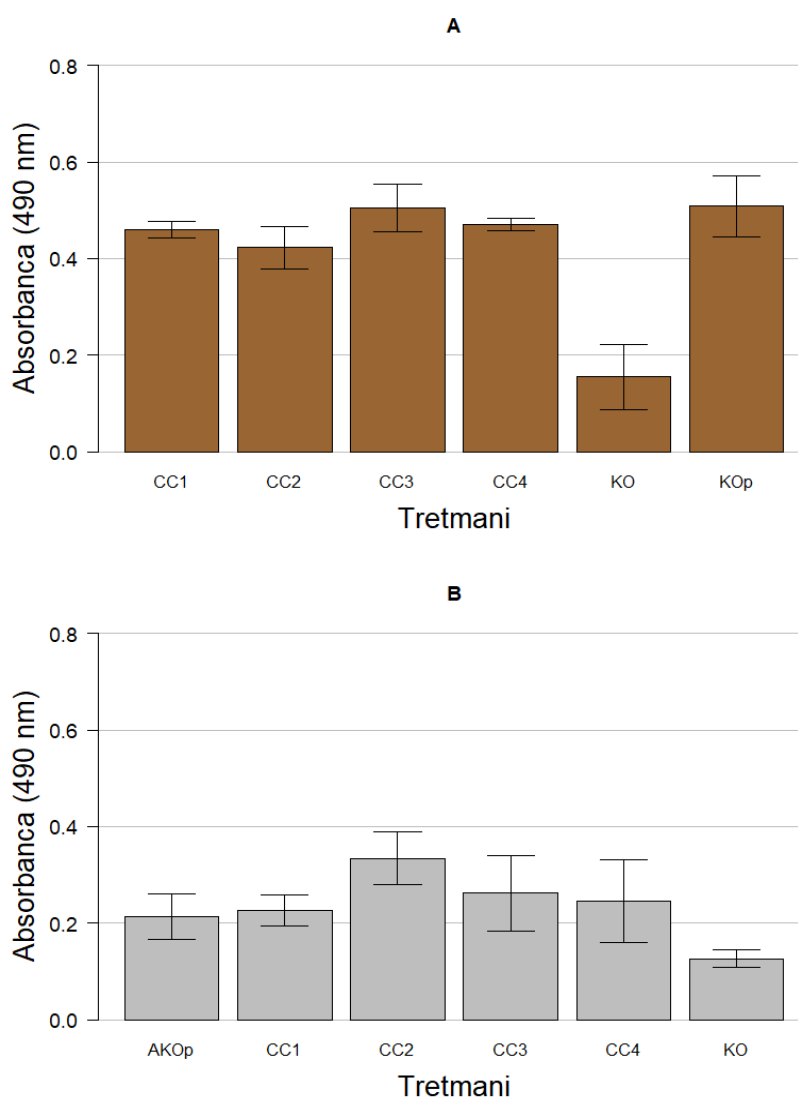
Srednje vrijednosti izmjerenih absorbanci kristal violet testa na umjetnom tlu iznosile su: CC1 (0,081), CC2 (0,071), CC3 (0,063), CC4 (0,080), KO (0,026), KOp (0,065), a analizom podataka ANOVA testom je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u stvaranju biofilma. Dunnet post hoc uočena je statistički značajna razlika kod tretmana KO u odnosu na KOp (Slika 20. B).



Slika 20. Grafički prikaz srednjih vrijednosti absorbanci kristal violet testa s pripadajućim standardnim devijacijama ($n = 3$) na A - glejnom tlu i B - umjetnom tlu. Zvezdicom su označene statistički značajne razlike tretmana u odnosu na pozitivnu kontrolu (KOp) ($* = p \leq 0,05$)

3.3.3. FDA test

Kao i u prošlom eksperimentu djelovanjem klorantraniliprola, ni na glejnom ni na umjetnom tlu nije utvrđena statistički značajna razlika u mikrobiološkoj aktivnosti kod tretmana u odnosu na pozitivnu kontrolu. Izmjerene srednje vrijednosti absorbanci mikrobiološke aktivnosti na glejnom tlu iznose: CC1 (0,460), CC2 (0,422), CC3 (0,505), CC4 (0,471), KO (0,155), KOp (0,508), a srednje vrijednosti izmjerenih absorbanci na umjetnom tlu iznosile su: CC1 (0,226), CC2 (0,334), CC3 (0,262), CC4 (0,246), KO (0,126), KOp (0,213) (Slika 21.).



Slika 21. Grafički prikaz srednjih vrijednosti absorbanci FDA testa s pripadajućim standardnim devijacijama (n = 3) na A - glejnom tlu i B - umjetnom tlu. Zvezdicom su označene statistički značajne razlike tretmana u odnosu na pozitivnu kontrolu (KOp)

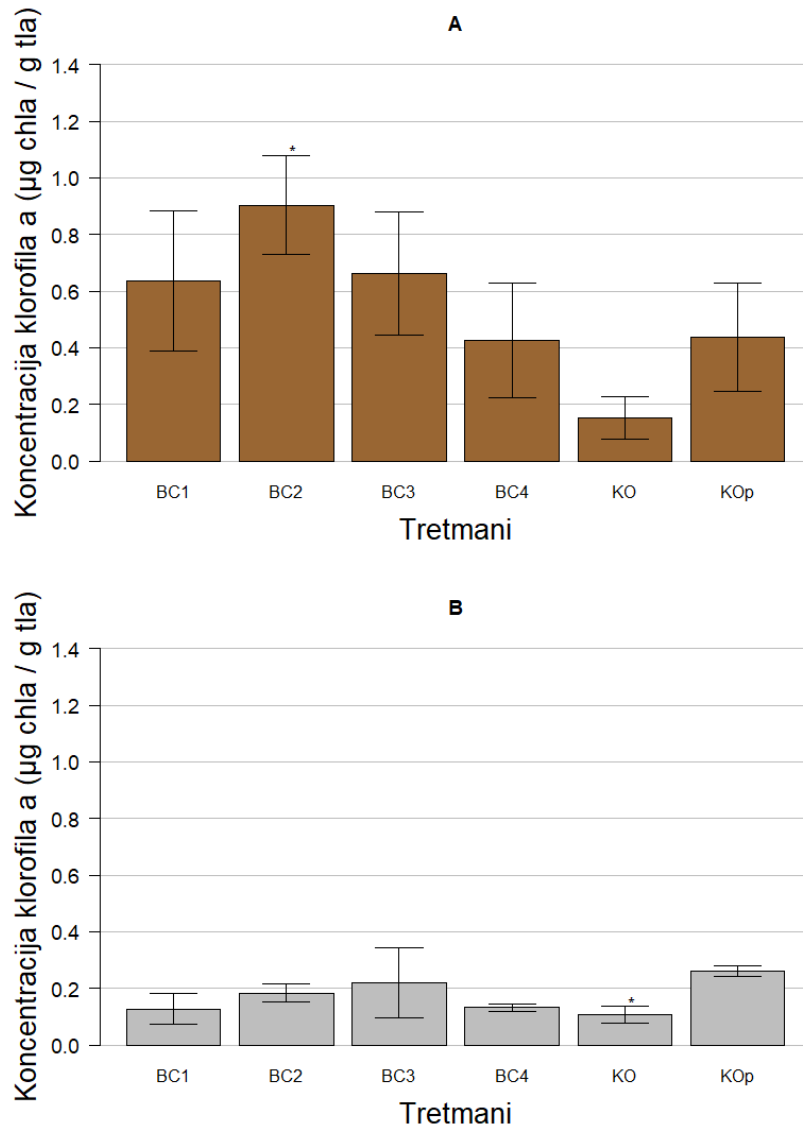
3.4. Propikonazol (drugi eksperiment)

Tretmani su postavljeni u triplicate na A – glejnom tlu i B – umjetnom tlu te su sastavljeni od: KO – kontrola sa autoklaviranim inokluatom bez pesticida, KOp - pozitivna kontrola sa inokluatom bez pesticida, BC1- inokulat + 5 x manja koncentracija propikonazola od preporučene uporabe, BC2 - inokulat + 2 x manja koncentracija propikonazola od preporučene uporabe, BC3 - inokulat + preporučena koncentracija propikonazola, BC4 - inokulat + 5 x veća koncentracija propikonazola od preporučene uporabe.

3.4.1. Koncentracija klorofila a

ANOVA testom je utvrđeno kako postoji statistički značajna ($p=0,05$) razlika u srednjim vrijednostima koncentracije klorofila na glejnom tlu, te je Dunnet post hoc testom utvrđena razlika između BC2 tretmana u odnosu na KOp. Srednje vrijednosti koncentracije klorofila za tretmane iznose: BC1 ($0,636 \mu\text{g}_{\text{chla}}/\text{g}_{\text{tla}}$), BC2 ($0,903 \mu\text{g}_{\text{chla}}/\text{g}_{\text{tla}}$), BC3 ($0,662 \mu\text{g}_{\text{chla}}/\text{g}_{\text{tla}}$), BC4 ($0,427 \mu\text{g}_{\text{chla}}/\text{g}_{\text{tla}}$), KO ($0,152 \mu\text{g}_{\text{chla}}/\text{g}_{\text{tla}}$), KOp ($0,436 \mu\text{g}_{\text{chla}}/\text{g}_{\text{tla}}$) (Slika 22. A).

Na umjetnom tlu je utvrđena statistički značajna razlika Dunnet post hoc testom kod KO tretmana u odnosu na KOp. Srednje vrijednosti koncentracije klorofila iznose: BC1 ($0,128 \mu\text{g}_{\text{chla}}/\text{g}_{\text{tla}}$), BC2 ($0,183 \mu\text{g}_{\text{chla}}/\text{g}_{\text{tla}}$), BC3 ($0,219 \mu\text{g}_{\text{chla}}/\text{g}_{\text{tla}}$), BC4 ($0,132 \mu\text{g}_{\text{chla}}/\text{g}_{\text{tla}}$), KO ($0,106 \mu\text{g}_{\text{chla}}/\text{g}_{\text{tla}}$), KOp ($0,262 \mu\text{g}_{\text{chla}}/\text{g}_{\text{tla}}$) (Slika 22. B).



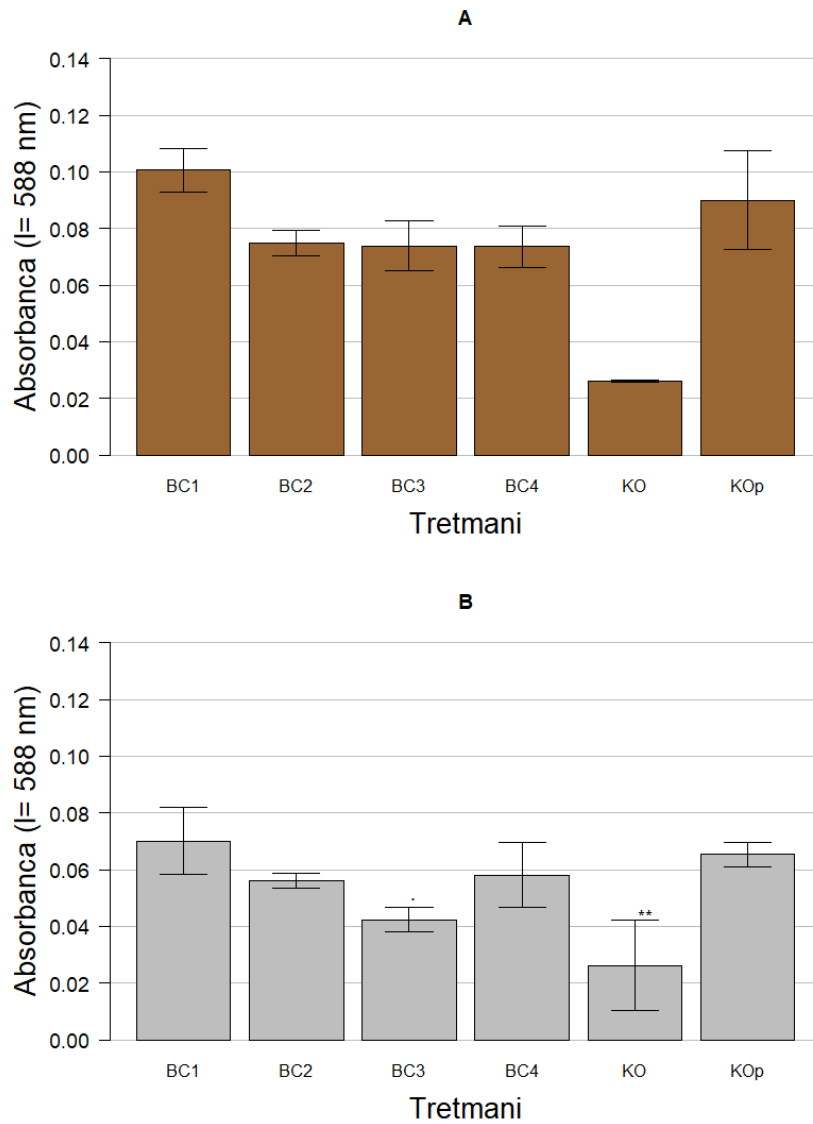
Slika 22. Grafički prikaz srednjih vrijednosti koncentracija klorofila a s pripadajućim standardnim devijacijama ($n = 3$) na A - glejnom tlu i B - umjetnom tlu. Zvezdicom su označene statistički značajne razlike tretmana u odnosu na pozitivnu kontrolu (KOp) ($* = p \leq 0,05$)

3.4.2. Kristal violet test

Izmjerene srednje vrijednosti absorbanci kristal violet testa na glejnom tlu iznosile su: BC1 (0,101), BC2 (0,075), BC3 (0,074), BC4 (0,074), KO (0,026), KOp (0,090) te nije uočena statistički značajna razlika kod tretmana u odnosu na KOp (Slika 23. A).

Na umjetnom tlu ANOVA testom uočena je statistički značajna razlika ($p < 0,05$). Dunnet post hoc testom utvrđeno je da se razlika nalazi kod tretmana BC3 i KO u odnosu na

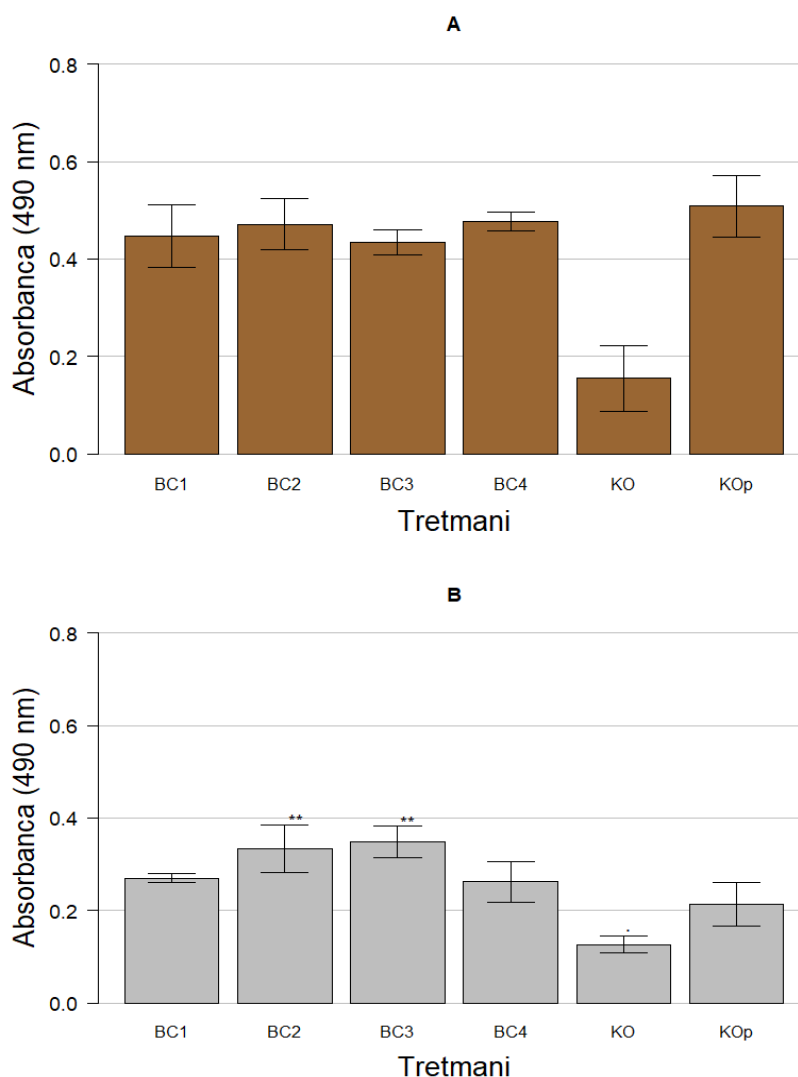
KOp. Izmjerene srednje vrijednosti absorbanca iznose: BC1 (0,070), BC2 (0,056), BC3 (0,042), BC4 (0,058), KO (0,026), KOp (0,065) (Slika 23. B).



Slika 23. Grafički prikaz srednjih vrijednosti absorbanca kristal violet testa s pripadajućim standardnim devijacijama ($n = 3$) na A - glejnom tlu i B - umjetnom tlu. Zvezdicom su označene statistički značajne razlike tretmana u odnosu na pozitivnu kontrolu (KOp) (** = $p \leq 0,01$)

3.4.3. FDA test

Obradom podataka nije uočena statistički značajna razlika između tretmana i KOp. Na glejnom tlu te izmjerene su sljedeće srednje vrijednosti absorbance: BC1 (0,447), BC2 (0,471), BC3 (0,434), BC4 (0,477), KO (0,155), KOp (0,508) (Slika 24. A). No na umjetnom tlu utvrđena je statistički značajna razlika ($p=0,05$) ANOVA testom te Dunnet post hoc testom statistički značajna razlika vidljiva je pri koncentracijama BC2, BC3 i negativne kontrole u odnosu na KOp. Srednje vrijednosti izmjerenih absorbanci FDA testa iznosile su: BC1 (0,269), BC2 (0,333), BC3 (0,349), BC4 (0,262), KO (0,126), KOp (0,213) (Slika 24. B).



Slika 24. Grafički prikaz srednjih vrijednosti absorbanci FDA testa s pripadajućim standardnim devijacijama ($n = 3$) na A - glejnom tlu i B - umjetnom tlu. Zvezdicom su označene statistički značajne razlike tretmana u odnosu na pozitivnu kontrolu (KOp) (** = $p \leq 0,01$)

4. Rasprava

Upotreba pesticida u svrhu suzbijanja štetnika i povećanja prinosa poljoprivrednih kultura neizostavan je dio današnje poljoprivredne prakse. Samo u Europskoj uniji odobreno je 473 aktivnih supstanci za uporabu u pesticidima (web 4.). Unatoč prednostima pesticida na prinose usjeva i njihovoj važnosti za gospodarstvo, intenzivna i raširena upotreba pesticida uzrokuje ozbiljne okolišne i zdravstvene probleme. Kontaminacija tla ostacima pesticida utječe na njegovu funkcionalnost, bioraznolikost te sigurnost hrane (Silva i sur., 2019). Kako bi se prijevremeno reagiralo na promjene u ekosustavima, potrebno je pratiti i neciljne organizme koji su obuhvaćeni djelovanjem pesticida. Prema OECD 201 protokolu (OECD, 2011) opisan je test za određivanje djelovanja supstanci na rast samo slatkovodnih algi i cijanobakterija. Još 1992. godine ističe se potreba za standardiziranim testovima za alge i cijanobakterije tla. Iako su autori Padhy (1985) i Pipe (1992) sumirali velik broj djelovanja herbicida, fungicida i insekticida na razne vrste algi i cijanobakterija, problem se javlja jer se dobiveni rezultati u različitim istraživanjima često ne mogu lagano usporediti, zbog razlika u eksperimentalnom dizajnu, formulaciji pesticida i razlici u ispitivanim organizmima.

Kako se u većini istraživanja djelovanje pesticida na cijanobakterije (čak i kada su izolirane iz tla) promatra u vodenim hranjivim medijima ili agarnim podlogama, u ovom radu korištena su dva tipa tla kao supstrat na kojem se prati utjecaj insekticida i fungicida na rast cijanobakterije *Cylindrospermum sp.* Cijanobakterija je izolirana iz glejnog tipa tla, s obzirom da u tom tipu tla ima sve potrebne nutrijente odabrano je kao supstrat za rast, s druge strane korišteno je i umjetno tlo kako bi mogli vidjeti hoće li postajati poveznica u dinamici mjerenih parametara. Koncentracija klorofila uzeta je kao glavni parametar za mjeru rasta cijanobakterije jer se ukupna koncentracija klorofila često koristi za mjerenje rasta, posebno u slučaju filamentoznih cijanobakterija, gdje se broj stanica ne može izravno prebrojati (Li i sur., 2014). Osim toga promatrana je sposobnost stvaranja biofilma, mikrobiološka aktivnost i ukupna količina ugljikohidrata. Iz rezultata ovog istraživanja vidljivi su različiti utjecaji na promatrane parametre s obzirom na primijenjeni pesticid i količinu početnog inokulata.

Određivanje ukupne količine ugljikohidrata iz tla prema metodi autora Safařík i Šantrůčková (1992) nije uspješno provedena iz dva razloga. Absorbance dobivene mjerenjem su bile veće od očekivanih, a umjetno tlo korišteno u eksperimentu ima krupnije dijelove treseta zbog kojih su očitavanja vjerojatno bila tako visoka. Prilikom izrade standardne krivulje veće koncentracije glukoze ne prate linearan rast zbog čega dobiveni rezultati nisu mogli biti ispravno uspoređeni.

4.1. Klorantraniliprol

U prvom eksperimentu (13.5. – 20.5.) može se primijetiti kako pri svim koncentracijama klorantraniliprol djeluje stimulirajuće na rast cijanobakterije na glejnom tlu. Najbolji rast opažen je pri najmanjoj koncentraciji CC1, a nešto manji rast kod CC3, CC4. Očekivano najmanju koncentraciju klorofila ima negativna kontrola pri kojoj je inokulat autoklaviran KO. U drugom eksperimentu (12.6. – 19.6.) korištena je manja količina cijanobakterijskog materijala te su vrijednosti nešto niže, ali se vidi porast koncentracije klorofila u svim tretmanima u odnosu na kontrolu, no značajnije razlika nema. Ovakav pozitivan utjecaj male količine pesticida na mjerene parametre mogli bi se pripisati hormetičkom učinku. Hormeza je pojava da određene tvari pri niskim koncentracijama imaju pozitivan utjecaj, a definira se kao rezultat adaptacije stanica i organizama na umjerenu količinu stresa (Calabrese, 2004; Mattson, 2008). Poznato je da i drugi tipovi insekticida u malim količinama imaju pozitivno djelovanje na rast. Pozitivan efekt na rast *Cylindrospermuma sp.* u tekućem mediju opažen je pri izlaganju 0,5 ppm paration-metila. Na agarnoj podlozi i u tekućem mediju LC₁₀₀ ovog insekticida je 10 ppm, zanimljivo je da na tlu cijanobakterija pokazuje veću otpornost te može biti izložena koncentraciji od 15 ppm (Panigrahi i sur., 2003). Mikroorganizmi mogu metabolizirati pesticide i to najčešće djeluje negativno na njih, međutim pri kratkotrajnom izlaganju određeni sastojci pesticida mogu poslužiti kao izvor dodatnih hranjivih tvari što im u konačnici može olakšati rast (Singh i sur., 2018). Sposobnost stvaranja biofilma u prvom eksperimentu najbolja je pri najmanjoj koncentraciji klorantraniliprola, s obzirom na heterotrofne uvjete inkubacije u mikrotitracijskim pločicama rezultat se može pripisati djelovanju bakterija, ali pri tome treba uzeti u obzir i najveći opažen rast cijanobakterija. Heterotrofni organizmi kao što su bakterije mogu iskoristiti metabolite fototrofnih organizama kao izvor hranjivih tvari (Grbić i sur., 2010), stoga su bakterije vjerojatno imale veće količine hranjivih tvari za rast zbog metabolita koji su proizvedeni od strane cijanobakterije. Osim toga u prilog ide i najveća mikrobiološka aktivnost koja je opažena pri najmanjoj koncentraciji pesticida, ali statistički značajnije razlike aktivnosti u odnosu na pozitivnu kontrolu nema.

U prvom eksperimentu (13.5. – 20.5.) kod uzoraka s umjetnim tlom, vrijednosti koncentracije klorofila a su skoro u pola manji nego što je to na glejnom tlu, iz toga se može zaključiti da je rast cijanobakterije manji nego na matičnom supstratu. Bilo bi poželjno omjere sastavnica od kojeg je pripravljeno umjetno tlo optimizirati kako bi rast bio što bliži onom na matičnom supstratu. Zanimljivo je da su svi tretmani imali podjednake vrijednosti te je

uočeno pozitivno djelovanje na rast cijanobakterije. Za razliku od glejnog tla, statistički značajna razlika u koncentraciji klorofila na umjetnom tlu utvrđena je pri svim koncentracijama u odnosu na pozitivnu kontrolu. S druge strane na oba tipa tla pri najvećoj i najmanjoj koncentraciji pesticida uočena je statistički značajnija razlika u sposobnosti stvaranja biofilma u odnosu na pozitivnu kontrolu. Gledajući mikrobiološku aktivnost ona je relativno niska, vjerojatno zbog tipa supstrata na kojem se odvijao rast. Autori Kar i Singh (1978) proučavali su djelovanje karbofurana na *Nostoc muscorum* te su utvrdili da veća količina početnog inokulata pokazuje i veću otpornost na pesticid. Do sličnog zaključka došli su i autori Singh i Tiwari (1988) primjenom iste koncentracije propanila na različitu količinu inokulata *Nostoc muscorum*. U drugom eksperimentu (12.6. – 19.6.) negativno djelovanje na rast prisutno je kod CC3 i CC4 tretmana, ali nije uočena statistički značajna razlika u sposobnosti stvaranja biofilma i mikrobiološkoj aktivnosti. Postoji mogućnost da je manja količina cijanobakterijskog materijala korištena u pripravi inokulata rezultirala i manjom tolerancijom na pesticid.

4.2. Propikonazol

U ovisnosti o kemijskom sastavu fungicida i doziranju primijećena su različita djelovanja pesticida. Djelovanje fungicida kao što su mankozeba i tebukonazola iznad njihove dopuštene primjene uzrokuju u cijanobakterijama smanjenu aktivnost nitrogenaze i glutamin sintetaze (Singh i sur., 2018). S druge strane mankozeb pri nižim koncentracijama (20 ppm) u tekućem hranjivom mediju utječe na povećanu sintezu klorofila a kod vrsta *Nostoc ellipsoforum*, *Scytonema simplex*, *Tolypothrix tenuis*, i *Westiellopsis prolifica*. Autori Padhy i Rath (2015) u svom radu filter papir inokuliraju sa cijanobakterijskim materijalom, a zatim u hranjivi mediji (bez dušika) dodaju određenu koncentraciju pesticida s kojim tretiraju inokulirani filter papir koji je položen na zemljani supstrat te se nakon određenog vremena filter papir polaže na agarnu podlogu kako bi se mogao prati rast cijanobakterije. U takvim eksperimentalnim uvjetima Padhy i Rath (2015) uočavaju veću otpornost *Cylindrospermuma sp.* na mankozeb. U prvom eksperimentu (13.5. – 20.5.) u uzorcima s glejnim tipom tla porast cijanobakterija je vidljiv pri svim koncentracijama propikonazola u odnosu na pozitivnu kontrolu. U tretmanima s najmanjom i najvećom koncentracijom propikonazola izmjerene su i najveće vrijednosti koncentracije klorofila (BC1 (0,969 $\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$) i BC4 (0,939 $\mu\text{g}_{\text{chl}a}/\text{g}_{\text{tla}}$)) očekivano pri tim koncentracijama prisutna je statistički značajna mikrobiološka aktivnost. Međutim, povećana sposobnost stvaranja biofilma prisutna je samo pri najnižoj koncentraciji. Na umjetnom tlu porast je najizraženiji pri najvećoj koncentraciji pesticida dok je sposobnost

stvaranja biofilma povećana pri najvećoj i najmanjoj koncentraciji. U oba tipa tla nije opažena značajnija promjena u mikrobiološkoj aktivnosti među tretmanima. U drugom eksperimentu (12.6. – 19.6.) povećana mikrobiološka aktivnost prisutna je samo kod uzoraka na umjetnom tlu pri preporučenoj koncentraciji za uporabu i pri upola manjoj koncentraciji od preporučene. Osim toga veći rast cijanobakterije prisutan je na samo glejnom tlu kod BC2 tretmana.

Neizostavan dio upotrebe pesticida u svrhu suzbijanja štetnika je i djelovanje na neciljne organizme. Iako sustavno korištenje pesticida i korištenjem u količinama većih od preporučene u poljoprivrednim praksama rezultira negativnim djelovanjem na organizme u tlu. Poznato je da male količine pesticida mogu uzrokovati suprotan učinak od očekivanog. U svrhu toga neophodna su istraživanja kojima bi utvrdili na koje načine pesticidi utječu na druge organizme kako bi pravovremeno mogli reagirati na promjene u okolišu.

5. Zaključak

- Utjecaj pesticida nema nužno negativan učinak na *Cylindrospermum sp.*
- U prvom eksperimentu stimulacija rasta primijećena je djelovanjem propikonazola pri koncentracijama BC1, BC4 na glejnom tlu i BC4 na umjetnom tlu, a pozitivan rast cijanobakterije djelovanjem klorantraniliprola uočen je pri svim koncentracijama na umjetnom tlu i CC1, CC3 te CC4 na glejnom tlu
- U drugom eksperimentu stimulacija rasta primijećena je djelovanjem propikonazola samo pri koncentraciji BC2 na glejnom tlu
- Veća količina početnog inokulata povećava toleranciju cijanobakterije na klorantraniliprol na umjetnom tlu
- Stimulacija rasta obraštaja djelovanjem pesticida koja je promatrana iz analize koncentracije klorofila može dovesti do pritiska cijanobakterije na druge organizme s kojima dijeli ekološku nišu
- Bolji rast cijanobakterije je na matičnom supstratu

6. Literatura

- Berry, J. P., Gantar, M., Perez, M. H., Berry, G. and Noriega, F. G. (2008). Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algaecides, herbicides and insecticides. *Marine drugs*, 6 (2), pp.117–146. *PubMed* [Online]. Available at: doi:10.3390/md20080007.
- Bristow, L. A., Mohr, W., Ahmerkamp, S. and Kuypers, M. M. M. (2017). Nutrients that limit growth in the ocean. *Current biology : CB*, 27 (11), pp.R474–R478. [Online]. Available at: doi:10.1016/j.cub.2017.03.030.
- Büdel, B. (2011). Cyanobacteria: Habitats and Species. In: Lüttge, U., Beck, E. and Bartels, D. (Eds). *Plant Desiccation Tolerance*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg. pp.11–21. [Online]. Available at: doi:10.1007/978-3-642-19106-0_2.
- Calabrese, E. J. (2004). Hormesis: a revolution in toxicology, risk assessment and medicine. *EMBO reports*, 5 Spec No (Suppl 1), pp.S37–S40. *PubMed* [Online]. Available at: doi:10.1038/sj.embor.7400222.
- Calonne, M., Fontaine, J., Debiante, D., Laruelle, F., Grandmougin-Ferjani, A. and Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2010). Propiconazole Toxicity on the Non-Target Organism, the Arbuscular Mycorrhizal Fungus, *Glomus irregulare*. In: *Fungicides*. [Online]. Available at: doi:10.5772/10482.
- Castle, S., D. Morrison, C. and Barger, N. (2011). Extraction of chlorophyll a from biological soil crusts: A comparison of solvents for spectrophotometric determination. *Soil Biology and Biochemistry*, 43, pp.853–856. [Online]. Available at: doi:10.1016/j.soilbio.2010.11.025.
- Dooley, F. and Houghton, J. A. (1973). The nitrogen-fixing capacities and the occurrence of blue-green algae in peat soils. *British Phycological Journal*, 8 (3), pp.289–293. [Online]. Available at: doi:10.1080/00071617300650311.
- Dvorak, P., Casamatta, D., Hasler, P., Jahodářová, E., Norwich, A. and Pouličková, A. (2017). Diversity of the Cyanobacteria. In: *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes: Environmental and Applied Aspects*. pp.3–46. [Online]. Available at: doi:10.1007/978-3-319-46261-5_1.
- Feld, L., Hjelmsø, M. H., Nielsen, M. S., Jacobsen, A. D., Rønn, R., Ekelund, F., Krogh, P. H., Strobel, B. W. and Jacobsen, C. S. (2015). Pesticide Side Effects in an Agricultural Soil Ecosystem as Measured by amoA Expression Quantification and Bacterial Diversity Changes. *PloS one*, 10 (5), pp.e0126080–e0126080. *PubMed* [Online]. Available at: doi:10.1371/journal.pone.0126080.
- Grbić, M., Vukojevic, J., Subakov Simic, G., Krizmanic, J. and Stupar, M. (2010). Biofilm forming cyanobacteria, algae and fungi on two historic monuments in Belgrade, Serbia. *Archives of Biological Sciences*, 62. [Online]. Available at: doi:10.2298/ABS1003625L.
- Humbert, J. F. (2009). CHAPTER 27 - Toxins of Cyanobacteria. In: Gupta, R. C. (Ed). *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. San Diego : Academic Press. pp.371–379. [Online]. Available at: doi:10.1016/B978-012374484-5.00027-4.

Jones, C. S., Esquenazi, E., Dorrestein, P. C. and Gerwick, W. H. (2011). Probing the in vivo biosynthesis of scytonemin, a cyanobacterial ultraviolet radiation sunscreen, through small scale stable isotope incubation studies and MALDI-TOF mass spectrometry. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 19 (22), pp.6620–6627. *PubMed* [Online]. Available at: doi:10.1016/j.bmc.2011.06.005.

Kaplan-Levy, R., Hadas, O., L. Summers, M., Rücker, J. and Sukenik, A. (2010). Akinetes: Dormant Cells of Cyanobacteria. In: *Dormancy and Resistance in Harsh Environments, Topics in Current Genetics*. Vol. 21. pp.5–27. [Online]. Available at: doi:10.1007/978-3-642-12422-8_2.

Kar, S. and Singh, P. K. (1978). Effect of pH, light intensity and population on the toxicity of the pesticide carbofuran to the blue-green alga *Nostoc muscorum*. *Microbios*, 21 85-86, pp.177–184.

Komarek, J. B., Kaštovský, J., Mareš, J. and Johansen, J. R. (2014). *Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach*. In: 2014.

Komárek, J. and Johansen, J. R. (2015a). Chapter 3 - Coccoid Cyanobacteria. In: Wehr, J. D., Sheath, R. G. and Kociolek, J. P. (Eds). *Freshwater Algae of North America (Second Edition)*. Boston : Academic Press. pp.75–133. [Online]. Available at: doi:10.1016/B978-0-12-385876-4.00003-7.

Komárek, J. and Johansen, J. R. (2015b). Chapter 4 - Filamentous Cyanobacteria. In: Wehr, J. D., Sheath, R. G. and Kociolek, J. P. (Eds). *Freshwater Algae of North America (Second Edition)*. Boston : Academic Press. pp.135–235. [Online]. Available at: doi:10.1016/B978-0-12-385876-4.00004-9.

Kothari, A., Vaughn, M. and Garcia-Pichel, F. (2013). Comparative genomic analyses of the cyanobacterium, *Lyngbya aestuarii* BL J, a powerful hydrogen producer. *Frontiers in microbiology*, 4, pp.363–363. *PubMed* [Online]. Available at: doi:10.3389/fmicb.2013.00363.

Kumar, D., Kaštánek, P. and Adhikary, S. P. (2018). Exopolysaccharides from cyanobacteria and microalgae and their commercial application. *Current Science*, 115, pp.234–241. [Online]. Available at: doi:10.18520/cs/v115/i2/234-241.

Li, Y., Lin, Y., Loughlin, P. C. and Chen, M. (2014). Optimization and effects of different culture conditions on growth of *Halomicronema hongdechloris* - a filamentous cyanobacterium containing chlorophyll f. *Frontiers in plant science*, 5, pp.67–67. *PubMed* [Online]. Available at: doi:10.3389/fpls.2014.00067.

Mattson, M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing research reviews*, 7 (1), pp.1–7. *PubMed* [Online]. Available at: doi:10.1016/j.arr.2007.08.007.

McCann, A. and Roy Cullimore, D. (1979). Influence of pesticides on the soil algal flora. *Residue Reviews*, 72, pp.1–31. [Online]. Available at: doi:10.1007/978-1-4612-6214-5_1.

Nabout, J., da Silva Rocha, B., Carneiro, F. and C.L, S. (2013). How many species of Cyanobacteria are there? Using a discovery curve to predict the species number. *Biodiversity and Conservation*, 22. [Online]. Available at: doi:10.1007/s10531-013-0561-x.

- Noreña-Caro, D. and Benton, M. G. (2018). Cyanobacteria as photoautotrophic biofactories of high-value chemicals. *Journal of CO2 Utilization*, 28, pp.335–366. [Online]. Available at: doi:10.1016/j.jcou.2018.10.008.
- Nozzi, N. E., Oliver, J. W. K. and Atsumi, S. (2013). Cyanobacteria as a Platform for Biofuel Production. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 1, pp.7–7. *PubMed* [Online]. Available at: doi:10.3389/fbioe.2013.00007.
- OECD. (2011). *Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test*. [Online]. Available at: doi:10.1787/9789264069923-en.
- Padhy, R. N. (1985). Cyanobacteria and pesticides. In: Gunther, F. A. (Ed). *Residue Reviews*. 1985. Springer New York. pp.1–44.
- Padhy, R. N. and Rath, S. (2015). Probit Analysis of Carbamate-Pesticide-Toxicity at Soil-Water Interface to N₂-Fixing Cyanobacterium *Cylindrospermum* sp. *Rice Science*, 22 (2), pp.89–98. [Online]. Available at: doi:10.1016/j.rsci.2015.05.012.
- Paerl, H. and Otten, T. (2013). Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microbial ecology*, 65. [Online]. Available at: doi:10.1007/s00248-012-0159-y.
- Paerl, H. W. (2013). Marine plankton. *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*, pp.127–153. [Online]. Available at: doi:10.1007/978-94-007-3855-3_5.
- Panigrahi, S., Padhy, S. and Padhy, R. N. (2003). Toxicity of parathion-methyl to cells, akinetes and heterocysts of the cyanobacterium *Cylindrospermum*, sp. and the probit analysis of toxicity. *Annals of Applied Biology*, 143 (2), pp.195–202. [Online]. Available at: doi:10.1111/j.1744-7348.2003.tb00286.x.
- Pathak, J., Rajneesh, Maurya, P. K., Singh, S. P., Häder, D.-P. and Sinha, R. P. (2018). Cyanobacterial Farming for Environment Friendly Sustainable Agriculture Practices: Innovations and Perspectives. *Frontiers in Environmental Science*, 6, p.7. [Online]. Available at: doi:10.3389/fenvs.2018.00007.
- Petrić, I., Bru, D., Udiković-Kolić, N., Hršak, D., Philippot, L. and Martin-Laurent, F. (2011). Evidence for shifts in the structure and abundance of the microbial community in a long-term PCB-contaminated soil under bioremediation. *Journal of Hazardous Materials*, 195, pp.254–260. [Online]. Available at: doi:10.1016/j.jhazmat.2011.08.036.
- Petric, I., Karpouzas, D. G., Bru, D., Udikovic-Kolic, N., Kandeler, E., Djuric, S. and Martin-Laurent, F. (2016). Nicosulfuron application in agricultural soils drives the selection towards NS-tolerant microorganisms harboring various levels of sensitivity to nicosulfuron. *Environmental Science and Pollution Research*, 23 (5), pp.4320–4333. [Online]. Available at: doi:10.1007/s11356-015-5645-6.
- Pipe, A. E. (1992). Pesticide Effects on Soil Algae and Cyanobacteria. In: Ware, G. W. (Ed). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews*. New York, NY : Springer US. pp.95–170. [Online]. Available at: doi:10.1007/978-1-4613-9751-9_4.

- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. and Stanier, R. Y. (1979). Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Microbiology*, 111 (1), pp.1–61.
- Ritchie, R. J. (2006). Consistent Sets of Spectrophotometric Chlorophyll Equations for Acetone, Methanol and Ethanol Solvents. *Photosynthesis research*, 89, pp.27–41. [Online]. Available at: doi:10.1007/s11120-006-9065-9.
- S Dow, C. and K Swoboda, U. (2007). Cyanotoxins. In: *Advances in Botanical Research - ADVAN BOTAN RES*. 27. pp.613–632. [Online]. Available at: doi:10.1007/0-306-46855-7_22.
- Safařík, I. V. O. and Šantrůčková, H. (1992). Direct determination of total soil carbohydrate content. *Plant and Soil*, 143 (1), pp.109–114. [Online]. Available at: doi:10.1007/BF00009135.
- Sattelle, D. B., Cordova, D. and Cheek, T. R. (2008). Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. *Invertebrate Neuroscience*, 8 (3), p.107. [Online]. Available at: doi:10.1007/s10158-008-0076-4.
- Seckbach, J. and J. Stal, L. (2007). *Cyanobacteria: Diversity and versatility, Clues to Life in Extreme Environments*.
- Sepehr, A., Hassanzadeh, M. and Rodriguez-Caballero, E. (2019). The protective role of cyanobacteria on soil stability in two Aridisols in northeastern Iran. *Geoderma Regional*, 16, p.e00201. [Online]. Available at: doi:10.1016/j.geodrs.2018.e00201.
- Shariatmadari, Z., Riahi H. (2012). A Taxonomic Study On Soil Taxa Of *Cylindrospermum Kützing Ex Bornet & Flahault* (Nostocaceae) In Iran. *The Iranian Journal Of Botany*, 18 (1 (35)), Pp.130–140. *Sid*.
- Silva, V., Mol, H. G. J., Zomer, P., Tienstra, M., Ritsema, C. J. and Geissen, V. (2019). Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded. *Science of The Total Environment*, 653, pp.1532–1545. [Online]. Available at: doi:10.1016/j.scitotenv.2018.10.441.
- Singh, A. K., Singh, P. P., Tripathi, V., Verma, H., Singh, S. K., Srivastava, A. K. and Kumar, A. (2018). Distribution of cyanobacteria and their interactions with pesticides in paddy field: A comprehensive review. *Journal of Environmental Management*, 224, pp.361–375. [Online]. Available at: doi:10.1016/j.jenvman.2018.07.039.
- Singh, J. S., Kumar, A., Rai, A. N. and Singh, D. P. (2016). Cyanobacteria: A Precious Bio-resource in Agriculture, Ecosystem, and Environmental Sustainability. *Frontiers in microbiology*, 7, pp.529–529. *PubMed* [Online]. Available at: doi:10.3389/fmicb.2016.00529.
- Singh, L. J. and Tiwari, D. N. (1988). Some important parameters in the evaluation of herbicide toxicity in diazotrophic cyanobacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 64 (5), pp.365–370. [Online]. Available at: doi:10.1111/j.1365-2672.1988.tb05092.x.
- Singh, R., Parihar, P., Singh, M., Bajguz, A., Kumar, J., Singh, S., Singh, V. P. and Prasad, S. M. (2017). Uncovering Potential Applications of Cyanobacteria and Algal Metabolites in

Biology, Agriculture and Medicine: Current Status and Future Prospects. *Frontiers in microbiology*, 8, pp.515–515. *PubMed* [Online]. Available at: doi:10.3389/fmicb.2017.00515.

Sivonen, K. and Jussi, D. (2015). *Anatoxin-a and odorous metabolites in cyanobacteria : molecular detection of the producers*. In: 2015.

Stal, L. J. (2013). Cyanobacterial mats and stromatolites. *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*, pp.65–125. [Online]. Available at: doi:10.1007/978-94-007-3855-3_4.

Tice, M. M. and Lowe, D. R. (2004). Photosynthetic microbial mats in the 3,416-Myr-old ocean. *Nature*, 431 (7008), pp.549–552. [Online]. Available at: doi:10.1038/nature02888.

Whitton, B. (2007). *Soils and Rice-Fields*. In: pp.233–255. [Online]. Available at: doi:10.1007/0-306-46855-7_8.

Win, T. T., Barone, G. D., Secundo, F. and Fu, P. (2018). Algal Biofertilizers and Plant Growth Stimulants for Sustainable Agriculture. *Industrial Biotechnology*, 14 (4), pp.203–211. [Online]. Available at: doi:10.1089/ind.2018.0010.

Yadav, S., Rai, S., Rai, R., Shankar, A., Singh, S. and C. Rai, L. (2017). Cyanobacteria: Role in Agriculture, Environmental Sustainability, Biotechnological Potential and Agroecological Impact. In: *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives*. pp.257–277. [Online]. Available at: doi:10.1007/978-981-10-6593-4_10.

Web Izvori:

1. - https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides_en 28.7. 2019.
2. - <http://www.algaebase.org/browse/taxonomy/?id=5017> 31.7. 2019.
3. - <http://www.algaebase.org/browse/taxonomy/?id=6813> 31.7. 2019.
4. - <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=EN> 10.8.2019.