

"Utjecaj različitih koncentracija silikata na abundaciju dijatomeje *Chaetoceros gracilis* (Schutt, 1985) u uzgojnim uvjetima"

Prečanica, Mario

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Dubrovnik / Sveučilište u Dubrovniku**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:155:860322>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Dubrovnik](#)



SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU
ODJEL ZA AKVAKULTURU
PREDDIPLOMSKI STUDIJ AKVAKULTURA

Mario Prečanica

**Utjecaj različitih koncentracija silikata na abundanciju dijatomeje
Chaetoceros gracilis (Schutt, 1985) u uzgojnim uvjetima**

ZAVRŠNI RAD

Dubrovnik, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU
ODJEL ZA AKVAKULTURU
PREDDIPLOMSKI STUDIJ AKVAKULTURA

Mario Prečanica

**Utjecaj različitih koncentracija silikata na abundanciju dijatomeje
Chaetoceros gracilis (Schutt, 1985) u uzgojnim uvjetima**

ZAVRŠNI RAD

Mentor: doc. dr. sc. Josip Mikuš
Komentor: doc. dr. sc. Kruno Bonačić

Dubrovnik, rujan 2018.

Ovaj završni rad je izrađen pod stručnim vodstvom profesora doc. dr. sc. Josipa Mikuša i doc. dr. sc. Kruna Bonačića, u sklopu preddiplomskog studija Akvakultura na Odjelu za akvakulturu Sveučilišta u Dubrovniku.

SAŽETAK

U ovom radu predstavljeni su rezultati uzgoja dijatomeje *Chaetocheros gracilis* (Schutt, 1985) pri različitim koncentracijama silikata. Istraživanje opisuje brzinu rasta vrste *C. gracilis*, duljinu svake faze uzgoja te razlike navedenog pri različitim koncentracijama silikata.

U pokusu se koristila 1 kontrolna i 3 testne grupe u duplikatu. Koristio se Guillardov F/2 hranjivi medij, ali s različitim koncentracijama silikata. U kontrolnoj grupi je sve rađeno po standardiziranom protokolu, dok se u testnim grupama radilo: u početnoj fazi s normalnom količinom silikata, a u drugoj fazi s dvostrukom količinom silikata (grupa 2), u početnoj fazi bez silikata, a u drugoj fazi s normalnom količinom silikata (grupa 3), u početnoj fazi bez silikata, a u drugoj fazi s dvostrukom količinom silikata (grupa 4). Koncentracija algi je mjerena na dnevnoj bazi, i rezultati su pokazali da dodavanje veće koncentracije ne uzrokuje brži rast i veću koncentraciju algi, ali pridonosi većoj stabilnosti kultura algi jer produžuje stacionarnu fazu rasta i ne dolazi do naglog pada koncentracije algi nakon što su alge dosegnule svoju maksimalnu koncentraciju.

Sve grupe su pokazale slične maksimalne koncentracije algi i rast u lag fazi. Grupe gdje su dodane dvostruke količine silikata od propisanog u GF/2 mediju su u drugom stadiju uzgoja pokazale dulju stacionarnu fazu bez naglog pada koncentracije algi koje su se dogodile u grupama gdje je dodana normalna količina silikata po GF/2 mediju.

Ključne riječi: fitoplankton, mikroalge, akvakultura, dijatomeje, Guillardov F/2 hranjivi medij, silikat

ABSTRACT

This paper presents the results of cultivation of the diatom *Chaetocheros gracilis* (Schutt, 1985) at varying concentrations of silicates. The study describes the growth rate of *C. gracilis* and the length of each stage of cultivation at different concentrations of silicates.

The experiment used 1 control and 3 test groups in duplicate. The nutrient medium that was used was Guillard F/2, but with different concentrations of silicates. In the control group everything was done according to a standardized protocol, while the test groups worked: in the initial stage with the normal amount of silicate and in the second stage with a double amount of silicate (S+/++), in the initial stage without silicate and in the second phase with the normal amount of silicate (S-/++), in the initial phase without silicate, and in the second phase with the double amount of silicate (S-/++). Algal concentration was measured on a daily basis, and results showed that adding a higher concentration of silicates did not cause faster growth and higher algal concentration, but contributed to greater stability of the algal culture by prolonging the stationary growth phase and not causing a sudden decrease in algal levels after the culture reached its maximum concentration.

All groups showed similar maximum algal concentrations and growth in the lag phase. Groups where a double amount of silica in the GF/2 medium was added to the second stage of growing showed a longer stationary phase without a sudden decrease in algal concentrations occurring in the groups where the normal amount of silica was added to the GF/2 medium.

Key words: phytoplankton, microalgae, aquaculture, diatoms, Guillard's F/2 nutrient media, silicate.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
1.1. Klasifikacija dijatomeja.....	2
1.2. Osnovne morfološko-fiziološke značajke dijatomeja.....	4
1.3. Stanište i rasprostranjenost dijatomeja.....	6
1.4. Razmnožavanje dijatomeja	6
1.4.1. Nesporno razmnožavanje.....	7
1.4.2. Sporno razmnožavanje.....	8
1.5. Ekonomski značaj dijatomeja.....	9
1.6. Faze raste mikroalgi u uzgoju.....	9
1.7. Uzgoj dijatomeja.....	10
2. MATERIJALI I METODE.....	13
2.1. Priprema Guillardovog F/2 medija.....	13
2.2. Priprema startne kulture.....	14
2.3. Prebacivanje startnih kultura u Erlenmeyerove tikvice od 250ml.....	15
2.4. Dezinfekcija vode za Erlenmeyerove tikvice od 5 l.....	16
2.5. Prebacivanje algi iz volumena od 250 mL u volumen od 5 l.....	16
2.6. Postavljanje aeracije.....	16
2.7. Svjetlost i temperatura.....	19
2.8. Postavljanje pokusa.....	19
2.9. Određivanje koncentracije algi Neubaerovom komorom.....	20
3. REZULTATI.....	22
4. RASPRAVA.....	27
5. ZAKLJUČAK.....	29
6. LITERATURA.....	30

1. UVOD

Mikroalge su jednostanični autotrofni organizmi koji koriste ugljikov dioksid i hranjive tvari koje se nalaze u vodi te pomoću svjetlosti kao izvora energije proizvode organsku tvar i kisik u procesu fotosinteze. Smatra se da su mikroalge odgovorne za proizvodnju 50% svog kisika na Zemlji (<https://www.livescience.com>). Osnova su skoro svake hranidbene mreže u akvatičnom mediju gdje služe kao izvor hrane za sav zooplankton, sve razvojne stadije školjkaša, ličinačke stadije drugih vrsta mekušaca te rakova, bodljikaša, riba i mnogih drugih meroplanktonskih organizama (FAO, 1996).

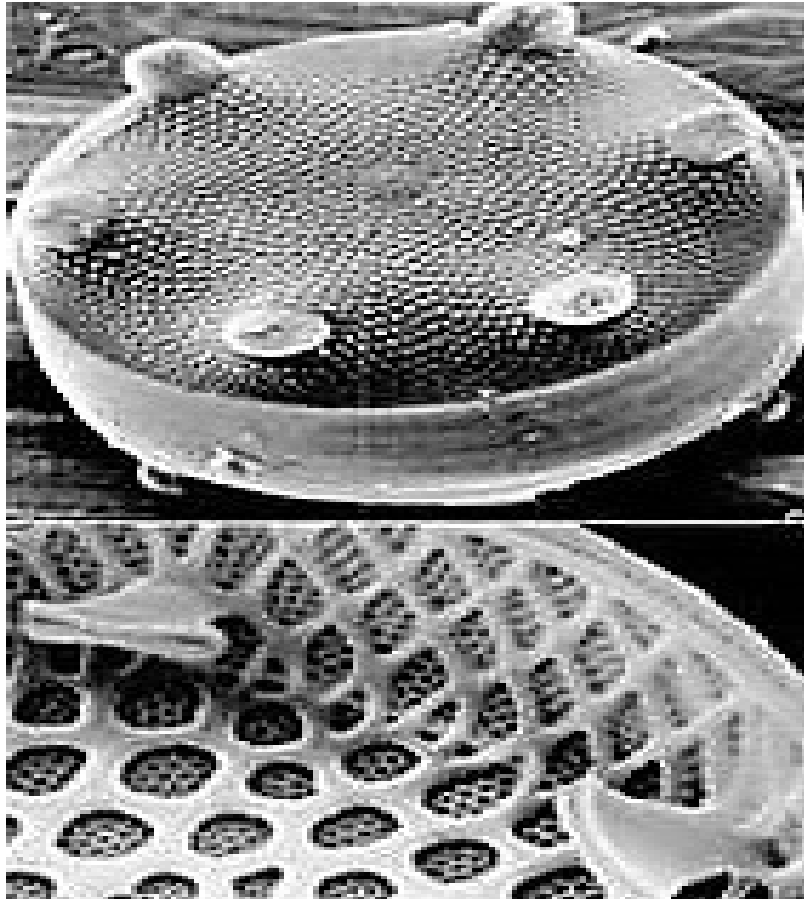
U akvakulturi mikroalge se primarno koriste u mrjestilištima, gdje služe kao hrana za uzgoj zooplanktona (račić *Artemia* sp., kopepodi, kolnjaci), kozica, te u tehnologiji uzgoja zelenih voda (FAO, 1996). Interes za mikroalge u akvakulturi je započeo s prvim mrjestilištima riba i školjkaša, danas su osnovni uvjet za skoro svako mrjestilište u akvakulturi, a kako akvakultura u svijetu raste iz godine u godinu s time raste i potražnja za mikroalgama (FAO, 2015).

Dijatomeje ili alge kremenjašice jedna su od najbrojnih skupina mikroalgi. Pretpostavlja se da postoji skoro 10000 vrsta dijatomeja koje su odgovorne za čak četvrtinu sveukupne fotosintetske proizvodnje na svijetu (Sumper i Bruner, 2006). Razlikuju se od drugih mikroalgi po jedinstvenim značajkama i sve više istraživanja se provodi u svrhu njihova mogućeg iskorištavanja u komercijalne svrhe.

1.1. Klasifikacija dijatomeja

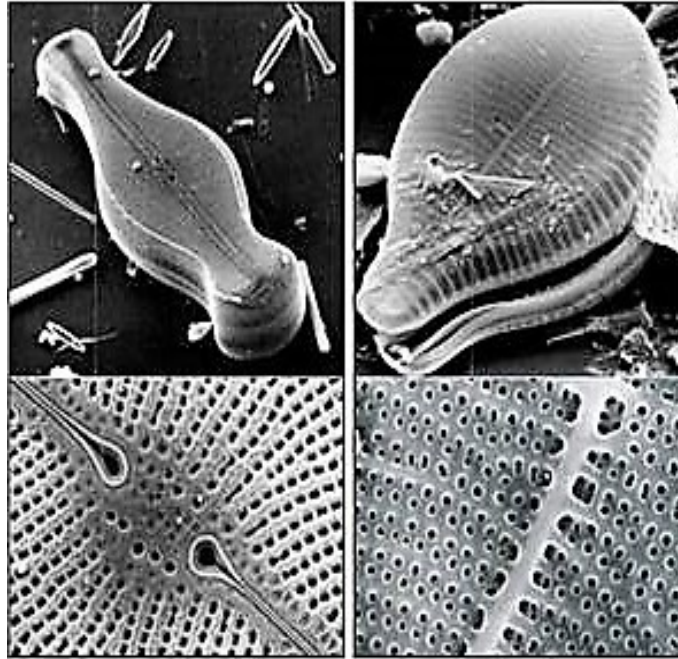
Dijatomeje spadaju u carstvo Protocista, odjel Chrysophyta i razred Bacillariophyceae (sin. Diatomea) koji se dijeli u dva reda: Centrales i Pennales (Viličić, 2002).

Red Centrales su alge kružnog oblika i radijalne simetrije (slika 1). Žive kao planktonski organizmi u moru i vodama na kopnu (npr. vrste rodova: *Aulacoseira*, *Melosira*, *Urosolenia*; Round i sur., 1990).



Slika 1. Radijalno simetrične Centrales (Preuzeto s: Kröger i Poulsen, 2008).

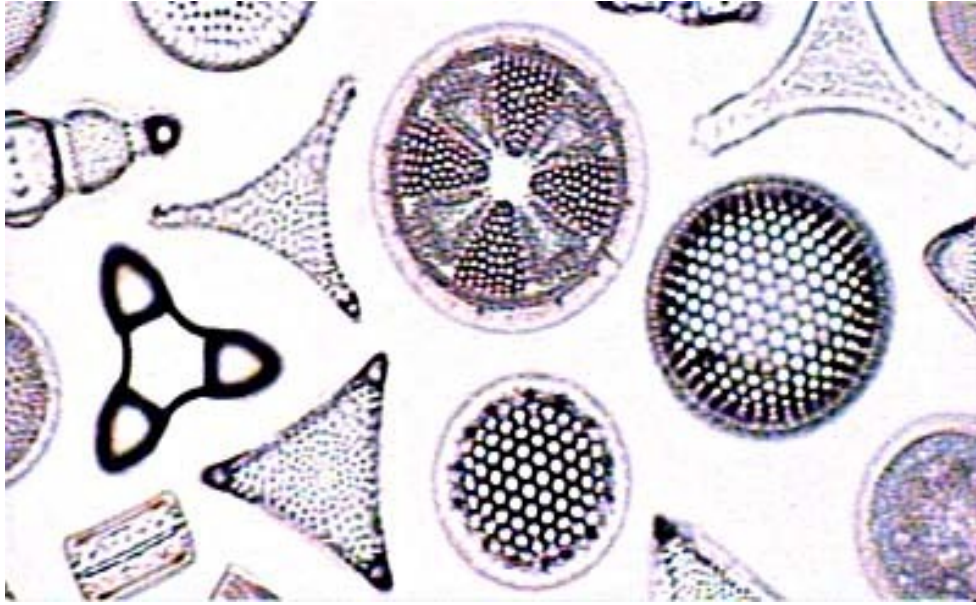
Red Pennales su bilateralno simetrične alge u obliku štapića (izdužene) ili koplja (slika 2). Žive u bentosu i rijetko kada ih nalazimo u planktonu. Spolni način razmnožavanja je izogamija, koja je za njih karakteristična budući da su gamete (izogamete) bez bičeva i morfološki potpuno identične. Kod nekih vrsta na ljušturi nalazimo rafu, dok kod drugih vrsta ona izostaje (Round i sur., 1990).



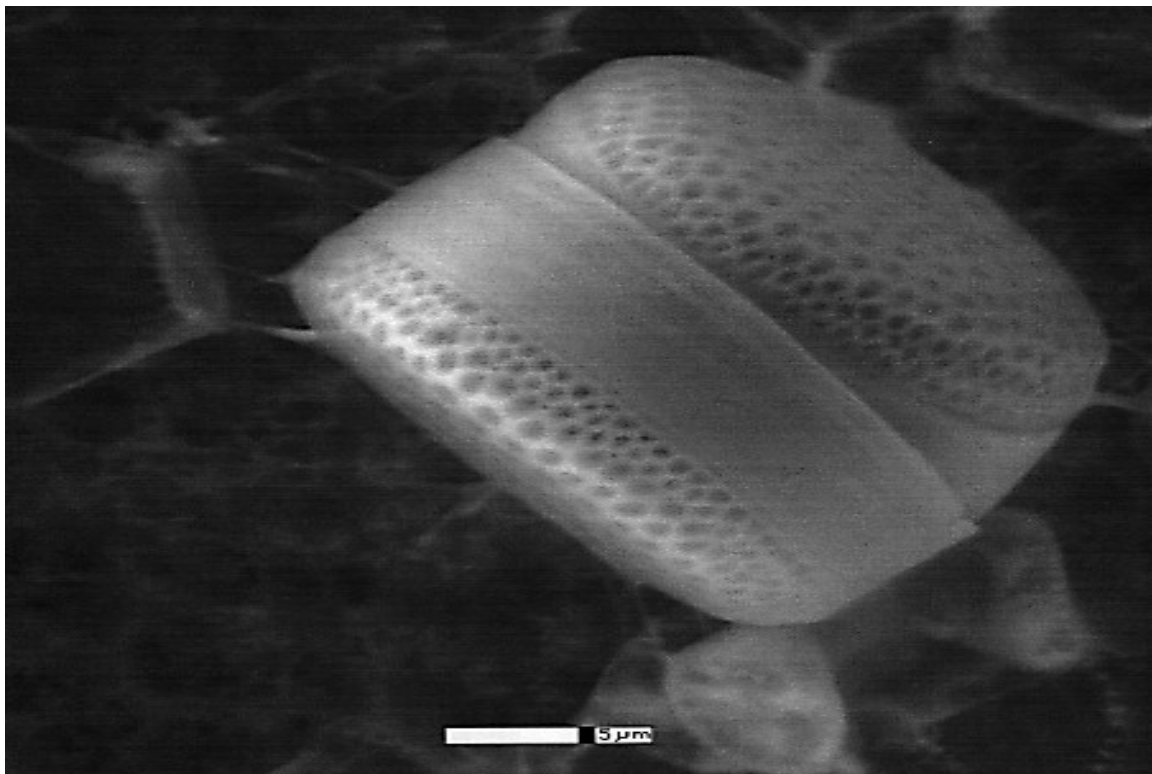
Slika 2. Dijatomeje iz skupine Pennales (Preuzeto s: Kröger i Poulsen, 2008).

1.2. Osnovne morfološko-fiziološke značajke dijatomeja

Veličina stanice dijatomeja varira od vrste do vrste, u rasponu od 2 μm do 200 μm (Thomas, 1996); (slika 3). Razlikuju se od ostalih mikroalgi jer imaju ljušturu frustulu koja se sastoji od dvije valve (epiteke i hipoteke). Frustula je tvrda vanjska stanična stijenka građena od silikata i organskih sastojaka. Upravo zbog izgradnje frustule dijatomejama su potrebni silikati u okolnoj vodi. Epiteka se preklapa preko hipoteke (slika 4) i međusobno su povezane strukturom nalik pojasu koju nazivamo cingulum (Crawford i sur., 2001). Unutrašnjost se sastoji od protoplasta u kojemu nalazimo organele karakteristične za eukariotske alge. Plastidi (kromatofori) sadrže karotenoidne pigmente (najviše β -karoten, diatoksantin, diadinoksantin i fukoksantin) koji maskiraju zeleni klorofil i stanicama daju smeđu boju. Većina dijatomeja se ne može kretati samostalno i ovisi o strujanju vode, ali postoji nekoliko vrsta koje čine iznimku (Round i sur., 1990). Zbog vrlo teške frustule lako tonu na dno. Oslanjaju se na turbulentno miješanje gornjih slojeva vode s vjetrom kako bi se zadržali u površinskim vodama gdje im je dostupna sunčeva svjetlost. Jedini mehanizam za reguliranje pozitivne plovnosti je ionska crpka (Anderson i Sweeney, 1977).



Slika 3. Različiti oblici dijatomeja (Preuzeto s: <http://www.ucmp.berkeley.edu>).



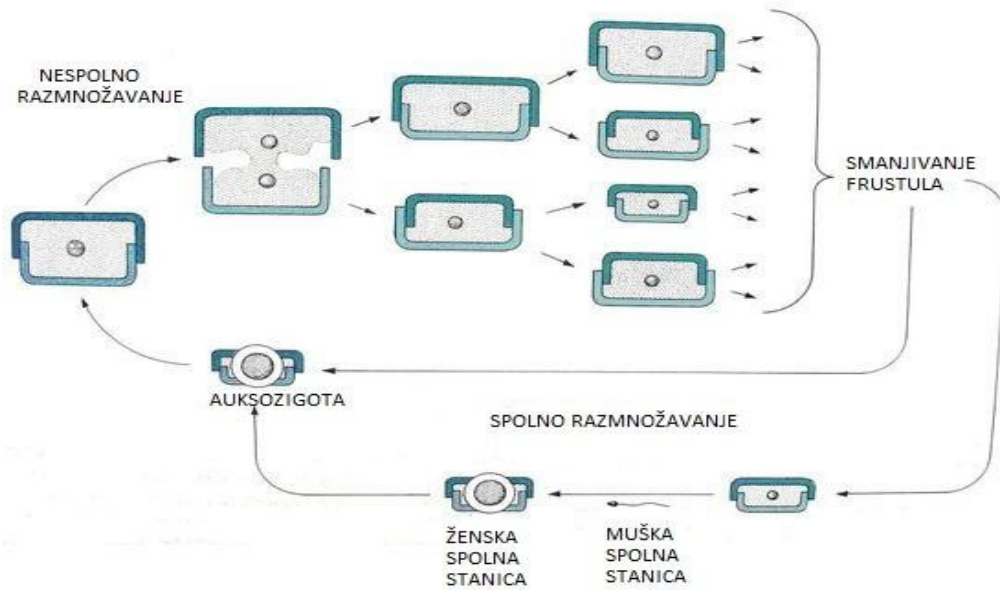
Slika 4. Prikaz epiteke koja se preklapa preko hipoteke (Preuzeto s: <http://www.ucmp.berkeley.edu>).

1.3. Stanište i rasprostranjenost dijatomeja

Dijatomeje žive u svakom vodenom ili vlažnom mediju, od morskih staništa kao što su oceani, mora i lagune do rijeka, jezera pa i najmanjih lokvi. Dominantne su brojnošću i biomasom u većini obalnih mora i jedna su od glavnih sastavnica fitoplanktona. Najčešće borave blizu površine zbog izvora svjetlosti i nutrijenata. Diyatomeje zahtijevaju vodu bogatu nutrijentima, posebno silikatima što govori podatak da iskoriste preko 6,7 milijardi tona silicija godišnje iz oceana u kojem se nalaze (Treguer i sur., 1995). Mogu živjeti odvojeno ili u kolonijama pri čemu se jedinke iste vrste međusobno povezuju u lance. Također, rastu pričvršćeni na bentoske podloge, plutajuće otpatke i makrofite, te su sastavni dio perifitonske zajednice (Wehr i sur., 2014). U nepovoljnim uvjetima mogu stvarati trajne ciste (spore), koje se nazivaju hipnospore. Stvaraju tvrdu silificiranu ljušturu s ciljem da potonu u hladniju vodu koja je bogatija nutrijentima, čekajući opet povoljne uvjete (French i Hargraves, 2004).

1.4. Razmnožavanje dijatomeja

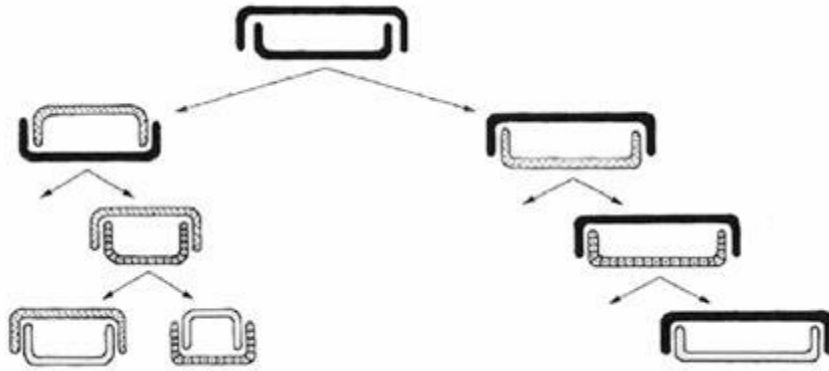
Dijatomeje imaju dva načina razmnožavanja: spolno i nespolno (slika 5). Do spolnog razmnožavanja dolazi kada je veličina stanice manja od kritične razine, te je to najčešći način vraćanja veličine stanica.



Slika 5. Prikaz nespolnog i spolnog razmnožavanja kod dijatomeja (Preuzeto s: Castro i Huber, 2005).

1.4.1. Nespolno razmnožavanje

Dijatomeje imaju sposobnost dvojne diobe, što im je i primarni način razmnožavanja. DNK prolazi kroz replikaciju koja uzrokuje podjelu kromosoma u dvije identične polovice, što dovodi do formiranja dvije frustule. Svaka stanica kćer prima jednu od frustula roditeljske stanice, kao i kod drugih organizama koji se nespolno razmnožavaju. To uzrokuje malu frustulu ili hipoteku da stvori veću frustulu. Roditeljska stanica raste te se dijeli na dvije stanice kćeri. Ova vrsta razmnožavanja uzrokuje smanjenje veličine stanica kćeri od prosječne veličine. Postepeno dolazi do smanjenja veličina stanica, na samo jednu trećinu njihove maksimalne veličine (slika 6). Ovaj način vegetativnog razmnožavanja je jedinstven u dijatomeja. Kako bi se vratile u svoju prvobitnu veličinu, moraju proći kroz spolno razmnožavanje (<https://biologywise.com>).



Slika 6. Pojedostavljeni prikaz nespolnog razmnožavanja dijatomeja (Preuzeto s: MacDonald 1869, Pfitzer 1869).

1.4.2. Spolno razmnožavanje

Vrsta reda Centrales karakterizira oogamično razmnožavanje. Muška stanica diobom stvara niz diferenciranih odjeljaka kako bi se formirao ograničen broj mikrospora, obično četiri. Mikrospore prolaze mejozu te nastaje flagelirana sperma. Oogamične ženske stanice proizvode jedno ili dva jaja pri čemu protoplast od ženke olakšava ulaz spermija i pogoduje oplodnji. Oplodnjom dobivamo zigotu sferičnog oblika koja se povećava unosom vode kako bi se formirale auksospore. Podjela auksospora proizvodi stanice maksimalne veličine za tu određenu vrstu (Jeon, 2004).

Kod vrsta reda Pennales spolno razmnožavanje je izogamično. Stanice se spajaju i prolaze mejozu. Samo jedna ili dvije jezgre su spolno funkcionalne. Nastajanje gameta iz frustula je povezano s proizvodnjom sluzi koja okružuje kopulirajuće stanice. Gamete se konjugiraju kako bi proizvele obično jednu ili dvije auksospore po jednom roditeljskom paru. Kao u vrstama iz reda Centrales, auksospora se dijeli kako bi se proizvele stanice obnovljene veličine (Jeon, 2004).

1.5. Ekonomski značaj dijatomeja

Izvori nafte se iscrpljuju u cijelom svijetu i počinju se tražiti alternativni izvori goriva. Upravo tu mnogi vide svijetlu budućnost u dijatomejama. Već su se počele masovno uzgajati za proizvodnju biogoriva iz više razloga: jednostavne su za uzgoj, sadrže dosta masnih kiselina i organskih molekula, imaju veliku količinu silicija, vrlo brzo se razmnožavaju (1-3 puta dnevno), godišnja produktivnost biomase mikroalga po jedinici volumena znatno premašuje produktivnost po jedinici zemljišta kopnenih biljaka (Samantray i sur., 2010).

Školjkašima su dijatomeje, u kombinaciji s bičašima, od esencijalne važnosti za pravilan rast i razvoj vanjske ljuštore, zbog čega su dijatomeje iznimno važan dio prehrane za sve razvojne stadije školjkaša (FAO, 1996). Kao prva hrana u mrjestilištima često se koristi zooplankton (račić *Artemia* sp., kopepodi, kolnjaci), a dijatomeje su zbog svoje male veličine i odličnog nutritivnog sastava odnosno bogatog udjela masnih kiselina, odlična hrana za sam rast i razmnožavanje zooplanktona kao i za obogaćivanje zooplanktona kako bi se unaprijedio njegov nutritivni sastav pri hranjenju ličinki riba (Brown, 2002).

1.5. Faze rasta mikroalgi u uzgoju

Postoji nekoliko faza rasta u uzgojnoj kulturi alga (slika 7). Prva faza je lag ili indukcijska faza. U ovoj početnoj fazi dolazi do sporog povećanja gustoće stanica. Kulture inokulirane eksponencijalno razmnožavajućim algama imaju brzu lag fazu, što može uveliko smanjiti vrijeme potrebno za *upscaling*. Odstupanje od rasta pripisuje se fiziološkoj prilagodbi metabolizma stanica na rast, kao što je povećanje razine enzima i metabolita koji su uključeni u podjelu stanica i fiksaciju ugljika (FAO, 1996).

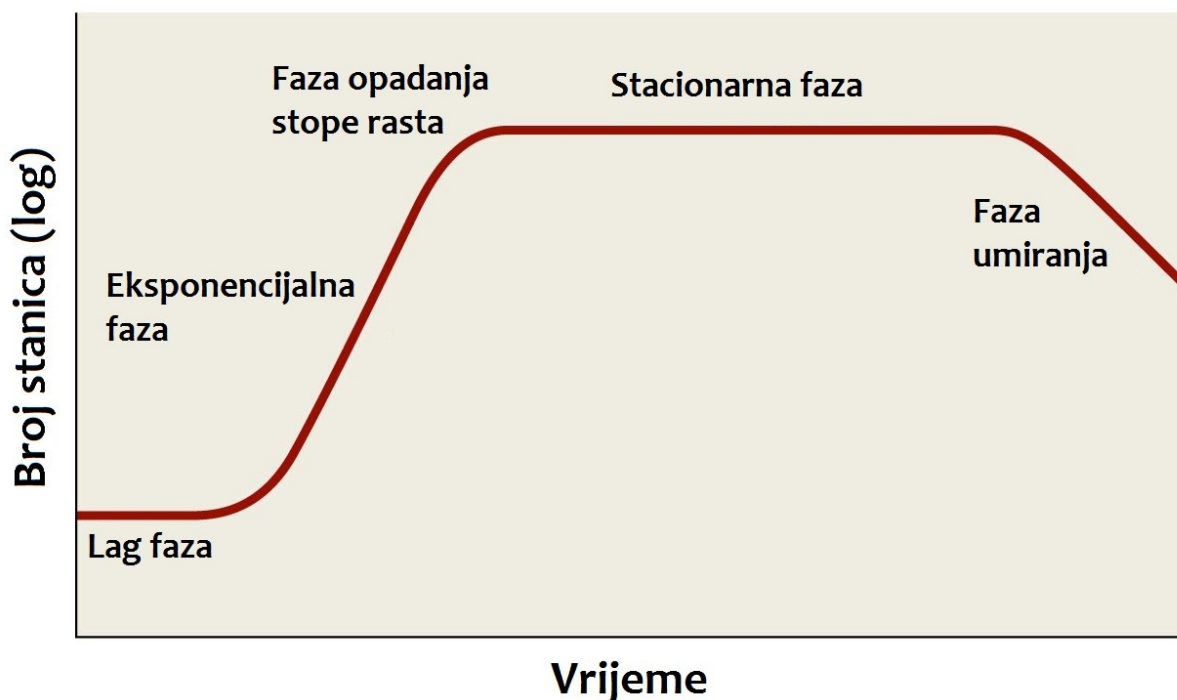
Druga faza je faza eksponencijalnog rasta. Tijekom ove faze gustoća stanica povećava se kao funkcija vremena t prema logaritamskoj funkciji: $C_t = C_0 \times e^{(m \times t)}$ (C_t i C_0 su koncentracije stanica u vremenu t i 0 ; m = specifična stopa rasta). Specifična stopa rasta uglavnom ovisi o vrstama algi, intenzitetu svjetlosti i temperaturi.

Treća faza je faza opadanja rasta. Podjela stanica se usporava kada hranjive tvari, svjetlo, pH, ugljični dioksid ili drugi fizički i kemijski čimbenici počinju ograničavati rast.

Četvrta faza je stacionarna faza koja nastaje kada ograničavajući čimbenik i stopa rasta dolaze u ravnotežu, što rezultira relativno konstantnom gustoćom stanica.

Opadajuća faza je u posljednjoj fazi, kada se kvaliteta vode pogoršava i hranjive tvari su već iscrpljene do razinane podobnih za održavanje rasta. Gustoća stanica se brzo smanjuje, a kultura algi se konačno ruši. U praksi, padovi kultura mogu imati različite uzroke, uključujući iscrpljivanje hranjivih tvari, nedostatak kisika, pregrijavanje, neodgovarajući pH ili zbog kontaminacije drugim organizmima.

Važno je naglasiti da su mikroalge najkvalitetnije za hranidbu kada se nalaze u eksponencijalnoj fazi (FAO, 1996).



Slika 7. Faze rasta mikroalgi (Preuzeto s: FAO, 1996).

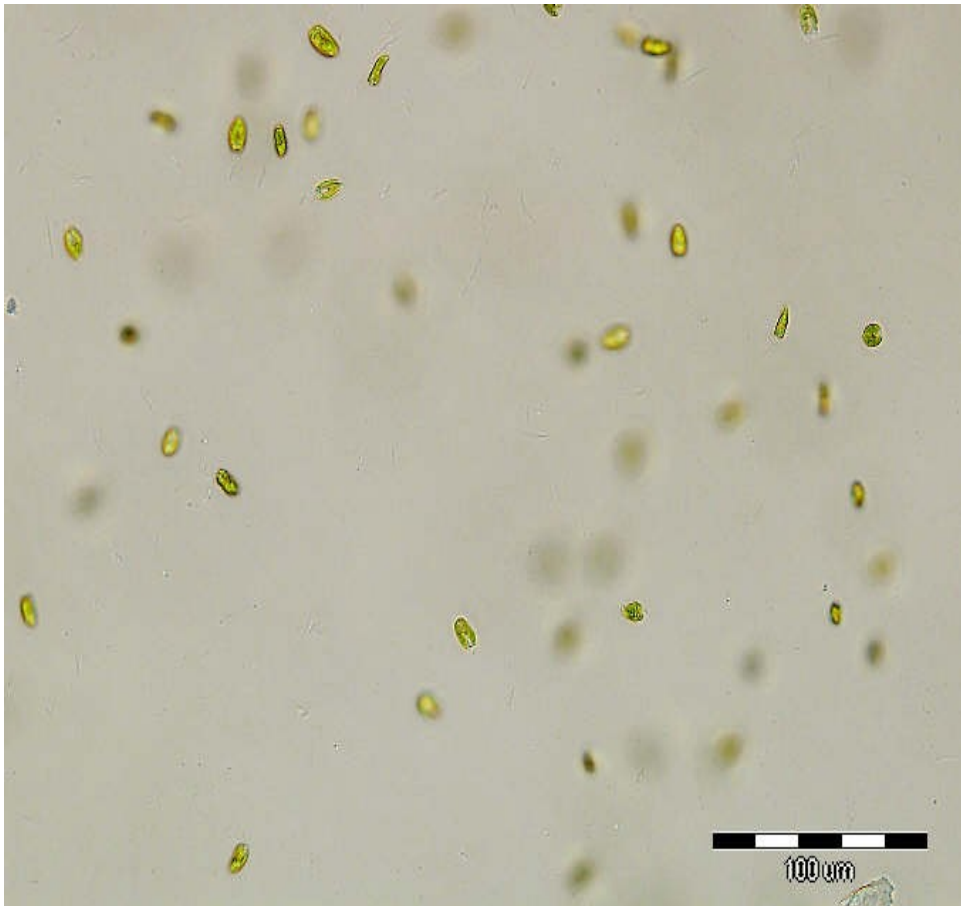
1.6. Uzgoj dijatomeja

Uzgoj dijatomeja se razlikuje od uzgoja ostalih mikroalgi zbog njihovih posebnih značajki. Nedostatak organa za kretanje često rezultira njihovim nakupljanjem na dnu uzgojnih sustava.

Također, glavni limitirajući čimbenik za proliferaciju dijatomeja su silikati. Gibson i sur. (2000) utvrdio je da rast i koncentracija dijatomeja ovisi o koncentraciji silikata u vodi. U jezeru Lough Neagh koncentracije silikata počinju rasti na ljeto i najviša koncentracija očitava se zimi. Primijećeno je da su dijatomeje postizale najvišu gustoću zimi kada je koncentracija silikata bila najviša i ostajala stabilna sve dok je bilo dostupnih silikata u vodi. Nakon što bi dijatomeje iscrpile silikate iz vode, njihova koncentracija dijatomeja bi također opala. Na kraju ljeta, kada bi koncentracija silikata opet počela rasti, postepeno ju je pratila i koncentracija dijatomeja.

Pretpostavka u našem pokusu je da bi dijatomeje mogle doživjeti veće maksimalne koncentracije i stabilnije kulture, bez naglog pada ako su im dodane veće količine silikata. Također, željelo se vidjeti ima li razlike u brzini rasta populacije i maksimalnoj koncentraciji dijatomeja, ako im u početnom dijelu uzgoja nisu dodani silikati, te hoće li doći do bržeg ili sporijeg rasta, odnosno do kompenzacije za inicijalni nedostatak silikata u slučaju naknadnog izlaganja duploj koncentraciji.

Vrsta *Chaetoceros gracilis* (Schutt, 1985) je izabrana za ovaj pokus jer je jedna od najčešće korištenih dijatomeja u akvakulturi (slika 8). Pripada redu Centrales, pa je tako karakterizira oogamično spolno razmnožavanje. Vrlo je zahvalna u uzgoju jer čak i u prirodi, kad je dostupno mnogo nutrijenata, ona će često nadvladati ostale vrste mikroalgi i postati dominantna vrsta (Simon, 1978). Primarno se koristi kao hrana u mrjestilištima školjkaša, gdje je esencijalna za rast i razvoj svih razvojnih stadija, te kondicioniranje matičnog stoka (FAO, 1996).



Slika 8. Fotografija dijatomeje *Chaetoceros gracilis* (Schutt, 1895) korištene u ovom pokusu.

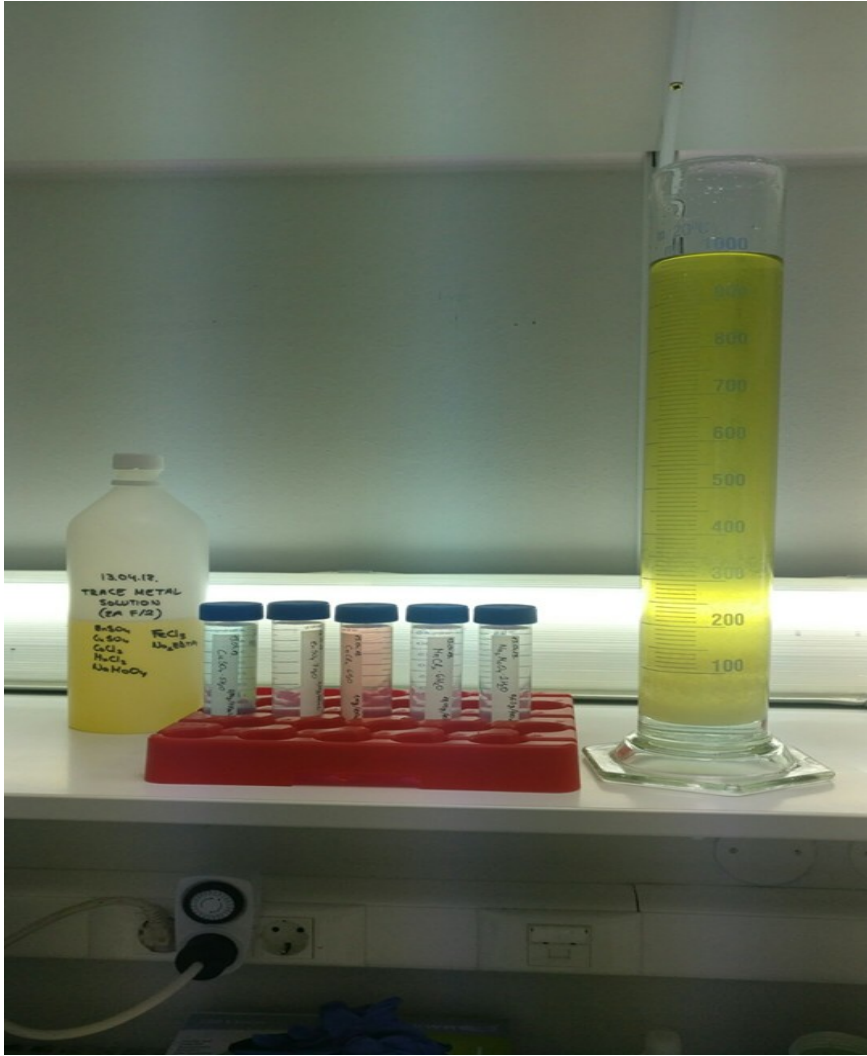
2. MATERIJALI I METODE

2.1. Priprema Guillardovog F/2 medija

Guillardov F/2 medij jedan je od najčešćih hranjivih medija koji se koristi za uzgoj mikroalgi (tablica 1). Pripreman je prema protokolu iz Guillard (1975) (slika 9).

Tablica 1. Prikaz sastojaka za pripravljanje Guillardovog F/2 medija (Guillard, 1975).

GLAVNI NUTRIJENTI	Kemijska formula	Koncentracija (g/l)
Nitrati	NaNO_3	75 g l^{-1}
Fosfati	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5 g l^{-1}
Silikati	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	30 g l^{-1}
METALI U TRAGOVIMA		
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$3,5 \text{ g l}^{-1}$
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$4,36 \text{ g l}^{-1}$
Otopiti u 900 ml destilirane vode te dodati 1 ml u sljedeću otopinu metala u tragovima		
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$0,98 \text{ g } 10^{-2} \text{ ml}^{-1}$
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,20 \text{ g } 10^{-2} \text{ ml}^{-1}$
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$1 \text{ g } 10^{-2} \text{ ml}^{-1}$
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$18 \text{ g } 10^{-2} \text{ ml}^{-1}$
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$0,63 \text{ g } 10^{-2} \text{ ml}^{-1}$
Dodati jedan ml l^{-1} u otopinu s glavnim nutrijentima		
Vitamini		
	Biotin	1 mg
	B 12	1 mg
	Tiamin HCl	20 mg
Otopiti vitamine u 1 l destilirane vode te dodati 0,5 ml otopine u 1 l morske vode		



Slika 9. Priprema Guillardovog F/2 medija.

2.2. Priprema startne kulture

Morska voda saliniteta 35 uzeta je iz bušotine u Bistrini koja se nalazi u Malostonskom zaljevu s dubine od 20 metara, te spremljena u tamne kanistre kapaciteta 25 l da služi kao izvor morske vode u laboratoriju. Voda je filtrirana kroz Munktell filter papir veličine pora 0,45 μm (slika 10). 15 ml filtrirane bušotinske vode prebačeno je u epruvete zajedno s Guillardovim F/2 hranjivim medijem (1 ml l^{-1}) i silicijem (1 ml l^{-1}), koje su zatvorene čepićima napravljenim od pamučne vate. Epruvete s filtriranom bušotinskom vodom, Guillardovim F/2 medijem i silicijem su zatim autoklavirane na temperaturi od 121°C , bez sušenja.



Slika 10. Munktell filter papir (veličina pora 0,45 μm) postavljen na filteru.

Radna je ploha dezinficirana 70%-tnim etanolom, a za rad su korištene jednokratne nitrilne rukavice također dezinficirane sa 70%-tnim etanolom. Pamučni čep je skidan samo iznad plamenika kako se epruveta i njen sadržaj ne bi kontaminirali mikrobima iz zraka, a sami grlić epruvete je dodatno uronjen u plamen za dezinfekciju stakla. Nastavci od mikropipeta su prije rada sterilizirani u autoklavu. Mikropipetom je uzeto 30 μl fitoplanktona iz matične kulture i prenijeto u epruvetu. Zatim je dodano 0,5 ml l^{-1} vitamina. Nakon dodavanja vitamina, epruveta je ponovno zatvorena pamučnim čepom. Startna kultura je stavljena pored laganog svjetla pri konstantnoj temperaturi prostorije od 19°C.

3.3. Prebacivanje startnih kultura u Erlenmeyerove tikvice od 250 ml

Priprema radne površine i filtriranje vode obavljeno je jednako kao i za startne kulture. Ovog puta je 150 ml filtrirane morske vode dodano u Erlenmeyerove tikvice volumena 250 ml i GF/2 hranjivog medija i silicija u jednakoj koncentraciji kao ranije. Tikvice su zatim začepljene čepom od pamučne vune i sterilne gaze (slika 11). Kao i ranije Erlenmeyerove tikvice s filtriranom bušotinskom vodom, G/F2 medijem i silicijem su stavljene na

sterilizaciju u autoklav na temperaturu od 121°C, bez sušenja. Nakon sterilizacije Erlenmeyerove tikvice je bilo potrebno ostaviti da se ohlade na sobnoj temperaturi do idućeg dana. Ohlađene tikvice su tada inokulirane s 3 ml startne kulture algi i 0,5 ml l⁻¹ vitamina. Postupak je izveden iznad plamenika kako bi se izbjegla moguća kontaminacija zrakom. Erlenmeyerove tikvice, ponovno začepljene čepom od vate i sterilne gaze, zatim su postavljene na policu ispred fluorescentnih svjetiljki koje su bile upaljene 24 h (slika 11).



Slika 11. Kultura vrste *Chaetoceros gracilis* u tikvicama od 250ml - prvi korak u eksperimentu.

3.4. Dezinfekcija vode za Erlenmeyerove tikvice od 5 l

Kao i za manje volumene, bušotinska voda je filtrirana kroz Munktell filter papir s veličinom pora od $0,45\mu\text{m}$. 4 l filtrirane bušotinske vode je dodano u Erlenmeyerove tikvice od 5 l. Zatim je dodano $0,2\text{ ml l}^{-1}$ izbjeljivača s 5% aktivnog klora. Nakon dobre aeracija prvih 30 minuta kako bi se klor što bolje izmiješao s vodom, grlić tikvice se prekrio folijom da klor ne ishlapi i tikvica se tako ostavila preko noći. Sljedeći dan, klor je neutraliziran s 12 mg l^{-1} natrijev-tiosulfat-pentahidrata.

3.5. Prebacivanje algi iz volumena od 250 ml u volumen od 5l

Hranjivi medij je dodavan u tikvice od 5 l tako da se prvenstveno sterilizirao u autoklavu. Da bi se to izvelo, prvo je 100 ml bušotinske vode profiltrirano kroz Munktell filter papir $0,45\ \mu\text{m}$ i prebačeno u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 250 ml. U istu Erlenmeyerovu tikvicu dodan je GF/2 medij i silikati u količini potrebnoj za jednu tikvicu od 5 l (5 ml obje otopine). Vrh tikvice je prekriven folijom te je tikvica stavljena u autoklav na sterilizaciju pri 121°C . Ovako sterilizirani i naknadno ohlađeni hranjivi medij je dodan velikim Erlenmeyerovim tikvicama od 5 l iznad plamenika. Vitamini su dodani mikropipetom u količini od $0,5\text{ ml l}^{-1}$ kao i čitava zrela kultura algi iz tikvica od 250 ml. Na kraju, držeći grlić tikvice iznad plamena stavljen je čep napravljen od vate i sterilne gaze koji je prethodno steriliziran u autoklavu.

3.6. Postavljanje aeracije

Gumene cjevčice za aeraciju su prethodno sterilizirane u menzuri, dodavanjem 2 ml l^{-1} izbjeljivača (5% aktivnog klora) i ostavljanjem preko noći. Sljedeći dan klor je neutraliziran s 12 mg l^{-1} natrij-tiosulfat-pentahidrata. Staklene pipete od 5 ml, koje se postavljaju unutar same tikvice za dovod zraka, također su sterilizirane pri 121°C , sa sušenjem. Jedan kraj gumene cjevčice bio je spojen na akvarijsku crpku za zrak a drugi na filter za zrak od $0,45\ \mu\text{m}$

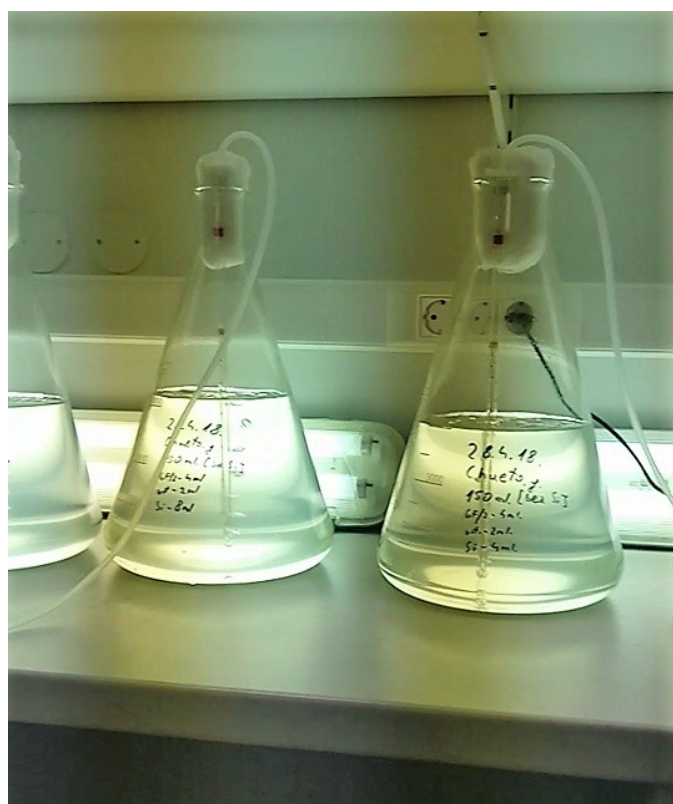
(slika 12). Druga cjevčica je „nizvodno“ od filtera je spojena na staklenu pipetu iznad plamenika (slika 13). Staklena pipeta, tako spojena na zračnu crpku, je stavljena kroz čep u Erlenmeyerovu tikvicu tako da joj je vrh tik iznad površine dna i u sredini tikvice. Cijeli vrh tikvice je omotan aluminijskom folijom zbog dodatnog smanjenja mogućnosti kontaminacije kulture (slika 14).



Slika 12. Filter za zrak koji se koristio za aeraciju tikvica od 5 l.



Slika 13. Postavljanje aeracije za tikvice od 5 l.



Slika 14. Početak uzgoja kultura vrste *Chaetoceros gracilis* u Erlenmeyerovim tikvicama od 5

l.

3.7. Svjetlost i temperatura

Za Erlenmeyerove tikvice od 250 ml korištena je svjetlost jačine 1000-1500 luxa. U sljedećem stadiju pokusa gdje su se koristile Erlenmeyerove tikvice od 5 l, korištene su fluorescentne cijevi jačine 2500 luxa. Fotoperiod koji se koristio bio je 24 h svjetla.

Optimalna temperatura za uzgoj mikroalgi je najčešće između 20 i 24°C iako se to može mijenjati s obzirom na uzgajane vrste i soj. Najčešće uzgajane vrste mikroalga podnose temperature između 16 i 27°C. Temperature niže od 16°C usporit će rast, dok one koje prelaze 35°C smrtonosne su za većinu vrsta (FAO, 1996).

Temperatura koja se koristila za ovaj eksperiment bila je 20-22°C te se održavala klima-uređajem u zatvorenom prostoru.

3.8. Postavljanje pokusa

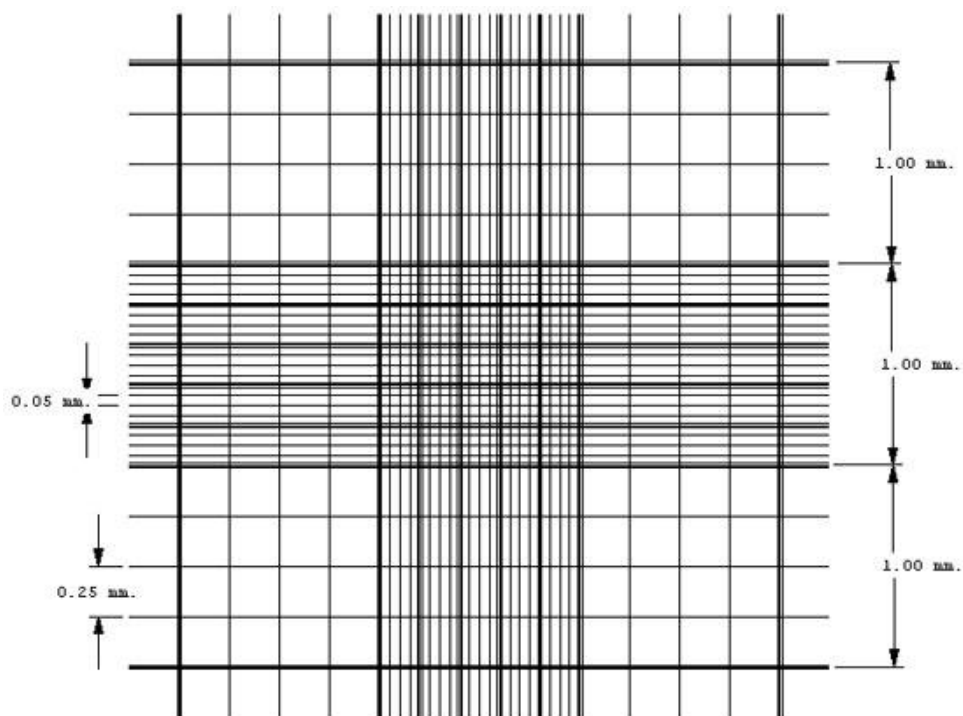
U pokusu je korištena kontrolna grupa i 3 pokusne grupe. Svaka grupa je određena u duplikatu ($n=2$), dakle ukupno je korišteno osam Erlenmeyerovih tikvica od 250 ml za početni stadij uzgoja i osam od 5 l za završni stadij.

Kontrolnoj grupi (S+/+) dodana je koncentracija silikata po protokolu Guillardovog F/2 hranjivog medija u početnom stadiju uzgoja (250 ml) i završnom stadiju uzgoja (5 l). Prvoj pokusnoj grupi (S-/+) u početnoj fazi uzgoja (250 ml) nisu dodani silikati, ali je u sljedećoj fazi uzgoja (5 l) dodano 1 ml l^{-1} silikata kao po GF/2 mediju. U početnoj fazi uzgoja (250 ml) druge pokusne grupe (S-/++) silikati također nisu dodani, ali je u sljedećoj fazi (5 l) dodana dupla količina silikata od propisane količine koja se nalazi u GF/2 mediju (2 ml l^{-1}). Trećoj pokusnoj grupi (S+/++) u početnoj fazi uzgoja (250 ml) dodana količina silikata kao u kontrolnoj skupini (1 ml l^{-1}), ali u sljedećoj fazi uzgoja (5 l) dodana je dupla količina silikata (2 ml l^{-1}).

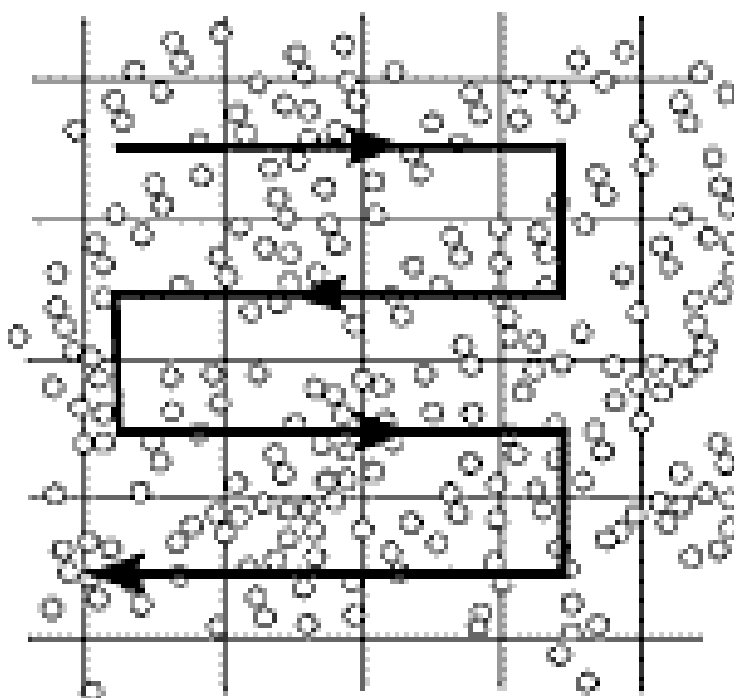
3.9. Određivanje koncentracije algi Neubaerovom komorom

Brojanje stanica s Neubaerovom komorom je najčešća metoda određivanja gustoće mikroalgi u kulturi (<http://www.celeromics.com>). Neubaerova komora je debela kristalna pločica s veličinom staklenog klizača 30 × 70 mm i 4 mm debljine. Sastoji se od 3 uzdignuta dijela, a brojanje se vrši u središnjem na kojem se nalaze ucrtana dva prostora za brojanje s crtama različitih mjerila (slika 15). Svaki prostor za brojanje je veličine 3 mm × 3 mm i sastoji se od devet kvadratnih pododjeljaka širine 1 mm s manjim kvadratićima. Pokrovno stakalce se stavlja na Neubaerovu komoru tako da stoji naslonjeno na bočna dva uzdignuta dijela, a "lebdi" nad središnjim područjem. Udaljenost između središnjeg uzdignutog dijela Neubaerove komore i tako postavljenog pokrovnog stakalca je 100 μm. S mikropipetom se uzima uzorak mikroalgi te stavlja u 1-2 kapljice na rub između Neubaerove komore i pokrovnog stakalca. Površinskom napetosti vode, uzorak sam popuni prostor između podloge i pokrovnog stakalca, a u slučaju da postoji višak uzorka, on će se izliti u male kanale koji se nalaze između uzdignutih dijelova komore. Pri radu s komorom treba paziti da je radna površina gdje se postupak obavlja ravna. U slučaju pojave mjehurića ili u slučaju pomicanja pokrovnog stakalca, potrebno je ponoviti postupak.

Nakon prethodno opisanog koraka, Neubaerova komora se stavlja na mikroskop i mikrovijkom pomičemo uzorak dok mikroalge i svi kvadratići na Neubaerovoj komori ne postanu jasno vidljivi. Za brojanje algi korištene su četiri kutne komore i komora u sredini (slika 15). Stanice koje diraju graničnu liniju komore se također broje (slika 16). Koncentracija algi se računa na sljedeći način: konc. (st. ml⁻¹) = broj stanica × 10000/broj komora (<http://www.celeromics.com>).



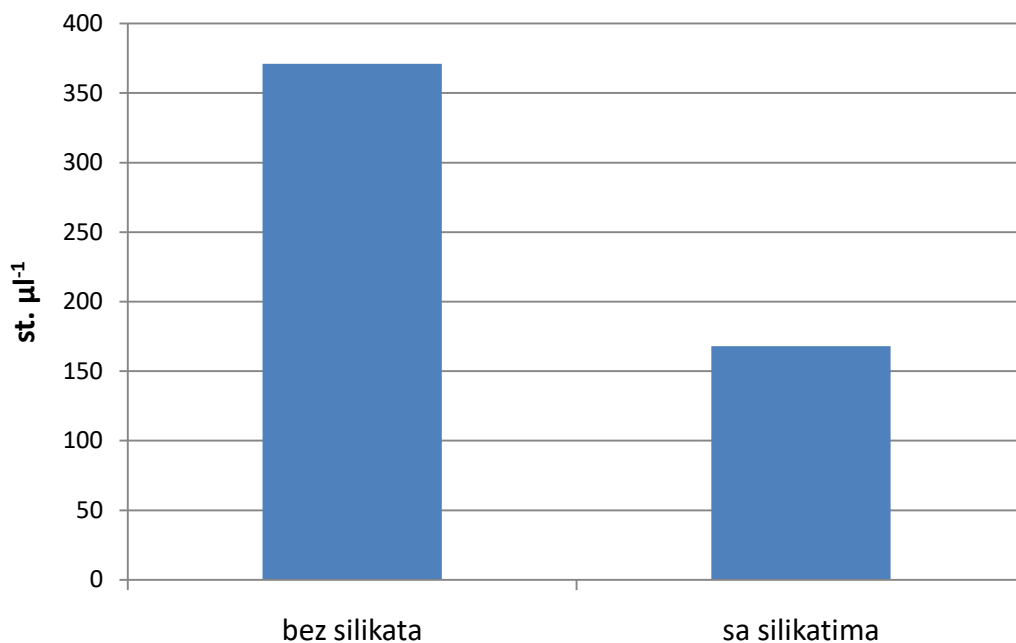
Slika 15. Neubaerova komora za brojanje stanica (Preuzeto s: <http://www.celeromics.com>).



Slika 16. Jedna komora s kvadratićima s uzorkom stanica (Preuzeto s: <http://www.celeromics.com>).

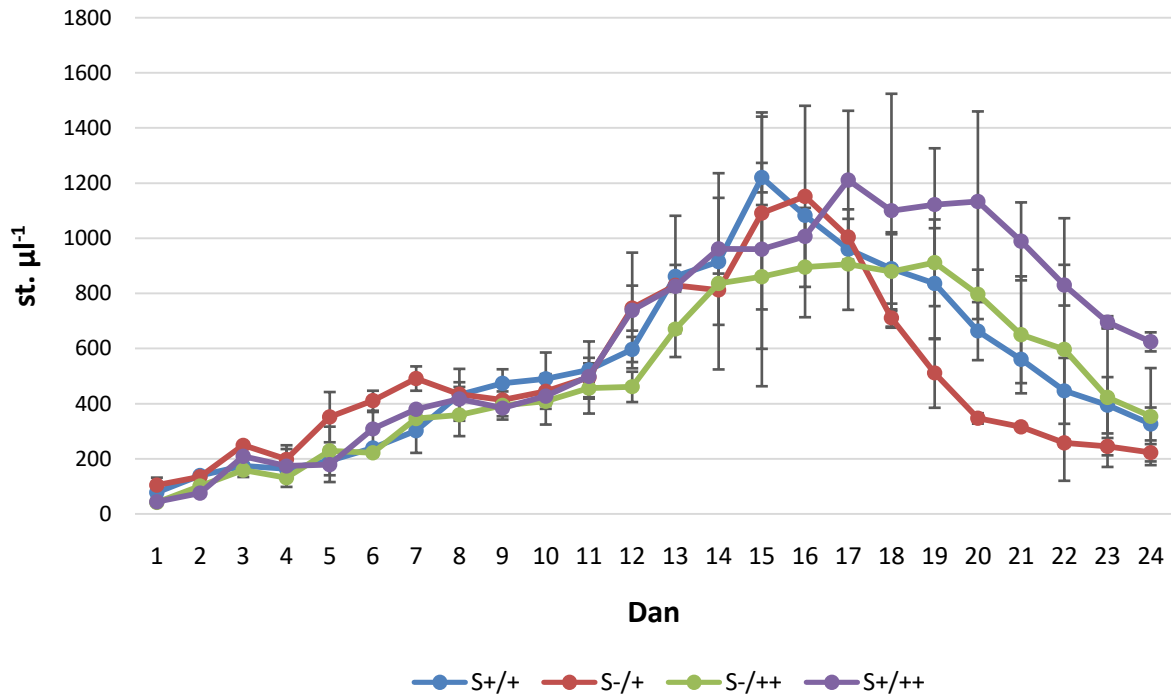
5.REZULTATI

Koncentracije algi u Erlenmeyerovim tikvicama od 250 ml su mjerene prije prebacivanja u Erlenmeyerove tikvice od 5 ml. U grupama gdje su inicijalno dodani silikati (S+/+ i S+/++), alge su dosegle koncentraciju od 371 st. μl^{-1} u razdoblju od sedam dana. U grupama gdje silikati nisu dodani od početka (S-/+ i S-/++), koncentracija je bila niža, 168 st. μl^{-1} u istom razdoblju (slika 17).

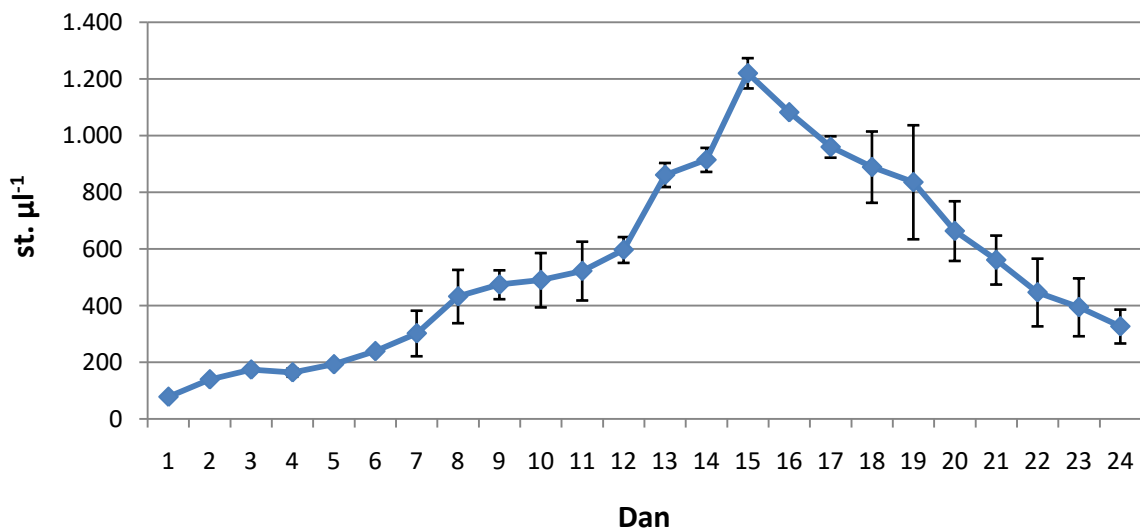


Slika 17. Prikaz koncentracija algi u Erlenmeyerovim tikvicama od 250 ml.

Rezultati koncentracija algi u Erlenmeyerovim tikvicama od 5 l dobiveni su svakodnevnim brojanjem stanica na Neubaerovoj komori čime su utvrđene koncentracije algi i njihove faze rasta (slika 18).

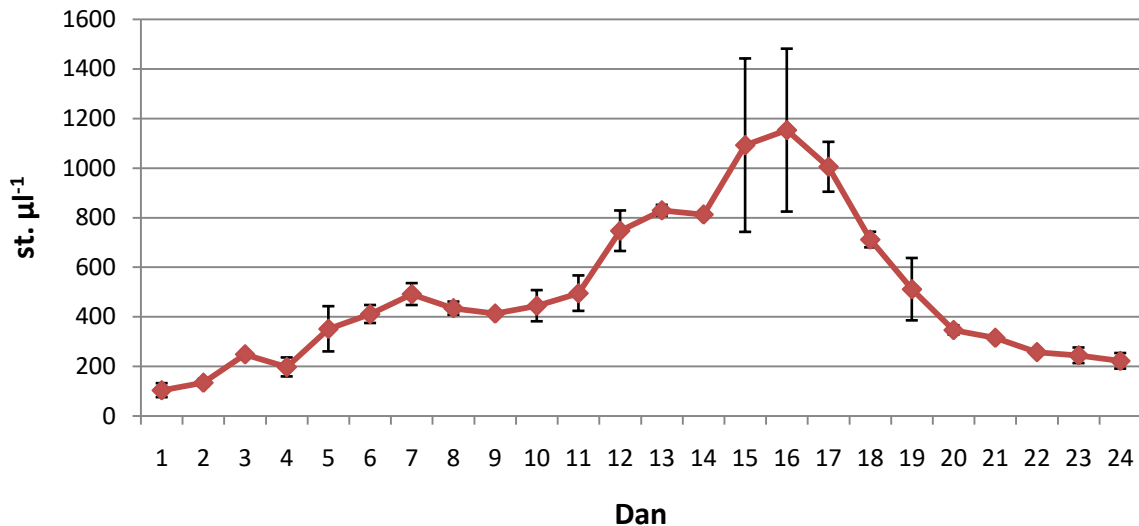


Slika 18. Koncentracija algi i faze raste kontrolne (S+/+) i svake od pokusnih grupa (S-/+, S-/++, S+/++) tijekom uzgoja u Erlenmeyerovim tikvicama od 5 l. Vrijednosti su izražene kao $AV \pm SD$ (n=2).



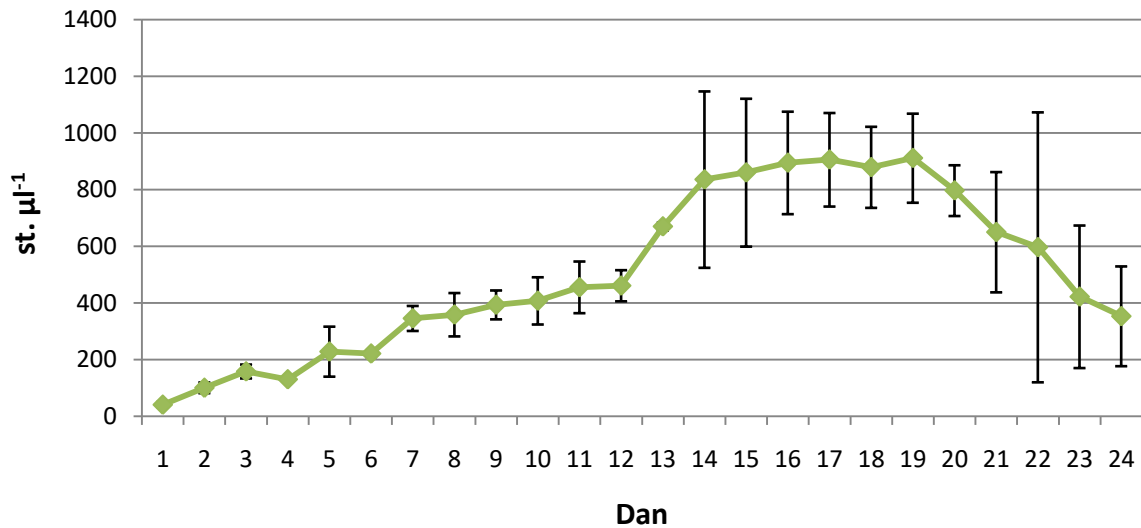
Slika 19. Koncentracija algi u kontrolnoj grupi (S+/+) tijekom uzgoja u Erlenmeyerovim tikvicama od 5 l. Vrijednosti su izražene kao $AV \pm SD$ (n=2).

Kontrolna grupa (S+/+) je imala početnu koncentraciju algiod $77 \text{ st. } \mu\text{l}^{-1}$ (slika 19). Broj algi je polagano rastao do 11. dana, nakon čega je u četiri dana broj skočio s $522 \text{ st. } \mu\text{l}^{-1}$ na $1220 \text{ st. } \mu\text{l}^{-1}$. Nakon postizanja najviše koncentracije od $1220 \text{ st. } \mu\text{l}^{-1}$ 15. dana, broj algi postepeno opada do zadnjeg dana pokusa kada je izbrojano $326 \text{ st. } \mu\text{l}^{-1}$.



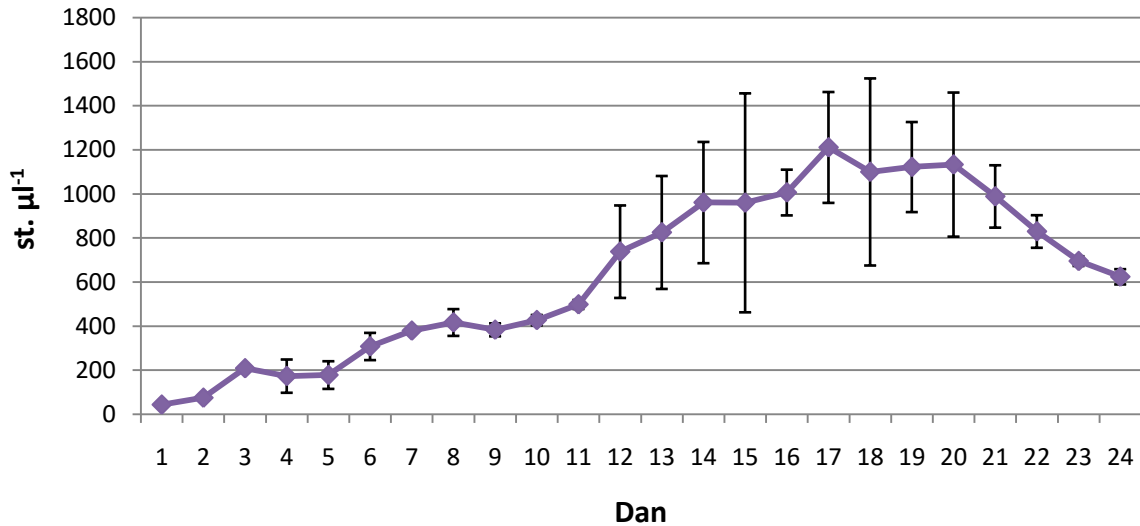
Slika 20. Koncentracija algi u prvoj pokusnoj grupi (S-/+) tijekom uzgoja u Erlenmeyerovim tikvicama od 5 l. Vrijednosti su izražene kao $AV \pm SD$ (n=2).

Prva pokusna grupa (S-/+) je imala početnu koncentraciju $103 \text{ st. } \mu\text{l}^{-1}$ (slika 20). Alge su bolje rasle u početku i već nakon sedam dana dosegle koncentraciju od $492 \text{ st. } \mu\text{l}^{-1}$, nakon čega dolazi do stagnacije od pet dana. Dvanaesti dan dolazi donaglog rasta koncentracije algi pri kojem u pet dana broj raste na $1152 \text{ st. } \mu\text{l}^{-1}$. Nakon dostizanja najviše koncentracije, broj algi relativno naglo pada do zadnjeg dana pokusa kada je izbrojano $222 \text{ st. } \mu\text{l}^{-1}$.



Slika 21. Koncentracija algi u drugoj pokusnoj grupi (S-/++) tijekom uzgoja u Erlenmeyerovim tikvicama od 5 l. Vrijednosti su izražene kao $AV \pm SD$ ($n=2$).

Početna koncentracija u drugoj pokusnoj grupi (S-/++) bila je $41 \text{ st. } \mu\text{l}^{-1}$. Koncentracija algi je polako ali postojano rasla do 14. dana kada je dosegla vrijednost od $461 \text{ st. } \mu\text{l}^{-1}$ i tada započinje eksponencijalna faza rasta od samo dva dana koja je prelazi u dugu fazu stagnacije od šest dana s najvišom vrijednosti od $911 \text{ st. } \mu\text{l}^{-1}$. Nakon 19. dana dolazi do opadanja koncentracije algi. Zadnji dan je izbrojano $353 \text{ st. } \mu\text{l}^{-1}$.



Slika 22. Koncentracija algi u trećoj pokusnoj grupi (S+/+++) tijekom uzgoja u Erlenmeyerovim tikvicama od 5 l. Vrijednosti su izražene kao $AV \pm SD$ (n=2).

Početna koncentracija treće pokusne grupe (S+/+++) je iznosila $44 \text{ st. } \mu\text{l}^{-1}$. Koncentracija algi je polagano rasla do 11. dana kada je iznosila $498 \text{ st. } \mu\text{l}^{-1}$. Tijekom sljedećih šest dana kultura algi ušla je u eksponencijalnu fazu i dosegla najvišu koncentraciju od $1211 \text{ st. } \mu\text{l}^{-1}$ s fazom stagnacije od pet dana. Koncentracija je zatim algi postepeno opadala do zadnjeg dana kada je iznosila $624 \text{ st. } \mu\text{l}^{-1}$.

5.RASPRAVA

Glavni ograničavajući čimbenik za uzgoj dijatomeja u akvakulturne svrhe su silikati koji se dodaju u hranjivi medij (Martin-Jezequel i sur., 2000). Cilj ovog rada je bio testiranje različitih koncentracija silikata u različitim fazama uzgoja, da se utvrdi imaju li silikati važnu ulogu u postizanju veće koncentracije stanica algi, kao i ulogu u stabilnijem uzgoju kultura dijatomeja. Također cilj je bio vidjeti kako različite koncentracije silikata djeluju na duljinu svake faze rasta dijatomeja.

Iz našeg pokusa bilo je vidljivo da početna koncentracija silikata u ranijem stadiju uzgoja (u volumenu 250 ml) nije imala značajni utjecaj na kasniji rast vrste *C. gracilisa*. U početnom volumenu od 250 ml u kontrolnoj grupi (S+/+) sve je bilo po GF/2 mediju dok se u grupi S-/++ u početnom volumenu nije uopće dodavao silikata. U sljedećem i završnom volumenu uzgoja od 5 l dodani su silikati po protokolu GF/2 medija u obje grupe. U kontrolnoj grupi (S+/+) i grupi (S-/++) primijećen je skoro identični razvoj kultura, koje su bile bez faze stagnacije rasta nakon što su dosegnule vrhunac koncentracije algi.

U prvoj i drugoj pokusnoj grupi (S-/++ i S-/+++),u početnom volumenu od 250 ml nije bio dodan silikat, što je rezultiralo manjom koncentracijom algi od 168 st. μl^{-1} na kraju početne faze uzgoja. U sljedećem i završnom dijelu uzgoja (volumen od 5 l), silikati su dodani u dvostrukoj koncentraciji (2 ml l^{-1}), dok su u standardnom GF/2 mediju silikati iznosili 1 ml l^{-1} . Ipak, uočeno je da nedostatak silikata u početnom dijelu uzgoja nije imao značajan utjecaj na rast algi u drugom dijelu uzgoja kada su dodani silikati iako su u početnoj fazi uzgoja imale niže koncentracije algi.

Treća pokusna grupa (S-/+++) pokazala je najdulju eksponencijalnu fazu od 5-6 dana i fazu stagnaciju rasta 3 dana. Grupa S-/+++ nije doživjela karakterističan vrhunac koncentracije algi kao ostale grupe, nego je iz eksponencijalne faze lagano prešla u fazu stagnacije rasta, ali ta stagnacija rasta je zato trajala pet dana. Na temelju toga, moguće je zaključiti da su kulture gdje je dodana dvostruka koncentracija silikata mnogo stabilnije s duljom eksponencijalnom fazom i duljom fazom stagnacije rasta što je korisno jer se može očekivati da se kulture alga neće naglo srušiti nakon postizanja vrhunca koncentracije. Boyd (2014) je uzgajajući vrstu *C. gracilis* za ishranu ličinaka kozica iz porodice Peneidae također uočio da ova vrsta naglo opada nakon kraja faze eksponencijalnog rasta. Njegove uzgojne kulture vrste *C. gracilisa* su

doživjele nagle kolapse odmah nakon što je uzgojna populacija dosegla svoju najvišu koncentraciju. Imali su nešto više *peakove* koncentracija algi, ali zato jer su alge bile uzgajane na višim temperaturama od 25-26°C. Upravo se u tom primjeru može vidjeti prilika za dodavanje dvostruke koncentracije silikata, koja bi po našem pokusu spriječila to neželjeno naglo rušenje kultura.

Laing (1985) u svome istraživanju također potvrđuje ovaj pokus. Grupe algi vrste *C. calcitrans* s različitim razinama silikata u vodinisu imale značajno različit rast do 2. dana pokusa kada su zabilježene identične količine silikata u vodi za optimalnu apsorpciju silikata. U grupama gdje je bilo manje silikata je nakon potrošnje silikata došlo do smanjenja podjele stanica te vrste.

Uzimajući u obzir rezultate iz ovog rada možemo pretpostaviti kako dodavanjem silikata u ključnim trenucima rasta populacije vrste *C. gracilis* možemo pozitivno utjecati da rast i zdravlje kulture, te spriječiti je od iznenadnog kolapsa. Daljnja istraživanja o točnom trenutku dodavanja silikata bi mogla rezultirati dodatnim saznanjima koja bi omogućila preciznu manipulaciju ove vrste u uzgoju.

6. ZAKLJUČAK

Dodatak silicijevog oksida ima značajan utjecaj na brzinu rasta populacije dijatomeje *C. gracilis*.

Dodavanjem veće koncentracije silicijevog dioksida od preporučene ne utječe na maksimalnu gustoću uzgojne populacije vrste *C. gracilis*.

Izostanak silicijevog dioksida u početnim uzgojnim stadijima ne utječe značajno na krajnji rezultat uzgoja vrste *C. gracilis* ako se kasnije doda normalna količina silicijevog dioksida.

Dodavanje dvostruke koncentracije silicijevog dioksida u uzgajane kulture vrste *C. gracilis* osigurava se stabilniji uzgoj, odnosno dulja eksponencijalna faza i faza stagnacije rasta bez naglog rušenja kultura nakon dostizanja vrhunca.

7. LITERATURA

- Anderson, L. W. J., Sweeney, B. M. 1977. Diel changes in sedimentation characteristics of *Ditylum brightwadi*: Changes in cellular lipid and effects of respiratory inhibitors and ion-transport modifiers. *Limnology and Oceanography*, 22(3): 539-552.
- Boyd, C. E. 2014. Silicon, diatoms in aquaculture. *Global aquaculture advocate*, May/June: 38-39.
- Brown, M. R. 2002. Nutritional value of microalgae for aquaculture. U: Cruz-Suárez, L. E., Rique-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Rujan 2002, Cancún, Quintana Roo, Meksiko*, 281-292.
- Castro, P., Huber, M. E. 2005. *Marine Biology*. 5th ed. McGraw-Hill, Higher Education Inc., New York, str. 422.
- Crawford, S. A., Higgins, M. J., Mulvaney, P., Wetherbee, R. 2001. Nanostructure of the diatom frustule as revealed by atomic force and scanning electron microscopy. *Journal of Phycology*, 37(4), 543–554.
- FAO 1996. *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. Rome, str. 295.
- FAO 2015. *Aquaculture Global and Regional Reviews*.
- French, F. W., Hargraves, P. E. 2004. Spore formation in the life cycle of the diatoms *Chaetoceros diadema* and *Leptocylindrus*. *Journal of Phycology*, 21(3).
- Gibson, C. E., Wang, G., Foy, R. H. 2000. Silica and diatom growth in Lough Neagh: the importance of internal recycling. *Freshwater Biology*, 45(3), 285–293.
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrate. In: Smith, W. L., Chanley, M. H. (Eds.), *Culture of marine invertebrates animals*. Plenum, New York, pp. 296–360.
- Jeon, K. j-, 2004. *International review of cytology: a survey of cell biology*. USA, str. 456.

- Kröger N., Poulsen N. 2008. Diatoms – from cell wall biogenesis to nanotechnology. *Annual Review of Genetics*, 42:83-107.
- Laing I., 1985. Growth response of *Chaetoceros calcitrans* (Bacillariophyceae) in batch culture to a range of initial silica concentrations 85(1), 37-41.
- MacDonald, J. D. 1869. On the structure of the diatomaceous frustule, and its genetic cycle. *Ann. Mag. Nat. Hist.*, 4: 1–8.
- Martin-Jezequel, V., Hildebrand, M., Brzezinski, M. A. 2000. Silicon metabolism in diatoms: *Journal of Phycology*, 36(5), 821-840.
- Pfitzer, E. (1871) Untersuchungen über Bau und Entwicklung der Bacillariaceen (Diatomaceen). *Botanische Abhandlungen*, 2: 1–189.
- Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G. 1990: *Diatoms: biology and morphology of the genera*. U.K., str. 747.
- Samantray S., Aakanksha, S. G., Ramachandra, T.V., 2010. Prospects of diatoms as third generation biofuel. *Biotechnology for Biofuels*, 10: 16.
- Simon, C. M. 1978. The culture of the diatom *Chaetoceros gracilis* and its use as a food for penaeid protozoan larvae. *Aquaculture*, 14(2): 105-113.
- Sumper, M., Bruner, E. (2006). Learning from Diatoms: Nature's tools for the production of nanostructured silica. *Advanced Functional Materials*, 16(1): 17-26.
- Thomas C. R. 1996. *Identifying marine diatoms and dinoflagellates*. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, SAD, str. 596.
- Treguer, P., Nelson, D. M., Van Bennekom, A. J., Demaster, D. J., Leynaert, A., Queguiner, B. 1995. The silica balance in the world ocean: an estimate. *Science*, 268(5209): 375–379.
- Viličić D. 2002. *Fitoplankton Jadranskoga mora: biologija i taksonomija*, Školska knjiga, str. 254.
- Wehr John D., Robert G. Sheath, J. Patrick Kociolek, 2014. *Freshwater Algae of North America*. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, SAD, str. 1066.

Internetske stranice:

<http://www.ucmp.berkeley.edu/chromista/diatoms/diatommm.html>, (14.9.2018.)

<https://www.livescience.com/46250-teasing-apart-the-diatom-genome.html>, (13.9.2018.)

<https://biologywise.com/diatoms-reproduction>, (13.9.2018.)

<http://www.celeromics.com/en/resources/docs/Articles/Cell-counting-Neubauer-chamber.pdf>, (13.9.2018.)

IZJAVA

S punom odgovornošću izjavljujem da sam završni rad izradio samostalno, služeći se navedenim izvorima podataka i uz stručno vodstvo mentora doc. dr. sc. Josipa Mikuša i komentora doc. dr. sc. Kruna Bonačića.

Ime i prezime studenta: Mario Prečanica

Potpis _____