



Gimnazija Novo mesto

MIKROORGANIZMI NA FILOSFERAH LISTOV RAZLIČNIH RASTLIN

raziskovalna naloga z interdisciplinarnega področja: biologija in ekologija

Avtor:

Enej Zamida

Mentorica:

Tanja Gačnik

Novo mesto, april 2022

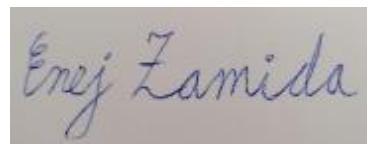
1 IZJAVA

Podpisani Enej Zamida, dijak Gimnazije Novo mesto, potrjujem, da je raziskovalna naloga z naslovom

mikroorganizmi na filosferah listov različnih rastlin

nastala kot rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati konkretno navedeni in pri pisanju niso bile kršene avtorske pravice in intelektualne lastnine drugih.

Enej Zamida

A rectangular box containing a handwritten signature in blue ink. The signature reads "Enej Zamida" in a cursive, flowing script.

2 POVZETEK

Mikroorganizme lahko najdemo vsepošod na našem svetu. Eden od bolj nenavadnih, pogosto zapostavljenih, a za kmetijstvo ključnih habitatov, na katerih se nahajajo mikroorganizmi, so nadzemne površine rastlin, drugače poimenovane filosfere. Organizmi, ki živijo na tej površini, gradijo tako imenovane filosferske mikrobiome. S to raziskavo sem želel ugotoviti, kako se razlikujejo zgradbe filosferskih mikrobiomov različnih rastlin. Raziskavo sem začel tako, da sem pripravil gojišča (infuzume), ki so vsebovala raznovrstne rastline. Za raziskovanje sem uporabil nekaj različnih metod. Z mikroskopiranjem sem opazoval raznolikost organizmov v posameznih infuzumih. Z vonjanjem vzorcev sem spremljal razvoj bakterij in anaerobnih organizmov v infuzumih ter gnitje rastlin. Z merjenjem nivoja koncentracije raztopljenega kisika v vodi sem preučeval prisotnost avtotrofnih in heterotrofnih organizmov. Ugotovil sem, da so na površini filosfere prisotni mikroorganizmi, vendar se filosferski mikrobiomi različnih vrst rastlin iz različnih ekosistemov statistično ne razlikujejo. V infuzumih so se nahajali skoraj izključno heterotrofni organizmi, nivo kisika je skozi čas v vseh infuzumih padal. Na površini večine infuzumov je nastala folija iz bakterij, katera je vplivala na nivo kisika. Raziskovalna naloga predstavlja odlično izhodišče za nadaljevanje raziskav na področju filosferskih mikrobiomov, v okviru katerih bi preučili vplive zunanjih dejavnikov na stabilnost filosferskih mikroekosistemov.

3 ABSTRACT

Microorganisms can be found all over our world. One of the more unusual, often neglected, but agriculturally vital habitats where microorganisms are found, are the above-ground surfaces of plants, otherwise called phyllospheres. Organisms that live on this surface build the so-called phyllospheric microbiomes. With this research, I wanted to find out how the structures of phyllospheric microbiomes of particular plants differ from each other. I started the research by preparing media (infusions) that contained a variety of plants. I used a few different methods to conduct my research. By microscopy I observed the diversity of organisms in individual infusions. By smelling the samples, I monitored the development of bacteria and anaerobic organisms in the infusions as well as the rotting of the plants. By measuring the level of the dissolved oxygen concentration in the water I studied the presence of autotrophic and heterotrophic organisms. I found that microorganisms are present on the phyllospheres, but the phyllospheric microbiomes of the selected plant species from different ecosystems do not differ statistically from each other. The infusions contained almost exclusively heterotrophic organisms and the oxygen level in all infusions dropped over time. Bacterial foil formed on the surface of most infusions, which affected oxygen levels. This research is an excellent starting point for continuing research in the field of phyllospheric microbiomes, which would examine the effects of external factors on the stability of phyllospheric microecosystems.

4 ZAHVALA

Pri izvedbi in izdelavi raziskovalne naloge sem imel veliko pomoči, katere ne morem spregledati. Zahvalo dolgujem:

- profesorici Tanji Gačnik za lektoriranje naloge in za nasvete, kateri so mi jo pomagali izboljšati, ter za pomoč iskanja literature, s katero sem se več naučil o izbrani temi;
- Gimnaziji Novo mesto in ravnateljici Mojci Lukšič za možnost izposoje šolske opreme za raziskovanje v času pandemije;
- družini za njihovo potrpežljivost z mano, ker sem uporabil eno sobo za domač laboratorij

5 KAZALO VSEBINE

1	IZJAVA.....	1
2	POVZETEK.....	2
3	ABSTRACT.....	2
4	ZAHVALA	3
5	KAZALO VSEBINE	4
5.1	KAZALO SLIK	5
5.2	KAZALO TABEL	6
6	UVOD.....	7
6.1	RAZISKOVALNA VPRAŠANJA.....	8
6.2	HIPOTEZE.....	8
7	TEORETIČNO OZADJE	9
7.1	PROTISTI	9
7.1.1	PRAŽIVALI	9
7.1.1.1	MIGETALKARJI	9
7.1.1.1.1	COLPODA	9
7.1.1.1.2	PARAMECIJ	10
7.1.1.1.3	VORTICELLA	11
7.2	ŽIVALI.....	12
7.2.1	KOTAČNIKI	12
7.2.2	GLISTE	12
7.3	LISTI RASTLIN	13
7.3.1	LISTI PRI IGLAVCIH	14
7.3.2	LISTI PRI LISTAVCIH.....	14
7.3.3	LISTI PRI TRAVAH.....	14
7.4	FILOSFERSKI MIKROBIOMI.....	15
7.5	GOJENJE MIKROORGANIZMOV	16
7.6	EKOSISTEM	16
8	MATERIALI, METODE IN POSTOPEK.....	18
8.1	MATERIALI	18
8.2	METODE IN POSTOPEK.....	20
8.2.1	PRIPRAVA INFUZUMOV.....	20

8.2.2	MERJENJE POVRŠINE LISTOV.....	21
8.2.3	MIKROSKOPIRANJE.....	21
8.2.4	KVALITATIVNO PREIZKUŠANJE VONJA INFUZUMOV.....	21
8.2.5	MERJENJE KONCENTRACIJE RAZTOPLJENEGA KISIKA V VODI.....	22
9	REZULTATI	23
9.1	REZULTATI MERJENJA POVRŠINE LISTOV	23
9.2	REZULTATI MIKROSKOPIRANJA	24
9.3	REZULTATI T-TESTA	25
9.4	REZULTATI MERJENJA KONCENTRACIJE RAZTOPLJENEGA KISIKA V INFUZUMIH	26
9.5	REZULTATI FORMACIJE FOLIJE NA POVRŠINI INFUZUMOV.....	27
9.6	REZULTATI KVALITATIVNEGA PREIZKUŠANJA VONJA INFUZUMOV.....	28
10	RAZPRAVA	31
11	ZAKLJUČEK	36
12	VIRI IN LITERATURA	37
13	PRILOGE	39

5.1 KAZALO SLIK

Slika 1:	Colpoda (colpoda, 2014)	9
Slika 2:	Paramecij (lasten vir)	10
Slika 3:	Vorticella (Vorticella 2021)	11
Slika 4:	Kotačnik (Phylum rotifera, 2021)	12
Slika 5:	Glista (lasten vir)	13
Slika 6:	Zgradba lista (Godec in sod.).....	13
Slika 7:	Pretok energije in kroženje snovi (odgovori 8 ...)	17
Slika 8:	Mikroskop, LabQuest in merilec koncentracije raztopljenega kisika (lasten vir)	19
Slika 9:	Položaj in razporeditev vzorcev	20
Slika 10:	Vsi vzorci (infuzumi) (lasten vir).....	21
Slika 11:	Merjenje koncentracije raztopljenega kisika (lasten vir).....	22
Slika 12:	Koncentracija raztopljenega kisika v infuzumih dne 21. 3. 2021.....	26
Slika 13:	Primer folije na površini infuzuma (lasten vir).....	28
Slika 14:	Vonj kontrol	28
Slika 15:	Vonj vzorcev z listavci-1	29
Slika 16:	Vonj vzorcev z listavci-2	29
Slika 17:	Vonj vzorcev z iglavci	30
Slika 18:	Vonj vzorcev s travami	30
Slika 19:	Kontrola-1, 3. 3. 2021 (lasten vir)	39

Slika 20: Vzorec z listi bukve, 3. 3. 2021 (lasten vir).....	39
Slika 21: Vzorec z listi breze, 3. 3. 2021 (lasten vir)	40
Slika 22: Vzorec z listi hruške, 3. 3. 2021 (lasten vir).....	40
Slika 23: Vzorec z listi jablane, 3. 3. 2021 (lasten vir).....	41
Slika 24: Vzorec z listi lipe, 3. 3. 2021 (lasten vir).....	41
Slika 25: Vzorec z listi oreha, 3. 3. 2021 (lasten vir)	42
Slika 26: vzorec z listi kostanja, 3. 3. 2021 (lasten vir)	42
Slika 27: Vzorec z iglicami smreke, 3. 3. 2021 (lasten vir)	43
Slika 28: Vzorec z iglicami bora, 3. 3. 2021 (lasten vir)	43
Slika 29: Vzorec z iglicami ciprese, 3. 3. 2021 (lasten vir)	44
Slika 30: Vzorec z listi obcestne trave, 3. 3. 2021 (lasten vir)	44
Slika 31: Vzorec z listi trave iz travnika, 3. 3. 2021 (lasten vir).....	45
Slika 32: Vzorec z listi trave iz pašnika, 3. 3. 2021 (lasten vir)	45
Slika 33: vzorec z listi hrasta, 3. 3. 2021 (lasten vir).....	46
Slika 34: Kontrola-2, 3. 3. 2021 (lasten vir)	46

5.2 KAZALO TABEL

Tabela 1: Povprečna filosferska površina listov na izbranih lokacijah	23
Tabela 2: Pogostost pojava organizmov v določenem infuzumu v obdobju osmih tednov	24
Tabela 3: T-test tabela 1.....	25
Tabela 4: T-test tabela 2.....	26
Tabela 5: Prisotnost folije na površini infuzumov.....	27
Tabela 6: Vsi opaženi organizmi pri mikroskopiranju	47

6 UVOD

Mikroorganizmi so majhna živa bitja, katerih ne moremo videti s prostim očesom in živijo praktično na vseh delih našega planeta. So neverjetno raznoliki in imajo veliko različnih vlog v ekosistemih, v katerih se nahajajo. Delijo se na bakterije, arheje, glice, virusi in protiste, med katere nekateri znanstveniki uvrščajo tudi alge (Microbes and the World, 2021). Pri moji raziskavi sem se najbolj osredotočil na protiste in na nekatere druge organizme, ki sem jih opazil pri mikroskopiranju. Protisti so raznolika skupina v glavnem mikroskopskih in enoceličnih organizmov. Vsi so evkariontski organizmi, ki niso živali, rastline ali glice. Novejša sistematika med slednje uvršča tudi praživali in alge (Vidyasagar, 2016a). Praživali se razlikujejo od alg po tem, da so heterotrofni organizmi, torej si sami ne pridelujejo hrane. Slednja lastnost je enaka strategiji prehranjevanja živali (Patterson J. David. 1992).

Praživali delimo na tri glavne skupine glede na to, kako se premikajo. Migetalkarji (ciliates), imajo na telesu izrastke poimenovane migetalke (cilia), s katerimi udarjajo po vodi in se s tem premikajo. Bičkarji (flagellates), ki se po vodi pomikajo s pomočjo bička (flagellum). Amebe (amoebae) so sploščeni organizmi in se zaradi spremenjanja oblike telesa po površini pomikajo s plazenjem. Praživali se prehranjujejo z manjšimi organizmi in so tudi same del prehrane večjih organizmov, zato so zelo pomemben del prehranjevalnih spletov (Anderson in Druger, 1997). Praživali živijo v vlažnih habitatih: v vodah z manjšo (sladke vode) ali večjo koncentracijo soli (slane vode) lahko tudi v prsti (protozoa, 2021).

Praživali ter drugi protisti, pa tudi bakterije, glice in drugi mikroorganizmi se nahajajo na filosferah rastlin. Slednje so vse nadzemne površine rastline, biosfere na njih pa imenujemo filosferni mikrobiomi. Znotraj njih je zdaleč največ bakterij, protistov je manj in veliko od teh je v dormantnih cistah. Ti protisti in tudi nekateri drugi dormantni organizmi se ponovno aktivirajo, ko pridejo v stik z vodo. To lastnost lahko uporabimo pri raziskovanju protistov, najpogosteje s pripravo infuzumom. Infuzum je skupek rastlinskih delov in vode iz naravnega izvira v čisti posodi. Po nekaj dnevih se organizmi, ki se nahajajo na rastlinski delih, preoblikujejo in nadaljujejo z aktivnim življnjem. Najprej se namnožijo bakterije, ki kmalu postanejo glavni vir hrane za večino praživali v infuzumu. Čez nekaj časa se ta infuzum razvije v svoj stabilen ekosistem (How is ..., 2021).

S pilotnim poskusom sem pred osrednjo raziskavo preizkušal infuzume, ki so bili narejeni iz različnih rastlin in rastlinskih delov. V različne infuzume sem dodal travo, liste drevesa, seno in mah. Po nekaj tednih sem pri mikroskopiranju vzorcev tekočine opazil, da se organizmi različno razvijajo v teh infuzumih in da se raznolikost organizmov razlikuje glede na infuzum.

Namen te raziskave je bil preučiti, kateri organizmi se razvijajo v infuzumih z različnimi rastlinami ter najti razloge za te razlike. Zanimale so me razlike med filosfernimi mikrobiomi različnih dreves, ki se nahajajo relativno blizu drug drugega, za primerjavo sem dodal zraven tudi travo. Ker je večina mikroorganizmov premajhnih, da bi jih lahko razvrstil v skupine in ker sem imel na razpolago omejene pripomočke, sem se osredotočil na raziskovanje protistov, še posebej na praživali.

6.1 RAZISKOVALNA VPRAŠANJA

Pri tej raziskovalni nalogi sem si zastavil štiri vprašanja.

1. Ali se mikroorganizmi razlikujejo glede na infuzum?
2. Kaj je skupno mikroorganizmom v infuzumih?
3. Ali mikroorganizmi vplivajo na infuzum?
4. Kako bi lahko ta raziskava pojasnila dogajanje v gozdnem ali travnatem ekosistemu?

6.2 HIPOTEZE

H1. Na listih se nahajajo mikroorganizmi.

H2. Infuzumi se bodo razlikovali glede na diverziteto organizmov.

H3. Tekom izvedbe eksperimenta bo v infuzumih padel nivo raztopljenega kisika.

H4. Infuzumi bodo imeli različno intenzivnost vonja med sabo.

H5. Trava in iglavci bodo imeli manjšo raznolikost mikroorganizmov kot listavci.

7 TEORETIČNO OZADJE

7.1 PROTISTI

Protisti so evkariontski organizmi, ki niso živali, rastline ali glice. So evkarionti kar pomeni, da njihove celice vsebujejo jedro in druge organele, kateri opravljajo raznolike naloge. Za protiste je značilno najpogosteje nespolno razmnoževanje. Glede na prehranjevanje so lahko ali avtotrofi, kar pomeni, da si lahko sami s pomočjo energije in anorganskih snovi naredijo hrano, ali pa heterotrofi, kar pomeni, da si sami ne pridelujejo hrane, ampak jo iščejo v okolju. Po prehranjevanju se še naprej delijo na fagotrofe in osmotrofe. Fagotrofi s svojim telesom obkrožijo in požirajo svojo hrano. Osmotrofi iz svoje okolice hranila absorbirajo (Vidyasagar, 2016a).

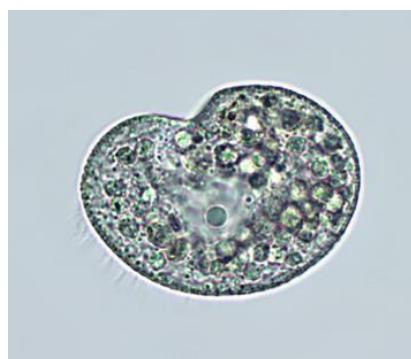
7.1.1 PRAŽIVALI

7.1.1.1 MIGETALKARJI

Migetalkarji ali ciliates so skupina praživali, katere prepoznamo po izrastkih, imenovanimi migetalke ali cilia. S temi migetalkami se premikajo po mediju, hkrati pa jih uporabljajo za zaznavanje sprememb v okolju. Lahko so prosto živeči ali pa zajedavci. S krčljivimi vakuolami izločajo vodo in v njej raztopljljene snovi (Ciliates Microscopy ..., 2021).

7.1.1.1.1 COLPODA

Colpoda je red, pogosto najden v prsteh. Celice so ledvičaste oblike in velikostnega razreda okoli 70 µm. Ti organizmi imajo možnost hitrega preoblikovanja v obliko ciste in tudi dokaj hitro izven te oblike. Tako lahko preživijo in uspevajo v okoljih, kjer periodično nastopajo poplave in sušna obdobja. *Colpoda* so osmotrofi kot veliko drugih praživali. Prehranjujejo se večinoma z bakterijami, katere predelajo v prebavnih vakuolah (Peterson, 1992). Tudi sami so vir hrane za manjše živali, kot so ličinke komarjev in drugih insektov ter vodne bolhe (Cochran-Stafira in von Ende, 1998). Poleg pogoste prisotnosti v vlažnih tleh pa jih najdemo tudi na površini različnih rastlin, kjer nerедko prevladujejo nad ostalo mikrofauno (Outka in Bradbury, 1967).



Slika 1: *Colpoda (colpoda, 2014)*

7.1.1.1.2 PARAMECIJ

Parameciji so enocelične praživali, velike od 50 do 330 µm in imajo obliko podolgovatega ovala. Živijo v vodnem okolju in imajo telo prekrito z mitgletalci, katere jim omogočajo premikanje po okolini (Vidyasagar, 2016b). Pogosto jih najdemo v mirujoči sladki vodi in v rekah, še posebej veliko jih je v vodi, kjer je veliko gnilega materiala, ter v kanalizaciji. Tudi za gojenje paramecijev je priporočljiva uporaba potopljenih rastlinskih delov kot izvor teh organizmov, ob gnitju rastlinske biomase pa se parameciji značilno zelo hitro namnožijo (Shah, 2021). Parameciji jedo predvsem bakterije, lahko tudi enocelične alge, kvas in tudi nekatere nežive organske snovi, kot so mleko v prahu ali škrob. Pri prehranjevanju paramecija sodelujejo mitgletalke tako, da hrano potiskajo v njihovo ustno odprtino. Ena izmed nenavadnih značilnosti paramecija sta dve različni jedri, ki se razlikujeta po vsebini in funkciji. Razmnožujejo se lahko spolno ali nespolno, način je odvisen od okoljskih razmer. Nespolno se razmnožujejo, ko je v okolini veliko hrani, spolno pa, ko hrani ni veliko (Vidyasagar, 2016b).



Slika 2: Paramecij (lasten vir)

7.1.1.1.3 VORTICELLA

Vorticella je rod praživali, med njo spada več kot 100 identificiranih vrst. Razmnožujejo se lahko na nespolni način ali na spolni. Za nespolen način uporabljajo binarno cepitev, pri kateri nastaneta dve ali več hčerinskih celic. Spolni način razmnoževanja *Vorticelle* je konjugacija. *Vorticella* lahko preživi neugodne razmere v okolju tako, da se odcepi od podlage in prosto odplava v ugodnejšo okolico. V okoljih z ekstremno neugodnimi razmerami oblikuje cisto, da se zaščitijo. Cisto naredi tako, da izloči želatinasto snov, ki se potem strdi. Ko se pa razmere v okolju izboljšajo, se cista prelomi in spusti ven organizem. *Vorticella* je pogosta v vodnih telesih, kot so ribniki, reke in potoki, nekatere vrste najdemo tudi v slanih vodah. Vrste tega rodu so običajno pritrjene na podlago preko peclja, zato morajo hrano dobiti neposredno iz njihove okolice, ker ne morejo plavat stran. Prehranjujejo se večinoma z bakterijami, manjšimi praživalmi in drugim drobnim organskim materialom okoli njih. Ena od najbolj izrazitih lastnosti *Vorticelle* je, da imajo telo v obliki zvonca, ki ima na koncu drobne migetalke, katere imajo vlogo vnosa materiala v peristom (ustna votlina). S peceljem se telo pritrjuje na podlago. Telo meri v dolžino približno 157 µm in je široko približno 99 µm, pecelj pa je različnih velikosti. *Vorticella* imajo pomembne vloge pri nadzorovanju populacije bakterij, razgrajevanju organskih snovi, zato prispevajo k čiščenju kanalizacijskih odplak (*Vorticella ...*, 2021).



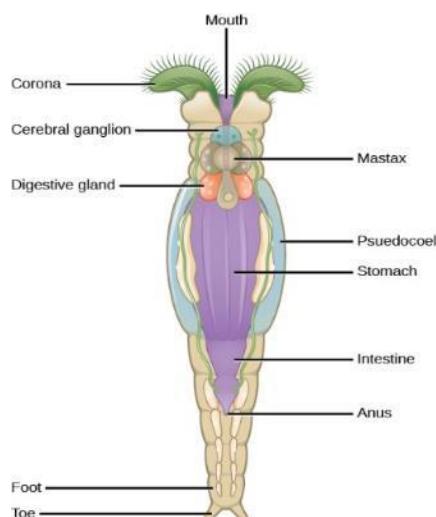
Slika 3: *Vorticella* (*Vorticella 2021*)

7.2 ŽIVALI

Nekatere živali so tako velike in živijo na podoben način kot protisti. Primeri takih živali so kotačniki, ploski črvi in gliste.

7.2.1 KOTAČNIKI

Kotačniki so mikroskopske živali, velike od 100 µm do 30.000 µm. So večinoma vodni organizmi, ki imajo na njihovem sprednjem delu kolesasto strukturo z mitalkami, poimenovano korona. Njihovo telo je sestavljeno iz glave (ki vsebuje korono), trupa (ki vsebuje organe) in stopala. Običajno so prosto plavajoči organizmi, ki lahko iz njihovega stopala izločajo lepljiv material, ki jim pomaga, da se oprimejo površin. So filtratorji, ki jedo odmrl organski material, alge in druge mikroorganizme, kar jih naredi pomembne segmente prehranjevalnih spletov. Živijo večinoma na vlažnih območjih (npr. v mahovih) ali vodnih okoljih (npr. v sladkih vodah) (Phylum Rotifera, 2021).



Slika 4: Kotačnik (Phylum rotifera, 2021)

7.2.2 GLISTE

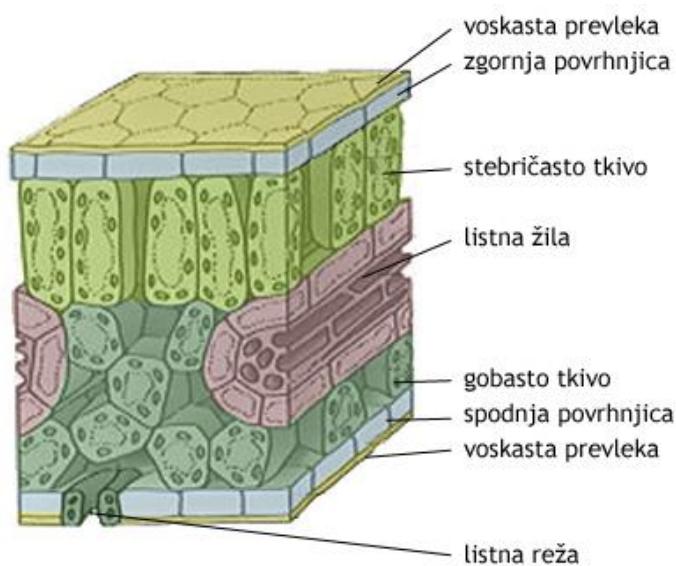
Gliste so živali, ki nimajo notranjega ogrodja. Živijo v večini vodnih habitatov in v vlažnih prsteh. Njihovo telo je sestavljeno iz tankega celičnega ovoja, povrhnjice in mišic. V telesu se nahajajo prebavni, reproduktivni, živčni in izločevalni sistemi. So parazitski organizmi in lahko zajedajo ljudi, živali ali rastline (Tattar, 1989). Zaradi prehranjevanja z bakterijami, glivami in drugimi glistami, so pomembne za reciklažo hranilnih snovi. Ker negativno vplivajo na korenine, lahko škodijo rastlinam (Nematoda, 2021).



Slika 5: Glista (lasten vir)

7.3 LISTI RASTLIN

Listi so rastlinski organi, najpogosteje anatomsko tanki in ploščati. Zgrajeni so iz zgornje povrhnjice, katero pokriva voščena prevleka, imenovana kutikula. Znotraj lista se od zgoraj najprej nahaja stebričasto, zatem gobasto tkivo, čisto spodaj pa spodnja povrhnjica, v kateri leži večina listnih rež, skozi katere se izmenjujejo plini. V listih potekajo tudi žile, po katerih do celic lista teče voda in odteka stran večja koncentracija hranilnih snovi. Listi imajo več funkcij: so organi, kjer se vrši fotosinteza (s sončno svetljobo pogojen proces pretvorbe ogljikovega dioksida in vode v glukozo in kisik) in proces transpiracije (izhlapevanje vode iz rastline skozi listne reže s hkratnim uravnavanjem osmotskih tlakov v rastlini) (Leaf, 2017; Belušič in sod., 2020).



Slika 6: Zgradba lista (Godec in sod.)

7.3.1 LISTI PRI IGLAVCIH

Iglavci imajo liste preobražene v iglice. Oblika iglic listom zmanjša površino, ki je izpostavljena dehidraciji. V primerjavi z listi listavcev imajo iglice debelejšo kutikulo. Poleg tega so njihove listne reže postavljene znotraj jam, ki zagotavljajo plast mirujočega zraka (gibljiv zrak povečuje stopnjo transpiracije). Vse te prilagoditve pomagajo preprečevati pretirano izgubo vode (Shaw, 2019).

7.3.2 LISTI PRI LISTAVCIH

Listi listavcev imajo priliste, lamino ali listno ploskev in pecelj. So široki in imajo tanjšo kutikulo kot iglice iglavcev (Leaf, 2017).

7.3.3 LISTI PRI TRAVAH

Listi trav so dolgi in tanki, njihove žile so med sabo vzporedne (Leaf, 2017). Listi trave so pritrjeni na steblo v nodiju, ki je praviloma nizkoležeč (summarize ..., 2021)

7.4 FILOSFERSKI MIKROBIOMI

Filosfera se nanaša na vse nadzemne dele rastlinskih površin in je habitat za veliko vrst mikroorganizmov (preostali del je rizosfera, ki je območje prsti, ki obdaja rastlinsko korenino). Mikroorganizmi, ki živijo v filosferi, se imenujejo epifiti in sestavljajo tako imenovane filosferske mikrobiome. Večina raziskovanj filosfere je bilo osredotočenih na površino listov rastlin. Ocijeno je, da rastlinski listi tvorijo največjo biološko površino na Zemlji z obsegom, večjim od 108 km^2 . Mikroorganizmi, ki živijo na površju listov, so vrstno raznolike bakterije, glive, alge, praživali in gliste. Bakterije so zdaleč najštevilčnejši epifiti listov. V povprečju najdemo od 10⁶ do 10⁷ bakterijskih celic na kvadraten centimeter lista (Sivakumar in sod., 2020). Ocijeno je, da je lahko populacija bakterij celotne filosfere na Zemlji velika tudi 10^{26} celic. Kar pomeni, da so te bakterije dovolj številčne, da lahko prispevajo k številnim globalnim procesom (Lindow in Brandl, 2003).

Viri mikroorganizmov so tla, voda, zrak in rastlinski ostanki. Na prehod mikroorganizmov v filosfero vplivajo deževje, atmosferska mikroflora, vlaga, veter ... (Sivakumar in sod., 2020).

Bakterije na listih se izrazito razlikujejo od bakterij na podzemnih rastlinskih površinah. Primer so pigmentirane bakterije, katere redko najdemo v rizosferi, ampak prevladujejo na listnih površinah. Filosferski mikroorganizmi so prilagojeni okoljskim razmeram, ki so drugačne od tistih v prsti. Izpostavljeni so atmosferski temperaturi, svetlobi, UV-sevanju, manjši količini vode in hrane (Lindow in Brandl, 2003).

Obstajajo dokazi, da so nekateri protisti prilagojeni na življenje v filosferi. Primer takega protista je mitalkar *Colpoda cucullus*, ki se pogosto hrani in množi na površini rastlinskih listov. Laboratorijske raziskave so pokazale, da je ta vrste mitalkarja zmanjšala število bakterij *Pseudomonas syringae* na listih fižola za dva reda velikosti (Ploch in sod., 2016).

Fiziologija listov določa mikrobiološko raznolikost in številčnost organizmov na filosferi. Bakterije običajno razvijejo večje kolonije ob in na žilah lista ter na mestih, kjer je kutikula tanjša. Na teh mestih bakterije lažje dobivajo hrano in vodo iz rastline (Sivakumar in sod., 2020).

Obstajajo raziskave (Lindow in Brandl, 2003), ki kažejo, da vrsta rastlin vpliva na nosilnost mikrobov na listih. Ena raziskava je pokazala, da je bilo skupno število bakterij, pridobljenih iz širokolistnih rastlin, kot so kumare in fižol, bistveno večje kot število bakterij, pridobljenih na travah ali širokolistnih rastlinah z debelejšo voščeno kutikulo (Lindow in Brandl, 2003).

7.5 GOJENJE MIKROORGANIZMOV

Obstaja več načinov za gojenje mikroorganizmov, izbira metode je odvisna od tega, katere organizme želimo gojiti. Eden od enostavnnejših načinov gojenja protistov in drugih manjših organizmov je z infuzumom. V okviru tega raziskovanja sem tudi sam v pilotnih študijah preizkušal različne tipe infuzumov. Za infuzum rabimo naravno vodo, ki ne vsebuje snovi, ki bi škodile mikroorganizmom. Poleg tega rabimo rastlinske dele (pogosto se uporablja seno), na katerih se nahajajo tudi ciste protistov in spore bakterij, kateri se bodo aktivirali kmalu po stiku z vodo. Najprej postanejo aktivne bakterije, ki začnejo razgrajevati rastlinski material in se množiti. Po približno enem tednu na vrhu infuzuma začnejo tvoriti biofilm. Tako bakterije postanejo glavni vir hrane za veliko drugih organizmov, katerih število čez čas tudi raste (How is ..., 2021).

Obstajata dve vrsti infuzuma, to sta sterilen in nesterilen. Za izdelavo npr. senenega sterilnega infuzuma je potrebna sterilizacija vode in sena, tako da se uniči vse organizme, tudi ciste in spore, ki se nahajajo v senu in vodi. To lahko naredimo z vretjem vode, v katero smo dodali seno. Po ohlajanju mešanice lahko v ta infuzum dodamo mikroorganizme, ki smo jih izolirali, in s tem ustvarimo monokulturno okolje.

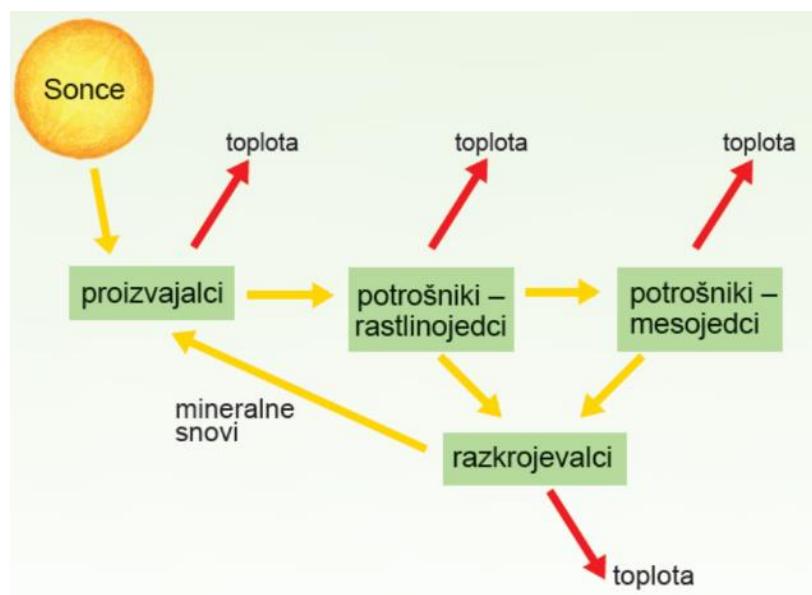
Če želimo vzdrževati sterilen infuzum, potem moramo preprečiti vstop mikroorganizmov iz zraka. Med njimi so lahko virusi, bakterijske spore in glivne spore (Habiba, 2020). Ti lahko, ob stiku s sterilnim infuzumom, uničijo ravnovesje tega majhnega ekosistema.

7.6 EKOSISTEM

Ekosistem sestavlja življenska združba ali biocenoza in neživo okolje ali biotop. Med biocenozo uvrščamo vsa živa bitja. Ekosistemi so zelo raznoliki, saj so lahko veliki kot ocean ali majhni kot luža. So okolja, ki se spreminja pod vplivom na biotskih in abiotičnih dejavnikov. V ekosistemih potekata dva procesa, ki vključujejo biocenozo in biotop. Prvi je kroženje snovi, pri katerem krožijo kemični elementi med živimi in neživimi sestavnimi deli okolja. Avtotrofi iz anorganskih snovi naredijo organske, s katerimi se potem hranijo heterotrofi, na koncu se pa te snovi spet spremenijo v anorganske, tako se ponavlja krog. Drugi proces je pretok energije. V večini primerov ekosistemov pride energija od zunaj v obliki sončne svetlobe. Če poenostavimo: ta da energijo avtotrofnim fotosintetskim organizmom, ki z njo sintetizirajo energijsko bogate organske snovi, katere so hrana tudi heterotrofnim organizmom. V živih bitjih se energija neprestano pretvarja, velik del energije se izgubi v okolje, en del pa gre v rast in razvoj organizma. Ko en organizem umre, ga razkrojevalci razkrojijo, tako se na koncu iz organizma v okolje sprosti vsa energija, ki je bila shranjena v njihovih molekulah (Reece in sod., 2013).

Ekosistemi se razlikujejo po zgradbi biocenoze. Njenostavnejši ekosistemi so sestavljeni iz samo avtotrofov in razkrojevalcev, bolj zapletenim ekosistemom pa so dodani tudi heterotrofi. V enem ekosistemu lahko živijo samo heterotrofi pod pogojem, da je ta ekosistem priključen drugemu ekosistemu, v katerem so avtotrofi.

Prehranjevanje v ekosistemih je izjemnega pomena, saj omogoča kroženje snovi in pretok energije. Glede na to, kateri vir energije in hranilnih snovi organizmi izrabljajo, jih razvrščamo v različne prehranjevalne ravni. Osnovna prehranjevalna raven so primarni proizvajalci ali avtotrofi, to so vsi organizmi (zelene rastline, avtotrofni enoceličarji, avtotrofne bakterije), ki lahko iz anorganskih snovi s pomočjo zunanjega vira energije proizvedejo organske snovi. Za njimi so primarni porabniki, ki se hranijo s primarnimi proizvajalci. Za njimi so sekundarni porabniki, ki se hranijo s primarnimi porabniki. Ostanejo še tertiarni in kvartarni porabniki, ki se hranijo z organizmi iz nižje ravni (Reece in sod., 2013).



Slika 7: Pretok energije in kroženje snovi (odgovori 8 ...)

8 MATERIALI, METODE IN POSTOPEK

8.1 MATERIALI

- svetlobni mikroskop
- Merilec koncentracije raztopljenega kisika v vodi (Vernier Dissolved Oxygen Probe Order Code DO-BTA)
- LabQuest
- kapalke
- objektna stekelca
- krovna stekelca
- ploščni kuhalnik
- paličice
- merilna posoda
- visoka kozica
- kozarci za vlaganje volumna 720ml
- pokrivalo za infuzume
- vrečke z zadrgo
- rokavice
- papirnate brisače
- razkužilo
- milimetrski papir
- izvirска voda (Bajer ob Potokih blizu Semiča)

Rastlinski material:

- listi bukve
- listi breze
- listi hruške
- listi jablane
- listi lipe

- listi oreha
- listi kostanja
- listi hrasta
- iglice smreke
- iglice bora
- iglice ciprese
- trava, ki raste ob cesti
- trava ki raste na travniku
- trava, ki raste na pašniku



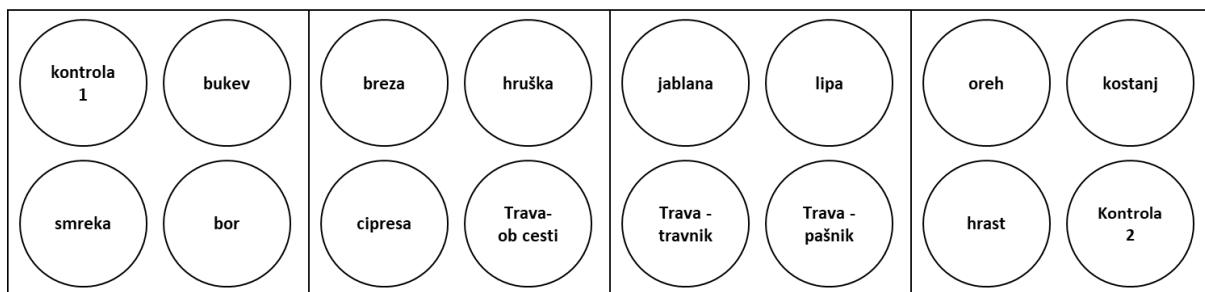
Slika 8: Mikroskop, LabQuest in merilec koncentracije raztopljenega kisika (lasten vir)

8.2 METODE IN POSTOPEK

8.2.1 PRIPRAVA INFUZUMOV

Eksperiment sem pripravil 21. februarja 2021. Pri izdelavi infuzuma sem najprej šel iskat vodo iz naravnega izvira na Bajer na Potoke ob Semiču, vodo sem vzel iz tamkajšnjega potoka. Ko sem prišel domov, sem to vodo prelij v čisto visoko kozico, to sem pokril in zavrel na kuhalni plošči. Vodo sem pustil vreti 5 minut. Še vrelo vodo sem zlil v postavljeni čiste kozarce za vlaganje, tako da sem v vsak kozarec zlil 500 ml vrele vode. Ko so bili vsi kozarci napolnjeni do enakega nivoja, sem vse skupaj pokril s pokrivalom, katerega sem prej naredil. Pustil sem, da se je voda ohladila do sobne temperature, katera je bila takrat 19 °C. Med obdobjem ohlajanja sem šel iskat liste rastlin, travo in iglice na že prej izbranih lokacijah. Vse dele rastlin sem pobiral z različnimi rokavicami in jih dal vsako posebej v svojo lastno vrečko z zadrgo. Te sem tesno zaprl in jih odnesel k mestu raziskave. Oceno potrebnega rastlinskega materiala sem določil s pomočjo metode merjenja površine listov (poglavlje 8.2.2). V vsak vzorec sem dal izračunano količino listov, tako da so imeli vsi vzorci približno enako veliko skupno filosfero listov v sebi. Ko sem dal ustrezeno količino rastlinskih delov v vsak infuzum, sem ga premešal s palčko, da so na koncu bili vsi rastlinski deli pod vodo. Postavil sem jih na mizo, katera je bila prekrita z belim prtom. Ta miza je bila locirana v sobi, ki se nahaja na severozahodni strani hiše. Mizo in vse infuzume na njej sem postavil tako, da so bili oddaljeni približno en meter stran od okna, tako da so vsi vzorci lahko dobili enako količino svetlobe.

okno



Slika 9: Položaj in razporeditev vzorcev



Slika 10: Vsi vzorci (infuzumi) (lasten vir)

8.2.2 MERJENJE POVRŠINE LISTOV

Za merjenje površine listov sem uporabil metodo milimetrskega grafičnega papirja. Pri tej metodi položiš list na milimetrski grafični papir in ga obrišeš s svinčnikom, potem na podlagi preštetih kvadratkov določiš površino lista (Trimble, 2019). Ta metoda ni najbolj točna metoda, ki obstaja za merjenje površine listov, ampak je bila za namene moje raziskave dovolj dobra, saj sem za raziskavo rabil le približne vrednosti povprečne velikosti površine listov. Ker so bile iglice in trava precej manjše, sem jih razširil na plastični vrečki z zapisano površino 400 cm² in jih dal posebej vsako v svoj infuzum.

8.2.3 MIKROSKOPIRANJE

Za mikroskopiranje sem uporabljal svetlobni mikroskop s 40x, 100x in 400x povečavo. Najprej sem iz infuzuma s kapalko (za vsak infuzum sem uporabi drugo kapalko) vzel vzorec tekočine in ga kanil na objektno steklo. Zaradi vzemanja vzorcev iz več slojev vode v infuzumu sem bil še posebej pozoren, da nisem preveč poškodoval folije, katera se je naredila na gladini infuzuma. Vsak preparat sem temeljito pregledal na različno velikih povečavah in si zapisal vse opažene organizme. Ena serija mikroskopiranja je obsegala pregled 3 različnih globin šestnajstih različnih infuzumov. Vse skupaj sem mikroskopiral osemkrat v obdobju osmih tednov, v enako dolgih intervalih.

8.2.4 KVALITATIVNO PREIZKUŠANJE VONJA INFUZUMOV

Pri preiskovanju vonja infuzumov sem moral paziti na samo čistočo okolice z infuzumi, ker so bili ti po navadi vedno pod pokrivalom, tako da ne bi v njih šle različne snovi iz zraka. Da bi začel preizkušati vonj infuzuma, sem ga najprej vzel izpod pokrivala ter ga previdno povonjal. Pri tem sem bil pazljiv, da sem ob bližini mojega nosu z infuzumov samo vdihnil in ne izdihnil, tako da ne bi slučajno infuzum izpostavil še več nepotrebnim zunanjim dejavnikom. Po vonjanju sem infuzum previdno dal nazaj pod pokrivalo in si v razpredelnico zapisal nivo smradu vzorca na lestvici od 0 do 5, kjer 0 pomeni, da nima vonja, in 5 pomeni, da je vonj neznosen. Postopek sem ponovil z vsemi vzorci. Vonjanje infuzumov sem opravljal vsak dan za štiri tedne, po tem časovnem obdobju so bile površine infuzumov preveč uničene, saj sem lahko samo z mešanjem merit drugo spremenljivko, koncentracijo raztopljenega kisika.

8.2.5 MERJENJE KONCENTRACIJE RAZTOPLJENEGA KISIKA V VODI

Za merjenje koncentracije raztopljenega kisika v vodi sem uporabljal Vernier Dissolved Oxygen Probe, katerega sem imel priključenega na Vernier LabQuest. Po navodilih proizvajalca sem merilec koncentracije kisika najprej "uravnal" v destilirani vodi. Po tem sem merilec kalibriral z dvema kalibrirnima točkama. Vse podatke kalibracije sem vpisal v LabQuest. Za tem sem začel s samim merjenjem vzorcev. Najprej sem temeljito očistil merilec z destilirano vodo v puhalki, po spiranju sem merilec rahlo popivnal s papirnato brisačko. Izpod podlage sem previdno vzel posamezen infuzum in vanj previdno potopil merilec do nekaj centimetrov globine. Med samim merjenjem sem počasi mešal in čakal, dokler se ni na LabQuest-u ustalila vrednost za količino raztopljenega kisika. Rezultat sem napisal v razpredelnico. Potem sem vzel merilec ven iz infuzuma ter tega položil nazaj pod pokrivalo. Merilec sem spet temeljito in previdno očistil s puhalko in papirnato brisačko, za tem sem izpod pokrivala vzel drug infuzum in ponovil postopek merjenja. To sem opravil z vsemi infuzumi.



Slika 11: Merjenje koncentracije raztopljenega kisika (lasten vir)

9 REZULTATI

9.1 REZULTATI MERJENJA POVRŠINE LISTOV

Tabela 1: Povprečna filosferska površina listov na izbranih lokacijah

	Povprečna površina enega lista – ena stran [cm ²]	Število listov	Skupna površina listov – ena stran [cm ²]
kontrola-1	0	0	0
kontrola-2	0	0	0
bukev	33	12	396
breza	30	13	390
hruška	14	29	406
jablana	39	10	390
lipa	31	13	403
oreh	32	13	416
kostanj	72	6	432
hrast	38	11	418
smreka	x	x	400
bor	x	x	400
cipresa	x	x	400
trava-ob cesti	x	x	400
trava-nekošen travnik	x	x	400
trava-pašnika	x	x	400

9.2 REZULTATI MIKROSKOPIRANJA

Rezultati preliminarnih opazovanj so pokazali, da je bil postopek priprave infuzumov uspešen, v njih pa so bili prisotni raznoliki organizmi. Kljub uporabljeni literaturi je bila vrstna določitev zaradi pomanjkanja specialnega znanja nemogoča ali pa bi lahko bila napačna. Ker so se nekatere skupine organizmov pojavljale v več različnih vzorcih, sem se osredotočil na preučevanje diverzitete slednjih med različnimi infuzumi. Pod imenom "neznani" sem uvrstil organizme, kateri so bili premajhni, da bi jih lahko identificiral s svetlobnim mikroskopom oziroma nisem bil prepričan o ustreznosti taksonomske skupine. V nadaljnji raziskavi sem mikroskopiral 16 vzorcev enkrat na teden v obdobju osmih tednov in zabeležil opažene organizme (Tabela 6). Po osmih tednih sem rezultate uredil tako, da sem navzočnost organizma v vzorcu v določenem tednu ovrednotil z 1, odsotnost pa z 0. Vrednost 0 v Tabeli 2 pomeni, da organizma v 8 tednih nisem opazil, vrednost 8 pa, da sem organizem našel vsak teden. Za lažjo preglednost sem vzorce razvrstil v skupino kontrol, infuzume z listavci, infuzume z iglavci in infuzume s travami.

Tabela 2: Pogostost pojava organizmov v določenem infuzumu v obdobju osmih tednov

vrsta infuzuma	mikroorganizmi					
	paramecij	<i>Colpoda</i>	<i>Vorticella</i>	gliste	kotačnik	neznani
kontrola-1	0	0	0	0	0	1
kontrola-2	0	0	0	0	0	2
bukev	3	1	0	1	0	5
breza	3	8	1	0	4	7
hruška	1	5	3	0	2	7
jablana	2	4	6	0	4	7
lipa	1	7	0	0	1	8
oreh	0	4	4	0	4	7
kostanj	2	1	3	0	0	8
hrast	0	2	0	0	2	7
smreka	1	7	1	1	0	7
bor	5	8	3	0	1	5
cipresa	1	4	2	2	2	6
trava-ob cesti	2	4	6	0	2	7
trava-nekošen travnik	4	4	4	0	1	6
trava-pašnika	2	7	0	0	3	7

9.3 REZULTATI T-TESTA

Na podlagi rezultatov Tabele 2 sem s pomočjo enorepnega t-testa preveril, ali se vzorci glede na pojavljanje skupin protistov in mikroskopskih živali razlikujejo. Določil sem stopnjo zaupanja 95 %. Izračune sem razdelil v dve tabeli (Tabela 3 in Tabela 4) zaradi preglednosti. Kjer je vrednost manj kot 0,05, pomeni, da sta vzorca statistično različna (v tabelah so označeni z rdečo barvo).

Tabela 3: T-test tabela 1

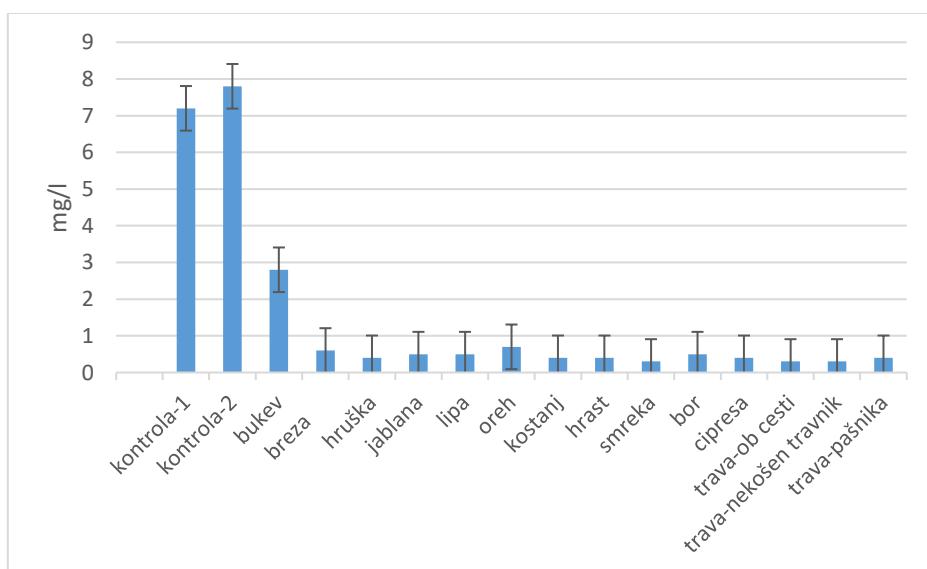
ttest	kon.-1	kon.-2	bukev	breza	hruška	jablana	lipa	oreh
kontrola-1	0,500	0,334	0,061	0,018	0,022	0,008	0,067	0,021
kontrola-2	0,334	0,500	0,085	0,021	0,027	0,009	0,079	0,025
bukev	0,061	0,085	0,500	0,096	0,171	0,067	0,256	0,151
breza	0,018	0,021	0,096	0,500	0,316	0,500	0,312	0,352
hruška	0,022	0,027	0,171	0,316	0,500	0,294	0,465	0,458
jablana	0,008	0,009	0,067	0,500	0,294	0,500	0,298	0,336
lipa	0,067	0,079	0,256	0,312	0,465	0,298	0,500	0,431
oreh	0,021	0,025	0,151	0,352	0,458	0,336	0,431	0,500
kostanj	0,070	0,085	0,331	0,211	0,345	0,188	0,401	0,313
hrast	0,097	0,122	0,453	0,135	0,233	0,109	0,302	0,207
smreka	0,051	0,060	0,236	0,301	0,462	0,284	0,500	0,426
bor	0,016	0,019	0,100	0,463	0,343	0,459	0,337	0,383
cipresa	0,008	0,009	0,157	0,262	0,450	0,228	0,500	0,404
trava-ob cesti	0,014	0,016	0,104	0,424	0,375	0,415	0,363	0,417
trava-travnik	0,010	0,012	0,123	0,342	0,454	0,321	0,427	0,500
trava-pašnik	0,035	0,041	0,177	0,362	0,462	0,349	0,435	0,500

Tabela 4: T-test tabela 2

ttest	kostanj	hrast	smreka	bor	cipresa	trava-ob cesti	trava-travnik	trava-pašnik
kontrola-1	0,070	0,097	0,051	0,016	0,008	0,014	0,010	0,035
kontrola-2	0,085	0,122	0,060	0,019	0,009	0,016	0,012	0,041
bukov	0,331	0,453	0,236	0,100	0,157	0,104	0,123	0,177
breza	0,211	0,135	0,301	0,463	0,262	0,424	0,342	0,362
hruška	0,345	0,233	0,462	0,343	0,450	0,375	0,454	0,462
jablana	0,188	0,109	0,284	0,459	0,228	0,415	0,321	0,349
lipa	0,401	0,302	0,500	0,337	0,500	0,363	0,427	0,435
oreh	0,313	0,207	0,426	0,383	0,404	0,417	0,500	0,500
kostanj	0,500	0,384	0,394	0,228	0,369	0,247	0,299	0,326
hrast	0,384	0,500	0,288	0,144	0,237	0,154	0,188	0,227
smreka	0,394	0,288	0,500	0,326	0,500	0,353	0,420	0,431
bor	0,228	0,144	0,326	0,500	0,286	0,460	0,374	0,392
cipresa	0,369	0,237	0,500	0,286	0,500	0,313	0,392	0,415
trava-ob cesti	0,247	0,154	0,353	0,460	0,313	0,500	0,410	0,424
trava-travnik	0,299	0,188	0,420	0,374	0,392	0,410	0,500	0,500
trava-pašnik	0,326	0,227	0,431	0,392	0,415	0,424	0,500	0,500

9.4 REZULTATI MERJENJA KONCENTRACIJE RAZTOPLJENEGA KISIKA V INFUZUMIH

Koncentracijo raztopljenega kisika v infuzumih sem meril 21. 3. 2021, tj. točno štiri tedne po pripravi infuzumov.



Slika 12: Koncentracija raztopljenega kisika v infuzumih dne 21. 3. 2021

9.5 REZULTATI FORMACIJE FOLIJE NA POVRŠINI INFUZUMOV

Podatke za formacijo folije sem zbiral od samega začetka raziskave do približno štirih tednov po začetku. Razlog za prekinitve zbiranja podatkov je, da se je folija večkrat uničila ali potopila po številnih vzetjih vzorcev in merjenju koncentracije raztopljenega kisika. S tem razlogom so podatki navedeni do vključno 3. marca.

✗- ni folije ✓- je folija

Tabela 5: Prisotnost folije na površini infuzumov

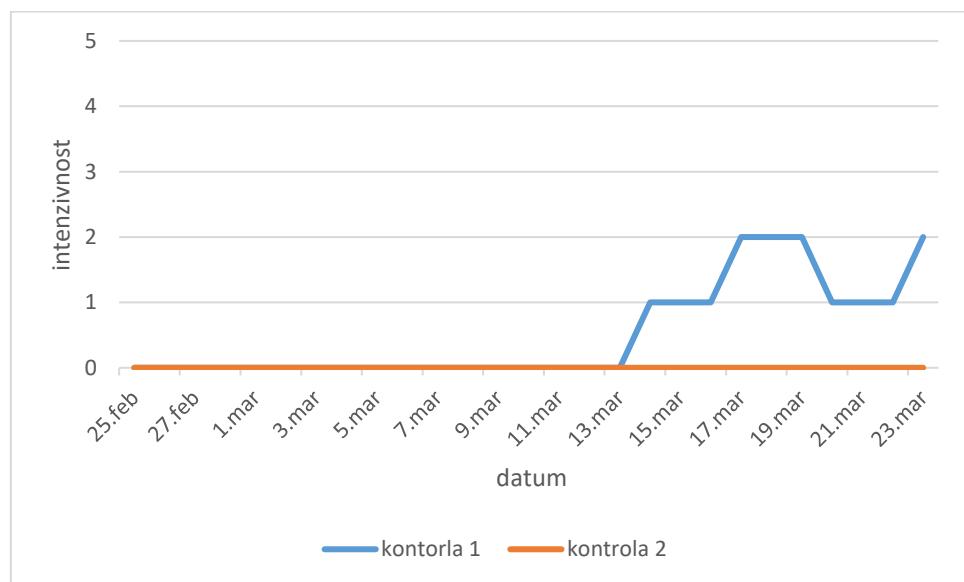
infuzum	21.feb	22.feb	23.feb	24.feb	25.feb	26.feb	27.feb	28.feb	1.mar	2.mar	3.mar
Kontrola-1	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
Kontrola-2	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
bukov	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
breza	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
hruška	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓
jablana	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓
lipa	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓
oreh	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓
kostanj	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓
hrast	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
smreka	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓
bor	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
cipresa	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓
trava-ob cesti	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
trava-nekošen travnik	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓
trava- pašnik	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓



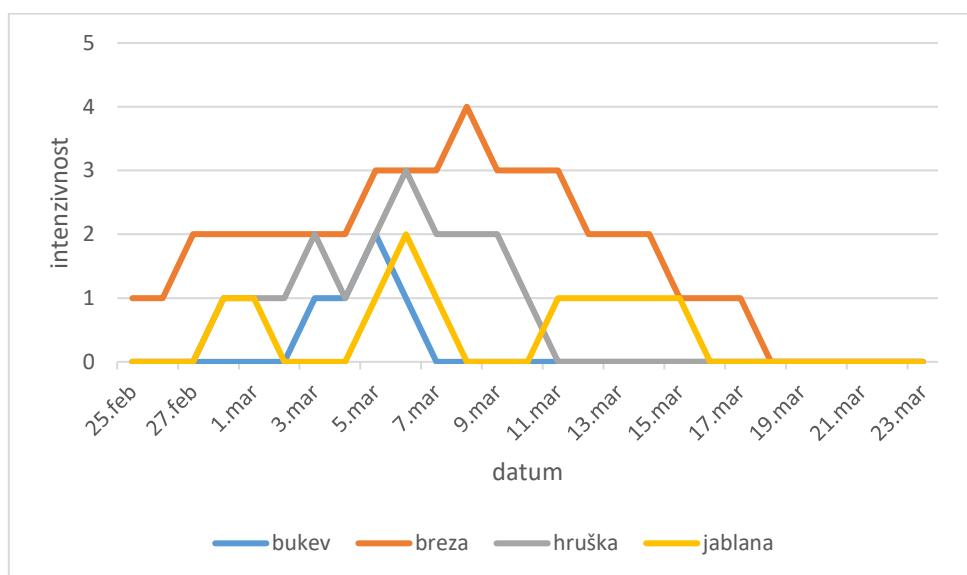
Slika 13: Primer folije na površini infuzuma (lasten vir)

9.6 REZULTATI KVALITATIVNEGA PREIZKUŠANJA VONJA INFUZUMOV

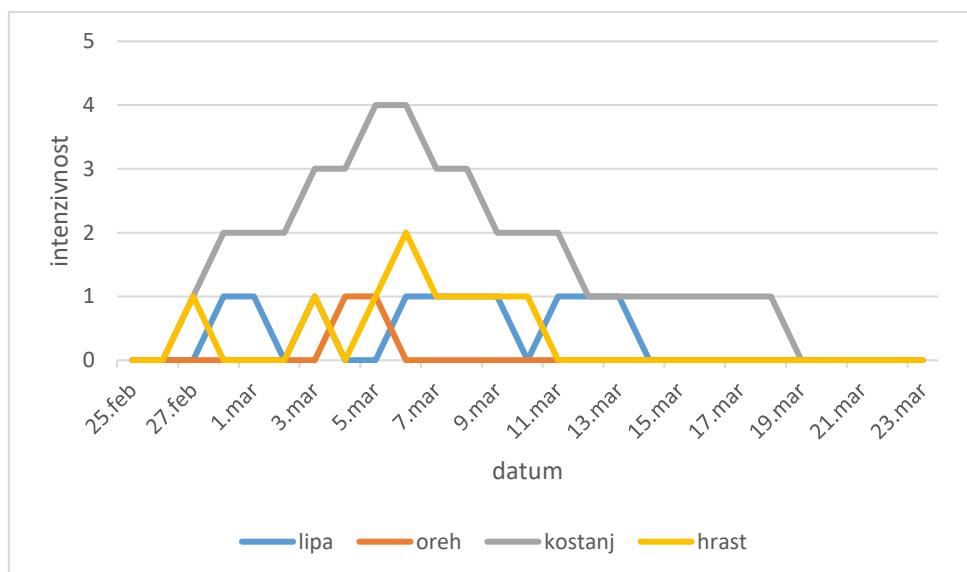
Za te rezultate sem vohal vsak infuzum od 25. februarja do 27. marca. Dlje nisem vonjal infuzumov, saj so ti zaradi vzetja vzorcev in merjenja količine raztopljenega kisika izgubili vonj. Za te rezultate sem tudi ustvaril lestvico od 0 do 5, kjer 0 pomeni, da vzorec ne smrdi, in 5, da zelo smrdi. Rezultate sem razdelil v več diagramov zaradi preglednosti.



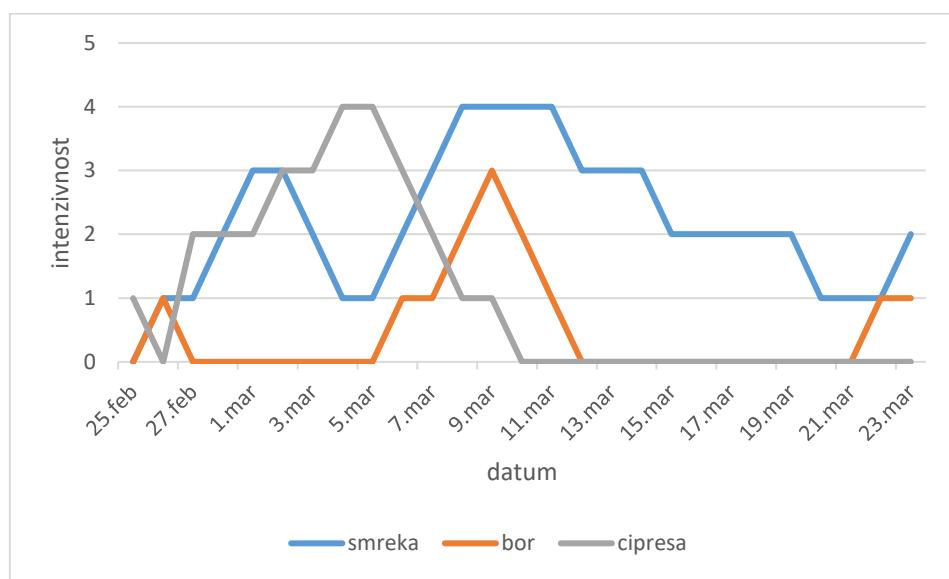
Slika 14: Vonj kontrol



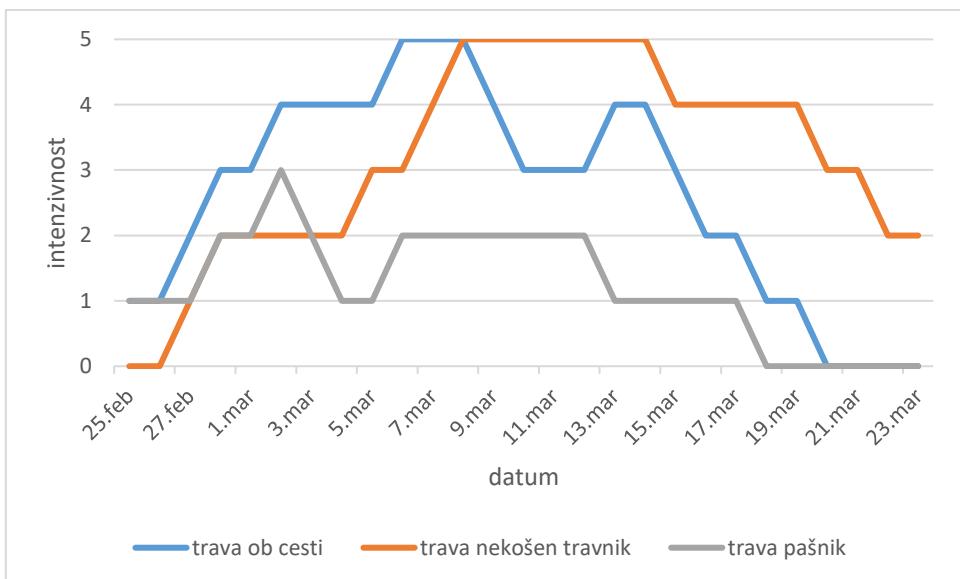
Slika 15: Vonj vzorcev z listavci-1



Slika 16: Vonj vzorcev z listavci-2



Slika 17: Vonj vzorcev z iglavci



Slika 18: Vonj vzorcev s travami

10 RAZPRAVA

Pri rezultatih mikroskopiranja lahko vidimo koliko organizmov določene vrste je bilo najdenih v posameznem infuzumu v obdobju osmih tednov. Ob vsakem mikroskopiranju sem za posamezen vzorec vzel preparate iz vode, ki je prišla iz enake globine, tako da bi lahko bili rezultati čim bolj primerljivi. Ko primerjamo pogostost videnih organizmov v kontrolah s pogostostjo videnih organizmov v drugih vzorcih s t-testom vidimo, da se večinoma ti razlikujejo od kontrole. Pri listavcih so štirje od osmih infuzumov statistično različni od kontrol, pri iglavcih sta dva od treh statistično različna, trave so pa vse statistično različne. Ob primerjanju infuzumov, ki niso bili kontroli, med sabo s t-testom so vse vrednosti prišle nad 0,05, kar pomeni, da ti infuzumi niso bili statistično različni med sabo.

Pri rezultatih preizkušanja vonja infuzumov sem opazil, da so izmed vseh skupin vzorcev z rastlinskimi deli najbolj smrdele trave, še posebej trava, ki je bila zbrana ob cesti, in trava, ki je bila zbrana iz travnika. Od listavcev so najbolj smrdeli kostanj, breza in hruška, vsi drugi infuzumi, ki so vsebovali liste, niso imeli pretirano močnega vonja. Razvidno je tudi, da so bili vzorci, ki so vsebovali dele iglavcev, v glavnem bolj smrdeči. Kontroli nista imeli nobenega vonja, je pa opazno, da je kontrola 1 ob koncu preizkušanja z vonjem dobila rahel smrad. Pri tem preizkušanju je tudi treba omeniti, da ker so bili rezultati zbrani na kvalitativen način, ni nujno, da so ti rezultati točni. Kljub njihovim potencialnim netočnosti pokažejo vsaj splošno stanje vonja infuzumov skozi potek eksperimenta – lestvica se je izkazala za primerno, saj so bile razlike med vrednostmi 0 in 1, 1 in 2 itd. zelo očitne.

Iz rezultatov raztopljenega kisika v infuzumih je razvidno, da sta imeli kontroli v sebi največjo vrednost raztopljenega kisika. Poleg teh dveh vzorcev, je po vsebnosti kisika edini iztopajoči vzorec infuzum z listi bukve, ki je imel sicer manjšo količino raztopljenega kisika na liter kot kontroli, ampak še vedno izrazito več kot katerikoli drug infuzum. Bolje bi bilo, da bi lahko skozi obdobje raziskave večkrat meril to spremenljivko. Razlog zakaj nisem je to, da nisem hotel pretiravati s temi meritvami, ker ob merjenju teh podatkov je potrebno, da konstantno merilec mešaš v vodi, kar je imelo kot posledico uničeno folijo, ki se je izgrajevala na površini infuzuma. Zato sem nivo raztopljenega kisika v vodi izmeril šele po štirih tednih, da bi čim manj posegal v ekosisteme, ki so se vzpostavili v posameznem vzorcu.

Podatki za prisotnost folije na površini infuzumov so bili tudi pridobljeni na kvalitativen način, saj sem opazoval, ali se je folija že formirala. Ob koncu opazovanja folija ni bila formirana pri obeh kontrolah ter infuzumu iz bukve.

Iz rezultatov je razvidno, da obstaja povezava med formacijo folije in koncentracijo raztopljenega kisika v infuzumu. Vzorci brez formirane folije so imeli po štirih tednih eksperimenta veliko več raztopljenega kisika na liter tekočine kot vzorci, na katerih je bila folija. Glede na te podatke predvidevam, da je folija nekako vplivala na koncentracijo raztopljenega kisika. Res je, da tega ne moram dokončno potrditi, ampak v vseh primerih, kjer je nizek nivo kisika v vodi, je bila folija formirana že en teden po začetku eksperimenta. Predpostavim tri različne vzroke: folijo gradijo anaerobni mikroorganizmi, organizmi v foliji so

porabniki kisika, folija je preprečila dostop kisika v infuzum. Bakterije v foliji so se predvidoma aktivirale ob stiku z vodo iz cist v mirovanju. Bakterije so se tudi prve namnožile in so predstavljale hrano za večino drugih organizmov, ki so se kasneje prebudili. Torej tam, kjer je bilo več bakterij, je bilo tudi več organizmov, ki so porabljalo kisik in zato se je kisik do zbiranja podatkov porabil. Še več dokazov za to, da je bilo v infuzumih brez folije manj organizmov, je bilo moje opravljeno mikroskopiranje, katero je pokazalo da so imeli ti vzorci v sebi manjšo raznolikost in tudi število organizmov.

Z mikroskopiranjem in opazovanjem lahko pridobljene rezultate povežemo tudi z rezultati vohanja. Vzrok za smrad je bila lahko folija, katera je zgrajena iz bakterij. Če se v foliji nahajajo saprofitne bakterije, bo zaradi razkrajajočih snovi navzven smrdel tudi infuzum. Možno je tudi da so poleg bakterij smrad proizvajali tudi kakšni drugi organizmi. Vidimo, da so infuzumi, kjer ni nastala folija, bili dokaj ne smrdeči. V prid ugotovitvi, da je folija izvor smradu, je tudi spoznanje, da so po potopitvi folij (zaradi pravilnega načina izvajanja meritev koncentracije kisika) vsi infuzumi začeli izgubljati svoj vonj, kar pomeni, da je imela folija velik vpliv na aroma infuzumov. Drug razlog za smrad je povezan s padajočim nivojem raztopljenega kisika v vodi. Najbolj smrdeči infuzumi so imeli vsi nizek nivo kisika v sebi, kar pomeni, da so v njih imeli anaerobni organizmi več možnosti za razmnoževanje, ti so pa lahko še bolj prispevali k neprijetnim vonjavam različnih vzorcev. Še zadnja razlaga, zakaj so vzorci smrdeli je to, da so rastlinski deli znotraj vode v steklenih kozarcih začeli gniti. Ker gnitje v okolje spušča slab vonj, sem ga lahko zaznal. Zanimivo bi bilo preučiti, ali infuzumi, ki so pripravljeni iz rastlinskih delov z malo ali nič bakterijskih cist in cist anaerobnih organizmov, smrdijo.

Po končanem analiziranju infuzumov lahko tudi odgovorim na prej zastavljena raziskovalna vprašanja. Najprej sem si postavil široko vprašanje o tem, kako se razlikujejo mikroorganizmi glede na infuzum. Pri mikroskopiranju sem najbolj pogosto opažal paramecije, *Colpoda*, *Vorticelle*, gliste in kotačnike. Poleg teh so bili prisotni tudi organizmi, kateri so bili tako majhni, da nisem bil prepričan, v katero taksonomsko skupino bi jih uvrstil. S pomočjo t-testa sem ugotovil, da vzorci različnih infuzumov z rastlinskimi materialom ne vsebujejo statistično značilno različnega števila organizmov.

Drugo raziskovalno vprašanje je bilo, kaj je skupno mikroorganizmom v infuzumih. Lahko vidimo, da ni pretiranih razlik v raznolosti mikroorganizmov. Je pa razlika v pogostosti njihovega pojava. Lahko vidimo, da v kontrolah ni bilo nobenih večjih mikroorganizmov, ampak so se izjemoma pojavili samo nekateri manjši neidentificirani organizmi. Poleg kontrol pa opazimo, da so ti neidentificirani organizmi bili prisotni v vseh infuzumih in tudi zelo pogosto. *Colpoda* je bila prisotna tudi v vseh infuzumih poleg kontrol, kar sem tudi pričakoval saj ti protisti pogosto prevladujejo v filosferskih mikrobiomih. Še posebej velikokrat so bili prisotni na dveh iglavcih, boru in smreki. Vsem infuzumom je skupno, da so bile najmanj pogoste gliste. Rezultati se skladajo z literaturo (Nematoda, 2021), saj nekatere gliste napadajo rastline, vendar so ciljni rastlinski organ korenine. To pomeni, da je manj verjetno, da bi lahko prišle vse do listov rastlin.

Naslednje raziskovalno vprašanje je bilo, kako mikroorganizmi vplivajo na infuzum. Z opravljanjem več eksperimentov in preučevanjem rezultatov sem izvedel, da v infuzumu veliko različnih vrst organizmov in vsi imajo svoje naloge in ekosistemski vloge (Anderson in Druger, 1997). Za večino organizmov v infuzumu so najbolj pomembne bakterije, saj za njih predstavljajo glavni vir hrane. Same bakterije so ključne pri formulaciji folije, katera povzroča smrad in tudi posledično zniževanje nivoja koncentracije raztopljenega kisika v vodi. Koncentracija kisika se manjša tudi zato, ker so v infuzumu tudi drugi večji organizmi, ki porabljajo kisik. To so aerobni heterotrofi, kateri so bili večinoma prisotni v mojih vzorcih. Presenetilo me je, da v infuzumih ni bilo veliko alg, katere bi predstavljale avtotrofne organizme, ki tudi proizvajajo kisik. Brez umetnega posredovanja bi bil tak ekosistem netrajnostni zaradi pomanjkanja hrane in kisika (Reece in sod., 2013). Edini infuzumi, kateri so imeli v sebi še dovolj kisika, so bile obe kontroli in infuzum, ki je vseboval liste bukve. Z mikroskopiranjem sem ugotovil, da so ti vzorci imeli najmanj raznolikosti organizmov, te sem tudi bolj redko videval. Sklepam, da se na filosferi rastlinskih delov, katere sem opazoval, ne nahaja dovolj avtotrofnih mikroorganizmov za izgradnjo ekosistema, ki se bi lahko vzdrževal.

Zadnje raziskovalno vprašanje je bilo, kako bi lahko ta raziskava pojasnila dogajanje v gozdnem ali travnatem ekosistemu. Za odgovarjanje na to vprašanje je potrebno vedeti, da infuzumi niso najboljši način za predstavljanje ekosistema, vsaj ne infuzumi, ki ne vsebujejo avtotrofov. Avtotrofi so za vsak ekosistem nujni, saj so to edini organizmi, ki lahko iz anorganskih snovi proizvajajo organske, s katerimi se potem prehranjujejo še drugi heterotrofni organizmi. Brez avtotrofov se prekine kroženje energije in kroženje snovi, to pa sta dva najbolj pomembna procesa v kateremkoli ekosistemu. Metoda izdelave infuzuma je bila primerna za namene moje raziskave, saj sem hotel videti, kateri organizmi se nahajajo na filosferi rastlin. Ta metoda lahko pokaže dokaj natančno, kateri organizmi se nahajajo na delih rastlin, ne more pa dovolj natančno pokazati, kako delujejo ti organizmi v ekosistemu zunaj v naravi. Saj v naravi se voda vedno polni s potoki ali z dežjem, medtem ko se v mojem eksperimentu ni, v naravi imajo neverjetno pomembne vloge na organizme na filosferi rastlin tudi organizmi in dejavniki, ki so prisotni drugod, katerih pa nisem mogel rekreirati v mojem poskusu. Zato lahko do neke mere odgovorim na to zastavljeno vprašanje, ne moram pa dokončno reči, kako bi različni procesi s temi organizmi potekali v naravi, saj sem iz narave vzel samo en majhen sestavni del ekosistema, ki pa ni vseboval vseh organizmov, ki bi lahko vzpostavili svoj ekosistem v katerem bi lahko preživel dolgoročno.

Preden sem začel z eksperimentom, sem postavil nekaj hipotez.

H1. Na listih se nahajajo mikroorganizmi.

Z mikroskopiranjem sem opazil mikroorganizme v vseh vzorcih. S prekuhanjem vode in pokrivanjem steklenih kozarcev sem preprečil dostop mikroorganizmov, vendar so bili tudi v kontrolnih posodah organizmi prisotni. Slednjih je bilo statistično značilno manj od infuzumov z listi, zato lahko trdim, da so mikroorganizmi v vodo vstopili iz filosfere. Hipotezo zato potrdim.

H2. Infuzumi se bodo razlikovali glede diverzitete organizmov.

To hipotezo zavračam, saj infuzumi, poleg kontrol, niso imeli v sebi različne mikroorganizme, imeli so enake vrste mikroorganizmov, ki so se pa pojavljali v enem infuzumu večkrat, v drugem pa manjkrat. Sicer je bilo nekaj primerov, kjer so se pojavili nekateri organizmi v enem infuzumu, ko jih v drugem ni bilo in tudi da so nekateri mikroorganizmi v določenih vzorcih tudi manjkali. Na podlagi primerjave s t-testom ugotovimo, da so vsi vzorci, v katerih je bil rastlinski material, statistično značilno enaki po številu organizmov, vendar statistična metoda ne omogoča prepoznavanja raznolikosti organizmov.

H3. Tekom izvedbe eksperimenta bo v infuzumih padel nivo raztopljenega kisika.

To hipotezo potrdim, saj je koncentracija raztopljenega kisika v vodi res močno padla zaradi več različnih prej omenjenih dejavnikov (folija, heterotrofni organizmi).

H4. Infuzumi bodo imeli različno intenzivnost vonja med sabo.

Hipotezo potrdim. Večina listavcev je imela manj intenziven vonj kot kontroli, trave in iglavci. Infuzumi s travami najbolj intenziven vonj od vseh vzorcev.

H5. Trava in iglavci bodo imeli manjšo raznolikost mikroorganizmov kot listavci.

Zadnja hipoteza je bila postavljena na osnovi značilnosti filosferskih mikrobiomov. Navadno imajo listi z večjo in bolj grobo površino na sebi več mikroorganizmov. Z večjo površino imajo možnost večje nosilnosti organizmov, njihova grobost listov pa omogoča različnim mikroorganizmom, kot so bakterije, življenjski prostor, kjer so bolj zavarovani pred zunanjimi dejavniki, kot bi bili drugače, če bi živelni na listu z gladko površino, kjer ni veliko variacije površja. Ampak vseeno te hipoteze ne moram potrditi, saj podatki pokažejo, da so imeli infuzumi, ki so vsebovali ali trave ali iglice, enako raznolikost ali pa v nekaterih primerih tudi večjo, kot so jo imeli listi listavcev. Za to je lahko več razlogov. Prvi razlog je lahko to, da imajo iglice in trave kljub njihovimi majhnosti filosfere druge zgradbe in dejavnike, ki vplivajo na poseljenost filosfere. Iglice so listi, ki so samo preoblikovani in so prav narejeni za to, da imajo manjšo površino ter debelo kutikulo, kar jim omogoča manjšo izgubo vode. Ampak kot vsi listi morajo tudi iglice imeti reže, da lahko izmenjujejo pline z okoljem. Da bi čim bolj zmanjšale izgubo vode, imajo te reže znotraj jam. Možno je da se prav v teh jama nahajajo epifiti ali filosferska mikrobiota, saj so v teh jama idealni dejavniki za preživetje. Za to trditev, da se v režnih jama na iglicah nahaja veliko epifitov, bi bilo potrebna druga raziskava. Trava pa ima nekako drugačne morfološke značilnosti, ki ji omogočajo večjo nosilnost mikroorganizmov na njenej površinah. Mesto na filosferi trave, kjer bi se lahko nahajalo največ epifitov, je nodij, to je mesto, kjer se list pritrjuje na steblo. Pri tem se ustvari mesto, kjer bi bili lahko mikroorganizmi bolj zaščiteni pred zunanjimi dejavniki. Razlog pa je lahko tudi evolucijski, saj so se v krajšem evolucijskem časovnem obdobju nastanka listavcev oblikovale redkejše simbioze mikroorganizmov in rastlin kot med travami ali iglavci, ki so imeli daljše časovno obdobje za razvoj raznovrstnih simbioz.

Pri opravljanju raziskave bi bile možne tudi nekatere spremembe in izboljšave. Ker sem raziskavo delal v času pandemije covid-19, sem vso raziskavo opravil doma. Zaradi tega razloga sem uporabljal nekatere pripomočke, ki niso bili iz laboratorija, ampak so opravili podobno funkcijo (npr. kozarci za vlaganje namesto čaš). Kljub postavitvi eksperimenta doma sem poskušal čim bolj vzpostaviti higienske razmere v okolini infuzumov. Na razpolago nisem imel laboratorija, ampak sem si lahko iz šole izposodil vso potrebno opremo, katere nisem mogel nadomestiti z alternativami.

Pri raziskavi sem čim bolj poskušal zmanjšati število spremenljivk, ki bi vplivale na potek raziskave, zato sem poskušal narediti, da so vsi vzorci imeli enake pogoje. Potencialen problem je mogoče predstavljala pozicija infuzumov na mizi. Vsi infuzumi so bili izpostavljeni enak čas sončni svetlobi, ampak nekateri so bili postavljeni tako, da so bili drugi infuzumi pred njimi, kar bi lahko zmanjšalo količino svetlobe, ki so jih dobili infuzumi v zadnji vrsti. Ampak menim, da to ni bil tako velik problem, saj ni bilo pretiranih razlik med sprednjo in zadnjo vrsto. Kontroli se med sabo tudi bistveno ne razlikujejo. Za vsak slučaj sem v zadnjo vrsto postavil tudi infuzum, ki je vseboval liste hrasta, tako da bi lahko videl ali pozicija kaj vpliva na različne rezultate. Ampak nisem videl bistvene razlike. Idealno bi bilo, če bi imel lahko infuzume razporejene tako da bi bili vsi v eni vrsti z enako osvetlitvijo in temperaturo. Za idealen potek eksperimenta bi imel za vsako vrsto rastlinskih delov več infuzumov, da bi lahko imel večji nabor rezultatov, kar bi dodalo k natančnosti raziskave in bi se lahko videle večje razlike med infuzumi.

Najbolj "netočne" meritve pa bi lahko predstavljalo kvalitativno merjenje intenzivnosti vonja infuzumov, saj za merjenje vonja nisem imel nobenih aparatur, ki bo ga lahko zmerile kvalitativno. Kljub temu menim, da so pridobljeni rezultati dovolj dobrni, saj za namene raziskave nisem rabil točne vrednosti intenzivnosti vonja. Rezultati so bili primerni za primerjavo z drugimi.

Merjenje koncentracije raztopljenega kisika v vodi je bilo dokaj nedvoumno, saj so bili to kvantitativni podatki. Pri merjenju tega podatka pa je omembe vredno tudi to, da sem za merjenje tega podatka moral uničiti folijo, ki je bila na vrhu infuzuma, saj drugače ne bi mogel pravilno uporabljati meritca.

11 ZAKLJUČEK

Pri moji raziskavi sem izvedel veliko različnih informacij o filosferskih mikrobiomih izbranih rastlin. Rezultati so pokazali, da se na površini listov izbranih rastlin nahajajo mikroorganizmi, saj so vzorci z rastlinskimi deli bili statistično različni od kontrol. Vzorci niso bili statistično različni med sabo, zato ne moramo govoriti o biodiverziteti med filosferskimi mikrobiomi rastlin. Dokazana je bila povezava med nivojem koncentracije raztopljenega kisika v vodi, smradom vzorcev in tvorbo folije na površini infuzumov ter številom mikroorganizmov. V vzorcih so se nahajali večinoma heterotrofni organizmi, medtem ko avtotrofov praktično ni bilo, torej so bili mikroorganizmi na površini listov izbranih rastlin v veliki večini heterotrofi. Kot rezultat pomankanja avtotrofov se je nivo koncentracije raztopljenega kisika nižal, kar je omogočilo hitrejši razvoj anaerobnih organizmov. Nivo kisika je – poleg kontrol – najmanj padel v vzorcu z listi bukve. Najbolj so smrdeli iglavci in trave, kar dokazuje, da je v njih bilo prisotnih največ bakterij, anaerobnih organizmov ali gnitja. Iz tega lahko sklepamo, da se na filosferah iglavcev in trave nahaja več bakterij.

Na tem področju bi bile potrebne bolj natančne raziskave, ki bi lahko z več vzorci in z boljšimi pripomočki dokazale različnost med posameznimi filosferskimi mikrobiomi rastlin. Z raziskovanjem tega področja bi lahko zvedeli, točno kateri organizmi se nahajajo na filosferah določene vrste rastlin na določenem območju. S tem bi lahko lažje razumeli, kako filosferski mikrobiomi vplivajo na širši ekosistem nekega prostora. Izvedeli bi, katere vloge imajo ti mikroorganizmi in tudi kako to vpliva na kmetijstvo ter kvaliteto življenja ljudi. Ni nujno, da bi bile take raziskave omejene samo na neobdelane površine, lahko bi bile izvedene tudi na kmetijskih površinah, da bi videli, kako filosferski mikrobiomi vplivajo na pridelke.

Menim da je to eno področje znanosti, kateremu bi morali nameniti več pozornosti, saj ima velik vpliv na človeka in naravo.

12 VIRI IN LITERATURA

Anderson O. R. in Druger Marvin. 1997. Explore the world Using Protozoa. Arlington: National Science Teachers Association. 240 str.

Atta I. H. 2020. Why Studying Microorganisms in the Air Is Vital. [online]. Dostopno dne 6. 4. 2021 na spletnem naslovu: <https://asm.org/Articles/2020/December/Why-Studying-Microorganisms-in-the-Air-Is-Vital>

Belušič G., Koce D. J., Turk M., Vittori M., Zalar P. 2020. Biologija 2 O zgradbi in delovanju organizmov. Ljubljana: Mladinska knjiga. 288 str.

Ciliates Microscopy: Habitats, Characteristics & Reproduction. 2021. [online]. Dostopno dne 6. 4. 2021 na spletnem naslovu: <https://www.microscopemaster.com/ciliates.html>

Cochran-Stafira, D. L. in von Ende C. N. 1998. INTEGRATING BACTERIA INTO FOOD WEBS: STUDIES WITH SARRACENIA PURPUREA INQUILINES. [online]. Dostopno dne 6. 4. 2021 na spletnem naslovu: [https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1890/0012-9658\(1998\)079\[0880:IBIFWS\]2.0.CO;2](https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1890/0012-9658(1998)079[0880:IBIFWS]2.0.CO;2)

Colpoda. 2014. [online]. Dostopno dne 6. 4. 2021 na spletnem naslovu: <https://www.flickr.com/photos/114552427@N08/15500338317>

Godec G., Grubelnik L., Glažar S. Zgradba lista pod mikroskopom. [online]. Dostopno dne 5. 4. 2021 na spletnem naslovu: <https://eucbeniki.sio.si/nar6/1547/index2.html>

How is a hay infusion prepared? [online]. Dostopno dne 6. 4. 2021 na spletnem naslovu: <https://www.bresser.de/c/en/support/guidebooks/mikroskopie/hay-infusion/>

Leaf. 2017. [online]. Dostopno dne 5. 4. 2021 na spletnem naslovu: <https://biologydictionary.net/leaf/>

Lindow E. S., Brandl T.M. 2003. Microbiology of the Phyllosphere. Dostopno dne 26. 4. 2021 na spletnem naslovu: <https://aem.asm.org/content/69/4/1875>

Microbes and the World. 2021. [online]. Dostopno dne 4. 4. 2021 na spletnem naslovu: <https://courses.lumenlearning.com/boundless-microbiology/chapter/microbes-and-the-world/>

Nematoda. 2021. [online]. Dostopno dne 5. 4. 2021 na spletnem naslovu: <https://byjus.com/biology/nematoda/>

Odgovori 8 ekologija. [online]. Dostopno dne 24. 4. 2021 na spletnem naslovu: <http://vedez.dzs.si/datoteke/odgovori%208%20Ekologija.pdf>.

Outka E. D. in Bradbury C. P. 1967. The Structure of Colpoda elliotti n. sp. [online]. Dostopno dne 26. 4. 2021 na spletnem naslovu: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1550-7408.1967.tb02006.x>

Patterson D. J. 1992. Free-Living Freshwater Protozoa: A Colour Guide. CRC press. 233 str.

Phylum Rotifera. 2021. [online]. Dostopno dne 5. 4. 2021 na spletnem naslovu: <https://courses.lumenlearning.com/wm-biology2/chapter/phylum-rotifera/>

Ploch S., Rose L. E., Bass D., Bonkowski M. 2016. High Diversity Revealed in Leaf-Associated Protists (Rhizaria: Cercozoa) of Brassicaceae. Dostopno dne 26. 4. 2021 na spletnem naslovu: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jeu.12314>

Protozoa. 2021. [online]. Dostopno dne 6. 4. 2021 na spletnem naslovu: <https://microbiologysociety.org/why-microbiology-matters/what-is-microbiology/protozoa.html>

Reece J. B., Urry L. A., Cain M. L., Wasserman S. A., Minorsky P. V., Jackson R. B. (2013). Biologija zgradba in delovanje ekosistemov. Celovec. Mohorjeva založba. 121 str.

Shah R. 2021. Paramecium Caudatum: Habitat, Structure and Locomotion. [online]. Dostopno dne 5. 4. 2021 na spletnem naslovu: <https://www.biologydiscussion.com/invertebrate-zoology/protozoa/paramecium-caudatum-habitat-structure-and-locomotion/28315>

Shaw E. 2019. [online]. Dostopno dne 6. 4. 2021 na spletnem naslovu: <https://sciencing.com/pine-needles-6455979.html>

Sivakumar N., Sathishkumar R., Selvakumar G., Shyamkumar R., Arjunekumar K. (2020) Phyllospheric Microbiomes: Diversity, Ecological Significance, and Biotechnological Applications. V: Yadav A., Singh J., Rastegari A., Yadav N. (urd.S) Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture. Sustainable Development and Biodiversity, vol 25. Springer, Cham. Dostopno dne 26. 4. 2021 na spletnem naslovu: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-38453-1_5

Summarize the distinctive physical characteristics of grasses. 2021. Oregon state university. [online]. Dostopno 26. 4. 2021 na spletnem naslovu:

<https://forages.oregonstate.edu/nfgc/eo/onlineforagecurriculum/instructormaterials/availabletopics/grasses/characteristics>

Tattar A. T. 1989. Diseases of Shade Trees (Revised Edition). [online]. Dostopno dne 29. 6. 2021 na spletnem naslovu: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780126843514500107>

Trmble S. 2019. Leaf Area - How & Why Measuring Leaf Area is Vital to Plant Research. Dostopno 29. 6. 2021 na spletni povezavi: <https://cid-inc.com/blog/leaf-area-how-why-measuring-leaf-area-is-vital-to-plant-research/>

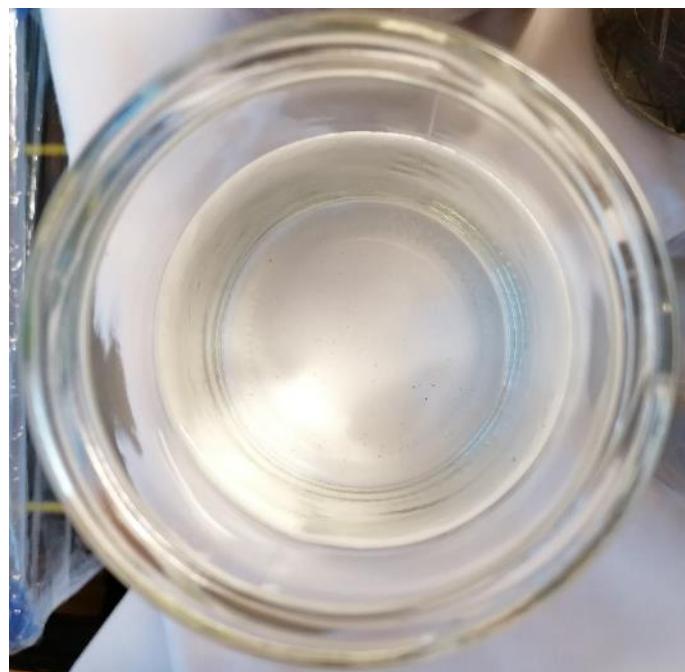
Vidyasagar, A. 2016a. What Are Protists?. [online]. Dostopno 6. 4. 2021 na spletnem naslovu: <https://www.livescience.com/54242-protists.html>

Vidyasagar, A. 2016b. What Is A Paramecium?. [online]. Dostopno 6. 4. 2021 na spletnem naslovu: <https://www.livescience.com/55178-paramecium.html>

Vorticella Characteristics, Structure, Reproduction and Habitat. 2021. [online]. Dostopno 6. 4. 2021 na spletnem naslovu <https://www.microscopemaster.com/vorticella.html>

Vorticella. 2021. [online]. Dostopno dne 6. 4. 2021 na spletnem naslovu : http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Amoebeae_Flagellates_Ciliates/Ciliates/VORTICELLA/Vorticella_Image_page.html

13 PRILOGE



Slika 19: Kontrola-1, 3. 3. 2021 (lasten vir)



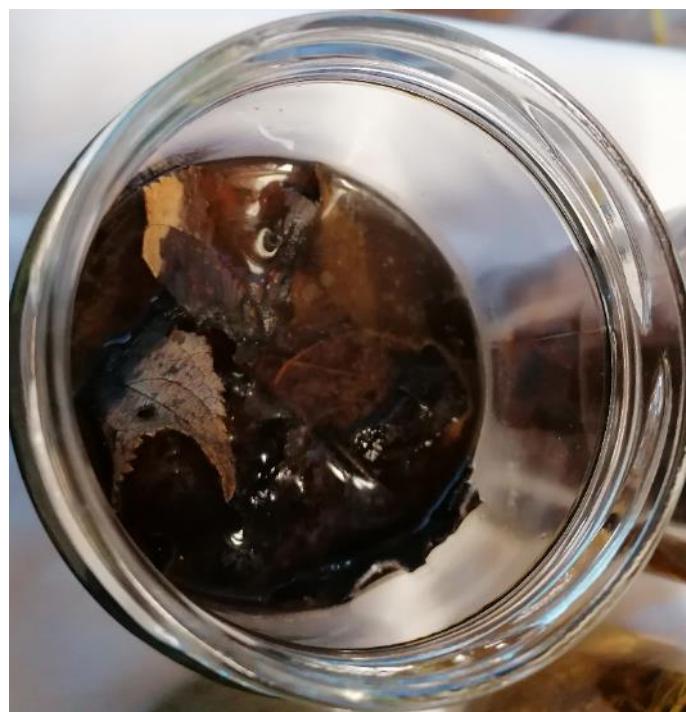
Slika 20: Vzorec z listi bukve, 3. 3. 2021 (lasten vir)



Slika 21: Vzorec z listi breze, 3. 3. 2021 (lasten vir)



Slika 22: Vzorec z listi hruške, 3. 3. 2021 (lasten vir)



Slika 23: Vzorec z listi jablane, 3. 3. 2021 (lasten vir)



Slika 24: Vzorec z listi lipe, 3. 3. 2021 (lasten vir)



Slika 25: Vzorec z listi oreha, 3. 3. 2021 (lasten vir)



Slika 26: vzorec z listi kostanja, 3. 3. 2021 (lasten vir)



Slika 27: Vzorec z iglicami smreke, 3. 3. 2021 (lasten vir)



Slika 28: Vzorec z iglicami bora, 3. 3. 2021 (lasten vir)



Slika 29: Vzorec z iglicami ciprese, 3. 3. 2021 (lasten vir)



Slika 30: Vzorec z listi obcestne trave, 3. 3. 2021 (lasten vir)



Slika 31: Vzorec z listi trave iz travnika, 3. 3. 2021 (lasten vir)



Slika 32: Vzorec z listi trave iz pašnika, 3. 3. 2021 (lasten vir)



Slika 33: vzorec z listi hrasta, 3. 3. 2021 (lasten vir)



Slika 34: Kontrola-2, 3. 3. 2021 (lasten vir)

Tabela 6: Vsi opaženi organizmi pri mikroskopiranju

infuzum	teden							
	1	2	3	4	5	6	7	8
kontrola 1	x	x	x	x	x	neznana	x	x
bukev	neznana	colpoda, glista	neznana paramecij	paramecij neznana	paramecij	x	neznana	neznana
breza	colpoda	colpoda neznana	colpoda kotačnik neznana	colpoda neznana	colpoda vorticella kotačnik neznani	colpoda kotačnik neznani	paramecij colpoda kotačnik neznani	paramecij colpoda kotačnik neznani
hruška	paramecij colpoda	colpoda neznani	colpoda vorticella neznani	colpoda kotačnik neznani	vorticella neznani	neznani	kotačnik neznani	colpoda vorticella neznani
jablana	colpoda vorticella	neznani	vorticella kotačnik neznani	colpoda vorticella neznani	paramecij vorticella kotačnik neznani	paramecij colpoda vorticella kotačnik neznani	colpoda vorticella neznani alge	kotačnik neznani
lipa	colpoda neznani	colpoda kotačnik neznani	colpoda neznani	colpoda neznani	colpoda neznani	paramecij colpoda neznani	colpoda neznani	neznani
oreh	colpoda vorticella neznani	colpoda neznani	vorticella kotačnik neznani	vorticella neznani	vorticella kotačnik	kotačnik neznani	colpoda neznani	colpoda kotačnik neznani
kostanj	neznani	paramecij vorticella neznani	vorticella neznani	colpoda neznani	vorticella neznani	neznani	paramecij neznani	neznani
smreka	colpoda	colpoda neznani paramecij	colpoda neznani	colpoda glista neznani	colpoda neznani	colpoda neznani	colpoda neznani	vorticella neznani
bor	colpoda vorticella neznani	colpoda neznani	colpoda vorticella	paramecij colpoda neznani	paramecij colpoda vorticella neznani	paramecij colpoda neznani	paramecij colpoda	paramecij colpoda kotačnik
cipresa	neznani	colpoda neznani	colpoda glista	colpoda kotačnik glista	colpoda vorticella neznani	paramecij neznani	vorticella neznani	kotačnik neznani
trava–ob cesti	colpoda neznani	kotačnik neznani	colpoda vorticella paramecij neznani	colpoda vorticella neznani	vorticella alga neznani	paramecij vorticella	colpoda vorticella kotačnik neznani	vorticella neznani
trava-travnik	paramecij neznani	paramecij neznani	vorticella	colpoda neznani	colpoda vorticella neznani alga	paramecij vorticella neznani	paramecij colpoda vorticella neznani alge	colpoda kotačnik
trava-pašnik	colpoda neznani	colpoda neznani	paramecij colpoda neznani kotačnik	colpoda	colpoda neznani	colpoda kotačnik neznani	colpoda kotačnik neznani	paramecij neznani
hrast	x	colpoda neznani	neznani	neznani	colpoda neznani	neznani	kotačnik neznani	kotačnik neznani
kontrola 2	x	neznani	neznani	x	x	x	x	x