Pokazatelji toksičnosti teških metala u vodenoj leći (Lemna minor L.) i luku (Allium cepa L.)

Vujčić, Valerija

Master's thesis / Diplomski rad

2008

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:826072

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Valerija Vujčić

POKAZATELJI TOKSIČNOSTI TEŠKIH METALA U VODENOJ LEĆI (*Lemna minor* L.) I LUKU (*Allium cepa* L.)

Diplomski rad

Zagreb, 2008

Ovaj rad je izrađen u Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Branke Pevalek-Kozlina kojoj iskreno zahvaljujem na stručnim savjetima, ponajviše strpljenju i iskazanom povjerenju tijekom izrade ovog rada.

Najljepše zahvaljujem asistentici dr. sc. Sandri Radić koja je imala dovoljno strpljenja i vremena da mi pomogne u svakom trenutku. Najviše joj zahvaljujem na iznimno stručnim i kvalitetnim savjetima koji su mi pomogli dovesti ovaj rad do savršenstva. Doista bez nje ovaj rad ne bi bio jedna zaista zaokružena cjelina.

Također zahvaljujem svim ostalim članovima Laboratorija za fiziologiju bilja koji su mi na bilo koji način pomogli u izradi ovog rada.

Izuzetno sam zahvalna prof. dr. sc. Viličiću i asistentici dr. sc. Mariji Gligori koji su mi omogućili nesmetan rad na mikroskopu.

Veliko hvala mojoj obitelji, posebno roditeljima na strpljenju i podršci tijekom svih godina mog studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD **1**

1.1 TEŠKI METALI 3

1.2 FOTOSINTEZA 3

1.3 OTROVNI KISIKOVI SPOJEVI I RADIKALI 4

1.4 ANTIOKSIDACIJSKI SUSTAV 5

1.4.1 Peroksidaze 6

1.4.2 Karotenoidi 7

1.5 GENOTOKSIČNOST 7

1.5.1 Allium test 8

1.5.1.1 Dužina i morfologija korjenčića 8

1.5.1.2 Kromosomske aberacije 8

2. CILJ ISTRAŽIVANJA **10**

3. MATERIJALI I METODE **12**

3.1 ODREĐIVANJE SADRŽAJA TEŠKIH METALA U UZORCIMA VODE 13

3.2 BILJNI MATERIJAL 13

3.3 METODE 15

3.3.1 Kultura vodene leće (*Lemna minor* L.) u uvjetima *in vitro* 15

3.3.2 Određivanje prirasta broja biljaka 17

3.3.3 Određivanje prirasta mase biljaka 18

3.3.4 Određivanje sadržaja pigmenata 18

3.3.5 Ekstrakcija topivih proteina i aktivnost enzima 19

3.3.5.1 Ekstrakcija i određivanje sadržaja topivih proteina 19

3.3.5.2 Određivanje nespecifične aktivnosti peroksidaza 20

3.3.6 Citogenetička analiza 20

4. REZULTATI **22**

4.1 SADRŽAJ TEŠKIH METALA U UZORKOVANIM POVRŠINSKIM I OTPADNIM VODAMA 23

4.2 UČINAK TEŠKIH METALA NA POKAZATELJE RASTA VODENE LEĆE 25

4.2.1 Učinak teških metala na prirast broja biljaka 25
4.2.2 Učinak teških metala na relativni prirast mase svježe tvari 27
4.3 UČINAK TEŠKIH METALA NA SADRŽAJ KLOROFILA I KAROTENOIDA U VODENOJ LEĆI 28
4.4 UČINAK TEŠKIH METALA NA AKTIVNOST PEROKSIDAZE U VODENOJ LEĆI 30
4.5 ALLIUM TEST 31
4.5.1 Učinak teških metala na dužinu i morfologiju korjenčića luka 31
4.5.2 Učinak teških metala na mitozu u stanicama korjenčića luka 32
4.5.3 Citogenetička analiza 34

5. RASPRAVA 37
5.1 FITOTOKSIČNOST 38
5.2 GENOTOKSIČNOST 40

6. ZAKLJUČAK 42

8. LITERATURA 44

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

POKAZATELJI TOKSIČNOSTI TEŠKIH METALA U VODENOJ LEĆI (*Lemna minor* L.) I LUKU (*Allium cepa* L.)

Valerija Vujčić

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta
Botanički zavod Biološkog odsjeka
Rooseveltov trg 6, Zagreb

SAŽETAK

Vodena leća se često koristi kao modelna biljka zbog svoje osjetljivosti na različite toksične tvari te jednostavnog i brzog uzgoja. Običan luk je vrlo pogodan za istraživanje genotoksičnosti zbog malog broja vrlo dugačkih kromosoma (2n = 16). Teški metali prvotno djeluju na korjenski sustav te se dalje mobiliziraju uslijed transpiracije uzrokujući klorozu listova i inhibiciju rasta. Istraživala sam fitotoksične i genotoksične učinke teških metala nasađivanjem vodene leće i običnog luka na površinske vode (Sava Županja, Sava Jesenice i Sutla Prišlin) uzorkovane tijekom 3 mjeseca te otpadne vode ZGOS (uzorkovane kroz 24 sata) i Jakuševac. Biljni materijal je uziman nakon tjedan dana (vodena leća) ili 24h (luk) inkubacije. Metodom atomske apsorpcijske spektrometrije u uzorkovanim vodama su određeni esencijalni i neesencijalni teški metali. U ovom radu praćeni su rast i relativna masa svježe tvari, sadržaj klorofila i karotenoida, aktivnost gvajakol peroksidaze te citogenetička analiza. Svi uzorci voda su izazvali inhibiciju relativnog prirasta broja biljaka i relativne mase svježe tvari, smanjenje sadržaja klorofila i karotenoida te aktivnosti gvajakol peroksidaze. Aktivnost tog antioksidacijskog enzima bila je povećana samo u uzorcima otpadne vode ZGOS 4 i 5. Smjesa teških metala uzrokovala je inhibiciju rasta korjenčića i morfološke promjene kao što su vrškovi zavinuti u obliku kuke. Teški metali iz testnih voda smanjili su mitotski indeks i broj stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa. Citogenetička analiza pokazala je najveći broj kromosomskih aberacija u otpadnim vodama te površinskoj vodi Sutla Prišlin. Najčešće kromosomske aberacije prisutne u uzorcima, sljepljivanje, *c*-mitoza i zaostali kromosomi su vjerojatno posljedica povećanih količina olova, kroma i žive u uzorcima vode. Rezultati dobiveni u ovom radu na dvjema biljnim vrstama, vodenoj leći i luku, ukazuju na fito-, cito- i genotoksične tvari u uzorkovanim vodama i indiciraju potencijalan rizik ne samo za biljne vrste nego i za sve žive organizme

---

(50 stranica, 12 slika, 7 tablica, 80 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: fitotoksičnost / *Lemna minor* / *Allium cepa* / genotoksičnost /

Voditelj: Prof. dr. sc. Branka Pevalek-Kozlina

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation thesis

INDICATORS OF HEAVY METAL TOXICITY IN DUCKWEED (*Lemna minor* L.) AND ONION (*Allium cepa* L.)

Valerija Vujčić

University of Zagreb
Faculty Of Science
Department of Biology
Rooseveltov trg 6, Zagreb

ABSTRACT

Duckweed (*Lemna minor* L.) is often used as a plant model because it is a widely spread monocot, multiplies rapidly and shows tremendous metal accumulating capacity. Onion (*Allium cepa* L.) is suitable candidate for genotoxicity studies because it has a small number of large chromosoms (2n = 16). Heavy metals enter the plant tissues through the root system and then mobilize to leaves causing chlorosis and growth inhibition. I investigated phytotoxic and genotoxic effects of heavy metals present in chosen surface (Sava Županja, Sava Jesenice i Sutla Prišlin taken every month during 3 months) and waste waters (ZGOS taken every 4 hours during 24 hours and Jakuševac) using duckweed and onion as plant test systems. Plant material was harvested after seven days (duckweed) or 24 hours (onion). Essential and non-eseential heavy metals were determinated by atomic absorption spectrometry. I monitored the relative frond number, relative fresh weight, chlorophyll and carotenoid contents, guaiacol peroxidase activity and cytogenetic analysis. All samples of tested waters caused growth inhibition, decrease of chlorophyll and carotenoid contents and decline of guaiacol peroxidase activity. Activity of that antioxidant enzyme increased only in ZGOS 4 and 5 samples. Water samples containing heavy metals caused the inhibition of onion root length and morfological changes of root tips such as crochet hooks. Consequently, mitotic index declined and the number of cells in each fase of cell cycle decreased as well. Cytogenetic analysis revealed the highest number of chromosome aberrations in both waste waters and surface water Sutla Prišlin. The most frequent chromosome aberrations as sticky chromosomes, *c*-mitosis and lagging chromosomes were most probably caused by increased quantities of lead, mercury and chromium in water samples. Results obtained in this work indicate that surface and waste waters contains toxic and genotoxic compounds that may impact aquatic ecosystem but also present potential risk to all living organisms.

(50 pages, 12 figures, 7 tables, 80 references, original in Croatian)

Key words: phytotoxicity / *Lemna minor* / *Allium cepa* / genotoxicity

Supervisor: Prof. Branka Pevalek-Kozlina, Ph. D.

Svi živi organizmi pa tako i biljke najbolje se razvijaju, rastu i razmnožavaju u za njih optimalnom rasponu određenih okolišnih uvjeta. Međutim živi organizmi su izloženi različitim vrstama stresa koji nastupa kada je vrijednost potencijalno stresnog čimbenika izvan granica optimuma adaptacije. Granica između stresnih i nestresnih uvjeta različita je za pojedine vrste. Stres može imati prirodni uzrok, ali može biti uzrokovan i ljudskim aktivnostima. Ekološki čimbenici koji najčešće uzrokuju stres su: promjene temperature, nedostatak vode ili kisika u tlu, povećan salinitet, poremećaji pH vrijednosti tla, različiti teški metali i sl.

Mnoge biljke imaju mogućnost prilagodbe na stres. Prethodnim izlaganjem stresnim uvjetima biljka može povećati otpornost na stres tj. može se aklimatizirati na nepovoljne uvjete okoliša. Takva aklimatizacija razlikuje se od adaptacije koja podrazumijeva genetski uvjetovanu otpornost koja je rezultat selekcije tijekom mnogo generacija (Pevalek-Kozlina, 2003).

Biljke su nepokretni organizmi i nisu u mogućnosti napustiti stanište kada za njih nastupe nepovoljni uvjeti. Stoga su morale razviti učinkovitu zaštitu u svrhu obrane i preživljavanja.

Akumulacija teških metala u prirodi je posljedica industrije i poljoprivrede. Biljka ih prima putem korjenovog sustava. Iako su biljci neki od njih kao na primjer željezo, mangan, bakar i molibden neophodni u malim količinama, teški metali često inhibiraju fiziološke procese. Negativan učinak koji takvi metali imaju na biljku može se uočiti po zakržljalom rastu, klorozi i nekrozi. Najuobičajeniji ali i najmanje specifičan simptom toksičnosti teških metala je smanjenje stope rasta u usporedbi s kontrolnim biljkama.

1.1 TEŠKI METALI

Teški metali se dijele na esencijalne: Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, Ni te neesencijalne koji su neutralni ili toksični kao što su Cd, Pb i Hg. Toksičnost teških metala uvijek ovisi o koncentraciji pa tako esencijalni elementi stimuliraju metabolizam biljke pri niskim koncentracijama. Teški metali se međusobno razlikuju po mobilnosti što također utječe na njihovu učinkovitost, a treći aspekt koji ima važnu ulogu u djelovanju teških metala jest starost biljke za vrijeme izlaganja. Što je biljka starija to može tolerirati veću količinu teških metala jer se oni akumuliraju u vakuolama i staničnoj stjenci gdje su metabolički inaktivni. Teški metali inhibiraju većinu fizioloških procesa na svim razinama metabolizma kao što su rast, fotosinteza, primanje iona i vode te asimilaciju nitrata.

Neki simptomi toksičnosti specifični su upravo za teške metale. Možemo ih podijeliti na vidljive i samo mjerljive. Vodena leća brzo reagira na toksičnost teških metala tako što se raspada na odvojene frondove (Fodor, 2002). Jedan od karakterističnih simptoma stresa uzrokovanog teškim metalima je kloroza listova zbog smanjenja koncentracije klorofila (Fodor i sur., 1996; Fodor, 2002; Lang i sur., 1998; Zoronza i sur., 1999).

U većini slučajeva primarno mjesto djelovanja teških metala je korjenski sustav, a uslijed transpiracije se dalje rasprostranjuju u listove. Prvotno teški metali izazivaju povećano stvaranje reaktivnih oblika kisika (ROS), zatim reagiraju s proteinima i neenzimskim molekulama uzrokujući inhibiciju metaboličkih reakcija te oksidacijski stres. Krajnja posljedica djelovanja teških metala jest otežan transport odnosno smanjeno uzimanje potrebnih minerala što onemogućuje sintezu potrebnih molekula.

1. 2 FOTOSINTEZA

Proces fotosinteze koji se odvija u kloroplastima biljnih stanica omogućava opskrbu biljke ugljikohidratima potrebnim za njezin rast i razvoj te je važan izvor energije. U svjetlosnim reakcijama fotosinteze Sunčeva energija se pretvara u kemijsku. Svjetlost koju apsorbira klorofil pokreće prijenos elektrona od vode prema akceptoru elektrona, oksidiranom obliku nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfata ($NADP^+$), putem niza redoks-sustava. Kompleksi za sakupljanje svjetlosti (engl. "light

harvesting **c**omplex" – LHCII) fotosistema II (PSII) apsorbiraju svjetlosnu energiju i prenose je do reakcijskog središta P_{680}. Svjetlost inducira oksidaciju vode i prijenos elektrona na feofitin koji je primarni akceptor elektrona i na dva plastokinona koji se reduciraju u plastokinol. Elektroni se dalje prenose preko kompleksa citokrom b_6f, plastocijanina i fotosistema I (PSI) na $NADP^+$ koji je konačni akceptor elektrona. Svjetlosnim reakcijama nastaje reducirani oblik nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfata (NADPH) koji je izvor visokoenergiziranih elektrona, a nastali protonski gradijent koristi ATP-sintaza za proizvodnju adenozin-trifosfata (ATP). NADPH i ATP koriste se u reakcijama Calvinova ciklusa za fiksaciju CO_2 pomoću enzima RUBISCO i njegovu redukciju do ugljikohidrata.

Smanjena fotosinteza može biti posljedica smanjenja razine fotosintetskih pigmenata što je pak povezano s inhibicijom njihove sinteze. Smanjena koncentracija klorofila je ustanovljena u vodenoj leći (*Lemna minor*) izloženoj olovu (Garnczarska i Ratajczak, 2000). Olovo uzrokuje smanjenje količine klorofila i prosječnog broja struktura grana u kloroplastima. Kadmij (Cd) smanjuje količinu proteinskih kompleksa pigmenata što je primarno u PSI i LHCII dok je PSII manje osjetljiv (Lang i sur., 1995). Cd uzrokuje veću osjetljivost PSI inhibicijom većine antioksidacijskih enzima (Gallego i sur., 1996). Osjetljivost fotosintetskog aparata ovisi o starosti biljke i trajanju izloženosti nekom teškom metalu. Kod starijih biljaka izloženih kadmiju aktivnost PSII je slabija nego u mlađih biljaka (Skorzynska – Polit i Baszynski, 1997).

1.3 OTROVNI KISIKOVI SPOJEVI I RADIKALI

Otrovni kisikovi spojevi i radikali (engl. "reactive oxygen species" – ROS) nastaju u raznim dijelovima stanice i u malim količinama su stalni produkti normalnog staničnog metabolizma. Tijekom normalnog metabolizma mogu nastati i u većim količinama jer su uključeni u sva područja aerobnih procesa poput disanja, fotosintetskog transporta elektrona na komponentama PSI i PSII, oksigenaznom aktivnošću enzima RUBISCO (Foyer i sur. 1994), oksidacije različitih supstrata i dr. Zbog velike koncentracije kisika kloroplasti se smatraju glavnim izvorom ROS-a u biljnim stanicama (Pevalek-Kozlina 2003, Foyer i Noctor 2000). Toksičnost otrovnih kisikovih spojeva i radikala proizlazi iz njihove sposobnosti da potaknu kaskadne

reakcije radikala koje vode oštećivanju proteina, DNA, membranskih lipida i konačno smrti stanice.

Djelovanjem brojnih stresnih čimbenika uključujući i teške metale povećava se stvaranje kisikovih radikala i molekula koje su oštećene radikalima, a također se potiče ekspresija gena za antioksidacijske mehanizme što podiže razinu antioksidansa koji uklanjaju radikale. Njihovo se stvaranje tijekom starenja zbog učinka teških metala povećava jer se narušava ravnoteža između njihove proizvodnje i eliminacije (Fodor F, 2002). Otrovni kisikovi spojevi i radikali uključuju superoksidni anion O_2-·, perihidroksidni radikal HO_2·, vodikov peroksid H_2O_2, hidroksidni radikal OH·, alkoksi radikal RO·, peroksi radikal ROO·, organski hidroperoksid ROOH, singletni kisik $^1O_2$ i ekscitirani karbonil RO*. ROS mogu oštetiti proteine, lipide, polisaharide i nukleinske kiseline uzrokujući propadanje membrana, inaktivaciju enzima i oštećenja DNA (Thompson i sur. 1987).

Proizvodnja kisikovih radikala, i to alkoksi radikala, peroksi radikala i singletnog kisika raste zbog lipidne peroksidacije koja je povećana u uznapredovaloj senescenciji (Thompson i sur. 1987). Veće količine singletnog kisika uzrokuju pojavu drugih oblika kisikovih radikala. Izolirani peroksisomi iz listova prirodno senescentnog graška pokazuju povišenu razinu lipidne peroksidacije, no također i povećanu razinu superoksida i vodikovog peroksida (Pastori i del Río 1997).

1. 4 ANTIOKSIDACIJSKI SUSTAV

Stanični antioksidacijski sustav obuhvaća različite neenzimske i enzimske komponente. Enzimi askorbat-glutationskog ciklusa su glutation reduktaza (GR), monodehidroaskorbat reduktaza (MDHAR), dehidroaskorbat reduktaza (DHAR) i askorbat peroksdaza (APX). Radikalnoj deionizaciji također pridonose enzimi superoksid dismutaza (SOD), glutation S-transferaza (GST), katalaza (CAT), glutationperoksidaza (GPX) i guaiakol-tip peroksidaze. Najvažnije neenzimske komponente u biljaka su molekule male molekulske mase kao što su askorbinska kiselina, vitamin E, glutation, karotenoidi, ksantofili i flavonoidi. Različiti stanični odjeljci imaju svoje specifične antioksidacijske mehanizme koji se sastoje od izoformnih antioksidacijskih enzima i antioksidanasa.

Teški metali mogu poremetiti funkciju oksidoreduktivnih enzima (oksidaze i peroksidaze) te dolazi do povećanog stvaranja reaktivnih oblika kisika (ROS) kao što su superoksidni anion (O_2-·), vodikov peroksid (H_2O_2), hidroksidni radikal (OH·). ROS mogu oštetiti proteine, lipide, polisaharide i nukleinske kiseline uzrokujući propadanje membrana, inaktivaciju enzima i oštećenja DNA (Thompson i sur. 1987). Dokazano je da Cd, Zn i Fe uzrokuju oksidacijski stres (Dat i sur., 2000). Teški metali Cu, Ni i Zn mogu uzrokovati lipidnu peroksidaciju plazmaleme posredstvom aktivnih oblika kisika što uzrokuje veću membransku propusnost (Weckx i Clijsters, 1996, 1997; Kochian, 1995; Baccouch i sur., 1998).

1.4.1 PEROKSIDAZE

Peroksidaze (vodik peroksid oksidoreduktaze) su široko rasprostranjeni enzimi nađeni u biljnom i životinjskom carstvu. Biljne peroksidaze su monomerni glikoproteini molekularnih masa od 35 do 45 kDa koji kao prostetičku skupinu imaju protohematin IX koji je pomoću dviju molekula histidina povezan s glikoproteinskim dijelom enzima. Ti enzimi kataliziraju oksidaciju staničnih komponenti (npr. fenolnih spojeva, askorbinske kiseline, glutationa i dr.) koristeći vodikov peroksid ili organski hidroperoksid kao supstrat.

S obzirom na fiziološku ulogu i supstratnu specifičnost peroksidaze su podijeljene u dvije skupine (Asada 1992):

1. Prva skupina su nespecifične peroksidaze (POX) koje koriste H_2O_2 za različite oksidacijske reakcije i imaju slabu supstratnu specifičnost. Zbog slabe supstratne specifičnosti kao donori elektrona mogu poslužiti gvajakol, pirogalol i druge molekule. Uključene su u procese diferencijacije stanica, biosinteze lignina, suberina i etilena, razgradnju auksina, zaraštavanje rana te zbog svojih baktericidnih i fungicidnih svojstava u obranu od patogena (Gaspar i sur. 1991).
2. Drugoj skupini pripadaju askorbat peroksidaza (APOX) i glutation peroksidaza. Glavna funkcija im je uklanjanje viška H_2O_2, organskih hidroperoksida i lipidnih peroksida kako ne bi došlo do nastajanja jako reaktivnih radikala koji oksidiraju sve stanične komponente i uzrokuju stanična oštećenja.

Kod vrste *Lemna minor* nije ustanovljena prisutnost askorbat peroksidaze (APX) u kloroplastima, ali je ustanovljena prisutnost katalaze (CAT) i gvajakol peroksidaze

(GP) u vakuoli, kao najzanačajniji antioksidativni enzimi uslijed djelovanja Cu (Mazhoudi i sur., 1997; Teiseire i Guy, 2000).

1.4.2 KAROTENOIDI

Karotenoidi su molekule topive u mastima a jedna od njihovih uloga je zaštita od oštećenja koja može prouzročiti oksidacijski stres. Velike količine energije koju apsorbiraju pigmenti mogu oštetiti fotosintetske membrane ako se ta energija ne pohrani fotokemijski. Ako pobuđeno stanje klorofila potraje dulje nego je to normalno doći će do reakcije s molekulskim kisikom. Tom reakcijom nastaje sigletni kisik ($^1O_2$) koji je vrlo reaktivan i može oštetiti stanicu. Karotenoidi imaju ulogu 'gašenja' pobuđenog stanja klorofila tj. u fotosintetskom aparatu zatomljuju pobuđeno tripletno stanje klorofila i nastajanje singletnog kisika pa na taj način sprečavaju početak lipidne peroksidacije (Parker i Joyce 1967).

1. 5 GENOTOKSIČNOST

Industrijski i poljoprivredni otpad može onečistiti površinske vode i sediment što može utjecati na onečišćenje izvora pitke vode te na taj način direktno utjecati na zdravlje ljudi. Onečišćenje vode raznim genotoksičnim tvarima je problem u cijelom svijetu upravo zbog njihove mogućnosti nakupljanja u hranidbenim lancima. Među takve tvari ubrajaju se i teški metali koji negativno utječu na biološku raznolikost biljnih i životinjskih vrsta. Zbog važnosti vode za čovjekov život provode se razne fizikalne i kemijske analize kako bi se testirala kvaliteta vode i okoliša (Monte Egito i sur., 2007).

Biljni biotestovi su izrazito osjetljivi na mnoge toksične tvari uključujući i teške metale te se koriste i za praćenje učinka mješavine toksičnih tvari. Pri tome se biljke mogu izložiti direktno mješavini tvari ili uzorcima uzetim s terena u laboratoriju ili *in situ*. Prednost biljnih testova je i ta što pokazuju dobru korelaciju s animalnim sustavima s obzirom da su biljke također eukariotski organizmi.

1.5.1 ALLIUM TEST

Allium test se može koristiti za određivanje genotoksičnosti (kromosomski lomovi, *c*-mitoza) i fitotoksičnosti (inhibicija ili restrikcija rasta korjenčića) raznih tvari. Testna biljka je luk (*Allium cepa*) zbog malog broja (2n=16) velikih kromosoma što je prednost u istraživanju učinka toksičnih tvari na kromosome i mitozu. U analizi se koriste korjenčići jer su oni prvi u doticaju sa određenom toksičnom tvari. Ovaj test se često koristi u analizi genotoksičnosti površinskih, otpadnih industrijskih voda i voda iz domaćinstava (Somashekar i sur., 1985; Nielsen i Rank, 1994; Smaka-Kincl i sur., 1996; Rank i Nielsen, 1998, Grisolia et al., 2005). Rezultati Allium testa dobro se podudaraju s testovima na drugim eukariotskim i prokariotskim sustavima (Fiskesjö, 1988).

1.5.1.1 DUŽINA I MORFOLOGIJA KORJENČIĆA

Dužina korjenčića je koristan pokazatelj toksičnosti raznih tvari kao i rasta i razvoja biljke. Jako toksične tvari mogu inhibirati rast ili izazvati različite stupnjeve usporavanja rasta. Toksične tvari mogu uzrokovati i promjene u morfologiji korjenčića luka kao što su valoviti korjenčići, vrškovi korjenčića zavinuti u obliku kuke te zadebljali ili prelomljeni vrškovi korjenčići (Fiskesjö, 1993).

1.5.1.2 KROMOSOMSKE ABERACIJE

Najznačajniji parametri za utvrđivanje kromosomskih aberacija su kromosomski lomovi i *c*-mitoza koji ukazuju na promjene genetičkih osobitosti. Kromosomske lomove uzrokuju jako toksične tvari, a najčešće se primjećuju u anafazi mitoze. Kromosomski lomovi mogu uzrokovati pojavu fragmenata i anafazne mostove što je kasnije povezano s translokacijom ili ljepljivim krajevima kromosoma. Kod *c*-mitoze vreteno je potpuno neaktivno i ne može se oformiti ekvatorijalna ravnina te je dioba centromere odgođena pa se kromosomi zadržavaju u metafazi. Za vrijeme *c*-mitoze kromosomi su više kontrahirani što pospješuje njihovo širenje. Ovaj efekt je postignut raznim toksičnim tvarima, među ostalih živom i niklom (Fiskesjö, 1993). Ukoliko se *c*-mitoza nastavi doći će do udvostručavanja kromosoma, a ako se prekine telofazni kromosomi će se skupiti u grupe s varijabilnim brojem kromosoma u svakoj grupi. Ovakav tijek događaja će uzrokovati stvaranje stanice s više jezgara ako se ne oformi stanični zid ili će dovesti do

stvaranja stanica čiji broj kromosoma odstupa od normalnog odnosno do aneuploidije. Dakle, ova oba tipa genotoksičnosti, kromosomski lomovi i *c*-mitoza, biti će zabilježeni kada su prisutne toksične tvari u okolišu. Sljepljivanje kromosoma se javlja kao posljedica toksičnosti i uzrokuje smrt stanice.

Pojedini teški metali induciraju specifične mikroskopske učinke iako ih se ne može grupirati prema njihovu specifičnom učinku (Fiskesjö, 1988). Živa uzrokuje sljepljivanje iako pokazuje vrlo nizak klastogeni učinak. Bakar izaziva određen stupanj sljepljivanja, u manjoj mjeri i pojavu *c*-mitoze te smanjuje mitotski indeks uz pojavu interfaznih stanica s nakupinama heterokromatina. Nikal najčešće uzrokuje *c*-mitozu i oblik *c*-mitoze s ljepljivim kromosomima. Kadmij uzrokuje *c*-mitozu i sljepljivanje kromosoma, a dokazano je da ima i klastogeni učinak u biljaka (Fiskesjö, 1988).

U ovom radu istraživani su fitotoksični učinci teških metala na modelnoj biljci *Lemna minor* L. te genotoksični učinci teških metala u meristemskim stanicama korjenčića običnog luka (*Allium cepa*).

Istraživala sam učinke smjese teških metala prisutnih u uzorcima voda Sava Jesenice, Sava Županja, Sutla Prišlin uzimanih kroz 3 mjeseca i otpadnim vodama Zagrebačkog otpadnog gradskog sustava (ZGOS) koje su uzorkovane svaka 4 sata te Jakuševac.

Cilj istraživanja bio je utvrditi promjene do kojih dolazi u rastu (relativni prirast broj biljaka i mase svježe tvari) te u sadržaju klorofila i karotenoida uslijed djelovanja smjese teških metala. Nastojala sam utvrditi potiču li teški metali oksidacijski stres te odgovor jednog od antioksidacijskog enzima na takvo stanje. Također sam nastojala utvrditi i genotoksično djelovanje teških metala primjenom Allium testa odnosno praćenjem promjena u dužini i morfologiji korjenčića te analizom mitotskog indeksa i kromosomskih aberacija u meristemskim stanica luka.

3.1 ODREĐIVANJE SADRŽAJA TEŠKIH METALA U UZORCIMA VODE

Sadržaj teških metala (bakra, cinka, kadmij, kroma, nikla, olova i žive) određen je atomskom apsorpcijskom spektrometrijom na grafitnoj kiveti (GFAAS).

Određivanje se vrši metodom GFAAS na instrumentu Perkin Elmer AA 600 (Zeemanova korekcija 0,9 T) opremljenim auto samplerom Perkin ElmerAS 800.

Instrumentalni uvjeti:

volumen uzorka: 20 μl

matriks modifikator: $Pd(NO_3)_2$, $Mg(NO_3)_2$ (5 μg Pd + 3 μg $Mg(NO_3)_2$)

lampa: HCL valna duljina 276,8 nm

slit: 0,7 nm

kiveta: transverzalno grijana L'vovom platformom od pirolitičkog grafita

protok argona: 250 ml/min

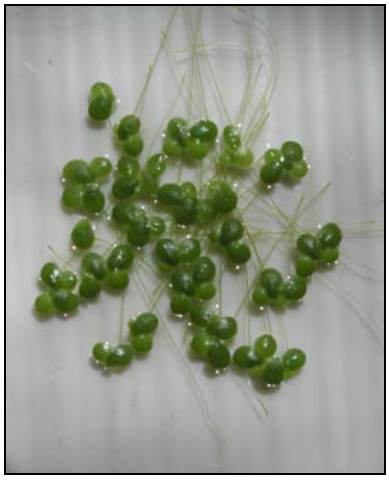
temperaturni program: sušenje, 110 °C i 130 °C; piroliza 700 °C, atomizacija 1 600 °C; čišćenje 2 450 °C

kalibracijski standardi: 25 ng/ml i 50 ng/ml

program za kontrolu instrumenta i obradu podataka: Perkin Elmer AA Winlab

3.2. BILJNI MATERIJAL

Vodena leća (*Lemna minor* L.) široko je rasprostranjena jednosupnica vrlo jednostavne građe koja se sastoji od članaka koji sliče listu i slobodno plivaju, te se pupanjem intenzivno razmnožavaju. Veći, prednji dio svakog članka odgovara listu, a stražnji reduciranoj osi izdanka i iz njega se razvija jedan korijen. Kozmopolitskog je rasprostranjenja te pokriva površine mirnih voda (jezera i rijeke). Mnoge prednosti kao brzi rast, genetski homogene populacije, lakoća uzgoja i osjetljivost na mnoge toksične tvari čine je idealnim testnim organizmom (Lewis, 1995).



Slika 1. *Lemna minor* L.

Običan luk (*Allium cepa* L.) je jednosupnica koja ima jednostavnu lukovicu iz koje raste široki, šuplji, zeleni listovi, nazvani perjanice (pera). Tek u drugoj godini formiraju se cvjetovi na uspravnoj zelenoj stabljici, sakupljeni u obliku kugle. Budući da je uvelike kultiviran možemo reći da je široko rasprostranjen. Vrlo je pogodan materijal koji se često koristi za testiranje genotoksičnosti teških metala i drugih toksičnih tvari jer ima mali broj relativno dugačkih kromosoma (2n = 16).



Slika 2. *Allium cepa L.*

3. 3. METODE

3.3.1. KULTURA VODENE LEĆE (*Lemna minor L.*) U UVJETIMA *IN VITRO*

Vodena leća je sakupljena u Botaničkom vrtu Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Prilikom uvođenja vodene leće u kulturu *in vitro* 1995. godine biljke su sterilizirane etanolom i živinim kloridom postupkom po Krajnčiću i Devidéu (1980) i dalje uzgajane u akseničnim uvjetima. Za dugotrajnu kultivaciju vodene leće korištena je modificirana hranjiva podloga PS (Pirson i Seidel 1950), a za eksperimentalnu analizu hranjiva podlogu po Steinbergu (1946). Sastav modificirane Pirson–Seidel hranjive podloge prikazuje Tablica 1, a Steinberg podloge Tablica 2. Epruvete s hranjivim podlogama su začepljene vatom i aluminijskom folijom te sterilizirane autoklaviranjem pri temperaturi od 120 ˚C i tlaku od 0,15 MPa u trajanju od 20 minuta. pH vrijednost hranjivih podloga podešena je na 4,55 otopinom kalijevog hidroksida koncentracije 0,1 mol/dm^3.

Prije nasađivanja biljaka, uzorcima površinskih – Sava Jesenice (SJ), Sava Županja (SŽ), Sutla Prišlin (SP) i otpadnih – Zagrebački otpadni gradski sustav (ZGOS), Jakuševac (JAK) testnih voda dodani su makro i mikroelementi po Steinbergu nakon čega su sterilizirani hladnom filtracijom korištenjem celuloza-nitratnih membrana "Whatman" (veličine pora 0,45 μm, promjera 47 mm). Nakon 2 tjedna rasta na sterilnoj Steinberg podlozi, pojedinačne zdrave kolonije s 2-3 listića su nasađene u Erlenmeyerove tikvice od 100 mL koje su sadržavale po 60 mL uzorka filtriranih testnih voda (praćenje rasta), a po desetak kolonija u tikvice od 300 mL (određivanje količine pigmenata, ukupnih proteina i aktivnosti gvajakol peroksidaze) koje su sadržavale po 130 mL uzoraka testnih voda.

Biljke su rasle u uvjetima dugog dana (16 sati osvjetljenja i 8 sati tame), na temperaturi 24±1 ˚C uz rasvjetu bijelih fluorescentnih svjetiljki (90 μEm^{-2}s^{-1}) u klima–komori. Broj listića praćen je samo u malim tikvicama kroz 7 dana, na dane 0, 1, 2, 5, i 7. Uzorci biljnog tkiva za pokuse uzimani su iz svih tikvica (malih i velikih) nakon 7 dana pokusa.

Tablica 1. Sastav hranjive podloge PS (Pirson i Seidel 1950)

MAKROELEMENTI	mg/L
KNO_3	400
KH_2PO_4	200
$MgSO_4 \times 7H_2O$	300
$CaCl_2 \times 2H_2O$	804
MIKROELEMENTI	mL
$MnCl_2 \times 4H_2O$ H_3BO_3	1
Na_2 – EDTA x $2H_2O$ željezni citrat	5
ORGANSKI DODACI	g/L
saharoza	10
asparagin	0,1

Tablica 2. Sastav hranjive podloge Steinberg (1946)

MAKROELEMENTI	mg/L	mmol/L
KNO_3	350	3,46
$Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$	295	1,25
KH_2PO_4	90	0,66
K_2HPO_4	12,6	0,072
$MgSO_4 \times 7H_2O$	100	0,41
MIKROELEMENTI	µg/L	µmol/L
H_3BO_3	120	1,94
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	180	0,63
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	44	0,18
$MnCl_2 \times 4H_2O$	180	0,91
$FeCl_3 \times 6H_2O$	760	2,81
Na_2 – EDTA x 2H2O	1 500	4,03

3.3.2. ODREĐIVANJE PRIRASTA BROJA BILJAKA

Prirast broja biljaka određivale smo brojanjem biljaka kroz tjedan dana, na dane 0, 1,2, 5, i 7. Pri tome je brojena svaka pa i najmanja biljka vidljiva golim okom. Dobiveni podaci uvrštavani su u slijedeći izraz (Ensley i sur. 1994):

$$\text{prirast broja biljaka} = \frac{\text{broj biljaka n - tog dana - broj biljaka nultog dana}}{\text{broj biljaka nultog dana}}$$

n = 1, 2, 5, 7

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost prirasta broja biljaka u šest Erlenmeyerovih tikvica ± standardna pogreška. Usporedba pojedinog tretmana s kontrolom, te tretmana međusobno provedena je testom «Duncan's New Multiple Range Test» (Duncan 1955).

3.3.3. ODREĐIVANJE PRIRASTA MASE BILJAKA

Biljke smo vagale nultog dana pokusa te nakon sedam dana. Dobivene podatke uvrštavale smo u sljedeću formulu:

$$\text{prirast mase svježe tvari} = \frac{\text{masa biljaka n - tog dana - masa biljaka nultog dana}}{\text{masa biljaka nultog dana}}$$

3.3.4. ODREĐIVANJE SADRŽAJA PIGMENATA

Sadržaj pigmenata određen je spektrofotometrijski koristeći UV/VIS spektrofotmetar Specord (Analytik Jena). Uzorke svježeg tkiva mase 30 mg ekstrahirale smo u 1,5 ml 80%-tnog hladnog acetona na ledu. Nakon 10 minuta centrifugiranja na 5000 g, svakom je uzorku izmjeren volumen dobivenog supernatanta i zatim je kvantitativno prenesen u kivetu. Mjeren je cijeli spektar apsorbancije za svaki uzorak te su zatim očitavani podaci na tri valne duljine: 663, 646 i 470 nm (Arnon, 1949). Sadržaj fotosintetskih pigmenata određen je prema sljedećim izrazima (Lichtenthaler, 1987):

a) za klorofil *a*:

c_a = sadržaj klorofila *a* (mg / g svježe tvari)

$$c_a = \frac{12{,}21 \times A_{663} - 2{,}81 \times A_{646}}{l \times 1000 \times m} \times V$$

b) za klorofil *b*:

c_b = sadržaj klorofila *b* (mg / g svježe tvari)

$$c_b = \frac{20{,}13 \times A_{646} - 5{,}03 \times A_{663}}{l \times 1000 \times m} \times V$$

c) za ukupne karotenoide:

c_k = sadržaj ukupnih karotenoida (mg / g svježe tvari)

$$c_k = \frac{(1000 \times A_{470} - 3{,}27 \times c_a - 104 \times c_b) / 198}{l \times 1000 \times m} \times V$$

A_X = apsorbancija uzoraka pri određenim valnim duljinama

V = volumen uzorka (ml)

l = duljina optičkog puta = 1 cm

m = masa uzorka = 30 mg

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika ± standardna devijacija i izraženi u odnosu na kontrolu.

3.3.5. EKSTRAKCIJA TOPIVIH PROTEINA I AKTIVNOST ENZIMA

3.3.5.1. EKSTRAKCIJA I ODREĐIVANJE SADRŽAJA TOPIVIH PROTEINA

Po 100 mg vodene leće homogenizirale smo u 1 mL 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7,0) koji sadrži 0,1 mM EDTA uz dodatak PVPP-a. Homogenat smo centrifugirale 30 minuta u rotoru 12154H visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18) pri temperaturi +4 ^oC i 25000 g. Dio dobivenog supernatanta koristile smo kao sirovi ekstrakt u kojem smo odredile koncentraciju proteina metodom Bradforda (1976), a drugi dio za određivanje aktivnosti gvajakol peroksidaze.

Bradfordova metoda temelji se na mjerenju apsorbancije smjese proteinskog ekstrakta i reagensa pri valnoj duljini 595 nm. U 1 ml radne otopine Bradford - 15 ml etanola, 30 ml 88%-tne H_3PO_4, 30 ml Bradford matične otopine (100 ml 96%-tnog etanola, 200 ml 88%-tne H_3PO_4 i 350 mg Coomassie brillant blue G 250) i 450 ml H_2O – dodale smo 50 µl uzorka sirovog ekstrakta. Koncentraciju proteina u pojedinim uzorcima odredile smo očitavanjem baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopina serumskog albumina iz goveda poznatih koncentracija (od 0,096 mg/ml do 0,8 mg/ml). Koncentraciju proteina izrazile smo kao mg proteina po gramu svježe mase biljnog tkiva.

3.3.5.2. ODREĐIVANJE NESPECIFIČNE AKTIVNOSTI PEROKSIDAZA

Kao reakcijsku otopinu za guajakol peroksidaze koristile smo otopinu po Chanceu i Maehlyu (1955) koja je sadržavala 50 mM kalij fosfatnog pufera pH vrijednosti 7,0, 18 mM guajakola i 5 mM H_2O_2. Vodikov peroksid dodale smo u reakcijsku smjesu neposredno prije mjerenja. Na 950 µl ove otopine dodale smo 50 µl sirovog ekstrakta mjerila povećanje apsorbancije uslijed stvaranja tetragvajakola svakih 15 sekundi tijekom 2,5 minute pri valnoj duljini od 470 nm.

Aktivnost GPOD je izražena kao količina nastalih produkata u µmolima po minuti po miligramu proteina koristeći $\varepsilon_{470} = 26{,}6\ mM^{-1}cm^{-1}$ za gvajakol. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika ± standardna devijacija i izraženi u odnosu na kontrolu.

3.3.6. CITOGENETIČKA ANALIZA

Citogenetička analiza provedena je u vršnim dijelovima korijena luka izloženim površinskim i otpadnim vodama pri čemu je određen mitotski indeks stanica i broj kromosomskih aberacija. Nakon 24h izlaganja površinskim i otpadnim vodama, korjenčići su fiksirani u otopini Carnoy I – mješavina 96% etanola i ledene octene kiseline u omjeru 3:1. Fiksiranjem se zaustavlja dioba stanica. Prije same analize korjenčići su obojeni 1%-tnom otopinom aceta-karmina. Nakon bojanja pristupila sam izradi preparata. Otkinula

sam vršni dio korjenčića (intezivno obojana zona primarnog meristema) i stavila ga na predmetno stakalce u kap aceto-karmina, te ga macerirala staklenim štapićem. Macerirane korjenčiće sam prekrila pokrovnicom i lagano pritisnula palcem – tehnika gnječenja ("squash") (Sharma i Sharma, 1972). Predmetna i pokrovna stakalca prethodno sam oprala u etanolu. Pripremljene sam preparate pregledala svjetlosnim mikroskopom.

Mikroskopiranje i fotografiranje sam obavila svjetlosnim mikroskopom "Standard 20 Zeiss". Za analizu mitotske aktivnosti pregledala sam najmanje 6000 stanica (2000 stanica u svakoj od 3 replike) po svakom uzorku testnih voda, a za analizu kromosomskih aberacija najmanje 200 diobenih stanica vršKova korjenčića luka po uzorku (kontrola, SJ, SŽ, SP, ZGOS, JAK). Mitotski indeks sam izračunala kao omjer broja stanica u diobi i ukupnog broja stanica uzorka i izrazila u postocima.

4.1 SADRŽAJ TEŠKIH METALA U UZORKOVANIM POVRŠINSKIM I OTPADNIM VODAMA

Metodom atomske apsorpcijske spektrometrije određeni su u uzorkovanim površinskim i otpadnim vodama esencijalni teški metali bakar, cink i nikal te neesencijalni kadmij, krom, olovo i živa. Najviše dopuštene koncentracije navedenih teških metala prema "Uredbi o opasnim tvarima u vodama" (Narodne novine, 1998) Vlade Republike Hrvatske u vodama prve vrste (one koje se u svom prirodnom stanju ili nakon dezinfekcije mogu koristiti za piće ili prehrambenoj industriji) su navedene u Tablici 3.

Tablica 3. Granične vrijednosti teških metala u vodama.

Metali	μg/L
bakar	<2
cink	>50
kadmij	>0,1
krom	>1
nikal	>15
olovo	>0,1
živa	>0,01

Sadržaj bakra, cinka, nikla i kadmija u odabranim vodama bio je ispod najviših dozvoljenih vrijednosti za teške metale u vodama (Tablice 4 i 5). Sadržaj kroma bio je povišen u pojedinim uzorcima površinskih voda Sava Jesenice (SJ1, SJ3) i Sava Županja (SŽ2, SŽ3) te otpadne vode uzete nakon 16 i 24h (4, 6) iz Zagrebačkog otpadnog gradskog sustava (ZGOS). Sadržaj olova bio je povišen u svim uzorcima površinskih voda Sutla Prišlin i jednom uzorku Sava Županja (SŽ2) te u otpadnim vodama Jakuševac i ZGOS (1, 2, 3). Sadržaj žive bio je povišen u uzorcima površinskih voda SP1, SJ3, a posebice u uzorcima SP3 i SŽ3 u odnosu na vrijednosti iz Tablice 3. Sadržaj tog toksičnog metala bio je povišen i u uzorcima otpadne vode ZGOS 1, 6 te posebice u uzorcima ZGOS 3 i Jakuševac.

Tablica 4. Sadržaj teških metala u površinskim vodama uzorkovanim tijekom tri mjeseca.

	Sutla-Prišlin			Sava Jesenice			Sava Županja		
	SP1	SP2	SP3	SJ1	SJ2	SJ3	SŽ1	SŽ2	SŽ3
µg/L	13.11.2007	04.12.2007	22.01.2008	20.11.2007	10.12.2007	28.01.2008	19.11.2007	11.12.2007	29.01.2008
bakar	1.24	0.95	1.14	0.64	0.88	0.8	1.15	1.2	0.77
cink	2.81	2.92	2.19	2.68	2.77	2.19	2	6.33	2.7
kadmij	0.02	0.01	0.04	0.015	0.01	0.009	0.01	0.02	0.009
krom	0.67	0.92	0.39	1.29	0.51	1.23	0.71	1.2	2.24
nikal	3.08	3.5	1.12	2.02	1.48	3.78	4.27	3.44	4.37
olovo	0.21	0.2	0.23	0.05	0.08	0.05	0.08	0.11	0.03
živa	0.018	<0.01	0.022	<0.01	<0.01	0.01	<0.01	<0.01	0.027

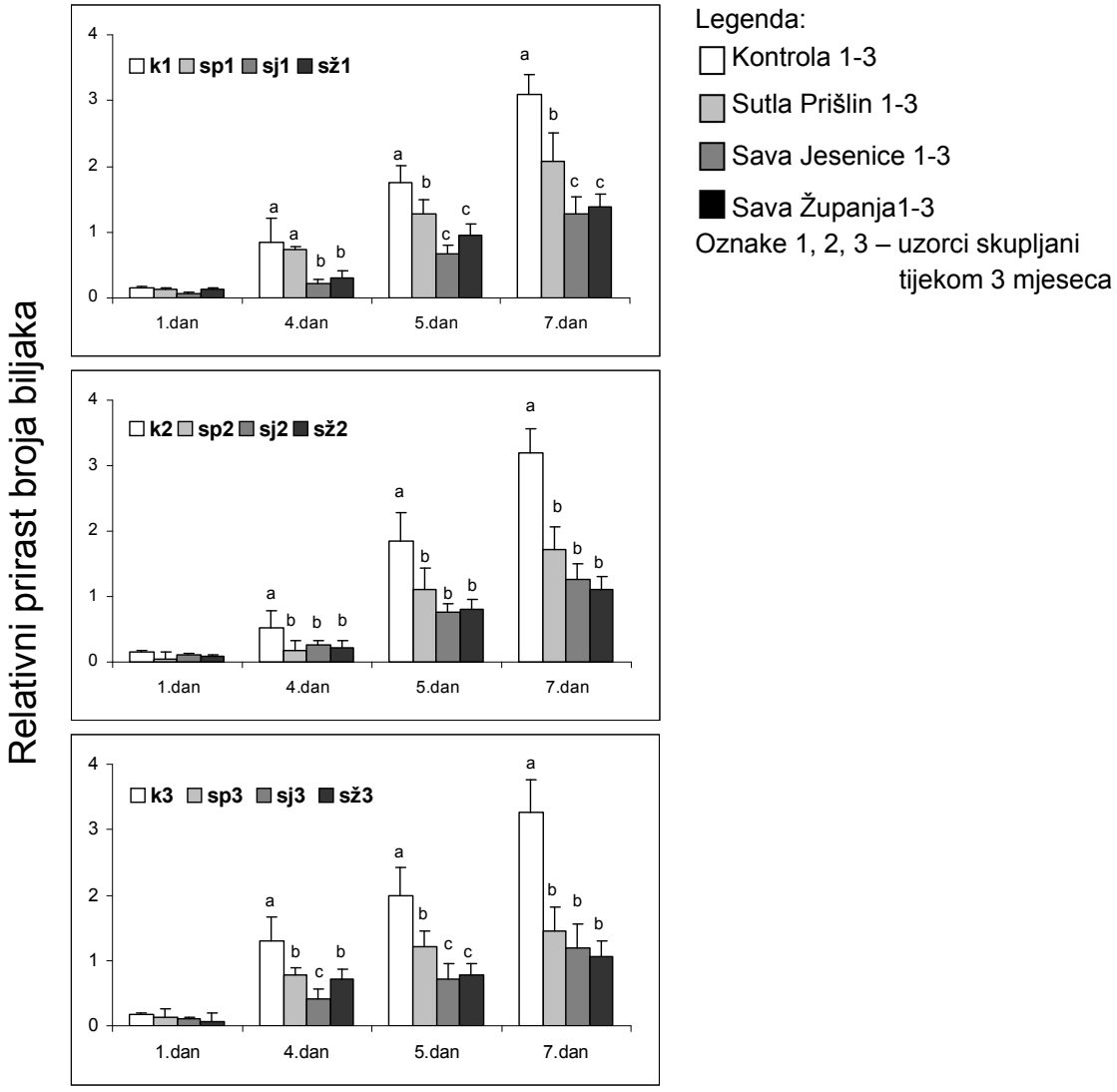
Tablica 5. Sadržaj teških metala u otpadnim vodama (ZGOS-uziman svaka 4h tijekom 24h, Jakuševac).

	Zagrebački gradski otpadni sustav						JAK
µg/L	1 (4h)	2 (8h)	3 (12h)	4 (16h)	5 (20h)	6 (24h)	
bakar	1.24	0.95	1.14	0.64	0.88	0.8	1.11
cink	2.81	2.92	2.19	2.68	2.77	2.19	2.64
kadmij	0.02	0.01	0.04	0.015	0.01	0.009	0.02
krom	0.67	0.92	0.39	1.29	0.51	1.23	0.66
nikal	3.08	3.5	1.12	2.02	1.48	3.78	2.57
olovo	0.21	0.2	0.23	0.05	0.08	0.05	0.21
živa	0.018	<0.01	0.022	<0.01	<0.01	0.01	0.02

4.2 UČINAK TEŠKIH METALA NA POKAZATELJE RASTA VODENE LEĆE

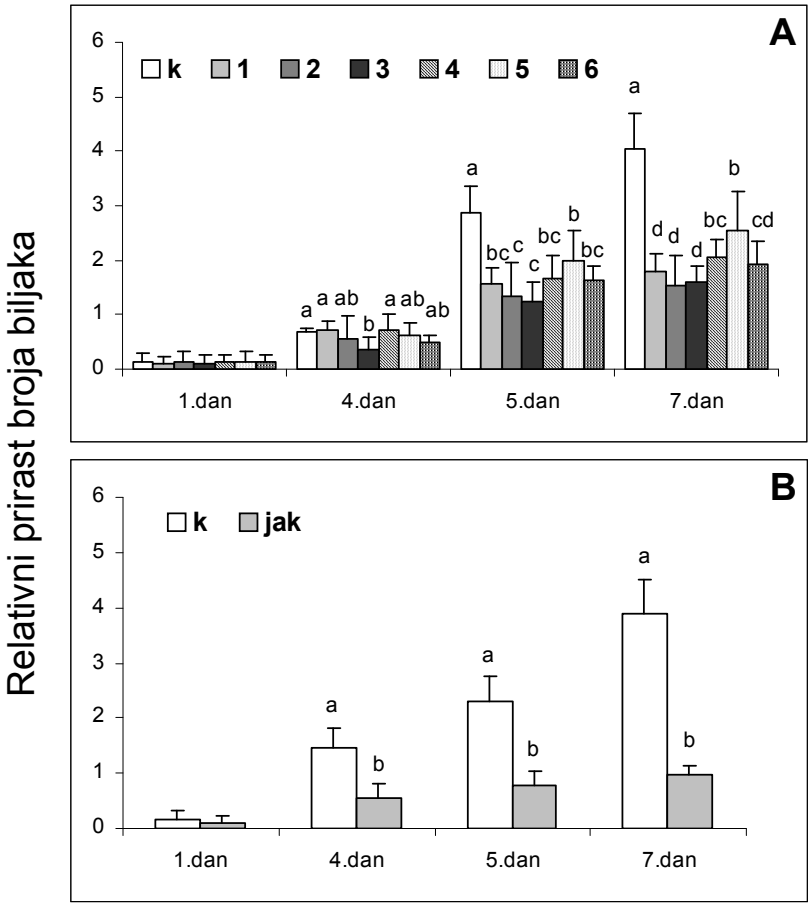
4.2.1 UČINAK TEŠKIH METALA NA PRIRAST BROJA BILJAKA

Uzorci gotovo svih površinskih voda (Sutla Prišlin 2-3, Sava Jesenice 1-3, Sava Županja 1-3) opterećeni teškim metalima uzrokovali su smanjeni rast broja biljaka već nakon četvrtog dana pokusa (Slika 1). Nakon petog i sedmog dana pokusa statistički značajno smanjeni rast vodene leće zabilježen je u uzorcima svih voda, a posebice u uzorcima Sava Jesenice i Sava Županja.



Slika 3. Relativan prirast broja biljaka uzgajanih 7 dana u površinskim (Sutla Prišlin, Sava Jesenice, Sava Županja) vodama opterećenim teškim metalima sakupljenim tijekom 3 mjeseca (1-3). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$).

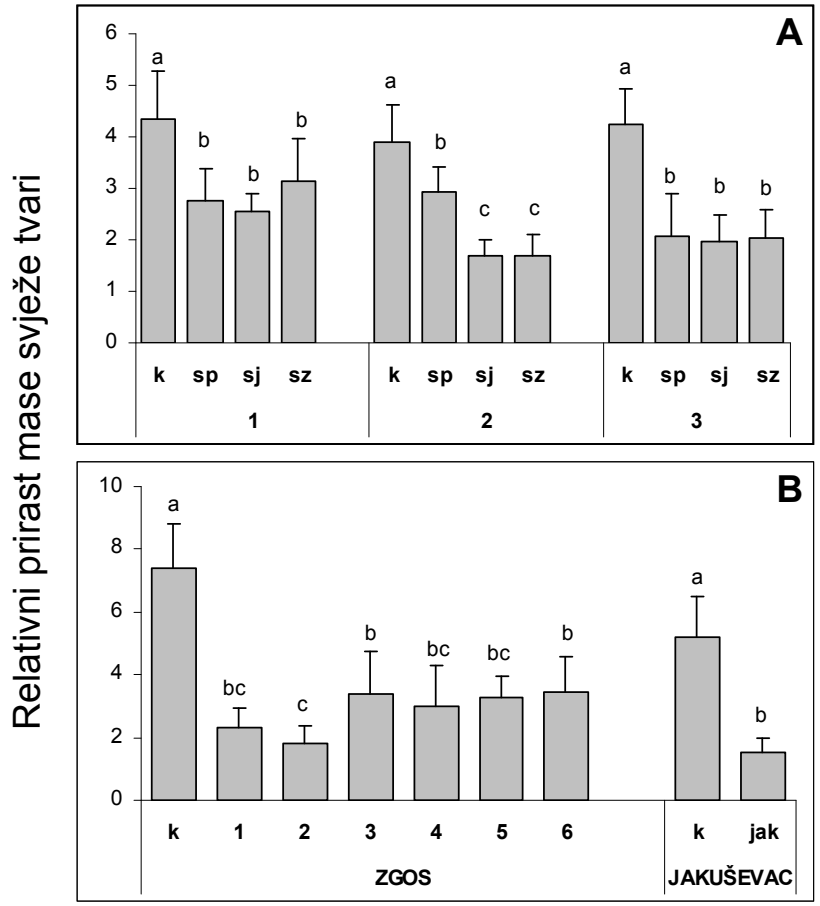
Uzorci vode iz Zagrebačkog gradskog otpadnog sustava (ZGOS) sakupljani su svaka 4 sata tijekom jednog dana. Smjesa teških metala iz otpadne vode ZGOS sakupljene nakon 12h (uzorak 3) uzrokovala je smanjeni rast broja biljaka već nakon četvrtog dana pokusa (Slika 2A). Prirast broja biljaka je bio znatno smanjen u svim ZGOS uzorcima (1-6) od petog dana do kraja pokusa. Smjesa teških metala iz otpadne vode Jakuševac uzrokovala je smanjeni rast broja biljaka nakon četvrtog dana za 49%, nakon petog dana za za 79% te nakon sedmog dana za od 85% u odnosu na kontrolu (Slika 2B).



Slika 4. Relativan prirast broja biljaka uzgajanih 7 dana u otpadnim vodama opterećenim teškim metalima: A) ZGOS (zagrebački gradski otpadni sustav – kompozitni uzorak sakupljan svakih 4 sata), B) Jakuševac. Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$).

4.2.2 UČINAK TEŠKIH METALA NA RELATIVNI PRIRAST MASE SVJEŽE TVARI

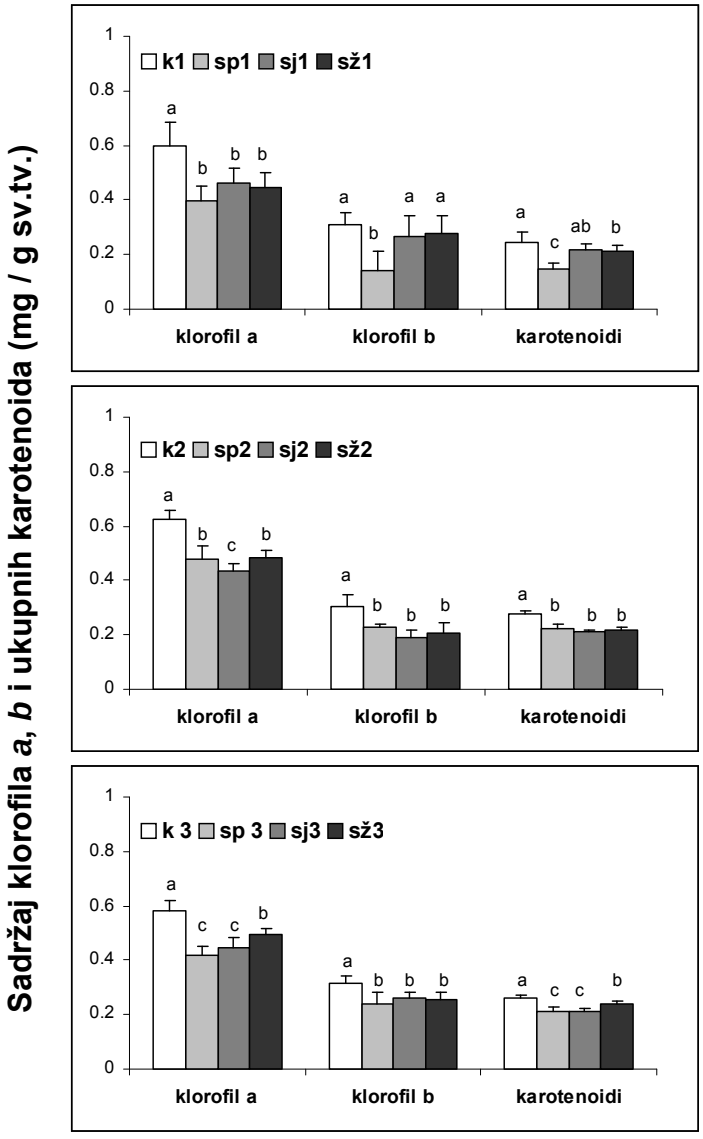
Uzorci svih površinskih voda (Sutla Prišlin, Sava Jesenice, Sava Županja) opterećeni smjesom teških metala uzrokovali su smanjeni prirast mase svježe tvari vodene leće nakon tjedan dana pokusa (Slika 3A). Uzorci otpadnih voda ZGOS1-6 i Jakuševac također su statistički značajno smanjili relativni prirast mase svježe tvari (Slika 3B).



Slika 5. Relativan prirast mase svježe tvari vodene leće uzgajane 7 dana u A) površinskim (Sutla Prišlin, Sava Jesenice, Sava Županja) vodama sakupljenim tijekom 3 mjeseca (1-3) te u B) otpadnim vodama ZGOS i Jakuševac. Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$).

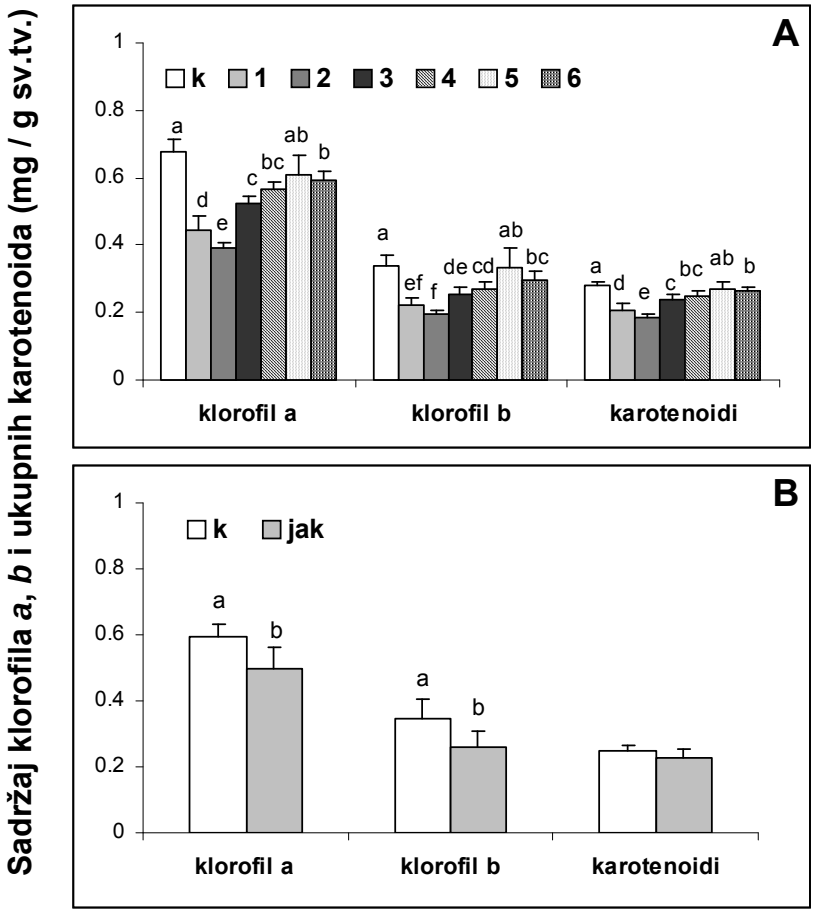
4.3 UČINAK TEŠKIH METALA NA SADRŽAJ KLOROFILA I KAROTENOIDA U VODENOJ LEĆI

Smjesa teških metala iz uzoraka površinskih voda (Sutla Prišlin, Sava Jesenice, Sava Županja) značajno je smanjila sadržaj klorofila *a*, *b* i ukupnih karotenoida u vodenoj leći nakon tjedan dana pokusa (Slika 4). Izuzetak je primijećen samo u vodenoj leći izloženoj teškim metalima iz uzoraka SJ1 i SŽ1 pri čemu je sadržaj klorofila *b* bio sličan kontroli.



Slika 6. Sadržaj klorofila *a*, *b* i ukupnih karotenoida u vodenoj leći nakon 7 dana rasta na površinskim (Sutla Prišlin, Sava Jesenice, Sava Županja) vodama opterećenim teškim metalima sakupljenim tijekom 3 mjeseca (1-3). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$).

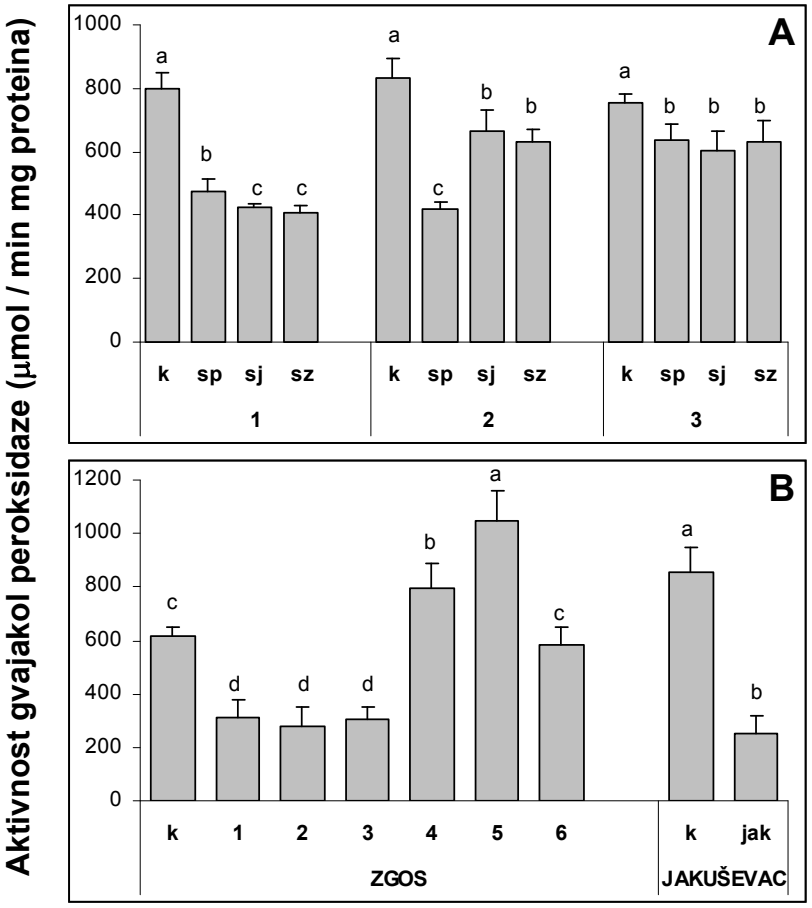
Smjesa teških metala iz otpadne vode ZGOS1-6 (sakupljene svaka 4 sata tijekom 24h) uzrokovala je smanjeni sadržaj klorofila *a*, *b* i ukupnih karotenoida u vodenoj leći nakon tjedan dana pokusa (Slika 5A). Uzorci ZGOS uzeti nakon 16, 20 i 24h imali su slabiji učinak na sadržaj fotosintetskih pigmenata u vodenoj leći u odnosu na uzorke sakupljene nakon 4, 8 i 12h. Smjesa teških metala iz otpadne vode Jakuševac uzrokovala je smanjeni sadržaj klorofila *a* i *b* (Slika 5B), dok se sadržaj ukupnih karotenoida nije bitno razlikovao u odnosu na kontrolu.



Slika 7. Sadržaj klorofila *a*, *b* i ukupnih karotenoida u vodenoj leći nakon 7 dana rasta na otpadnim vodama opterećenim teškim metalima: A) ZGOS 1-6 (zagrebački gradski otpadni sustav – kompozitni uzorak sakupljan svakih 4 sata), B) Jakuševac. Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$).

4.4 UČINAK TEŠKIH METALA NA AKTIVNOST PEROKSIDAZE U VODENOJ LEĆI

Aktivnost nespecifičnih ili „gvajakol“ peroksidaza (POD) u vodenoj leći izloženoj tijekom tjedan dana površinskim vodama opterećenim teškim metalima (Sutla Prišlin, Sava Jesenice, Sava Županja) je bila značajno smanjena u odnosu na kontrolu (Slika 6A). Uzorci otpadnih voda ZGOS1-3 statistički su značajno smanjili aktivnost POD, uzorci ZGOS4-5 su značajno povećali dok uzorak ZGOS6 nije promijenio aktivnost POD u usporedbi s kontrolom (Slika 6B). Teški metali iz uzorka otpadne vode Jakuševac su bitno smanjili aktivnost POD.



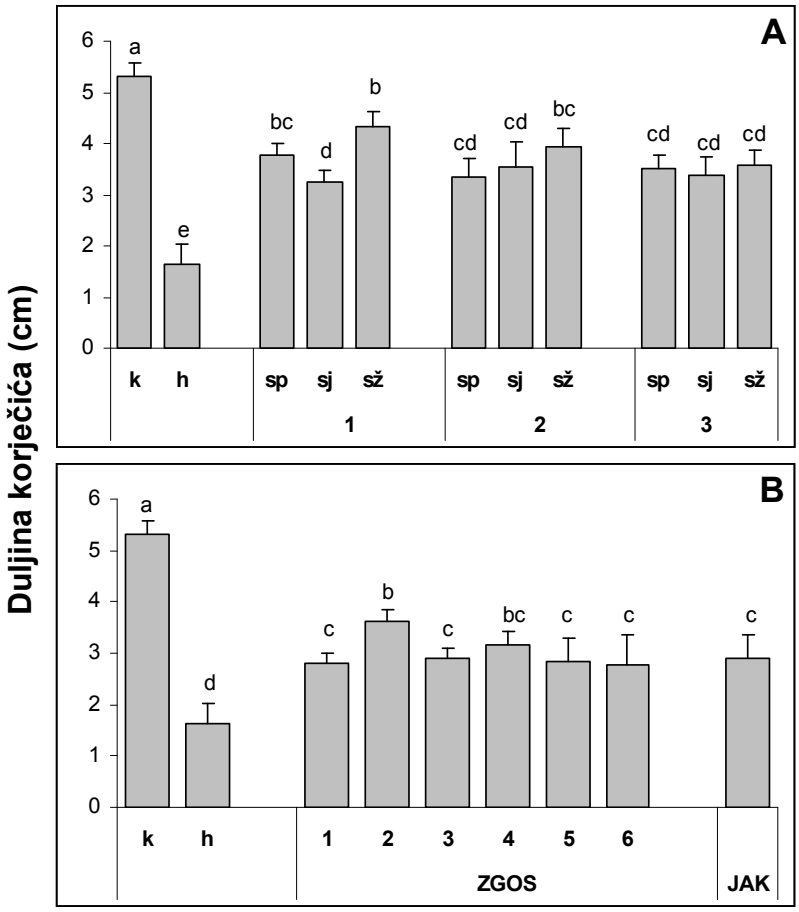
Slika 8. Aktivnost gvajakol peroksidaze u vodenoj leći nakon 7 dana rasta u A) površinskim (Sutla Prišlin, Sava Jesenice, Sava Županja) vodama sakupljenim tijekom 3 mjeseca (1-3) te u B) otpadnim vodama ZGOS i Jakuševac. Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$).

4.5 ALLIUM TEST

4.5.1 UČINAK TEŠKIH METALA NA DUŽINU I MORFOLOGIJU KORJENČIĆA LUKA

Teški metali iz uzorkovanih voda su imali učinak i na morfologiju vrška korijena luka. Obje otpadne vode ZGOS (1-6) i Jakuševac te uzorci površinskih voda SŽ2 i SP2 su uzrokovale uvinuće vršakova korjenčića u obliku kuke. Valoviti i djelomice macerirani korjenčići su primijećeni kao rezultat učinka 300 mM H_2O_2 (pozitivna kontrola).

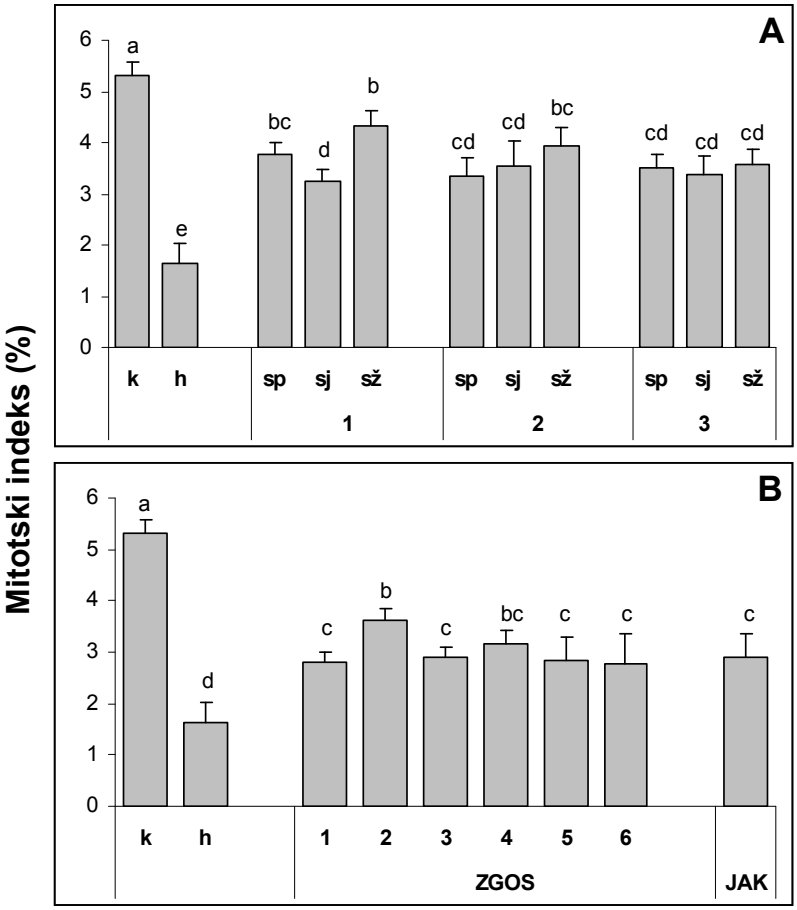
Svi uzorci površinskih (Slika 9A) i otpadnih (Slika 9B) voda su izazvali statistički značajnu inhibiciju rasta korjenčića u usporedbi s kontrolom dok je najveća inhibicija zamijećena u pozitivnoj kontroli.



Slika 9. Duljina korjenčića luka nakon 48h rasta u A) površinskim (Sutla Prišlin, Sava Jesenice, Sava Županja) vodama sakupljenim tijekom 3 mjeseca (1-3) te u B) otpadnim vodama ZGOS i Jakuševac. Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$).

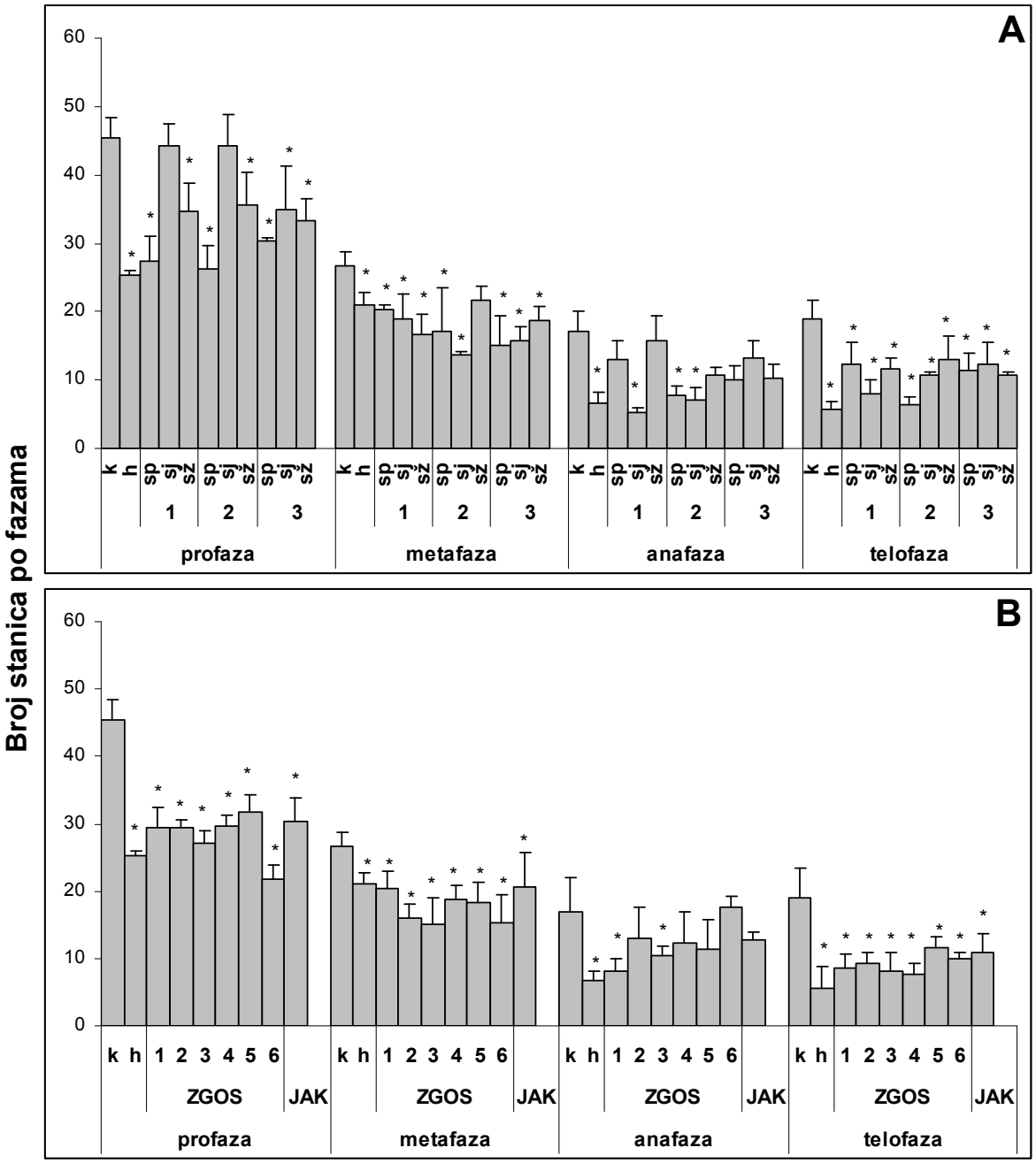
4.5.2 UČINAK TEŠKIH METALA NA MITOZU U STANICAMA KORJENČIĆA LUKA

Citotoksičnost voda je procijenjena određivanjem mitotskog indeksa tj. postotka broja stanica u diobi te brojem stanica u svakoj pojedinoj fazi diobe. Ti su parametri dobiveni brojanjem 2000 stanica po svakoj lukovici (2n = 16) pri čemu su po svakom uzorku testnih voda nasađene po 3 lukovice. Svi uzorci površinskih (Slika 10A) i otpadnih (Slika 10B) voda su uzrokovali znatno smanjenje mitotskog indeksa u usporedbi s kontrolom, a najmanje stanica u diobi je zamijećeno u pozitivnoj kontroli.



Slika 10. Mitotski indeks u vrškovima korjenčića luka nakon 24h rasta u A) površinskim (Sutla Prišlin, Sava Jesenice, Sava Županja) vodama sakupljenim tijekom 3 mjeseca (1-3) te u B) otpadnim vodama ZGOS i Jakuševac. Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$).

Većina uzoraka površinskih (Slika 11A), a posebice otpadnih (Slika 11B) voda uzrokovali su znatno smanjenje broja stanica u pojedinim fazama u usporedbi s kontrolom. Uzorci površinskih voda koji su bili slični kontrolnim vrijednostima stanica u profazi su SJ1 i 2, u metafazi SŽ2 te u anafazi SP1 i 3, SJ3, SŽ1-3. Uzorci otpadnih voda koji se nisu bitno razlikovali od kontrolnih vrijednosti broja stanica u anafazi su ZGOS2, 4-6 i JAK.



Slika 11. Broj stanica u pojedinim fazama u vršcima korjenčića luka nakon 24h rasta u A) površinskim (Sutla Prišlin, Sava Jesenice, Sava Županja) vodama sakupljenim tijekom 3 mjeseca (1-3) te u B) otpadnim vodama ZGOS i Jakuševac. Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni zvjezdicom statistički su značajno različiti od kontrole ($P \leq 0,05$).

4.5.3 CITOGENETIČKA ANALIZA

Genotoksičnost voda bila je procijenjena analizom kromosomskih aberacija u najmanje 200 diobenih stanica vrškova korjenčića luka po uzorku. Promatrane kromosomske i mitotske nepravilnosti su: multipolarna vretena, zaostali kromosomi, fragmenti, *c*-mitoza, anafazni mostovi i sljepljeni kromosomi.

Meristemske stanice luka tretirane 300 mM H_2O_2 (pozitivna kontrola) izazvale su najveći broj kromosomskih aberacija među kojima u najvećoj mjeri sljepljivanje kromosoma. Svi uzorci površinske vode Sutla Prišlin te otpadne vode ZGOS i Jakuševac povećale su broj kromosomskih i mitotskih nepravilnosti u odnosu na kontrolu (Tablica 6 i 7). Svi uzorci površinske vode Sutla Prišlin (SP1-3) uzrokovali su pojavu *c*-mitoza i sljepljenih kromosoma (Slika 12A) dok je uzorak SP3 povećao i broj zaostalih kromosoma (Slika 12B). U meristemskim stanicama korijena luka raslog na otpadnoj vodi ZGOS uočeno je najviše zaostalih kromosoma i sljepljivanja (Slika 12C), a zatim *c*-mitoza (Slika 12C) i anafaznih mostova (Slika 12D). Vrlo rijetko su u svim uzorcima zamijećene anafaze s multipolarnim diobenim vretenom (Slika 12E). Kromosomski fragmenti su u najvećoj količini pronađeni u uzorku otpadne vode Jakuševac gdje je također uočeno i sljepljivanje kromosoma u većoj mjeri (Slika 12F).

Tablica 6. Mitotske i kromosomske nepravilnosti u stanicama korijena luka nakon 24h rasta na testnim površinskim vodama Sava Jesenice, Sava Županja i Sutla Prišlin.

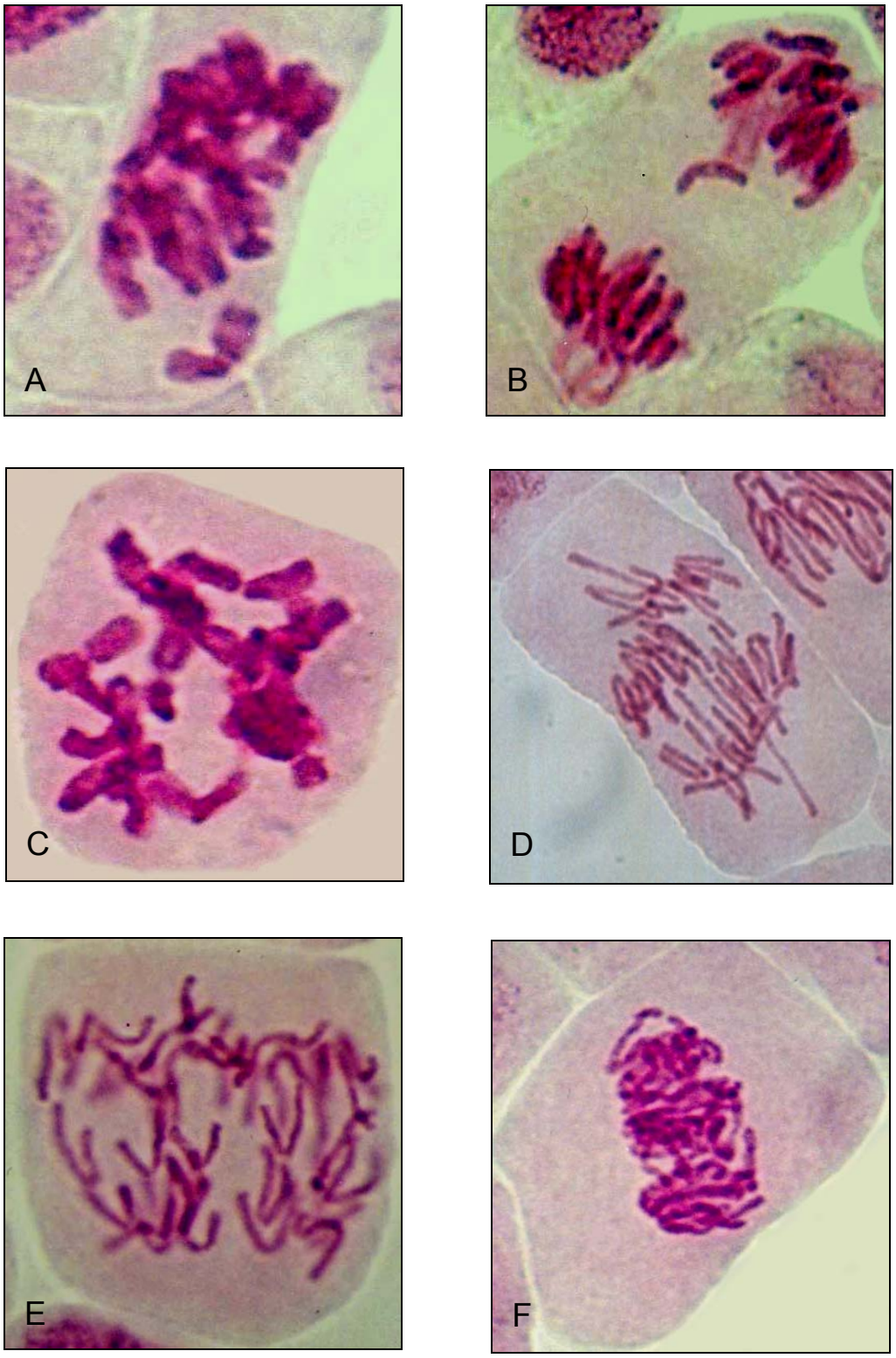
		Poremećena funkcija diobenog vretena			Promjene u strukturi kromosoma	Promjene u strukturi kromatina		
Uzorak	Broj stanica u diobi	C-mitoza	Zaostali kromosomi	Multipolarno vreteno	Lomovi	Anafazni mostovi	Sljepljeni kromosomi	Ukupno aberacija %
K	294	1	2	0	0	2	0	1.7
H_2O_2	176	18**	20**	1	6*	11**	87**	81.3
SP1	219	13*	4	0	1	3	18*	17.8
SP2	202	12*	3	0	0	3	11*	14.3
SP3	200	10*	8*	0	2	1	9*	15.0
SJ1	230	6	0	0	0	0	2	3.5
SJ2	207	3	0	0	0	0	0	1.5
SJ3	229	3	0	0	0	0	0	1.3
SŽ1	236	1	1	0	1	1	0	1.7
SŽ2	243	7	2	0	1	1	0	4.5
SŽ3	219	5	4	1	1	1	5	7.8

*p < 0.05, **p < 0.001

Tablica 7. Mitotske i kromosomske nepravilnosti u stanicama korijena luka nakon 24h rasta na testnim otpadnim vodama ZGOS (Zagrebački gradski otpadni sustav) i Jakuševac.

		Poremećena funkcija diobenog vretena			Promjene u strukturi kromosoma	Promjene u strukturi kromatina		
Uzorak	Broj stanica u diobi	C-mitoza	Zaostali kromosomi	Multipolarno vreteno	Lomovi	Anafazni mostovi	Sljepljeni kromosomi	Ukupno aberacija %
K	294	1	2	0	0	2	0	1.7
H_2O_2	176	18**	20**	1	6**	11**	87**	81.3
ZGOS 1	199	6	9*	0	2	7*	6	15.1
ZGOS 2	203	4	4	0	2	5	11*	12.8
ZGOS 3	201	1	10*	0	3	5	7	12.9
ZGOS 4	205	13*	12*	0	2	4	9*	19.5
ZGOS 5	219	3	10*	0	1	16**	9*	17.8
ZGOS 6	194	11*	10*	0	1	5	6	17.0
JAK	224	6	5	1	5*	4	9*	13.4

*p < 0.05, **p < 0.001



Slika 12. Citogenetički učinci teških metala iz površinskih i otpadnih voda u meristemskim stanicama vrškova korijena luka: sljepljeni kromosomi i zaostali (A), anafaza s zaostalim kromosomom (B), *c*-mitoza sa sljepljenim kromosomima (C), anafazni most (D), anafaza s multipolarnim diobenim vretenom (E), sljepljeni kromosomi (F).

Diljem svijeta su provedena ekotoksikološka istraživanja o učinku smjese teških metala iz površinskih i otpadnih voda na biljni i životinjski svijet. Međutim u Hrvatskoj još nije provedeno takvo istraživanje na biljkama, iako je mjeren učinak pojedinog teškog metala u uvjetima *in vitro*. Stoga je moguća usporedba naših rezultata i s rezultatima toksičnosti pojedinog teškog metala.

U ovom radu sam od esencijanih teških metala određivala sadržaj bakra (Cu), cinka (Zn) i nikla (Ni), a od neesencijalnih kadmija (Cd), kroma (Cr), olova (Pb) i žive (Hg). Obzirom da je sadržaj kroma, olova i žive bio povišen u većini uzoraka voda, pretpostavila sam da su učinci smjese teških metala na pokazatelje fito- i genotoksičnosti većinom posljedica djelovanja upravo ta tri teška metala.

5.1 FITOTOKSIČNOST

Jedan od pokazatelja kojim sam utvrdila fitotoksičnost smjese teških metala iz površinskih i otpadnih voda u ovom radu je njihov učinak na rast vodene leće (*Lemna minor* L.). Mjereni pokazatelji rasta su relativni prirast broja biljaka i relativni prirast mase svježe tvari. Smanjeni relativni prirast mase svježe tvari uočen je nakon tjedan dana rasta u svim uzorcima, a posebice u uzorcima otpadnih voda. I drugi pokazatelj rasta - relativni prirast broja biljaka - također je bio smanjen u svim uzorcima osobito u vodama Sava Jesenice i Sava Županja nakon 5. i 7. dana, a u otpadnim vodama već nakon 4. dana. Dobiveni rezultati podudaraju se s brojnim istraživanjima koja su pokazala da Cr, Pb i Hg izazivaju inhibiciju rasta u raznim vrstama biljaka (Panda, 2003; Panda i Choudhury, 2005; Sharma i Dubey, 2005; Cargnelutti i sur., 2006). Liu i sur. (1993) su dokazali da nakupljanje kroma u biljci uzrokuje inhibiciju rasta kao posljedica inhibicije diobe stanica. Cseh i sur. (1996) su utvrdili da i olovo inhibira rast, ali ne tako znatno kao krom jer se olovo zadržava najvećim dijelom u apoplastu korijena. Inhibicija rasta usko je povezana sa smanjenjem sadržaja klorofila zbog nemogućnosti sinteze tvari potrebnih za rast (Choudhury i Panda, 2004).

Fotosintetski pigmenti klorofili, karotenoidi i fikobilini imaju važnu ulogu u fotosintezi. Teški metali utječu prvotno upravo na biosintezu fotosintetskih pigmenata budući da su kloroza i poremećen rast prvi simptomi toksičnosti teških metala (Myśliwa-Kurdziel i sur. 2002). Inducirano smanjenje akumulacije fotosintetskih pigmenata još je očitije tijekom rasta novih listova jer tada u normalnim okolnostima

dolazi do aktivne sinteze pigmenata. Posljedica poremećaja fotosintetskog aparata je smanjena fotosintetska učinkovitost, sporiji rast i smanjena biomasa. Supstitucija Mg^{2+} iona u molekuli klorofila s metalnim ionima Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+}, Pb^{2+} ili Ni^{2+} koja je uočena kod vodenih biljaka razlog je prekida fotosinteze (Küpper i sur., 1996). U brojnim istraživanjima utvrđena je bioakumulacija i toksičnost kroma za fotosintetske pigmente u mnogim vrstama (Barcelo i sur., 1986; Sharma i Sharma, 1996; Vajpayee i sur., 2000). Sukladno tome rezultati su također pokazali smanjen sadržaj klorofila i karotenoida uslijed povišenog sadržaja kroma u svim uzorcima. U svim uzorcima uočen je odnos klorofila *a* i *b* 1:2, iznimka je uzorak Sutla-Prišlin 1 u kojem je taj odnos bio 1:3 što možemo povezati s povećanom koncentracijom olova u odnosu na druge uzorke. Zamjena središnjeg atoma magnezija u molekuli klorofila atomom olova sprečava sakupljanje svjetlosti što onemogućuje fotosintezu (Küpper i sur., 1998). Bakar isto tako značajno smanjuje sadržaj klorofila (Devi i Prasad, 1998) što je povezano s peroksidacijom membrana kloroplasta uzrokovanom upravo bakrom (Sandmann i Boger, 1980). Uzorci otpadnih voda uzeti tijekom prvih 12 sati više su smanjili sadržaj fotosintetskih pigmenata od onih uzetih u narednih 12 sati. Ovakav rezultat je vjerojatno posljedica veće aktivnosti raznih industrijskih postrojenja ili ustanova čiji rad rezultira ispuštanjem različitih organskih tvari i teških metala (pesticidi, herbicidi, otapala iz otpadnih voda tvorničkih postrojenja itd.) u prvom dijelu dana te smanjene aktivnosti u drugom dijelu dana. Otpadne vode Jakuševca odstupaju utoliko što je sadržaj karotenoida sličan kontroli što se može objasniti činjenicom da krom uzrokuje povećanje količine reaktivnih oblika kisika, a posljedično tome se povećava i razina karotenoida koji imaju antioksidacijski učinak (Panda i Choudhury, 2005). Brojna istraživanja provedena na vodenim biljkama potvrđuju takvo djelovanje kroma na sadržaj karotenoida (Ralph i Burchett, 1998; Tripati i Smith, 2000; Vajpayee i sur., 2000).

Osim ovih parametara vezanih uz rast i djelotvornost fotosintetskog aparata promatrani su i pokazatelji oksidacijskog stresa s obzirom da uslijed djelovanja teških metala dolazi do stvaranja reaktivnih oblika kisika. Pokušala sam utvrditi sposobnost biljke da se suprotstavi oksidacijskom stresu mjerenjem aktivnosti nespecifičnih peroksidaza koje razgrađuju vodikov peroksid. U ovom istraživanju aktivnost peroksidaza sam mjerila koristeći gvajakol kao supstrat. U uzorcima površinskih voda, Jakuševca i ZGOS 1-3 uočeno je smanjenje aktivnosti gvajakol peroksidaze što je vjerojatno posljedica stvaranja povećanih količina reaktivnih oblika kisika

uslijed djelovanja povećane količine olova u tim uzorcima koje uzrokuje lipidnu peroksidaciju (Choudhury i Panda, 2004). Suprotno tome, otpadne vode ZGOS 4-5 uzrokovale su povećanu aktivnost peroksidaza u odnosu na kontrolne biljke vjerojatno zbog toga što u tim uzorcima voda nijedan neesecijalni teški metal nije prelazio najviše dozvoljene vrijednosti, a poznato je da esencijalni teški metali (Zn, Cu, Ni) u niskim koncentracijama induciraju aktivnost peroksidaza (Srivastava i sur., 2006; Prasad i sur., 1999; Schickler i Caspi, 1999).

5.2 GENOTOKSIČNOST

Budući da teški metali prvo dolaze u kontakt s korjenskim sustavom na njemu najranije možemo primijetiti neke morfološke promjene koje nastaju kao posljedica njihova djelovanja. U ovom sam istraživanju uočila da u uzorcima otpadnih voda i nekim površinskih voda dolazi do uvinuća korijena luka u obliku kuke što je vjerojatno najvećim djelom uzrokovano povećanom količinom olova te posebice žive u tim uzorcima. Inhibicija rasta korjenčića luka primijećena je u također u svim uzorcima testnih voda. Dokazano je da olovo prvenstveno izaziva inhibiciju rasta korijena, a ne izdanka što i nije neobično obzirom da se taj teški metal zadržava u najvećoj količini u apoplastu korijena (Wozny i Jerczynska, 1991; Kahle, 1993; Godbold i Kettner, 1991). Iz tog razloga olovo u fiziološkoj koncentraciji od 10 μM ne inhibira značajno rast i ne uzrokuje vidljive morfološke promjene (Cseh i sur., 2000). Rast korijena je međutim više inhibiran kadmijem nego olovom (Titov i sur., 1996) što je uzrokovano negativnim učinkom tog teškog metala na mitozu, sintezu komponenti stanične stjenke, Golgijev aparat ili metabolizam polisaharida u korjenovoj kapi (Punz i Seighardt, 1993). Drugi razlog inhibicije rasta korjenčića uslijed djelovanja kadmija leži u činjenici da kadmij smanjuje translokaciju produkata fotosinteze u korjenčiće (Sanita di Toppi i sur., 1999).

Teški metali mogu uzrokovati razne posljedice a genotoksičnost se odnosi na oštećenje DNA ili genoma. Kromosomske aberacije se odnose na kromosomske strukturne promjene. Meristemske stanice korijena biljaka, najčešće običnog luka, prikladni su indikatori za procjenu genotoksičnosti teških metala prisutnih u vodi. Istraživanja su pokazala kako Cd, Cr, Hg, Pb, Se i Zn uzrokuju kromosomske

aberacije u vrste *Allium cepa* (Borboa i De la Torre 1996; Fiskejo 1979; Fiskejo 1988, Liu i sur. 1995; Rank i Nielsen 1994; Lerda 1992).

Većina testnih uzoraka voda iz mog istraživanja je smanjila broj stanica u diobi tj. mitotski indeks, a povećala učestalost kromosomskih aberacija. Koncentracija vodikovog peroksida od 300 mM je (pozitivna kontrola) uzrokovala najveći postotak kromosomskih aberacija i to poglavito sljepljivanje kromosoma, zatim zaostale kromosome i *c*-mitozu koja je također često bila „ljepljiva“. Slične učinke na strukturu kromosoma, statistički značajne u odnosu na kontrolu, pokazali su uzorci površinske vode Sutla Prišlin te otpadnih voda ZGOS i Jakuševac. Monte Egito i sur. (2007) su također uočili sljepljivanje kromosoma i pojavu c-mitoze kao najučestalije kromosomske aberacije u korijenu luka izloženom površinskim vodama.

Živa je jedan od teških metala koji uzrokuje smanjenje mitotskog indeksa i povećava frekvenciju kromosomskih aberacija (Patra, 2000), a arsen ima isti takav učinak. U meristemskim stanicama korijena vrste *Allium cepa* Hg je izazvala pojavu *c*-mitoze (kolhicin mitoza) i kondenzaciju kromosoma (Fiskejo, 1969; Ramel, 1969).

Kada teški metal djeluje direktno na DNA dolazi do kromosom/kromatidnih prekida ili izmjena koje su vidljive u metafazi, nastaju dicentrični kromosomi (Kihlman 1971, 1975). Gubitak telomere uzrokuje stvaranje mostova i ljepljivih kromosoma u anafazi i telofazi (Nicoloff i Gecheff, 1976; Rank i Nielsen, 1993). Pretpostavlja se kako su ljepljivi kromosomi rezultat oštećenja kromosomskih perifernih proteina kao što je DNA topoizomeraza II. Vrsta *Allium cepa* je korištena za analizu genotoksičnosti otpadnih voda koje su sadržavale: Pb, Ni, Cr, Zn, Cu i Cd (Rank i Nielsen 1998). Uzorak Sutla Prišlin pokazao je veći broj c-mitoze i sljepljenih kromosoma što možemo povezati sa nešto višim koncentracijama olova i žive. Kromosomski fragmenti su primijećeni u vrlo malom postotku u svim uzorcima voda s iznimkom Jakuševca gdje je nađeno nešto više fragmenata što je vjerojatno posljedica povećane količine olova. Otpadne vode ZGOS uzrokovale su pojavu sljepljivanja i anafaznih mostova što možemo objasniti prisutnošću olova, žive i kroma (Patra i sur., 2004).

Rezultati dobiveni u ovom radu na dvjema biljnim vrstama, vodenoj leći i luku, ukazuju na fitotoksične, citotoksične i genotoksične tvari u uzorkovanim vodama i indiciraju potencijalan rizik ne samo za biljne vrste nego i za sve žive organizme.

Na temelju provedenih istraživanja možemo zaključiti da su teški metali iz testnih površinskih i otpadnih voda uzrokovali:

- smanjeni rast vodene leće (relativni prirast broja biljaka i relativna masa svježe tvari)

- smanjenje sadržaja klorofila *a* i *b* te karotenoida u listovima vodene leće (posebice ZGOS tijekom prvih 12 sati)

- smanjenje aktivnosti peroksidaza izuzevši ZGOS 4-5 gdje je zabilježeno povećanje aktivnosti peroksidaza

- smanjenje dužine korjenčića i morfološke promjene vrškova korjenčića u obliku kuka

- smanjenje mitotskog indeksa i smanjen broj stanica u određenim staničnim fazama u odnosu na kontrolu

- kromosomske aberacije - otpadne vode u većem postotku (c-mitoza, sljepljivanje i zaostali kromosomi) nego površinske vode

Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplast: polypheoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol 24: 1-15

Asada K (1992) Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxid-scavenging enzyme in plants. Physiol Plant 85: 235-241

Baccouch S, Chaoui A, El Ferjani E (1998) Nickel-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Zea mays* shoots. Plant Physiol Biochem 36: 689-694

Barcelo J, Poschenrieder C, Gunse B (1986) Water relations of cromium VI treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv Contender) under both normal and water stress conditions. J Exp Bot 37: 178-187

Borboa L, De la Torre C (1996) The genotoxicity of Zn (II) and Cd (II) in *Allium cepa* root meristematic cells. New Phytol 134: 481-486

Cargnelutti D, Almeri Tabaldi L, Spanevello RM, de Oliveira Jucoski G, Battisti V, Redin M, Blanco Linares CE, Dressler VL, de Moraes Flores EM, Teixeira Nicoloso F, Morsch VM, Chitolina Schetinger MR (2006) Mercury toxicity induces oxidative stress in growing cucumber seedlings. Chemosphere 65:999–1006

Choudhury S, Panda SK (2004) Induction of oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under lead and arsenic phytotoxicity. Curr Sci 87:342-348

Cseh E, Fodor F, Varga A, Záray G (2000) Effect of lead treatment on the distribution of essential elements in cucumber. J Plant Nutr 23: 1095-1105

Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cell Moll Life Sci 57: 779-795

Devi SR, Prasad MNV (1998) Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. Plant Sci 138: 157-165

Duncan DB (1955) Multiple range and multiple F tests. Biometrics 11: 1-42

Ensley HE, Barber JT, Polito MA, Oliver AI (1994) Toxicity and metabolism of 2,4-dichlorophenol by the aquatic angiosperm *Lemna gibba*. Environ Toxicol Chem 13: 325-331

Fiskesjo G (1969) Some results from Allium tests with organic mercury halogenides. Hereditas 62: 314-322

Fiskesjo G (1979) Mercury and selenium in a modified Allium test. Hereditas 91: 169-178

Fiskesjo G (1988) The *Allium* test – an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. Mut Res 197: 243-260

Fiskesjö G (1993) The Allium test – a potential standard of assessment of environmental toxicity. U: Environmental Toxicology and Risk Assessment: 2nd volume. Gorsuch JW, Dwyer JF, Ingersoll CG, La Point TW (ur). ASTM Publication, Philadelphia, USA, str 331-345

Fodor F (2002) Physiological responses of vascular plants to heavy metals. U: Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants. Prasad MNV, Strzałka K (ur). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London, str 149-177

Fodor F, Sárvári E, Láng F, Szigeti Z, Cseh E (1996) Effects of Pb and Cd on cucumber depending on the Fe-complex in the culture solution. J Plant Physiol 148: 434-439

Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ (1994) Photooxidative stress in plants. Physiol Plant 92: 696-717

Foyer CH, Noctor G (2000) Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. New Phytol 146: 359-388

Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvment of oxidative stress. Plant Sci 121: 151-159

Garnczsarska M, Ratajczak L (2000) Metabolic responses of *Lemna minor* to lead ions. I. Growth, chlorophyll level and activity of fermentative enzymes. Acta Physiol Plant 22: 423-427

Gaspar Th, Penel C, Hagege D, Greppin H (1991) Peroxidases in plant growth, differentiation and developmental processes. U: Lobarzewski, J., Greppin, H., Penel, C. i Gaspar Th. (ur.) Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. Universety M. Curie-Sklodowska, Lublin and University of Geneva, Geneva, str 249-280

Goodbold DL, Kettner C (1991) Lead influences root growth and mineral nutrition of *Picea abies* seedlings. J Plant Physiol 139:95-99

Grisolia CK, de Oliveira ABB, Bonfim H, de Nazare Klautau-Guimarães (2005) Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. Gen Mol Biol 28: 334-338

Kahle H (1993) Response of roots of trees to heavy metal. Environ Exp Bot 33: 99-119

Kihlman BA (1971) Root tips for studying the effects of chemicals on chromosomes. U: Chemical Mutagens. Hollaender A (ur.) Chemical Mutagenesis 2nd Volume. Plenum Press, New York, str 489-514

Kihlman BA (1975) Root tips of Vicia faba for the study of the induction of chromosomal aberrations. Mut Res 31: 401-412

Kochian LV (1995) Cellular mechanisms of aluminium toxicity and resistence in plants. Physiol Plant Mol Biol 46: 237-260

Küpper H, Küpper F, Spiller M (1996) Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. J Exp Bot 47: 259-266

Küpper H, Küpper F, Spiller M (1998) In situ detection of heavy metals substituted chlorophylls in water plants. Photosynth Res 58: 123-133

Láng F, Sárvári E, Fodor F, Cseh E (1995) Effects of heavy metals on the photosynthetic apparatus in cucumber. U: P. Mathis (ur), Photosyntesis: From Light to Biosphere, Vol. IV, Kluwer Acad Publ, Dordrecht, str 533-536

Láng F, Szigeti Z, Cseh E, Zolla L, Sárvári E (1998) Influence of Cd and Pb on the ion content, growth and photosynthesis in cucumber. U: G. Garab (ur), Photosyntesis: Mechanisms and Effects, Vol. IV, Kluwer Acad Publ, Dordrecht, str 2693-2696

Lerda D (1992) The effect of lead on *Allium cepa* L. Mut Res 281: 89-92

Lewis MA 1995 Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: A review. Environ Pollut 87: 319-336

Lichtenthaler HK (1987a) Chlorophylls and carotenoids – pigments of photosynthetic biomembranes. Methods Enzimol 148: 350-382

Liu D, Jiang W, Li M (1992) Effect of trivalent and hexavalent chromium on root growth an cell division of *Allium cepa*. Hereditas 117: 23-29

Liu DH, Jaing WS, Li MX (1993) Effects of cromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. Israel J Plant Sci 42: 235-243

Liu D, Jiang W, Wang W, Zhai L (1995) Evaluation of metal ion on root tip cells by the *Allium* Test. Israel J Plant Sci 43: 125-133

Mazhoudi S, Chaoui A, Ghrobal MH, Ferjani EE (1997) Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). Plant Sci 127: 129-137

Monte Egito LM, das Gracas Medeiros M, Batistuzzo de Medeiros SR, Agnez-Lima LF (2007) Cytotoxic and genotoxic potential of surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. Gen Mol Biol 30: 435-431

Myśliwa-Kurdziel B, Strzałka K (2002) Influence of metals on biosynthesis of photosythetic pigments. U: Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants. Prasad MNV, Strzałka K (ur). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London, str 221-227

Narodne Novine (1998) Uredba o opasnim tvarima u vodi. “Narodne novine”, službeni list RH 78: 1774-1777

Nicloff H, Gecheff K (1976) Methods of scoring induced chromosome structural changes in barley. Mutation Research 34, 233-244

Nielsen MH, Rank J (1994) Screening of toxicity and gentoxicity in wastewater by the use of the Allium test. Hereditas 121: 249-254

Panda SK (2003) Heavy-metal phytotoxicity induces oxidative stress in a moss, *Taxithellium* sp. Curr Sci 84: 631-633

Panda SK, Choudhury S (2005) Chromium stress in plants. Braz J Plant Physiol 17: 95-102

Parker CA, Joyce TA (1967) Delayed fluorescence and some properties of the chlorophyll triplets. Photochem Photobiol 6: 395

Pastori GM, del Río LA (1997) Natural senescence in pea leaves. An activated oxygen mediated function for peroxisomes. Plant Physiol 113: 411-418

Patra M (2000) Comparative analysis of mercurials in higher plants in vivo. J Indian Bot Soc 79: 133-138

Patra M, Bhowmik N, Bandopadhyay B, Sharma A (2004) Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. Environ Exp Bot 52: 199-223

Pevalek-Kozlina B (2003) Fiziologija bilja, Profil International, Zagreb, str 156-219

Pirson A, Seidel F (1950) Zell- und stoffwechselphysiologishe Untersuchungen an der Wurzel von *Lemna minor* unter besonderer Berücksichtigung von Kalium- und Kalziummangel. Planta 38: 431-473

Prasad KVSK, Paradha Saradhi P, Sharmila P (1999) Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in Brassica juncea. Environ Exp Bot 42: 1-10

Punz WF, Sieghardt H (1993) The response of roots of herbaceous plant species to heavy metals. Environ Exp Bot 33:85-98

Ralph PJ, Burchett MD (1998) Photosynthetic response of *Halophila ovalis* to heavy metal stress. Environ Pollut 103: 91-101

Ramel C (1969) Genetic effecrs of organomercury compounds, 1. Cytological investigation on *Allium* root. Hereditas 61: 208-230

Rank J, Nielson MH (1993) A modified *Allium* test as a total in screening of the genotoxicity of complex mixture. Hereditas 118: 49-53

Rank J, Nielson MH (1994) Evaluation of *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity sreening of industrial waste water. Mut Res 312: 17-24

Rank J, Nielsen MH (1998) Genotoxicity testing of wastewater using the Allium cepa anaphase-telophase chromosome aberration assay. Mut Res 418: 113-119

Sandmann G, Boger P (1980) Copper-mediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes. Plant Physiol 66: 797-800

Sanita di Toppi L, Gabbrielli R (1999) Response to cadmium in higher plants. Environ Exp Bot 41: 105-130

Schickler H, Caspi H (1999) Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus Alyssum. Physiol Plant 105: 39-44

Sharma P, Dubey RS (2005) Lead toxicity in plants. Braz J Plant Physiol 17: 35-52

Sharma AK, Sharma A (1972) Chromosome techniques: Theory and practice. Buterworths and Co. Ltd, London, str 97-111

Sharma DC, Sharma CP (1996) Chromium uptake and toxicity effects on growth and metabolic activities in wheat, *Triticum aestivum* L. Indian J Exp Biol 34: 689-691

Siedlecka A, Krupa Z (2002) Functions of enzymes in heavy metal treated plants. U: Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants. Prasad MNV, Strzałka K (ur). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London, str 303-324

Skorzynska-Polit E, Baszynski T (1997) Differences in sensitivity of the photosynthetic apparatus in Cd-stressed runner bean plants in relation to their age. Plant Sci 128: 11-21

Smaka-Kincl V, Stegnar P, Lovka M, Toman MJ (1996) The evaluation of waste, surface and ground water quality using the Allium test procedure. Mut Res 368: 171-179

Somashekar SK, Gurudev MR (1985) Cell abnormalities induced by manufacturing industry waste water. Cytologia 50: 129-134

Srivastava S, Mishra S, Rudra D, Dwivedi TS, Gupta DK (2006) Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatins in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. Aquat. Toxicol. 80: 405-415

Steinberg R (1946) Mineral requirement of Lemna minor. Plant Physiol 21: 42-48

Teisserie H, Guy V (2000) Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). Plant Sci 153: 65-72

Thompson JE, Legge RL, Barber RF (1987) The role of free radicals in senescence and wounding. New Phytol 105: 317-344

Titov AF, Talanova VV, Boeva NP (1996) Growth responses of barley and wheat seedlings to lead and cadmium. Biol Plant 38: 431-436

Tripati RD, Smith S (2000) Effect of chromium (VI) on growth and physiology of giant duckweed *Spirodella polyrrhiza* (L.) Schileiden. U: Environmental Stress: Indication, Mitigation and Eco-Conservation. Yunus MN, Singh L, de Kok J (ur). Kluwer Academic Publishers. The Northlands, str 195-205

Vajpayee P, Tripathi RD, Rai UN, Ali MB, Singh SN (2000) Chromium VI accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. Chemosphere 41: 1075-1082

Weckx JEJ, Clijsters HMM (1996) Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amount of copper. Physiol Plant 96: 506-512

Woźny A, Jerczyńska E (1991) The effect of lead on early stages of *Phaseolus vulgaris* L. growth *in vitro* conditions. Biol Plant 33: 32-39

Zoronza P, Robles S, Martin N (1999) Alleviation of nickel toxicity by ammonium supoly to sunflower plants. Plant Soil 208: 221-226